

Luis Gabriel Balieiro

**ADSORÇÃO COMPARATIVA DE OVALBUMINA E ALBUMINA DE SORO
BOVINO SOBRE FILMES DE FOSFOLIPÍDIOS E ÁCIDO GRAXO.**

Mestrado em Ciências

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras – Universidade Estadual de São Paulo

Ribeirão Preto

2002

Luis Gabriel Balieiro

**ADSORÇÃO COMPARATIVA DE OVALBUMINA E ALBUMINA DE SORO
BOVINO SOBRE FILMES DE FOSFOLIPÍDIOS E ÁCIDO GRAXO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Área de concentração: Química).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

Mestrado em Ciências

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras – Universidade Estadual de São Paulo

Ribeirão Preto

2002

Comissão Julgadora:

Agradecimentos

A Deus

À mamãe, que lutou muito pra me manter na escola...

À minha família, pela ajuda e compreensão,

À Bete, pela orientação, compreensão, integridade e generosidade

Ao Luciano e à Taís, que me ajudaram e ensinaram muito

À Thati, à Ju, ao Rodrigo, à Viviane, à Ana Paula, pela amizade e companheirismo

Aos meus amigos e alunos, que tiveram muita paciência com meu estresse

RESUMO

Título: Adsorção Comparativa de Ovoalbumina e Albumina de Soro Bovino sobre Filmes de Fosfolipídios e Ácido Graxo.

Autor: Luis Gabriel Balieiro

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

Palavras chave: ovoalbumina, albumina de soro bovino, adsorção, filmes Langmuir-Blodgett

Este trabalho relaciona-se ao estudo da adsorção a partir de solução de proteínas sobre filmes Langmuir-Blodgett (LB) de diferentes lipídios. Nestes filmes camadas monomoleculares orientadas de lipídios podem ser convenientemente transferidas uma a uma para substrato sólido. O objetivo do trabalho foi estudar a adsorção comparativa das proteínas globulares ovoalbumina (OVA) e albumina de soro bovino (BSA) sobre diferentes superfícies de fosfolipídios e ácidos graxos. Foram utilizados os fosfolipídios: ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA) e ácido dilauoil fosfatídico (DLPA) (nas formas de sais de sódio) e os ácidos graxos: araquídico (AA), esteárico (AE) e behênico (AB), sendo as monocamadas formadas sobre água pura e sobre solução de íons Zn^{2+} . A caracterização das monocamadas na interface líquido-ar foi feita através das isotermas de pressão de superfície, enquanto a transferência das mesmas para substratos sólidos foi seguida através da técnica de microbalança a cristal de quartzo. Esta técnica também foi empregada na determinação das densidades superficiais das proteínas para o levantamento das curvas de cinética e isotermas de adsorção. Os resultados puderam comprovar que embora as superfícies em todos os casos fossem hidrofóbicas, a adsorção difere consideravelmente. As isotermas e cinéticas de adsorção para a OVA mostram que a densidade superficial da proteína adsorvida é diferente para os lipídios utilizados. OVA adsorve mais nos filmes de fosfolipídios do que no ácido esteárico para tempos de adsorção de até 50 minutos, e entre os fosfolipídios, adsorve mais em DLPA do que em DMPA. Desta forma, não só a natureza hidrofóbica da interface é importante na adsorção da proteína, como também o grau de mobilidade da superfície. Na concentração de 0,02 mg/ml BSA e OVA fixam-se por mais tempo na superfície de ácido esteárico do que na superfície de DMPA. OVA, uma glicoproteína, fixa-se por mais tempo do que a BSA independente do lipídio que constitui o filme.

ABSTRACT

Title: Comparative study of ovalbumin and bovine serum albumin adsorption on phospholipids and fatty acid films.

Author: Luis Gabriel Balieiro

Adviser: Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

Keywords: ovalbumin, serum bovine albumin, adsorption, Langmuir-Blodgett films

This work is related to the study of the adsorption from solution of globular proteins on Langmuir Blodgett (LB) films of different lipids. In these films, monomolecular oriented layers can be conveniently transferred, one by one, to a solid substrate. The objective of this work was to study the comparative adsorption of globular proteins, ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA) on different phospholipids and fatty acids Langmuir-Blodgett films. The phospholipids used were dimiristoil phosphatidic acid (DMPA) and dilauoil phosphatidic acid (DLPA) (sodium salt forms) and the fatty acids: arachidic (AA), estearic (AE) and behenic (AB), being the monolayers formed on pure water and on aqueous Zn^{2+} solution. Surface pressure isotherms were used to characterize the monolayers at the liquid-air interface. The transference of them to solid substrates was followed through the quartz crystal microbalance technique. This technique was also used to determine the surface densities of the proteins for the kinetics and isotherms of adsorption on solid substrates. The results confirm that the adsorption is dependent on the lipid used to prepare the films, although the surfaces, in all the cases, were hyrophobic. The kinetic and isotherms for the adsorption of OVA show that the surface density of the protein is different depending on the lipid forming the LB film. The surface density of OVA is higher on phospholipid films than in the estearic acid up to adsorption periods of 50 minutes. Also this protein adsorbs more in DLPA than in DMPA LB films. Thus, not only the hydrophobic nature of the interface is important in the adsorption of the protein, but the mobility degree of the surface. For bulk concentrations of 0.2 mg/ml, BSA and OVA remain adsorbed longer periods on the surface of estearic acid than on the surface of DMPA. Also, despite both proteins are globular and soluble in water, OVA, a glycoprotein, adsorbs for longer periods compared to BSA, independent of the lipid that constitutes the film.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	13
Capítulo 1 - Apresentação e Objetivos.....	15
1.1. Apresentação	15
1.2. Objetivos.....	15
1.2.1. Objetivo Geral.....	15
1.2.2. Objetivos específicos	16
Capítulo 2 - Membranas biológicas	17
2.1. Membranas Biológicas.....	17
2.2. Composição das membranas	18
2.2.1. Lipídios.....	18
2.2.1.1. Lipídios estruturais de membrana	18
2.2.2. Proteínas.....	19
2.2.2.1. Proteínas estruturais de membrana	21
2.2.2.2. Proteínas globulares e não globulares	21
2.2.2.3. Proteínas utilizadas neste trabalho.....	22
2.2.2.3.1. Ovalbumina (OVA)	22
2.2.2.3.2. Albumina de soro bovino (BSA)	23
2.3. Arquitetura estrutural das membranas	23
Capítulo 3 - Adsorção de macromoléculas	26
3.1. Adsorção.....	26
3.2. Proteínas na interface	26
3.3. A energia de Gibbs no Processo de Adsorção	27

3.4.	A estrutura tridimensional das proteínas e o processo de adsorção	27
3.5.	O papel das estruturas secundárias.....	27
3.6.	O efeito hidrofóbico.....	29
3.7.	Pontos de contato entre as proteínas e o substrato	31
3.8.	Outros fatores que influenciam na adsorção de proteínas	32
3.9.	Isotermas de adsorção.....	33
3.10.	Cinéticas de adsorção.....	34
3.11.	Dessorção.....	36
Capítulo 4 - Monocamadas de Langmuir e filmes LB.....		38
4.1.	Sistemas de modelos de membranas.....	38
4.2.	Filmes de Langmuir-Blodgett.....	38
4.3.	Revisão bibliográfica.....	39
4.4.	Espalhamento na interface líquido-ar	41
4.5.	Cuba de Langmuir	42
4.6.	Isotermas superficiais	43
4.7.	Formação dos filmes	46
Capítulo 5 - Métodos experimentais para investigação da adsorção de proteínas na interface.....		47
5.1.	Introdução	47
5.2.	Microbalança a cristal de quartzo.....	47
Capítulo 6 - Parte Experimental		50
6.1.	Descrição geral dos experimentos realizados	50
6.2.	Preparação das monocamadas na interface líquida	50
6.3.	Formação de filmes LB	52
6.4.	Cinética e isoterma de adsorção de ovoalbumina (OVA) e albumina de soro	

bovino (BSA)	53
Capítulo 7 - Resultados e Discussão	54
7.1. Caracterização das monocamadas	54
7.2. Deposição dos lipídios na forma de filmes LB.....	59
7.2.1. Avaliação do processo de transferência.....	59
7.2.2. Tipo de filmes obtidos	61
7.2.3. Massa transferida.....	61
7.3. Deposição da OVA sobre filmes LB	63
7.3.1. Isotermas de adsorção.....	63
7.3.2. Cinéticas de adsorção.....	68
7.4. Cinéticas de adsorção de BSA e OVA em filmes LB de Zn^{2+}/$\frac{1}{2}$DMPA e Zn^{2+}/$\frac{1}{2}$AE	72
Capítulo 8 - Conclusão	76
Bibliografia	78

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
Tabela 1	Fatores de compressibilidade isotérmico superficial (em mN/m) para as monocamadas de ácidos graxos na pressão superficial de 30 mN/m.	57
Tabela 2	Características das deposições de monocamadas dos diferentes lipídios sobre cristais de quartzo recobertos por ouro utilizados na técnica de MCQ.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
Figura 1	Reação de condensação de dois aminoácidos.	19
Figura 2	Estrutura da Ovalbumina.	22
Figura 3	Estrutura da Albumina de soro bovino.	23
Figura 4	Modelo do mosaico fluido para a estrutura de uma membrana biológica.	24
Figura 5	Polímero adsorvido na superfície, com a formação de trens, laços e caudas.	32
Figura 6	Classificação de isotermas padrão.	33
Figura 7	Representação esquemática do processo de adsorção de proteínas.	35
Figura 8	Esquema da cuba de Langmuir utilizada.	42
Figura 9	Representação de uma isoterma de pressão de superfície, mostrando os diversos estágios de compressão.	43
Figura 10	Formação da primeira camada de um filme LB nos processos de imersão e emersão do substrato sólido.	45
Figura 11	Tipos de filmes obtidos no processo vertical (Langmuir Blodgett) de deposição de monocamadas.	46

Figura 12	Microbalança a cristal de quartzo com eletrodo de ouro montado em suporte.	48
Figura 13	Fluxograma da parte experimental.	50
Figura 14	Estrutura das moléculas DMPA; DLPA; AA; AE e AB.	52
Figura 15	Isotermas de pressão superficial para monocamadas de ácido araquídico formadas sobre água pura (preto) e sobre solução de zinco $1, 0.10^{-4}$ mol/l (vermelho).	55
Figura 16	Isotermas de pressão superficial para monocamadas de ácido beênico formadas sobre água pura (preto) e sobre solução de zinco $1, 0.10^{-4}$ mol/l (vermelho).	55
Figura 17	Isotermas de pressão superficial para monocamadas de ácido esteárico formadas sobre água pura (preto) e de solução de zinco $1, 0.10^{-4}$ mol/l (vermelho).	56
Figura 18	Isotermas de pressão superficial para monocamadas de DLPA formadas sobre água pura (preto) e de solução de acetato de zinco $1, 0.10^{-4}$ mol/l (vermelho).	58
Figura 19	Isotermas de pressão superficial para monocamadas de DMPA formadas sobre água pura (preto) e sobre solução de acetato de zinco $1, 0.10^{-4}$ mol/l (vermelho).	58
Figura 20	Massas de $Zn^{2+}_{1/2}AB$, $Zn^{2+}_{1/2}AA$ e $Zn^{2+}_{1/2}AE$, depositadas por camada (número de deposições) na forma de filmes LB.	60

Figura 21	Massas de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ e $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$, depositadas por camada (número de deposições) na forma de filmes LB.	60
Figura 22	Isoterma de adsorção para ovalbumina em filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ (cinco camadas).	64
Figura 23	Isoterma de adsorção para ovalbumina em filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$ (cinco camadas).	66
Figura 24	Isoterma de adsorção para ovalbumina em filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$ (cinco camadas).	67
Figura 25	Cinética de adsorção de OVA sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$.	69
Figura 26	Cinética de adsorção de OVA sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$.	70
Figura 27	Cinética de adsorção de OVA sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$.	71
Figura 28	Cinéticas de adsorção de BSA e OVA na concentração de 0,02 mg/ml sobre superfícies de filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ e $Zn^{2+}_{1/2}AE$.	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquídico
AB	Ácido beênico
AE	Ácido esteárico
BSA	Albumina de soro bovino
DMPA	Ácido dimiristoil fosfatídico
DLPA	Ácido dilauroil fosfatídico
OVA	Ovalbumina
Zn²⁺_{1/2}AA	Araquidato de zinco
Zn²⁺_{1/2}AB	Beeniato de zinco
Zn²⁺_{1/2}AE	Estearato de zinco
Zn²⁺_{1/2}DMPA	Filmes de DMPA formados a partir de solução contendo íons zinco
Zn²⁺_{1/2}DLPA	Filmes de DLPA formados a partir de solução contendo íons zinco
c_p	concentração da proteína em solução.
Cs⁻¹	Coefficiente de compressibilidade isotérmica de superfície.
D	coeficiente de difusão
LB	Langmuir-Blodgett

MCQ	Microbalança a cristal de quartzo
t	tempo de contato entre a solução protéica e a superfície
Γ	densidade superficial da proteína
γ_0	Tensão superficial da subfase suporte sem a monocamada
π	Pressão superficial
μ_q	módulo de cisalhamento do quartzo ($2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$)
ρ_q	densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^{-3}$)
ΔG_{esp}	Energia livre de espalhamento
$\Delta_{\text{ads}}G$	Energia livre de Gibbs de adsorção
$\Delta_{\text{ads}}H$	Variação de entalpia para o processo de adsorção
$\Delta_{\text{ads}}S$	Variação de entropia para o processo de adsorção
$S_{g/i}$	Coefficiente de espalhamento da substância g na interface líquida
F_0	freqüência fundamental do cristal de quartzo em Hz antes da deposição ou adsorção.
C_A	$2,26 \times 10^{-6} F_0^2 \text{ Hz cm}^2 \text{ g}^{-1}$, constante usada na equação de Suaerbrey para uso na microbalança a cristal de quartzo.

Capítulo 1 - Apresentação e Objetivos

1.1. Apresentação

As unidades estruturais básicas de todos os organismos vivos são chamadas células. As células de organismos diferentes e os vários tipos celulares dentro de um mesmo organismo podem ser muito diferentes entre si, em estrutura e função. Apesar disso, uma característica comum a todas as células é a presença das membranas biológicas. Estas membranas, entre outras coisas, permitem às células isolarem-se do meio em que se encontram, sendo este possivelmente o principal fator no surgimento dos processos de autoorganização celulares que estão na base dos fenômenos da vida e da evolução biológica.

O estudo destas membranas pode ser feito através do uso de membranas integrais, obtidas de extratos celulares; ou através da elaboração de sistemas de modelos simplificados que imitam o funcionamento, ou aspectos dele, das membranas existentes na natureza.

Numerosos sistemas de modelos de membranas têm sido desenvolvidos com o intuito de mimetizar as membranas biológicas. Podemos citar: micelas, monocamadas líquidas, bicamadas, lipossomos ou vesículas.

Este trabalho relaciona-se ao estudo da adsorção a partir de solução de proteínas sobre filmes Langmuir-Blodgett (LB) de lipídios. Nestes filmes camadas monomoleculares orientadas de lipídios podem ser convenientemente transferidas uma a uma para substrato sólido.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

- Estudar o reconhecimento de diferentes superfícies de fosfolipídios e ácidos graxos pelas proteínas globulares ovalbumina (OVA) e albumina de soro bovino (BSA).

1.2.2. Objetivos específicos

- Levantar curvas (isotermas) de pressão superficial para monocamadas dos fosfolípidios ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA) e ácido dilauroil fosfatídico (DLPA) (formas de sais de sódio) e para os ácidos graxos: araquídico (AA) ($C_{19}H_{39}COOH$), esteárico (AE) ($C_{17}H_{35}COOH$) e beênico (AB) ($C_{21}H_{43}COOH$), quando formadas sobre água pura e sobre solução de íons Zn^{2+} .
- Levantar isotermas e cinética de adsorção de ovalbumina (OVA) e albumina de soro bovino (BSA) sobre filmes LB dos diferentes lípidios citados acima, utilizando para a quantificação das massas depositadas a técnica de microbalança a cristal de quartzo (MCQ).

Capítulo 2 - Membranas biológicas

2.1. Membranas Biológicas

As membranas biológicas são estruturas flexíveis e fluidas [1], compostas principalmente de proteínas e lipídios, que compõem a estrutura de todas as células animais e vegetais. Elas basicamente definem os limites internos e externos das células. Não são, porém, simples barreiras passivas, mas desempenham funções essenciais à vida da célula que delimitam: movimentam íons inorgânicos ou solutos orgânicos específicos através da membrana; recebem sinais extracelulares que, através dos receptores localizados na membrana, promovem alterações moleculares intracelulares; convertem uma forma de energia em outra [1-4].

As proteínas e lipídios que compõem as membranas são distribuídos em proporções relativas diferentes em diferentes membranas, acompanhando a grande diversidade de papéis biológicos que exercem. Os lipídios, que exercem uma função estrutural, perfazem de 20% a 80% da massa da membrana, enquanto o restante é composto, em sua maioria, de proteínas [1, 3, 5, 6], que exercem várias funções. Há ainda uma pequena quantidade de carboidratos, não maior do que 10% do peso total da membrana, que geralmente é parte dos glicolipídios ou das glicoproteínas [2] A diversidade de distribuição dos componentes das membranas faz com que seja notável a sua diversidade.

Devido às diferentes propriedades das proteínas e lipídios presentes nas membranas, e aos modos de interação destes entre si, com os componentes citoplasmáticos e com as substâncias presentes no meio extracelular, as membranas exercem vários papéis biológicos, consoantes com aquelas propriedades. Assim, podemos entender suas funções através do estudo de sua composição.

Por exemplo: a movimentação de substâncias entre o interior e o exterior da célula, que podemos chamar de *regulação seletiva*, pode ser entendida como consequência de um

conjunto de propriedades de permeabilidade bastante peculiares: em vista dos lipídios que a compõem, as membranas são permeáveis às moléculas lipossolúveis. Como resultado da ação das proteínas que entram em sua estrutura, as membranas são permeáveis à água, mas intrinsecamente impermeáveis a moléculas polares e íons eletricamente carregados. Essas moléculas e íons somente atravessam as membranas se houver sistemas de transporte específicos, ou transportadores.

2.2. Composição das membranas

2.2.1. Lipídios

Os lipídios são os compostos biológicos que têm como característica a baixa solubilidade em água, sendo muito solúveis em solventes não polares. Esta característica é comum a todos os lipídios, mesmo que, quimicamente, eles possam ser muito diferentes entre si. São encontrados em vitaminas lipossolúveis e em ácidos graxos essenciais contidos nas gorduras dos alimentos. Atuam como isolantes térmicos e elétricos. Servem ainda como formas de armazenamento de energia (tecido adiposo) e também como fonte direta de energia. Em junção com proteínas formam as membranas celulares e os transportadores de lipídios no sangue.

2.2.1.1. Lipídios estruturais de membrana

As membranas biológicas têm como característica arquitetônica central uma dupla camada lipídica. Esta bicamada lipídica organiza-se em função de uma característica dos lipídios que a formam: eles são anfipáticos ou anfifílicos, ou seja, possuem uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica, cuja orientação dirige o grupamento destes lipídios na formação das bicamadas. Devido à presença dessas duas regiões, esses compostos, em meio aquoso, formam os chamados “agregados lipídicos”, nos quais as partes hidrofóbicas permanecem em contato uma com a outra e as partes hidrofílicas interagem com a água. Com isso, reduzem a parte hidrofóbica em contato com a água, diminuindo o número de moléculas

na camada de hidratação e resultando em uma maior entropia, favorecendo termodinamicamente a formação destas estruturas.

A parte lipídica das membranas é formada por diferentes espécies de lipídios. As membranas das células animais contêm principalmente glicerofosfolípidios cuja parte hidrofóbica por é constituída por uma cadeia dupla de dois ácidos graxos ligados ao glicerol e, a extremidade hidrofílica, por grupos polares ou carregados nas suas extremidades polares, ou ainda grupos fosfatos. Em menores quantidades, estas membranas podem também trazer esfingolipídios, que são constituídos por um único ácido graxo unido a uma amina (esfingorina) e na região hidrofílica também portam álcoois polares ou carregados, ou ainda grupos fosfatos. Aparecem também os esteróis, sendo o colesterol o mais importante, formado por um grupo polar (hidroxila) e um grupo apolar hidrocarbônico. Cada tipo de membrana de qualquer célula animal possui uma composição lipídica constante e característica [1, 5].

2.2.2. Proteínas

As proteínas são macromoléculas formadas pela polimerização de aminoácidos. Estes aminoácidos são unidos através de ligações peptídicas entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxílico de outro aminoácido com a eliminação de uma molécula de água (condensação). (Ver figura 1)

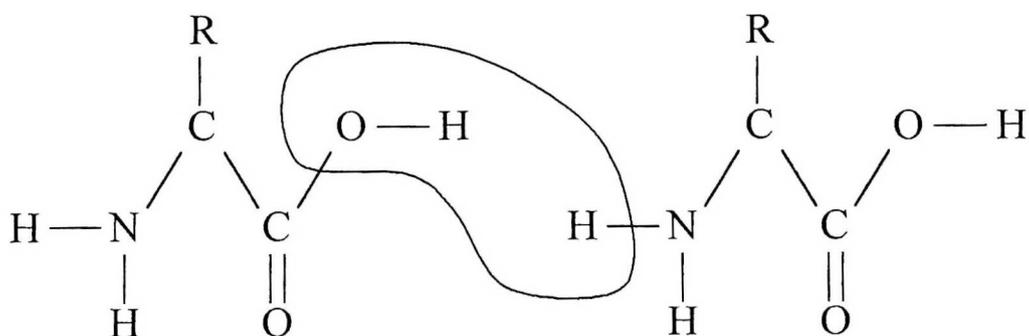


Figura 1: Reação de condensação de dois aminoácidos.

Após esta condensação os aminoácidos são chamados de resíduos (pois não são mais aminoácidos, mas sim resíduos dos aminoácidos originais). As proteínas são formadas por cadeias longas que variam de 50 a 2000 resíduos [3]. Apesar da grande diversidade de proteínas, todas elas são formadas por 20 tipos de aminoácidos [1, 3, 5]. Esses aminoácidos possuem uma composição semelhante, em que R é uma cadeia lateral.

Os aminoácidos podem ser classificados em função das características químicas e estruturais dos grupos R em 3 grandes classes:

- aminoácidos com cadeia lateral apolar
- aminoácidos com cadeia lateral ionizada
- aminoácidos com cadeia lateral sem carga

As características das cadeias laterais (R) são responsáveis pela auto organização da proteína, que é influenciada pela tendência da proteína em segregar regiões apolares do contato com o meio polar [7]. A diferença em composição e sequência de seus aminoácidos define suas diferentes funções ou atividades biológicas.

A estrutura da proteína é dividida em quatro níveis:

(1) a estrutura primária, que é definida pela sequência dos aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica;

(2) a estrutura secundária, dada pelo arranjo espacial da cadeia polipeptídica sem levar em consideração as cadeias laterais. Estes arranjos podem se dar na forma de hélices, folhas e dobras, de geometrias diversas;

(3) a estrutura terciária, definida pelo arranjo tridimensional de toda a proteína, ou seja, a disposição espacial das estruturas secundárias e cadeias laterais.

(4) a estrutura quaternária, que é o nome dado ao arranjo espacial das subunidades das proteínas formadas por mais de uma unidade polipeptídica.

2.2.2.1. Proteínas estruturais de membrana

As proteínas de membrana diferem quanto à associação com a estrutura da membrana. Existem as proteínas periféricas ou extrínsecas, que se ligam fracamente à superfície da membrana através de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com os domínios hidrofílicos das proteínas integrais de membrana e, talvez, com as extremidades polares dos lipídios de membrana. São geralmente solúveis em solventes polares e usualmente fáceis de extrair da membrana.

As proteínas integrais ou intrínsecas, que são embebidas na estrutura da membrana e podem se estender completamente através dela, são, geralmente, insolúveis em água, qualidade que lhes advém da presença, em sua composição, de domínios ricos em aminoácidos hidrofóbicos [8]. Estes domínios são também responsáveis pela sua forte ligação com a membrana, através de interações hidrofóbicas que permitem que se estabeleçam ligações entre a proteína e os lipídios da membrana. Geralmente toma-se a presença de longas regiões hidrofóbicas em uma proteína integral de membrana como índice ou evidência de que aquela proteína atravessa a bicamada lipídica.

Existem ainda as proteínas ancoradas, que estão ligadas covalentemente a um lipídio. Tanto as proteínas integrais como as ancoradas são mais difíceis de serem extraídas das membranas, requerendo o uso de tensoativos ou solventes orgânicos [9-17].

2.2.2.2. Proteínas globulares e não globulares

As proteínas também podem ser classificadas com base na sua forma. Assim as proteínas globulares são macromoléculas que apresentam uma ou mais cadeias peptídicas organizadas em uma forma final aproximadamente esférica e compacta. São geralmente solúveis em meio aquoso, com característica coloidal. Muitas enzimas e proteínas de transporte são exemplos dessa classe de macromoléculas.

As proteínas não globulares, ou fibrosas, apresentam forma alongada e de maior

complexidade estrutural. São geralmente insolúveis e desempenham um papel basicamente estrutural, mas podem exercer outras funções nos sistemas biológicos, como a de proteínas de reserva. São exemplos dessas proteínas: o colágeno, a queratina, entre outras, de origem animal; e as ligninas, entre outras, de origem vegetal

2.2.2.3. Proteínas utilizadas neste trabalho

As duas proteínas globulares utilizadas para estudo neste trabalho foram: a albumina de soro bovino (BSA) e a ovalbumina (OVA).

2.2.2.3.1. Ovalbumina (OVA)

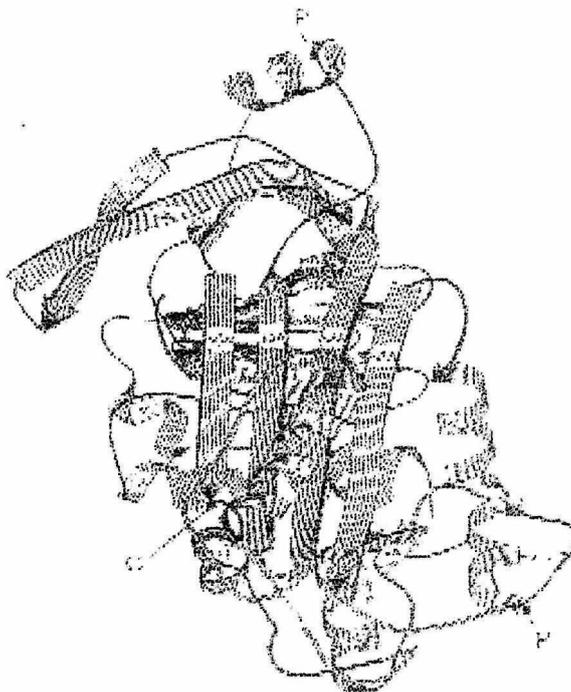


Figura 2 : Estrutura da Ovalbumina

A ovoalbumina (OVA) é uma glicoproteína, que constitui a maior parte (75%) da clara do ovo de aves. Tem massa molar de 45000 g/mol [18] e, estruturalmente, é uma proteína complexa formada por uma cadeia polipeptídica de 385 resíduos de aminoácidos (dos quais

aproximadamente metade são hidrofóbicos), contendo ainda um máximo de dois resíduos fosfatos por mol e uma cadeia lateral oligossacarídea composta apenas de resíduos de manoses e glucosaminas. Sua molécula possui uma forma aproximadamente elipsoidal com dimensões globais de 70 Å x 45 Å x 50 Å. É uma proteína globular solúvel em água e seu ponto isoelétrico é $4,7 \pm 2$ [18].

2.2.2.3.2. Albumina de soro bovino (BSA)

A albumina de soro bovino (BSA) não é uma glicoproteína e constitui a proteína mais abundante do plasma de bovinos. Apresenta 585 resíduos de aminoácidos e é caracterizada através do baixo conteúdo de triptofano e metionina e do alto conteúdo de cisteína e aminoácidos carregados. A molécula de BSA possui uma massa molar de 66700 ± 400 g/mol [18-20] e sua forma é aproximadamente um elipsóide (prolato) [20] com dimensões de 40 Å x 40 Å x 140 Å [20, 21]. É uma proteína globular solúvel em água e seu ponto isoelétrico é $4,9 \pm 2$ [18, 20].

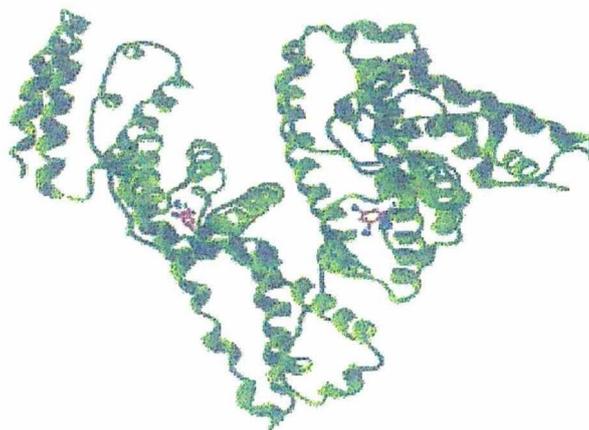


Figura 3 : Estrutura da Albumina de Soro Bovino

2.3. Arquitetura estrutural das membranas

Em 1972, S. Jonathan Singer e Garth Nicholson propuseram um modelo em mosaico fluido [1, 3, 4] (ver Figura 4) para a organização global das membranas biológicas. Essa

proposta foi apoiada por uma ampla variedade de observações experimentais e por evidências que provieram da aplicação da microscopia eletrônica ao estudo da estrutura da membrana.

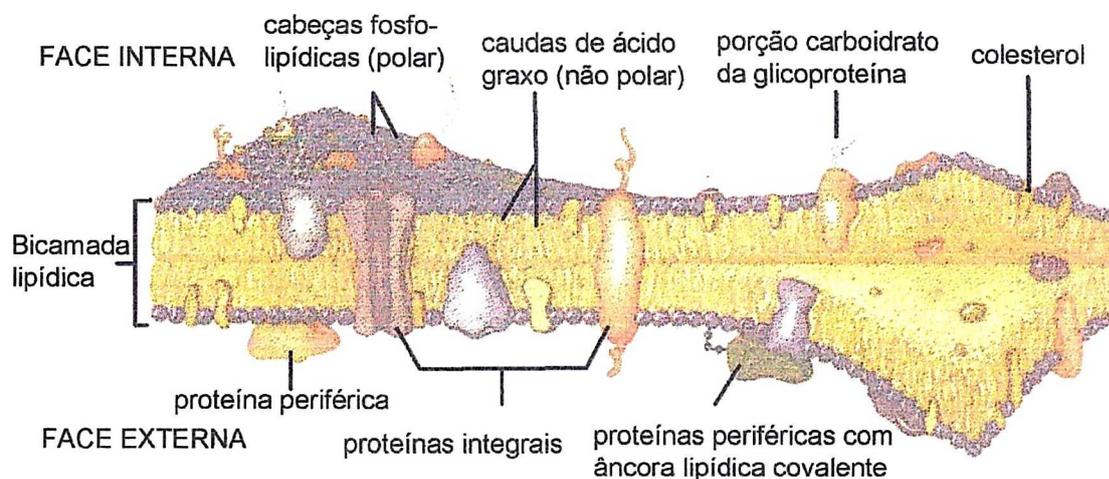


Figura 4: Modelo do mosaico fluido para a estrutura de uma membrana biológica. (retirado de [1])

Eles propuseram que a matriz, ou a parte contínua da membrana, fosse uma bicamada de lipídios polares, com a parte apolar desses lipídios voltada para dentro da bicamada e a parte polar voltada para fora. As proteínas integrais de membrana estariam imersas na bicamada lipídica, associando-se com as cadeias apolares dos lipídios através de interações hidrofóbicas. Por outro lado, o modelo propõe que as proteínas periféricas ligam-se à superfície da membrana por pontes de hidrogênio ou interações iônicas, estabelecidas com grupamentos polares dos lipídios anfipáticos da bicamada.

A bicamada seria fluida porque as caudas hidrofóbicas de seus lipídios polares seriam constituídas de uma mistura apropriada de derivados de ácidos graxos saturados e insaturados que é fluida na temperatura normal da célula. A fluidez da membrana variaria com o comprimento das cadeias carbônicas de seus lipídios e o grau de insaturação delas.

Estas duas variáveis interagiriam com a temperatura [1-4] da seguinte maneira: à medida que a temperatura aumenta, a parte hidrofóbica das cadeias passa de um estado ordenado para um desordenado, ficando fluida. Essa temperatura onde ocorre a mudança de

estado é chamada de “temperatura de transição”. Quando a composição da bicamada exhibe em maior proporção lipídios com cadeias longas e/ou saturadas, apresentam uma “temperatura de transição” mais elevada, porque necessitam de uma maior temperatura para atingir a fluidez. A presença de cadeias mais curtas e/ou insaturadas faz com que a “temperatura de transição” diminua, ou seja, estas membranas necessitam de temperaturas menores para atingir a fluidez.

Um outro fator adicional que regula a fluidez das membranas é a presença de colesterol [1-4]. Suas moléculas entram em contato com a bicamada lipídica, interagindo sua hidroxila com os grupos polares dos fosfolipídios e seus anéis rígidos com as cadeias carbônicas. Abaixo da “temperatura de transição” seus anéis rígidos impedem o agrupamento ordenado das cadeias carbônicas, induzindo a desordem. Acima da “temperatura de transição” ele produzirá um efeito condensante, reduzindo a movimentação das cadeias carbônicas

Este modelo permite ainda admitir que as proteínas de membrana movam-se lateralmente, uma vez que suas ligações com os lipídios da membrana não são covalentes. Esse movimento lateral, entretanto, pode ser restringido pela atração entre proteínas funcionalmente relacionadas, quando elas formam aglomerados interatuantes.

Capítulo 3 - Adsorção de macromoléculas

3.1. Adsorção

O acúmulo de moléculas ou átomos de uma substância (adsorbato) em uma superfície (adsorvente) é chamado *adsorção*. São duas as maneiras pelas quais as moléculas ou átomos podem se ligar a uma superfície sólida: por adsorção química ou por adsorção física. Quando as interações entre a substância e a superfície são do tipo dispersivas, isto é, aquelas que envolvem ligações tipo London e van der Waals, (dipolo induzido-dipolo induzido e dipolo-dipolo induzido) temos a adsorção física. Quando a interação ocorre por meio de ligações covalentes temos a adsorção química.

3.2. Proteínas na interface

É bem reconhecido o fenômeno pelo qual proteínas em solução aquosa, quando expostas a uma superfície sólida, acumulam-se numa interface sólido-líquido. O entendimento deste processo é extremamente relevante para todas as áreas em que estas interfaces representem papel crucial, como as ciências médicas, a biotecnologia e a engenharia biomédica, as ciências ambientais, etc. Este entendimento esclarece processos como a iniciação da coagulação sanguínea e a adesão de células bacterianas às superfícies, mas também se aplica ao desenvolvimento de lentes de contato melhores, à correção de falhas em processadores industriais de alimentos, ao aperfeiçoamento da biocompatibilidade de implantes, e muitas outras [22-24].

Muitas variáveis determinam a tendência das proteínas a se acumularem em interfaces, entre elas a temperatura, o tamanho e as propriedades das moléculas protéicas e das moléculas da superfície, a estabilidade iônica, o pH, a natureza do solvente e de outros componentes no meio [22-24].

3.3. A energia de Gibbs no Processo de Adsorção

Sob temperatura e pressão constantes, o processo de adsorção somente ocorrerá espontaneamente se a energia de Gibbs (G) do sistema decrescer.[22-25]. De maneira análoga a outros processos, a variação de energia livre de adsorção relaciona-se com as variações de entalpia, ΔH_{ads} , e entropia, ΔS_{ads} , que acompanham o processo de adsorção:

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T\Delta S_{ads}$$

3.4. A estrutura tridimensional das proteínas e o processo de adsorção

A estrutura tridimensional de uma proteína decorre das interações entre os segmentos e átomos que a compõe. Algumas das interações que determinam a estrutura tridimensional de uma molécula de proteína sustentam uma conformação compacta, enquanto outras tendem a expandir a molécula. Numa solução aquosa, as partes hidrofóbicas da proteína são enterradas tanto quanto possível no interior da molécula, resultando numa conformação estrutural compacta.

No estado adsorvido, por outro lado, os resíduos hidrofóbicos podem se expor na superfície do solvente, ainda protegidos de água. Portanto, se a estrutura compacta estiver estabilizada pelas ligações hidrofóbicas intramoleculares, deverá aparecer uma estrutura expandida no momento da adsorção. Dependendo da contribuição das ligações intramoleculares hidrofóbicas em relação às outras interações, haverá uma mudança na estrutura das moléculas de proteína adsorvidas, ou uma estabilização global da estrutura protéica na solução.

3.5. O papel das estruturas secundárias

As estruturas secundárias da proteína, como α -hélice e folha β , serão estabilizadas pelas interações entre os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Assim, uma redução das ligações intramoleculares hidrofóbicas poderá causar uma diminuição de tais estruturas

secundárias, resultando num aumento da liberdade rotacional e, conseqüentemente, num ganho de entropia, que aumenta a energia livre de Gibbs (ΔG) no sistema, tornando esta redução uma das principais razões para a adsorção espontânea da proteína.

Proteínas em seu estado natural, no entanto, são moléculas estruturalmente ordenadas, o que pode dificultar o processo de adsorção. Assim, é comum que hajam alterações parciais na estrutura das proteínas durante este processo, e, mesmo, que estes rearranjos desempenhem nele um papel crucial, uma vez que aumentam a entropia conformacional, contribuindo também para a diminuição de ΔG [22-25].

Em proteínas nativas a liberdade conformacional da cadeia polipeptídica é muito inferior do que na conformação expandida. O número de conformações distintas (livres) em α -hélice ou folha β de uma proteína é aproximadamente um quarto daquelas num polipeptídeo presente na conformação enovelada ao acaso [23]. Na maioria das proteínas globulares, 40-70% da cadeia polipeptídica assume a forma de α -hélice ou folha β . Assumindo serem possíveis quatro conformações por unidade peptídica na estrutura expandida, e somente uma em α -hélice ou folha β , no segundo caso, a perda de entropia conformacional por unidade peptídica é de: $R \ln (1/4) = 11,53 \text{ kJ}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Para uma proteína de 100 resíduos de aminoácidos, dos quais 50% estão na forma de α -hélice e folha β , essa quantidade corresponde a um aumento da ordem de centenas de $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ na energia livre de Gibbs [23, 24] à temperatura ambiente, devido à perda de entropia conformacional que desestabiliza a conformação nativa da proteína em relação à estrutura expandida.

Vários autores [26, 27] têm determinado a estrutura secundária em proteínas desorvidas usando espectros de dicroísmo circular (CD) e comparando com a molécula nativa. Foi encontrado que a α -hélice da soro-albumina após adsorvida em superfície de óxidos é 20-25% menor [26], e 50% do fibrinogênio em relação ao estado nativo [27]. BSA também sofre grandes alterações no estado adsorvido em sílica segundo Kondo *et al* [28], que

registrou uma redução de 20% em α -hélice em $\text{pH} = 7, 0$ e 40% em $\text{pH} = 4, 0$. Norde e Favier [20] encontraram 50 a 60% de redução, dependendo da superfície da cobertura. Para outras estruturas estáveis de proteína como ovalbumina [28] menores alterações estruturais na adsorção, de um modo geral, foram encontradas.

3.6. O efeito hidrofóbico

Outro mecanismo que interfere no processo de adsorção, é a desidratação dos componentes hidrofóbicos da proteína durante o dobramento sobre si mesma (“folding”) da cadeia polipeptídica – globulização – quando em solução aquosa. Esta desidratação decresce a energia de Gibbs do sistema, devido ao ganho na entropia das moléculas de água liberadas. Este “efeito hidrofóbico” [22] foi reconhecido primeiro por Kauzman que argumentou que este aumento da entropia favorece a forma globular da proteína. Este efeito é aceito hoje como a principal força motriz para a “globulização” das proteínas em água.

Entretanto, ainda que o “efeito hidrofóbico” e a entropia conformacional sejam os fatores dominantes, vários outros efeitos das interações moleculares interferem na conformação da proteína, o que faz com que a conformação globular compacta seja apenas marginalmente estável, especialmente porque, como argumentam Haynes & Norde [24], para proteínas com um único domínio (“single-domain proteins”), a conformação esférica compacta somente é estável, sob o ponto de vista termodinâmico, para valores de energia livre (na transição da forma nativa para a forma não globular) entre 20-100 KJmol^{-1} [24], o que é aproximadamente equivalente à energia requerida para a ruptura de 1 a 8 ligações de hidrogênio. Isto quer dizer que a expansão da cadeia protéica é um processo auto-alimentador, uma vez que o desdobramento de qualquer porção significativa da estrutura compacta libera energia suficiente para levar ao desdobramento de todo o resto.

Outro tipo de interação molecular que atua sobre a conformação da proteína está ligado às distorções do ângulo e tamanho ótimos das ligações de hidrogênio, que são

prováveis de ocorrer no estado compacto da proteína. Cálculos de valores de energia demonstram que distorções de ligações covalentes oferecem uma pequena mas significativa oposição para a estabilidade do estado nativo, da ordem de algumas dezenas de KJ por mol [29].

Outro fator a ser considerado advém do fato de que, em ambiente aquoso, as ligações de hidrogênio entre os grupos amina e a água são muitas vezes favorecidas sobre aquelas entre os grupos amina entre si. Vê-se, portanto, que em ambiente aquoso as ligações de hidrogênio não correspondem a uma força motriz para que a proteína permaneça em sua estrutura nativa [30].

Outro efeito importante é causado pelas cargas elétricas que as proteínas e a superfície de adsorção geralmente apresentam. As proteínas, devido à dissociação/associação dos resíduos ácidos ou básicos dos aminoácidos têm sua carga determinada pelo pH do meio. Em solução aquosa as proteínas e superfícies carregadas são rodeadas por íons de carga oposta, dando origem à estrutura de dupla camada elétrica [23]. Quando a proteína se aproxima da superfície, as camadas elétricas da proteína e superfície se sobrepõem, havendo uma redistribuição de cargas que afeta as constantes de associação/dissociação dos resíduos de aminoácidos adjacentes à superfície do solvente, causando mudanças na estabilidade da estrutura esférica compacta da proteína [32]. Esta mudança contribui para uma maior liberdade dos grupos laterais internos devido à perda do empacotamento, aumentando a entropia e diminuindo a energia livre. Experimentalmente [22, 23] encontra-se que a adsorção da proteína é aumentada nas vizinhanças do seu ponto isoelétrico, talvez por causa da carga e repulsão de cargas entre as moléculas adsorvidas serem minimizadas sob essas condições.

Vemos assim que os fatores predominantes na (des)estabilização da estrutura esférica compacta da proteína em solução aquosa são a perda da entropia conformacional relativamente ao estado expandido e a desidratação das partes hidrofóbicas das moléculas.

Contudo, dependendo da situação, outros tipos de interação molecular não podem ser desprezados.

Concluindo, o fator primário que determina a adsorção de proteínas em solução aquosa em superfícies sólidas é a estabilidade de sua estrutura. Proteínas com baixa estabilidade interna, chamadas “soft” proteínas, tendem a adsorver em todas as superfícies, devido ao ganho de entropia resultante dos rearranjos estruturais envolvendo perda de estruturas secundárias, desconsiderando qualquer outro efeito desfavorável. Superfícies mais hidrofóbicas induzem grandes perturbações na proteína em adsorção. O comportamento de proteínas com alta estabilidade, chamadas de “hard” proteínas, é governado por interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre a proteína e a superfície do substrato. Essas proteínas adsorvem bem em superfícies hidrofóbicas e devem sofrer mudanças estruturais na adsorção. Em superfícies hidrofílicas, elas adsorverão apenas se houver interações eletrostáticas em extensão suficiente.

3.7. Pontos de contato entre as proteínas e o substrato

As proteínas podem estabelecer numerosos pontos de contato com uma superfície adsorvente, especialmente em solução aquosa, em que, como vimos, a conformação esférica compacta tende à desestabilização. Assim, mesmo que cada ponto contribua com uma pequena quantidade de energia livre de Gibbs (ΔG), a perda de energia total resultante, para a molécula como um todo, pode ser suficientemente alta para produzir a adsorção.

Os segmentos de um macromolécula linearmente adsorvida são denominados de *trens*, *laços* e *caudas*. (Ver figura 5)

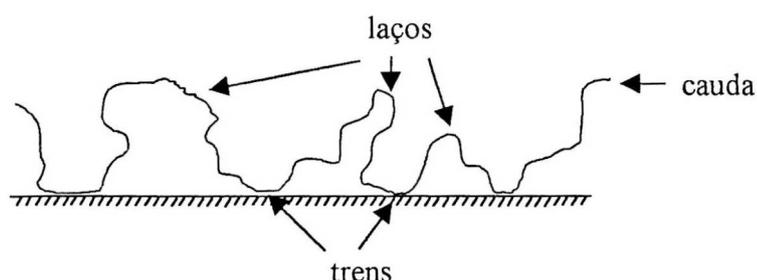


Figura 5: Polímero adsorvido na superfície, com a formação de trems, laços e caudas

Os segmentos que, consecutivos um ao outro, mantêm contato com a superfície, são chamados de *trens*. Os que mantêm contato apenas com o solvente, e tem suas duas extremidades ligadas, continuamente, a *trens*, são chamados de *laços*. Os segmentos que, nas extremidades da cadeia, tem contato com a superfície apenas em uma das pontas – ligada a um *trem* – tendo a outra ponta livre no solvente, são chamados de *caudas*. Os padrões de distribuição de *trens*, *laços* e *caudas* dependem de diversos parâmetros, como qualidade do solvente, massa molar, energia de adsorção por segmentos, etc. Entretanto, a própria arquitetura molecular pode definir a composição destes segmentos.

3.8. Outros fatores que influenciam na adsorção de proteínas

A adsorção de uma molécula de proteína também pode ser influenciada pela existência de moléculas já adsorvidas em lugares vizinhos, porque há uma redução da área disponível para a adsorção (pois os sítios da superfície tornaram-se ocupados), ou por causa das forças repulsivas que são esperadas pelo fato das moléculas estarem muito próximas. Estes fatores podem obrigar que a população adsorvida seja intrinsecamente heterogênea com respeito às interações proteína-superfície, causando diferentes modos de contato das moléculas adsorvidas.

Estudos têm demonstrado que também a hidrofobicidade da proteína influencia a adsorção em interfaces sólidas [33]. A variação da hidrofobicidade envolve concomitantemente a variação da composição química e da densidade de cargas. Devido às interações hidrofóbicas entre a superfície e os pacotes hidrofóbicos, geralmente aceita-se que

em solução aquosa todas as proteínas de soro mostram um alto grau de hidrofiliicidade. Assim, para uma superfície particular, algumas proteínas podem ter um tipo de resíduo que favorece mais a ligação do que os resíduos apresentados por outras proteínas, portanto adsorvendo mais.

3.9. Isotermas de adsorção

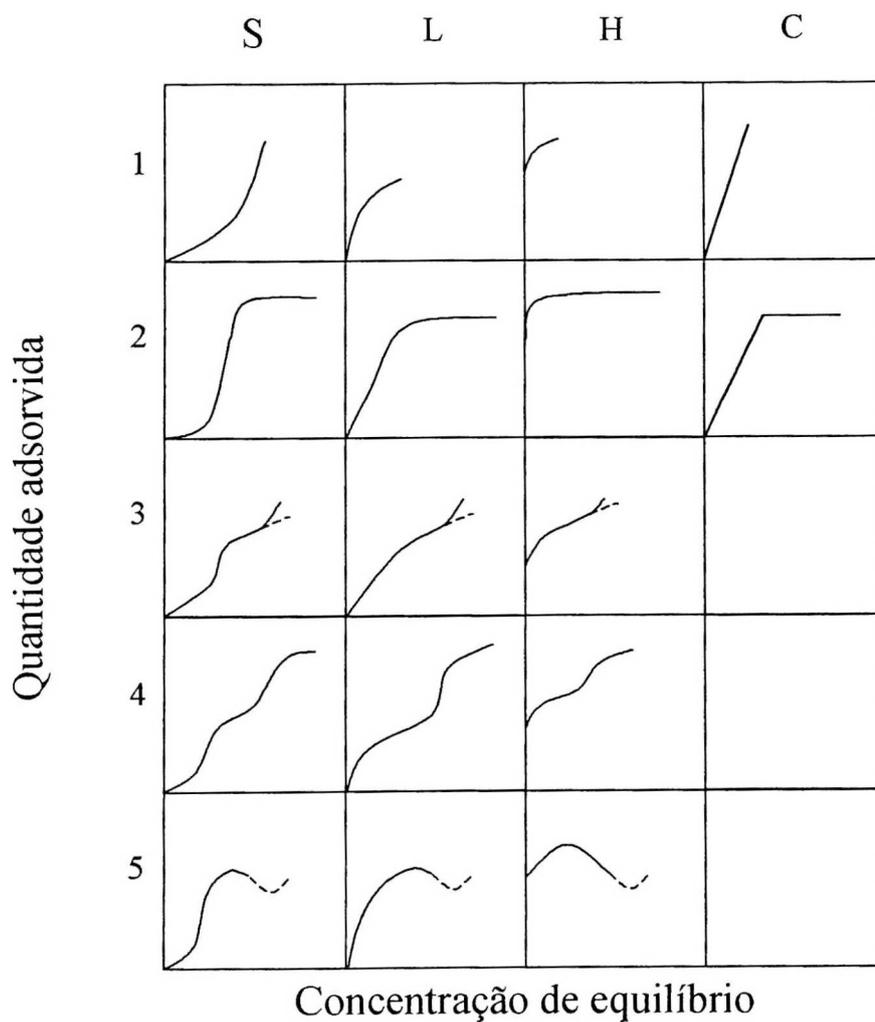


Figura 6: Classificação de isotermas padrão. (retirado de [34])

O gráfico de adsorção em função da concentração é chamado *isoterma de adsorção*. A temperatura constante, vários tipos de isotermas podem ser formados. Giles *et al* classificaram estes tipos e proveram uma base teórica para esta classificação [34].

Foram identificadas quatro classes: L, S, H e C, baseadas na forma da parte inicial da isoterma, com cada classe comportando subgrupos, relacionados ao comportamento do processo em altas concentrações (ver Figura 6). A classe L (Langmuir), a mais comum, agrupa as isotermas cuja região inicial é côncava em relação ao eixo de concentração. A classe S, por sua vez, apresenta a região inicial convexa em relação ao eixo de concentração. A classe H (“alta afinidade”) apresenta o início da curva no meio do eixo de quantidade adsorvida, resultante de uma rápida e forte adsorção em concentrações muito baixas. A classe C (“divisão constante”), por seu lado, apresenta um região inicial linear, que indica a divisão constante do soluto entre a solução e o adsorvente.

Na interpretação das isotermas de adsorção, uma distinção deve ser feita entre a parte inicial (que apresenta uma cobertura muito baixa), em que as moléculas de proteína interagem apenas com a superfície do substrato, e o platô de adsorção (alta superfície de cobertura), onde as interações laterais entre as moléculas adsorvidas têm um papel importante. Pode surgir uma nova subida da linha da isoterma após este platô, a qual seria explicada pela formação de uma segunda camada ou por uma transição na estrutura ou organização da camada adsorvida. Essa reorganização estaria ligada a uma mudança das moléculas de uma forma lateral para uma mais inclinada [35-37].

Para proteínas globulares, as isotermas geralmente apresentam um platô bem definido a concentrações inferiores a $0,3\text{g/dm}^3$ [22, 23]. Estas isotermas de adsorção são do tipo H (alta afinidade), ou seja, na parte inicial da isoterma (baixa concentração) a quantidade adsorvida sobe abruptamente, enquanto que em altas concentrações atinge um patamar. Muitas vezes, entretanto, a isoterma obtida é diferente, apresentando, após a subida inicial rápida, ou um pequeno patamar ou nenhum patamar, seguido de um contínuo e leve aumento.

3.10. Cinéticas de adsorção

Várias etapas [23] que envolvem a adsorção de proteínas são representadas

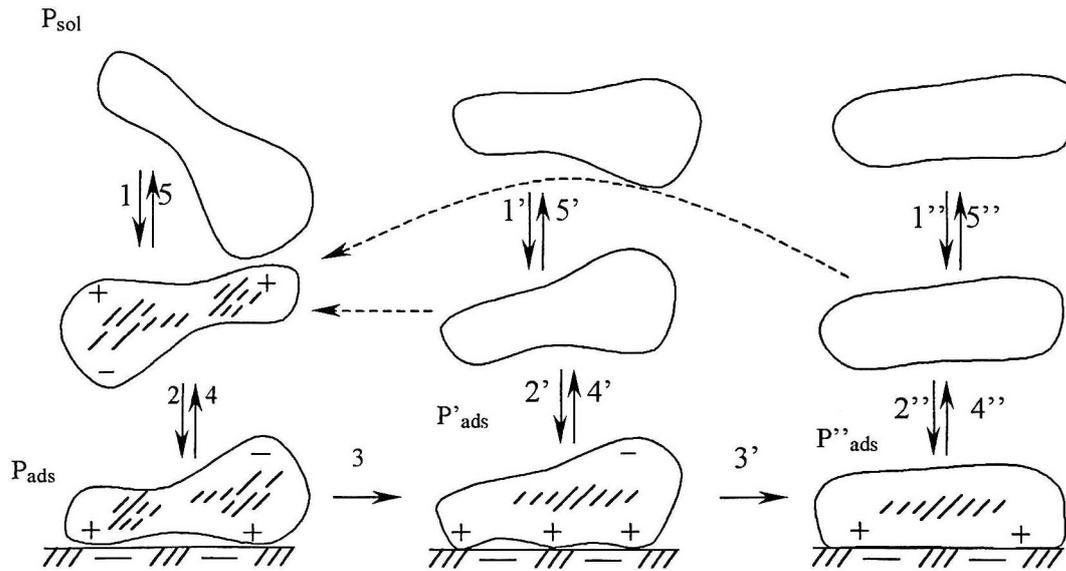


Figura 7: Representação esquemática do processo de adsorção de proteínas.

esquematicamente na figura 7.

Na Figura 7 os números de 1 a 5 representam os seguintes processos:

- 1 – transporte da molécula de proteína para a superfície de adsorção
- 2 – ligação à superfície
- 3 – rearranjo estrutural na camada de adsorção protéica
- 4 – rearranjo da superfície
- 5 – transporte fora da superfície

Os mecanismos básicos de transporte das moléculas de proteína através do solvente até atingir a superfície do solvente são a difusão e o transporte convectivo por fluxo laminar ou turbulento.

Na ausência de qualquer fluxo, a taxa de adsorção em condições de baixa concentração de proteína é dada por [38]:

$$\left(\frac{d\Gamma(t)}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} = c_p(D/\pi)^{1/2} \cdot t^{-1/2},$$

onde:

Γ = densidade superficial da proteína

D = coeficiente de difusão;

t = tempo de contato entre a solução protéica e a superfície

c_p = concentração da proteína.

Devido à ausência de fluxo, a proteína atinge a superfície por difusão [39]. O fluxo das moléculas até a superfície é proporcional a c_p .

Entretanto, nem todas as moléculas que chegam à superfície sofrem adsorção, e isto indica uma repulsão eletrostática [40] ou um efeito hidrodinâmico [41], ou ainda, pode ser que uma fração das moléculas colidam com a superfície em uma orientação que não permite adsorção [40]. Os rearranjos das moléculas protéicas na superfície de adsorção ocorrem durante várias horas. Entretanto, isto pode ser bloqueado caso o número de moléculas que chegam à superfície seja igual ou maior que o número de moléculas que sofrem o rearranjo.

3.11. Dessorção

Para vários autores [42], a cinética de adsorção tem muitos detalhes e uma das maiores dificuldades consiste na heterogeneidade das moléculas adsorvidas e no ainda pouco entendimento da sua dessorbilidade. A irreversibilidade da adsorção protéica em interfaces líquido-sólido manifesta-se por si mesma de várias maneiras. Como regra, a diluição não leva a uma dessorção detectável de proteínas dos substratos sólidos, principalmente dos hidrofóbicos, mesmo quando a observação estende-se por vários dias.

Como já foi dito, múltiplos contatos são feitos entre a proteína e o substrato sólido. Se a energia de adsorção por segmento for pequena, a diluição poderia desligar alguns dos segmentos em contato com a superfície. Mesmo assim, ainda seria necessária uma força substancial para dessorver todos os segmentos que permaneceram ligados. Então, a energia livre de Gibbs exigida para que ocorra a dessorção deve ser maior do que aquela necessária para que ocorra a adsorção, tanto que a dessorção é muitas vezes mais lenta.

Esta observação, porém, não é ainda uma prova da irreversibilidade da adsorção, uma vez que, aumentando-se a concentração de polímeros heterodispersos na solução, a fração de alto peso molecular na camada de adsorção torna-se gradualmente maior. Se, após estabelecido o equilíbrio, o sistema estiver diluído, a fração de alto peso molecular permanece na superfície, mas a fração de baixo peso molecular desorve [43]. Similarmente, em soluções protéicas onde dímeros e, possivelmente, altos agregados estejam presentes, ocorrerá a adsorção preferencial dessas espécies com maior massa molecular.

A taxa de desorção é inversamente proporcional à raiz quadrada da área disponível para a adsorção. A proteína é mais rapidamente desorvida a partir de uma interface completamente coberta. A presença de moléculas adsorvidas no substrato impedirá que moléculas vizinhas façam ligações de hidrogênio no substrato, ou mesmo que essas moléculas sofram repulsão eletrostática umas com as outras [44].

Capítulo 4 - Monocamadas de Langmuir e filmes LB

4.1. Sistemas de modelos de membranas

Numerosos sistemas de modelo de membrana têm sido desenvolvidos para estudar as propriedades de lipídios puros, de misturas de lipídios e de misturas de lipídios-proteínas.

Estes sistemas de modelos podem ser agrupados como:

1. monocamadas
2. bicamada polar
3. lipossomas ou vesículas

Algumas vantagens desses sistemas:

a) pode-se variar o conteúdo lipídico das membranas, possibilitando um exame sistemático dos efeitos dessa variação em outras funções;

b) o ambiente desses sistemas pode ser controlado e variado;

c) esses sistemas podem também ser expostos a ligantes (como proteínas) e ser estudado esse tipo de interação.

Monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Blodgett constituem sistemas modelos de membrana e são tratados neste trabalho.

4.2. Filmes de Langmuir-Blodgett

A explicação dos fenômenos relativos à tensão superficial exige que examinemos as interações intermoleculares. As forças de atração que atuam sobre as moléculas no interior de um líquido operam em todos os sentidos, de tal forma que entre elas ocorre um balanço. Na superfície do líquido, porém, as forças de interação não estão balanceadas. Ao contrário, estão dirigidas para o interior da solução, de tal forma que a maioria das moléculas se deslocará para o interior do líquido, contraindo a superfície – também chamada “interface líquido/ar” – dando origem à tensão superficial. Um exemplo desta alta tensão superficial ocorre com a água devido às pontes de hidrogênio.

A adsorção de substâncias que tenham um caráter anfifílico ou tensoativo alterará drasticamente a tensão superficial, pois essas substâncias ligam-se com as moléculas superficiais dos líquidos, diminuindo assim as interações inter-moleculares. Quando estas substâncias tensoativas tiverem o grupo hidrofóbico maior do que um certo tamanho, elas tornam-se insolúveis em água, podendo formar monocamadas insolúveis.

4.3. Revisão bibliográfica

Existem diversas revisões [45] que trazem informações históricas mais detalhadas sobre filmes LB. Apresentaremos abaixo apenas os aspectos mais relevantes ou interessantes sobre o assunto do ponto de vista dos objetivos desta dissertação.

Desde a antigüidade observa-se o fenômeno do espalhamento de óleo sobre a superfície da água. Até onde temos conhecimento, o primeiro relato de um experimento científico sobre o assunto deve-se a Benjamin Franklin, que em 1774 descreveu, para a Royal Society, o efeito “tranqüilizante” de uma colher de chá de óleo sobre as águas do lago Clapham [46]. Agnes Pockels, em 1891, publicou um relato em que conta como, através de uma técnica por ela desenvolvida de confinamento de filmes insolúveis em uma cuba cheia de água até a borda, desenvolveu medidas rápidas e confiáveis da relação entre a “contaminação superficial” e a área. Utilizando estas técnicas, Rayleigh, em 1899, sugeriu pela primeira vez que a tensão superficial decresce até que a superfície seja coberta com um filme de espessura, necessariamente, monomolecular.

Em 1917 Langmuir [47] obteve sucesso na tarefa de propor um modelo teórico sobre o comportamento de moléculas em monocamadas insolúveis, modelo que foi bem sucedido nos testes experimentais. O modelo especificava que as moléculas componentes do filme não apenas formavam uma camada unimolecular, mas posicionavam-se orientadamente sobre a superfície da água, com seus grupos funcionais polares imersos na água e a longa cadeia não polar posicionada quase verticalmente acima da superfície. Em suas investigações, Langmuir

desenvolveu um instrumento, denominado balança de superfície, que foi crucial para que uma sua assistente, Katherine Blodget [48], em 1919, desenvolvesse um conjunto de métodos para transferir verticalmente, de forma organizada, monocamadas de ácidos graxos para placas de vidro. Com a publicação da metodologia de transferência, em 1935, as monocamadas ficaram conhecidas como filmes de Langmuir-Blodget, ou simplesmente, filmes LB.

Interrompidas pela Segunda Guerra Mundial as pesquisas com a técnica foram retomadas apenas na década de 70. Kuhn e colaboradores [49, 50] com uma série de estudos destinada a testar os modelos, equações e técnicas de Langmuir, mostraram que monocamadas orgânicas poderiam ser utilizadas na construção de estruturas moleculares precisas. A grande aplicabilidade destas técnicas nas áreas acadêmica e tecnológica aumentou a sua popularidade nos laboratórios, o que promoveu um forte impulso na direção de seu aperfeiçoamento, com o surgimento, no início da década de 80, de vários trabalhos que se utilizavam de técnicas de análise variadas como a espectroscopia UV-vis, infravermelho, a microscopia de fluorescência, microscopia no ângulo de Brewster, a microbalança de cristal de quartzo, a microscopia de força atômica, além das tradicionais de medidas de pressão e potencial superficiais.

Monocamadas de Langmuir e filmes LB são muito utilizados nos estudos sobre transições de fase em membranas biológicas. Especialmente importantes são as investigações sobre as interações entre as substâncias envolvidas na monocamada, como lipídios e proteínas, o que permite entender o próprio funcionamento das membranas. Os primeiros estudos [51] de monocamadas líquidas de proteínas surgiram ainda na década de 30, mas foi Henry B. Bull, [52] na década de 40, que, examinando a discordância entre os vários trabalhos sobre espalhamento de proteínas como a ovalbumina publicados até então, apontou como possível causa da discrepância uma possível tendência da proteína a ser perdida na solução. Já em 1958, Kashiwagi [53] observou que as proteínas apresentam um comportamento na

superfície bastante diferente do que aquele observado para os ácidos graxos: enquanto proteínas solúveis em água não permitem a obtenção de um bom espalhamento, porque tem-se de fato um equilíbrio entre as moléculas adsorvidas na interface líquido-ar e aquelas dissolvidas no interior da fase líquida, as moléculas de ácido graxo dissolvidas em solvente apropriado formam, após a evaporação do solvente, monocamadas estáveis na interface água-ar. Para se conseguir um filme destas proteínas usava-se então um teor alto de salinidade (“salting-out”) na subfase da solução aquosa, que tinha como efeito fazer que a proteína permanecesse na interface. Esta prática, entretanto, favorece a desnaturação da proteína.

A partir daí, estendendo-se até o começo dos anos 60, vários trabalhos foram realizados com a ovalbumina, [54, 55] incluindo os de adsorção de proteína em substratos sólidos, em pó de vidro Pirex [56] e em placas de metal com os métodos de Langmuir-Blodgett [57] Atualmente os estudos com filmes LB fazem uso de diferentes tipos de proteínas [58, 59, 60, 61, 62] e estão principalmente relacionados com aplicações em biossensores [63, 64, 65, 66], estudos de sistemas modelos de membranas biológicas [67, 68] que estudam o aspecto de reconhecimento molecular ou interação de proteínas com diferentes tipos de interfaces sólidas.

4.4. Espalhamento na interface líquido-ar

O processo de preparação de filmes compostos por estas monocamadas, ou filmes de LANGMUIR- BLODGETT, exige normalmente que três requisitos sejam obedecidos:

1. é necessário que a substância utilizada para apresente um coeficiente de espalhamento positivo [69] na interface líquido/ar com decréscimo da energia livre do sistema (ΔG_{esp}). O coeficiente de espalhamento ($S_{g/i}$), definido como ($-\Delta G_{\text{esp}}$), pode ser calculado através das diferenças entre a tensão superficial inicial (γ_i) da água e a soma das tensões do líquido (γ_g) a ser espalhado e a tensão interfacial criada pela nova interface ($\gamma_{g/i}$), segundo

a equação:

$$S_{g/i} = - \Delta G_{\text{esp}} = \gamma_i - (\gamma_g + \gamma_{g/i})$$

2. é necessário que a substância a ser espalhada seja insolúvel na subfase;
3. é necessária a adesão desta substância, ao substrato sólido e entre as sucessivas camadas.

Quando alguma destas condições não é satisfeita, usam-se recursos tais como: adsorção de substância solúvel a partir de subfase suporte da monocamada ou co-espalhamento com uma substância anfifílica que apresenta coeficiente de espalhamento positivo.

4.5. Cuba de Langmuir

Utiliza-se a balança de superfície ou cuba de Langmuir para preparar os filmes LB.

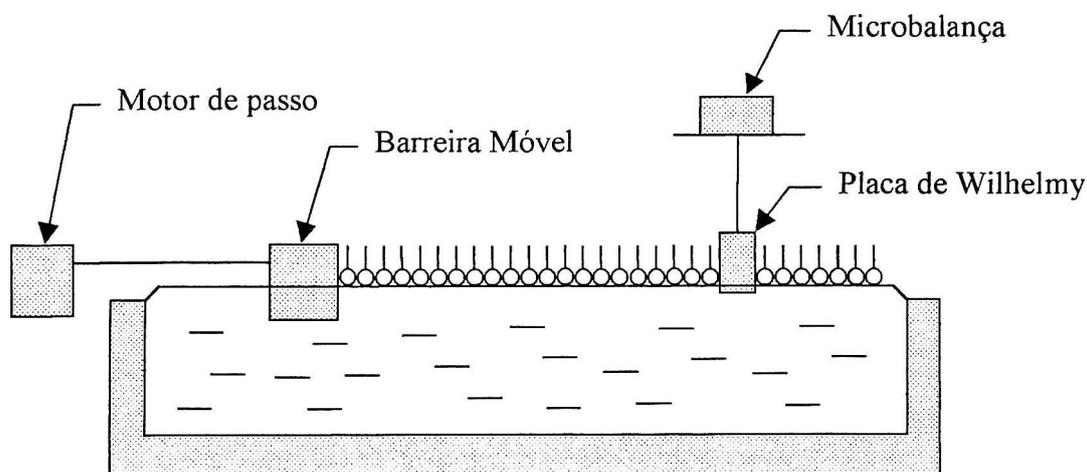


Figura 8: Esquema da cuba de Langmuir utilizada.

A cuba de Langmuir é construída em teflon[®], que é um material hidrofóbico, tendo uma barreira móvel capaz de varrer a superfície da água ou solução aquosa [45] e uma lâminula hidrofílica, papel de filtro, em contato com a superfície (método da lâminula de Wilhelmy [70]) técnica utilizada para medir a tensão superficial.

No interior da cuba coloca-se um líquido, normalmente água ou solução aquosa, que é denominado subfase, até formar-se um menisco na superfície. Espalha-se, sobre a subfase, uma solução do tensoativo desejado. À medida que a barreira é movimentada, ocorre a interação das moléculas da monocamada (tensoativo) com as moléculas da superfície da subfase, alterando a tensão superficial. Assim, à medida que a monocamada é comprimida ocorre a diminuição da tensão superficial da subfase pura (γ^0) em relação à tensão superficial na presença da monocamada (γ). A cada estágio da compressão é possível determinar a pressão superficial (π), que é dada pela fórmula:

$$\pi = \gamma^0 - \gamma$$

onde:

γ^0 = tensão superficial da subfase pura,

γ = tensão superficial na presença da monocamada.

4.6. Isotermas superficiais

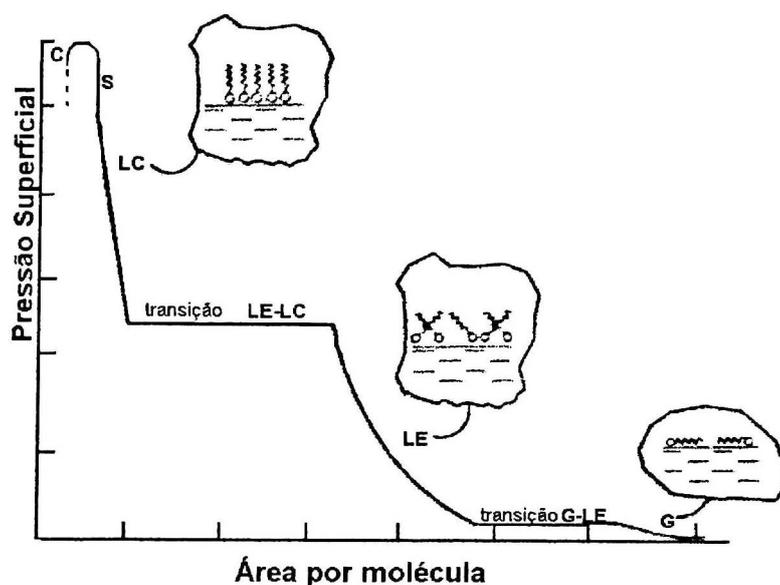


Figura 9 : Representação de uma isoterma de superfície mostrando os diversos estágios de compressão

Conhecendo a concentração e o volume da solução do tensoativo espalhado na cuba, é possível determinar a área disponível por molécula. Desta forma, a uma temperatura constante, o gráfico lançado da pressão superficial versus a área disponível por molécula representa uma *isoterma de pressão superficial*.

Dependendo do estágio da compressão, podemos observar diferentes estados físicos bidimensionais (semelhantes às isotermas pressão-volume para o estado tridimensional da matéria). Assim, associa-se cada trecho da isoterma superficial a um estado. Diz-se que um filme encontra-se no estado gasoso (G) quando as interações entre as moléculas são pequenas devido à grande área disponível por molécula, o suficiente para não exceder de 1 m N/m a pressão superficial. À medida que move-se a barreira, diminui a área disponível por molécula e a pressão superficial aumenta, tendo-se o estado líquido expandido (LE). Às vezes pode-se observar uma região onde ocorre uma coexistência de fases, quando a pressão superficial permanece constante. Esse estado corresponde à transição de fase de líquido expandido para líquido condensado. Comprimindo-se ainda mais o filme, tem-se um aumento brusco da pressão superficial, caracterizando o estado líquido condensado (LC) e, finalmente, o estado sólido (S).

Continuando a compressão, o filme adquire uma instabilidade mecânica e colapsa. Neste ponto ocorre uma diminuição da área do filme e a flexão desta monocamada, podendo ser formadas, desordenadamente, bicamadas ou multicamadas [45]. O ponto de colapso é indicado pela constância ou queda brusca da pressão superficial.

O fator de compressibilidade de superfície (C_S^{-1}) pode ser obtido a partir dessas isotermas, e nos indica quanto a pressão superficial é alterada ($\partial\pi$) a uma dada taxa de compressão (∂A), a uma dada área (A) e uma dada temperatura (T), sendo obtida pela fórmula [71]:

$$C_S^{-1} = (-A) (\partial\pi/\partial A)_T$$

4.7. Formação dos filmes

Existem dois métodos de transferência mais comuns da monocamada da subfase para o substrato sólido: o horizontal, ou tipo Schafer, e o vertical, ou tipo Langmuir-Blodgett [72].

No processo vertical, ou tipo Langmuir-Blodgett, o substrato é movido verticalmente

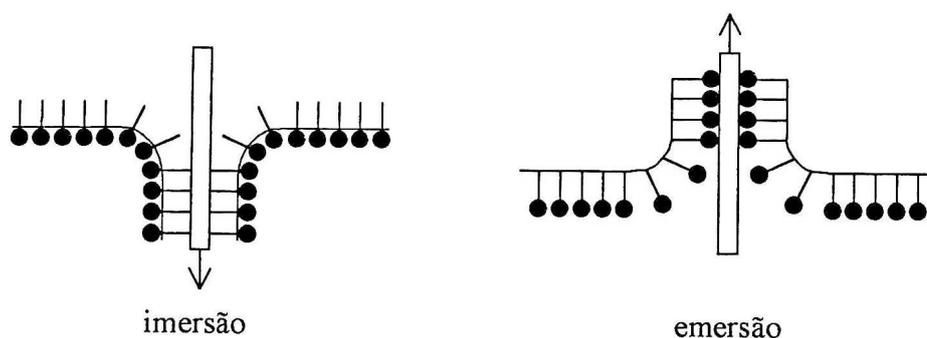


Figura 10: Formação da primeira camada de um filme LB na imersão-emersão do substrato sólido

através da monocamada na interface líquido/ar, e, com a compressão da barreira móvel obtém-se a pressão superficial finita que permite efetuar a transferência, e, assim, a monocamada, comprimida, é transferida para o substrato. É altamente desejável que a pressão seja mantida constante enquanto a monocamada é removida da interface líquida, uma vez que o processo de transferência depende da pressão superficial.

Esta transferência pode ocorrer durante a emersão ou durante a imersão. Se a superfície do substrato é hidrofílica, o filme é transferido durante a emersão, e as cabeças hidrofílicas interagem com a superfície. Se, por outro lado, a superfície do substrato é hidrofóbica, a monocamada é transferida durante a imersão, e as caudas hidrofóbicas interagem com a superfície.

São obtidos três tipos de deposição neste processo: (a) deposição tipo-Z, quando as monocamadas sucessivas são depositadas apenas durante a emersão; (b) deposição tipo-X, quando as monocamadas sucessivas são depositadas apenas durante a imersão; e (c) deposição tipo-Y, quando as deposições ocorrem, alternadamente, na emersão e na imersão. A deposição tipo-Y utiliza-se do fato de que, após a primeira transferência, inverte-se a qualidade da superfície livre da camada – se hidrofílica, torna-se hidrofóbica; se hidrofóbica, torna-se hidrofílica. A característica dos filmes tipo-Y é que as interações são cabeça-cabeça e cauda-cauda, enquanto os filmes tipo-Z e tipo-X possuem interações cabeça-cauda ou cauda-cabeça.

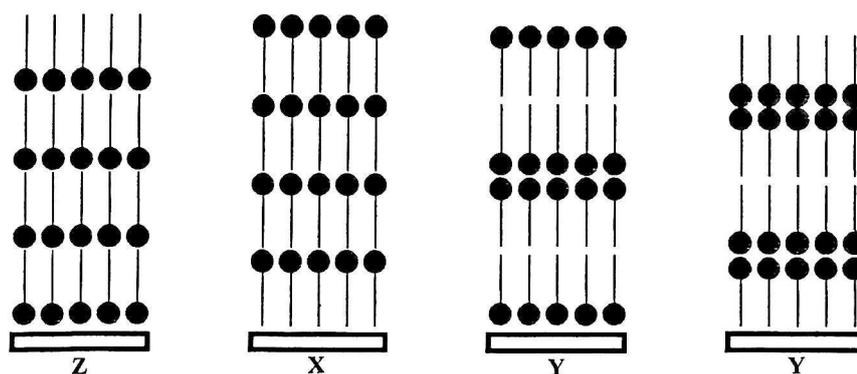


Figura 11: Tipos de filmes obtidos no processo vertical (Langmuir Blodgett) de deposição de monocamadas.

Capítulo 5 - Métodos experimentais para investigação da adsorção de proteínas na interface

5.1. Introdução

Vários métodos experimentais são utilizados para determinar a adsorção de proteínas na interface, tais como:

1. técnicas de depleção na solução
2. métodos gravimétricos
3. métodos hidrodinâmicos
4. métodos elétricos
5. métodos ópticos
6. uso de sondas radioativas ou fluorescentes.

O método usado neste trabalho foi o gravimétrico e foi utilizada a microbalança a cristal de quartzo (MCQ).

5.2. Microbalança a cristal de quartzo

Uma microbalança a cristal de quartzo (MCQ ou MCQ) é uma balança que utiliza-se do efeito piezelétrico reverso. Compõe-se de: (a) um oscilador; (b) cristais de quartzo cuja frequência é ajustada pela deposição de filmes de ouro que, depositados nos dois lados do cristal, servem também como eletrodos, através dos quais aplica-se uma diferença de potencial; (c) um frequencímetro, que registra as variações de frequência provocadas pela deposição de massa sobre o cristal ou por ele absorvidas.

Esta técnica apoia-se no princípio de que há uma proporcionalidade entre a variação de frequência de ressonância do cristal e a variação da massa depositada sobre o mesmo [73]. O cristal piezelétrico, cuja parte ativa é aquela compreendida entre os eletrodos, tem sua frequência de vibração diminuída com a pequena quantidade de material depositada.

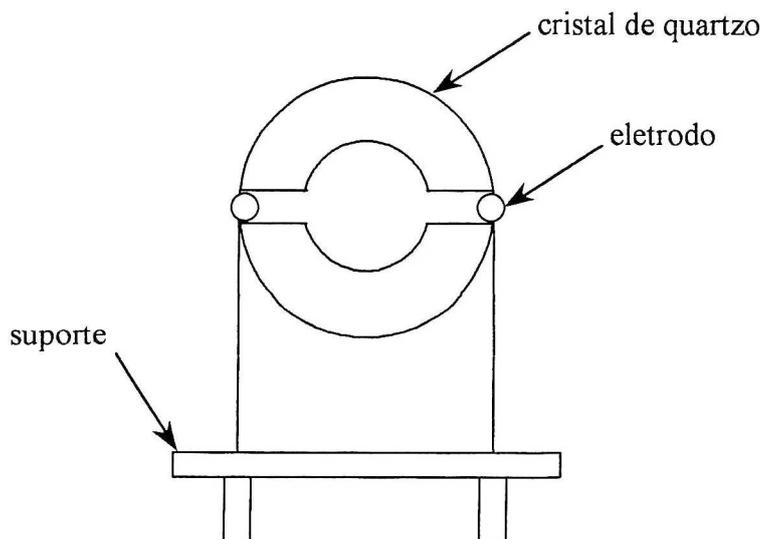


Figura 12: Microbalança a cristal de quartzo com eletrodo de ouro montado em suporte.

A MCQ tem sido empregada como uma técnica para caracterizar filmes LB, na confirmação da quantidade de filme transferido da monocamada para o substrato sólido e na comprovação da relação linear entre o número de camadas depositadas e a variação de frequência, e também para avaliar a quantidade de proteína adsorvida em filmes LB. A leitura da frequência ressonante ΔF (Hz) permite determinar a massa (g) através da equação de SAUERBREY [74], mostrada abaixo:

$$\Delta F = - \frac{2F_0^2}{A (\mu_q \rho_q)^{1/2}} \Delta M ,$$

onde:

F_0 = frequência fundamental do cristal de quartzo em Hz antes da deposição ou adsorção.

μ_q = módulo de cisalhamento do quartzo ($2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$)

ρ_q = densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^{-3}$)

A = área do eletrodo ($0,392 \text{ cm}^2$)

Reunindo-se as constantes e deixando $\Delta m = \Delta M/A$, tem-se:

$$\Delta F = - C_A \Delta m ,$$

onde:

$$C_A = 2, 26 \times 10^{-6} F_0^2 \text{ Hz cm}^2 \text{ g}^{-1}$$

Δm = massa adicionada por unidade de área em g/cm^2

Utilizando-se a MCQ, que é bastante sensível para medir uma massa depositada na ordem de nanogramas, podemos determinar a massa depositada a partir de apenas uma camada molecular de fosfolípido ou proteína.

Capítulo 6 - Parte Experimental

6.1. Descrição geral dos experimentos realizados

A estratégia e as técnicas experimentais empregadas para a consecução dos objetivos propostos está representada no diagrama abaixo:.

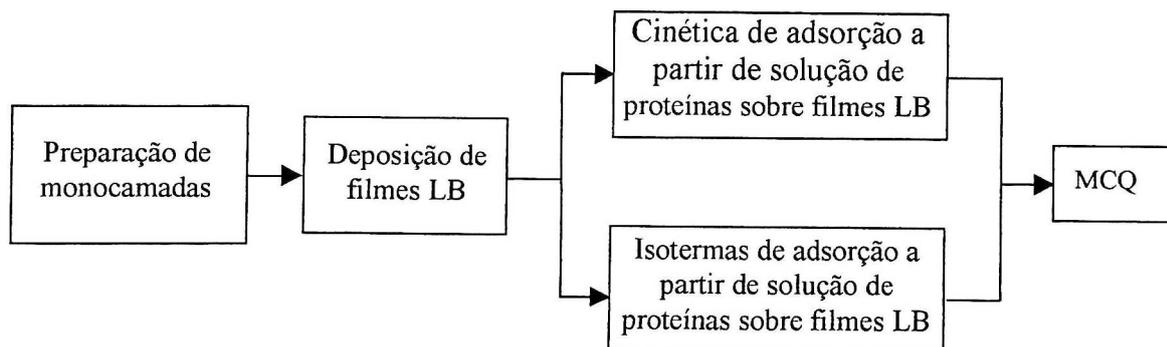


Figura 13: Fluxograma da parte experimental.

A primeira etapa consistiu na preparação de monocamadas de Langmuir de fosfolipídio e ácido graxo sobre soluções aquosas de cátions divalentes (Zn^{2+}), a partir das quais, segundo a técnica de Langmuir-Blodgett, foram preparados filmes finos e organizados. Os filmes foram preparados de forma a ter um número ímpar de camadas. Sobre esses filmes foi feita a adsorção da proteína a partir de solução.

A técnica de microbalança a cristal de quartzo (MCQ), descrita no capítulo 5 foi utilizada para: (i) a determinação da massa depositada por camada na preparação dos filmes LB, (ii) a determinação da razão de transferência (relação entre a massa diminuída da monocamada e a massa depositada no substrato) e (iii) estudos da cinética e isoterma de adsorção de proteínas sobre os filmes LB de fosfolipídios.

6.2. Preparação das monocamadas na interface líquida

As monocamadas são preparadas em uma cuba de Langmuir (279 x 170 x 15 mm, com área na compressão máxima de 102 cm²) construída nas oficinas de Precisão do Campus

de Ribeirão Preto, que usa uma microbalança (Cahn mod C-32) e o método da laminula de Wilhemy [70], para monitorar as variações na tensão superficial (pressão superficial). Inicialmente, através de sucessivas trocas de água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q-Plus da Millipore que fornece água com condutividade de $18\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$, limpa-se a cuba. Para a remoção de resíduos de fosfolipídio que eventualmente fiquem retidos nas bordas da cuba ou na barreira após um experimento, utiliza-se também clorofórmio (Merck). Após limpa a cuba, coloca-se água destilada e purificada na subfase até a formação de um menisco nas laterais hidrofóbicas do teflon e varre-se a superfície com a barreira numa velocidade alta, medindo-se a variação da tensão superficial para a subfase pura enquanto a mesma é comprimida. Se a variação da pressão superficial não exceder 1 mN/m , a cuba é considerada limpa e pronta para a deposição do tensoativo. Se a variação da pressão exceder o limite estabelecido, repete-se o processo de limpeza.

Um volume de aproximadamente $60\ \mu\text{L}$ de ácido eicosanóico (araquídico), ácido esteárico ou ácido beênico (Sigma), diluídos em clorofórmio (Merck), na concentração aproximada de $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ foi espalhado sobre solução aquosa de $\text{Zn}(\text{H}_3\text{CCOO}^-)_2$ (Aldrich) $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$, para a formação de monocamadas de araquidato, estearato e beenato de zinco. De maneira análoga, um volume de aproximadamente $60\ \mu\text{L}$ de uma solução de concentração aproximada de $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ dos sais de sódio dos ácidos dimiristoil fosfatídico (DMPA) e dilauril fosfatídico (DLPA) (Sigma) em clorofórmio e metanol (Merck), na proporção de 3 para 1 [75] foi espalhado sobre solução aquosa de $\text{Zn}(\text{H}_3\text{CCOO}^-)_2$ (Merck) $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$, $\text{pH} = 5, 8$. Seguem-se as estruturas do ácido araquídico, esteárico, beênico, do DMPA e do DLPA.

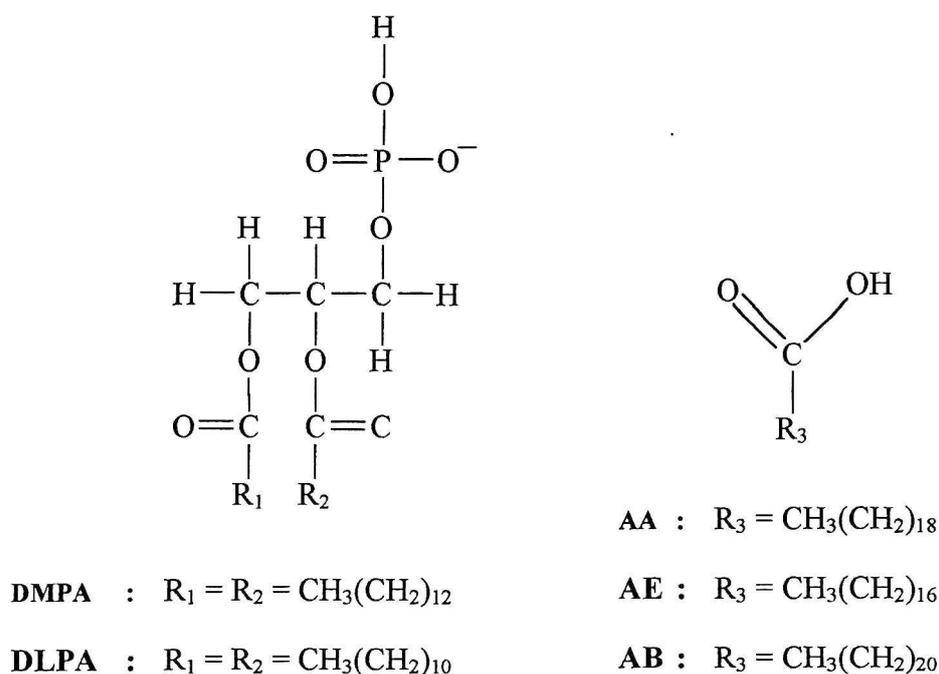


Figura 14: Estrutura das moléculas DMPA; DLPA; AA; AE e AB.

A velocidade de compressão e expansão dessas monocamadas foi de 0,24 mm/s, numa temperatura de $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$.

6.3. Formação de filmes LB

Para a formação dos filmes LB foram utilizados como substrato placas de quartzo, previamente limpas com clorofórmio e água Milli-Q, e posteriormente secas. O substrato foi montado em um suporte de teflon, que por sua vez foi preso por um imã a uma haste ligada a um motor de passo. A transferência das monocamadas foi realizada a temperatura de $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, mantendo-se a pressão superficial em $(30 \pm 1) \text{ mN/m}$ tanto para os ácidos como para os fosfolipídios. As velocidades de imersão/emersão foram de 0,03 mm/s. Foram preparados filmes do tipo Y, com cinco camadas, iniciando-se a deposição na emersão do substrato, o que resultou na exposição da cauda apolar (hidrofóbica) na última camada.

6.4. Cinética e isoterma de adsorção de ovoalbumina (OVA) e albumina de soro bovino (BSA)

As soluções das proteínas foram preparadas usando um tampão de fosfato e cloreto de sódio com pH igual a 7, 2.

As proteínas foram adsorvidas a partir de solução em diferentes concentrações: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg/ml sobre os filmes LB preparados conforme descrito anteriormente.

A imersão e emersão do substrato contendo o filme LB na solução de proteína deu-se a uma velocidade 0,09 mm/s, usando-se um sistema mecânico montado nas Oficinas de Precisão do campus da USP – Ribeirão Preto.

O tempo de adsorção foi variável e a temperatura foi mantida em $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Para o estudo da cinética de adsorção das proteínas, os tempos de permanência do filme LB imerso na solução protéica foram de: 2; 5; 10; 20; 30; 40 e 60 minutos.

Capítulo 7 - Resultados e Discussão

7.1. Caracterização das monocamadas

Em uma membrana biológica a combinação de lipídios fornece uma fluidez característica para cada tipo de membrana. No sistema modelo de filmes LB a fluidez é ditada pelo estado em que a monocamada se encontra durante a deposição. De uma maneira simplificada, a força motriz para a transferência de monocamadas da interface líquido-ar para interfaces sólidas está ligada ao gradiente de pressão superficial que se estabelece entre o menisco formado com o substrato e a interface plana. Monocamadas mais comprimidas ou presentes em um estado mais condensado são mais facilmente transferidas que aquelas que se encontram em estados mais expandidos. Assim, quanto maior o estado de compressão dos filmes de Langmuir, melhor é a sua transferência para o substrato sólido. Uma vez transferidos, a sua estabilidade também depende da interação entre as camadas sucessivas [76].

Demonstrou-se [77] que a presença de íons divalentes na subfase diminui a repulsão das cabeças polares dos lipídios, fornecendo um filme com baixa compressibilidade e condensado, melhorando as características de transferência.

Neste trabalho utilizamos íons Zn^{2+} nas duas subfases: para as monocamadas de fosfolipídios e também para aquelas de ácidos graxos.

Nas Figuras 15, 16 e 17, a seguir, são apresentadas as isotermas de pressão superficial para monocamadas dos ácidos graxos: araquídico, beênico e esteárico formadas sobre água pura e sobre solução de acetato de zinco $1, 0.10^{-4} \text{ mol/l}$.

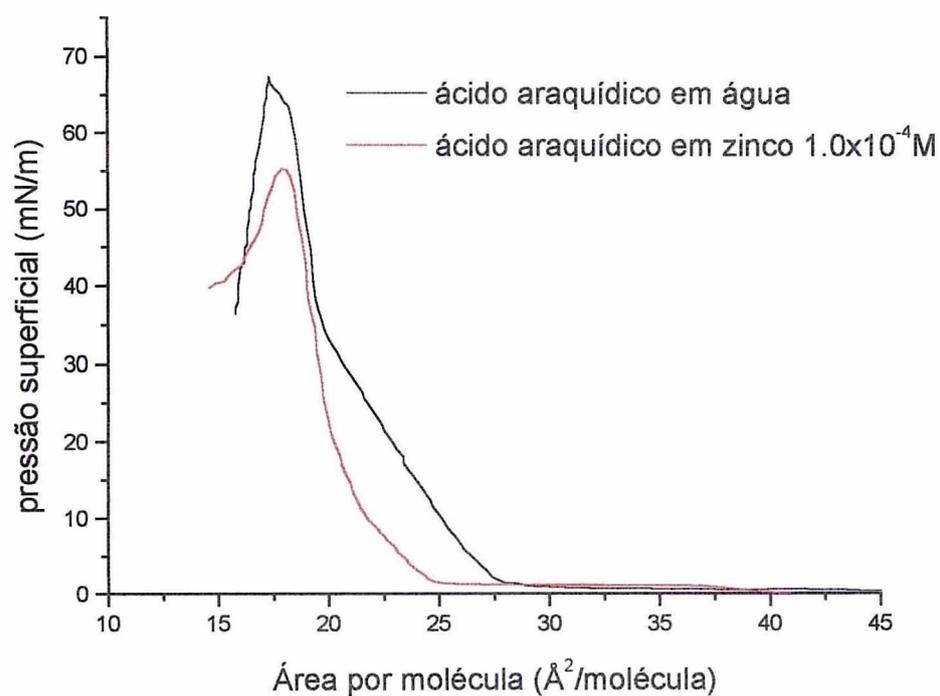


Figura 15 : Isotermas de pressão superficial para monocamadas de ácido araquídico sobre água pura (preto) e de solução de zinco $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (vermelho).

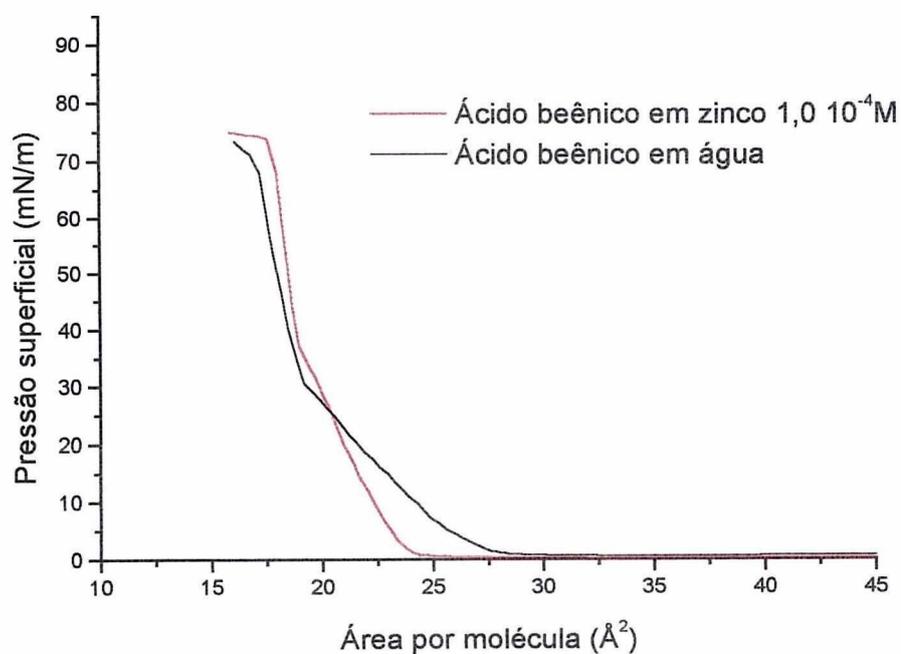


Figura 16 : Isotermas de pressão superficial para monocamadas de ácido beênico sobre água pura (preto) e de solução de zinco $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (vermelho).

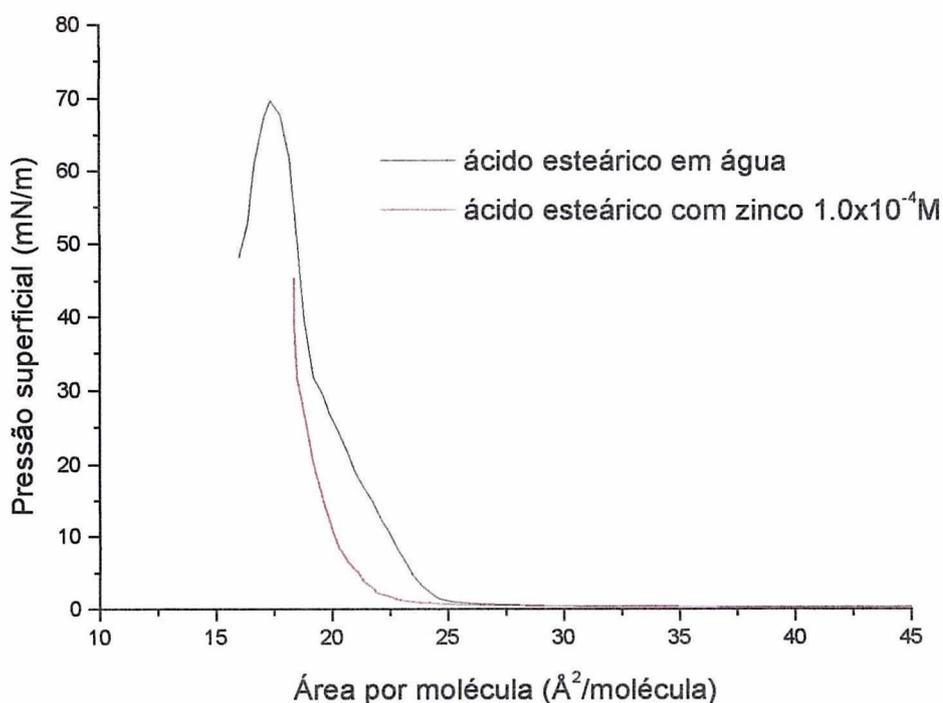


Figura 17 : Isothermas de pressão superficial para monocamadas de ácido esteárico sobre água pura (preto) e de solução de zinco $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (vermelho).

Todas as isothermas apresentam perfis semelhantes, podendo observar-se três regiões distintas. Cada região pode ser atribuída a um estado físico bidimensional; no início da compressão onde a pressão superficial permanece em torno de zero observamos o estado gasoso, entre 25 e 30 \AA^2 por molécula inicia-se uma elevação da pressão superficial até aproximadamente 30 mN/m: esta região corresponde ao estado de líquido expandido, a partir desse ponto observamos uma elevação mais brusca da pressão indicando assim o estado líquido condensado.

Entre 65 e 70 mN/m, a pressão superficial sofre uma queda, indicando o desmanche da monocamada (colapso). A área mínima (extrapolada da região mais íngreme da curva até o eixo horizontal) em todos os casos ficou em $19 \pm 1 \text{\AA}^2$ por molécula.

A presença dos íons Zn^{2+} na subfase provoca uma diminuição da área por molécula em relação à água pura. Além disso, a região de líquido expandido apresenta, neste caso, uma

maior inclinação. Estes efeitos devem-se à blindagem do carboxilato por íons positivamente carregados. Segundo alguns autores [77] isto aumenta a estabilidade da monocamada e facilita a deposição dos ácidos graxos na forma filmes LB. Neste trabalho, o valor máximo da diminuição da área por molécula foi de 3 \AA^2 . No caso em que a subfase era de água pura, a área mínima se manteve a mesma. Os valores obtidos concordam com aqueles encontrados na literatura [78].

A seguir é apresentada, na Tabela 1, os fatores de compressibilidade (C_s^{-1}) para as isotermas de os ácidos graxos (araquídico, beênico e esteárico) apresentadas.

Tabela 1: Fatores de compressibilidade isotérmico superficial (em mN/m) para as monocamadas de ácidos graxos na pressão superficial de 30 mN/m.

ÁCIDOS	SUBFASE	
	ÁGUA	Zn ²⁺
	Fatores de Compressibilidade: C_s^{-1} (mN/m)	
ARAQUÍDICO	114	260
BEÊNICO	95	240
ESTEÁRICO	160	278

A Tabela 1 demonstra o aumento do fator de compressibilidade das monocamadas causado pela presença dos íons zinco na subfase, confirmando a hipótese de que esses íons condensam a monocamada.

A seguir, através das figuras 18 e 19, apresentamos as isotermas de pressão superficial para os fosfolipídios DMPA e DLPA.

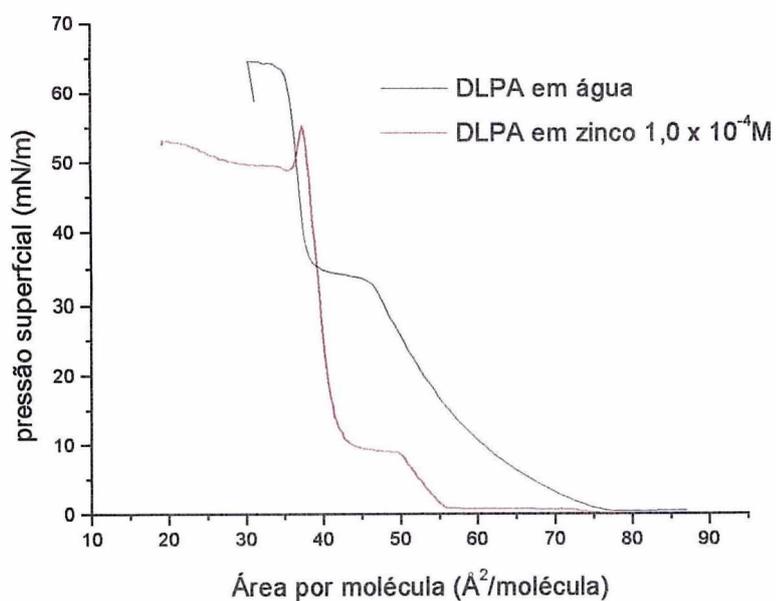


Figura 18 : Isotermas de pressão superficial para monocamadas de DLPA sobre água pura (preto) e de solução de zinco $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (vermelho).

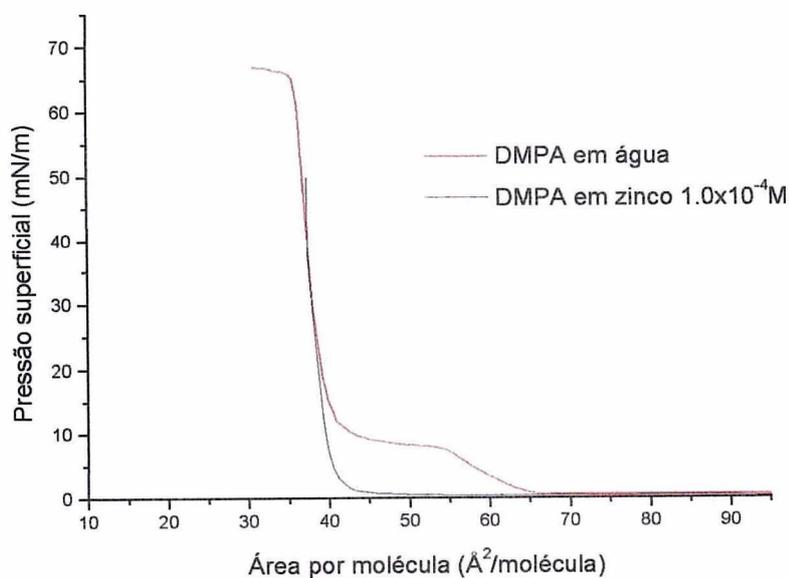


Figura 19 : Isotermas de pressão superficial para monocamadas de DLPA sobre água pura (preto) e de solução de zinco $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (vermelho).

As isotermas para os fosfolipídios apresentaram quatro regiões distintas: gasoso (para pressões em torno de zero), líquido expandido (primeira elevação da pressão durante a compressão), transição de fases de líquido expandido para líquido condensado (LE-LC – patamar) e líquido condensado (elevação mais brusca da pressão antes do colapso).

Embora os perfis para os dois fosfolipídios sejam semelhantes, a transição de fases para o DLPA ocorre em uma pressão mais elevada (45 mN/m) do que para o DMPA (7 mN/m).

Com a presença dos íons Zn^{2+} na subfase a pressão de transição é reduzida para 9 mN/m no caso do DLPA e extinta no caso do DMPA. Em ambos os casos, tal redução deve-se também à diminuição da repulsão eletrostática entre as cabeças polares dos fosfolipídios. Estes dados estão de acordo com outros previamente relatados na literatura [8, 75, 79].

Em 30 mN/m, todos os fatores de compressibilidade ficaram em torno de 300 mN/m. Não ocorreu redução adicional com a presença dos íons Zn^{2+} na subfase pelo fato de, já em água pura, nesta pressão superficial, já se ter uma monocamada razoavelmente condensada.

7.2. Deposição dos lipídios na forma de filmes LB

7.2.1. Avaliação do processo de transferência

Nas figuras 20 e 21 mostramos as medidas de massa depositada por camada de lipídio na forma de filme LB. Estas medidas foram obtidas através da técnica de MCQ. A pressão superficial para a deposição destes filmes foi de 30 mN/m. Deve-se ressaltar novamente que as deposições foram otimizadas pela presença dos íons Zn^{2+} na subfase.

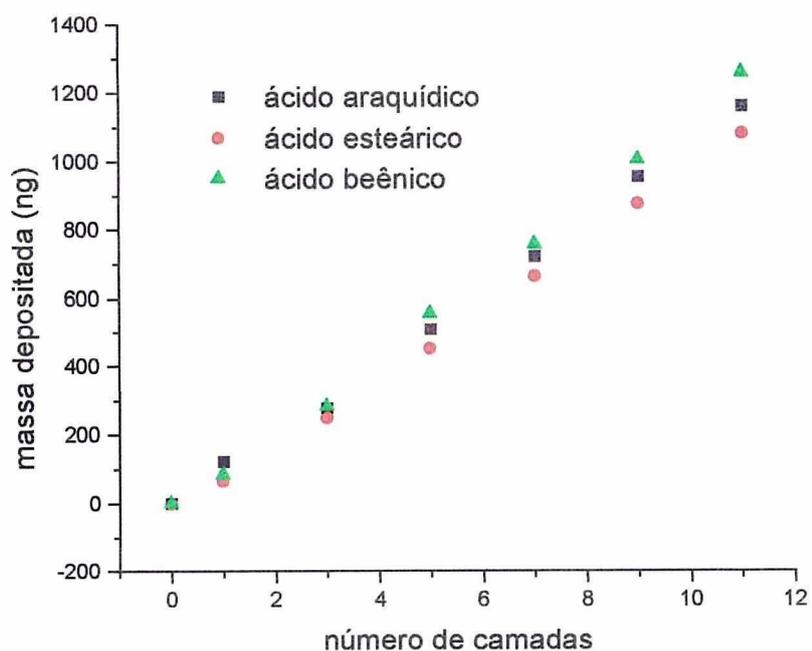


Figura 20 : Massas de $Zn^{2+}_{1/2}AB$, $Zn^{2+}_{1/2}AA$ e $Zn^{2+}_{1/2}AE$, depositadas por camada (número de deposições) na forma de filmes LB.

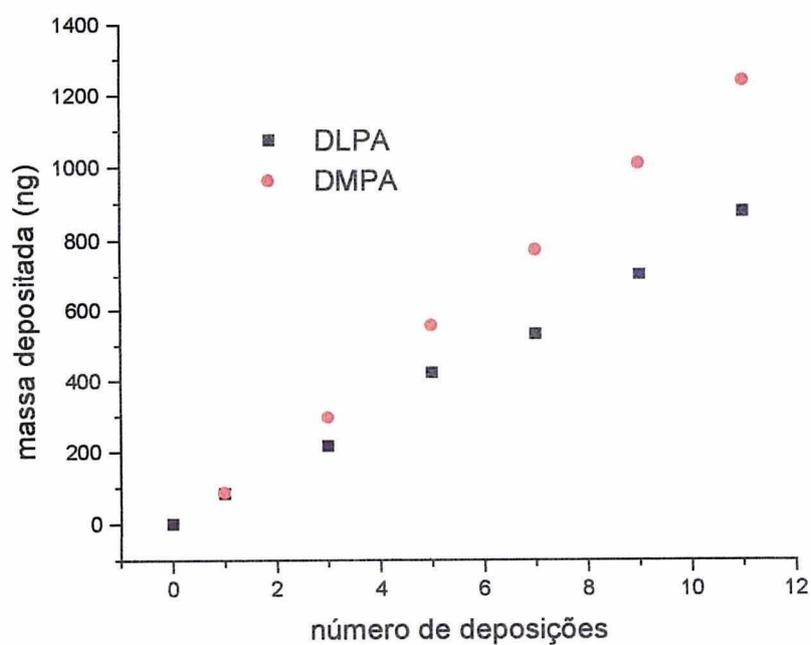


Figura 21 : Massas de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ e $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$, depositadas por camada (número de deposições) na forma de filmes LB.

Os gráficos mostram a eficácia da deposição das 11 monocamadas, visto que o comportamento linear do gráfico indica que a quantidade de massa depositada é proporcional ao número de camadas, ou seja, a cada transferência a quantidade de massa depositada é aproximadamente a mesma. Paralelamente, as razões de transferência, determinadas através do controle da variação da área da monocamada na interface líquido-ar e da área recoberta pela monocamada no substrato sólido, a cada etapa do procedimento, imersão e suspensão do substrato, mostraram-se iguais para cada camada depositada e tendendo a 1.

Outro argumento a favor da eficácia da transferência do lipídio da subfase para o filme LB consiste na comparação entre a razão de transferência na água pura e esta mesma razão na subfase contendo Zn^{2+} . Explicando: a deposição destas monocamadas de lipídios formadas sobre uma subfase de água pura fornece razão de transferência bem inferior a 1, mostrando o desprendimento de parte do material da superfície do substrato sólido. Porém, com a subfase utilizada neste trabalho (contendo íons Zn^{2+}) obteve-se uma razão de transferência tendendo a 1, tanto para a imersão quanto para a emersão do substrato.

7.2.2. Tipo de filmes obtidos

O processo de transferência alternou emersão e imersão, produzindo um filme LB de múltiplas camadas de lipídio, depositados na forma Y. Este tipo de filme é confirmado pelo fato das transferências das monocamadas da interface líquido-ar para a superfície do substrato sólido não diferirem na imersão e emersão do mesmo.

7.2.3. Massa transferida

A massa depositada por camada foi calculada através da variação de frequência medida antes e depois da deposição através da técnica de MCQ, usando a equação de Sauerbrey (Capítulo 5). Os valores foram lançados nos gráficos apresentados, e a partir da regressão linear das retas apresentadas nestes gráficos, obtivemos o valor da variação de massa por camada (Δm).

O resultado, para $Zn^{2+}_{1/2}AA$, foi de $\Delta m = 78 \text{ ng}$ ($R = 0,9986$). Na pressão de deposição de 30 mN/m a área ocupada por molécula é de 19 \AA^2 . Como a área total depositada é de $0,392 \text{ cm}^2$, obtém-se um número médio total de moléculas de $2,0 \cdot 10^{14}$. Sendo $345,2 \text{ g/mol}$ a massa molar do $Zn^{2+}_{1/2}AA$, este número de moléculas corresponde a 115 ng , que é o valor esperado teoricamente para a massa depositada. Comparando-se este valor de massa com Δm , tem-se um desvio de 47% . Uma vez que não se detectou diferenças nas razões de transferências para as monocamadas depositadas durante a imersão e suspensão do substrato, sugere-se que este resultado possa estar associado a uma mudança na área por molécula que o lipídio passa a ocupar na interface sólido-ar em relação àquela observada na interface líquido-ar através da curva π -A.

Usando o mesmo raciocínio para as demais deposições obtém-se o quadro comparativo apresentado na Tabela 2, onde (*) corresponde ao valor numérico da tangente do gráfico de massa depositada em função do número de camadas e (**) à massa depositada por camada $= N \times m = (A_{\text{cristal}} / A_{\text{moléc.}})$, em que 'N' corresponde ao número de moléculas depositadas e 'm' a massa por molécula (M/N_{Av}), A_{cristal} = área da seção ativa do cristal de quartzo usado na MCQ e $A_{\text{moléc.}}$ a área ocupada por molécula do lipídio na interface líquido-ar obtida da isoterma de pressão superficial.

Tabela 2: Características das deposições de monocamadas dos diferentes lipídios sobre cristais de quartzo recobertos por ouro utilizados na técnica de MCQ.

Lipídio Formador da monocamada	$A_{\text{moléc.}}$ ($\text{\AA}^2/\text{moléc}$)	Massa depositada por camada (ng) (MCQ) (*)	Massa depositada por camada (ng) (isoterma) (**)	Desvio (%)
Zn^{2+} $\frac{1}{2}$ AA: 345, 2 g/mol	19	78	115	47
Zn^{2+} $\frac{1}{2}$ AB: 373, 3 g/mol	19	115	124	8
Zn^{2+} $\frac{1}{2}$ AE: 296, 7 g/mol	19	100	103	3
Zn^{2+} $\frac{1}{2}$ DMPA: 647, 5g/mol	39	116	140	21
Zn^{2+} $\frac{1}{2}$ DLPA: 569, 4 g/mol	39, 7	79, 1	94, 6	19

Para os dados apresentados na Tabela 2, a pressão superficial foi mantida para todos os casos em 30 mN/m durante a deposição. A área ativa do cristal de quartzo usado na técnica de MCQ neste trabalho é de 0,392 cm².

Os desvios obtidos entre os valores esperados para a massa depositada a partir de considerações sobre os dados da isoterma de pressão superficial e os obtidos pela técnica de MCQ foram em torno de 20% para os fosfolipídios e mais baixos para os ácidos graxos com exceção do ácido araquídico, já comentado anteriormente. Devido a esse resultado decidiu-se excluir o ácido araquídico dos experimentos de adsorção da proteína, pela incerteza muito grande com relação à área ocupada por molécula na interface sólida.

7.3. Deposição da OVA sobre filmes LB

7.3.1. Isotermas de adsorção

A seguir apresentaremos as isotermas de adsorção de ovalbumina (OVA) sobre filmes de diferentes lipídios. Cada ponto foi obtido pelo menos em triplicata. Os desvios experimentais foram variáveis entre 5 e 25% e não foram acrescentados nos gráficos para não

dificultar a visualização. Cada adsorção foi realizada em um filme LB de lipídio diferente, preparado de maneira idêntica. Um suporte foi construído de maneira a possibilitar a transferência simultânea da monocamada para oito diferentes cristais. O controle foi feito através das variações de frequência obtidas para o cristal limpo e o cristal recoberto pelas camadas do filme LB: filmes que fornecessem valores de ΔF diferindo em mais de 20% não eram utilizados.

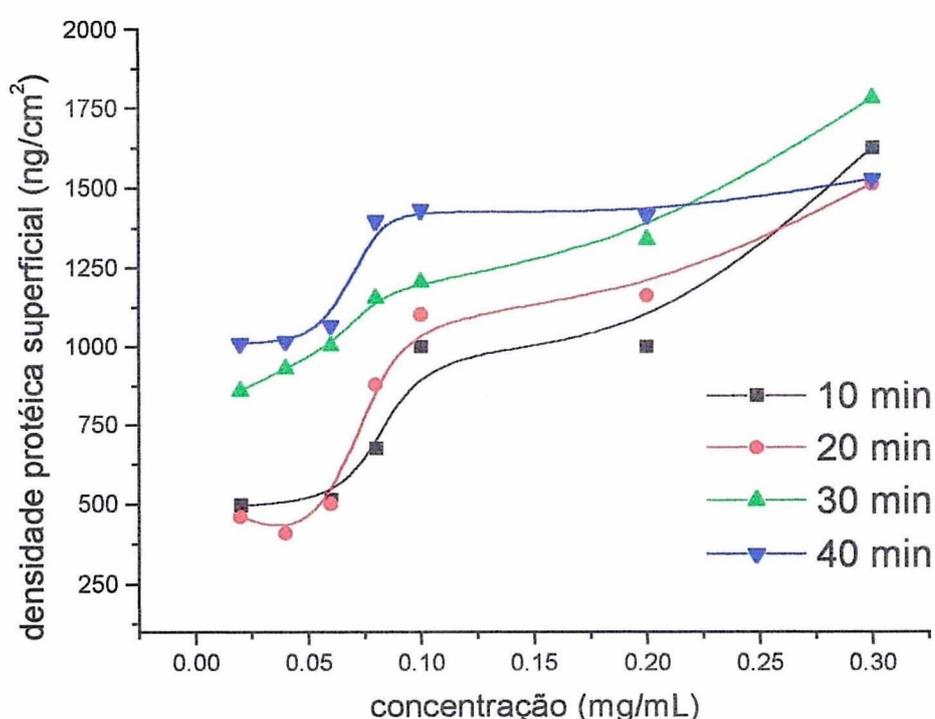


Figura 22: Isoterma de adsorção para ovalbumina em filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ (5 camadas)

Na figura 22 mostramos as isotermas de adsorção de OVA sobre filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$, obtidas após diferentes tempos de contato entre a solução protéica e a superfície sólida. Estas isotermas demonstram perfis muito semelhantes. Mesmo para tempos tão curtos quanto dez minutos a adsorção já é considerável, inclusive para as concentrações mais baixas. Observa-se inicialmente um aumento brusco na adsorção de proteína, até uma concentração

de entre 0,07 e 0,1 mg/ml, dependendo do tempo de adsorção. A partir deste ponto observamos a formação de um patamar até 0,2 mg/ml para a isoterma de 40 minutos, e um ligeiro aumento na densidade da proteína adsorvida até a concentração de 0,3 mg/ml para as outras isotermas. Este perfil é característico de sistemas que exibem efeito de saturação, sendo atribuído à formação de uma monocamada [22-24, 26, 34, 80]. O patamar não é tão definido e aparece em densidades superficiais diferentes para as isotermas obtidas em tempos menores que 40 minutos. O pequeno aumento na adsorção após a concentração de 0,2 mg/ml, nas isotermas de 10, 20 e 30 minutos pode ser, como já foi dito anteriormente, devido a uma transição e/ou um rearranjo da camada adsorvida. A adsorção, praticamente constante e baixa, para concentrações abaixo de 0,07 mg/mL e intervalos de tempo de 10 e 20 minutos pode ser atribuída inicialmente a processos difusivos, que interferem mais em concentrações mais baixas e que impedem que o aumento da adsorção seja linear com a concentração na faixa mencionada. Pode também estar associada a uma ativação ou necessidade de mudança de conformação da proteína para que a adsorção seja efetiva em baixas concentrações. De qualquer forma, trata-se de um efeito cinético.

Um outro fato importante observado até a concentração de 0,2 mg/ml é que, para intervalos de tempo crescentes observa-se também um aumento na densidade superficial da proteína adsorvida nas diferentes isotermas de adsorção.

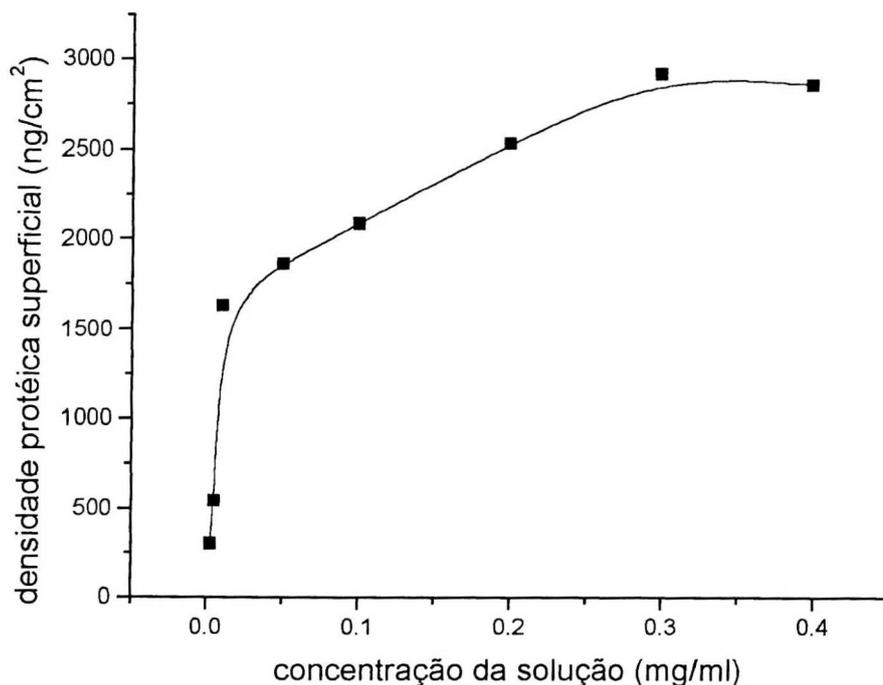


Figura 23: Isoterma de adsorção para ovalbumina em filmes LB de Zn²⁺_{1/2}DLPA (5 camadas)

Na figura 23 mostramos a isoterma de adsorção de OVA sobre filme LB de Zn²⁺_{1/2}DLPA, obtida após 30 minutos de contato entre a solução protéica e o substrato sólido modificado pelo filme LB. Esta isoterma apresenta um perfil diferente da isoterma obtida para adsorção sobre o filme LB de Zn²⁺_{1/2}DMPA após o mesmo tempo de contato. Ela apresenta um aumento brusco na densidade da proteína adsorvida até uma concentração de 0,025 mg/ml e um aumento mais suave até 0,3 mg/ml. Em seguida apresenta um patamar mais definido do que os apresentados nas isotermas obtidas para o filme LB de Zn²⁺_{1/2}DMPA. A densidade superficial da proteína neste caso é maior do que aquela obtida para a adsorção sobre filmes de Zn²⁺_{1/2}DMPA. Esta diferença é estatisticamente significativa, levando-se em consideração os desvios nos dados experimentais. Não se observa aumento de adsorção após o atingimento do patamar na faixa de concentração estudada: ou não ocorre a formação de multicamadas ou não se tem rearranjo das moléculas adsorvidas nesse caso. A diferença entre os dois fosfolipídios está no número de átomos de carbono da cadeia hidrofóbica: 12 no caso do

DLPA e 14 no caso do DMPA, diferença esta que leva a um comportamento diferenciado quanto à pressão de transição entre os estados expandido e condensado para as monocamadas dos dois fosfolípidios. Para o DLPA a pressão de transição é mais elevada, ou seja o estado expandido é mais estabilizado, e não é extinta na presença de íons zinco. Isto pode acarretar uma maior mobilidade para as moléculas também no substrato sólido. Desta forma, não simplesmente a natureza hidrofóbica da superfície do substrato sólido define a forma de adsorção da proteína, mas também a mobilidade das cadeias hidrocarbônicas.

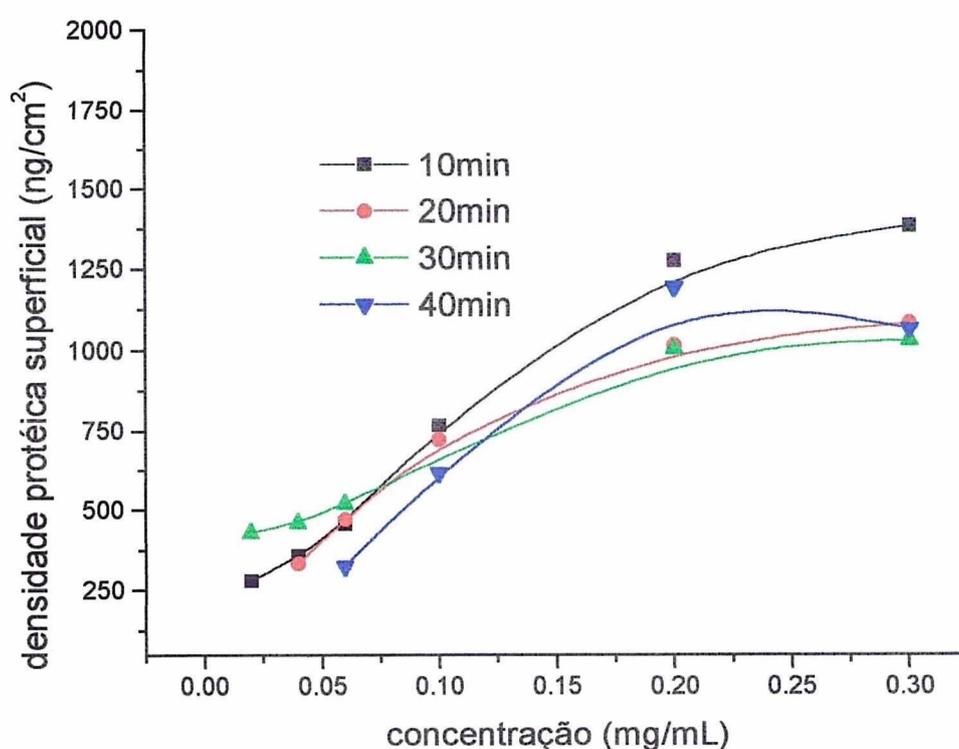


Figura 24: Isoterma de adsorção para ovalbumina em filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$ (5 camadas)

Na figura 24 temos as isotermas de adsorção de OVA sobre filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$. Estas isotermas diferem menos entre si que aquelas apresentadas para OVA sobre filmes de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$. Observa-se um aumento na adsorção da proteína menos brusco e mais linear do que nos outros casos até 0,3 mg/ml, atingindo posteriormente uma possível saturação. Esta possível saturação na adsorção no filme de $Zn^{2+}_{1/2}AE$ ocorre entretanto para concentrações

mais elevadas que aquelas obtidas para a adsorção de OVA sobre os filmes de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$ e $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$.

Comparando as isotermas de adsorção de OVA nas superfícies dos diferentes lipídios nota-se que a densidade da proteína adsorvida sobre a superfície dos filmes de fosfolipídios é maior do que sobre a superfície dos filmes do ácido graxo, em todas as concentrações e nos diferentes tempos. Constata-se também que a densidade da proteína adsorvida na superfície do filme de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$, que apresenta maior mobilidade das cadeias, é muito maior do que a densidade superficial da proteína adsorvida na superfície do filme de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$, e que esta, por sua vez, é maior do que a densidade superficial da proteína adsorvida na superfície do filme de $Zn^{2+}_{1/2}AE$, em todas as concentrações e nos diferentes tempos.

Outro ponto importante que deve ser observado é que em concentrações mais elevadas (0,2 e 0,3 mg/ml para o $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ e $Zn^{2+}_{1/2}AE$; e 0,3 para o $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$) e em tempos maiores, principalmente acima de 40 minutos, ocorre uma diminuição na adsorção da proteína, o que praticamente não ocorre em tempos menores. Voltaremos a este ponto na análise das cinéticas de adsorção.

7.3.2. Cinéticas de adsorção

Apresentamos a seguir as cinéticas de adsorção de OVA sobre filmes LB de diferentes lipídios.

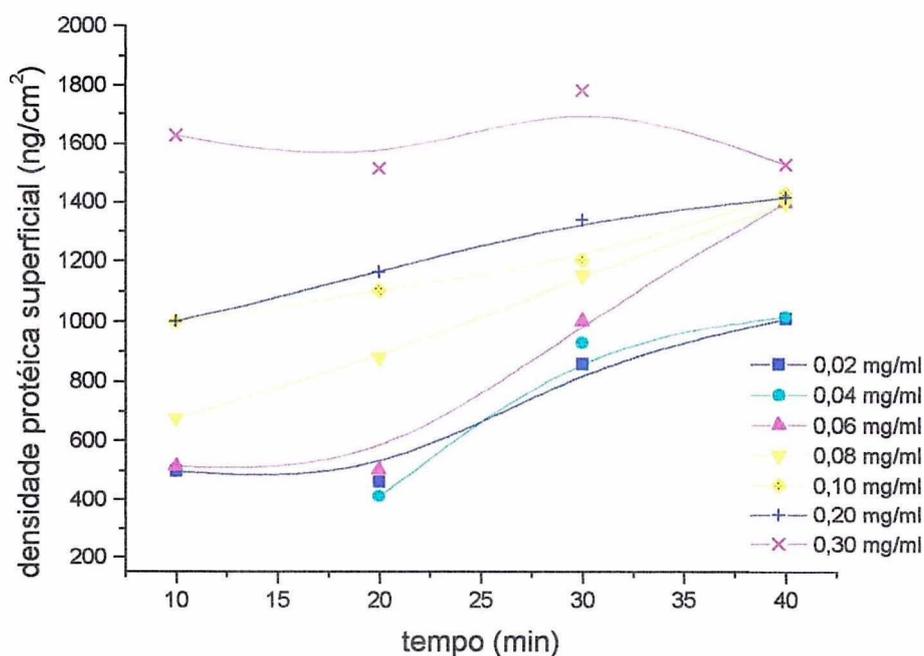


Figura 25: Cinética de adsorção de ovalbumina sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$.

Na figura 25 mostramos a cinética de adsorção de OVA sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$. As cinéticas apresentam perfis de adsorção semelhantes nas diferentes concentrações. Observa-se um aumento constante na densidade da proteína adsorvida com o passar do tempo, exceto na maior concentração utilizada (0,3 mg/ml), em que a densidade superficial permanece praticamente constante durante todo o tempo. Após 40 minutos, observamos uma tendência à saturação da adsorção, com posterior diminuição da massa adsorvida, que fica mais evidente na concentração de 0,3 mg/ml, em que a quantidade adsorvida sofre uma diminuição nítida com o tempo. Apesar do que foi apresentado no Capítulo 3 sobre a baixa probabilidade de dessorção de macromoléculas, constata-se que no caso de proteínas globulares solúveis no meio de adsorção ocorre uma diminuição na densidade superficial com o tempo, para a qual não se tem outra justificativa senão a ocorrência de dessorção. Este processo pode ser devido ao fato de algumas moléculas que adsorveram posteriormente não estarem em contato direto com a superfície, dessa forma a interação proteína-solvente é favorecida em detrimento às interações proteína-proteína [44].

OVA e BSA, como todas as proteínas solúveis, são mais facilmente “arrancadas” da superfície adsorvente para a solução, em parte pela repulsão eletrostática que ocorre entre as moléculas vizinhas já adsorvidas [44] e talvez pela maior interação de grupos hidrofílicos com o solvente.

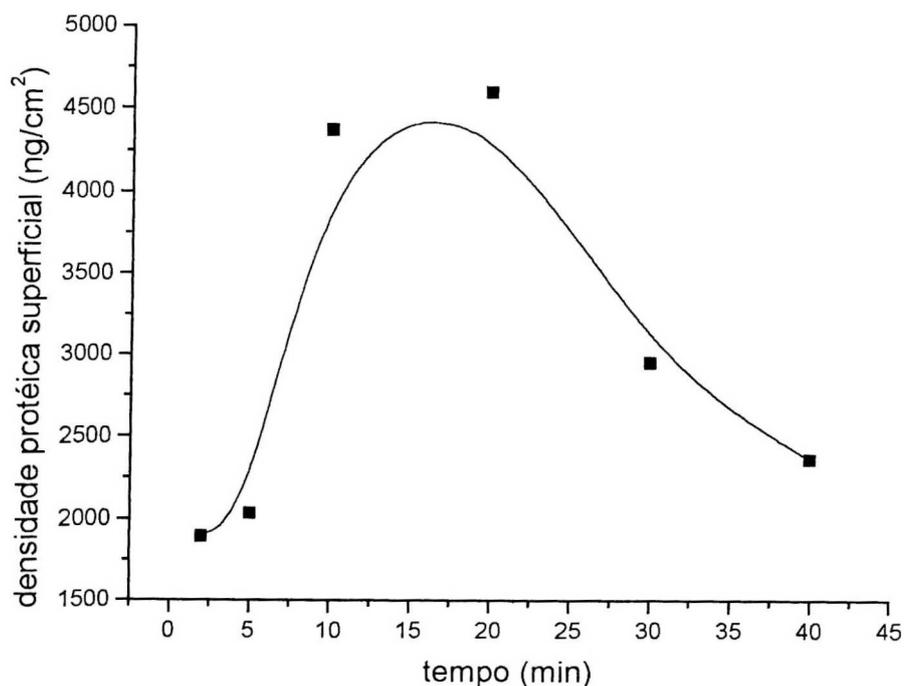


Figura 26: Cinética de adsorção de ovalbumina sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$.

Na figura 26 mostramos a cinética de adsorção de OVA sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$. Apesar dessa cinética ter sido acompanhada em um intervalo de tempo maior, seu perfil é um pouco diferente daquele apresentado para filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$. Tem-se, no início, uma adsorção muito brusca, com um máximo na densidade superficial da proteína ($4404 \mu g/cm^2$) ocorrendo aos 15 minutos, e, logo após, uma dessorção muito intensa. Como a quantidade adsorvida é muito maior num menor intervalo de tempo, comparada àquela para a adsorção sobre o filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$, tem-se outro argumento de apoio à hipótese da dessorção sugerida para explicar a cinética anterior.

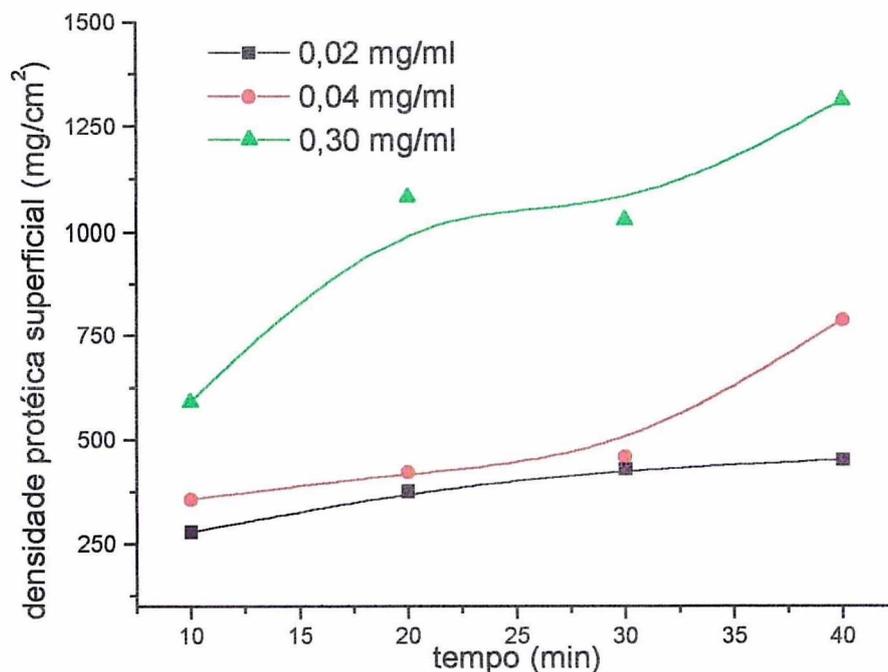


Figura 27: Cinética de adsorção de ovalbumina sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$.

Na figura 27 mostramos a cinética de adsorção de OVA sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$, com perfis semelhantes às cinéticas para os filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$, com um aumento constante na densidade superficial da proteína adsorvida e, posteriormente, uma tendência à saturação e a uma possível dessorção em tempos maiores do que 40 minutos.

Comparando a cinética de adsorção de OVA nas superfícies de filmes LB dos diferentes lipídios, observa-se também que a densidade da proteína adsorvida nas superfícies de fosfolipídios é maior do que aquela adsorvida nas superfícies do ácido graxo, em todos os tempos e nas diferentes concentrações. Vê-se também que a densidade da proteína adsorvida na superfície do filme de $Zn^{2+}_{1/2}DLPA$ é muito maior do que a densidade da proteína adsorvida na superfície do filme de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$, esta é maior, mas não muito, do que a densidade superficial da proteína adsorvida em filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$, em todos os tempos e nas diferentes concentrações.

Uma explicação para essas diferenças na densidade superficial da proteína adsorvida pode vir da quantidade de cadeias hidrofóbicas disponíveis para adsorção por área. A uma pressão de 30 mN/m, a área disponível por molécula para o DLPA é de $\approx 40 \text{ \AA}^2$; para o DMPA de $\approx 39 \text{ \AA}^2$; e para o AE de $\approx 19 \text{ \AA}^2$. Como os dois fosfolipídios apresentam duas cadeias hidrofóbicas, que na pressão de deposição encontram-se praticamente perpendiculares à superfície, tem-se uma densidade de 1 cadeia por $\approx 20 \text{ \AA}^2$, isto é, a densidade de cadeias hidrofóbicas é igual nas três situações. O AE, por seu turno, embora também apresente uma densidade de 1 cadeia por $\approx 19 \text{ \AA}^2$, apresenta cadeias hidrofóbicas maiores, formadas por 17 carbonos, que conferem à monocamada um fator de compressibilidade (278 mN/m) apenas ligeiramente inferior àquele obtido para os dois fosfolipídios (300 mN/m). Entretanto, monocamadas de ácidos graxos não apresentam região de transição entre estados expandido e condensado e a interação lateral entre cadeias hidrofóbicas mais longas e simples deve ser consideravelmente maior que entre cadeias mais curtas e duplas.

7.4. Cinéticas de adsorção de BSA e OVA em filmes LB de $\text{Zn}^{2+}_{1/2}\text{DMPA}$ e $\text{Zn}^{2+}_{1/2}\text{AE}$

O gráfico a seguir compara as cinéticas de adsorção de BSA e OVA na concentração de 0,02 mg/ml sobre as superfícies de filmes LB de $\text{Zn}^{2+}_{1/2}\text{DMPA}$ e $\text{Zn}^{2+}_{1/2}\text{AE}$.

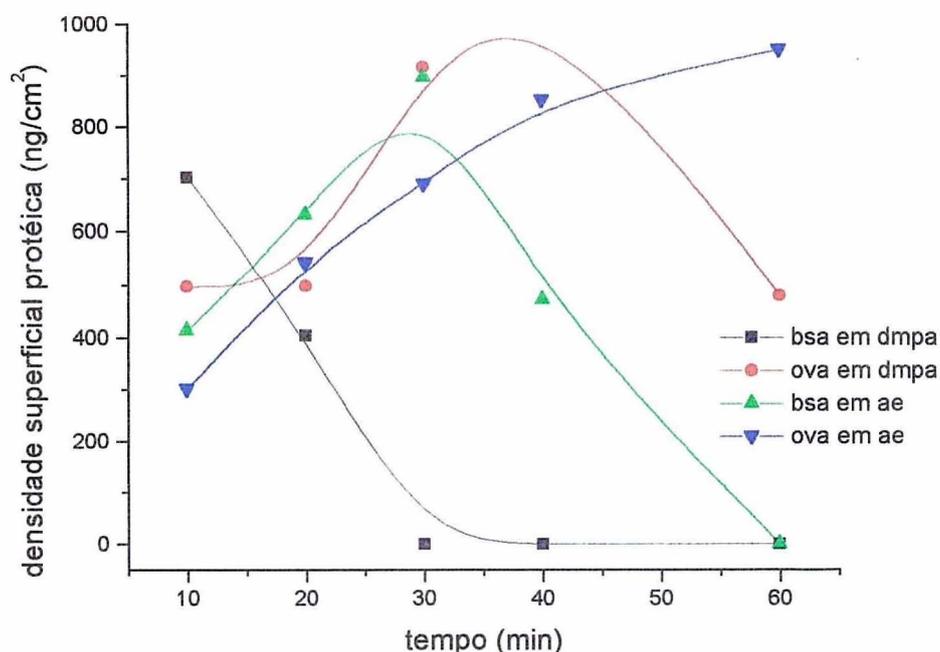


Figura 28: Cinéticas de adsorção de albumina de soro bovino e ovalbumina na concentração de 0,02mg/ml sobre as superfícies de filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ e $Zn^{2+}_{1/2}AE$.

Continua-se obtendo uma maior quantidade adsorvida de OVA sobre a superfície de filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ do que sobre filmes LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$, até o tempo de 40 minutos, como nos gráficos apresentados anteriormente. A cinética para a adsorção de BSA segue também o mesmo perfil, adsorvendo mais na superfície do filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ até aproximadamente 15 minutos.

Observamos também uma maior velocidade na adsorção e posterior dessorção das duas proteínas sobre a superfície do filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ do que sobre filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$.

Consta-se, então, que o filme LB de $Zn^{2+}_{1/2}AE$ fixa por mais tempo a proteína, indiferentemente de ser OVA ou BSA, ou seja, a proteína dessorve mais rápido em $Zn^{2+}_{1/2}DMPA$ do que em $Zn^{2+}_{1/2}AE$, provavelmente devido ao argumento anteriormente apresentado: quando a proteína adsorve mais rapidamente, atinge mais rapidamente o ponto de saturação, em que a primeira camada foi completamente adsorvida. Atingido antes o ponto

de saturação, o processo de dessorção também começará mais cedo.

As cinéticas apresentam uma adsorção de BSA que começa mais bruscamente do que a de OVA, independente da superfície, iniciando-se também antes o processo de dessorção; a densidade superficial de OVA e o tempo em que ela fica na superfície são maiores do que estes mesmos parâmetros para BSA, nas duas superfícies em questão. Esta diferença pode ser invocada como argumento de apoio para a hipótese de que a adsorção mais rápida, ao atingir antes o ponto de saturação, facilita o início do processo de dessorção. Ainda assim, a diferença de velocidade de adsorção, propriamente dita, não é explicada por esta hipótese.

Nossa hipótese para explicar este comportamento diferente entre a BSA e a OVA apoia-se na comparação das estruturas das duas proteínas. A BSA é uma proteína maior e mais flexível do que a OVA, o que tem duas conseqüências: terá um maior número de pontos de contato, favorecendo a rapidez das primeiras ligações; e expondo mais facilmente e em maior quantidade as estruturas secundárias em α -hélice no processo de adsorção, o que implica em mais rearranjos estruturais, fazendo com que a completa adsorção da molécula leve mais tempo. OVA, por seu turno, apresentará menos pontos de contato, o que aumentará o tempo necessário para as primeiras ligações, mas, sendo menos flexível e tendo menos quantidade de estruturas secundárias em α -hélice a expor no processo de adsorção, completará este processo mais rapidamente do que a BSA, formando assim ligações mais estáveis. Não é possível decidir sobre esta hipótese com os dados obtidos pois, como as cinéticas utilizadas neste trabalho foram de no máximo 1 hora, o tempo pode não ter sido suficiente para ligar completamente a BSA à superfície do substrato, mesmo que o tenha sido para a OVA. Cinéticas com tempos maiores mostrariam, se a hipótese é verdadeira, com a adsorção de BSA atingindo mais tardiamente o ponto de estabilidade atingido pela OVA.

Ainda assim, outros estudos, já comentados, trazem argumentos de apoio à hipótese, especialmente os que afirmam que moléculas dessorvidas de BSA apresentam uma perda de

50 a 60% das estruturas secundárias em α -hélice [20], enquanto que os estudos com OVA indicam uma menor quantidade de perda destas estruturas [28].

Uma última observação é que tanto as isotermas quanto as cinéticas apoiam a hipótese de que a adsorção de proteínas solúveis é favorecida durante a formação da primeira camada e depois disso, como as proteínas não se ligam diretamente à superfície, a adsorção deixa de ser favorecida.

Capítulo 8 - Conclusões

- As isotermas de pressão superficial confirmam que os íons Zn^{2+} presentes na subfase da monocamada extinguem a região de transição entre os estados expandido e condensado da monocamada de DMPA e provocam apenas uma diminuição na pressão de transição de fases nas monocamadas DLPA. A presença de íons zinco na subfase também diminui a área ocupada por molécula e acarretam uma elevação substancial do fator de compressibilidade superficial para as monocamadas dos ácidos graxos (araquídico, bêenico e esteárico).
- Os gráficos de massa depositada em função de diferentes números de camadas dos lipídios são lineares em todos os casos, mostrando que a massa depositada por camada é constante. A diferença entre a massa determinada por MCQ e aquela estimada a partir de dados na interface líquida para o ácido araquídico, com maior número de carbonos dentre os ácidos graxos estudados é interpretada como uma variação na área que as moléculas ocupam na interface sólida em relação àquela que as mesmas ocupam na interface líquido-ar.
- As isotermas e cinéticas de adsorção para a OVA mostram que a densidade superficial protéica é diferente para os diferentes lipídios utilizados. OVA adsorve mais nos filmes dos fosfolipídios DMPA e DLPA do que em filmes de ácido esteárico, e entre os fosfolipídios, adsorve muito mais em DLPA do que em DMPA. Desta forma, não só a natureza hidrofóbica da interface é importante na adsorção da proteína, como também o grau de mobilidade da superfície. DLPA não apresenta região de coexistência de fases na presença íons zinco, enquanto DMPA, sim.
- Na concentração de 0,02 mg/ml a BSA e a OVA fixam-se por mais tempo na superfície de ácido esteárico do que na superfície de DMPA. A OVA fixa-se por

mais tempo na superfície dos lipídios do que a BSA, independente de quais sejam estes lipídios. A adsorção mais rápida está ligada também à mobilidade da própria molécula da proteína.

Bibliografia

1. Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M.; *Princípios de Bioquímica*, (2ª edição) Sarvier Editora, São Paulo, 2000.
2. Gennis, R.B.; *Biomembranes: molecular structure and function*, Springer-Verlag, New York, 1989.
3. Stryer, L.; *Bioquímica*, 4ª ed., Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1996.
4. Marzzoco, A.; Torres, B.B.; *Bioquímica Básica*, 2ª ed., Editora Guanabara Koogan AS, Rio de Janeiro, 1999.
5. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell V.W.; *Harper: Bioquímica*, 7ª ed., Atheneu Editora, São Paulo, 1994.
6. Helm, C.A.; Loxhubes, L.; Lösche, M.; Möhwald, H.; *Colloid & Polymer Sci*, **1986**, 264, 46.
7. Voet, D.; Voet, J.G.; *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1990.
8. Haynes, C.A.; Norde, W.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **1994**, 2, 517.
9. Santos, H.; Ciancaglini, P.; *Biochem. Education*, **2000**, 28, 178.
10. Yagle, P.L.; *The Membranes of Cells*, 2ª ed., Academic Press, New York, 1993.
11. Fergusson, M.A.J.; *Biochemi. Soc. Trans*, **1992**, 20, 243.
12. Tanford, C.; Reynolds, J.A.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1976**, 456, 133.
13. Helenius, A.; Semons, K.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1975**, 415, 29.
14. Koepsell, H.; *Ver. Physcol. Biochem. Pharmacol.*, **1986**, 104, 65.
15. Silvius, J.R.; *Ann. Ver. Biophys. Biomol. Struct.*, **1992**, 21, 323.
16. Hjelmeland, L.M.; *Methods in Enzymology*, **1990**, 181, 253.
17. Cornelius, F.; *Biochem. Biophys. Acta*, **1991**, 1071, 19.
18. Wahlgren, M.C.; Poulsson, M.A.; Arnebrant, T.; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1993**, 70, 139.

19. Lu, J.R.; Su, T.J.; Thomas, R.K.; Cui, Z.F.; Penfold, J.; *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 8100.
20. Norde, W.; Favier, J.P.; *Colloids and Surfaces*, **1992**, *64*, 87.
21. Fitzpatrick, H.; Luckham, P.F.; Friksen, S.; Hammond, K.; *Colloids and Surfaces*, **1992**, *65*, 43.
22. Brash, J.L.; Horbett, T.A.; *Proteins at interfaces*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, 1987.
23. Norde, W.; Kleijn, M.; *Heterogeneous Chemistry Review*, **1995**, *2*, 157.
24. Norde, W.; Haynes, C.A.; *Colloids and Surfaces B: Bionterfaces*, **1994**, *2*, 517.
25. Norde, W.; *Pure Appl. Chem.*, **1994**, *66*, 491.
26. Norde, W.; MacRitchie, F.; Nowicka, G.; Lyklema, J.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1986**, *112*, 447.
27. Chan, B.M.C.; Brash, J.L.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1981**, *82*, 217.
28. Kondo, A.; Oku, S.; Higashitani, K.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, *143*, 214.
29. Levitt, M.; *J. Mol. Biol.*, **1976**, *104*, 59.
30. Tanford, C.; *Adv. Protein Chem.*, **1970**, *24*, 1.
31. Norde, W.; *Adv. Colloid Interface Sci.*, **1986**, *25*, 267.
32. Kronman, M.J.; *Crit. Ver. Biochem. Mol. Biol.*, **1989**, *24*, 565.
33. Regnier, F.E.; *Science*, **1987**, *328*, 319.
34. Parfitt, G.D.; Rochester, C.H.; *Adsorption from solution at the solid/liquid interface*, Academic Press, New York, 1983.
35. Baillou, N.; Dejardin, P.H.; Schmitt, A.; Brash, J.L.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1984**, *100*, 167.
36. Schaaf, P.; Dejardin, P.; *Colloids Surfaces*, **1988**, *19*, 89.
37. Blomberg, E.; Claesson, P.M.; Tilton, R.D.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, *12*, 179.

38. Ward, A.F.H.; Tordai, L.; *J. Chem. Phys.*, **1946**, *14*, 453.
39. Dabros, T.; Van der Vem, T.G.M.; *Colloid Polym Sci.*, **1983**, *26*, 683.
40. Norde, W.; Anusiem, A.C.I.; *Colloids Surfaces*, **1992**, *66*, 73.
41. Hasegawa, M.; Kitano, H.; *Langmuir*, **1992**, *8*, 1582.
42. Corsel, J.W.; Willems, G.M.; Kop, J.M.M.; Cuypers, P.A.; Hermens, W.T.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1986**, *11*, 544.
43. Stuart, C.M.A.; Fleer, G.J.; Scheutjens, J.M.H.M.; *J. Colloid Interface Sci.*, **1984**, *97*, 526.
44. Kurrat, R.; Ramsden, J.J.; Prenosil, J.E.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1994**, *90*, 587.
45. Roberts, G.; *Langmuir-Blodgett*[®], Plenum Press, New York, 1990.
46. Gaines, G.L.; *Thin Solid Films*, **1983**, *99*, 9.
47. Langmuir, I.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1917**, *39*, 1848.
48. Blodgett, K.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, 964.
49. Mann, B.; Kuhn, H.; *J. Appl. Phys.*, **1971**, *42*, 4398.
50. Kuhn, H.; Möbius, D.; *Angew. Chem. Internat. Edit*, **1971**, *10*, 620.
51. Bull, H.B.; *J. Biol. Chem.*, **1938**, *125*, 585.
52. Bull, H.B.; *J. Biol. Chem.*, **1945**, *67*, 4.
53. Kashiwagi, M.; *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1950**, *31*, 176.
54. Bull, H.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, *67*, 10.
55. Ghosh, S.; Keith, B.; Bull, H.D.; *J. Coll. Sci.*, **1964**, *19*, 457.
56. Rothen, A.; *J. Biol. Chem.*, **1947**, *168*, 75.
57. Bull, H.B.; *Arch. Biochem. Bioph.*, **1957**, *68*, 102.
58. Methot, M.; Boucher, F.; Salesse, C.; Subirade, M.; Pezolet, M.; *Thin Solid Films*, **1996**, *284-285*, 627.
59. Berzina, T.S.; Troitsky, V. I.; Petrigliano, A.; Alliata, D.; Tronin, A. Yu.; Nicolini, C.;

- Thin Solid Films*, **1996**, 284-285, 757.
60. Vila, N.; Puggelli, M.; Gabrielli, G.; *Colloids Surf.*, **1996**, A119(2/3), 95.
 61. Sommer, F.; Alexandre, S.; Dubreuil N.; Lair, D.; Duc, T.; Valleton, J.M.; *Langmuir*, **1997**, 13(4), 791.
 62. Edmiston, P.L.; Lee, J.E.; Cheng, S.; Saavedra, S.; Scott, J.; *Am.Chem.Soc.*, **1997**, 119(3), 560.
 63. Dubrovsky, T.; Tronin, A.; Dubrovskaya, S.; Guryev, O.; Nicolini, C.; *Thin Solid Films*, **1996**, 294, 284.
 64. Chudinova, G.K.; Chudinov, A.V.; Savanskry, V.V.; Prokhorov, A.M.; *Thin Solid Films*, **1997**, 307, 294.
 65. Nicolini, C.; *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15(10), 395.
 66. Nicolini, C.; Adami, M.; Dubrovsky, T.; Erokhin, V.; Facci, P.; Paschkevitsch, P.; Sartore, M.; *Sens. Actuators B*, **1995**, B24(1-3), 121.
 67. McConnell, H.M.; *Annu. Ver. Phys. Chem.*, **1991**, 42, 171.
 68. Möhwald, H., *Annu. Ver. Phys. Chem.*, **1990**, 41, 441.
 69. MacRitchie, F.; *Chemistry at Interfaces*, Academic Press, New York, 1989.
 70. Adamson, A.W.; *Physical Chemistry of Surfaces*, Wiley-Publication, New York, 1990.
 71. Davies, J.T.; Redeal, E.K.; *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New York, 1963.
 72. Ulman, A.; *An introduction to ultrathin organic films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, New York, 1990.
 73. Ebara, Y.; Ebato, H.; Ariga, K.; Okahata, Y.; *Langmuir*, **1994**, 10, 2267.
 74. Sauerbrey, G.; *Z. Phys.*, **1959**, 155, 206.
 75. Haas, H.; Torrielli, M.; Steitz, R.; Cavatorta, P.; Sorbi, R.; Fasano, A.; Riccio, P.; Gliozzi, A.; *Thin Solid Films*, **1998**, 327, 627.
 76. Buhaenko, M.R., Goodwin, J.W.; Richardson, R.M.; *Thin Solids Films*, **1988**, 159, 171.

77. Yazdanian, M.; Yu, H.; Zografi, G.; *Langmuir*, **1990**, *6*, 1093.
78. Gaines, G.L.; *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley-Interscience: New York, 1966.
79. Caseli, L.; Zanicelli, M.E.D.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A.; Enzymatic Activity of Alkaline Posphatase Adsorbed on Dimyristoylphosphatidic Acid Langmuir-Blodgett Films : *in press: Colloids and Surfaces B*
80. Atkins, P.W.; *Physical Chemistry*, 4^a ed., Oxford University Press, 1990, p.884.