

Cinética e Termodinâmica da Interacção de
Anfifilas Fluorescentes com Bicamadas Lipídicas
na fase Líquido-Ordenado

Sofia Isabel Antunes Coelho Santos

Mestrado em Química
Departamento de Química
FCTUC

Setembro 2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Cinética e Termodinâmica da Interação de Anfífilas
Fluorescentes com Bicamadas Lipídicas na fase
Líquido-Ordenado**

Sofia Isabel Antunes Coelho Santos

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado
em Química, ramo de Química Avançada**

Orientadora: Professora Doutora Maria João Moreno

**Setembro de 2010
Universidade de Coimbra**

Índice

Índice	i
Abreviaturas.....	iii
Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	v
Resumo	vi
Abstract.....	vii
Agradecimentos	viii
Capítulo 1: Introdução	1
1.1. Membranas Biológicas	1
1.1.1. Estrutura e Composição das Membranas Biológicas	1
1.1.2. Dinâmica e Organização	4
1.1.3. Fluidez da Membrana.....	7
1.1.4. Perfil da Pressão Lateral e da Densidade da Membrana	8
1.1.5. Permeabilidade Selectiva das Biomembranas.....	10
1.1.6. Água como Solvente Biológico	13
1.2. Sistemas Modelo de Biomembranas.....	14
1.2.1. Concentração Micelar Crítica e Parâmetro Crítico de Empacotamento	14
1.2.2. Lipossomas.....	15
1.2.3. Comportamento de fases	16
1.3. Barreira Hematoencefálica.....	21
1.4. Objectivo deste estudo	22
Capítulo 2: Resultados e Discussão.....	26
2.1. Metodologia para determinar os Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos da interacção da Sonda com a Bicamada Lipídica	26
2.2. Determinação dos Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos da interacção do NBD-C8 com a Bicamada Lipídica	29
2.2.1. Constante de Equilíbrio K_L da interacção de NBD-C8 e LUVs de SpM/Col	29
2.2.2. Cinética da interacção de NBD-C8 com LUVs de SpM/Col.....	30

2.2.3. Termodinâmica da inserção e desorção da anfifila NBD-C8 em/de LUVs de SpM/Col	32
2.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos da interacção do NBD-C10 com a Bicamada Lipídica	33
2.3.1. Constante de Equilíbrio K_L da interacção de NBD-C10 e LUVs de SpM/Col	33
2.3.2. Cinética da interacção de NBD-C10 com LUVs de SpM/Col.....	34
2.3.3. Termodinâmica da inserção e desorção da anfifila NBD-C10 em/de LUVs de SpM/Col	35
2.4. Discussão	36
Capítulo 3: Conclusões.....	41
Capítulo 4: Experimental.....	43
4.1. Material	43
4.1.1. Reagentes	43
4.1.2. Equipamento.....	43
4.2. Métodos	44
4.2.1. Preparação de LUVs.....	44
4.2.2. Análise da Concentração de Lípidos nos LUVs.....	44
4.2.3. Determinação das Constantes de Equilíbrio (K_L) da interacção das anfifilas NBD-Cn com os LUVs	45
4.2.4. Determinação das Constantes Cinéticas da interacção das anfifilas NBD-Cn com os LUVs.....	46
Bibliografia.....	47

Abreviaturas

ALF – Anfífilas lipídicas fluorescentes

BHE – Barreira Hematoencefálica

CMC - Concentração micelar crítica

Col – Colesterol

DMPE – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DPPC – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

GUV – Vesículas unilamelares gigantes

k_{-} - Constante de velocidade de desorção

k_{+} - Constante de velocidade de inserção

$k_{\text{-dif}}$ – Constante de velocidade da separação do complexo de encontro por difusão

k_{dif} – Constante de velocidade de processos controlados por difusão

K_L – Constante de equilíbrio da associação

LUV – Vesículas unilamelares grandes

MLV – Vesículas multilamelares

NBD-C n - 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il com uma cadeia alquílica de comprimento n

PC – Fosfatidilcolina

PCE – Parâmetro crítico de empacotamento

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

SpM – Esfingomielina

SUV – Vesículas unilamelares pequenas

β – Constante de velocidade de transferência

Índice de figuras

Figura 1 – Ilustração da membrana biológica	2
Figura 2 – Ilustração das três principais classes de lípidos presentes nas biomembranas	3
Figura 3 – Perfil da pressão lateral de uma camada lipídica. Ilustração esquemática de uma bicamada lipídica com a indicação das forças que actuam na camada (esquerda). Perfil resultante da pressão ou stress (direita)	8
Figura 4 - Distribuição do volume livre (esquerda) e perfil da densidade electrónica (direita) ao longo de uma bicamada	10
Figura 5 – Ilustração esquemática da relação entre o parâmetro crítico de empacotamento e as estruturas dos agregados lipídicos.....	15
Figura 6 – Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de vesículas ...	16
Figura 7 – Diagrama de fase SpM/H ₂ O.....	17
Figura 8 – Diagrama de fase DPPC/Col.....	20
Figura 9 – Estrutura química das anfifilas NBD-C8 e NBD-C10, compostas pelo fluoróforo NBD (a vermelho) ligado a uma cadeia hidrocarbonada com 8 e 10 carbonos.	24
Figura 10 – Diagrama de fase SpM/Col	24
Figura 11 – Intensidade de fluorescência a 530 nm do NBD-C8 em função da concentração de LUVs. A linha a vermelho representa o melhor ajuste da equação (11) aos dados experimentais com um $K_L \approx 6,63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. O gráfico interior representa os espectros de emissão de fluorescência da anfifila NBD-C8 para concentrações de LUVs de 0 mM, 0,5 mM, 1,5 mM, 3 mM e 5 mM.	29
Figura 12 – Intensidade de fluorescência em função do tempo para a anfifila NBD-C8 com concentração 200 nM usando LUVs com concentração 1,5 mM. O melhor ajuste foi dado pela integração numérica das equações diferenciais do esquema cinético (ajuste global), com valores de $k_- \approx 15,0 \text{ s}^{-1}$, $k_+ \approx 9,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_f \approx 0,7 \text{ s}^{-1}$ a 20 °C. No gráfico interior estão representados os resultados experimentais para concentrações de LUVs de 1 mM, 1,25 mM e 2 mM (de baixo para cima).....	31

Figura 13 – Gráfico do tipo Arrhenius para os processos de inserção (A) e desorção (B) da anfifila NBD-C8 em/de LUVs de SpM/Col a temperaturas entre 10 °C e 20 °C. A linha é o melhor ajuste da equação do estado de transição (12) aos dados experimentais. 32

Figura 14 – Intensidade de fluorescência a 530 nm do NBD-C10 em função da concentração de LUVs. O gráfico interior representa os espectros de emissão de fluorescência para concentrações de LUV entre 0 mM e 3 mM. 33

Figura 15 – Intensidade de fluorescência em função do tempo para a anfifila NBD-C10 com concentração 12,5 nM usando LUVs com uma concentração de 0,15 mM. O melhor ajuste foi dado pela integração numérica das equações diferenciais do esquema cinético (ajuste global), com valores de $k_+ \approx 5,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k \approx 5,90 \text{ s}^{-1}$ e $k_f \approx 0,33 \text{ s}^{-1}$ a 12 °C. No gráfico interior estão representados os resultados experimentais para as concentrações 0,1 mM, 0,13 mM e 0,2 mM (de baixo para cima). 34

Figura 16 - Gráfico do tipo Arrhenius para os processos de inserção (A) e desorção (B) da anfifila NBD-C10 em/de LUVs de SpM/Col a temperaturas entre 10 °C e 18 °C. A linha é o melhor ajuste da equação do estado de transição (12) aos dados experimentais. 35

Figura 17 – Representação esquemática do Modelo do Estado de Transição usado na discussão. As linhas a tracejado na molécula de sonda no estado de transição, são para indicar uma liberdade de movimento considerável comparada com o estado completamente inserida. A área a sombreado representa a região interfacial que tem propriedades diferentes da água do meio aquoso. 36

Índice de tabelas

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação das anfifilas NBD-C8 e NBD-C10 com LUVs de SpM/Col e de POPC a 35 °C. 37

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação da anfifila NBD-DMPE com LUVs de SpM/Col e de POPC a 35 °C. 39

Resumo

A barreira hematoencefálica é uma estrutura constituída por células endoteliais muito próximas, que previne a passagem de substâncias da corrente sanguínea para o cérebro, protegendo-o das mesmas.

A monocamada exterior da membrana das células endoteliais tem uma fase líquido-ordenado constituída maioritariamente por esfingomielina, fosfolípidos de cadeia longa saturada e colesterol. Sendo a monocamada exterior a primeira barreira que um soluto tem que ultrapassar de modo a entrar dentro da célula, torna-se assim importante conhecer a cinética de inserção e desorção de anfifilas em/de membranas nesta fase de modo a obtermos dados que possam servir de base para um melhor entendimento do transporte passivo de substâncias através da barreira hematoencefálica.

O presente estudo refere-se à interacção entre duas anfifilas lipídicas fluorescentes, formadas por uma sonda fluorescente, 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il, ligada covalentemente a uma cadeia hidrocarbonada de 8 e 10 carbonos, e bicamadas lipídicas formadas por colesterol e esfingomielina, no estado líquido-ordenado. Neste estudo obtiveram-se as constantes de velocidade de inserção e de desorção, bem como a correspondente constante de equilíbrio. Verificou-se que a velocidade de inserção para ambas as anfifilas não é limitada por difusão, sendo cerca de duas ordens de grandeza inferior ao valor obtido para a inserção destas anfifilas em bicamadas formadas por POPC, na fase líquido-desordenado [34].

A constante de velocidade de desorção obtida para o NBD-C10 é menor que para o NBD-C8, reflectindo a interacção mais forte que se estabelece entre a anfifila com a cadeia alquilo mais longa e a bicamada lipídica. Ambas as velocidades de desorção são comparáveis às obtidas para as bicamadas na fase líquido-desordenado. A constante de equilíbrio obtida entre a fase aquosa e bicamadas lipídicas na fase líquido-ordenado é assim cerca de duas ordens de grandeza inferior que ao valor previamente obtido para o caso de membranas na fase líquido-desordenado.

Todo o trabalho foi realizado a várias temperaturas de modo a permitir a obtenção dos diferentes parâmetros termodinâmicos envolvidos nos processos de inserção e desorção. A contribuição entálpica para a interacção das anfifilas com bicamadas na fase líquido ordenado foi inferior ao obtido para a interacção com bicamadas na fase líquido-desordenado.

Abstract

The blood brain barrier is a structure formed by very tight endothelium cells that prevents substances in the blood entering into the brain.

The outer leaflet of the endothelium cells membrane has a liquid-ordered phase that is rich in sphingomyelin, long chain saturated phospholipids and in cholesterol. Being the outer leaflet the first barrier that a solute has to overcome to enter the cell, it's important to know the kinetics of the insertion and desorption of the amphiphile in/from membranes in that phase, so that we can reach a better understanding about the substances passive transport across the blood brain barrier.

The present study refers to the interaction between two fluorescent lipid amphiphiles, formed by a fluorescent probe, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl, covalently attached to a hydrocarbon chain of 8 and 10 carbons, and a lipid bilayer of cholesterol and sphingomyelin, in the liquid-ordered phase. In this study we obtained the insertion and desorption rate constants, and the correspondent equilibrium constant. The insertion rate is not diffusion controlled for both the amphiphiles, being about two orders of magnitude lower than the previously obtained for the insertion of the amphiphiles into lipid bilayers of POPC in the liquid-disorder phase [34].

The desorption rate constant obtained for NBD-C10 is lower than for NBD-C8, reflecting a stronger interaction between the amphiphile with the longest alkil chain and the lipid bilayer. Both the desorption rates are comparables to the ones obtained for the lipid bilayers in the liquid-disordered phase. The equilibrium constant for the aqueous phase and the lipid bilayers in liquid-ordered phase is about two orders of magnitude higher than the value previously obtained for the case of membranes in the liquid-disordered phase.

All the experiments were performed with different temperatures so that we could obtain the thermodynamic parameters for the insertion and desorption processes. The entalpic contribution for the interaction of the amphiphiles with the bilayer in liquid-ordered phase was lower than the one obtained for the interaction with lipid bilayers in liquid-disordered phase.

Agradecimentos

A conclusão da tese marca o fim de mais uma etapa muito importante da minha vida e, como é próprio desse momento, devo lembrar as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para que tudo chegasse a um bom termo.

Agradeço, inicialmente, à minha orientadora Prof. Doutora Maria João Moreno por, para além de me ter proporcionado inestimável apoio e orientação na sua área de investigação para a constituição deste trabalho, ter participado de forma decisiva para o meu crescimento pessoal e académico de forma crítica e construtiva.

Quero agradecer também ao Prof. Doutor Winchil Vaz, pois foi ele o meu mestre no mais amplo e melhor sentido do termo. Foi ele que me despoletou o meu fascínio pela química biológica, com a sua sabedoria, sensatez e personalidade que lhe é tão característica. Sem ele este trabalho não fazia sentido para mim.

Com estes professores (no verdadeiro sentido da palavra) aprendi a ser crítica e, principalmente, que a pensar é que uma pessoa chega lá.

Aos meus colegas de trabalho só quero dizer uma coisa: “eh pá, sem vocês não teria conseguido!!”

E em último, mas com destaque, aos meus pais e ao meu irmão **POR TUDO!**

Capítulo 1

Introdução

1.1. Membranas Biológicas

A vida, tal como a conhecemos, é impossível de conceber sem as membranas biológicas.

Na evolução da vida no nosso planeta, as membranas celulares das primeiras formas de vida foram o sistema escolhido pela natureza para proteger estes organismos de variabilidades e flutuações do ambiente que os rodeava.

As biomembranas dividem o espaço intracelular em compartimentos a fim de isolar processos e componentes. Além disso, são responsáveis pela natureza de todas as comunicações entre o interior e o exterior desses compartimentos. Estas podem ser na forma de passagem de iões ou moléculas ou na forma de informação, transmitida através de alterações conformacionais dos componentes que constituem as membranas.

1.1.1. Estrutura e Composição das Membranas Biológicas

As membranas biológicas ainda são descritas pelo Modelo de Mosaico Fluido apresentado pela primeira vez por Singer e Nicholson em 1972. Numa versão mais simplificada, a membrana biológica é vista como uma solução bidimensional, onde os solutos (proteínas) difundem livremente pelo solvente fluido (bicamada lipídica), onde estão mergulhados [1].

Os principais componentes das biomembranas são os lípidos e as proteínas. Enquanto que a principal função dos lípidos nas biomembranas é de natureza estrutural, permitindo a formação de uma bicamada estável, as proteínas são os componentes mais activos bioquimicamente nas biomembranas, conferindo as propriedades funcionais características de cada tipo de membrana, contribuindo assim para a diversidade das membranas [2].

Segundo o Modelo de Mosaico Fluido, os lípidos formam uma bicamada, tendo cada monocamada a espessura de uma única molécula de lípido, e onde os lípidos se encontram empacotados de modo a manter as cabeças polares voltadas para a fase

aquosa e as caudas apolares voltadas para o interior da bicamada, orientadas perpendicularmente em relação ao plano da biomembrana (Figura 1).

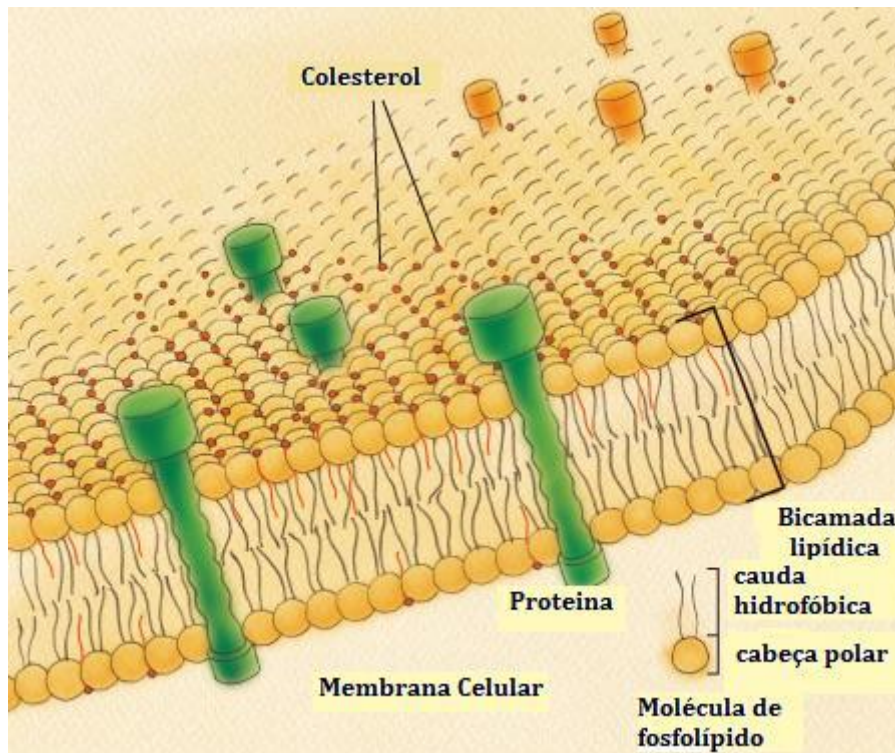


Figura 1 – Ilustração da membrana biológica. Adaptado do site http://www.rikenresearch.riken.jp/images/figures/hi_3787.jpg

Os lípidos presentes na bicamada surgem como suporte, permitindo que as proteínas interajam entre elas. Os lípidos são moléculas anfifílicas, com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. É esta característica que permite a formação da bicamada lipídica.

O centro hidrofóbico da bicamada, torna-a uma barreira impermeável à passagem de substâncias hidrofílicas. O transporte dessas substâncias através da bicamada é mediado por proteínas associadas à membrana.

Uma membrana biológica pode ter uma variedade tão grande de lípidos, que podem existir mais de 100 distintos na sua composição. Os lípidos mais comuns nas membranas biológicas são os fosfolípidos e os esteróis. Nas células existem duas classes de fosfolípidos, os glicerofosfolípidos e os esfingofosfolípidos. Os glicerofosfolípidos são os lípidos mais comuns nas membranas, e contêm dois ácidos gordos unidos a uma molécula de glicerol, o terceiro grupo hidroxilo do glicerol encontra-se ligado a um grupo fosfato. Este grupo fosfato, por sua vez, encontra-se ligado a uma segunda

molécula que pode ser colina, etanolamina, inositol ou serina, dependendo do tipo de fosfolípido. As cadeias longas hidrocarbonadas dos ácidos gordos, podem variar tanto em tamanho (entre 14 e 24 carbonos), como em grau de saturação. Muitos fosfolípidos têm uma cadeia saturada e outra insaturada, normalmente a ligação dupla encontra-se na posição sn-2 do glicerol, encontrando-se na maioria das vezes na configuração *cis* [2].

Os esfingofosfolípidos apresentam o mesmo tipo de substituintes polares dos glicerofosfolípidos, diferindo apenas no grupo hidrofóbico que neste caso é a ceramida, uma molécula formada pela união de dois ácidos gordos a uma serina (a qual substitui o glicerol presente nos glicerofosfolípidos). O esfingofosfolípido mais abundante nas membranas celulares é a esfingomiéline, originada pela união da ceramida com a fosforilcolina [2].

Os esteróis são outro tipo de lípido muito abundante nas membranas biológicas, sendo o colesterol o mais abundante nas células animais. Esta molécula tem uma parte hidrofóbica compacta e rígida e um grupo hidroxilo polar. O grupo hidroxilo presente no colesterol encontra-se na interface membrana-água, enquanto que a maior parte da cadeia hidrocarbonada está mergulhada no interior da membrana [2].

Na figura 2 podemos ver a representação das três principais classes de lípidos presentes nas biomembranas das células animais.

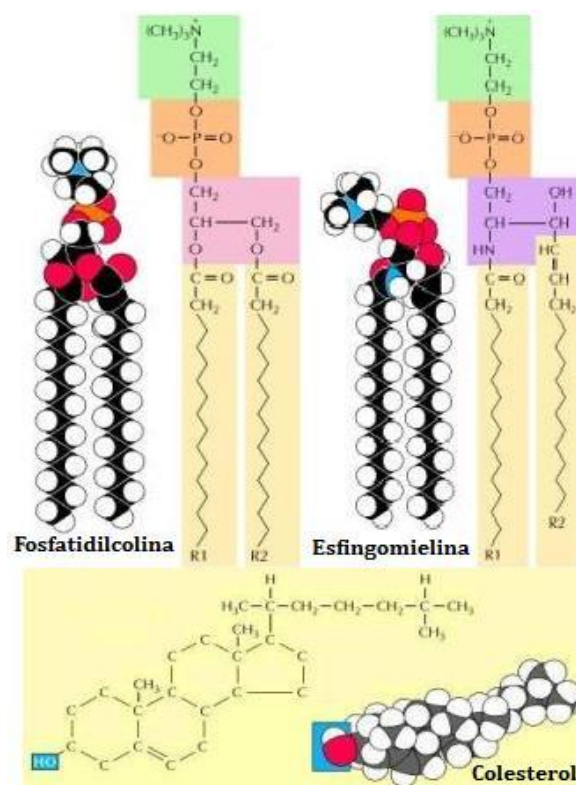


Figura 2 – Ilustração das três principais classes de lípidos presentes nas biomembranas. Adaptado do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

1.1.2. Dinâmica e Organização

O Modelo de Mosaico Fluido, apesar de limitado, continua a ser um ponto de referência, uma vez que, devido à sua simplicidade, permite interpretações alargadas de novos dados e o surgimento de novos conceitos teóricos, no entanto, vários aspectos não previstos pelo modelo têm sido alvo de intensa investigação científica recentemente.

Um aspecto previsto pelo Modelo de Mosaico Fluido é a assimetria entre as duas monocamadas, nomeadamente no que se refere à composição lipídica de cada uma. Isto é facilmente compreensível se tivermos em conta que as duas faces estão expostas a ambientes diferentes.

Ao analisarmos a membrana plasmática de células animais, podemos verificar que o grau de insaturação dos resíduos de ácidos gordos é maior na camada interna e que certos componentes lipídicos (esfingofosfolípidos, glicolípidos e fosfatidilcolinas) se localizam preferencialmente na camada externa, enquanto que outros (fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas e ácidos fosfatídicos) se localizam preferencialmente na camada interna [3].

A assimetria proteica é claramente consequência da maneira como as proteínas se inserem originalmente na membrana, uma vez que a sua capacidade de fazer “*flip-flop*” é desprezável. O termo “*flip-flop*” é normalmente usado para denotar a rotação de 180 graus em torno do eixo do plano da membrana, ou seja, quando uma molécula passa de uma monocamada para outra. A barreira de activação para passar uma proteína de uma monocamada para outra, de modo que os seus grupos polares e carregados fiquem momentaneamente dentro do centro hidrofóbico da bicamada, é muito elevada. Daí, apesar de algumas proteínas membranares difundirem lateralmente e/ou rodarem em torno do eixo normal ao plano da bicamada, não existem evidências de que as proteínas consigam fazer “*flip-flop*” espontaneamente [2].

O modelo presume também uma distribuição homogénea de proteínas e lípidos no plano da bicamada. No entanto, é claro neste momento que existem domínios e regiões nalgumas membranas que têm composição distinta e que podem ser separados de outras porções da membrana. Tanto as proteínas membranares como os lípidos não se difundem livremente na bicamada lipídica fluida, uma vez que apresentam uma distribuição não aleatória com concentrações elevadas em regiões definidas na membrana, conhecidas por domínios. Estes domínios podem ser macroscópicos, como no caso de regiões grandes e morfologicamente distintas da superfície da célula separadas por barreiras (por exemplo, os domínios apical e basolateral de células

polarizadas epiteliais), ou havendo agregação de proteínas no plano da membrana que podem originar domínios que são enriquecidos por um determinada proteína e por outros quaisquer componentes que possam ser favorecidos por esse ambiente (por exemplo, as junções comunicantes que contêm uma proteína conhecida por conexina), ou ainda como domínios lipídicos, mais conhecidos por jangadas lipídicas enriquecidos em colesterol e esfingomiéline (*lipid rafts*) [2].

Originalmente definidas bioquimicamente como a fracção da membrana resistente ao detergente TritonX-100 a baixas temperaturas (4°C), as jangadas lipídicas são microdomínios dinâmicos na fase líquido-ordenado, que “flutuam” livremente pela membrana celular na fase líquido desordenado. As jangadas lipídicas estão relacionadas com a imiscibilidade entre as fases líquido-ordenado e líquido-desordenado. A causa dessa imiscibilidade ainda é incerta, no entanto a formação desses domínios tem como objectivo a minimizar a energia livre do sistema [4].

Apesar de haver cada vez mais evidências da existência das jangadas lipídicas em membranas celulares e da sua importância biológica, ainda existe muita controvérsia quer em relação à sua existência, quer em relação às suas características morfológicas e propriedades dinâmicas. Contudo, existe já um suporte experimental para o papel destes domínios lipídicos na regulação de numerosos processos celulares incluindo a polaridade celular, transdução de sinal e tráfico intracelular [4].

Tendo em conta que a interacção entre os lípidos não é igual, lípidos que interagem e/ou empacotam mais eficazmente têm tendência a separar-se naturalmente para formarem espontaneamente domínios na membrana. Os domínios formados pelo colesterol e pela esfingomiéline têm sido um dos assuntos mais controversos e estudados nos últimos anos na biologia celular [4-8].

Muitos artigos apresentam resultados mostrando que o colesterol interage melhor com a esfingomiéline do que com qualquer outro fosfolípido [9,10]. A velocidade de desorção do colesterol em bicamadas contendo esfingomiéline é mais baixa do que a velocidade de desorção em membranas contendo fosfatidilcolina com cadeias alquilo equivalentes e saturadas [4]. Em misturas binárias contendo esfingomiéline e outros fosfolípidos, o colesterol anula preferencialmente a transição de fase da esfingomiéline, indicando a interacção preferencial com as moléculas de esfingomiéline [4]. A permeabilidade da água em bicamadas contendo colesterol e esfingomiéline é menor do que em bicamadas formadas por colesterol e fosfatidilcolina, indicando que existe um empacotamento lateral mais denso para as bicamadas contendo colesterol e

esfingomielina [4]. O colesterol interage melhor com a esfingomielina do que com a fosfatidilcolina devido às diferenças estruturais entre estes lípidos [4]. A esfingomielina é um derivado da esfingosina (2-amino-4-octadeceno-1,3-diol), com 1 ácido gordo ligado ao grupo 2-amino da esfingosina formando uma amida. Este ácido gordo normalmente tem uma cadeia saturada de 16 a 24 carbonos com uma pequena fracção de cadeias de 24:1 ^{Δ^{15cis}} , dependendo da origem do tecido donde a esfingomielina foi obtida. Na designação $x:y^{\Delta z}$, x refere-se ao número de carbonos de cadeia hidrocarbonada, y corresponde ao número de ligações duplas presentes na cadeia e Δz dá-nos a posição da ligação dupla na cadeia hidrocarbonada. Assim, em termos da parte apolar, estes lípidos apresentam cadeias longas e maioritariamente saturadas (com uma insaturação *trans* na base esfingosina), o que leva a pensar que as jangadas lipídicas são formadas pela auto-associação de moléculas de esfingomielina [5]. A interacção entre estas moléculas pode ser ainda mais favorecida por ligações de hidrogénio entre as suas cabeças polares. O vazio criado entre as cadeias hidrocarbonadas, causado pela cabeça polar relativamente volumosa, deverá ser preenchido pelo colesterol, que poderá participar também em ligações de hidrogénio com a esfingomielina. Apesar do colesterol ser um elemento importante na formação das jangadas lipídicas, a natureza destas interacções continuam a ser debatidas [5].

Em relação às fosfatidilcolinas monoinsaturadas, estas normalmente apresentam uma ligação dupla *cis* na posição Δ^9 na cadeia do ácido gordo podendo ainda apresentar mais duplas ligações ao longo da cadeia alquilo, criando “defeitos” na cadeia e diminuindo assim a ordem do empacotamento com o colesterol [4].

Esta assimetria transversal e lateral vem reforçar o conceito já existente de que a assimetria lipídica nas membranas é de uma grande importância fisiológica, porque mostra que as células investem energia para catalisar os movimentos dos lípidos de modo a manter uma distribuição fosfolípida específica.

Os lípidos numa membrana podem apresentar movimentos conformacionais, translacionais, rotacionais e de translocação. O primeiro descreve os movimentos intramoleculares, enquanto que o segundo e o terceiro dá-nos informação sobre a posição lateral da molécula no plano da membrana. A translocação refere-se ao movimento “*flip-flop*” já descrito anteriormente, sendo a velocidade deste movimento a mais lenta de todos. A escala característica de frequência destes movimentos pode ir desde $\sim 10^{14} \text{ s}^{-1}$, para dinâmicas vibracionais de ligações simples nas moléculas de

lípidos, até $\sim 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para a translocação transmembranar (“*flip-flop*”) de uma molécula de lípido [11]. A dinâmica de um lípido depende de muitos factores, tais como, o comprimento da cadeia alquilo, o número de ligações duplas *cis*, temperatura, pressão, grau de hidratação e composição lipídica [2].

1.1.3. Fluidez da Membrana

Para um líquido normal, o termo fluidez é definido como o inverso da viscosidade, que é uma característica física bem definida e facilmente mensurável. A viscosidade é essencialmente uma medida de resistência friccional encontrada quando camadas adjacentes de um fluido se movimentam a velocidades diferentes. Quando aplicado a membranas, o termo fluidez é normalmente usado no sentido qualitativo, geralmente é uma medida da resistência ao movimento na membrana [2].

A membrana é uma estrutura fluida, o que significa que os seus componentes não ocupam posições definidas e são susceptíveis a deslocações bidimensionais de rotação ou de translação. A fluidez da membrana depende essencialmente da composição dos fosfolípidos que constituem a bicamada lipídica e da presença de colesterol. O tamanho das cadeias alquilo é determinante na fluidez das biomembranas, uma vez que quanto maior forem as cadeias alquilo dos fosfolípidos, maior é a interacção entre elas tornando a membrana menos fluida. Outro factor importante é o grau de insaturação dessas mesmas cadeias. A existência de ligações duplas na cadeia alquilo faz com que haja flexão da cadeia, aumentando a distância entre as cadeias adjacentes, tornando assim as interacções mais fracas. Dessa maneira a membrana torna-se mais fluida [12].

A existência de colesterol nas membranas é outro factor determinante na fluidez das membranas. O colesterol localiza-se nas membranas com o seu eixo longo perpendicular ao plano da membrana. As moléculas de colesterol encontram-se na membrana intercaladas com moléculas de fosfolípidos, diminuindo assim a interacção entre as cadeias alquilo. Portanto, o colesterol afecta a fluidez da membrana impedindo o empacotamento perfeito entre as cadeias longas hidrocarbonadas [13].

A temperaturas abaixo da temperatura de fusão, o colesterol, ao diminuir a interacção entre os ácidos gordos, torna a membrana mais fluida, enquanto que a temperaturas acima da temperatura de fusão, ao impedir grandes movimentações dos fosfolípidos, visto que é mais rígido do que as cadeias alquilo e não tem tanta liberdade conformacional como os fosfolípidos, torna as membranas menos fluidas [13].

Como resultado, o colesterol, numa gama elevada de temperaturas, tende a aumentar a estabilidade e diminuir a permeabilidade das biomembranas.

A fluidez da membrana afecta as suas funções mais essenciais, uma vez que afecta a taxa de transporte por proteínas transportadoras transmembranares e afecta a permeabilidade membranar. Quanto mais fluida a membrana for, mais ela se torna permeável à água e a moléculas hidrofílicas pequenas, e maior é a difusão lateral de proteínas integrais [12,13].

1.1.4. Perfil da Pressão Lateral e da Densidade da Membrana

O facto de os lípidos formarem espontaneamente bicamadas de modo a minimizarem a exposição dos grupos hidrofóbicos à água, leva a que exista uma tensão na membrana. Esta tensão é referida como pressão lateral [2].

O perfil da pressão lateral é determinado pela contribuição de três forças que no equilíbrio, somadas, deverão ser zero, uma vez que a membrana não se expande nem encolhe devido a estas forças. Assim, existe uma contribuição positiva resultante da força de repulsão entre os grupos das cabeças polares, uma contribuição negativa da tensão interfacial derivada pela necessidade de minimizar o contacto das cadeias alquilo com a água e uma contribuição positiva resultante da repulsão entrópica entre as cadeias alquilo flexíveis (Figura 3).

A pressão lateral (força por unidade de área) da bicamada tem um valor médio de 350 atm [14]. O papel da pressão lateral tem sido alvo de alguns estudos, e foi proposto que ao alterar a pressão lateral, as proteínas membranares podem adoptar uma conformação diferente, regulando assim o fluxo de iões e outros solutos [15].

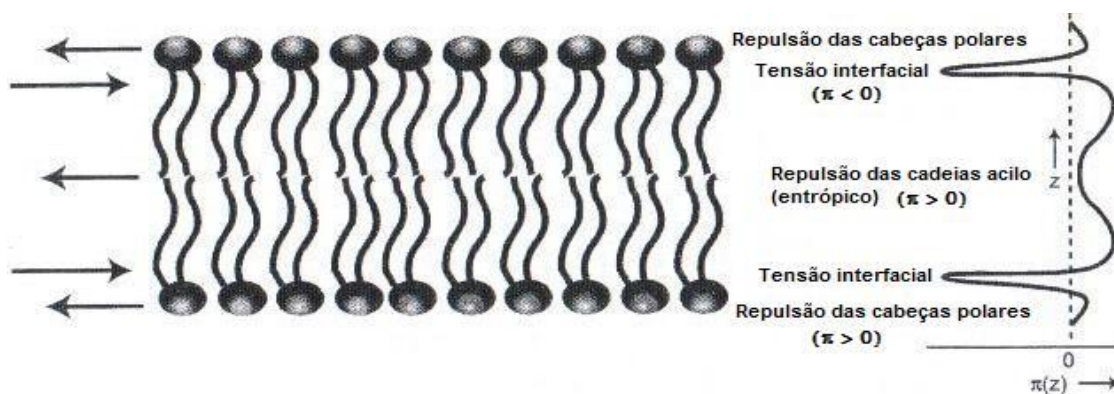


Figura 3 – Perfil da pressão lateral de uma camada lipídica. Ilustração esquemática de uma bicamada lipídica com a indicação das forças que actuam na camada (esquerda). Perfil resultante da pressão ou stress (direita). Adaptado de Mouritsen, 2005 [15].

Outro parâmetro que está relacionado com a dinâmica do lípido é o perfil de densidade electrónica da membrana, que nos dá a distribuição da posição dos átomos de um lípido no plano perpendicular à membrana, permitindo assim obtermos informação sobre a localização preferencial para a permeação de um soluto.

Foi proposto por Marrink e Berendsen em 1994 um modelo que descreve a membrana como uma bicamada com quatro regiões com densidades electrónicas distintas, o Modelo “Quatro Regiões” [16].

Neste modelo, a primeira região, que pode ser bastante extensa, é caracterizada por uma baixa densidade das cabeças polares. Começa a partir do ponto onde a presença da membrana se começa a sentir, resultando numa perturbação na estrutura da água do *bulk*, até onde a densidade da água e a densidade da cabeça polar sejam comparáveis.

A segunda região é caracterizada por uma alta densidade das cabeças polares. Todas as moléculas de água nesta região fazem parte da esfera de hidratação da cabeça dos fosfolípidos. Esta área tem a maior densidade de toda a bicamada e todos os átomos da cabeça polar e parte dos grupos metileno do início da cadeia alquilo passam a maior parte do tempo nesta região. Das quatro regiões que definem este modelo, é nesta parte da bicamada que se apresentam os valores mais baixos de coeficientes de difusão e fracções de volume livre.

A terceira região é caracterizada por uma alta densidade devida às cadeias alquilo. É constituída por cadeias parcialmente ordenadas, assemelhando-se a um polímero macio na densidade e propriedades. Esta região começa nos grupos carbonílicos dos ésteres (onde é também o limite para a penetração da maioria das moléculas de água) e termina onde as cadeias atingem uma densidade semelhante ao hexadecano líquido.

A quarta região é caracterizada por uma baixa densidade, comparável ao decano, e uma grande fracção de volume livre. A ordem dos parâmetros nesta região é perto de zero e não existe aparentemente nenhum efeito perturbador proveniente da interface [16,17].

De acordo com um estudo feito em Dinâmica Molecular [17], obteve-se um perfil de densidade que vai ao encontro do modelo apresentado anteriormente. Na Figura 4 podemos ver que na região 2 o volume livre é mínimo enquanto que a densidade electrónica é máxima, e que no centro da bicamada a densidade electrónica é mínima sendo nessa zona a região que apresenta maior volume livre.

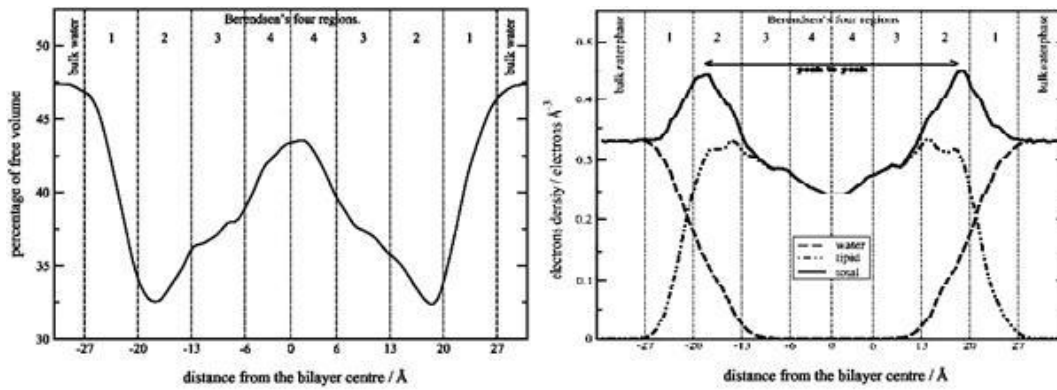


Figura 4 - Distribuição do volume livre (esquerda) e perfil da densidade electrónica (direita) ao longo de uma bicamada. Adaptado de Bemporad *et al*, 2004b [17].

1.1.5. Permeabilidade Selectiva das Biomembranas

A permeabilidade selectiva é uma das propriedades fundamentais das biomembranas. Entende-se por permeabilidade selectiva a capacidade de permitir facilmente a passagem de certas substâncias, dificultando ou impedindo a passagem de outras.

Perante este tipo de selectividade levanta-se a seguinte questão: “o que leva a membrana a ser permeável a umas substâncias e impedir a passagem de outras?”

Essa semi-permeabilidade deve-se essencialmente à natureza química da biomembrana, assim como ao tamanho, natureza química e carga da substância que pretende atravessar a membrana [18].

Os primeiros dados que sugeriam a permeabilidade selectiva das biomembranas foram obtidos por Charles Ernest Overton em 1895 quando trabalhava na sua tese de doutoramento em botânica na Universidade de Zurique. Overton descobriu acidentalmente, algumas propriedades importantes das membranas. A sua investigação estava relacionada com a hereditariedade das plantas e para concluir o seu estudo ele precisava de encontrar substâncias que fossem facilmente adsorvidas pelas células das plantas. Ele observou que a facilidade com que uma substância atravessava a membrana estava relacionada com a sua natureza química. Overton observou que as substâncias apolares passavam rapidamente através da membrana. Esta descoberta era muito contrária à visão anterior, que dizia que a membrana era impermeável a quase tudo excepto à água.

Baseado no seu estudo sobre a permeabilidade da membrana a várias moléculas, Overton publicou uma hipótese preliminar na qual proponha existirem várias

similaridades entre as membranas celulares e os lípidos (azeite), e que certas moléculas apolares atravessam a membrana porque se dissolviam no interior lipídico da membrana [19].

Hoje sabemos reconhecer o significado da hipótese de Overton, mas na altura houve muitas oposições às suas ideias.

Existem três tipos de transporte de moléculas através da membrana, o transporte passivo, que ocorre a favor do gradiente de concentração e sem gasto de energia, uma vez que só é usada a energia potencial da própria molécula, o transporte facilitado em que, apesar de o transporte ser a favor do gradiente de potencial do soluto que permeia, é necessária a participação de um transportador (com ou sem consumo de energia) para aumentar a permeabilidade do soluto através da membrana, e o transporte activo, que ocorre contra o gradiente de concentração, com dispêndio de energia e em que é sempre necessária a intervenção directa dos constituintes da membrana, nomeadamente das proteínas.

A permeação passiva através das membranas biológicas é o mecanismo usado pela maioria das drogas de forma a atingirem os seus locais de acção [20]. Portanto, a compreensão dos factores físico-químicos envolvidos na permeação molecular através das bicamadas torna-se importante, tanto do ponto de vista farmacêutico, como do ponto de vista médico.

O modelo que normalmente é usado para descrever o transporte passivo de moléculas através de bicamadas lipídicas e a permeação transcelular em membranas biológicas é o modelo de solubilidade-difusão. Este modelo assume a biomembrana como uma placa de matéria hidrofóbica rodeada de um ambiente aquoso, sendo a difusão através da região hidrofóbica o passo limitante do processo de permeação [21].

O modelo solubilidade-difusão descreve a permeação como um processo que envolve três passos:

1. A molécula tem que entrar na membrana, ultrapassando qualquer resistência interfacial ou barreira de energia livre;
2. Difundir através da região hidrofóbica da bicamada lipídica;
3. Sair no lado oposto da bicamada ultrapassando novamente qualquer possível resistência interfacial.

Usando este modelo, têm-se determinado coeficientes de difusão e coeficientes de partição octanol-água, de modo a prever a permeabilidade de certas moléculas através de membranas com uma certa espessura.

Segundo este modelo, se os coeficientes de partição e de difusão de uma molécula e a espessura da membrana forem conhecidos, o coeficiente de permeabilidade pode ser calculado pela seguinte relação:

$$P = \frac{K_p D}{d} \quad (1)$$

onde K_p é o coeficiente de partição membrana/água, D é o coeficiente de difusão através da região hidrocarbonada e d é a espessura da bicamada.

No entanto, apesar de em certos casos o modelo solubilidade-difusão nos dar uma boa estimativa da permeabilidade de certas moléculas, muitas vezes os coeficientes de permeabilidade de alguns iões e moléculas neutras pequenas determinados experimentalmente variam muito dos valores obtidos teoricamente usando este modelo [21]. Isto é compreensível se tivermos em conta que as biomembranas e as bicamadas lipídicas têm propriedades complexas e diversificadas e que não devem ser tratadas como uma solução simples de octanol ou cadeias longas hidrocarbonadas, como o modelo assume. Por exemplo, sabe-se que as biomembranas são sistemas ordenados devido à composição das cabeças polares, ao comprimento das cadeias hidrocarbonadas ou devido à concentração de colesterol, e que a temperaturas abaixo da transição de fase gel-líquido cristalino apresentam maior resistência à permeação de solutos, muitas vezes por várias ordens de grandeza. Os coeficientes de partição bicamada lipídica/água de não-electrólitos pequenos diminuem significativamente com o aumento da densidade superficial da membrana [22].

De modo a se poder explicar as diferenças entre os coeficientes de permeação previstos e os medidos experimentalmente para pequenos iões carregados, foi proposto um mecanismo alternativo que sugere que as partículas atravessam a bicamada através de defeitos transientes originados por flutuações térmicas, que formam poros hidratados que atravessam a bicamada [23]. Este modelo prevê que as partículas consigam ultrapassar a energia de Born necessária para permear a membrana. O modelo sugere que os iões conseguem atravessar a bicamada permutando ligações de hidrogénio com a rede de moléculas de água dos poros.

No entanto, este modelo também apresenta algumas limitações, nomeadamente a espessura da bicamada, uma vez que este modelo só se aplica caso a membrana seja suficientemente fina [21].

1.1.6. Água como Solvente Biológico

A maioria das reacções químicas que ocorrem nas células, realizam-se em ambiente aquoso. A água é um dos componentes mais abundantes em todos os organismos vivos, representando mais de 70% do seu peso. O facto de ser uma molécula pequena e com algumas propriedades únicas, faz dela o solvente universal.

A água controla uma variedade de propriedades funcionais e estruturais das biomembranas. A associação da água com os grupos polares dos lípidos e a região interfacial são determinantes para a formação do momento dipolar da membrana lipídica [2].

Muitas das moléculas biológicas são moléculas anfífilas, isto é, têm uma parte polar (ou hidrofílica) e outra apolar (ou hidrofóbica), como é o caso dos lípidos que constituem as biomembranas. Quando compostos hidrofóbicos são introduzidos num ambiente aquoso, as ligações de hidrogénio da solução são perturbadas, levando a um aumento da energia livre do sistema. A força que impulsiona o sistema a minimizar a energia livre é chamada de efeito hidrofóbico [2]. De uma maneira simplificada, o efeito hidrofóbico traduz-se pela força que leva o sistema a minimizar o contacto das partes apolares dos lípidos com a água. Esta é a força motriz para a auto-agregação dos lípidos, para a formação de estruturas em bicamada e também, em grande escala, para o *folding* das proteínas.

Quando uma molécula apolar é introduzida num sistema aquoso, há uma quebra das ligações de hidrogénio entre as moléculas de água que são novamente formadas de modo a fazer uma esfera de hidratação à sua volta. Esta esfera de hidratação é uma estrutura ordenada, e portanto desfavorável segundo a segunda lei da termodinâmica que postula que todas as reacções espontâneas se processam de modo a aumentar a entropia. Se as moléculas apolares se juntarem, então poucas moléculas de água são necessárias para formarem a esfera de hidratação, minimizando assim a área da esfera de hidratação e recuperando-se dessa maneira a perda de entropia do sistema [24-26].

1.2. Sistemas Modelo de Biomembranas

Sendo as membranas biológicas um sistema tão complexo, nem sempre os estudos físico-químicos podem ser realizados *in vivo* de modo a entender as suas propriedades. Assim, e numa primeira fase, podem utilizar-se sistemas muito simples que simulem pequenas partes desses sistemas complexos. A partir da informação retirada desses sistemas, podem usar-se sistemas de maior complexidade, numa contínua aproximação aos sistemas biológicos reais, de modo a obter dados que possam ser extrapolados para situações *in vivo*. Este tipo de estudo recorre a sistemas modelo formados com lípidos puros, mistura de lípidos ou misturas de lípidos e proteínas.

O sistema mais simples é o de uma bicamada formada por um único tipo de lípido. Apesar de não ser um sistema que possa reproduzir exactamente todas as propriedades da biomembrana real, uma vez conhecidos todos os parâmetros deste sistema simples, a complexidade pode ser aumentada adicionando outros componentes como colesterol, lípidos carregados ou proteínas.

1.2.1. Concentração Micelar Crítica e Parâmetro Crítico de Empacotamento

A solubilidade dos lípidos em água é muito baixa assim, as moléculas anfifílicas, devido ao efeito hidrofóbico, formam agregados com uma estrutura bem definida em soluções aquosas. A concentração a partir da qual esses agregados começam a ser formados é conhecida como concentração micelar crítica (CMC). Uma vez atingida a CMC, todos os lípidos adicionados à solução participam na formação dos agregados em vez de existirem como monómeros livres em solução [2].

As estruturas são formadas de modo a evitar o contacto das partes apolares dos lípidos com o meio aquoso e expondo a parte polar à água na superfície. A forma dos agregados vai ser sempre de modo a minimizar a energia livre do sistema.

O factor que determina a estrutura dos agregados é a forma efectiva dos lípidos que é determinada por propriedades moleculares tais como, o volume de van der Waals da molécula, a esfera de hidratação da cabeça polar, as ligações de hidrogénio intra e intermolecular e o comprimento e grau de saturação das cadeias alquila [2].

Os agregados podem assumir várias formas que podem ser previstas por um parâmetro que relaciona as partes polares e as partes apolares dos lípidos, o parâmetro crítico de empacotamento (PCE).

O parâmetro crítico de empacotamento PCE é dado pela seguinte razão:

$$PCE = \frac{v_c}{a.l_c} \quad (2)$$

onde v_c é o volume das cadeias hidrofóbicas, l_c o comprimento das cadeias e a é a área ocupada pela cabeça polar do lípido [11].

Assim, sistemas com $PCE < 1/3$ tenderão a formar micelas normais com curvaturas positivas, sistemas com $PCE \sim 1$ estruturas em bicamada e com $PCE > 1$ formar-se-ão micelas invertidas, Figura 5.

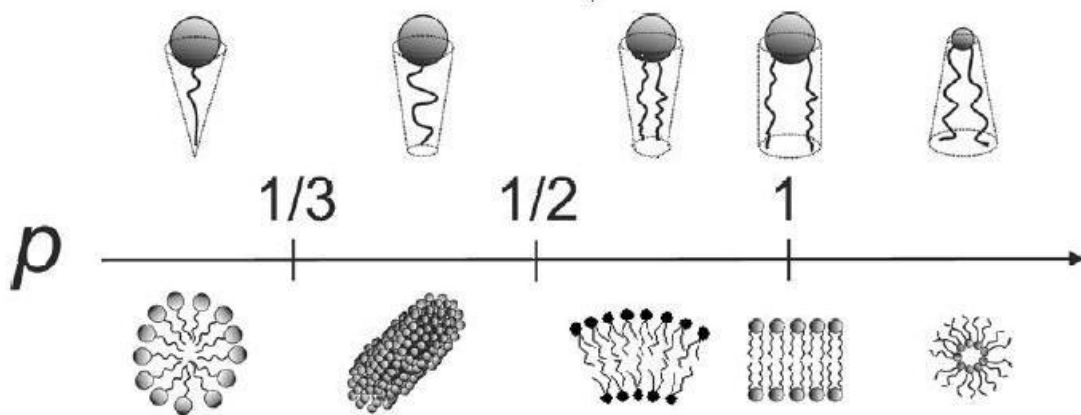


Figura 5 – Ilustração esquemática da relação entre o parâmetro crítico de empacotamento e as estruturas dos agregados lipídicos. Adaptado do site <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/ryhanen/biophysi.pdf>.

1.2.2. Lipossomas

Os lipossomas ou vesículas são bicamadas esféricas constituídas por lípidos que encerram pequenas quantidades de solução aquosa no seu interior. Este é o tipo de agregado que normalmente é usado como sistema modelo para o estudo das propriedades das biomembranas. Os lipossomas podem ser constituídos por uma única bicamada, vesículas unilamelares, ou por múltiplas bicamadas concêntricas, vesículas multilamelares (MLV). Os MLVs são sistemas estruturalmente mal definidos, assim sendo, em estudos biofísicos normalmente usam-se vesículas unilamelares já que são os sistemas que também mais se aproximam das membranas biológicas.

Dependendo do diâmetro, as vesículas unilamelares podem ser divididas em vesículas unilamelares pequenas (SUV), com diâmetros que podem variar entre 20 e 50 nm, vesículas unilamelares grandes (LUV), com diâmetros que variam entre 50 a 500 nm e vesículas unilamelares gigantes (GUV) com diâmetros superiores a 1 μm [2].

A elevada curvatura dos SUVs pode originar problemas de empacotamento resultando em defeitos na bicamada, pelo que normalmente usam-se os LUVs como sistemas modelo de biomembranas.

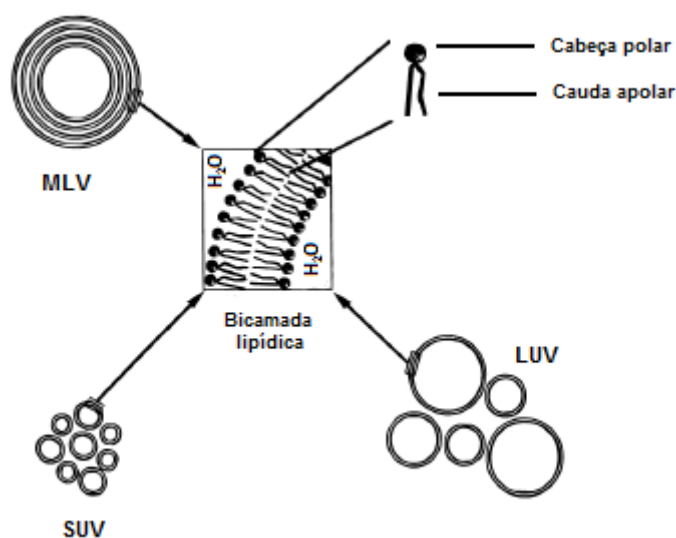


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de vesículas. Adaptado do site <http://www.avantilipids.com>

1.2.3. Comportamento de fases

De modo a obtermos uma compreensão das biomembranas, torna-se importante conhecermos a estrutura detalhada, assim como os princípios termodinâmicos da estabilidade da bicamada lipídica.

Um ponto de partida possível é a estrutura dos cristais de lípidos, obtidos por difração de raio-X de elevada resolução, uma vez que alguns cristais de lípidos apresentam características conformacionais semelhantes às adoptadas em bicamadas hidratadas.

Assim, existem cinco características comuns nas estruturas cristalinas de lípidos [11]:

- As estruturas observadas são totalmente lamelares, com os grupos polares e apolares organizados em bicamada;

- Existem problemas de empacotamento resultantes da presença de grupos polares volumosos. Muitos lípidos resolvem esse problema com a inclinação das cadeias alquilo em relação ao plano da bicamada;
- O grupo polar mantém-se paralelo ao plano da bicamada, formando ligações de hidrogénio intermoleculares onde é possível;
- As cadeias alquilo saturadas estão todas com configuração trans;
- Na maioria dos casos uma das cadeias está dobrada no segundo átomo de carbono, de modo que os planos das duas cadeias duma mesma molécula sejam aproximadamente paralelos, conseguindo assim um melhor empacotamento do que caso se estendessem a partir das suas conformações originais em relação ao grupo polar.

Estas características também foram detectadas em misturas de lípido e água.

Do ponto de vista físico, as bicamadas lipídicas podem ser descritas como cristais líquidos demonstrando um complexo comportamento de fase dependendo tanto da temperatura como da concentração de lípido [2].

Na Figura 7 está representado o diagrama de fases temperatura/composição da mistura esfingomiélna/água. Neste tipo de diagramas estão indicadas as fases mais estáveis em função da temperatura e da quantidade de água.

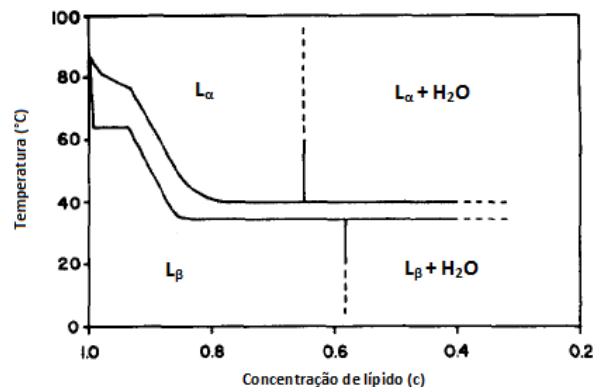
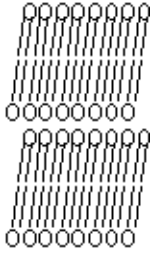


Figura 7 – Diagrama de fase SpM/H₂O. Adaptado de Shipley, 1974 [27].

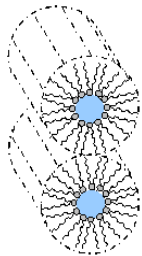
As várias fases que os lípidos podem apresentar em misturas lípido/água [11] são:



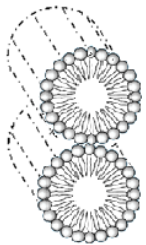
Fase gel L_{β} – Esta fase é formada a baixas temperaturas pelos lípidos que formam a estrutura lamelar. As moléculas encontram-se empacotadas muito juntas (menor área superficial por molécula) e as cadeias alquílicas encontram-se muito ordenadas com conformações *todas-trans* como nos cristais lipídicos. Devido ao facto das cadeias alquílicas estarem todas distendidas a espessura da bicamada é maior. A densidade da fase gel é maior do que na fase líquida-cristalina. Em lípidos com cabeças polares volumosas as cadeias alquílicas apresentam uma inclinação em relação à normal da bicamada.



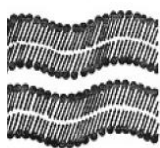
Fase líquida-cristalina L_{α} – Esta é a fase que a maioria dos lípidos adoptam em biomembranas, em que existe uma ordem bidimensional mas as cadeias alquílicas apresentam alguma desordem. A espessura das bicamadas é menor do que na fase L_{β} , isto deve-se ao aparecimento de defeitos nas cadeias. Nesta fase há um aumento do número de conformações *gauche*, resultando num encurtamento da cadeia.



Fase hexagonal H_{II} – Neste tipo de agregação os lípidos encontram-se organizados em forma de cilindros com os grupos polares voltados para dentro, onde existe uma coluna de água. Estão dispostos numa matriz hexagonal. Muitos lípidos puros formam este tipo de estrutura, como, por exemplo, a fosfatidiletanolamina.



Fase hexagonal H_I – Nesta fase hexagonal os lípidos estão organizados numa matriz hexagonal e também em forma de cilindros, mas neste caso as cabeças polares estão voltadas para fora.



Fase enrugada P_{β} – Nesta fase, observada em algumas bicamadas ordenadas a temperaturas intermédias, entre as características para a fase L_{β} e L_{α} , a superfície da bicamada aparece “enrugada”. A ordem das cadeias alquílicas nesta fase é menor do que na fase L_{β} e superior à fase L_{α} .

Em bicamadas lipídicas preparadas com uma única espécie de lípido, as cadeias alquilo dos lípidos são caracterizadas por uma alta razão conformacional *trans/gauche* a baixas temperaturas [11]. As cadeias encontram-se empacotadas paralelamente umas às outras, sendo as bicamadas caracterizadas por um alto grau de ordem conformacional, rotacional e translacional. Estas bicamadas encontram-se na fase gel L_{β} .

Dependendo da identidade química dos lípidos e da temperatura, já foi identificada mais que uma fase ordenada em bicamadas lipídicas. Na chamada fase “sub-gel” ou L_c , observada a temperaturas muito baixas, a ordem das cadeias alquilo é maior do que na fase L_{β} e pode incluir ordenação cristalina das moléculas de lípido.

As transições entre as várias fases em bicamadas ordenadas ocorrem a temperaturas características a cada lípido dependendo da sua natureza e tamanho da cadeia alquilo. Quando se aumenta a temperatura acima de uma temperatura característica T_m a fase gel é convertida a fase líquida ordenada L_{α} , na qual a configuração das cadeias alquilo é caracterizada por uma baixa razão configuracional *trans/gauche*. As bicamadas na fase fluida têm baixa ordem conformacional, rotacional e translacional.

Quando se aumenta ainda mais a temperatura, algumas bicamadas que se encontram na fase L_{α} (por exemplo em bicamadas formadas por fosfatidiletanolaminas), podem converter-se em uma das outras fases, incluindo a fase hexagonal invertida [11].

O estudo de lipossomas feito a partir de misturas de fosfolípidos aproxima-se mais da compreensão das membranas biológicas, uma vez que estas têm uma grande diversidade de fosfolípidos na sua composição. Como foi abordado anteriormente, as biomembranas apresentam domínios com diferentes composições e funções. Logo se forem preparados lipossomas a partir de dois fosfolípidos com temperaturas de transição T_m diferentes, é de se esperar que a uma dada temperatura intermédia às temperaturas de transição dos dois fosfolípidos coexistam duas fases nesse lipossoma, uma fase gel e uma fase fluida. A fase fluida é maioritariamente constituída pelo fosfolípidos com T_m menor e a fase gel pelo fosfolípido com T_m maior [3].

Quando se adicionam quantidades elevadas de colesterol a misturas de fosfolípidos, vão deixar de existir coexistência de fases passando a haver uma única fase intermédia, líquido-ordenado L_O [28]. Um dos maiores efeitos da adição progressiva de colesterol a bicamadas lipídicas é a redução da entalpia de transição L_{β}/L_{α} , eliminando-a por completo a 50% de colesterol. Também diminui a área transversal da molécula de

fosfolípido na fase L_{α} , aumenta a espessura da bicamada fosfolipídica, diminui o movimento das cadeias alquila e aumenta a rigidez mecânica, diminuindo assim a permeabilidade das bicamadas fosfolipídicas na fase L_{α} . Resumindo, a adição progressiva de colesterol converte as fases L_{α} e L_{β} das bicamadas de fosfolípidos num fase que tem propriedades intermédias entre a fase sólido (L_{β}) e fluido (L_{α}), daí o termo fase líquido-ordenado, L_o [28].

Na Figura 8 está representado um diagrama de fase DPPC/Col

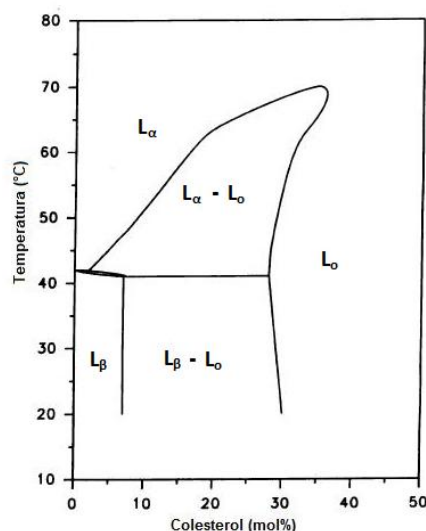


Figura 8 – Diagrama de fase DPPC/Col. Adaptado de Sankaram e Thompson, 1991 [29].

Neste diagrama podemos identificar três fases diferentes que existem a concentrações abaixo de 20-25 mol% dependendo da temperatura. A fase L_{α} e L_{β} do DPPC, a baixas concentrações de colesterol, que existem a baixas e altas temperaturas, respectivamente, e a fase L_o que coexiste com cada uma das fases L_{α} ou L_{β} a concentrações intermédias de colesterol. No entanto, a altas concentrações de colesterol só existe a fase L_o a qualquer temperatura.

Muitos investigadores tentaram construir diagramas de fase temperatura-composição para misturas binárias colesterol/fosfolípido em excesso de água, mas este é o diagrama de fase mais citado e a sua forma geral ainda é considerada universal, variando só as posições das regiões fronteiras de fase no diagrama com a estrutura e comprimento das cadeias dos ácidos gordos [28]. Contudo, é já aceite que acima da temperatura de transição de fase do PC, coexistem proporções variadas de L_{α} a qualquer concentração de colesterol abaixo de 20-25 mol%, mas apenas existe a fase L_o a altas concentrações de colesterol [28,29].

1.3. Barreira Hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira que previne a entrada no cérebro de substâncias que se encontram no sangue.

Os primeiros dados que sugeriam a existência desta barreira foram obtidos por um cientista alemão, Paul Ehrlich, em 1885. Num estudo que ele estava a desenvolver com corantes administrados endovenosamente, verificou que os corantes ao serem injectados na corrente sanguínea de um animal se localizavam em todos os tecidos do organismo excepto no sistema nervoso central (SNC) [30]. Esta observação, apesar da sua grande importância, não foi correctamente interpretada pelo cientista que atribuiu o facto a uma falta de afinidade do SNC por estes corantes. Foi só em 1913 que Goldmann, naquela altura discípulo de Ehrlich, interpretou correctamente os resultados obtidos. Ao administrar directamente os corantes no fluido cerebrospinal, verificou que obtinha uma coloração densa em todo o cérebro, mas o resto dos tecidos permaneciam sem coloração.

O carácter selectivo da barreira hematoencefálica foi mais tarde comprovado por Stern e Gautier, em 1952, quando verificaram que a característica determinante para uma substância atravessar a barreira hematoencefálica era a sua lipossolubilidade [30].

A barreira hematoencefálica restringe a difusão passiva de muitas drogas para o cérebro e constitui um obstáculo significativo a tratamentos farmacológicos de doenças e desordens do SNC. O grau de restrição imposto, no entanto, é variável, uma vez que exclui efectivamente drogas que sejam lipofóbicas do cérebro, enquanto que drogas lipofílicas não apresentam qualquer tipo de restrição [31].

A barreira hematoencefálica é composta de células endoteliais especializadas que se encontram agrupadas nos capilares cerebrais. Estas células endoteliais encontram-se muito próximas umas das outras, restringindo assim a passagem de substâncias maiores que normalmente passam através dos pequenos espaços entre cada célula presentes na maioria dos endotélios.

Uma vez que a BHE não tem poros hidratados, os solutos atravessam a barreira até ao cérebro por difusão passiva ou por transportadores específicos, dependendo da natureza química do soluto.

O estudo quantitativo da interacção de anfífilas lipídicas fluorescentes (ALF), como modelos de drogas activas do cérebro, com membranas que mimificam a BHE, pode levar a uma melhor compreensão do transporte passivo de substâncias ao cérebro.

1.4. Objectivo deste estudo

A permeabilidade da BHE tem sido alvo de estudo há já alguns anos e é de extrema importância, como já foi referido anteriormente. A difusão passiva através da BHE é o caminho preferencial das drogas activas para chegarem ao cérebro.

O desenvolvimento de novas drogas activamente mais eficientes, tornou-se uma prioridade no tratamento de muitas doenças e disfunções do SNC, mas actualmente está mais centrado nas características do próprio soluto dando pouca atenção às propriedades da membrana.

Na permeação passiva através de uma monocamada de células, como o endotélio, a molécula de soluto tem que primeiro interagir com a membrana plasmática e permear o domínio apical exposto ao sangue, depois atravessar o citoplasma da célula e finalmente interagir novamente com a membrana plasmática e permear o domínio basolateral antes de atingir o seu alvo.

O nosso grupo de investigação tem vindo a desenvolver nos últimos anos vários estudos relacionados com a estrutura e dinâmica das bicamadas fosfolipídicas. Mais recentemente tem vindo a desenvolver um estudo detalhado da cinética e termodinâmica da interacção de moléculas anfifílicas com bicamadas lipídicas em diferentes fases [4,24,32-36]. Com estes estudos determinaram-se constantes de equilíbrio tais como constantes de ligação a LUVs com diferentes composições, K_L , constantes de ligação a proteínas presentes no sangue (nomeadamente a proteína de soro bovina, BSA), K_B , constantes de ligação a lipoproteínas, K_{LP} , e parâmetros cinéticos tais como inserção de anfifilas em vesículas, k_+ , desorção de anfifilas de vesículas, k_- , e translocação de uma monocamada para a outra, k_f . O grande objectivo desta investigação é obter a caracterização detalhada do esquema cinético do processo completo da difusão passiva de moléculas anfifílicas através da camada de células endoteliais que constituem a BHE.

Para isso tem-se estudado a interacção de várias séries homólogas de anfifilas com diferentes componentes estruturais, grupo polar e tamanho da cadeia hidrocarbonada, com membranas em fases diferentes. Uma vez terminado este estudo tão complexo, vai ser possível modular a permeação destas anfifilas através da BHE, e consequentemente prever a permeação de drogas com propriedades similares.

A monocamada externa da membrana plasmática apresenta uma fase líquido-ordenado, que é maioritariamente constituída por esfingomiéline, fosfolípidos de cadeia longa saturada e colesterol, e uma fase líquido-desordenado rica em fosfolípidos insaturados como o POPC. Uma vez que a primeira barreira que a molécula de soluto

encontra durante a permeação é a monocamada exterior da membrana plasmática, a interacção de anfifilas com membranas na fase líquido-ordenado e líquido desordenado, tem uma grande relevância biológica. O estudo da interacção de anfifilas com bicamadas lipídicas na fase líquido-desordenado já foi desenvolvido pelo nosso grupo de investigação [34].

O objectivo deste trabalho de Mestrado foi o estudo cinético e termodinâmico da interacção de duas anfifilas lipídicas fluorescentes (ALF) com bicamadas lipídicas na fase líquido-ordenado constituídas por colesterol e esfingomiéline, como sistema modelo da monocamada externa da porção apical das células endoteliais da BHE.

De modo a entender como uma molécula interage com uma membrana durante o processo de permeação, é necessário obter as constantes de velocidade dos três principais passos durante esse processo:

1. A inserção da ALF na membrana, dada por k_+ ;
2. A translocação da ALF de um lado da membrana para o outro, dada por k_f ;
3. A desorção da ALF a partir da bicamada, dada por k_- .

O uso de lípidos marcados com sondas fluorescentes, usualmente designados por anfifilas lipídicas fluorescentes, é uma poderosa ferramenta no estudo das propriedades das membranas uma vez que a sua fluorescência depende da polaridade do meio onde estão inseridas. Estas moléculas consistem em fluoróforos covalentemente ligados a derivados lipídicos. Considerando as propriedades solvatocrómicas do fluoróforo e que a constante dielétrica na interface membrana/água é aproximadamente 80 e 2 na zona hidrocarbonada da fase membranar, facilmente se entende que mudanças mínimas na localização do fluoróforo podem resultar em diferenças na fluorescência obtida. A fluorescência da sonda usada varia consoante se encontre em ambientes aquosos ou ambientes apolares, apresentando maior fluorescência em ambientes apolares [33,34].

Neste estudo foi usada a sonda fluorescente 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il, designada normalmente por NBD, ligada covalentemente a uma cadeia hidrocarbonada com 8 e 10 carbonos.

Na Figura 9 estão representadas as estruturas das duas anfifilas:

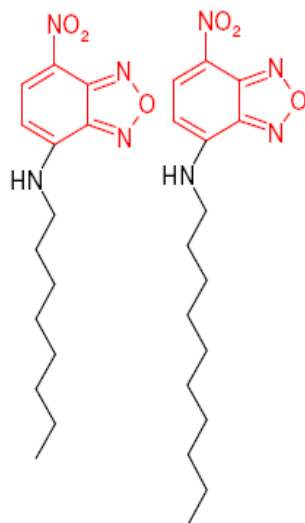


Figura 9 – Estrutura química das anfifilas NBD-C8 e NBD-C10, compostas pelo fluoróforo NBD (a vermelho) ligado a uma cadeia hidrocarbonada com 8 e 10 carbonos.

Como já foi referido anteriormente, vários investigadores tentaram construir diagramas de fase temperatura-composição para misturas binárias colesterol/fosfolípido em excesso de água, no entanto o mais citado e completo continua a ser o apresentado na Figura 8 de uma mistura de DPPC/Col. Recentemente, foi publicado um artigo com um diagrama de fase SpM/Col, que, apesar de ainda muito incompleto, serviu de apoio para a escolha das proporções de cada lípido e a gama de temperaturas que iríamos trabalhar, de modo a termos a certeza que as nossas vesículas estariam sempre na fase líquido-ordenado, Figura 10 [37].

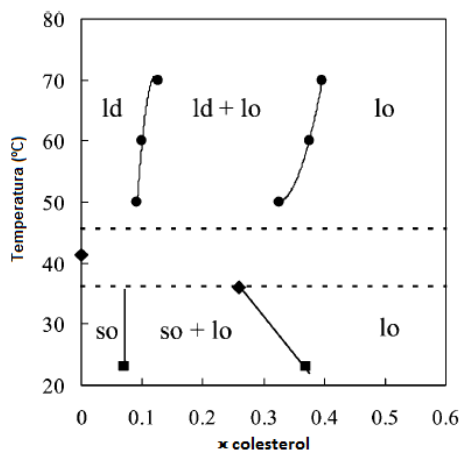


Figura 10 – Diagrama de fase SpM/Col. Adaptado de Almeida *et al*, 2003 [37].

Pelo diagrama de fase podemos ver que a partir de 40% de colesterol, as vesículas se encontram na fase líquido-ordenado a todas as temperaturas. Assim, as nossas vesículas tinham na sua composição 60% de esfingomiéline e 40% de colesterol. Com esta composição saberíamos, à partida, que independentemente da gama de temperaturas que iríamos trabalhar, estaríamos na parte do diagrama em que as vesículas se encontravam na fase líquido-ordenado.

A ideia inicial era determinar todos os parâmetros descritos no esquema cinético, para a interacção do NBD-C8 com LUVs na fase líquido-ordenado.

No entanto, ao iniciarmos o nosso estudo, deparámo-nos com uma série de problemas nomeadamente uma cinética muito rápida e um coeficiente de partição muito pequeno para a interacção da anfifila com os LUVs de esfingomiéline e colesterol.

De modo a obter uma quantidade significativa de anfifila na bicamada, tínhamos que trabalhar com concentrações muito elevadas, apresentando o sistema uma elevada dispersão de luz. Uma maneira de contornar esse problema era diminuir o percurso óptico. Pela lei de Beer-Lambert, variar a concentração ou o percurso óptico tem efeitos equivalentes, a diluição de uma solução num factor de 10 tem o mesmo efeito que diminuir o percurso óptico num factor de 10 [38]. Como tivemos que usar células com um percurso óptico muito pequeno, a intensidade do sinal de fluorescência que obtivemos era muito baixo e com muito ruído.

Decidimos que a mudança de sonda poderia diminuir os problemas com que nos estávamos a deparar. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, revelaram que o aumento da cadeia hidrocarbonada da sonda resultava numa diminuição da velocidade de inserção da anfifila na bicamada [34]. Assim, começámos a trabalhar com a anfifila NBD-C10. As experiências continuaram a apresentar os mesmos problemas, no entanto, foi possível obter os parâmetros que pretendíamos.

Tendo em conta tudo o que foi apresentado e que um ano lectivo é muito pouco tempo para uma investigação quando problemas de difícil resolução se apresentam, este estudo, apesar de trabalhoso, foi só um estudo preliminar que deverá ser completado em investigações futuras.

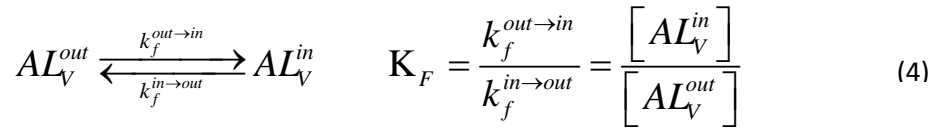
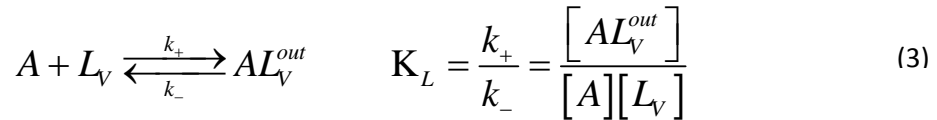
Capítulo 2

Resultados e Discussão

2.1. Metodologia para determinar os Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos da interacção da Sonda com a Bicamada Lipídica

De modo a podermos caracterizar completamente a interacção da sonda com a bicamada lipídica, precisamos de obter os 3 parâmetros mais importantes, K_L , k_+ e k_- .

O esquema cinético que traduz essa interacção é dado pelas seguintes equações:



onde A é o monómero da anfifila, L_V é o lipossoma, AL_V^{out} é a anfifila na monocamada externa e AL_V^{in} a anfifila na monocamada interna da bicamada lipídica. Quando uma anfifila (A) se aproxima de uma vesícula unilamelar de grandes dimensões (L_V), pode se inserir na monocamada externa da bicamada da vesícula (AL_V^{out}). A velocidade de inserção da anfifila na monocamada externa é definida por k_+ , sendo a velocidade de saída ou desorção dada por k_- . A razão entre a velocidade de inserção e de desorção dá-nos o valor da constante de afinidade entre a anfifila e as vesículas definido por K_L . A anfifila, uma vez inserida na monocamada externa, pode seguir dois caminhos, sair da monocamada externa voltando para a solução, ou pode translocar da monocamada externa para a monocamada interna (AL_V^{in}). A velocidade de translocação é definida por $k_f^{out \rightarrow in}$ indicando a entrada da monocamada externa para a interna e $k_f^{in \rightarrow out}$ indicando a passagem da monocamada interna para a externa. A razão entre estes dois termos dá-nos a distribuição em equilíbrio entre as duas monocamadas, K_F .

Do esquema cinético podem derivar-se as seguintes equações diferenciais:

$$\frac{d[AL_V^{out}]}{dt} = k_+[A][L_V] + k_f^{in \rightarrow out}[AL_V^{in}] - (k_- + k_f^{out \rightarrow in})[AL_V^{out}] \quad (5)$$

$$\frac{d[AL_V^{in}]}{dt} = k_f^{out \rightarrow in}[AL_V^{out}] - k_f^{in \rightarrow out}[AL_V^{in}] \quad (6)$$

A concentração da anfifila na solução aquosa é dada pelo balanço de massa:

$$[A] = [A]_T - [AL_V^{out}] - [AL_V^{in}] \quad (7)$$

Se a composição química é similar em ambas as monocamadas da bicamada lipídica e se a curvatura do lipossoma for pequena, como é o caso dos LUVs, considera-se que as velocidades de translocação $k_f^{out \rightarrow in}$ e $k_f^{in \rightarrow out}$ são iguais ($k_f^{out \rightarrow in} = k_f^{in \rightarrow out} = k_f$).

No nosso sistema, as concentrações no infinito e a velocidade de transferência β são dadas por:

$$[AL_V]_{(\infty)} = [AL_V^{out}]_{(\infty)} = \frac{K_L [L_V][A]_T}{1 + K_L [L_V]} \quad (8)$$

$$[A]_{(\infty)} = \frac{[A]_T}{1 + K_L [L_V]} \quad (9)$$

$$\beta = k_- + k_+[L_V] \quad (10)$$

Uma vez que a fluorescência depende das concentrações e do rendimento quântico das várias espécies, na associação de monómeros de anfifilas na fase aquosa com a bicamada lipídica vai depender da concentração da anfifila na fase aquosa $[A]$ à qual corresponderá o rendimento quântico de fluorescência Φ_A e da concentração da anfifila associada à bicamada lipídica $[AL_V]$ com o rendimento quântico de fluorescência Φ_{AL_V} .

Assim, a intensidade de fluorescência é dada pela expressão:

$$I_f = \Phi_A [A] + \Phi_{AL_V} [AL_V] \quad (11)$$

Alterações de polaridade no meio circundante resultam em mudanças no rendimento quântico, quando o grupo NBD se encontra ligado ao LUV de SpM/Col apresenta um rendimento quântico muito superior do que quando se encontra no meio aquoso. Estas diferenças permitem-nos seguir a distribuição no equilíbrio entre os dois sistemas.

Com estas equações, conseguimos obter todos os parâmetros cinéticos necessários para caracterizar a interacção da sonda com a bicamada lipídica.

De modo a completar o estudo da interacção da anfifila com a bicamada lipídica, torna-se importante conhecer a energética envolvida em todos os passos do processo.

Assim, a dependência dos parâmetros cinéticos com a temperatura pode-nos dar muita informação relativamente à termodinâmica da interacção.

Para determinar os parâmetros termodinâmicos para os processos de inserção e desorção, foi tida em conta a teoria do estado de transição usando a expressão:

$$\ln(k) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) + \frac{\Delta S^{\circ\#}}{R} - \frac{\Delta H^{\circ\#}}{RT} \quad (12)$$

onde k é a constante cinética considerada, k_B representa a constante de Boltzman, T a temperatura, h representa a constante de Planck, R representa a constante de gases ideais, $\Delta S^{\circ\#}$ é a variação de entropia entre o estado de transição e o estado inicial e $\Delta H^{\circ\#}$ é a variação de entalpia.

Fazendo um gráfico de $\ln(k)$ em função de $1/T$ podemos obter $\Delta H^{\circ\#}$ e $\Delta S^{\circ\#}$, pelo ajuste da equação (12) aos valores experimentais.

A energia livre de Gibbs é obtida pela relação:

$$\Delta G^{\circ\#} = \Delta H^{\circ\#} - T\Delta S^{\circ\#} \quad (13)$$

Estas equações permitem-nos obter todos os parâmetros termodinâmicos da interacção da anfifila com a bicamada lipídica.

Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos vão ser retirados do melhor ajuste das equações acima referidas aos dados experimentais. As curvas experimentais foram ajustadas usando o *Solver* do software *Microsoft Excel*.

2.2. Determinação dos Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos da interacção do NBD-C8 com a Bicamada Lipídica

Como foi referido anteriormente, o estudo da interacção da sonda NBD-C8 com a bicamada lipídica de esfingomiélna/colesterol (proporção 6:4) apresentou uma série de dificuldades. No entanto, foi possível obter os parâmetros cinéticos e termodinâmicos a que nos propusemos, tendo sempre em conta que se tratam de valores preliminares que poderão servir de base para estudos futuros.

2.2.1. Constante de Equilíbrio K_L da interacção de NBD-C8 e LUVs de SpM/Col

A constante de equilíbrio K_L , foi obtida experimentalmente através de titulações no equilíbrio, ajustando a equação (11) aos dados experimentais e usando as equações (8) e (9) para obter as concentrações de A e AL_v no equilíbrio. As curvas experimentais foram ajustadas usando o *Solver* do software *Microsoft Excel*.

Nas titulações foram usadas concentrações de LUV entre 0 mM e 5 mM e NBD-C8 com uma concentração de 250 nM.

Na Figura 11 está representada a curva de titulação para determinar o K_L da associação do NBD-C8 a LUVs de SpM/Col à temperatura de 25 °C.

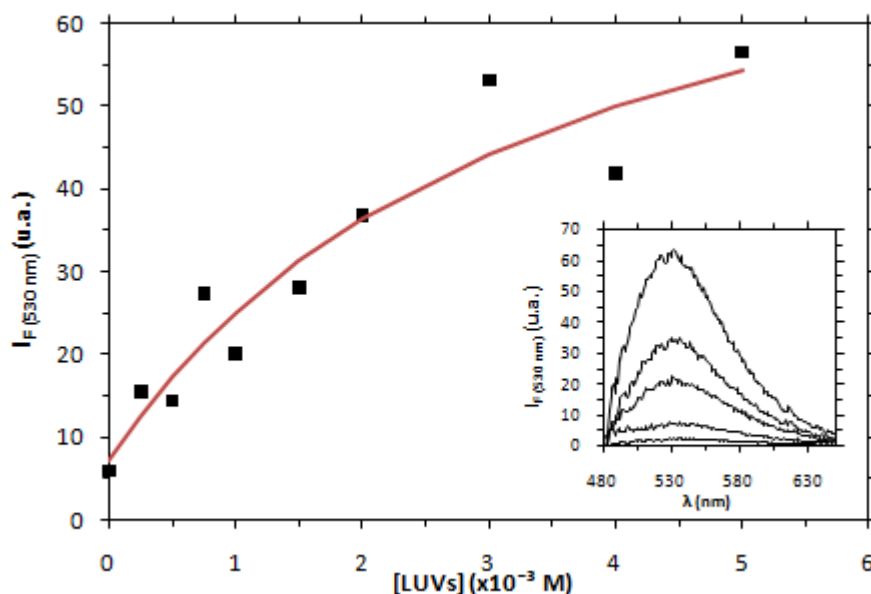


Figura 11 – Intensidade de fluorescência a 530 nm do NBD-C8 em função da concentração de LUVs. A linha a vermelho representa o melhor ajuste da equação (11) aos dados experimentais com um $K_L \approx 6,63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. O gráfico interior representa os espectros de emissão de fluorescência da anfífila NBD-C8 para concentrações de LUVs de 0 mM, 0,5 mM, 1,5 mM, 3 mM e 5 mM.

O valor de K_L obtido para a anfifila NBD-C8 foi de $6,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Este valor está em concordância com os valores de K_L para o NBD-C8 em bicamadas lipídicas de POPC ($1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) [34] e para NBD-DMPE em bicamadas lipídicas de SpM/Col ($1,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) [39], sendo significativamente menor do que os valores obtidos para os sistemas acima mencionados, como já se esperava.

Em relação à associação do NBD-C8 com bicamadas de POPC, o K_L é maior do que para as bicamadas de SpM/Col, porque, como já foi mencionado, a presença de colesterol aumenta a rigidez das bicamadas e devido ao favorável empacotamento entre o colesterol e a esfingomielina a nossa membrana torna-se mais densa encontrando-se na fase líquido-ordenado. Assim, a interacção da anfifila com a bicamada SpM/Col resulta em valores de K_L menores do que em bicamadas na fase líquido-desordenado.

Mantendo a mesma composição lipídica dos LUVs e variando a sonda, verificámos que o nosso sistema também resultou em valores de K_L menores, isto é devido à anfifila NBD-DMPE ter uma parte apolar maior do que NBD-C8, o que também favorece a associação da sonda com a bicamada lipídica. Estudos anteriores da interacção de séries homólogas de anfifilas fluorescentes revelaram que o K_L aumenta com o aumento do tamanho da cadeia hidrocarbonada [34].

2.2.2. Cinética da interacção de NBD-C8 com LUVs de SpM/Col

Nesta secção vão ser apresentados os resultados cinéticos da inserção e desorção para a sonda NBD-C8.

Tendo em conta o sistema cinético apresentado no início deste capítulo, monitorizou-se a dependência temporal da associação da anfifila com LUVs por fluorimetria de mistura rápida mediante o uso da técnica de *stopped-flow*. Numa experiência tipo, a anfifila é dissolvida num meio aquoso com uma dada concentração e, em seguida, adicionada aos LUVs, depois segue-se em tempo a concentração da anfifila [AL_v] inserida na bicamada pela observação do aumento na fluorescência.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos ajustando a equação (11) aos dados experimentais e, usando as várias equações apresentadas no início deste capítulo, retirou-se do ajuste os valores de k e k_f . O valor de k_+ foi obtido pela relação dada pela equação (3), usando o valor de K_L resultante da titulação em equilíbrio. O valor de K_L usado nos ajustes foi sempre o mesmo às várias temperaturas, uma vez que, este valor pouco varia com a temperatura [34].

As experiências foram feitas a várias temperaturas entre 10 °C e 20 °C de modo a podermos fazer o estudo termodinâmico.

Na Figura 12 está representado a evolução em tempo da intensidade de fluorescência após a adição de LUVs com uma dada concentração a uma solução de NBD-C8 com concentração 200 nM a 20 °C.

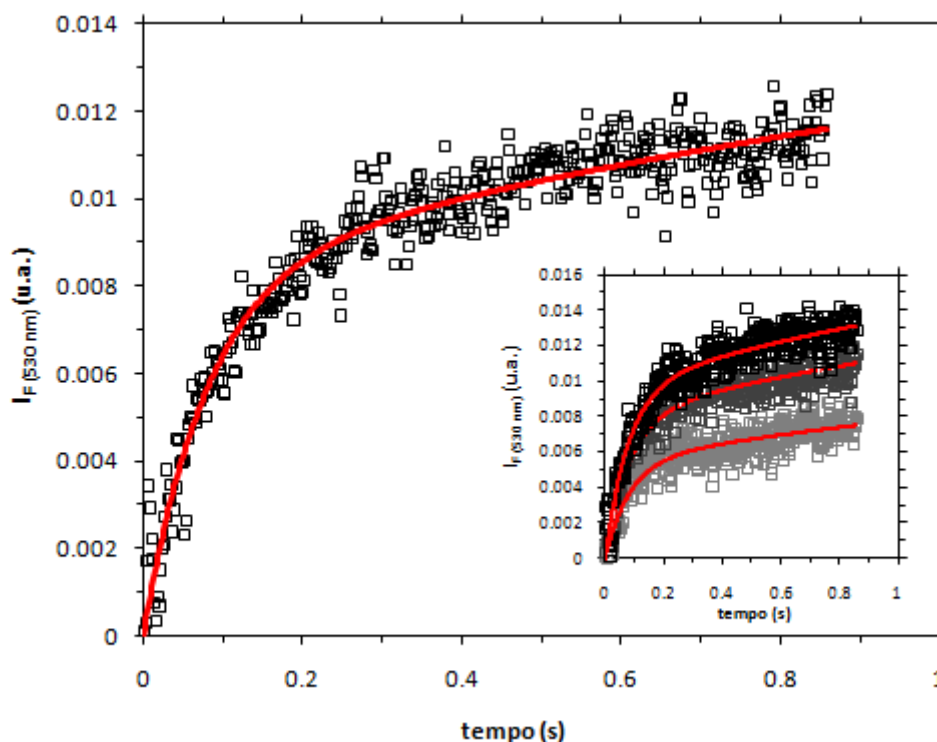


Figura 12 – Intensidade de fluorescência em função do tempo para a anfifila NBD-C8 com concentração 200 nM usando LUVs com concentração 1,5 mM. O melhor ajuste foi dado pela integração numérica das equações diferenciais do esquema cinético (ajuste global), com valores de $k \approx 15,0 \text{ s}^{-1}$, $k_+ \approx 9,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_f \approx 0,7 \text{ s}^{-1}$ a 20 °C. No gráfico interior estão representados os resultados experimentais para concentrações de LUVs de 1 mM, 1,25 mM e 2 mM (de baixo para cima).

Pelos gráficos do estudo cinético podemos verificar que os resultados experimentais obtidos não seguem um comportamento monoexponencial. O passo rápido foi atribuído à transferência da anfifila do meio aquoso para a bicamada e o passo mais lento à translocação da monocamada exterior para a monocamada interior. Isso levou-nos a ter dificuldades na desconvolução dos dois processos cinéticos caso as curvas experimentais fossem ajustadas individualmente. Assim, optámos por fazer um ajuste global das diferentes concentrações de LUVs impondo as mesmas constantes de velocidade para todas as concentrações.

A 20 °C os valores de k_+ e k foram $9,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $15,0 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

2.2.3. Termodinâmica da inserção e desorção da anfifila NBD-C8 em/de LUVs de SpM/Col

O estudo cinético foi feito a diferentes temperaturas de modo a se poder obter $\Delta G^{\circ\#}$, $\Delta H^{\circ\#}$ e $T\Delta S^{\circ\#}$ para o estado de transição, uma vez que pela dependência do logaritmo das velocidades com o inverso da temperatura podemos obter um gráfico do tipo Arrhenius.

Na figura 13 estão representados os gráficos do tipo Arrhenius para os processos de inserção (A) e de desorção (B):

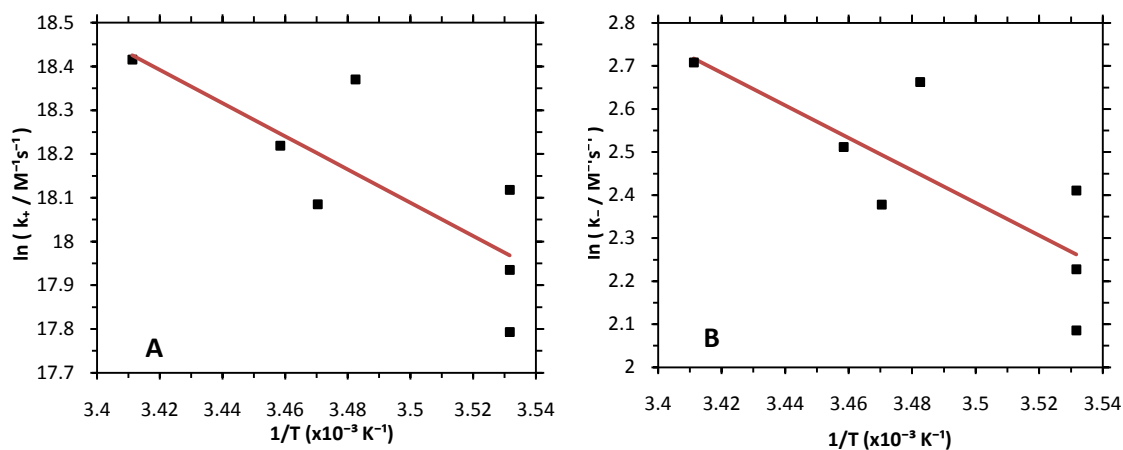


Figura 13 – Gráfico do tipo Arrhenius para os processos de inserção (A) e desorção (B) da anfifila NBD-C8 em/de LUVs de SpM/Col a temperaturas entre 10 °C e 20 °C. A linha é o melhor ajuste da equação do estado de transição (12) aos dados experimentais.

Todos os resultados obtidos para os processos de inserção e desorção para a sonda NBD-C8 serão discutidos em detalhe no final da apresentação dos resultados para a sonda NBD-C10.

2.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos da interacção do NBD-C10 com a Bicamada Lipídica

Nesta secção vão ser apresentados os resultados cinéticos e termodinâmicos da interacção da anfifila NBD-C10 com a bicamada lipídica dos LUVs de SpM/Col (6:4).

O estudo realizado com a sonda NBD-C8 foi um ponto de partida para o estudo com a sonda NBD-C10. Apesar das dificuldades que tivemos, não só conseguimos melhorar as condições das experiências como ganhámos maior confiança nos resultados obtidos. No entanto, deve ser tido em conta que, trabalhar com sistemas SpM/Col é muito difícil devido à alta densidade da membrana, e que apesar dos resultados obtidos serem mais confiáveis, ainda precisa de muito trabalho futuro até resultar num estudo conclusivo.

2.3.1. Constante de Equilíbrio K_L da interacção de NBD-C10 e LUVs de SpM/Col

Para a obtenção do K_L para o NBD-C10 foram usadas concentrações de LUVs que variaram entre 0 mM e 3 mM e a concentração de NBD-C10 foi de 50 nM. Usaram-se células com percurso óptico de 3 mm para concentrações abaixo de 1mM e células de percurso óptico de 1,5 mm para concentrações acima de 1 mM.

Na Figura 14 podemos ver a curva de titulação para determinar o K_L da associação do NBD-C10 com LUVs de SpM/Col a 25 °C:

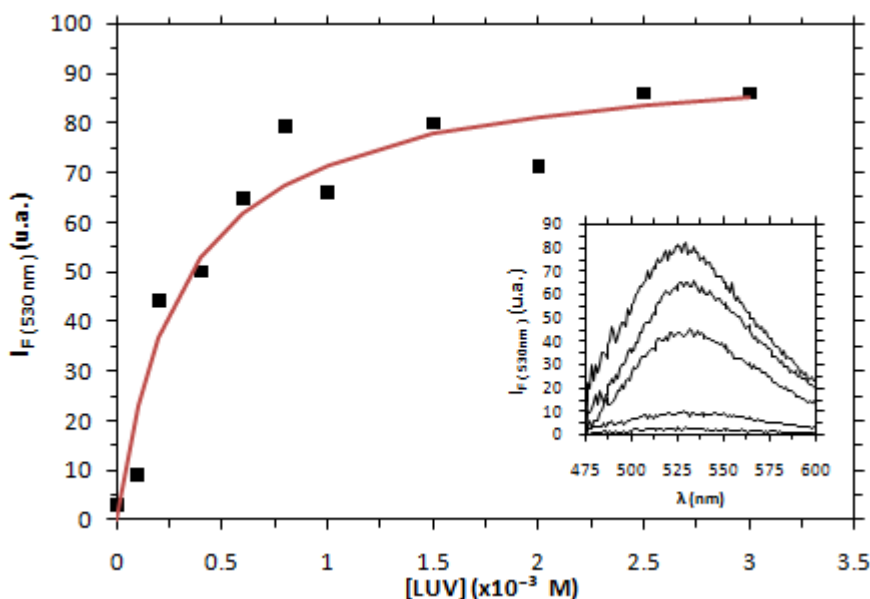


Figura 14 – Intensidade de fluorescência a 530 nm do NBD-C10 em função da concentração de LUVs. O gráfico interior representa os espectros de emissão de fluorescência para concentrações de LUV entre 0 mM e 3 mM.

O valor de K_L obtido para a associação da anfifila NBD-C10 com a bicamada lipídica foi de $8,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, cerca de uma ordem de grandeza superior ao valor obtido para o NBD-C8 neste sistema lipídico.

Um estudo realizado pelo nosso grupo, da associação da anfifila NBD-C10 com LUVs de POPC, resultou em valores de K_L muito superiores ($\approx 1,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) [34]. À semelhança do que se observou para a anfifila NBD-C8, a partição para a bicamada na fase líquido ordenado (SpM/Col 6:4) é muito menos favorável que para a fase líquido desordenado (POPC). Observando-se uma redução de um factor de 273 e 146 para o NBD-C8 e NBD-C10, respectivamente.

2.3.2. Cinética da interacção de NBD-C10 com LUVs de SpM/Col

O estudo cinético foi feito com uma concentração de NBD-C10 de 12,5 nM e as concentrações de LUVs variaram entre 0,1 mM e 0,25 mM a temperaturas que variaram entre 10 °C e 18 °C.

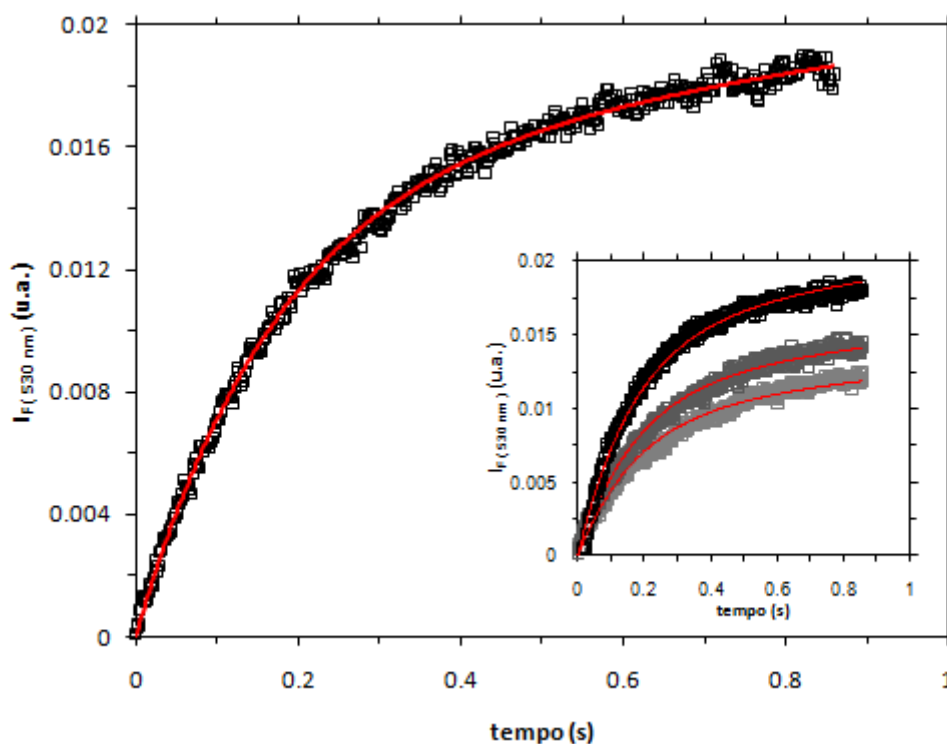


Figura 15 – Intensidade de fluorescência em função do tempo para a anfifila NBD-C10 com concentração 12,5 nM usando LUVs com uma concentração de 0,15 mM. O melhor ajuste foi dado pela integração numérica das equações diferenciais do esquema cinético (ajuste global), com valores de $k_+ \approx 5,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_- \approx 5,90 \text{ s}^{-1}$ e $k_f \approx 0,33 \text{ s}^{-1}$ a 12 °C. No gráfico interior estão representados os resultados experimentais para as concentrações 0,1 mM, 0,13 mM e 0,2 mM (de baixo para cima).

O ajuste global dado pela integração numérica das equações diferenciais do esquema cinético conduziu a valores de $k_+ \approx 5,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_- \approx 5,90 \text{ s}^{-1}$ a 12 °C.

2.3.3. Termodinâmica da inserção e desorção da anfifila NBD-C10 em/de LUVs de SpM/Col

Na figura 16 estão representados os gráficos do tipo Arrhenius para os processos de inserção (A) e de desorção (B):

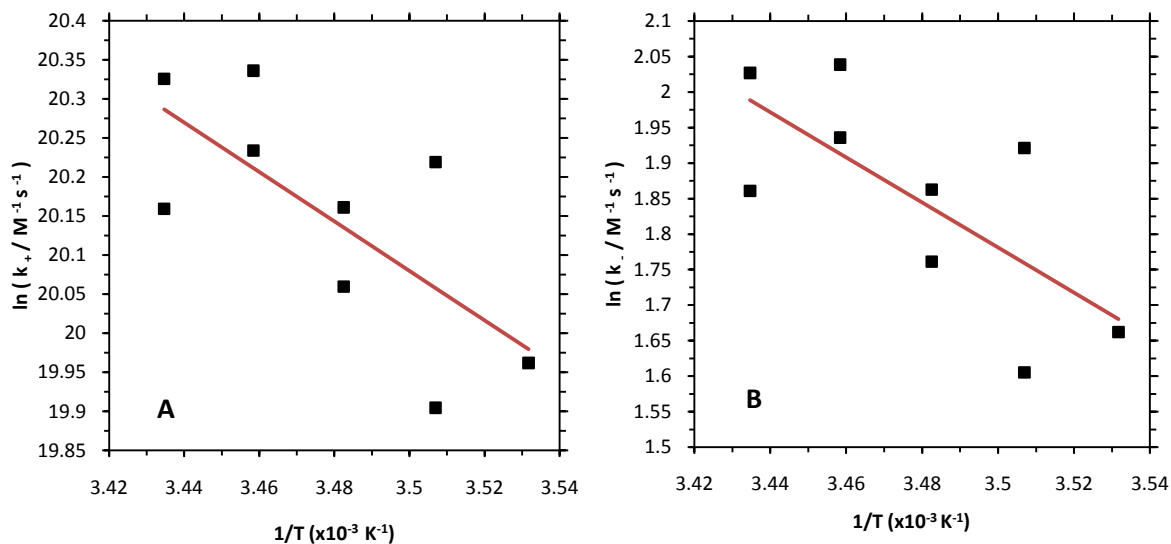


Figura 16 - Gráfico do tipo Arrhenius para os processos de inserção (A) e desorção (B) da anfifila NBD-C10 em/de LUVs de SpM/Col a temperaturas entre 10 °C e 18 °C. A linha é o melhor ajuste da equação do estado de transição (12) aos dados experimentais.

Na secção seguinte irão ser discutidos todos os resultados obtidos para a interacção (inserção e desorção) das sondas NBD-C8 e NBD-C10, tendo em conta a teoria do estado de transição.

2.4. Discussão

Os parâmetros termodinâmicos da inserção e da desorção foram obtidos tendo em conta a Teoria do Estado de Transição de Eyring, que envolve os estados de maior energia. Esta teoria postula que para uma partícula passar de um estado inicial para um estado final tem que ultrapassar a região de maior energia potencial, chamado de estado de transição [40]. O modelo aceite para o estado de transição no processo de inserção/desorção (que corresponde ao estado de maior energia) corresponde ao estado em que a anfifila reside ligeiramente inserida na bicamada lipídica mas também em contacto com a solução aquosa, Figura 17.

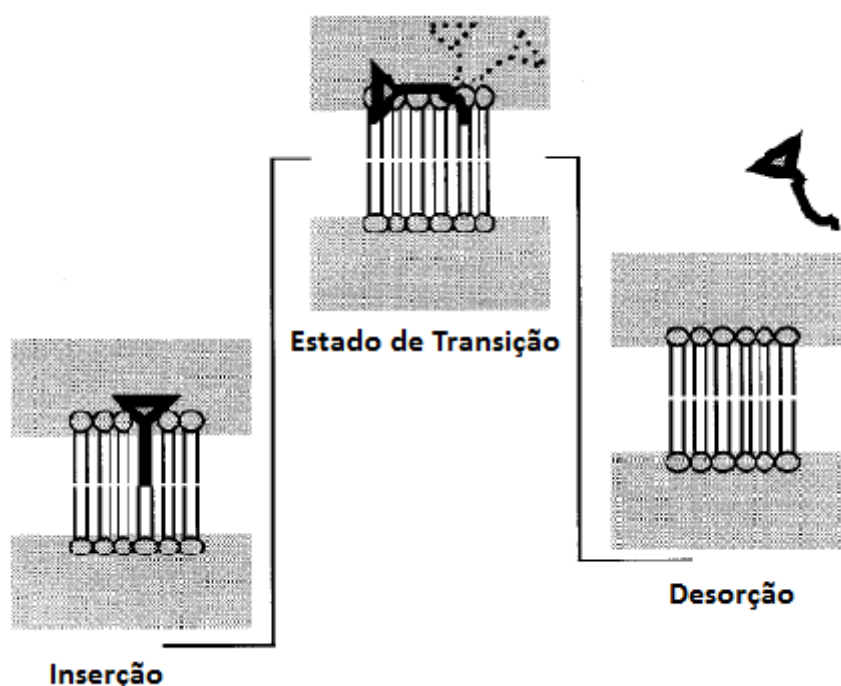


Figura 17 – Representação esquemática do Modelo do Estado de Transição usado na discussão. As linhas a tracejado na molécula de sonda no estado de transição, são para indicar uma liberdade de movimento considerável comparada com o estado completamente inserida. A área a sombreado representa a região interfacial que tem propriedades diferentes da água do meio aquoso. Adaptado de Pokorny *et al.*, 2000 [41].

Para entender a termodinâmica do processo é preciso ter em conta as diferentes contribuições entálpica e entrópica para a inserção e para a desorção. Estas contribuições tendem a compensar-se mutuamente e dependem de muitos factores.

No estado de transição a molécula de anfifila está semi-inserida na bicamada estando exposta também à água, que vai formar uma esfera de hidratação à volta da parte da anfifila em contacto com a fase aquosa. Vão-se formar assim, uma cavidade na fase aquosa e uma cavidade na fase membranar. Na fase aquosa vão-se estabelecer

ligações de hidrogénio entre as moléculas de água na esfera de hidratação, enquanto que na fase membranar, a cavidade formada pela anfifila é mais ou menos preenchida pelos lípidos, dependendo da sua liberdade conformacional. A variação de entalpia $\Delta H^{\circ\#}$ está relacionada com as interações que se quebram e estabelecem quando a anfifila sai de uma fase e entra na outra. A variação de entropia $\Delta S^{\circ\#}$ está relacionada com o aumento/diminuição de entropia provocado pela perda/ganho da esfera de hidratação em torno da anfifila na fase aquosa e por outro lado pela diminuição/aumento de entropia na fase membranar causada pela entrada/saída da anfifila na/da membrana. A variação da energia livre de Gibbs $\Delta G^{\circ\#}$ depende do balanço destas duas contribuições.

De modo a se poder comparar com os valores obtidos para a interação das sondas NBD-C8 e NBD-C10 com LUVs de POPC, recorreu-se a uma extrapolação dos valores para a temperatura de 35 °C.

Na tabela 2 estão compilados todos os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação das anfifilas NBD-C8 e NBD-C10 com a fase membranar de LUVs de SpM/Col a 35 °C. Nas duas colunas da direita estão os valores do estudo da interação das sondas com LUVs de POPC [34].

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação das anfifilas NBD-C8 e NBD-C10 com LUVs de SpM/Col e de POPC a 35 °C.

SpM/Col	NBD-C8 (a)	NBD-C10 (a)	NBD-C8 POPC (b)	NBD-C10 POPC (b)
k_+ ($M^{-1}s^{-1}$)	$1,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$(1,7 \pm 0,9) \times 10^{11}$	$(1,6 \pm 0,9) \times 10^{11}$
k_- (s^{-1})	27	13	94($\pm 0,3$)	12($\pm 0,4$)
K_L (M^{-1})	$6,6 \times 10^6$	$8,9 \times 10^7$	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{10}$
$\Delta G_{ins}^{\circ\#}$ ($kJ mol^{-1}$)	27($\pm 0,3$)	22($\pm 1,4$)	9,3	9,4
$\Delta H_{ins}^{\circ\#}$ ($kJ mol^{-1}$)	28(± 9)	24(± 10)	33(± 4)	49(± 3)
$T\Delta S_{ins}^{\circ\#}$ ($kJ mol^{-1}$)	1(± 9)	2(± 11)	24(± 4)	39(± 3)
$\Delta G_{des}^{\circ\#}$ ($kJ mol^{-1}$)	67($\pm 0,3$)	69($\pm 0,4$)	64	69
$\Delta H_{des}^{\circ\#}$ ($kJ mol^{-1}$)	28(± 9)	24(± 10)	64(± 5)	60(± 2)
$T\Delta S_{des}^{\circ\#}$ ($kJ mol^{-1}$)	-39(± 9)	-45(± 11)	0(± 5)	-8,9(± 2)

(a) valores extrapolidados para a temperatura de 35 °C.

(a) dados obtidos da bibliografia [34].

Segundo o modelo do estado de transição, a velocidade de inserção depende principalmente da energia necessária para abrir uma cavidade na membrana com dimensões adequadas à inserção da anfifila. Comparando os valores obtidos neste trabalho para as anfifilas NBD-C8 e NBD-C10, podemos verificar que a velocidade de inserção aumenta ligeiramente com o tamanho da cadeia. Este resultado não era esperado e pode não ser significativo pois não foram efectuadas suficientes experiências independentes.

Fazendo a comparação dos dados obtidos com LUVs de SpM/Col com os obtidos para as mesmas sondas com LUVs de POPC, verificamos que a velocidade de inserção é significativamente menor para o sistema na fase líquido-ordenado composta por SpM/Col. Este resultado reflecte o maior empacotamento existente entre os lípidos na fase líquido-ordenado com um volume livre médio menor e consequentemente uma menor probabilidade de encontrar uma cavidade com dimensões adequadas à inserção da anfifila durante o tempo de vida do complexo de encontro. Notamos, no entanto, que a variação de entalpia para o processo de inserção (energia necessária para formar a cavidade na membrana) é menor para o sistema na fase líquido-ordenado indicando uma menor interacção entre os lípidos nesta fase. O aumento da energia livre de Gibbs para o processo de inserção observada para o sistema na fase líquido-ordenado, deve-se assim a uma redução na contribuição entrópica que era muito favorável no sistema líquido-desordenado.

Num estudo feito da interacção da anfifila NBD-DMPE com sistemas de SpM/Col e em POPC, verificou-se um comportamento semelhante, embora com algumas diferenças devido às características distintas das anfifilas, nomeadamente na secção de corte [39]. Tendo em conta que a molécula de NBD-DMPE tem duas cadeias hidrocarbonadas, enquanto que, ambas as anfifilas usadas neste estudo só têm uma, faz com que haja uma maior dificuldade por parte desta em encontrar uma cavidade de tamanho adequado à sua inserção, reflectindo-se na sua velocidade de inserção, que apresenta valores menores para ambos os sistemas

Na tabela 2 estão compilados os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interacção da anfifila NBD-DMPE com bicamadas lipídicas de SpM/Col e de POPC a 35 °C.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interacção da anfifila NBD-DMPE com LUVs de SpM/Col e de POPC a 35 °C.

T = 35 °C	SpM/Col (a)	POPC (a)
k_+ ($M^{-1}s^{-1}$)	$(1,8\pm 0,1) \times 10^5$	$(2,3\pm 0,1) \times 10^6$
k_- (s^{-1})	$(1,4\pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(2,8\pm 1,2) \times 10^{-5}$
K_L (M^{-1})	$1,3 \times 10^{10}$	$8,2 \times 10^{10}$
$\Delta G^{\circ\#}_{ins}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	45	38
$\Delta H^{\circ\#}_{ins}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	97	85
$T\Delta S^{\circ\#}_{ins}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	52	46
$\Delta G^{\circ\#}_{des}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	104	102
$\Delta H^{\circ\#}_{des}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	87	119
$T\Delta S^{\circ\#}_{des}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	-17	16

(a) dados obtidos da bibliografia [39].

Verificou-se que para todas as anfifilas estudadas, o processo de inserção nas bicamadas formadas por SpM/Col não é controlado por difusão, pois a velocidade de inserção é muito inferior ao previsto para um processo controlado por difusão k_{dif} . Sempre que há um encontro entre um monómero de anfifila e o sistema lipídico, limitado por difusão, o complexo (AL_V) formado entre eles, é controlado por uma constante de velocidade k_{dif} . As duas entidades mantêm-se em proximidade por uma gaiola de solvente e por eventuais interacções entre as suas superfícies. Durante o tempo de vida deste complexo, pode haver inserção da anfifila no agregado lipídico, com uma constante de velocidade k_{in} ou pode haver uma separação por difusão com uma constante de velocidade k_{-dif} . A velocidade de inserção unimolecular k_{in} , reflecte a probabilidade de encontrar uma cavidade na bicamada com dimensões adequadas e está relacionada com a constante de inserção k_+ , obtida experimentalmente, para a inserção de uma anfifila na superfície lipídica a partir da fase aquosa, pela relação:

$$k_+ = \frac{k_{dif}}{k_{-dif}} k_{in} = \frac{4}{3} \pi a_{eff}^3 N_A e^{\frac{\Delta H}{RT}} k_{in} \quad (14)$$

onde a_{eff} é a soma dos raios da anfifila e do agregado lipídico, N_A é o número de Avogadro, ΔH é a energia de interacção entre as duas entidades do complexo, R é a constante dos gases ideais e T a temperatura.

Caso o nosso processo fosse controlado por difusão, a constante de inserção k_+ teria de ter um valor aproximado a $3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que não acontece com nenhuma das anfifilas.

A velocidade de desorção depende essencialmente da relação entre as forças de interacção estabelecida entre a anfifila e os dois ambientes, fase aquosa e fase membranar, bem como das interacções estabelecidas entre os lípidos na bicamada. Para o sistema SpM/Col, a velocidade de desorção é menor do que em sistemas líquido-desordenado, para anfifilas iguais. Assumindo que as propriedades da água são semelhantes à superfície de ambas as bicamadas, as diferenças observadas devem-se às propriedades diferentes dos dois sistemas lipídicos e às interacções distintas entre as anfifilas e as bicamadas. A variação observada para a contribuição entálpica reflecte a força das interacções estabelecidas entre a anfifila e a bicamada e é muito superior para a desorção a partir das membranas na fase líquido-desordenado. A maior variação de energia livre de Gibbs observada para o sistema na fase líquido-ordenado deve-se assim a uma variação de entropia mais desfavorável e não a interacções mais fortes entre a anfifila e a bicamada. A variação de entropia entre o sistema com a anfifila inserida na membrana e o estado de transição deve-se a várias contribuições das quais se destacam: i) formação da esfera de solvatação em torno da anfifila na fase aquosa, $\Delta S < 0$; ii) formação da cavidade na bicamada devido à saída da anfifila, $\Delta S > 0$. O primeiro termo é igual para os dois sistemas, pelo que a maior redução de entropia observada para o estado de transição da bicamada se deve a um menor aumento de entropia na bicamada. Este resulta da menor liberdade conformacional dos lípidos quando na fase líquido-ordenado e também da maior entropia da bicamada com a anfifila inserida devido a um empacotamento deficiente com a bicamada.

Quando comparamos a variação de entropia a quando da formação do estado de transição para a desorção das anfifilas estudadas neste trabalho (NBD-Cn) e para a desorção da anfifila de cadeia dupla (NBD-DMPE), verificamos que a variação de entropia foi maior (menos negativo) para o caso da anfifila de cadeia dupla. Este facto deve-se a um maior aumento de entropia causado pela cavidade na bicamada que não é compensada pela diminuição de entropia devido à solvatação da anfifila pela fase aquosa, uma vez que o aumento no volume das cavidades é superior ao aumento observado na superfície.

Capítulo 3

Conclusões

Neste trabalho de Mestrado efectuou-se o estudo da interacção de duas anfifilas fluorescentes, NBD-C8 e NBD-C10, com bicamadas lipídicas de esfingomiéline e colesterol na fase líquido-ordenado. O estudo permitiu obter os parâmetros cinéticos e termodinâmicos dos processos de inserção e desorção e da correspondente constante de equilíbrio para a interacção com a membrana.

As constantes de equilíbrio da associação das anfifilas com a bicamada lipídica, K_L , foram obtidas experimentalmente através de titulações no equilíbrio. A 25 °C os valores obtidos foram $6,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $8,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, para o NBD-C8 e NBD-C10, respectivamente, com um incremento na afinidade da anfifila para a bicamada com o aumento da sua cadeia alquílica. Estes valores foram mais baixos do que os que foram obtidos para bicamadas lipídicas na fase líquido-desordenado para as mesmas sondas [34]. O facto da bicamada lipídica na fase líquido-ordenado ter um empacotamento favorável entre os seus componentes, o que a torna mais densa, faz com que a interacção da anfifila com sistemas na fase líquido-ordenado seja menos favorável. Esta característica é de extrema importância se tivermos em conta que a primeira barreira à permeação passiva de solutos através da BHE se encontra na fase líquido-ordenado.

Estes valores de K_L foram usados para calcular os parâmetros cinéticos da interacção das sondas com a bicamada lipídica. Pelos gráficos cinéticos verificou-se que as curvas experimentais não seguiam um comportamento monoexponencial. O passo rápido foi atribuído à transferência da anfifila do meio aquoso para a bicamada lipídica e o passo lento à translocação da monocamada externa para a monocamada interna. Para obter os parâmetros cinéticos, procedeu-se a um ajuste global impondo as mesmas constantes cinéticas para as várias concentrações de LUVs.

As constantes de velocidade de inserção para o NBD-C8 foram mais baixas do que as do NBD-C10 para todas as temperaturas. Pela diferença entre os valores calculados para a constante de velocidade de um processo controlado por difusão, para as nossas condições experimentais, e os valores obtidos experimentalmente para a constante de velocidade de inserção, verificou-se que o processo de inserção não era

controlado por difusão para nenhuma das anfifilas. A diferença entre estes valores indica que nem todos os encontros entre a anfifila e os LUVs resultam na sua inserção durante o tempo de vida deste complexo de encontro.

Os valores das constantes de velocidade de inserção das anfifilas no sistema SpM/Col foram mais baixas do que no sistema POPC, que foram muito próximas da velocidade controlada por difusão para ambas as anfifilas. Este facto vem mostrar que a entrada da anfifila é mais facilitada em sistemas líquido-desordenado do que em sistemas líquido-ordenado, devido à maior liberdade conformacional dos lípidos no sistema líquido-desordenado, conduzindo a um maior volume livre para a inserção.

A constante de velocidade de desorção é menor para a anfifila NBD-C10, uma vez que esta apresenta uma cadeia hidrocarbonada maior do que a anfifila NBD-C8, estabelece interações de van der Waals mais fortes com a bicamada lipídica, sendo portanto necessário fornecer mais energia para quebrar as interações e retirar a anfifila da fase membranar.

A desorção das anfifilas NBD-C8 e NBD-C10 do sistema na fase líquido-ordenado estudado é mais lenta do que de sistemas na fase líquido-desordenado. A diferença é devida a uma variação desfavorável na entropia entre a anfifila inserida e o estado de transição sendo que a variação de entalpia é de facto menor no caso da desorção a partir das bicamadas na fase líquido-ordenado.

A variação de entropia aquando da formação do estado de transição é menor em membranas na fase líquido-ordenado. Este facto deve-se a um menor aumento da entropia na bicamada, como resultado da existência da cavidade, uma vez que há uma menor liberdade conformacional dos lípidos nesta fase. É também de esperar uma maior entropia da bicamada quando a anfifila está inserida, devida a um empacotamento deficiente resultando em defeitos na bicamada.

Capítulo 4

Experimental

4.1. Material

4.1.1. Reagentes

- Ácido Acético Glacial (Pronalab)
- Ácido Ascórbico (Aldrich)
- Ácido Perclórico 70% (Fluka)
- Ácido Sulfúrico 96% (Pronalab)
- Álcool Isopropílico (Pronalab)
- Anidrido Acético (Panreac)
- Azida de Sódio (Fluka)
- Clorofórmio (Sigma)
- Colesterol (Avanti)
- EDTA (Fluka)
- Esfingomielina (Sigma)
- Hepes (Sigma)
- Hidrogenofosfato dipotássico (Aldrich)
- Metanol (Sigma)
- Molibdato de Amónio (Sigma)
- Sulfato de Sódio Anidro (Aldrich)

4.1.2. Equipamento

- Espectrómetro de fluorescência Varian Cary Eclipse;
- Espectrómetro UV/VIS Spectronic Unicam UV500;
- Extrusor Lipex Biomembranes;
- Fluorímetro Stopped Flow termostatizado (Hi-Tech model SF-61, Hi-Tech Scientific, Salisbury, UK).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação de LUVs

A mistura de lípido foi preparada atendendo à concentração e proporção desejada (esfingomiéline/colesterol, 6:4) numa solução de clorofórmio/metanol (87/13, v/v). O solvente foi evaporado até à secura, sob um fluxo de azoto e aquecendo o tubo que contém a solução de lípidos de modo a formar um filme lipídico. O filme foi deixado num excicador sob vácuo durante 8 horas à temperatura ambiente. O resíduo livre de solvente foi hidratado com o volume necessário de solução tampão Hepes de forma a obter a concentração de lípidos desejada, a 65 °C. Os lípidos hidratados foram vigorosamente agitados, de modo a produzir uma suspensão de MLVs que foram seguidamente extruídas usando dois filtros de policarbonato sobrepostos com poros de 0,1 µm. Foram feitas dez passagens agitando sempre após cada passagem. As suspensões de LUVs obtidas após a extrusão foram diluídas com solução tampão de modo a obter as concentrações desejadas para as experiências.

4.2.2. Análise da Concentração de Lípidos nos LUVs

Após a extrusão pode-se perder algum lípido alterando a concentração final, portanto deve-se proceder à quantificação de cada componente de modo a determinar a concentração certa de lípido nos LUVs.

A esfingomiéline contém um grupo fosfato unido ao grupo hidroxilo da ceramida, logo a determinação da sua concentração nos LUVs foi feita usando uma versão modificada do ensaio de Bartlett [42]. A concentração de colesterol foi determinada usando o método de Lieberman-Burchard [43].

4.2.2.1. Determinação da Concentração de Fosfato nos LUVs

A quantificação dos fosfatos baseia-se na análise de fósforo através da redução do fosfomolibdato, e permite-nos obter a concentração exacta de esfingomiéline através da absorção a 700 nm. Para obter uma curva de calibração, pipetou-se, em duplicado, os volumes 0, 100, 150, 200, 250 e 300 µL de solução stock de K₂HPO₄ de concentração 1mM. As amostras foram preparadas em triplicado e diluídas de modo a que a sua concentração final se encontrasse no meio da curva de calibração. O volume final de cada tubo foi ajustado até 300 µL com água. Com uma pipeta de vidro, foi adicionado a

cada tubo, 700 μL de ácido perclórico a 70%. As soluções foram cobertas com berlindes e aquecidas num bloco de aquecimento a 190 °C até um máximo de 2 horas. Após um arrefecimento lento até à temperatura ambiente, adicionou-se 2 ml de molibdato de amónio 1% (m/v) e de solução aquosa de ácido ascórbico 4% (m/v). As soluções finais foram incubadas a 37 °C durante 2 horas. A concentração de fosfato foi determinada pela sua absorvância a 700 nm.

4.2.2.2. Determinação da Concentração de Colesterol nos LUVs

A quantificação do colesterol foi baseada na análise do grupo hidroxilo do colesterol que ao reagir com os reagentes aumenta a conjugação de insaturação do anel condensado adjacente, originando uma solução com cor verde. A concentração exacta de colesterol foi obtida através da absorção a 625 nm. Preparou-se uma solução conhecida por reagente de Lieberman-Burchard de ácido acético glacial:anidrido acético:ácido sulfúrico com proporção 35:55:10, à qual se adicionou 1% (m/v) de sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução em gelo. Para obter a curva de titulação, pipetou-se, em duplicado, 0, 20, 40, 60, 80 e 100 μL de uma solução stock de colesterol com concentração 40 mM. As amostras foram preparadas em triplicado e diluídas de modo a que a sua concentração final se encontrasse no meio da curva de titulação. Ajustou-se o volume em cada tubo até 100 μL com álcool isopropílico. Adicionou-se 3 mL da solução de reagente de Lieberman-Burchard e incubou-se a 37 °C durante 20 minutos. Colocaram-se os tubos num banho a temperatura ambiente e leu-se a absorvância de cada tubo a 625 nm.

4.2.3. Determinação das Constantes de Equilíbrio (K_L) da interacção das anfifilas NBD-Cn com os LUVs

As constantes de equilíbrio foram obtidas experimentalmente através de titulações no equilíbrio. Para a sonda NBD-C8 usaram-se concentrações de sonda de 250 nM e de LUV concentrações entre 0 mM e 5 mM. Para a obtenção do K_L para o NBD-C10 foram usadas concentrações de LUVs que variaram entre 0 mM e 3 mM e a concentração de NBD-C10 foi de 50 nM.

Prepararam-se os brancos sem sonda com LUV e solução tampão para cada concentração desejada. Prepararam-se também as soluções de sonda e LUVs incubando-se a solução de sonda com a concentração desejada com cada concentração de lípido e

esperando 0,5 hora para atingir o equilíbrio, realizando-se depois as medições dos brancos e das soluções com sonda e LUV. Para a sonda NBD-C8 usou-se uma célula de percurso óptico de 5mm e para a sonda NBD-C10 uma célula de percurso óptico de 3 mm para concentrações abaixo de 1mM e células de percurso óptico de 1,5 mm para concentrações acima de 1 mM. O valor da intensidade de fluorescência foi obtido subtraindo o espectro de emissão das soluções de LUVs com sonda ao espectro de emissão dos brancos só com LUVs e retirando o valor da intensidade a 530 nm.

4.2.4. Determinação das Constantes Cinéticas da interacção das anfifilas NBD-C n com os LUVs

As constantes de velocidade de inserção e desorção foram determinadas através da transferência das anfifilas a partir da fase aquosa (solução tampão HEPES) para as bicamadas lipídicas. A solução de LUVs com a concentração desejada foi adicionada a uma solução de anfifila em fase aquosa, mediante a mistura de volumes na proporção 1/1 das duas soluções. A velocidade de transferência da anfifila para os LUVs foi avaliada pelo equipamento de *stopped-flow* com um comprimento de excitação de 450 nm e um comprimento de onda de emissão, definido por um filtro de *cut-off*, de 530 nm. Os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir da dependência da velocidade de transferência com a concentração de LUV.

Bibliografia

- [1] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 1972, 720-731.
- [2] R.B. Gennis, Biomembranes, Molecular Structure and Function, 1989, Springer-Verlang.
- [3] L.M.S. Loura, R.F.M. Almeida, Tópicos de biofísica de membranas, 2004, Lidel.
- [4] K. Simons, W.L.C. Vaz, Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 2004, 269-295.
- [5] A. Pralle, P. Keller, E. Florin, K. Simons, J.K.H. Hörber, Sphingolipid-Cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *The journal of cell biology*, 148, 2000, 997-1007.
- [6] V.A.V. Samsonov, I. Mihalyov, F.S. Cohen, Characterization of Cholesterol-Sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes, *Biophysical Journal*, 81, 2001, 1486-1500.
- [7] K. Simons, R. Ehehalt, Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J.Clin.Invest*, 110, 2002, 597-603.
- [8] D. Lingwood, *et al.*, Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science*, 327, 2009, 46-50.
- [9] R.E. Brown, 1998, Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal, *J. Cell Sci.*, 111(Pt. 1), 1998, 1-9.
- [10] H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimaki, J.P. Slotte, 2002, Cholesterol interactions with phospholipids in membranes, *Prog.Lipid Res.*, 41, 2002, 66-97.
- [11] W.L.C. Vaz, Properties of Lipid Bilayers, 2008, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- [12] K.J. Seu, L.R. Cambrea, R.M. Everly, J.S. Hovis, Influence of Lipid Chemistry on Membrane Fluidity: Tail and Headgroup Interactions, *Biophysical Journal*, 91, 2006, 3727-3735.

- [13] A. Chabanel, M. Flamm, K.L. Sung, M.M. Lee, D. Schachter, S. Chien, Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity, *Biophys J*, 44(2), 1983, 171-176.
- [14] O.G. Mouritsen, *Life-As a Matter of Fat*, 2005, Germany, *Springer*.
- [15] D. Marsh, Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes, *Biophys.J.*, 11, 2007, 3884-3899.
- [16] S.J. Marrink, H.J.C. Berendsen, Simulation of Water Transport through a Lipid Membrane, *Jour. Phys. Chem.*, 98(15), 1994, 4155-4168.
- [17] D. Bemporad, C. Luttmann, J.W. Essex, Computer Simulation of Small Molecule Permeation across a Lipid Bilayer: Dependence on Bilayer Properties and Solute Volume, Size, and Cross-Sectional Area, *Biophysical Journal*, 87, 2004b, 1-13.
- [18] R.N. McElhaney, Membrane lipid, not polarized water, is responsible for the semipermeable properties of living cells, *Biophys. J.*, 15, 1975, 777-784.
- [19] D.W. Deamer, A. Kleinzeller, D.M. Fambrough, Membrane Permeability 100 Years since Ernest Overton, 1999, *Current Topics in Membranes*.
- [20] D. Bemporad, C. Luttmann, J.W. Essex, Computer simulation of small molecule permeation across a lipid bilayer: Dependence on bilayer properties and solute volume, size, and cross-sectional area. *Biophys. J.*, 87, 2004, 1-13.
- [21] S. Paula, A.G. Volkov, A.N. Van Hoek, T.H. Haines, D.W. Deamer, Permeation of Protons, Potassium Ions, and small Polar Molecules through Phospholipid Bilayers as a Function of Membrane Thickness. *Biophys. J.*, 70, 1996, 339-348.
- [22] T. Xiang, B.D. Anderson, Permeability of acetic acid across Gel and Liquid-Crystalline lipid bilayers conforms to free-surface-area theory. *Biophys. J.*, 72, 1997, 223-237.
- [23] D. Bassolino-Klimas, H.E. Alper, T.R. Stouch, 1995, Mechanism of Solute Diffusion through Lipid Bilayer Membranes by Molecular Dynamics Simulation, *JACS*, 117, 1995, 4118-4129.
- [24] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry*, 1999, *John Willey & Sons, Inc.*

- [25] K. Gawrisch, D. Ruston, J. Zimmerberg, V.A. Parsegian, R.P. Rand, N. Fuller, Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces, *Biophys. J.*, 5, 1992, 1213-1223.
- [26] G.L. Jendrasiak, The hydration of phospholipids and its biological significance, *J.Nutr. Biochem.*, 7, 1996, 599-609.
- [27] G.G. Shipley, L.S. Avicella, D.M. Small, Phase behavior and structure of aqueous dispersions of sphingomyelin, *Journal of Lipid Research*, 15, 1974, 124-131.
- [28] T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 2004, 459-468.
- [29] M.B. Sankaram, T.E. Thompson, Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, 8686-8690.
- [30] D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, M. Artico, Development of the blood-brain barrier: A historical point of view, *The Anatomical Record Part B: The new Anatomist*, 289b, 2006, 3-8.
- [31] A. Misra, S. Ganesh, A. Shahiwala, Drug delivery to the central nervous system: a review, *J.Pharmaceut. Sci.*, 6(2), 2003, 252-273.
- [32] J.L. Sampaio, M.M. Moreno, W.L.C. Vaz, Kinetics and Thermodynamics of Association of Fluorescent Lysophospholipid Derivative with Lipid Bilayers in Liquid-Ordered and Liquid-Disordered Phases, *Biophys. J.*, 88, 2005, 4064-4071.
- [33] F. Gomes, Controle e estudo, cinético e termodinâmico, da associação de derivados fosfolipídicos fluorescentes com uma bicamada lipídica na fase líquida desordenada, 2007, Tese de Mestrado, Coimbra.
- [34] R. Cardoso, Kinetics and Thermodynamics of Interaction of a Homologous Series of Fluorescent Fatty Amines with Lipid Bilayers, 2008, Master Thesis, Coimbra.
- [35] H.A.L. Filipe, Quantitative Modeling of Passive Permeation through the Blood Brain Barrier, 2009, Master Thesis, Coimbra.
- [36] M.J. Moreno, L.M.B.B. Estronca, W.L.C. Vaz, Translocation of phospholipids and dithionite permeability in liquid-ordered and liquid-disordered membranes, *Biophys. J.*, 91, 2006, 873-881.

[37] R.F.M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, M., Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Diagram: Boudaries and composition of lipid raft, *Biophys. J.*, 85, 2003, 2406-2416.

[38] http://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet%E2%80%93visible_spectroscopy.

[39] M.S.C., Abreu, M.J. Moreno, W.L.C. Vaz, Kinetics and Thermodynamics of phospholipid derivative with lipid bilayers in liquid-disordered and liquid-ordered phases, *Biophys. J.*, 87, 2004, 353-365.

[40] K.J. Laidler, C. King, The development of Transition-State Theory, *J. Phys. Chem.*, 87, 1983, 2657-2664.

[41] A. Pokorny, P.F.F. Almeida, E.C.C. Melo, W.L.C. Vaz, Kinetics of amphiphile association with two-phase lipid bilayer vesicles, *Biophys. J.*, 78, 2000, 267-280.

[42] G.R. Bartlett, Phosphorus Assay in Column Chromatography, *Journal of Biological Chemistry*, 234, 1958, 466-468.

[43] R.P. Taylor, A.V. Broccoli, C.M. Grisham, Enzymatic and colorimetric determination of total serum cholesterol, *J. Chem. Educ.*, 55, 1978, 63-64.