

Ana Maria Branco Alves

**Efeitos de Ocupação Molecular nas
Propriedades Termotrópicas de diferentes
Bicamadas Lipídicas**

**Dissertação apresentada para prova de Mestrado em Química, Área de
especialização em Controle de Qualidade e Ambiente**

Professora Doutora Maria João Moreno

Setembro 2013

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Há seis anos que a caminhada começou, quatro deles envolvida no projecto que apresento. Nem sempre o percurso foi fácil, em muitos momentos a vontade de desistir foi maior que a de continuar, mas não existe sucesso sem trabalho, e muitas vezes a força para continuar vem dos que nos são mais próximos e que estão sempre presentes.

Desta forma, não poderia deixar de agradecer às pessoas que de uma maneira ou de outra me ajudaram a construir este caminho que chega agora ao fim.

À Prof. Dra. Maria João Moreno, minha orientadora de estágio, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela disponibilidade, pelo apoio, pelo incentivo demonstrados e pela paciência ao longo de todo este percurso. Obrigada por me ensinar que em investigação, apesar de passarmos metade do tempo frustrados, no final do trabalho a recompensa é tão boa e o sentimento de realização tão grande, que vale sempre a pena todo o esforço.

À Prof. Dra. Maria Ermelinda Eusébio, obrigada pela paciência e por estar sempre disponível para me ensinar e para me ajudar no meu trabalho.

Aos meus colegas de grupo, ao Hugo e ao Filipe, mas principalmente ao Renato pela ajuda sempre que foi necessário, pelos conselhos, pela paciência.

Aos meus amigos, por serem a minha segunda família, a família que eu escolhi, por estarem ao meu lado tanto nos bons como nos maus momentos, por não me deixarem baixar os braços, mesmo quando a vontade era disso mesmo, por me incentivarem sempre a continuar. Sem o vosso apoio tudo tinha sido mais difícil.

Por fim, o meu maior agradecimento vai para o meu pai Nuno, a minha mãe Maria e o meu irmão Nuno. Obrigada é pouco para tudo o que fizeram por mim, desde sempre. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando eu não sabia qual era o caminho, obrigada por me protegerem, obrigada por confiarem em mim e nas minhas capacidades, mesmo quando eu já não confiava, obrigada por chorarem as minhas lágrimas e por festejarem as minhas vitórias. Obrigada por me darem a oportunidade de uma vida.

Índice Geral

Índice de Figuras	I
Resumo	V
Abstract	VII
Abreviaturas	IX

Capítulo I - Introdução

1. Biomembranas: Estrutura e Composição.....	1
1.1 A importância das biomembranas na unidade estrutural básica da vida: Modelos.....	1
1.2 Lípidos constituintes da membrana.....	3
1.3 Efeito hidrofóbico: Formação da bicamada lipídica	6
1.4 Formação de vesículas e lipossomas	7
1.4.1 Lipossomas	9
2. Dinâmica e Fluidez Membranar.....	11
2.1 Dinâmica Membranar	11
2.2 Estado físico das membranas	12
2.2.1 Coexistência de fases	14
2.3 Colesterol e o seu efeito em membranas	16
2.4 Anfífilas fluorescentes na bicamada: TMA-DPH e NBD-DMPE ...	17
3. Trealose	19
3.1 Estrutura e relevância biológica.....	19
3.2 Trealose em bicamadas lipídicas	20

Capítulo II – Material e Métodos

1. Material	25
1.1 Reagentes	25
1.2 Soluções Tampão.....	26
1.3 Equipamento	26

2. Métodos	27
2.1 Preparação de LUVs por extrusão	27
2.2 Análise da concentração de lípido nos LUVs	28
2.2.1 Quantificação de Fosfato nos LUVs	29
2.2.2 Quantificação de Colesterol nos LUVs	29
2.2.2.1 Preparação de amostras hidratadas com tampão HEPES com trealose para a quantificação de fosfato nos LUVs.....	30
2.3 Anisotropia de fluorescência	31
2.4 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	35
2.5 Tempos de vida de fluorescência	36

Capítulo III – Resultados e Discussão

1. Estudo da anisotropia o TMA-DPH e do NBD-DMPE em diferentes bicamadas lipídicas.....	41
1.1 Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em diferentes fracções molares de DMPC:DSPC, em tampão HEPES	41
1.2 Efeitos de ocupação molecular nas propriedades temotrópicas de uma bicamada com transição de fase sólido-líquido (DMPC:DSPC)...	46
1.3 Efeitos de ocupação molecular nas propriedades termotrópicas de uma bicamada com transição de fase sólido – líquido desordenado – líquido ordenado (SpM:Chol)	52
1.4 Efeitos de ocupação molecular numa bicamada POPC:SpM	55
2. Tempo de vida de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC, SpM e POPC, hidratado com tampão HEPES com e sem trealose	59
3. Ensaio preliminares de DSC	63
 Conclusão	 67
Referências Bibliográficas	69
Anexos	75

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular de diferentes glicerofosfolípidos. Adaptado de Moran et al, 2011

Figura 2. Estrutura molecular da Esfingomiéline. A estrutura foi desenhada utilizando o software chemdraw.

Figura 3. Estrutura molecular do Colesterol. A estrutura foi desenhada utilizando o software chemdraw.

Figura 4. Diferentes tipos de agregados, podem ser formados pelos diferentes parâmetros críticos de empacotamento. Adaptado de Hiemenz e Rajagopalan, 1997.

Figura 5. Esquema representativo dos diferentes lipossomas: GUV, MLV, LUV e SUV. Adaptado de Segota et al, 2006.

Figura 6. Representação dos diferentes modos de difusão dos lípidos numa bicamada: **(a)** Dinâmica vibracional dos lípidos; **(b)** Modo de difusão rotacional; **(c)** Modo de difusão translacional; **(d)** Modo de difusão transversal. Adaptado de Yeagle, 2004.

Figura 7. Representação das diferentes fases em que as membranas se podem encontrar. Adaptado de Gennis, 1988.

Figura 8. (a) Diagrama de fases (binário) da mistura DMPC:DSPC, onde é possível observar as diferentes fases da bicamada. Adaptado de Pokorny, 2001, depois de Mabrey, 1976 e Knoll 1981. **(b)** Diagrama de fases (ternário) da mistura POPC:PSM:Chol. Adaptado de Almeida et al, 2003.

Figura 9. Estrutura molecular da sonda fluorescente TMA-DPH. Esta sonda apresenta um comprimento de onda de excitação de 356nm e de emissão de 425 nm. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

Figura 10. Estrutura molecular da sonda fluorescente NBD-DMPE. Esta sonda apresenta um comprimento de onda de excitação de 450nm e um comprimento de onda de emissão de 530nm. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

Figura 11. Estrutura molecular da Trealose, dissacarídeo não redutor de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

Figura 12. Diagrama de Jablonski.

Figura 13. Esquema do dispositivo para medição da despolarização da luz fluorescente.

Figura 14. Factor G do NBD-DMPE em diferentes ambientes em função do comprimento de onda.

Figura 15. Gráficos de fluorescência de DMPC:TMA-DPH e DMPC:NBD-DMPE antes e depois das experiências de anisotropia, em tampão HEPES com e sem trealose.

Figura 16. (a) Estrutura Molecular do DMPC. **(b)** Estrutura Molecular do DSPC. Estas estruturas foram desenhadas utilizando o software Chemdraw.

Figura 17. Diagrama de fases da mistura DMPC:DSPC, onde se pode observar as diferentes fases da bicamada lipídica, consoante a fracção molar em que se encontra cada um dos lípidos e a temperatura. Adaptado de Pokorny, 2001, depois de Mabrey 1976 e Knoll, 1981.

Figura 18 Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES e respectivas curvas de ajuste com uma distribuição normal e uma recta. Primeira e segunda derivada das curvas de ajuste, onde se pode observar T_i , T_m e T_f da transição.

Figura 19. Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES, e respectivas curvas de ajuste com duas distribuições normais. Primeira e segunda derivada das curvas de ajuste, onde se pode observar T_i , T_m e T_f da transição.

Figura 20. Diferentes T_i , T_m e T_f para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC com a sonda NBD-DMPE E TMA-DPH em tampão HEPES.

Figura 21. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em tampão HEPES com e sem trealose em diferentes fracções molares de DMPC:DSPC e respectivas curvas de ajuste utilizando duas distribuições normais.

Figura 22. T_m high, T_m low, T_i e T_f obtidas para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC, com sonda TMA-DPH e NBD-DMPE em tampão HEPES com e sem trealose.

Figura 23. Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES com e sem trealose e respectivas curvas de ajuste, para diferentes razões sonda:lípido.

Figura 24. Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC, em tampão HEPES (♦) e em tampão HEPES com trealose (◆) a 30°C, em função do tempo.

Figura 25. Diagrama de fases SpM:Chol. Os pontos representados foram determinados por anisotropia de fluorescência do DPH (●), por *quenching* do DPH por 5-NS (■) e por dados já obtidos e relatos na literatura (◆). Adaptado de Almeida et al., 2003.

Figura 26. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em SpM, em tampão HEPES com e sem trealose e respectiva curva de ajuste utilizando duas distribuições normais.

Figura 27. Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em tampão HEPES com e sem trealose em diferentes frações molares de SpM:Chol e respectivas curvas de ajuste.

Figura 28. Representação das T_m e T_i obtidas em tampão HEPES com e sem trealose para as misturas de SpM:Chol com NBD-DMPE e TMA-DPH.

Figura 29. Estrutura molecular do POPC. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

Figura 30. Diagrama de fases POPC:SpM MLV. Os dados experimentais são mostrados nos círculos e a linha ponteadada é hipotética. Adaptado de Almeida, 2003.

Figura 31. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em diferentes frações de POPC:SpM em tampão HEPES com e sem trealose e respectivas curvas de ajuste, utilizando duas distribuições normais.

Figura 32. Diferentes tempos de vida e pré-exponenciais em função da temperatura (°C).

Figura 33. Curvas de DSC LUV 100nm de DSPC, com diferentes concentrações e diferentes massas.

Figura 34. Curvas de DSC de MLV e LUV 100nm de DSPC com a mesma concentração e diferentes massas.

Figura 35. Curvas de DSC LUV 100nm DSPC em tampão HEPES com e sem trealose.

Figura 36. Curvas de DSC LUV 100nm DMPC em tampão HEPES com e sem trealose.

Figura 37. Curvas de DSC LUV 100nm DSPC, DSPC:TMA-DPH e DSPC:NBD-DMPE em tampão HEPES.

Resumo

A célula, considerada como a unidade estrutural e funcional da vida, é constituída por diferentes organelos, cada um com uma função específica. A membrana biológica tem especial relevância, uma vez que envolve todos os organelos constituintes da célula.

A membrana é constituída por diversos fosfolípidos, que se encontram organizados na sua unidade estrutural básica, a bicamada lipídica. Esta estrutura, do ponto de vista físico, desempenha um papel crucial na organização e funcionalização das células, define compartimentos, limitando o exterior e o interior da célula, bem como todas as comunicações entre estes dois meios. A membrana pode ser mais ou menos permeável, consoante o estado em que se encontre. Podem existir vários tipos de fases na membrana, a fase gel, a que possui maior organização, a fase líquida cristalina ou líquida desordenada, e a fase líquido ordenado, que só existe na presença de colesterol. Sob condições apropriadas uma bicamada lipídica pode existir numa destas fases ou como uma mistura de fases coexistentes.

No citoplasma da célula, existem elevadas concentrações de pequenas moléculas, macromoléculas e estruturas supramoleculares. Neste meio, uma fracção significativa de moléculas de água está envolvida em solvatação, não se comportando como água “bulk”. Este meio é geralmente descrito como uma solução com “ocupação molecular”.

Um agente que pode gerar ocupação molecular é a trealose, um dissacarídeo não redutor, sintetizado por diversos organismos sob condições de stress. O papel dos agentes de ocupação molecular na estabilização da estrutura nativa de proteínas está bem documentado bem como a sua importância na preservação das biomembranas em condições de desidratação e/ou temperaturas muito baixas. O efeito nas propriedades das membranas em condições de hidratação e temperaturas normais tem, no entanto, sido pouco estudado.

Neste trabalho, avaliaram-se os efeitos de ocupação molecular, gerados pela trealose em condições de excesso de água, nas propriedades termotrópicas de diferentes bicamadas lipídicas, nomeadamente na viscosidade e no comportamento de fase. Foram estudadas membranas formadas por: DMPC:DSPC, SpM:Chol e POPC:SpM (em diferentes fracções molares). Os efeitos na interface e na zona hidrofóbica da membrana foram caracterizados através de anisotropia de fluorescência em função da temperatura do NBD-DMPE e do TMA-DPH, respectivamente. Foi observado um aumento na largura da

transição de fase, indicando estabilização da coexistência de fases devido à presença de trealose 1M na solução aquosa. Este efeito é particularmente relevante para membranas com coexistência de fase líquido desordenado-sólido.

Para complementar os resultados obtidos por anisotropia de fluorescência, mediu-se ainda os tempos de vida de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC, SpM e POPC, a várias temperaturas e em tampão HEPES com e sem trealose e começaram-se ensaios preliminares de calorimetria diferencial de varrimento para avaliar o papel da sonda na membrana.

Abstract

The cell is considered as a structural and functional unity of life, consists of individual organelles with a specific function. The biological membrane has a special relevance, since it involves all the organelles of the cell.

The membrane is composed of several phospholipids, which are arranged in its basic structural unit, the lipid bilayer. This structure plays a crucial role in the organization and functionalization of the cells, define compartments, limiting the exterior and interior of the cell, and all communication between these two media. The membrane could be more or less permeable depending on the state it is found. There may be various phases in the membrane, the gel phase, the one that has more organization, the liquid crystalline phase or liquid disordered, and the liquid ordered phase, which only exists in the presence of cholesterol. Under appropriated conditions a lipid bilayer can exist in one of these phases or as a mixture of coexisting phases.

In the cell cytoplasm, there are high concentrations of small molecules, macromolecules and supramolecular structures. In this way, a significant fraction of water molecules are involved in solvation not behaving as water bulk. This medium is generally described as a solution with molecular crowding.

One common agent of molecular crowding is trehalose, a non-reducing disaccharide, synthesized by various organisms under stress conditions. The role of crowding agents in stabilizing the molecular structure of native proteins are well known as well as its importance in the preservation of biomembranes in conditions of dehydration and/or very low temperatures. However the effect on the properties of the membranes under hydration conditions and normal temperatures has been the subject of few studies and is not well characterized.

In this work, we have evaluated the molecular crowding effects, generated by trehalose under excess water conditions, on the thermotropic properties of different lipid bilayers, namely the viscosity and phase behavior of DMPC:DSPC, SpM:Chol and POPC:SpM (in different molar ratios). The effects at the membrane interface and hydrophobic core were characterized by fluorescence anisotropy as a function of temperature using NBD-DMPE and TMA-DPH, respectively. It is observed a significant increase in the width of the phase transition indicating stabilization of phase coexistence by 1M trehalose in the

aqueous solution. This effect is particularly relevant for membranes with coexistence of liquid-disordered and solid phases.

To complement the results obtained by fluorescence anisotropy, it was also measured the lifetimes of NBD-DMPE in POPC, SpM and DSPC at several temperatures in HEPES buffer with and without trehalose. Preliminary tests using DSC, were done to evaluated the role of the probe on the membrane.

Abreviaturas

CAC – Concentração de agregação crítica

Chol – Colesterol

DMPC – 1,2 – dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfaticilcolina

DPH – difenilhexatrieno

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento

DSPC – 1,2 – distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético

GUV – Vesículas unilamelares gigantes

HEPES – 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-ácido etanosulfúrico, N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfúrico)

l_d – Fase líquido desordenada

l_o – Fase líquido ordenada

LUV - Vesículas unilamelares grandes

MLV – Vesículas multilamelares

NBD - 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il

NBD-DMPE – 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il- dimiristoil- fosfatidil - etanolamina

PC – Fosfatidilcolina

PE – Fosfatidiletanolamina

PG – Fosfatidilglicerol

POPC – 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

PS – Fosfatidilserina

P_{β} – Fase *ripple*

s_o – Fase gel ou sólida

SpM – Esfingomielina

SUV – Vesículas unilamelares pequenas

T_f – Temperatura final de transição

T_i – Temperatura inicial de transição

T_m – Temperatura de transição

TMA-DPH – trimetilamónio-difenihexatrieno

Capítulo I

Introdução

1. Biomembranas: Estrutura e Composição

As membranas biológicas são tão diversas na sua estrutura como no seu funcionamento. Estas estruturas dinâmicas constituídas essencialmente por lípidos e proteínas, desempenham um papel importante na estruturação e no funcionamento das células, a unidade estrutural da vida.

Neste capítulo, estará exposto o desenvolvimento teórico necessário para a compreensão deste trabalho.

1.1 A importância das biomembranas na unidade estrutural da vida: modelos

A teoria celular postula que, apesar das diferenças quanto à forma e função, todos os seres vivos têm em comum o facto de serem formados por uma (unicelulares) ou mais células (pluricelulares), sendo esta designada como a unidade estrutural, funcional, reprodutora, hereditária e de desenvolvimento dos seres vivos. Cada célula realiza todas as funções fundamentais dos seres vivos: reproduz-se, cresce, alimenta-se, move-se e reage aos estímulos externos.

Considerando a sua organização e complexidade estrutural, as células podem ser consideradas como procarióticas, as células mais simples, não possuem invólucro nuclear, não têm organelos celulares individualizados, ou têm um número muito reduzido de organelos celulares, e o material genético encontra-se disperso no citoplasma. As células eucarióticas, têm uma organização estrutural complexa, com vários organelos individualizados.

As células, são comumente constituídas por pequenas moléculas que pertencem a quatro classes: os açúcares, os aminoácidos, os nucleótidos e os ácidos gordos. Estas moléculas associam-se formando macromoléculas e estruturas supramoleculares, e cada uma dessas macromoléculas e dessas estruturas supramoleculares irá estar responsável por uma ou mais funções da célula.

Uma das estruturas supramoleculares que se forma e que tem especial importância na célula são as membranas lipídicas, estas são a estrutura celular mais abundante em

toda a matéria viva, já que são o modo de encapsulação eleito pela natureza, compartimentando a matéria viva e protegendo o material genético. É na membrana, ou através desta que se dão muitos dos processos mais importantes da célula como o transporte, crescimento, resposta imunológica, actividade enzimática (Mouritsen, 2005).

A membrana, é actualmente, definida como uma estrutura fina, tipicamente plana que separa dois ambientes, sendo considerada como um sistema semipermeável e selectivo, contudo, ao longo do tempo, várias foram as hipóteses para a constituição e funcionalização das membranas.

O primeiro modelo a surgir foi o de Gorter e Grendel (1925), já por esta altura a ideia de uma membrana semi-permeável e não polar era considerada, estes propuseram pela primeira vez o arranjo em bicamada, que ainda hoje é considerada como a unidade estrutural básica de todas as membranas biológicas. Gorter e Grendel previram que se uma membrana plasmática fosse realmente uma bicamada, então a sua superfície deveria ser metade da superfície ocupada por todos os seus lípidos distribuídos numa monocamada. Mais tarde, este pressuposto foi dado como incompleto, não sendo a conclusão original invalidada.

Para colmatar as falhas apresentadas pelo modelo anterior, Danielli e Davson (1935), apresentaram um novo modelo, no qual, postularam que as proteínas contactavam com a parte polar da bicamada cobrindo-a dos dois lados. Apesar de ter de sofrer algumas adaptações como, por exemplo, para explicar a passagem de moléculas hidrófilas através da membrana, este modelo estático foi aceite e utilizado durante vários anos, até ao aparecimento do modelo do mosaico fluido, concebido por Singer e Nicolson (1972).

Singer e Nicolson postularam que a membrana, organizada em bicamada, é uma estrutura dinâmica e fluida sobre a qual se encontram distribuídas moléculas proteicas, podendo estas ser intrínsecas (atravessam toda a membrana) ou extrínsecas (apenas interagem superficialmente com a membrana). As proteínas têm funções bastante específicas na membrana, funcionando como meio de passagem, por exemplo, para alguns iões. Na parte externa da membrana encontram-se glícidos ligados quer à cabeça dos fosfolípidos (glicolípidos), quer às proteínas (glicoproteínas) (Loura e Almeida, 2004). Este modelo prevê liberdade lateral e rotacional e uma distribuição ao acaso, dos componentes moleculares na membrana.

Contudo, a evidência de que os complexos de proteínas eram construídos hierarquicamente, dificultando a difusão das mesmas na membrana, e a existência de domínios na membrana, chamados “rafts”, contradizem o modelo apresentado por Singer e Nicolson.

Por isso mesmo, três décadas depois, Vereb surge com um novo modelo, que tem como objectivo colmatar as falhas e explicar algumas lacunas que o modelo antigo detinha. Através de uma série de experiências, utilizando as mais variadas técnicas, Vereb construiu um novo modelo em que enfatiza a colocação, a mobilidade e a distribuição não aleatória de um grande número de moléculas da superfície da célula. Este modelo defende que a mobilidade de proteínas é restrita devido à segregação de domínios lipídicos, porém a distribuição em mosaico mencionada por Singer e Nicolson mantém-se. As proteínas são frequentemente acomodadas por rafts e organizadas segundo interacções acima, dentro ou abaixo da membrana celular e a localização das proteínas na membrana pode ser determinada através da sequência de aminoácidos que a caracteriza, já que esta vai determinar a interacção lípido-proteína.

As proteínas passam então, a ter um papel igualmente importante na determinação dos constituintes, na estrutura e na dinâmica de domínios lipídicos (Vereb, 2003).

1.2 Lípidos constituintes da membrana

Uma das características mais marcantes das membranas lipídicas é a sua enorme diversidade ao nível da composição lipídica. A razão para tanta diversidade ainda não está clara, embora haja uma crescente noção das múltiplas funções dos lípidos nas membranas. Certamente, que a maior função dos lípidos na membrana é formar a bicamada lipídica matriz, unidade estrutural de todas as membranas biológicas, com a qual as proteínas interagem.

Os lípidos constituintes da membrana, apresentam duas regiões com solubilidades distintas, o que faz com que estes se afirmem como moléculas anfifílicas, ou seja possuem uma parte hidrofílica (polar), solúvel em água e restantes solventes polares, que fica em contacto com a solução aquosa exterior e uma parte hidrofóbica, solúvel em solventes apolares, que fica virada para a parte interior da bicamada (Gennis, 1988).

Estes agregam-se essencialmente devido ao efeito hidrofóbico, que irá ser discutido na secção seguinte.

A membrana pode ter mais de 100 lípidos distintos na sua composição. As principais famílias de lípidos são: os fosfolípidos que estão divididos em glicerofosfolípidos, que são considerados os lípidos mais abundantes na membrana, derivam do fosfato de glicerol, o que faz com que possuam um carbono assimétrico, e em esfingofosfolípidos, que diferem dos glicerofosfolípidos no grupo hidrófobo, que neste caso é a ceramida; os glicolípidos, que são glicósidos de 1,2-diacilgliceróis, extremamente raros em animais; e os esteróis, que são moléculas compactas, rígidas, hidrofóbicas com um grupo polar hidroxil, dos quais se destaca o colesterol.

Os glicerofosfolípidos são derivados do *sn*-glicero-3-ácido fosfórico, com dois ácidos gordos esterificados na posição *sn* 1 e 2 do glicerol. A cabeça do fosfolípido pode ter diferentes cargas eléctricas, dependendo do grupo polar que se liga ao glicerol, através de uma ligação fosfodiéster. É também a presença deste grupo polar que determina a nomenclatura dos fosfolípidos, se for uma colina, tem-se a fosfatidilcolina (PC), se for uma etanolamina, a fosfatidiletanolamina (PE), se for uma serina, a fosfatidilserina (PS), (Figura 1), se for um glicerol, tem-se a fosfatidilglicerol (PG). A PC, é considerada o maior componente das membranas celulares animais, e a PE predomina nas membranas celulares de bactérias, têm carga negativa no fosfato e carga positiva no álcool polar, possuindo assim, um carácter zwitteriónico. As cadeias acil, que podem ser saturadas ou insaturadas, têm normalmente entre 14 a 24 carbonos, sendo as cadeias mais comuns com 16, 18 e 20 carbonos, e as cadeias insaturadas mais comuns as 18:1,18:2, 18:3 e 20:4. Nesta notação, o primeiro termo refere-se ao tamanho da cadeia enquanto o segundo é o número de ligações duplas (Yeagle, 2004; Gennis, 1998).

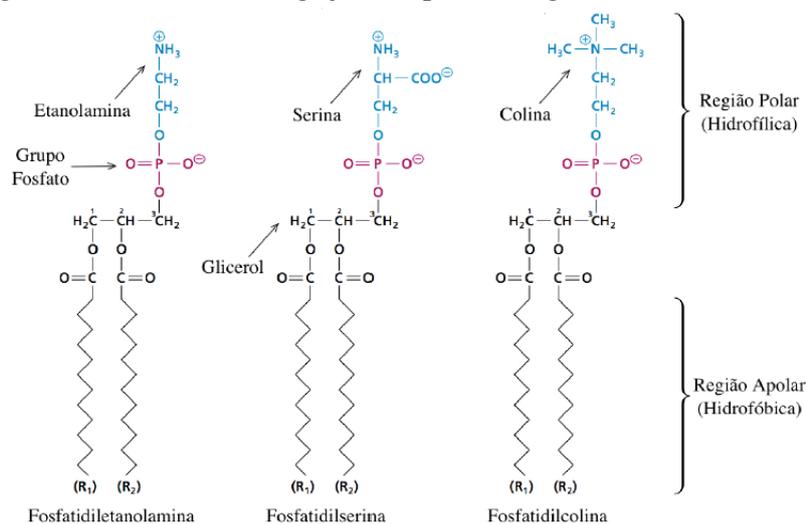


Figura 1. Estrutura molecular de diferentes glicerofosfolípidos. Adaptado de Moran et al, 2011.

Os esfingolípídeos são similares aos glicerofosfolípídeos, já que contêm os mesmos substituintes polares que os glicerofosfolípídeos, mas o seu grupo hidrofóbico é uma ceramida, que é uma molécula formada pela união de dois ácidos gordos com uma serina, a união desta última a um dos ácidos gordos forma um amino álcool chamado esfingosina.

A maior parte dos esfingolípídeos que ocorrem naturalmente, possuem cadeias acilo muito mais longas que as PCs. Os esfingolípídeos são ainda caracterizados por terem uma grande disparidade no comprimento das suas cadeias, o que pode levar à interdigitação entre as cadeias acilo das duas monocamadas que fazem a bicamada, afectando a curvatura da mesma. Devido a esta particularidade, os esfingolípídeos são potenciais candidatos na introdução de heterogeneidade lateral e imiscibilidade numa membrana.

Um esfingolípídeo essencial na estrutura das membranas do tecido nervoso é a esfingomiéline (SpM) (Figura 2). Esta tem similaridades estruturais com a fosfatidilcolina, mas tem propriedades físicas e biológicas diferentes, sendo originada pela união da ceramida à fosforilcolina. (Gennis, 1988, Barenholz, 1999).

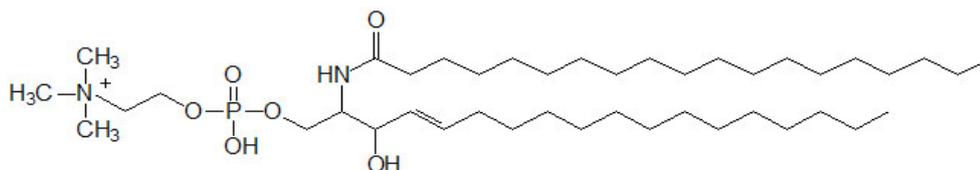


Figura 2. Estrutura molecular da Esfingomiéline. A estrutura foi desenhada utilizando o software chemdraw.

Os glicolípídeos são análogos dos esfingolípídeos, mas a sua região polar é constituída por um ou mais açúcares que se ligam ao glicerol através de uma ligação glicosídica (Stryer, 1998).

Os esteróis são estruturalmente diferentes dos lípidos apresentados anteriormente, estes são moléculas compactas, com uma região hidrofóbica rígida, formada por vários anéis, com cadeia lateral e características estruturais periféricas variáveis. O esterol mais abundante em membranas celulares animais é o colesterol (Chol) (Figura 3), cujo grupo polar é um hidroxilo, constituindo cerca de 30% da massa das membranas biológicas animais (Gennis 1988; Yeagle, 2004).

O colesterol tem uma grande influência nas propriedades físico-químicas das membranas, devido às suas particularidades enquanto lípido.

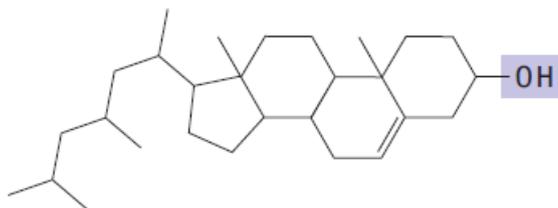


Figura 3. Estrutura molecular do Colesterol. A estrutura foi desenhada utilizando o software chemdraw.

Existem ainda uma pequena quantidade de lípidos que constituem as membranas, mas em proporções muito menores que os mencionados anteriormente, como os ácidos gordos livres e os lisofosfolípidos.

1.3 Efeito hidrofóbico: formação de membranas biológicas

A estrutura das moléculas nas quais a vida está fundamentada, como é o caso das proteínas, ácidos nucleicos, glícidos e lípidos, são uma consequência directa das suas interacções com o meio aquoso.

A molécula de água possui propriedades muito singulares, que lhe permitem ser considerada como o mais importante e abundante fluido na Terra, tendo um papel preponderante na nossa sobrevivência (Dill, 2005).

As particularidades da água como solvente provêm tanto da sua polaridade como das ligações de hidrogénio que formam. A água é similar aos líquidos simples, no que toca a interacções de Van Der Waals, esta torna-se mais interessante devido à sua habilidade em formar ligações intermoleculares de hidrogénio. Quando associadas, as moléculas de água orientam-se num arranjo tetraédrico, tendo a molécula de água central uma estrutura aberta, o que vai ser uma consequência directa para que a densidade da água líquida seja maior que a do gelo a 0°C.

A água é chamada, muitas vezes, de solvente universal, contudo a veracidade desta afirmação pode ser questionada.

Devido à diferença de electronegatividade entre o Hidrogénio e o Oxigénio, a molécula de água possui um momento dipolar diferente de zero, o que faz dela uma molécula polar.

Assim, a água irá ser um excelente solvente para materiais polares e iónicos (hidrofílicos), e as substâncias apolares (hidrofóbicas) serão praticamente insolúveis em água (Voet, 2006).

Na presença de água, as moléculas anfifílicas, como é o caso dos lípidos, organizam-se espontaneamente, num arranjo que lhes permita interagir favoravelmente com o ambiente em que se encontram. Assim que os lípidos interagem com a água, as moléculas desta organizam-se em volta das regiões apolares, diminuindo o número de microestados. Como esta organização é desfavorável para o sistema, este reage de modo a aumentar o número de microestados, e conseqüentemente, aumentando a entropia. Assim, as moléculas adoptam uma conformação que minimize o contacto entre a zona apolar dos lípidos e a água.

Na origem dos agregados lipídicos estão diversas forças estabilizadoras, como forças de Van Der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos e ligações de hidrogénio entre as cabeças polares dos fosfolípidos. Contudo, o maior parâmetro termodinâmico estabilizador dos agregados lipídicos é o chamado efeito hidrofóbico (Gennis, 1988; Tanford, 1991).

1.4 Formação de vesículas e lipossomas

Como foi referido na secção anterior, os lípidos têm tendência a agregar-se quando se encontram em solução aquosa sobretudo devido ao efeito hidrofóbico, de modo a reduzir o contacto da sua região apolar com a água, reduzindo assim a energia livre de Gibbs. Geralmente, este fenómeno acontece acima de uma determinada concentração, a chamada concentração de agregação crítica (CAC). Os fosfolípidos, apresentam uma CAC na ordem dos nanomolar (nM) ou inferior, devido essencialmente às suas extensas cadeias acilo (Vaz, 2008).

As moléculas anfifílicas em solução aquosa, acima da CAC e consoante a sua estrutura, podem formar diferentes tipos de agregados, como micelas, micelas invertidas, monocamadas, bicamadas lipídicas, lipossomas.

A dimensão de um agregado lipídico é determinada por vários factores, como o tamanho da cabeça polar, o comprimento da cadeia acil do fosfolípido, o grau de

insaturação da cadeia acil. Estes factores geométricos que se têm em conta são extremamente afectados pela temperatura do meio onde estão inseridos.

A forma do fosfolípido é importante para determinar a sua habilidade em formar e participar num agregado. Quanto maior o afastamento à forma cilíndrica da molécula lipídica, menos estável será a bicamada que esta incorporará, podendo dar alguma curvatura à bicamada, positiva ou negativa, consoante o lípido se encontre na forma de cone ou cone invertido, respectivamente. A geometria das moléculas lipídicas em solução aquosa, como uma medida da sua capacidade para se encaixar num determinado agregado lipídico, é descrita pelo parâmetro crítico de empacotamento (P):

$$P = \frac{v}{a \cdot l}$$

onde (v) é o volume molecular das cadeias acilo, (a) a área ocupada pela superfície polar e (l) o comprimento máximo (Mouritsen, 2005).

Na figura 4, estão representados os diferentes tipos de agregados que se podem formar, segundo o parâmetro crítico de empacotamento.

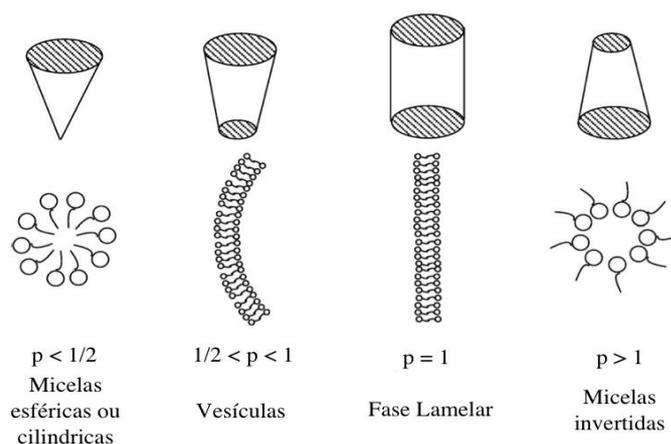


Figura 4. Diferentes tipos de agregados, podem ser formados pelos diferentes parâmetros críticos de empacotamento. Adaptado de Hiemenz e Rajagopalan, 1997.

Para formar uma bicamada estável, os lípidos que a formam devem apresentar uma curvatura próxima de zero, ou seja, o balanço entre a região apolar e polar da molécula é semelhante.

1.4.1 Lipossomas

Quando se forma uma bicamada, os extremos desta vão estar expostos à solução aquosa onde a mesma se encontra, tornando a sua estrutura instável, já que uma fracção da parte hidrofóbica do agregado lípido passa a estar em contacto com a solução aquosa. Para minimizar a instabilidade da bicamada, esta tem tendência a formar espontaneamente uma estrutura esférica designada de lipossoma (Lehninger et al, 1997).

Os lipossomas são considerados como estruturas vesiculares, que se compõem de várias bicamadas formando uma serie de coroas esféricas concêntricas, que no seu interior têm um compartimento intra vesicular de água.

Estes podem ser classificados de diferentes maneiras: vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares gigantes (GUV) (Figura 5).

As vesículas multilamelares (MLV) apesar de serem bastante fáceis de preparar, o seu uso em estudos fotofísicos é bastante limitado devido à elevada dispersão de luz que estas estruturas causam. No seu interior, estas contêm várias bicamadas, sendo difícil saber qual a concentração de lípido em cada uma dessas bicamadas.

A partir dos MLV, por extrusão, método abordado na secção 2.1, podem ser preparadas vesículas unilamelares. Consoante o tamanho do poro dos filtros de policarbonato por onde os MLV passam, pode-se então obter: SUV, cujo diâmetro varia de 20 a 50 nm e LUV, com diâmetro entre 50 – 500 nm (Loura e Almeida, 2004). Os GUV, com um diâmetro compreendido entre 5 a 300 μm , não são obtidos por extrusão.

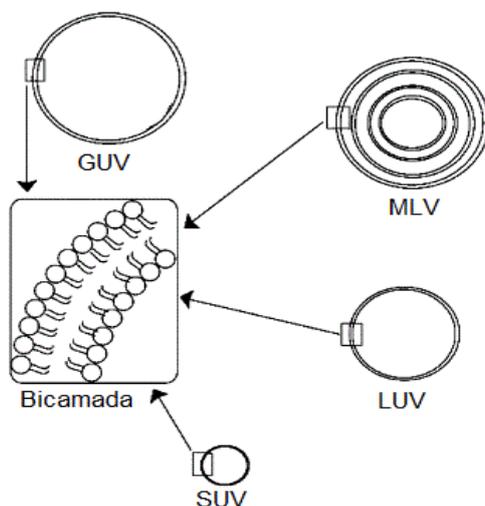


Figura 5. Esquema representativo dos diferentes lipossomas: GUV, MLV, LUV e SUV. Adaptado de Segota et al, 2006.

Os estudos em membranas celulares nativas são de extrema importância. Actualmente, este estudo é feito, maioritariamente, por vesículas unilamelares compostas por uma bicamada fechada, de dimensões controláveis e propriedades vantajosas.

No caso deste estudo, para obter uma reprodução fidedigna das bicamadas lipídicas, prepararam-se LUVs com o lípido ou misturas de lípido alvo.

2. Dinâmica e Fluidez Membranar

A ideia das membranas biológicas como estruturas estáticas, foi há muito modificada com a postulação do modelo do mosaico fluído, por Singer e Nicholson em 1972, e reforçado com as postulações de Vereb (2003) (secção 1.1).

O estado físico das membranas é caracterizado pelo perfil da ordem dos movimentos da bicamada. O movimento dos fosfolípidos será mais restrito na região das cadeias hidrocarbonadas mais próximas do glicerol, e terá mais liberdade de movimento nas extremidades das cadeias acilo.

Neste subcapítulo será discutida a dinâmica e a fluidez membranar de uma forma mais pormenorizada, através do estudo do comportamento dos fosfolípidos na bicamada e o efeito que o colesterol pode ter numa bicamada lipídica.

2.1 Dinâmica membranar

A bicamada lipídica é definida como sendo uma estrutura extremamente dinâmica, sobretudo devido às interacções que os lípidos constituintes da mesma podem ter entre eles.

As propriedades dinâmicas da membrana dependem de vários factores como a temperatura, pressão, hidratação, a estrutura e a quantidade de espécies de lípidos envolvidas, e podem ser divididas em quatro categorias: conformacional, rotacional, translacional e transversal (Vaz, 2008).

A dinâmica de um fosfolípido pode ser caracterizada por um vasto leque de modos de movimento que ocorrem em escalas de tempo distintas, podendo estas ir dos fentossegundos a dias, e todos contribuem para as propriedades dinâmicas da membrana.

Os fosfolípidos das bicamadas possuem dinâmica vibracional (figura 6a) que ocorre numa escala de tempo dos fento aos nanosegundos, estes são caracterizados por movimentos intramoleculares como oscilações vibracionais e torcionais em torno das ligações simples C-C (10^{-12} s), isomerização *trans/gauche* (10^{-10} s) e rotações axiais (Moore et al., 2001).

A difusão rotacional dos lípidos (Figura 6b), ocorre numa escala de tempo dos 10^{-9} a 10^{-7} s, e é caracterizada por movimentos giratórios ao longo da normal e do eixo vertical da bicamada.

Os modos de difusão translacional (Figura 6c) possuem um coeficiente de difusão de $10^{-8}/10^{-7}$ cm^2/s e ocorrem no plano da bicamada (Jovin e Vaz, 1989).

O modo de difusão transversal (Figura 6d), é um processo que tem uma barreira de energia associada muito elevada, já que implica a passagem de um fosfolípido de uma monocamada para outra, o que faz com que a sua velocidade seja menor e, por isso, ocorre numa escala de tempo maior, de 10^2 a 10^4 s (Moreno et al, 2006). Este movimento é comumente conhecido como flip-flop.

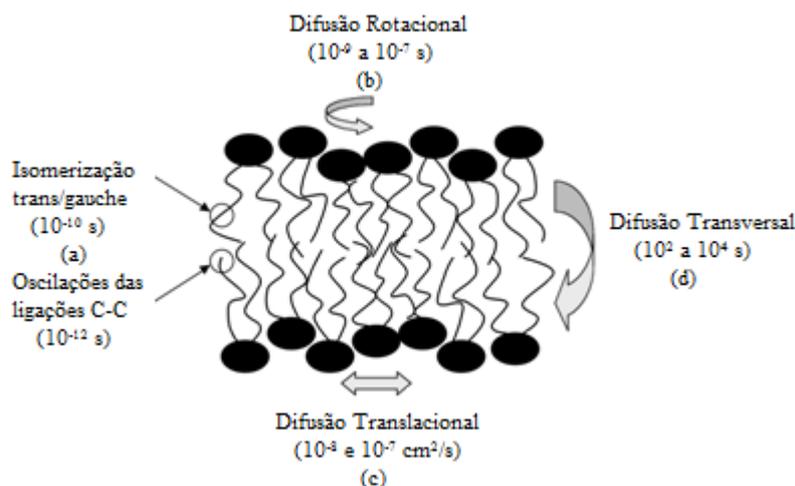


Figura 6. Representação dos diferentes modos de difusão dos lípidos numa bicamada: (a) Dinâmica vibracional dos lípidos; (b) Modo de difusão rotacional; (c) Modo de difusão translacional; (d) Modo de difusão transversal. Adaptado de Yeagle, 2004.

2.2 Estado físico das membranas

A fluidez das membranas é introduzida muitas vezes como sendo o inverso da viscosidade. Na realidade, a fluidez das membranas deve ser interpretada como a medida da viscosidade dos constituintes da membrana durante os processos dinâmicos da mesma. Os parâmetros de ordem, os tempos de correlações entre as moléculas embutidas na membrana e as ligações moleculares entre as moléculas que constituem as membranas, bem como a taxa de difusão lateral, a permeabilidade da membrana a solutos

e a solventes, e as temperaturas de transição de fase da matriz lipídica, podem ser demonstrados por um aumento ou diminuição da fluidez da membrana (Yeagle, 2004).

Uma bicamada em excesso de água, dependendo da temperatura, pode-se encontrar em dois tipos de fases, na fase gel (menos fluida) ou na fase líquida (mais fluida).

Na fase gel, muitas vezes chamada de fase sólida-ordenada (Figura 7), os lípidos constituintes da bicamada apresentam uma razão conformacional *trans/gauche* elevada, as cadeias acilo estão completamente distendidas (conformação *trans*) e vão ficar perpendiculares ao plano da bicamada (fase s_o). Nesta fase, as bicamadas são caracterizadas por um grau de ordem conformacional, rotacional e translacional elevados, sendo a espessura da bicamada máxima.

Com o ligeiro aumento de temperatura, as interações de Van Der Waals entre as cadeias acilo que favorecem o empacotamento cristalino vão, progressivamente, ficando mais fracas. Devido à excitação rotacional, induzida termicamente nas cadeias acilo, dão origem a uma fase em que as cadeias acilo se encontram ligeiramente inclinadas em relação ao plano, fase $L_{\beta'}$. A inclinação é interpretada como o resultado de a área das cabeças do fosfolípido, ser ligeiramente maior que a área das duas cadeias acilo.

O aumento da temperatura é directamente proporcional ao aumento da taxa de rotação das cadeias acilo e, na temperatura de pré-transição de fase, os fosfolípidos constituintes da bicamada passam da fase $L_{\beta'}$ para a chamada fase *ripple*, ou fase $P_{\beta'}$ (Figura 7).

Na fase *ripple*, as cadeias acilo das PC mantêm-se inclinadas em relação à normal do plano da bicamada, contudo passam a comportar-se como se fossem rotacionalmente simétricas. Na interface da bicamada, nota-se um aumento substancial da área ocupada pelas cabeças do lípido, devido ao deslocamento de cada molécula de lípido ao longo do eixo longitudinal. Este aumento, faz com que as moléculas possam rodar quase livremente, embora o grau de hidratação não apresente alterações.

Quando a temperatura a que esta está sujeita se encontra acima da temperatura de transição de fase do lípido (T_m), a bicamada passa a estar na fase fluida ou líquida cristalina (l_d) (Figura 7).

A fase fluida (l_d) pode ser caracterizada como sendo o contrário da fase gel, as suas cadeias acilo são caracterizadas por uma conformação *trans/gauche* baixa. À medida que as cadeias acilo fundem, há uma redução do comprimento das mesmas,

passando estas a apresentar flexão e rotação rápida, há ainda uma expansão lateral da bicamada, traduzida num aumento acentuado da área da secção transversal desta (Heimburg, 1998; Yeagle, 2004; Vaz, 2008;).

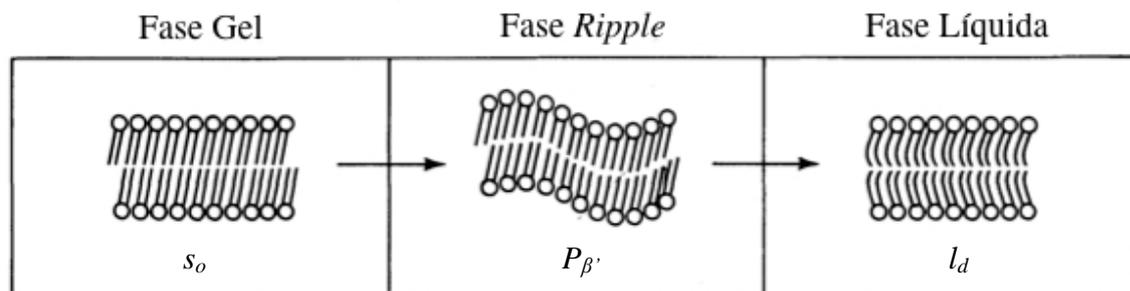


Figura 7. Representação das diferentes fases em que as membranas se podem encontrar. Adaptado de Gennis, 1988.

As transições de fase são a maior parte das vezes induzidas pela temperatura, sendo denominadas de transições de fase termotrópicas. A temperatura de transição de fase depende, essencialmente, do tamanho, do grau e do tipo (cis- ou trans-) de insaturação das cadeias acilo do lípido que constitui a bicamada.

Para lípidos, cuja cabeça seja homóloga e as cadeias hidrocarbonadas idênticas, a T_m aumenta uniformemente com o aumento do comprimento da cadeia acil. Normalmente, os lípidos possuem uma cadeia saturada e uma insaturada com uma ou mais ligações duplas carbono-carbono que, consoante a sua posição irão afectar a T_m do lípido, tornando-a mais baixa do que a T_m de um lípido homólogo com as duas cadeias saturadas (Vaz, 2008).

Quando a bicamada lipídica é constituída por uma mistura binária ou ternária de lípidos, pode existir coexistência de fases, para além disso, na fase gel, os lípidos constituintes da bicamada, têm tendência a serem imiscíveis entre si, criando domínios na membrana, enquanto que na fase fluida isso não acontece, os lípidos são quase totalmente miscíveis entre si.

2.2.1 Coexistência de fases em bicamadas lipídicas

Quando existe mais do que um tipo de lípido na bicamada, o comportamento desta será claramente, mais complexo. Deixará de haver uma transição bem definida, caracterizada por uma temperatura específica e passará a haver uma gama de temperaturas, onde o sistema se separa em mais do que uma fase, existindo desta forma, coexistência de fases na bicamada. Usualmente, os lípidos tendem a agregar-se junto aos

da sua espécie, excluindo os restantes, que também se irão agregar aos da sua espécie, criando assim vários domínios na membrana

A coexistência de fases é uma importante propriedade física das membranas, que depende dos lípidos dominantes da bicamada e da fracção de massa destes em relação à bicamada. Quando existe coexistência de fases, uma das fases é perclorativa, ou seja é fisicamente contínua, enquanto que a outra é descontínua ou dispersa em domínios isolados na bicamada, sendo designada como não perclorativa. Estas duas fases podem-se interconverter, caso haja uma mudança físico-química nas propriedades da membrana, sendo as mais relevantes a pressão lateral, a temperatura a que a membrana se encontra e a composição química da mesma.

Em sistemas em que há coexistência de fases, a energia livre do sistema é descontínua na interface entre as fases. Esta descontinuidade resulta da tensão interfacial que conduz o sistema para uma minimização da interface.

Se a tensão interfacial for suficientemente larga, espera-se que as fases que coexistem, se separem em domínios macroscópicos com a menor separação superficial possível entre elas, no equilíbrio.

A separação e coexistência de fases podem ser observadas em diagramas de fase dos lípidos (Figura 8) (Feigenson, 2006; Vaz, 2008).

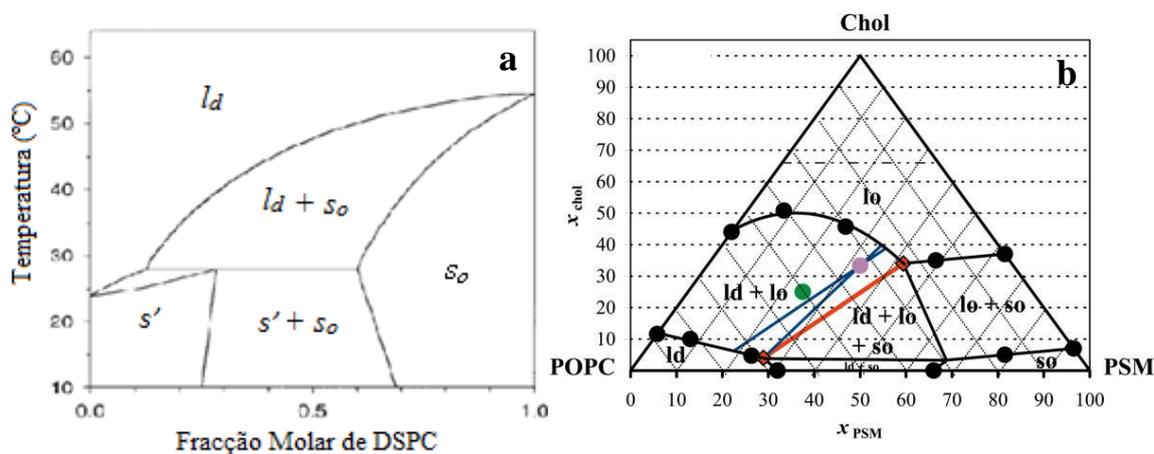


Figura 8. (a) Diagrama de fases (binário) da mistura DMPC:DSPC, onde é possível observar as diferentes fases da bicamada. Adaptado de Pokorny, 2001, depois de Mabrey, 1976 e Knoll1 1981. (b) Diagrama de fases (ternário) da mistura POPC:PSM:Chol. Adaptado de Almeida et al, 2003.

A construção de um diagrama de fase é muito delicada, sendo necessários estudos envolvendo variadas técnicas, como difracção raio X, fluorescência, DSC, entre outros, para se obter resultados concordantes e fidedignos de serem apresentados.

Um lípido que influencia bastante o estado físico da membrana, bem como a coexistência de fases da bicamada e merece especial atenção é o colesterol.

2.3 Colesterol e o seu efeito em membranas

O colesterol, o esteroide mais abundante em membranas biológicas de células animais, tem um duplo efeito nestas, já que este lípido, torna a membrana mais rígida, quando esta se encontra na fase fluida, contudo mantém a fluidez requerida pela mesma, quando esta se encontra na fase gel.

Este esteroide, devido à sua estrutura hidrofóbica rígida em anel, tem preferência por ter as cadeias acilo dos lípidos adjacentes ordenadas conformacionalmente, favorecendo as interações entre as moléculas. Se por um lado se pode afirmar que o colesterol tem uma maior afinidade pela fase sólida-ordenada. Por outro lado, a fase sólida-ordenada, é uma fase cristalina caracterizada por um empacotamento denso entre as moléculas lipídicas. Como o colesterol tem um tamanho e forma muito peculiar, não se encaixa bem nesta ordem de empacotamento, o que remete para que a fase líquida-desordenada, seja a fase de eleição do colesterol.

Desta forma, conclui-se que a introdução de colesterol, irá destabilizar a membrana, independentemente da fase em que esta se encontre.

Então, para que haja equilíbrio do sistema aquando da introdução de colesterol no meio, admitiu-se uma nova fase, com características tanto da fase fluida como da fase gel, denominada fase líquida-ordenada (*lo*). Esta fase é caracterizada por apresentar desordem posicional e alta mobilidade lateral das moléculas da membrana. As cadeias hidrofóbicas têm um certo grau de ordem conformacional.

Na fase fluida, a introdução de colesterol faz com que a espessura da bicamada aumente, o que origina uma diminuição na difusão translacional dos fosfolípidos, tornando a membrana menos flexível. Na fase gel, acontece o contrário, ou seja a presença de colesterol, induz uma diminuição na espessura da bicamada devido à diminuição da ordem conformacional (McMullen et al., 2004; Mouritsen, 2005; Feigenson, 2006).

2.4 Anfifilas fluorescentes na bicamada: trimetilamônio-difenilhexatrieno e 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il-dimiristoil- fosfatidil - etanolamina

As sondas de fluorescência são fluoróforos extrínsecos inseridos no sistema membranar a estudar, e são frequentemente utilizados em estudos de alteração da ordem da membrana e da sua fluidez, já que apresentam dinâmicas rotacionais diferentes no estado excitado para diferentes ambientes lipídicos (Loura et al, 2003).

Os fluoróforos, são geralmente moléculas hidrofóbicas ou anfifílicas, e a interpretação do seu comportamento depende, em larga escala, da sua localização na bicamada lipídica (Sousa et al, 2008).

No caso específico do trimetilamônio - difenilhexatrieno (TMA-DPH) e do 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il- dimiristoil- fosfatidil - etanolamina (NBD-DMPE), estas anfifilas fluorescentes, localizam-se em partes distintas da membrana, reportando assim o comportamento de diferentes zonas da mesma.

O difenilhexatrieno (DPH) e derivados, como é o caso do TMA-DPH (Figura 9) que é um análogo catiónico do DPH devido ao grupo trimetilamônio (TMA), são muitas vezes escolhidos para estudar a estrutura e propriedades dinâmicas da membrana, pois estas sondas têm uma polarização (anisotropia) sensível em resposta à ordem dos fosfolípidos.

Os derivados do DPH encontram-se na região da cadeia acilo da bicamada, estando a uma distância do meio da bicamada de 6-11 Å (Kaiser e London, 1998). De acordo com esta localização membranar, o TMA-DPH permite monitorizar alterações na membrana, a uma distância correspondente entre C₁₀-C₁₄ a partir da interface água/membrana (Santanela e Vierling, 1999).

A localização dos derivados de DPH na membrana pode ser explicada por várias propriedades deste. A primeira é o facto de o DPH ser um grupo bastante hidrofóbico, o que faz com que se espere que a sua localização seja na parte hidrofóbica da membrana, a segunda é o facto de o DPH possuir uma longa cadeia C-C e a terceira propriedade é a sua forma de bastonete que permite que o DPH se ”empacote” bem com a cadeia acil do fosfolípido (Kaiser e London, 1998). O grupo TMA possui carga positiva, por isso, irá ter uma maior afinidade com a cabeça polar do fosfolípido, ficando situado na interface

da membrana. A posição deste grupo enfatiza ainda mais o facto de o grupo DPH se orientar na cadeia de fosfolípidos.

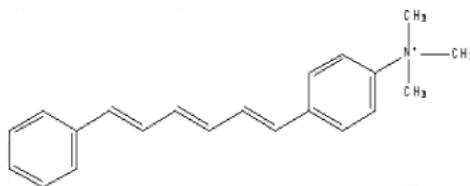


Figura 9. Estrutura molecular da sonda fluorescente TMA-DPH. Esta sonda apresenta um comprimento de onda de excitação de 356nm e de emissão de 425 nm. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

No caso do NBD-DMPE (Figura 10), o grupo fluorescente, grupo 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD), aparece localizado a 19-20 Å do centro da bicamada, ou seja, o fluoróforo interage favoravelmente como a cabeça polar do fosfolípido (Abrams e London, 1993).

O NBD é um grupo fluorescente, que devido ao facto da sua fluorescência apresentar uma acentuada dependência com a polaridade do meio, este tem vindo a ser utilizado no estudo de diferentes propriedades das membranas biológicas, como a fluidez, a dinâmica e a permeabilidade (Cardoso et al, 2010).

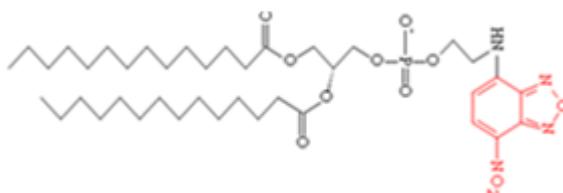


Figura 10. Estrutura molecular da sonda fluorescente NBD-DMPE. Esta sonda apresenta um comprimento de onda de excitação de 450nm e um comprimento de onda de emissão de 530nm. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

As sondas de fluorescência permitem avaliar qualitativamente as alterações globais da fluidez da membrana mas, a interpretação directa dos resultados experimentais deve ser feita com muito cuidado, já que as alterações na fluidez da bicamada podem não ser uniformes em toda a membrana e a sonda, poderá influenciar os resultados, comportando-se como uma impureza (Ferreira et al, 2005).

Para a realização deste trabalho utilizaram-se ambas as sondas apresentadas anteriormente, com o objectivo de caracterizar as bicamadas em estudo tanto na região das cadeias acilo como na interface com a água.

3. Trealose

A classe mais abundante de moléculas biológicas são os sacarídeos, cuja unidade básica são os monossacarídeos, que resultam de um processo elementar, denominado como gliconeogénese. Estes unem-se formando dissacarídeos e polissacarídeos (Voet, 2006).

Neste subcapítulo serão discutidas algumas propriedades da trealose, um dissacarídeo que pode ser facilmente encontrado na natureza.

3.1 Estrutura e propriedades

A trealose (Figura 11) (α,α - trealose, α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -Dglicopiranosídeo) é um dissacarídeo formado pela ligação 1 \rightarrow 1 de duas moléculas de D-glucose na conformação α (Birch, 1963; Cordone, 2006). Este dissacarídeo é classificado como não redutor, pois os seus hidroxilos anoméricos encontram-se envolvidos numa ligação glicosídica forte.

A combinação da sua estrutura molecular e das suas propriedades físico-químicas fazem com que a trealose seja um dissacarídeo bastante estável.

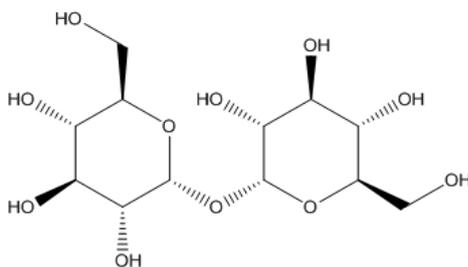


Figura 11. Estrutura molecular da Trealose, dissacarídeo não redutor de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

Em 1832, H.A. Wiggers reportou pela primeira vez a presença de trealose, enquanto estudava soluções da cravagem do centeio, a partir daqui, houve sempre um estudo crescente sobre este dissacarídeo e o modo como este podia ser obtido. Elbein sumariou todos os organismos em que a presença de trealose foi notada, obtendo um total de cerca de 80 espécies, como por exemplo plantas, algas, fungos, leveduras, bactérias, insectos e outros invertebrados.

Estas espécies biosintetizam trealose através de um mecanismo catalizado por enzimas, que facilitam a reacção da UDP-D-glucose com D-glucose-6-fosfato, produzindo α,α -trealose-6-fosfato, que é depois removida enzimaticamente, ficando apenas a molécula de trealose, que pode ser degradada por uma enzima específica, a trealase (Elbein, 1974).

Em certos organismos, a trealose funciona como fonte de energia em vários estados da vida dos mesmos, noutros como um intermediário metabólico e em organismos que sobrevivem em condições extremas de desidratação e congelamento, a trealose tem uma função estabilizadora e de protecção.

Um estudo de modelação molecular de trealose em solução aquosa, sugere que esta protege as estruturas biológicas durante a desidratação e/ou congelamento, substituindo a quantidade de água associada a estas estruturas, o que pode ajudar a estabilizar e inibir a desnaturação irreversível destas biomoléculas. Ou seja, a trealose tem uma certa tendência para solvatar, sobretudo em relação a outros dissacarídeos, já que este açúcar tem a habilidade de alternar entre a forma di-hidratada e anidra, sem sofrer alterações de estrutura (Donnamaria et al., 1994).

A trealose, devido a propriedades já enunciadas anteriormente, como a sua ligação glicosídica estável, e a sua resistência à hidrólise, é um dos açúcares mais estável e inerte quimicamente. Este dissacarídeo tem ainda outras propriedades que devem ser ressaltadas, como a sua solubilidade, similar à da maltose, é estável numa gama ampla de pH e suporta bem oscilações de temperatura (Richards et al., 2001).

3.2 Trealose em bicamadas lipídicas

O espaço intra celular, entre a membrana plasmática e o invólucro nuclear, em seres eucariontes, é denominado por citoplasma. Este é preenchido por matéria semi-fluida e homogénea denominado hialoplasma. Dispersos no hialoplasma, é possível encontrar elevadas concentrações de pequenas moléculas, macromoléculas e estruturas supramoleculares. Neste meio, uma fracção significativa das moléculas de água está envolvida em solvatação não se comportando como água “bulk”. Este meio é geralmente descrito como uma solução com “ocupação molecular”. A estrutura e dinâmica das macromoleculas e estruturas supramoleculares resultam de um elevado número de forças

fracas, tais como forças electrostáticas e efeito hidrófobo, sendo estas fortemente afectadas pelas propriedades da água e dependentes da disponibilidade reduzida da água devido à “ocupação molecular”. A modelação das interacções moleculares que ocorrem no interior de uma célula tem assim que ser efectuada em condições de “ocupação molecular”.

Os efeitos de “ocupação molecular” podem ser gerados por açúcares, como a trealose ou a maltose.

Segundo as propriedades já citadas da trealose, e como a trealose tem uma função estabilizadora sob condições extremas como é o caso da desidratação, este açúcar é introduzido no citoplasma da célula, de forma a estabilizar proteínas intracelulares e membranas, que se encontrem nestas condições (Crowe, 2007).

O papel estabilizador dos açúcares em membranas desidratadas está já bem estabelecido, tendo já sido propostos vários mecanismos que envolvem a formação de matrizes vitrificadas devido à interacção directa entre açúcares e lípidos.

Tem vindo a ser sugerido que a fluidez da membrana aumenta com a presença de carboidratos. Durante o processo de desidratação, sabe-se que a fosfatidilcolina passa à fase gel a temperaturas em que normalmente estaria na fase fluida (aumenta a densidade de empacotamento das cabeças polares, aumenta as interacções de Van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas) (Chapman et al, 1967). Este efeito provocaria a separação lateral entre fosfolípidos e destes com as proteínas, induzindo a uma destabilização na estrutura da membrana. As transições e separações de fase não se observam em membranas desidratadas na presença de trealose (Crowe et al, 1984).

Outros trabalhos apresentam evidências de que certos açúcares podem substituir a água que rodeia as cabeças polares dos fosfolípidos e as proteínas das membranas, formando pontes de hidrogénio com estes e mantendo assim a integridade dos mesmos na ausência de água. A trealose é extremamente eficaz na substituição de moléculas de água quando as bicamadas são desidratadas drasticamente (Crowe et al, 1984 a,b; Crowe et al, 1987).

O efeito da trealose em lipossomas também foi estudado. Estes podem ser preservados no estado seco se forem dissecados na presença de dissacarídeos, tendo aplicação imediata na área farmacêutica como possíveis transportadores de fármacos (Crowe and Crowe, 1995). A trealose promove a vitrificação destes sistemas, fazendo com que não haja fusão dos lipossomas.

Apesar de em membranas desidratadas o efeito da trealose ser já conhecido e esteja bem determinado, o efeito deste sacarídeo em membranas hidratadas ainda não está bem caracterizado, o que justifica a realização do trabalho aqui apresentado.

Capítulo II

Materiais e Métodos

1. Materiais

Nesta secção, são apresentados os reagentes e equipamentos utilizados, para a realização deste estudo.

1.1 Reagentes

- Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich, lote no. 25564-100G; ref. 50-81-7);
- Ácido Perclórico (70%) (Sigma-Aldrich, lote no. BCBD6143; ref. 7601-90-3);
- Ácido Acético Glacial (Panreac, lote no. 0000212445; ref. 131008.1211);
- Ácido Sulfúrico (Absolve, ref. 73-30-45);
- Anidrido Acético (Panreac, lote no. 0000239970; ref. 131147.1611);
- Azida de Sódio (Fluka, lote no. 419515/1; ref. 20301);
- Clorofórmio (99.8%) (Sigma-Aldrich, lote no. 47796DM; ref. 67-66-3);
- Cloreto de Sódio (Sigma-Aldrich, lote no. 074K0097; ref. 57653);
- Cromossulfúrica (Riedel-de-Haen, lote no. 61810; ref. 2240);
- EDTA (Baker Analysed, lote no. 9534010010; ref. 60-00-4);
- HEPES (Sigma-Aldrich, lote no. 027K5436; ref. 7365-45-9);
- Hidróxido de Sódio (Baker Analysed, lote no. 9601550002; ref. 1310-73-2);
- Metanol (99.9%) (Sigma, lote no. 21109P03; ref. 67-56-1);
- Molibdato de Amónio (BDH, lote no. 6315650; ref. 27187);
- Trealose (Sigma-Aldrich, lote no. 011M7000V; ref. 6138-23-4)
- 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) (Avanti, lote no. 140PC-180; ref. 850345)
- 1,2-dioctadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC) (Avanti, lote no. 180PC-90; ref. 850365)
- Esfingomiéline (SpM) (Avanti, lote no. ESM-105; ref. 180294);
- Colesterol (Chol) (Avanti, lote no. CH-57);
- 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) (Avanti, lote no. 160-181PC-192; ref. 207902);

- Trimetilamônio-difenilhexatrieno (TMA-DPH) (Sigma-Aldrich, lote no. 115534-33-3);
- 1,2-Dimiristoil- *sn* – glicero-3-fosfatidiletanolamina – N- [7-nitro-2- 1,3-benzoxadiazol -4-il] (Avanti, lote no. F181NBD PE-16; ref. 810145)

1.2 Soluções tampão

As soluções tampão desempenham um papel fundamental no equilíbrio de alguns sistemas biológicos, estas têm como função atenuar a variação de pH do meio que estão a hidratar.

Neste caso específico utilizaram-se dois tipos de solução tampão:

- Solução tampão HEPES, preparada através de uma mistura de HEPES (10 mM), azida de Sódio (0.02% m/v), cloreto de sódio (15 mM) e EDTA (1 mM), o pH foi ajustado a 7.4 adicionando hidróxido de sódio.
- Solução tampão HEPES com trealose 1 M, análoga à solução tampão HEPES, sendo esta preparada através de uma mistura de trealose (1 M), HEPES (10 mM), azida de sódio (0.02% m/v), Cloreto de Sódio (15 mM) e EDTA (1 mM), o pH foi acertado a 7.4 adicionando Hidróxido de Sódio.

1.3 Equipamento

- Calorímetro de potência compensada, Perkin-Elmer Pyris 1
- Espectrômetro de Fluorescência VarianCary Eclipse com banho peltier, polarizador automático e suporte de quatro células;
- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic Unicam UV 500;
- Extrusor Lipex Biomembranes;
- Medidor de pH Jenway 3510;

2. Métodos

Segue-se a descrição dos vários métodos utilizados para a realização deste trabalho.

2.1 Preparação de LUVs por extrusão

Para que haja uma reprodução fidedigna das bicamadas lipídicas, preparam-se LUVs com o lípido ou misturas de lípido que são objectivo de estudo.

Preparou-se previamente soluções stock contendo os lípidos de interesse, neste caso, 1,2 – dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2 – distearoil–sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC), SpM, Chol e 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), através da sua dissolução numa mistura azeotrópica de Clorofórmio:Metanol (87:13 (v/v)). Às soluções finais dos lípidos foi adicionado o volume pretendido do stock de sonda em metanol. A concentração destas foi determinada recorrendo ao seu espectro de absorção, considerando o $\epsilon=21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\lambda=450 \text{ nm}$, para o NBD-DMPE e $\epsilon=80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\lambda=356 \text{ nm}$, para o TMA-DPH.

Recorrendo aos stocks de lípido em mistura azeotrópica retirou-se um volume, de acordo com a concentração final desejada, dos lípidos de interesse, deixou-se equilibrar durante 30 minutos para o caso de uma mistura de dois lípidos, sendo que para composições mais complexas o tempo de equilíbrio foi aumentado (15 minutos por cada componente acrescentado). Após o equilibrar da solução evaporou-se o solvente recorrendo a um fluxo de ar quente que incidia através da parte externa do tubo de ensaio. Durante este processo a solução foi mantida sob constante agitação por intermédio de um vortex e sob um fluxo continuado de azoto. O filme contendo os lípidos de interesse foi colocado num exsiccador sob vácuo por um período de tempo entre 6 a 12 horas.

O filme é hidratado com solução tampão HEPES com e sem trealose, e colocado num banho que esteja a uma temperatura de pelo menos 10°C acima da temperatura de transição de fase do lípido ou da mistura de lípidos, para que a bicamada se encontre na fase fluida e a extrusão seja assim facilitada.

No caso específico, para a hidratação dos resíduos, utilizaram-se dois solventes, tampão HEPES com e sem trealose, pH 7.4, de forma a obter a concentração pretendida conforme a experiência a realizar.

A solução foi agitada pontualmente até à total dissolução do filme, de forma a obter uma suspensão de vesículas multilamelares, procedendo-se então à extrusão das MLVs. É essencial um mínimo de 10 passagens no extrusor Lipex Biomembranes, através de dois filtros de policarbonato, com poros de diâmetro 100 nm, e deve-se, pelo menos agitar a suspensão nas 5 primeiras passagens e na última.

Após a extrusão, procedeu-se ao *annealing* da amostra, aquecimento e arrefecimento lento da amostra cerca de 20°C acima e abaixo da temperatura de transição dos lípidos, da mistura, principalmente se estes forem constituídos por mais de um lípido.

Através deste método foram preparados LUVs de DMPC:DSPC 0.1 mM, nas proporções 0:100, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30, 80:20 e 100:0 com NBD-DMPE 1 µM e TMA-DPH 1 µM, LUVs SpM:Chol 0.1 mM, nas proporções 100:0, 90:10, 80:20 e 50:50 com NBD-DMPE 1 µM e TMA-DPH 1 µM, LUVs POPC:SpM 0.1 mM, nas proporções 100:0, 75:25, 50:50 e 25:75 com NBD-DMPE 1 µM e TMA-DPH 1 µM em tampão HEPES com e sem trealose, utilizados nas experiências de anisotropia de fluorescência e na medição de tempos de vida.

Procederam-se ainda à preparação de LUVs de DSPC 25 mM puro e com NBD-DMPE 0.25 mM e TMA-DPH 0.25 mM, DMPC em tampão HEPES com e sem trealose, para se proceder às experiências de DSC.

2.2 Análise da concentração de Lípido nos LUVs

Um processo de extrusão mais prolongado pode levar à perda de lípido, o que faz com que a concentração final da amostra seja alterada, deste modo a sua quantificação é essencial.

Procedeu-se então, à quantificação dos fosfatos em solução, a partir do método descrito por Bartlett (Bartlett, 1958) e à quantificação do colesterol, descrita por Taylor (Taylor et al, 1978).

2.2.1 Quantificação de Fosfato nos LUVs

O método para quantificar o fosfato presente nas amostras de lípido foi modificado da sua versão original descrita por Bartlett (1958). Baseia-se na análise de fósforo através da redução do fosfomolibdato formando um complexo de cor azulada que absorve a um comprimento de onda de 700 nm.

Para a quantificação dos fosfatos é necessário a preparação prévia de soluções stock de K_2HPO_4 1 mM (solução A), molibdato de amónio 1% w/v (solução B) e ácido ascórbico 4% w/v (solução C).

Para obter uma curva de calibração é necessário pipetar em duplicado 0.0, 100, 150, 200, 250 e 300 μ L da solução A, para tubos de 20 mL. Das soluções de LUVs com concentração por definir, pipetou-se um determinado volume, para um tubo de 20 mL, de forma a que a concentração esperada estivesse no meio da curva de calibração.

Uma vez que o volume final de cada um dos tubos, nesta primeira parte da quantificação, deve ser de 300 μ L, perfaz-se o volume restante com água. De seguida, com uma pipeta de vidro, adicionaram-se 700 μ L de ácido perclórico a 70% e homogeneizaram-se as soluções utilizando o vortex, sendo estas finalmente, cobertas com berlindes e colocadas num banho seco a 190°C até um máximo de 2 horas.

Após o arrefecimento à temperatura ambiente, acrescentou-se 2 mL da solução B e 2 mL da solução C. Agitou-se de novo as soluções no vortex e incubou-se a 37°C por um período de tempo entre 1-2 horas.

A absorvância de cada tubo foi medida a 700 nm e a concentração final das amostras de interesse foi obtida com recurso à recta de calibração.

2.2.2 Quantificação de Colesterol nos LUVs

A determinação de colesterol em solução é baseada no método descrito por Taylor, Broccoli (1978). Esta, assenta na análise do grupo hidroxilo do colesterol que ao reagir com um reagente de Liebereman-Burchard aumenta a conjugação da insaturação do anel condensado adjacente, originando uma solução de cor verde, que absorve no comprimento de onda de 625 nm.

O reagente de Lieberman-Burchard é preparado juntando ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 35:55:10 (%v/v), respectivamente, à qual se adicionou 1% (m/v) de sulfato de sódio anidro, mantendo-se sempre a solução em gelo.

Para obter a curva de calibração é necessário pipetar em duplicado, 0, 20, 40, 60, 80 e 100 μL de uma solução stock de colesterol 2 mM em álcool isopropílico. Das soluções de LUVs é pipetado, em triplicado, um determinado volume, de maneira a que a concentração esperada esteja no meio da curva de calibração. O volume final de cada um dos tubos foi ajustado com álcool isopropílico, até 100 μL .

De seguida, adicionou-se 3 mL da solução de reagente de Lieberman-Burchard e incubou-se as soluções, num banho a 37°C, durante aproximadamente 20 min.

Após o tempo de incubação, mede-se a absorvância dos tubos a 625 nm. Como o produto final é fotossensível, os tubos de calibração devem ser lidos antes e depois das amostras a serem quantificadas, para que a taxa de degradação possa ser calculada e a leitura das amostras corrigida, de modo a que a concentração obtida seja a mais verdadeira possível.

2.2.2.1 Preparação de amostras hidratadas com tampão HEPES com trealose para a quantificação de fosfato nos LUVs

Quando as amostras estão hidratadas com tampão HEPES com trealose observou-se que o ácido perclórico reage com a trealose contida na solução tampão, formando uma solução de cor escura. Por este motivo, é necessário que a trealose seja removida da solução antes que a quantificação dos fosfatos seja feita. Para que tal aconteça é necessário passar a amostra por uma coluna R_p18.

Começa-se por se preparar uma coluna de 2,5 mL de volume após empacotada, com a fase estacionária composta por sílica modificada com grupos acilo e o eluente etanol. Antes de passar a amostra pela coluna é conveniente ressuspender a fase estacionária com etanol, permitindo que a coluna volte a empacotar enquanto o etanol é eluído. Com precisão e em pequenas quantidades foi-se mudando a polaridade do eluente adicionando água, de modo a que a fase móvel fosse integralmente composta por água. Após a passagem de 1 ou 2 ml de água e quando o seu nível estava bastante próximo da

fase estacionária (deixando secar por breves instantes), aplicou-se a amostra de LUVs em trealose (cerca de 250 μ l para uma solução de 1 mM).

De seguida adicionou-se cerca de 8 ml de água e esperou-se que estes eluíssem, depois adicionaram-se 6 ml de metanol em fracções de 1 ml, voltou-se a esperar que as fracções eluíssem quase totalmente, terminando de encher a coluna com metanol, tantas vezes como o necessário para recolher 30 ml do eluente da coluna.

Posteriormente, evapora-se o metanol usando um balão de fundo redondo. Ao filme formado, adicionam-se 3 vezes 1 ml de metanol, para “limpar”o balão. A solução obtida após a adição do primeiro ml de metanol é transferida para um tubo, seguida dos outros 2 ml de solução, para que a solução seja usada na quantificação do fosfato.

Os 3 ml de metanol devem ser evaporados da mesma forma que se prepara os filmes de lípido para a preparação de LUVs, descrita na secção 2.1.

O resto do procedimento é igual ao utilizado em quantificações de fosfato, descrito anteriormente.

Este procedimento nunca foi utilizado, pois ao quantificar o lípido sem trealose, obtiveram-se sempre resultados com um erro associado à concentração pretendida de 5-15%, por isso não foi necessário quantificar as amostras hidratadas com tampão trealose, uma vez que a preparação foi igual e portanto o erro seria muito aproximado.

2.3 Anisotropia de fluorescência

Uma molécula pode sofrer diversos processos de transição electrónica, consoante se absorve ou emite luz e se a transição é ou não permitida (Figura 12).

Após absorção de radiação, o sistema fica num estado excitado e para atingir de novo o equilíbrio esse excesso de energia tem de ser libertado. Esta energia pode ser libertada para o solvente sob a forma de calor (aumento da energia cinética do sistema) ou pode ser libertada sob a forma de um fóton (transições radiactivas). A transição radiactiva do estado singleto excitado para o estado singleto fundamental, sem alteração da multiplicidade de spin, denomina-se por fluorescência.

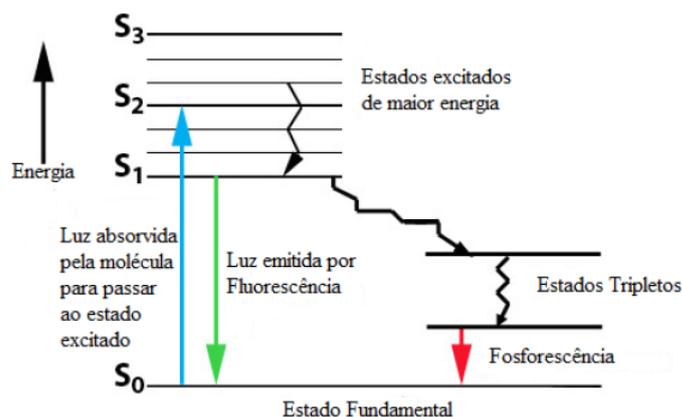


Figura 12. Diagrama de Jablonski.

No estudo de anisotropia de fluorescência (r), a luz de excitação é enviada ao longo do eixo dos xx com o vector eléctrico ao longo do eixo dos zz . Uma molécula hipotética está na origem dos eixos coordenados e tem o seu dipolo de transição de absorção com o ângulo θ em relação ao eixo dos zz . O ângulo γ é gerado entre o dipolo de transição de absorção e o dipolo de transição de emissão de fluorescência por parte da molécula. A fluorescência emitida é assim observada ao longo do eixo dos yy , onde é utilizado um polarizador linear para separar a intensidade dos vectores eléctricos paralelos (I_{\parallel}) e perpendiculares (I_{\perp}) ao vector eléctrico da luz de excitação (Figura 13).

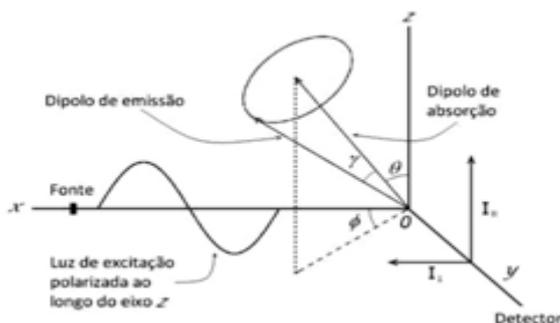


Figura 13. Esquema do dispositivo para medição da despolarização da luz fluorescente.

Os instrumentos possuem uma certa sensibilidade à luz polarizada, contudo essa sensibilidade não é igual quando a luz é polarizada vertical e horizontalmente. Por isso mesmo, torna-se indispensável definir o factor de sensibilidade geométrico, denominado por factor G (equação 1), já que as medidas obtidas experimentalmente serão afectadas por esta “deficiência” do aparelho.

$$G = \frac{S_{\parallel}}{S_{\perp}} \quad (\text{Equação 1})$$

S_{\parallel} designa a sensibilidade do aparelho para a luz polarizada verticalmente, e S_{\perp} a sensibilidade do aparelho para a luz polarizada horizontalmente.

A anisotropia de fluorescência pode depender de diversos factores, como, a orientação do dipolo de transição de emissão relativamente à orientação do dipolo de transição de absorção e a rotação molecular que ocorre durante o tempo de vida de fluorescência que, por sua vez, depende da viscosidade do solvente e do tamanho e forma da molécula. Assim, a luz fluorescente será parcialmente despolarizada.

A anisotropia (equação 2) é uma medida adimensional e independente da intensidade de luz total da amostra, uma vez que a diferença $I_{\parallel} - I_{\perp}$ é normalizada pela intensidade total, $I_T = I_X + I_Y + I_Z$ (que, quando a luz excitação é polarizada ao longo do eixo dos z , tem a radiação dipolar simétrica em torno desse eixo, pelo que $I_X = I_Y$ logo, $I_T = I_{\parallel} - (2G \cdot I_{\perp})$, isto é,

$$r = \frac{I_Z - I_Y}{I_X + I_Y + I_Z} = \frac{I_{\parallel} - (G \cdot I_{\perp})}{I_{\parallel} + (2G \cdot I_{\perp})} \quad (\text{Equação 2})$$

onde r designa a anisotropia (Lakowicz, 1999).

Procedimento experimental

Antes de se iniciar o estudo da anisotropia das diferentes amostras a diferentes temperaturas (rampas de temperatura), mediu-se às temperaturas de 20°C e 60°C, o factor de sensibilidade geométrica do equipamento à luz, com polarização vertical e horizontal (factor G). Como se pode observar no gráfico (Figura 14), o factor G não depende nem da temperatura, nem do solvente, apresentando apenas uma pequena variação com o comprimento de onda de emissão.

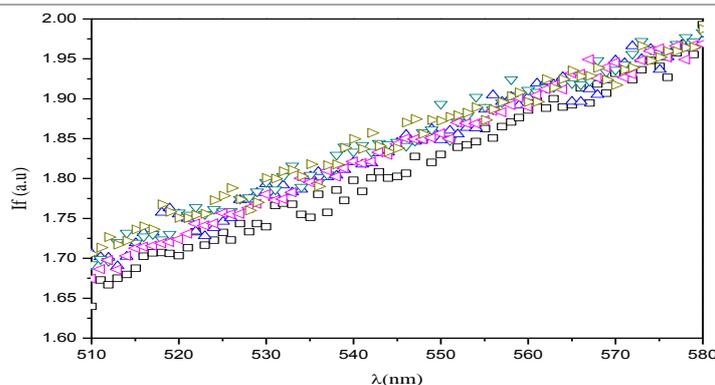


Figura 14. Factor G do NBD-DMPE em diferentes ambientes em função do comprimento de onda. Factor G, DMPC-DSPC (50:50) 0,1mM NBD-DMPE 1 μ M em tampão HEPES sem trealose, HEPES com trealose, em função do comprimento de onda, para as temperaturas de 20°C (Δ) (\triangleleft) e a 60°C (∇) (\triangleright), respectivamente. E NBD-DMPE em metanol a 20°C (\square).

Anterior e posteriormente a cada rampa de temperatura foi necessário medir o espectro de fluorescência das amostras para que se pudesse analisar a fotodegradação das sondas utilizadas, quando expostas a radiação intensa, durante um período de tempo considerável.

Quando nas experiências de anisotropia de fluorescência a sonda presente na solução foi o TMA-DPH, as rampas de temperatura das soluções com esta sonda foram feitas manualmente, de modo a que a exposição desta à luz fosse a menor possível, bem como a sua degradação, já que se trata de uma sonda sensível e de fácil fotodegradação (Figura 15a).

Quando a sonda presente na solução foi o NBD-DMPE, a rampa de temperatura foi feita automaticamente, pois a fotodegradação desta sonda é mínima (Figura 15b).

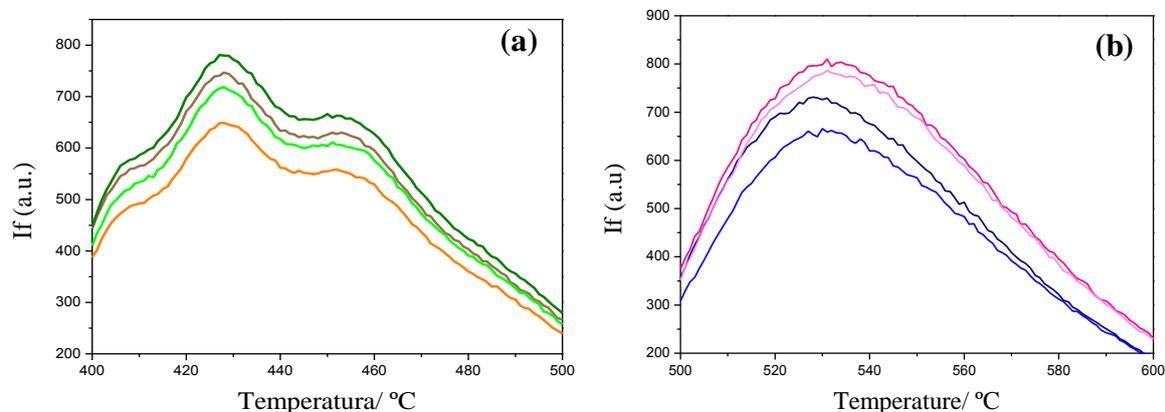


Figura 15. Gráficos de fluorescência de DMPC:TMA-DPH e DMPC:NBD-DMPE antes e depois das experiências de anisotropia, em tampão HEPES com e sem trealose. **(a)** Gráfico de fluorescência de DMPC:TMA-DPH em HEPES antes da experiência (—) e depois (—) e em trealose antes (—) e depois (—), da medição da rampa de temperatura. **(b)** Gráfico de fluorescência de DMPC:NBD-DMPE em HEPES antes da experiência (—) e depois (—) e em trealose antes (—) e depois (—), da medição da rampa de temperatura.

Após todas as considerações necessárias e relevantes, iniciaram-se as experiências de anisotropia de fluorescência, recorrendo a LUVs contendo uma razão sonda lípido 1:100 e 1:300, hidratadas com soluções tampão HEPES com e sem trealose. Estas foram equilibradas a uma determinada temperatura (temperatura de início de medição), independentemente do método utilizado, durante aproximadamente duas horas, evitando a agregação da sonda.

A medição da anisotropia de fluorescência foi feita utilizando um espectrómetro de fluorescência Varian Cary Eclipse com banho de Peltier, com polarizadores automáticos.

2.4 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de Varrimento é uma técnica de análise térmica, que mede a diferença de fluxo de calor para a amostra e para a referência, enquanto estas são submetidas a um programa de variação de temperatura controlado.

Estas medições dão-nos informações, quantitativas ou qualitativas, acerca de variações químicas ou físicas dos materiais, em processos exotérmicos (libertação de energia calorífica) ou endotérmicos (absorção de energia calorífica) (Brown, 2001).

De acordo com os seus princípios operacionais, os Calorímetros diferenciais de varrimento podem ser classificados em dois tipos: de potência compensada ou de fluxo de energia calorífica.

Nos calorímetros diferenciais de varrimento de potência compensada, as células onde se colocam a amostra e a referência encontram-se equipadas individualmente com um sensor de resistência, que mede a temperatura de cada uma, e uma resistência de aquecimento. Quando é detectada uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência devido a uma alteração da amostra, é adicionada energia térmica ($\partial H/\partial t$) a uma das células de modo a manter um diferencial de temperaturas nulo entre ambas ($T_{\text{amostra}} = T_{\text{ref}}$) (Hohne, 2003).

Procedimento experimental

Neste trabalho foi utilizado o calorímetro de potência compensada, Perkin-Elmer Pyris 1, com refrigeração ajustada a -25°C , (*intracooler* com circulação da mistura etilenoglicol : água 1:1 (v/v)).

O azoto, N50, foi utilizado como gás de purga com fluxo de 20 mL/min. Todas as amostras foram preparadas em cápsulas de alumínio de $50\mu\text{L}$, hermeticamente fechadas. Como referência foi utilizada uma cápsula igual, com tampão HEPES. A velocidade de varrimento das experiências foi sempre de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A massa da amostra e da referência variou entre 12 a 16 mg.

A calibração da temperatura foi efectuada com materiais de referência, nomeadamente, benzofenona (Metler Toledo, ME 18870), $T_{\text{fusão}} = (48,1 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$, bifenilo (CRM LGC 2610), $T_{\text{fusão}} = (68,93 \pm 0,03)^{\circ}\text{C}$ e índio (Perkin Elmer, $x = 99,99\%$, $T_{\text{fusão}} = 156,60^{\circ}\text{C}$), o qual foi também utilizado para calibração de entalpia ($\Delta_{\text{fus}}h = (3286 \pm 13) \text{J.g}^{-1}$) (Sabbah, et al, 1999).

2.5 Tempos de vida de fluorescência

O tempo de vida determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir ou se difundir no ambiente em que se encontra durante o estado excitado, correspondendo ao tempo ao fim do qual cerca de 63% das moléculas já transitaram para o estado de menor energia. Este é definido segundo a equação 3:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (\text{Equação 3})$$

onde k_r corresponde à constante radiativa e k_{nr} à constante não radiativa.

Este parâmetro possui muita informação sobre o ambiente em torno do fluoróforo e pode ser utilizado para seguir transformações, pois a velocidade de transição não radiactiva depende de colisões com o solvente, e vai depender directamente da temperatura a que o solvente se encontra, bem como da viscosidade do mesmo.

Pode-se ainda calcular o tempo de vida médio ($\langle\tau\rangle$) que, permite relacionar os tempos de vida das espécies fluorescentes (τ_1, τ_2) com os seus correspondentes pré-exponenciais (α_1, α_2), e é calculado de acordo com a equação 4: (Lacowicz, 1999)

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \quad (\text{Equação 4})$$

Procedimento experimental

No trabalho realizado, seleccionou-se a região de interesse e as curvas de decaimento de fluorescência foram construídas a partir dos fotões registados durante um intervalo de tempo após a excitação da molécula. As curvas de decaimento obtidas foram ajustadas como sendo a soma dos termos exponenciais, de forma a obter o tempo de vida de fluorescência do grupo NBD (equação 5),

$$F(t) = \sum_i \alpha_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (\text{Equação 5})$$

onde $F(t)$ é a intensidade de fluorescência no tempo t , e α_i é o factor pré-exponencial que representa a intensidade de decaimento de um componente com tempo de vida τ_i (Stockl, 2008).

As amostras utilizadas foram preparadas de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 2.1 deste capítulo, tendo sido usada uma concentração de lípido DSPC, SpM e POPC de 0.1mM e uma razão sonda:lípido de 1:100.

As amostras foram medidas a várias temperaturas, consoante as temperaturas de interesse retiradas dos resultados de anisotropia, e a um comprimento de onda de 530 nm.

Capítulo III
Resultados e Discussão

1. Estudo da anisotropia do TMA-DPH e do NBD-DMPE em diferentes bicamadas lipídicas.

1.1 Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em diferentes frações molares de DMPC:DSPC, em tampão HEPES

Tanto o DMPC (Figura 16a) como o DSPC (Figura 16b) são ambos glicerofosfolípidos cujo grupo polar é uma colina, a sua estrutura apenas difere no número de carbonos que constituem as cadeias acil de cada um, divergem quatro grupos metileno um do outro. A região apolar do DMPC é constituída por duas cadeias acil saturadas, cada uma com 14 carbonos, enquanto que as cadeias acil do DSPC são constituídas por 18 carbonos. A discrepância no comprimento das cadeias acil faz com que as temperaturas de transição destes lípidos sejam diferentes, pois as interações de Van der Waals são menores entre as cadeias com menor número de carbonos, o que faz com que a energia necessária para promover a transição da fase gel para a fase líquida seja menor (secção 2.2 do capítulo I), sendo a T_m do DMPC de 24°C e a do DSPC de 55°C (Gennis, 1988).

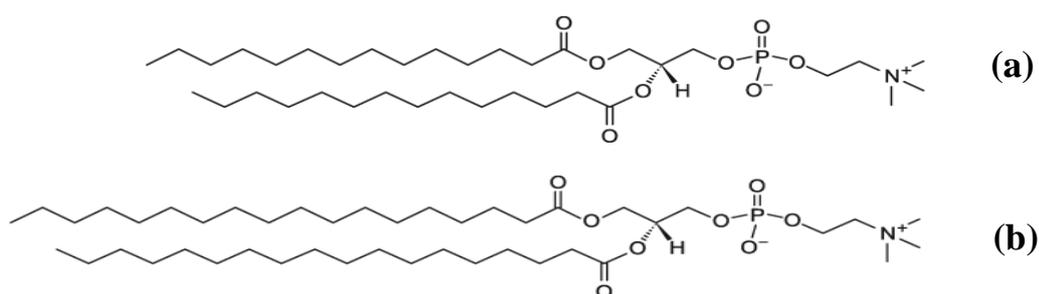


Figura 16. (a) Estrutura Molecular do DMPC. (b) Estrutura Molecular do DSPC. Estas estruturas foram desenhadas utilizando o software Chemdraw.

O diagrama de fases desta mistura de fosfatidilcolinas (Figura 17) é há muito conhecido e bem definido, através de técnicas termodinâmicas e espectroscópicas. Neste pode-se observar uma zona em que existe coexistência das duas fases presentes no

sistema, fase sólida ou gel (fase s_o) e fase líquida cristalina ou líquida desordenada (fase l_d) e outra zona distinta onde apenas existe uma das fases.

Na presença de DMPC ou DSPC puro, as fases presentes coexistem apenas na temperatura de transição, enquanto que quando se tem uma mistura dos dois lípidos de 1:1, por exemplo, pode-se observar uma zona de coexistência de fases estável num grande intervalo de temperaturas.

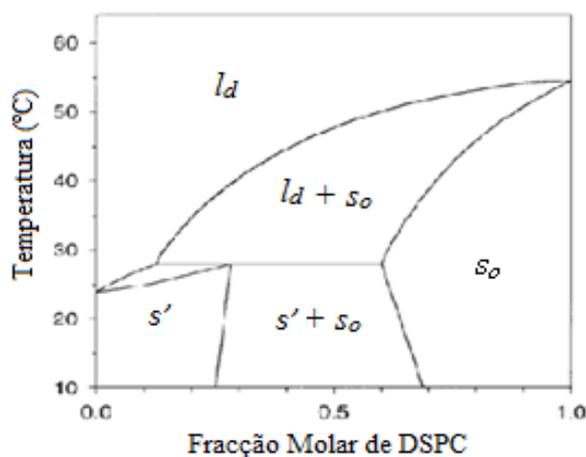


Figura 17. Diagrama de fases da mistura DMPC:DSPC, onde se pode observar as diferentes fases da bicamada lipídica, consoante a fracção molar em que se encontra cada um dos lípidos e a temperatura. Adaptado de Pokorny, 2001, depois de Mabrey 1976 e Knoll, 1981.

As rampas de temperatura apresentadas a baixo, mostram a comparação entre a anisotropia de fluorescência apresentada quando a sonda fluorescente utilizada é o TMA-DPH ou o NBD-DMPE em tampão HEPES. Tal como foi referido na secção 2.4 do capítulo I, estas sondas reportam ambientes distintos da bicamada, enquanto que o fluoróforo do TMA-DPH interage favoravelmente com as cadeias acil da bicamada, o grupo fluoróforo do NBD-DMPE interage com as cabeças polares.

Como se encontra perto da cabeça polar do fosfolípido, a parte polar do NBD-DMPE pode interagir também com a solução tampão HEPES que está a solvatar a bicamada.

Para que o método utilizado, neste trabalho, fosse validado, foi necessário estudar bem algumas das fracções molares representadas no diagrama binário DMPC:DSPC, para saber se os resultados obtidos por anisotropia de fluorescência eram ou não concordantes com os já existentes.

A partir dos resultados obtidos, pretende-se calcular a temperatura de transição (T_m), bem como o início (T_i) e o final (T_f) da transição. Estes últimos parâmetros são essenciais para se poder comparar com os resultados obtidos por DSC.

Começou-se, então, por procurar uma curva que descreve-se bem os resultados experimentais. Posteriormente, calculou-se a derivada da curva de ajuste a qual, foi sujeita o tratamento usual em DSC para encontrar T_i e T_f .

O primeiro ajuste às curvas obtidas a ser utilizado (Figura 18a e 18b), pressupunha apenas uma distribuição normal e uma recta (equação 6).

$$(C^{te} + m \cdot x) + f \cdot \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\left(\frac{T-\mu}{2\sigma^2}\right)^2} \quad (\text{Equação 6})$$

Contudo, e como se pode verificar na figura 18a e 18b, este ajuste não era mau, principalmente para as curvas de anisotropia do TMA-DPH. Contudo para as curvas de anisotropia do NBD-DMPE, não se consegue ajustar a curva toda, apesar de o ajuste ser bom, na zona em que ajusta (Figura 18a e 18b), pode-nos induzir em erro sobre os valores exactos da temperatura inicial (T_i), média (T_m) e final (T_f) da transição (Figura 18c e 18d) e, conseqüentemente da largura de transição.

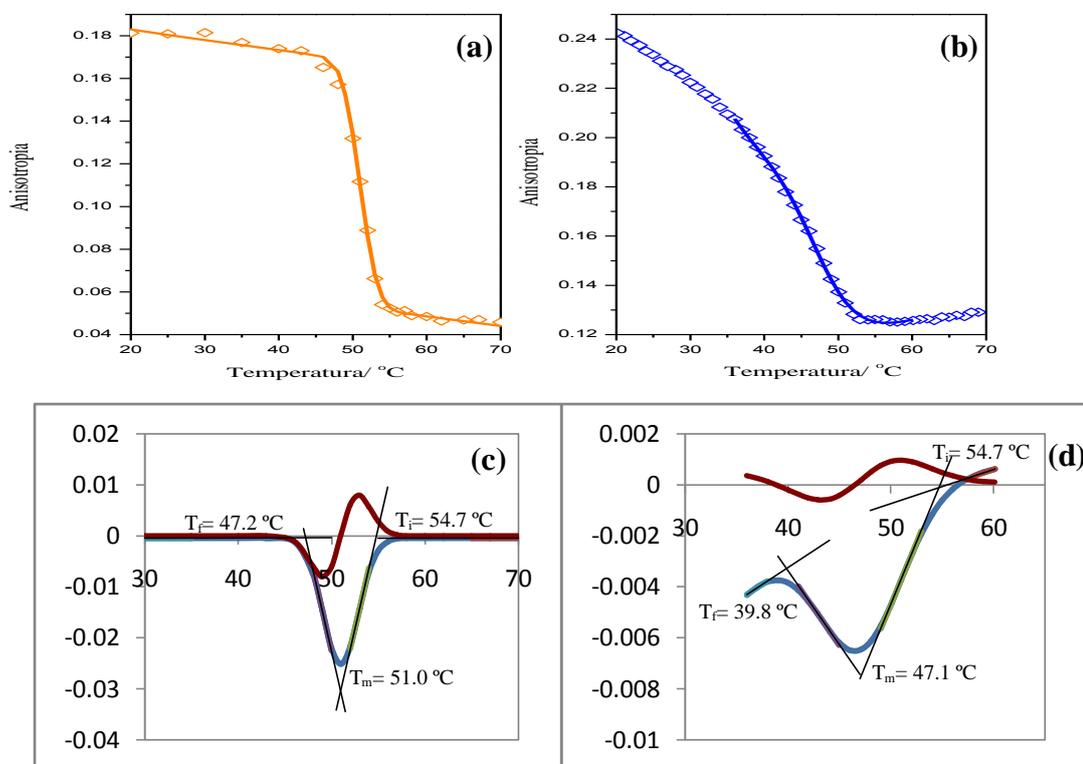


Figura 18. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES e respectivas curvas de ajuste com uma distribuição normal e uma recta. Primeira e segunda derivada das curvas de ajuste, onde se pode observar T_i , T_m e T_f da transição. (a) Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH em DSPC (◇) e respectiva curva de ajuste (—). (b) Anisotropia de Fluorescência do NBD-DMPE em DSPC (◇) e respectiva curva de ajuste (—). Primeira (—) e segunda (—) derivada da curva de ajuste da anisotropia do TMA-DPH (c) e do NBD-DMPE (d) em DSPC em tampão HEPES.

Como este ajuste se mostrou insuficiente, já que não abrangia toda a curva, passou-se então a fazer o ajuste das curvas com duas distribuições normais, segundo a equação 7 (Figura 19a e 19b):

$$C^{te} + f_1 \cdot \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\left(\frac{(T-\mu_1)^2}{2\sigma_1^2}\right)} + f_2 \cdot \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\left(\frac{(T-\mu_2)^2}{2\sigma_2^2}\right)} \quad (\text{Equação 7})$$

Apesar do bom ajuste obtido nas curvas é nos difícil ter percepção exacta da temperatura a que se inicia e finaliza a transição, pois esses valores podem ser ambíguos consoante as considerações de cada observador. Então, depois de ajustar a curva tão bem quanto possível, com duas distribuições normais, passou-se para um tipo de tratamento de dados mais sistemático, utilizando a primeira e a segunda derivada. A primeira derivada dá-nos com exactidão a temperatura média da transição (mínimo da curva), que também pode ser obtida tendo em conta a segunda derivada. Esta última, através dos seus máximos e mínimos dá-nos informação sobre onde é que o declive da primeira derivada é máximo, através da intercepção das duas tangentes à transição obtém-se a T_m . A T_i e a T_f podem ser obtidas através da intercepção das tangentes com a linha de base (zero) ou com tangentes à primeira derivada de transições adjacentes (Figura 19c e d).

É de notar que em algumas das misturas estudadas houve uma transição mais larga antes ou depois da transição principal, esta transição secundária assinala-se por uma pequena inflexão da segunda derivada, e por isso a primeira derivada não vai a zero. Esta transição secundária, não era bem distinguida se não se fizesse este tratamento sistemático das derivadas ao ajuste da curva, tal pode-se ver claramente na figura 19d.

O decréscimo acentuado que se observa na anisotropia, diz respeito à transição de fase sólido-líquido da membrana, quando a sonda utilizada é o TMA-DPH esse decréscimo é mais visível que com o NBD-DMPE.

Na fase gel, a anisotropia do NBD-DMPE, aumenta progressivamente, não havendo um patamar bem definido, o que faz com que haja claras dificuldades na interpretação de resultados obtidos. Com os resultados obtidos pela primeira e segunda derivada, percebe-se que existe uma transição secundária para temperaturas abaixo da T_m , o que não era esperado, já que se trata apenas de um lípido e não de uma mistura de lípidos.

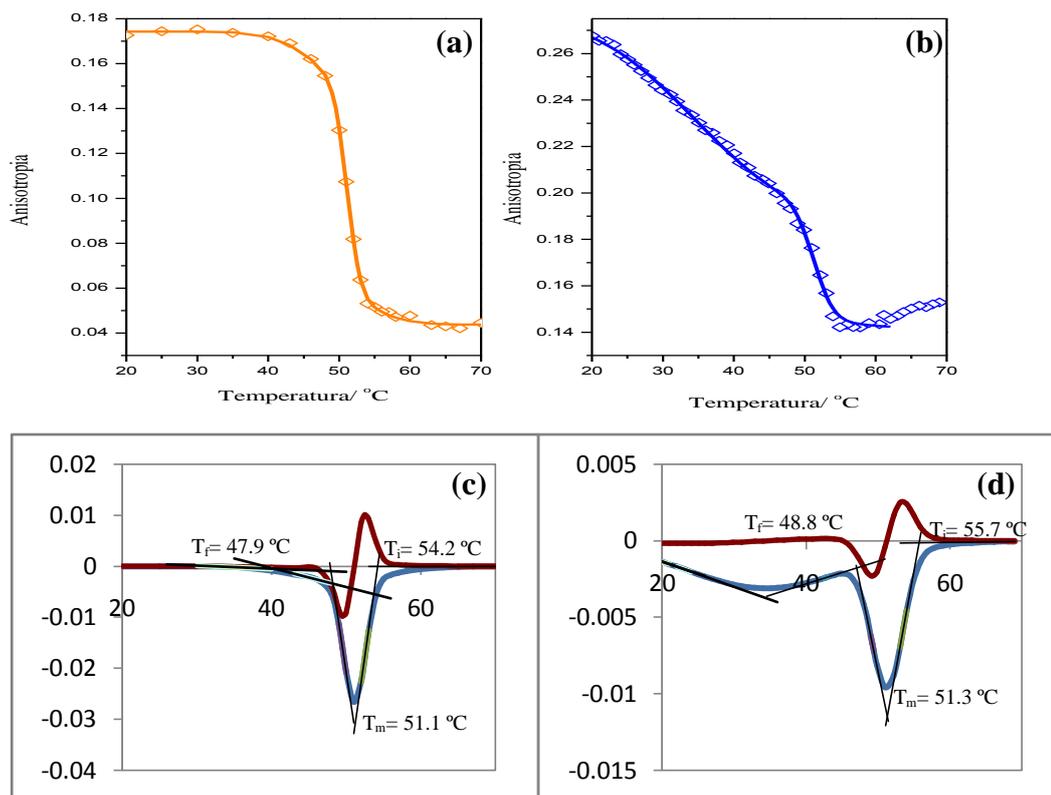


Figura 19. Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES, e respectivas curvas de ajuste com duas distribuições normais. Primeira e segunda derivada das curvas de ajuste, onde se pode observar T_i , T_m e T_f da transição. (a) Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH em DSPC (\diamond) e respectiva curva de ajuste ($—$). (b) Anisotropia de Fluorescência do NBD-DMPE em DSPC (\diamond) e respectiva curva de ajuste ($—$). Primeira ($—$) e segunda ($—$) derivada da curva de ajuste da anisotropia do TMA-DPH (c) e do NBD-DMPE (d) em DSPC em tampão HEPES,.

Na figura 20a, pode-se observar a comparação das temperaturas médias de transição obtidas por uma e por outra sonda, bem como as temperaturas iniciais e finais das transições (Figura 20b). O desvio padrão associado aos mesmos acaba por dissipar a diferença que poderia existir, devido ao facto de as sondas reportarem ambientes distintos, sendo que quando a sonda é o TMA-DPH, a T_m é sempre maior do que quando a sonda é o NBD-DMPE.

Assim sendo, e como a largura de transição é dada pelo módulo da diferença entre T_f e T_i , esta não vai variar muito consoante o ambiente que a sonda está a referir. Aquando da comparação dos valores obtidos com o diagrama de fases já existente, pode-se notar que as linhas representadas no diagrama dizem respeito ao início e ao fim da transição, pois os pontos que melhor coincidem com as linhas do diagrama são os que representam a T_i e a T_f das diferentes misturas estudadas (Figura 20b).

Na figura 20a pode-se observar ainda dois valores de T_m (para a maior parte das misturas), um dos valores diz respeito à T_m obtida na transição principal e o outro diz respeito à transição secundária.

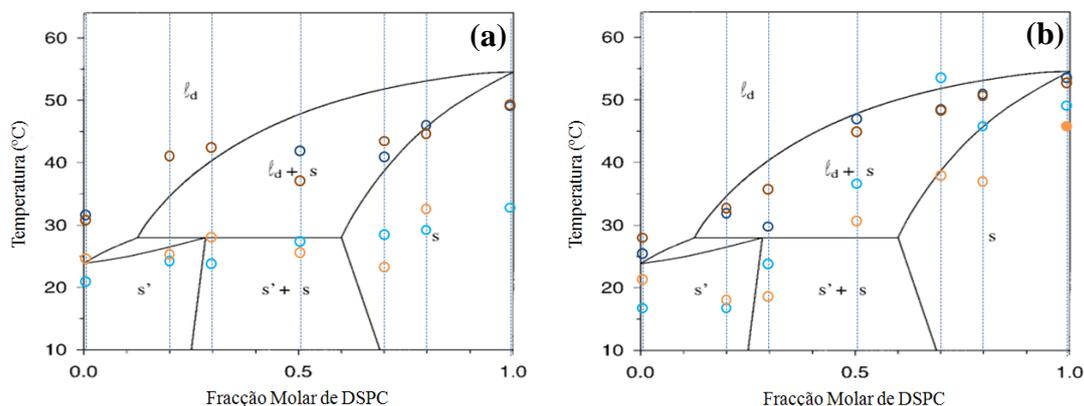


Figura 20. Diferentes T_i , T_m e T_f para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC com a sonda NBD-DMPE E TMA-DPH em tampão HEPES (a) Diferentes T_m obtidas para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC, com a sonda TMA-DPH (○ e ●) e com a sonda NBD-DMPE (○ e ●). (b) Diferentes T_i e T_f , respectivamente, obtidas para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC, com a sonda TMA-DPH (○ e ●) e com a sonda NBD-DMPE (○ e ●).

A partir destes resultados, conclui-se que o método de análise utilizado permite obter o início da transição de forma concordante com a metodologia usada para obter o diagrama de fases da mistura. Pode-se agora aumentar a complexidade do sistema e avaliar o efeito da trealose no comportamento de fases de bicamadas de DMPC e DSPC.

1.2 Efeitos de ocupação molecular nas propriedades termotrópicas de uma bicamada com transição de fase sólido-líquido (DMPC:DSPC)

Existem vários agentes que podem gerar ocupação molecular numa célula, neste caso específico, o agente de “crowding” é a trealose.

O objectivo nesta parte do trabalho é ver, se realmente, a trealose afecta as propriedades ou o comportamento da membrana, neste caso, o estudo centra-se numa bicamada com transição de fase sólido-líquido.

Os dados obtidos para as experiências de anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em várias fracções molares de DMPC:DSPC quando a solução

tampão utilizada foi HEPES com trealose foram alvo do mesmo tratamento sistemático que os dados apresentados anteriormente, tendo em conta a primeira e a segunda derivada de um ajuste às curvas com duas distribuições normais.

Os efeitos de *crowding* são bem conhecidos para as proteínas, aumentando a estabilidade da estrutura das mesmas. Com base neste efeito, poderia-se esperar uma diminuição da largura de transição, para os resultados obtidos neste trabalho.

Ao comparar os resultados de anisotropia de fluorescência do TMA-DPH, quando existe maior quantidade de DMPC na membrana, a largura de transição diminui na presença de trealose. Se a fracção molar de DSPC presente na membrana for igual ou superior a 50%, então a largura da transição aumenta na presença de trealose. Já nos resultados de anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em várias fracções molares de DMPC: DSPC, quando se utiliza solução tampão com e sem trealose, nota-se que a presença de trealose aumenta, claramente, a largura de transição (Figura 21). O alargamento por vezes, é tão grande que a transição secundária observada, quando o tampão apenas continha HEPES, deixa de ser visível, passando apenas a haver uma única transição de fase.

Observa-se também, para os resultados obtidos com ambas as sondas que há um aumento da T_m , apesar de não ser estatisticamente significativo. Este ligeiro aumento da T_m já foi observado antes, para MLVs de DMPC na presença de trealose, sendo interpretado como uma consequência da desidratação (Kiselev et al, 2005).

Neste trabalho utilizaram-se LUVs e, previamente, foi feito um estudo do efeito do freeze-taw e annealing nas amostras. Observou-se que o freeze-taw não tinha quaisquer influências nos resultados obtidos, mas fazer ou não o annealing das amostras era significativo, já que quando se fazia annealing a amostra se mostrava mais estável durante as experiências. O ligeiro aumento observado, deve-se então à presença de trealose na fase aquosa.

No nosso grupo de investigação, estudou-se a solubilidade de anfífilas na presença de trealose. Os resultados obtidos não eram esperados, com base no comportamento observado para as proteínas, contudo, vão de encontro ao aumento da largura de transição de fase, observados neste trabalho (Palmeira, 2011).

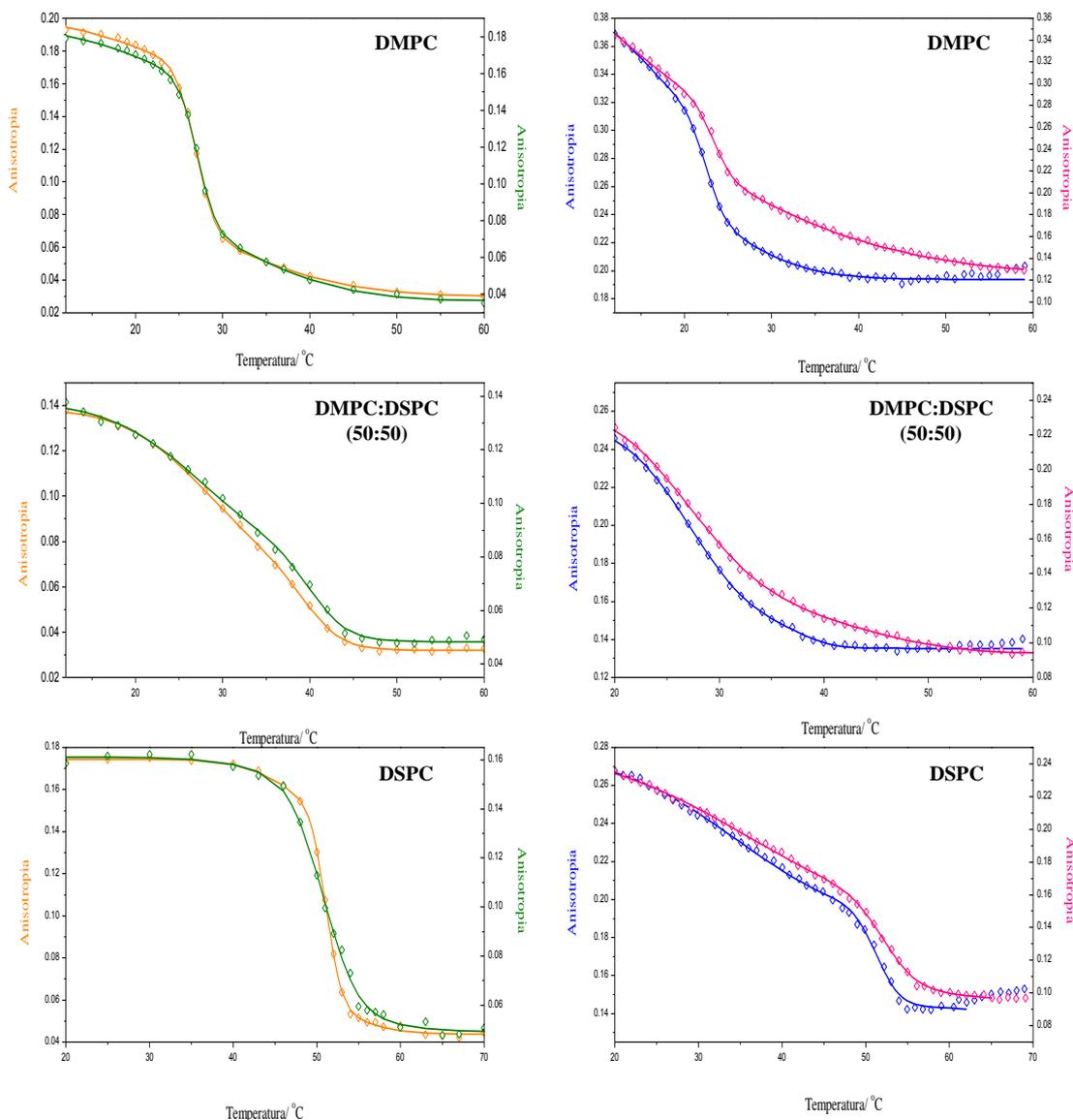


Figura 21. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em tampão HEPES com e sem trealose em diferentes frações molares de DMPC:DSPC e respectivas curvas de ajuste utilizando duas distribuições normais. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH em DMPC, DMPC:DSPC (50:50) e DSPC, respectivamente, em tampão HEPES sem trealose (\diamond) e em tampão HEPES com trealose (\blacklozenge) e respectivas curvas de ajuste (—) e (—). Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DMPC, DMPC:DSPC (50:50) e DSPC, respectivamente, em tampão HEPES sem trealose (\diamond) e em tampão HEPES com trealose (\blacklozenge) e respectivas curvas de ajuste (—) e (—).

Como a largura de transição aumenta, e é dada pelo módulo da diferença entre a T_f e a T_i , pode-se concluir que a T_i na presença de trealose vai aumentar e a T_f vai diminuir ligeiramente (Figura 22).

A interação da trealose com a bicamada lipídica pode alterar algumas propriedades da membrana, explicando assim este alargamento da transição de fase principal.

Os efeitos observados pelo NBD-DMPE são muito mais significativos do que quando reportados pelo TMA-DPH. Este comportamento resulta da localização dos fluoróforos na membrana e indica que a trealose afecta principalmente as propriedades da interface membrana/solvente aquoso e mais significativamente as regiões de interface entre a fase sólida e líquida.

Todos os valores de anisotropia do TMA-DPH e do NBD-DMPE, obtidos para a T_i , T_m e T_f podem ser confirmados na tabela 1.

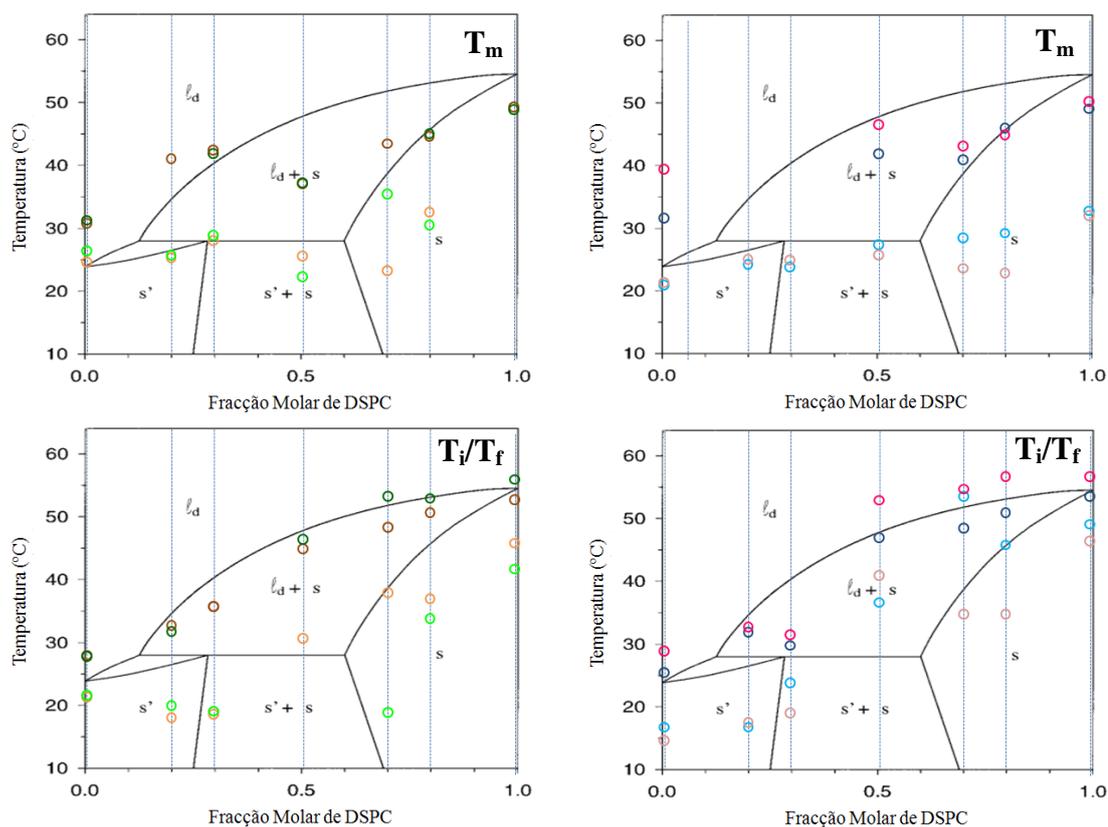


Figura 22. T_m high, T_m low, T_i e T_f obtidas para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC, com sonda TMA-DPH e NBD-DMPE em tampão HEPES com e sem trealose. T_m high e T_m low obtidas para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC, com a sonda TMA-DPH em tampão HEPES (○ e ○) e em tampão HEPES com trealose (● e ●) e com a sonda NBD-DMPE em tampão HEPES (○ e ○) e em tampão HEPES com trealose (● e ●), respectivamente. Diferentes T_i e T_f obtidas para as transições de fase das diferentes misturas DMPC:DSPC, com a sonda TMA-DPH em tampão HEPES (○ e ○) e em tampão HEPES com trealose (● e ●) e com a sonda NBD-DMPE em tampão HEPES (○ e ○) e em tampão HEPES com trealose (● e ●), respectivamente.

Tabela 1. Valores obtidos de T_i , T_m e T_f e largura de transição dada pelo módulo da diferença entre T_f e T_i , para diferentes frações de DMPC:DSPC, com a sonda fluorescente TMA-DPH e NBD-DMPE, em tampão HEPES com e sem trealose

%DSPC	TMA-DPH							
	HEPES				HEPES com Trealose			
	T_i	T_m	T_f	Largura de transição	T_i	T_m	T_f	Largura de transição
0	29.2±2.5	25.8±1.6	22.4±1.1	6.7	29.0±1.8	25.9±1.4	22.7±0.9	6.3
20	34.0±0.1	26.5±0.3	19.1±0.3	14.9	33.0±0.2	27.0±0.6	21.0±1.2	12.0
30	37.1±1.3	29.3±1.6	19.7±0.8	17.4	37.1±0.7	30.1±1.7	20.1±2.7	17.0
50	46.5±0.7	38.5±1.7	31.9±3.7	14.6	48.0±1.1	38.7±1.4	31.1±3.1	16.9
70	49.9±0.2	45.0±1.1	39.4±5.1	10.5	55.0±0.7	36.9±0.8	19.9±1.2	35.1
80	52.4±0.8	46.2±1.9	38.4±5.6	14.0	54.7±1.5	46.6±0.8	25.1±3.4	29.6
100	54.5±0.2	51.0±0.1	47.4±0.4	7.1	57.8±0.5	50.5±0.2	43.2±0.8	14.6

%DSPC	NBD-DMPE							
	HEPES				HEPES com Trealose			
	T_i	T_m	T_f	Largura de transição	T_i	T_m	T_f	Largura de transição
0	26.7±2.1	22.1±1.1	17.8±3.5	8.9	30.1±4.4	22.5±2.6	15.6±8.0	14.5
20	33.2±0.3	25.4±0.3	17.8±0.7	15.4	34.0±0.4	26.2±0.3	18.6±0.7	15.4
30	31.0±3.7	24.9±0.9	18.9±4.3	12.1	32.8±1.1	26.0±0.0	20.0±0.0	12.8
50	48.6±9.5	43.4±6.8	38.0±4.4	10.6	54.7±3.5	48.2±2.2	42.5±7.3	12.2
70	50.1±0.8	42.4±6.7	55.3±16.8	5.2	56.5±0.2	44.7±0.8	21.1±1.7	35.4
80	52.7±0.2	47.7±0.1	47.7±2.0	5.0	58.5±0.4	46.5±1.0	36.1±1.9	22.4
100	55.3±0.8	50.8±3.1	47.3±5.6	8.0	58.5±0.4	52.0±2.2	48.0±3.5	10.5

Quando se tem uma mistura de lípidos espera-se encontrar uma zona de coexistência de fases, o que resulta numa zona de transição de fase muito mais larga, já que os lípidos não fundem todos à mesma temperatura. Quando se tem apenas um lípido espera-se que a zona de coexistência de fases seja apenas a temperatura de transição, tal como já foi referido anteriormente. Algumas colinas são caracterizadas por terem uma pequena pré-transição antes da transição principal. No entanto, esta pré-transição observa-se numa gama estreita de temperaturas não sendo compatível com a transição secundária que é observada neste trabalho para os componentes puros, em particular para o NBD-DMPE em DSPC. A transição secundária observada neste sistema a $T < T_m$ pode assim remeter para a existência de alterações nas propriedades do sistema reportadas pela

sonda. Para avaliar a possibilidade de exclusão do NBD-DMPE da fase gel foram realizados dois tipos de experiências.

Primeiro, testou-se uma razão sonda:lípido de 1:300, em vez da habitual 1:100, para analisar se haveria ou não diferença nos valores de anisotropia obtidos. Como se pode observar na figura 23, a anisotropia obtida na fase gel não variou, com a diminuição da concentração de sonda presente na membrana. Na fase fluida, observa-se que o comportamento da curva na ausência de trealose não é igual, deixando de se observar o comportamento inesperado de diminuição da anisotropia com o decréscimo da temperatura. Estes resultados indicam que a estabilização da membrana a 70°C durante 2h, que precedeu a realização da rampa descendente de temperatura, pode não ser suficiente para garantir a homogeneidade da bicamada após incubações longas à temperatura ambiente. São assim compatíveis com a agregação do NBD-DMPE em DSPC na fase gel. No entanto, o comportamento observado a $T < T_m$ é o mesmo para ambas as concentrações indicando que o aumento observado na anisotropia não se deve a este fenómeno.

A comparação entre os resultados obtidos na ausência e presença de trealose sugerem uma maior estabilidade do NBD-DMPE na fase gel do DSPC quando a solução aquosa contém agentes de ocupação molecular.

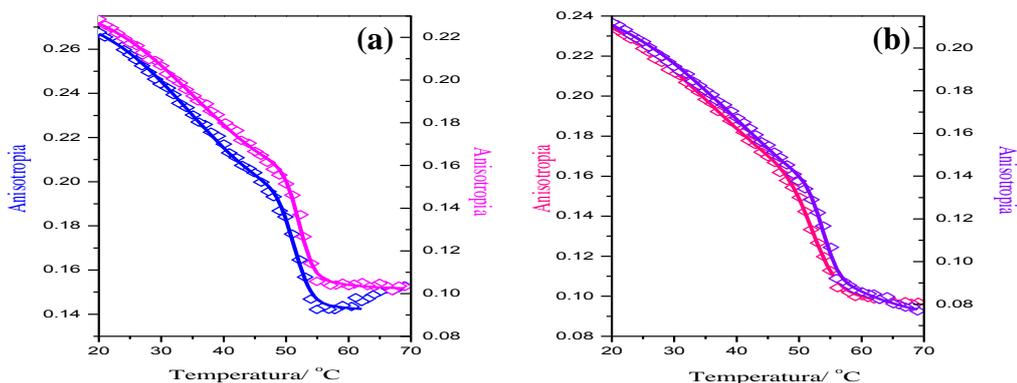


Figura 23. Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES com e sem trealose e respectivas curvas de ajuste, para diferentes razões sonda:lípido. (a) Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES, razão sonda:lípido de 1:100 (◇) e 1:300 (◇) e respectivas curvas de ajuste (—) (—). (b) Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC em tampão HEPES com trealose, razão sonda:lípido de 1:100 (◇) e 1:300 (◇) e respectivas curvas de ajuste (—) (—).

De seguida, fez-se uma experiência em tempo, mediu-se a anisotropia a 60°C e logo de seguida a 30°C, repetindo a medição de anisotropia a 30°C de 10 em 10 minutos, num total de duas horas (Figura 24). Neste caso, também não houve nenhuma alteração

significativa da anisotropia, indicando que as propriedades do meio onde a sonda se encontra permanecem inalteradas ao longo das duas horas.

Não se pode afirmar em absoluto, mas os resultados obtidos nestas experiências complementares, vão no sentido de que a variação observada na anisotropia do NBD-DMPE para $T < T_m$ não se devem à agregação/segregação da sonda quando a membrana se encontra na fase gel, mas sim a alterações nas propriedades da fase gel nesta gama de temperaturas.

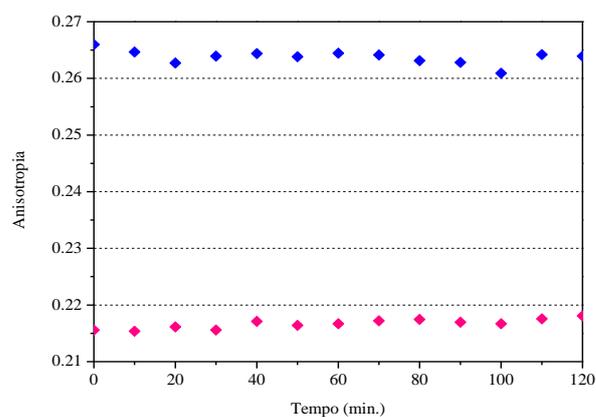


Figura 24. Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC, em tampão HEPES (♦) e em tampão HEPES com trealose (♦) a 30°C, em função do tempo.

1.3 Efeitos de ocupação molecular nas propriedades termotrópicas de uma bicamada com transição de fase Sólido- líquido desordenado – líquido ordenado (SpM:Chol)

A esfingomiélinina tem um papel bastante importante no que diz respeito à constituição da membrana dos tecidos nervosos, bem como da membrana plasmática. Esta pode ser obtida de diferentes formas na natureza, através do ovo ou do cérebro de bovino, sendo a utilizada no presente estudo de ovo. A esfingomiélinina de ovo, contém maioritariamente cadeias acil saturadas de 16 carbonos, com uma T_m de cerca de 37°C, tal como a maioria das esfingomiélininas que ocorrem naturalmente (Barenholz, 1999).

O colesterol é o mais conhecido dos esteróis, sendo um lípido bastante peculiar, tal como foi abordado na secção 2.3 do capítulo I.

A interação entre a esfingomielinina e o colesterol é já conhecida e está já documentada num diagrama de fases (Figura 25). Neste, é visível que com o aumento de colesterol na bicamada, a transição de fase gel-líquida cristalina é abolida, dando lugar a apenas uma fase, a fase líquida ordenada. Este comportamento era de esperar, já que a adição de colesterol à bicamada vai fazer com que a ordem das cadeias acilo decresça na fase gel e aumente na fase líquida desordenada (Barenholz, 1999; Massey, 2001).

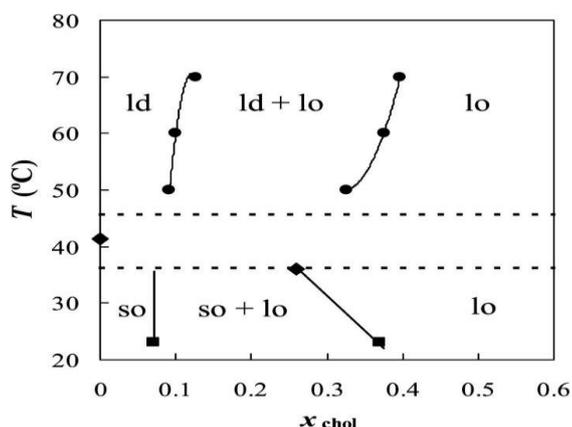


Figura 25. Diagrama de fases SpM:Chol. Os pontos representados foram determinados por anisotropia de fluorescência do DPH (●), por *quenching* do DPH por 5-NS (■) e por dados já obtidos e relatos na literatura (◆). Adaptado de Almeida et al., 2003.

Para compreender os efeitos de ocupação molecular criados pela trealose em bicamadas SpM:Chol, com diferentes fracções molares dos lípidos, começou-se por estudar a anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE nas proporções de SpM:Chol 100:0, 90:10, 80:20 e 50:50, em tampão HEPES, para comparar os resultados com o diagrama de fases já existente e só depois se estudou as anisotropias destas duas sondas, nas mesmas proporções de SpM:Chol, mas em tampão HEPES com 1M de trealose.

Já que a esfingomielinina tem um comportamento semelhante a muitas PCs, e depois de analisar os efeitos de ocupação molecular em bicamadas DMPC:DSPC, era de se esperar que a presença de trealose provoca-se, igualmente, um alargamento da transição de fase. Na esfingomielinina pura, esse alargamento é visível, tanto nos resultados de anisotropia obtidos com o TMA-DPH (Figura 26a) como com o NBD-DMPE (Figura 26b).

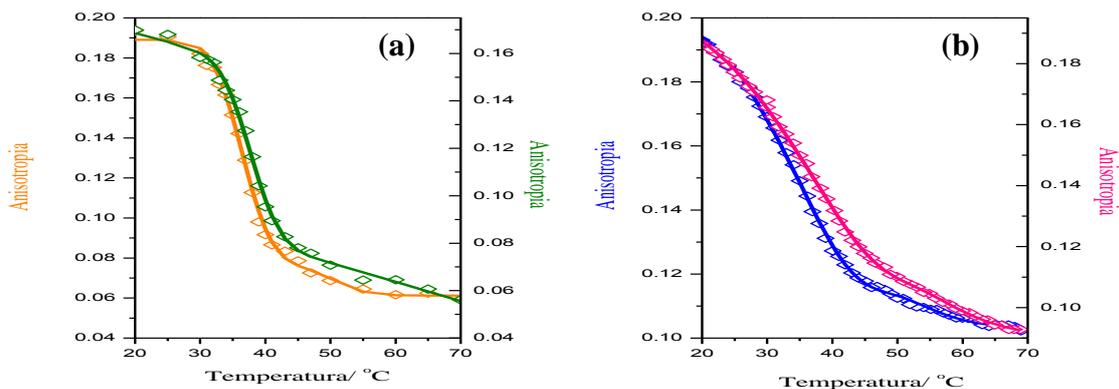


Figura 26. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em SpM, em tampão HEPES com e sem trealose e respectiva curva de ajuste utilizando duas distribuições normais. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH (a) e do NBD-DMPE (b), em SpM, em tampão HEPES (◇) e (◇) e em tampão HEPES com trealose (◇) e (◇), respectivamente e respectivas curvas de ajuste (—) (—) (—) e (—).

Contudo, à medida que se aumenta a fracção molar de colesterol na membrana, este alargamento da transição causado pela presença de trealose deixa de ser notado, pois a largura de transição já vai aumentar com o aumento da percentagem de colesterol na bicamada. Na mistura 50:50, apenas se vê o efeito da temperatura, já que não há nenhuma transição de fase, a membrana encontra-se sempre na fase líquido-ordenado (Figura 27).

O ajuste das curvas de anisotropia apresentadas neste ponto foi feito com duas distribuições normais, tal como foi explicado no ponto anterior.

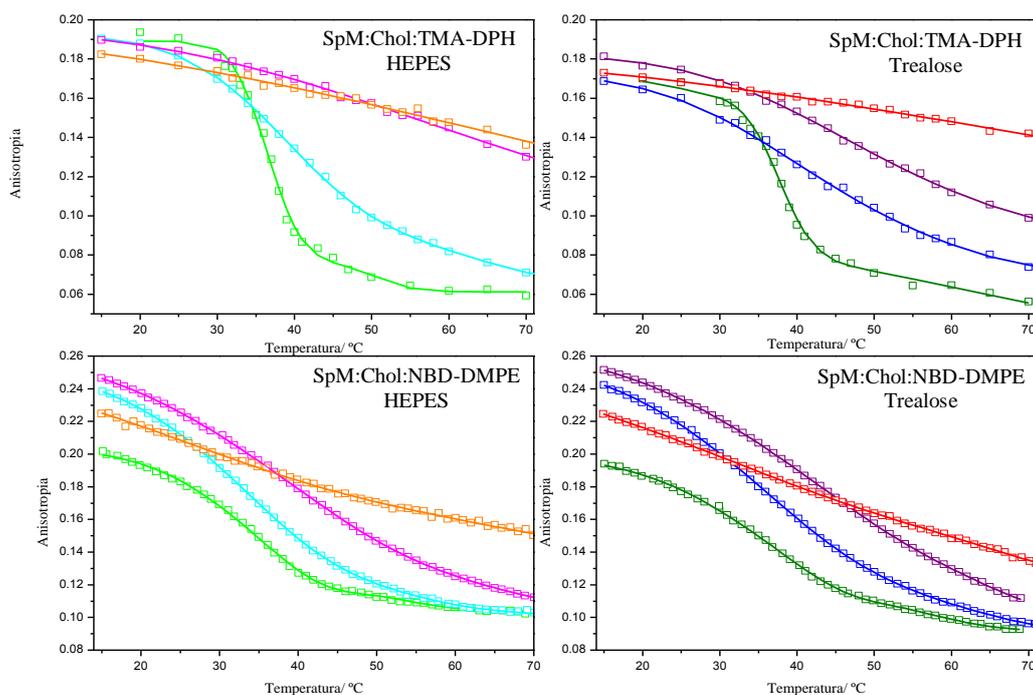


Figura 27. Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em tampão HEPES com e sem trealose em diferentes fracções molares de SpM:Chol e respectivas curvas de ajuste. Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em tampão HEPES em SpM (◇); SpM:Chol (90:10) (◇); SpM:Chol (80:20) (◇) e SpM:Chol (50:50) (◇) e respectivas curvas de ajuste (—), (—), (—) e (—); Anisotropia de Fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em tampão HEPES com trealose em SpM (◇); SpM:Chol (90:10) (◇); SpM:Chol (80:20) (◇) e SpM:Chol (50:50) (◇) e respectivas curvas de ajuste (—), (—), (—) e (—).

Na figura 28, encontram-se representadas as temperaturas médias e iniciais de transição de fase. Estas apenas foram obtidas para a SpM pura e para a mistura SpM:Chol (90:10), pois, tal como já foi referido, como a largura de transição aumenta proporcionalmente ao aumento de colesterol na bicamada, passa a não ser possível obter valores concretos para T_m , nem para T_i .

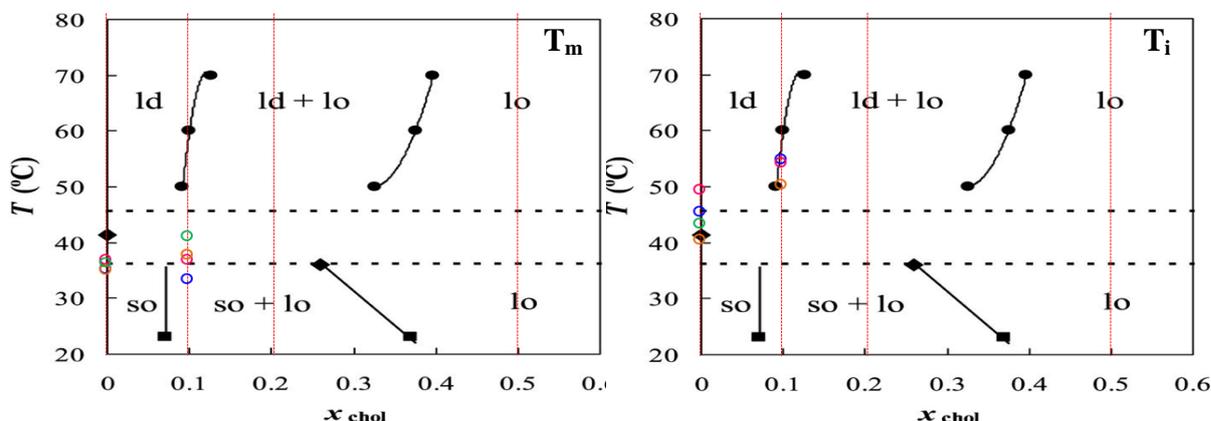


Figura 28. Representação das T_m e T_i obtidas em tampão HEPES com e sem trealose para as misturas de SpM:Chol com NBD-DMPE e TMA-DPH. Diferentes T_m e T_i obtidas para as transições de fase das diferentes misturas SpM, com a sonda TMA-DPH em tampão HEPES (○) e em tampão HEPES com trealose (○) e com a sonda NBD-DMPE em tampão HEPES (○) e tampão HEPES com trealose (○).

1.4 Efeitos de ocupação molecular nas propriedades termotrópicas de uma bicamada POPC:SpM

Em laboratório um dos fosfolípidos sintéticos mais utilizado nas membranas artificiais é o POPC (Figura 29). Este glicerofosfolípido possui uma região polar composta por uma fosfatidilcolina e uma região apolar composta por uma cadeia acil saturada, de 16 carbonos, e outra insaturada (no carbono 9), com 18 carbonos, e a sua temperatura de transição é de -2°C (Gennis, 1988)

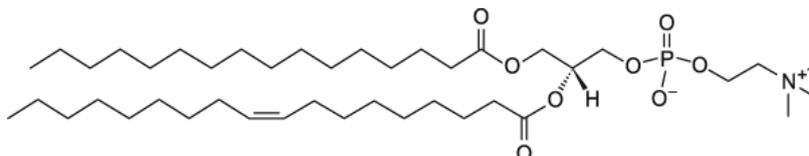


Figura 29. Estrutura molecular do POPC. Esta estrutura foi desenhada utilizando o software Chemdraw.

A mistura POPC:SpM é, claramente, uma mistura não ideal, como se pode observar pelo diagrama de fases (Figura 30), com uma ampla região de separação de

fases. Neste diagrama é considerado que há uma fase líquida desordenada e duas fases sólidas, a so_1 rica em POPC e a so_2 rica em SpM (Almeida et al, 2003).

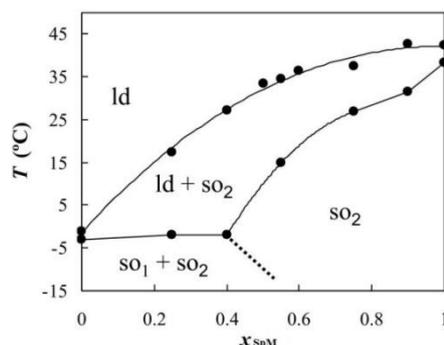


Figura 30. Diagrama de fases POPC:SpM MLV. Os dados experimentais são mostrados nos círculos e a linha pontuada é hipotética. Adaptado de Almeida, 2003.

Como as experiências de anisotropia só foram feitas até aos 12°C, pois se fosse até temperaturas mais baixas, corria-se o risco de haver condensação, não sendo possível a obtenção de resultados, não se pode observar nenhuma transição de fase clara nas misturas estudadas, sendo a única transição de fase óbvia, a da esfingomielina pura, já apresentada e discutida na secção anterior. Assim sendo, a apreciação dos resultados obtidos por anisotropia de fluorescência neste ponto serão abordados de uma forma qualitativa e não quantitativa, pois não existe uma transição de fase clara da qual se possa retirar dados concretos de T_m , T_f e da largura de transição. Apenas se consegue obter com algum rigor a T_i e em misturas com maior percentagem de SpM, consegue-se obter T_m .

A anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em POPC puro, em tampão HEPES com e sem trealose, tem um comportamento diferente.

No caso do TMA-DPH, a anisotropia em tampão HEPES mantém-se sempre superior à com tampão HEPES com trealose.

No caso do NBD-DMPE, por volta dos 40°C há uma inversão de valores, a anisotropia em tampão HEPES com trealose passa a ser menor que a anisotropia em tampão HEPES sem trealose. A trealose é um açúcar e quando adicionado a uma solução HEPES normal irá fazer com que a solução se torne mais viscosa, deste modo, para temperaturas inferiores a 40°C o aumento de viscosidade da solução de trealose relativamente à solução de HEPES é compatível com o aumento da anisotropia do NBD-DMPE. Acima dos 40°C a curva de anisotropia do NBD-DMPE na solução de HEPES sem trealose apresenta valores superiores à solução de HEPES com trealose, contudo,

dentro do erro, os valores serão muito semelhantes, não apresentando grandes diferenças (Figura 31)

Na mistura POPC:SpM 75:25, a anisotropia do TMA-DPH passa a ser maior em tampão HEPES com trealose do que em HEPES sem trealose, durante toda a gama de temperaturas medidas.

Na mistura POPC:SpM 50:50 e 25:75, há uma ligeira inversão na anisotropia do TMA-DPH em tampão HEPES e em tampão trealose, contudo, essa diferença na anisotropia será quase nula, devido ao erro associado a cada medição (Figura 31).

Na mistura POPC:SpM 75:25; 50:50 e 25:75, a anisotropia do NBD-DMPE mantém o mesmo comportamento que em POPC puro.

Estas inversões de anisotropia em algumas das misturas estudadas podem-se dever a uma possível alteração das propriedades físicas da membrana.

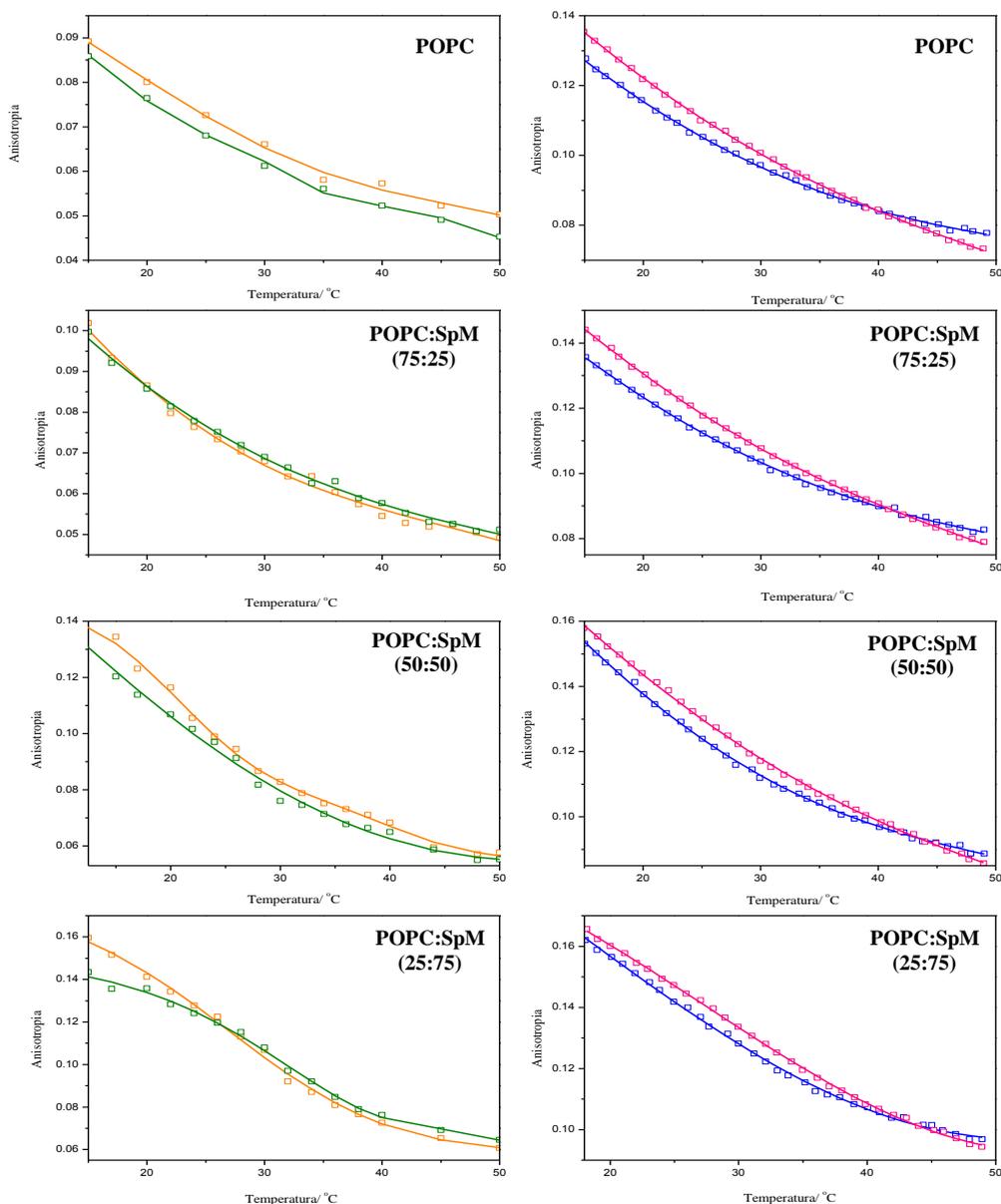


Figura 31. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE em diferentes frações de POPC:SpM em tampão HEPES com e sem trealose e respectivas curvas de ajuste, utilizando duas distribuições normais. Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em POPC, POPC:SpM (75:25), POPC:SpM (50:50), POPC:SpM (25:75), em tampão HEPES (\diamond) e em tampão HEPES com trealose (\square) e respectivas curvas de ajuste (—) e (—). Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH em POPC, POPC:SpM (75:25), POPC:SpM (50:50), POPC:SpM (25:75), em tampão HEPES (\diamond) e em tampão HEPES com trealose (\square) e respectivas curvas de ajuste (—) e (—).

2. Tempo de vida de fluorescência do NBD-DMPE em DSPC, SpM e POPC, hidratado com tampão HEPES com e sem trealose

Como foi referido anteriormente no capítulo II, secção 2.3, a anisotropia depende da rotação do fluoróforo durante o tempo em que este se encontra no estado excitado. Para se poder concluir relativamente à alteração da viscosidade da membrana é assim essencial saber o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado.

As experiências de medição dos tempos de vida foram feitas com o NBD-DMPE, porque para além de o TMA-DPH ser fotodegradável e as experiências serem muito longas, deixando as amostras expostas a radiação durante um grande período de tempo, foi com o NBD-DMPE que se obteve resultados mais difíceis de interpretar sem que se fizessem experiências complementares. Foi, igualmente, o NBD-DMPE que reportou os maiores efeitos nas propriedades das membranas.

O tempo de vida do fluoróforo, foi medido a várias temperaturas, em DSPC, POPC e SpM em tampão HEPES com e sem trealose.

Para o DSPC estudaram-se os tempos de vida a várias temperaturas (35°C, 55°C e 65°C, em tampão HEPES e aos 22°C, 30°C, 40°C e 55°C, para tampão HEPES com trealose), com o objectivo de saber mais sobre a variação das propriedades da membrana com a temperatura na fase gel. Para a SpM mediram-se os tempos de vida do fluoróforo a 40°C, 50°C e 60°C e para o POPC, mediram-se os tempos de vida às temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C (Figura 32). Ao se observarem as figuras, pode-se afirmar que os tempos de vida do fluoróforo, não dependem da presença da trealose, pois em todas as misturas, os tempos de vida médios são muito próximos. Deste modo, o único factor que poderá influenciar a anisotropia é a viscosidade do solvente.

Através da interpretação dos gráficos da figura 32, podem-se tirar várias observações do estudo dos tempos de vida.

Pode-se observar que o tempo de vida médio não depende muito da membrana, mas é dependente da temperatura a que esta se encontra. O decaimento de fluorescência observado foi sempre multi-exponencial. Na maioria das soluções, o decaimento foi bem descrito por duas exponenciais embora sejam necessários três tempos de vida para

descrever o comportamento na fase gel do DSPC na ausência de trealose. Os diferentes tempos de vida serão assim descritos como τ_1 (muito curto), τ_2 (intermédio) e τ_3 (longo), embora na maior parte das soluções sejam apenas observados os tempos de vida médio e longo (τ_2 e τ_3).

Quando a membrana se encontra na fase gel, o τ_2 , τ_3 e tempo de vida médio ($\langle\tau\rangle$) não aumentam tanto quanto esperado com a diminuição da temperatura. Este comportamento é mais acentuado no $\langle\tau\rangle$ devido à diminuição do pré-exponencial do tempo de vida longo (α_3) e aumento do pré-exponencial do tempo de vida médio (α_2), com a diminuição da temperatura.

Em DSPC gel sem trealose, são necessários três τ e mesmo assim, a qualidade do ajuste não é tão boa como nos restantes, o que remete para que o NBD-DMPE não seja estável nestas condições, contudo não se pode afirmar se ele agrega ou se é excluído da membrana.

Quando a membrana se encontra na fase líquida, o τ_2 e τ_3 diminuem com a temperatura, mas as pré-exponenciais mantêm-se constantes, cerca de 0.4 para τ_2 e 0.6 para τ_3 no caso da SpM e 0.4/0.6 no caso do POPC.

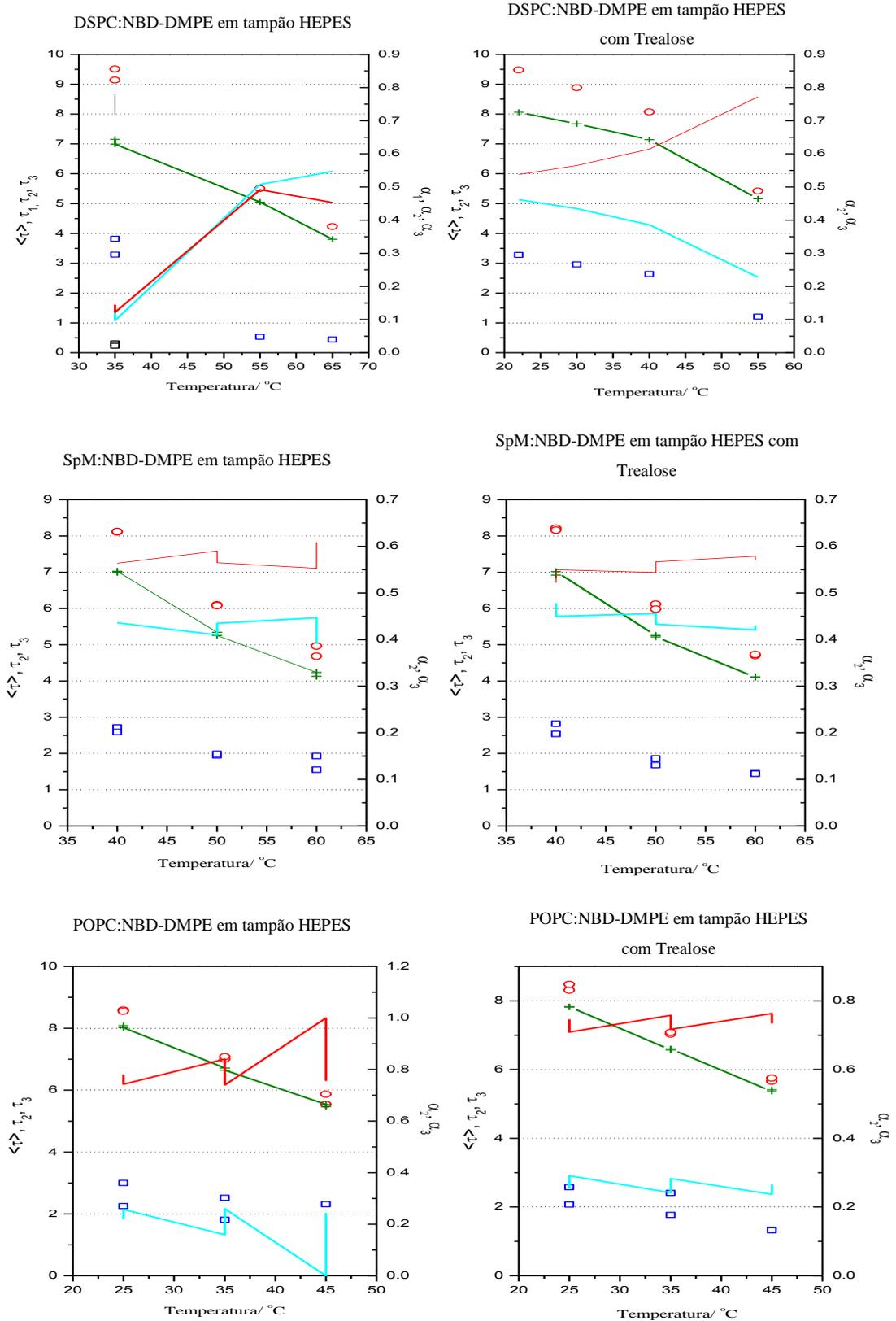


Figura 32. Diferentes tempos de vida e pré-exponenciais em função da temperatura (°C). Tempo de vida médio (ns) em função da temperatura (°C) (—). Tempo de vida 1(ns) em função da temperatura (°C) (□), tempo de vida 2 (ns) em função da temperatura (°C) (□) e tempo de vida 3 (ns) em função da temperatura (°C) (○). Pré-exponencial 1 (α_1) (|), 2 (α_2) (—) e 3 (α_3) em função da temperatura (°C).

Estes resultados permitem concluir que a pequena diminuição observada na anisotropia do NBD-DMPE com o aumento da temperatura quando a membrana se encontra na fase fluida subestima a diminuição observada na fluidez da região onde se encontra o grupo NBD. Por outro lado, a diminuição acentuada que se observa na anisotropia quando o NBD-DMPE se encontra na fase gel reporta quantitativamente variações na viscosidade do meio.

3. Ensaios Preliminares de DSC

A calorimetria diferencial de varrimento, por não necessitar da presença de sondas, que podem ser consideradas como uma impureza no sistema, afectando os resultados obtidos, poderá ser útil na confirmação do eventual efeito da sonda na caracterização feita por anisotropia de fluorescência.

Desta forma, procedeu-se a uma série de ensaios preliminares de DSC, utilizando o equipamento disponível no Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

Foram realizados alguns ensaios iniciais utilizando LUVs de DSPC utilizando diferentes massas (≈ 3 mg e ≈ 18 mg) e a mesma concentração de lípido, 100mM e, posteriormente diferentes concentrações (100 mM e 25 mM). Pretendia-se chegar a um compromisso entre a massa e a concentração de amostra a utilizar nas experiências de DSC, de forma a obter um sinal calorimétrico confiável, atendendo ao calorímetro utilizado e dado que as energias envolvidas nos processos a investigar são baixas. A massa não poderá ser levada a ponto de se verificarem gradientes térmicos na amostra, e a concentração da solução é limitada pelo consumo de reagentes.

Os resultados apresentados na figura 33 apontam para que os componentes do evento endotérmico observado e os valores de temperatura de *onset* registados não sejam significativamente alterados nas condições ensaiadas. Estes valores estão também de acordo com o registado na literatura para este lípido (Mabrey, 1976).

Como tal a concentração escolhida para as experiências a realizar foi de 25 mM e a massa de amostra de cerca de 12-14 mg.

Os ensaios foram realizados à velocidade $\beta = 2^\circ\text{C}/\text{min}$, o valor mais baixo que permitia obter uma relação sinal/ruído satisfatória.

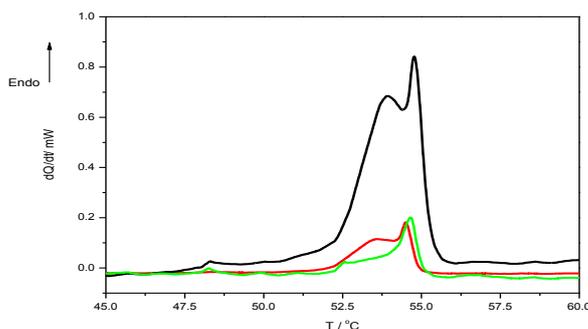


Figura 33. Curvas de DSC LUV 100nm de DSPC, com diferentes concentrações e diferentes massas. LUV 100nm de DSPC []=100mM e m=18mg (—), de DSPC []=100mM e m=3mg (—) e de DSPC []=25mM e m=12.85mg (—). $\beta = 2^\circ\text{C}/\text{min}$; cápsula fechada de 50 μL .

Após este estudo preliminar, passou-se à comparação dos resultados de DSC obtidos por MLVs e por LUVs 100 nm de DSPC hidratados com tampão HEPES. O perfil das curvas é significativamente diferente, registando-se no caso dos MLVs um pico com melhor definição do que nas experiências feitas com LUVs, como se pode observar na figura 34.

Os valores de entalpia total é de $\Delta H= 46/47$ kJ/mol no caso dos MLVs, superior ao obtido para os LUVs ($\Delta H= 19/20$ kJ/mol), que comparam favoravelmente com valores referidos na literatura (Mabrey, 1976).

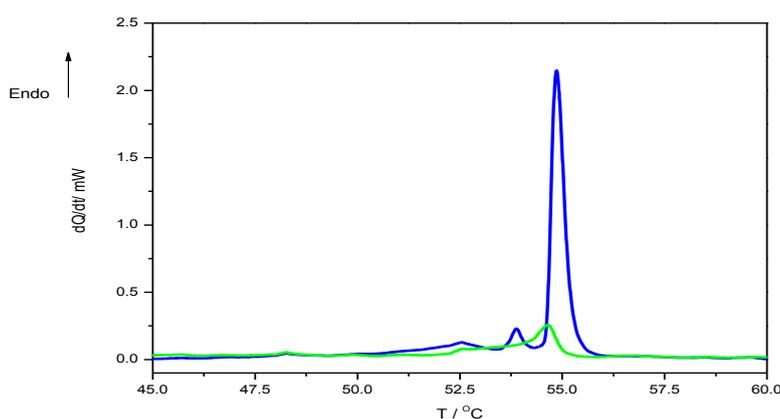


Figura 34. Curvas de DSC de MLV e LUV 100nm de DSPC com a mesma concentração e diferentes massas. MLV DSPC [] = 25 mM e m = 14.53 mg (—) e LUV 100nm DSPC [] = 25 mM e m=12.85 mg (—). $\beta = 2^\circ\text{C}/\text{min}$; cápsula fechada de 50 μL .

O efeito da presença de trealose está exemplificado na figura 35, para LUVs 100nm de DSPC (25mM). É de registar uma diferença nas temperaturas de transição de cerca de 2°C . Obtendo-se valores mais elevados na presença de trealose, apesar do valor de entalpia total registado $\Delta H= 24$ kJ/mol, não ser diferente.

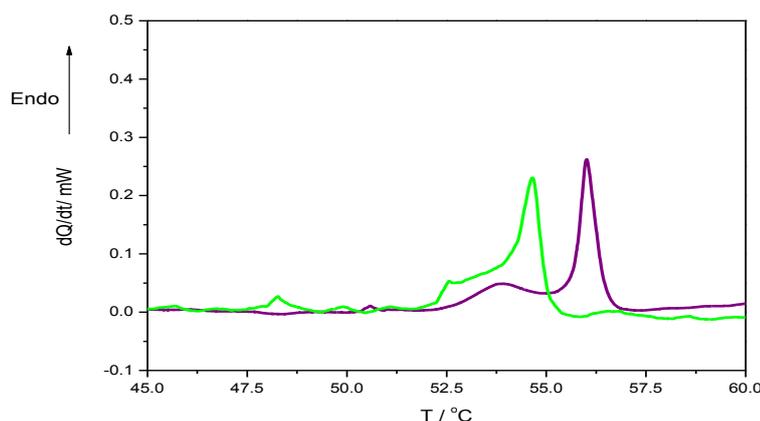


Figura 35. Curvas de DSC, LUV 100nm DSPC em tampão HEPES com e sem trealose. LUV 100nm DSPC em tampão HEPES m=12.85 mg (—) e LUV 100nm DSPC em tampão HEPES com trealose m= 13.72 mg (—). $\beta = 2^\circ\text{C}/\text{min}$; cápsula fechada de 50 μL .

Na figura 36 apresentam-se os resultados obtidos no estudo do efeito da presença de trealose no comportamento térmico de LUVs 100nm de DMPC de concentração 25mM. A temperatura de transição ($T = 24.7/24.9\text{ }^{\circ}\text{C}$), é muito próxima da reportada na literatura (Fidorra, 2009).

Os resultados apontam, tal como para o DSPC, para um aumento da temperatura de transição aquando da presença de trealose.

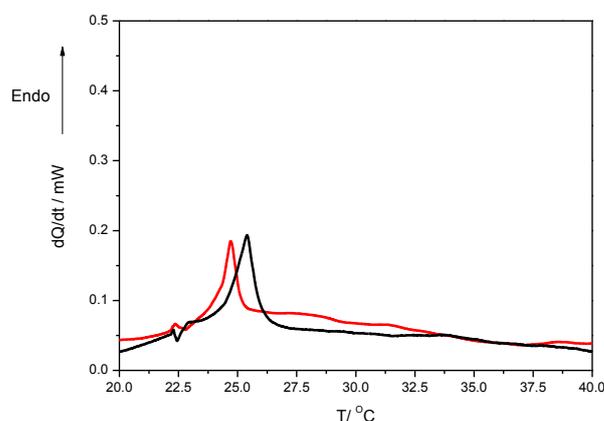


Figura 36. Curvas de DSC, LUV 100nm DMPC em tampão HEPES com e sem trealose. LUV 100nm DMPC em tampão HEPES $m=13.16\text{ mg}$ (—) e LUV 100nm DMPC em tampão HEPES com trealose $m= 13.13\text{ mg}$ (—). $\beta = 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$; cápsula fechada de $50\text{ }\mu\text{L}$.

Por fim, realizaram-se alguns ensaios com o objectivo de avaliar o efeito da introdução da sonda no comportamento térmico dos LUVs de DSPC, figura 37. O perfil das curvas parece, de algum modo, ser afectado pela presença da sonda, não se registando, porém, alterações significativas nos valores das temperaturas de transição.

Este estudo deve ser encarado como preliminar e um maior número de ensaios seria necessário para dar solidez à interpretação avançada.

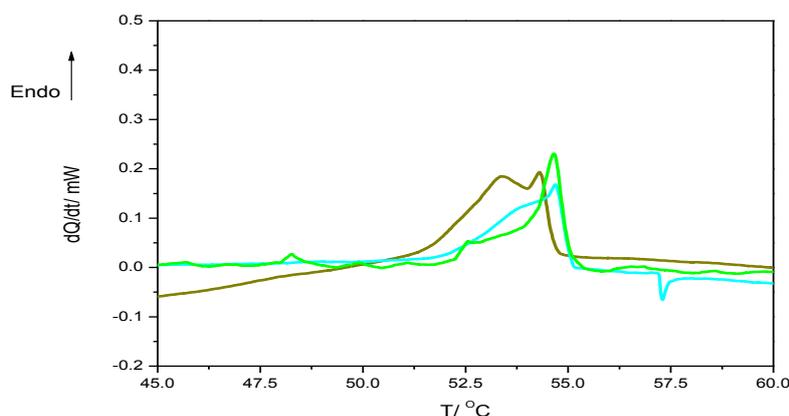


Figura 37. Curvas de DSC, LUV 100nm DSPC, DSPC:TMA-DPH e DSPC:NBD-DMPE em tampão HEPES. LUV 100nm DSPC em tampão HEPES [] = 25 mM e $m=12.85\text{ mg}$ (—), LUV 100nm DSPC:NBD-DMPE em tampão HEPES [] = 25 mM e $m= 13.42\text{ mg}$ (—) e LUV 100nm DSPC:TMA-DPH em tampão HEPES [] = 25 mM e $m= 12.53\text{ mg}$ (—). $\beta = 2^{\circ}\text{C}/\text{min}$; cápsula fechada de $50\text{ }\mu\text{L}$.

Tentou-se ainda obter as curvas de DSC de algumas das misturas estudadas, contudo a sensibilidade do aparelho não permitiu.

Conclusão

A sonda TMA-DPH é uma sonda facilmente fotodegradável, contudo, isso não afecta os resultados experimentais, já que nem toda a sonda irá sofrer fotodegradação e o fotoproduto não é fluorescente. Por outro lado, o NBD-DMPE não sofre grande fotodegradação, sendo a concentração deste similar no início e no final da experiência.

Reconhece-se também, que em todas as misturas estudadas, a anisotropia de fluorescência aumenta com a organização das bicamadas, já que tanto o TMA-DPH como o NBD-DMPE apresentam maior anisotropia quando a bicamada está na fase sólido ordenado do que na fase líquida desordenada. À medida que a temperatura aumenta, a membrana fica mais fluida e a anisotropia diminui, devido ao aumento da energia cinética do sistema.

Observou-se que numa mistura com transição de fase sólido ordenada - líquido desordenada, a presença de trealose aumenta a largura de transição. Na presença de colesterol, o efeito deste sobrepõe-se ao efeito da trealose, não havendo nenhuma variação significativa devido à presença de trealose no sistema.

Os diferentes valores de anisotropia obtidos na presença e ausência de trealose dependem apenas da viscosidade do solvente, pois os tempos de vida da sonda NBD-DMPE em DSPC, SpM e POPC em tampão HEPES sem trealose são idênticos aos obtidos em tampão HEPES com trealose.

Nos resultados de anisotropia do NBD-DMPE, é mais evidente o efeito da trealose na membrana, devido à posição da sonda, em relação à sonda TMA-DPH.

Era de esperar que os resultados obtidos na bicamada DMPC: DSPC e POPC: SpM fossem semelhantes, já que a natureza da transição das duas bicamadas é a mesma. Contudo, devido à diferença no comprimento das cadeias acilo do DMPC (14 carbonos) e do DSPC (18 carbonos), o efeito da trealose é mais evidente nesta bicamada, pois na zona de coexistência de fases e na fase fluida, existirão domínios que estarão mais expostos ao solvente do que outros, haverá uma *mismatch* nos lípidos da membrana. No caso da bicamada POPC: SpM, estes dois lípidos possuem o mesmo comprimento das cadeias acilo, o que faz com que não haja uma diferença de espessura tão grande entre as regiões da membrana na fase fluida e na fase gel como na bicamada DMPC: DSPC.

Através dos resultados preliminares de DSC, pode-se concluir que a sonda não interfere nas temperaturas médias de transição, já que estas se mantêm aproximadamente

iguais, bem como os valores de ΔH , apenas há um alargamento do pico obtido, já que a sonda é considerada como uma impureza.

Referências Bibliográficas

1. Abrams, F, and London, E., (1993), *Extension of the Parallax Analysis of Membrane Penetration Depth to the Polar Region of Model Membranes: Use of Fluorescence Quenching by a Spin-Label Attached to the Phospholipid Polar Headgroup*, *Biochemistry* 32, pp.10826-10831.
2. Almeida, R.F.M., Fedorov A., Prieto M. (2003). *Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts*. *Biophys. J.* 85: 2406-2416.
3. Barenholz, Y., Thompson T. (1999). *Sphingomyelin: biophysical aspects*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 102: 39-34.
4. Bartlett, G. R. (1959). *Phosphorus assay in column chromatography*. *J Biol Chem* 234(3): 466-468.
5. Birch, G.G. (1963) *Trehalose*. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 18: 201-225.
6. Cardoso, R. M., H. A. Filipe, et al. (2010). *Chain length effect on the binding of amphiphiles to serum albumin and to POPC bilayers*. *J Phys Chem B* 114(49): 16337-16346.
7. Chapman, D., Williams, R.M. and Ladbroke, B.D. (1967). *Physical studies of phospholipids. VI Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2 diacylphosphatidylcholines (lecithins)*. *Chem. Phys. Lipids*, 1: 445-475.
8. Cordone, L., Cottone G., Giuffrida S. (2007). *Role of residual water hydrogen bonding in sugar/water/biomolecule systems: a possible explanation for trehalose peculiarity*. *J. Phys.; Condens. Matter* 19: 205110.
9. Crowe, J.H. (2007). *Trehalose as a “chemical chaperone”*: *Fact and Fantasy*. *Molecular aspects of the stress response: chaperones, membranes and networks book*.
10. Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F. and Wistrom, C.A. (1987). *Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars*. *Biochem. J.*, 242: 1-10.

11. Crowe, J.H., Whittam, M.A., Chapman, D. and Crowe L.M. (1984). *Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates*. Biochim. Et Biophys. Acta, 769: 151-159.
12. Crowe, L.M, Mouradian, R., Crowe, J.H., Jackson, S.A. and Womersley, C. (1984). *Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities*. Biochem. Biophys. Acta, 769: 141-450.
13. Crowe, L.M. and Crowe J.H. (1995) *Freeze-dried liposomes*. En *Liposomes, new systems and new trends in their applications*. Peuisieux, Couvreur, Delattre and Devissaguet, Eds., Paris, 237-272.
14. Dill, K.A., Truskett T. M., et al. (2005). *Modeling water, the hydrophobic effect, and ion salvation*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 34:173-99.
15. Donnamaria, M.C., Howard E.I., Grigera, J.R. (1994) *Interaction of water with α,α -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach*. J. Chemical Society Faraday Transactions, 90: 2731-2735.
16. Elbein, A.D. (1974) *The metabolism of α,α -trehalose*. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 30: 227-256.
17. Feigenson, G.W. (2006). *Phase behavior of lipid mixtures*. Nat Chem Biol, 2(11): 560-563.
18. Ferreira, H., Lúcio M., Siquet C., Reis S. (2005) *Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos*. QUÍMICA;99:39-51.
19. Fidorra, M., Heimburg T., Seeger H.M. (2009). *Melting of individual lipid components in binary lipid mixtures studied by FTIR spectroscopy, DSC and Monte Carlo simulations*. Biochimica et Biophysica Acta. 1788. 600-607.
20. Gennis, R. B. (1988). *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York, Springer-Verlag.
21. Heimburg, T. (1998). *Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry*. Biochimica et Biophysica Acta 1415: 147-162.

22. Hiemenz, P. C. and R. Rajagopalan (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, CRC Press.
23. Hohne G.W.H, Hemminger W.F., Flammersheim H.J. (2003). *Differential Scanning Calorimetry*. Springer, 2ªEd.
24. Jovin, T. M. and W. L. Vaz (1989). *Rotational and translational diffusion in membranes measured by fluorescence and phosphorescence methods*. *Methods Enzymol* 172: 471-513.
25. Kaiser, RD, and London, E., (1998) *Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth*, *Biochemistry* 37 pp.8180-8190.
26. Kiselev, M.A., et al. (2005). *Influence of trehalose on the structure of unilamellar DMPC vesicles*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 256. 1-7.
27. Knoll, W., et al. (1981). *Small-Angle Neutron Scattering Study of Lipid Phase Diagram by the Contrast Variation Method*. *Biochemistry* 20: 6379-6383.
28. Lakowicz, R., J. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, 1ªEd. New York.
29. Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (1997). *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers.
30. Loura, L.M.S., de Almeida R.F.M., Coutinho A., Prieto M. (2003) *Interaction of peptides with binary phospholipid membranes: application of fluorescence methodologies*. *Chemistry and Physics of Lipids*; 122(1-2):77-96.
31. Loura, Luís M.S., Almeida, Rodrigo F.M. (2004). *Tópicos de Biofísica de Membranas*, Lidel. Lisboa.
32. Mabrey, S. and J. M. Sturtevant (1976). *Investigation of Phase-Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(11): 3862-3866.

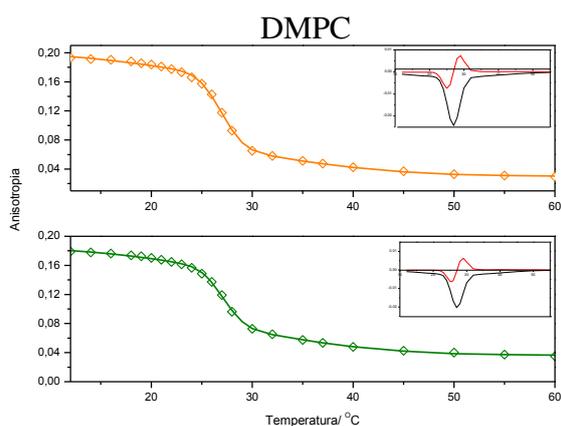
-
33. Massey, J.B. (2001). *Interaction of Ceramides with phosphatidylcoline, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1510: 167-184.
34. McMullen, T. P. W., R. N. A. H. Lewis, et al. (2004). *Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8(6): 459-468.
35. Michael E. Brown. (2001). *Introduction to Thermal Analysis – Techniques and Application*. Kluwer Academic Publishers, 2ªEd.
36. Moore, P. B., C. F. Lopez, et al. (2001). *Dynamical properties of a hydrated lipid bilayer from a multianosecond molecular dynamics simulation*. *Biophys J* 81(5): 2484-2494.
37. Moran, L. A., R. Horton, A., et al. (2011). *Principles of Biochemistry*, Prentice Hall.
38. Moreno, M. J., L. M. Estronca, et al. (2006). *Translocation of phospholipids and dithionite permeability in liquid-ordered and liquid-disordered membranes*. *Biophys J* 91(3): 873-881.
39. Mouritsen, Ole G. (2005). *Life as a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*, Spinger.
40. Palmeira, T. (2011). Relatório de estágio de Mestrado em Química. Universidade de Coimbra.
41. Pokorny, A., Almeida P.F.F., Vaz W.L.C. (2001). *Association of a Fluorescent Amphiphile with Lipid Bilayer Vesicles in Regions of Solid-Liquid-Disordered Phase Coexistence*. *Biophys. J.* 80: 1384-1394.
42. Richards, A.B., et al. (2002). *Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies*. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 871-898.
43. Sabbah, R.; Xu-Wu, A.; Chickos, J. S., Leitão, M. L. P.; Roux, M. V.; Torres, L. A. (1999). *Reference materials for calorimetry and differential thermal analysis*. *Thermochimica Acta*. 331. 93.

-
44. Santaella, C., Vierling P. (1995). *Molecular order and mobility within liposomal membrane made from highly fluorinated phospholipids*. Chemistry and Physics of Lipids; 77(2):173-7.
45. Segota, S., Tezak D. (2006). *Spontaneous formation of vesicles*. Advances in Colloid and Interface Science; 121(1-3):51-75.
46. Sousa, C., Nunes C., Lúcio M., Ferreira H., Lima J.L.F.C., Tavares J., et al. (2008) *Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the cellular membrane fluidity*. Journal of Pharmaceutical Sciences; 97(8):3195-206.
47. Stockl, M. et al, JBC. (2008). Vol. 283, No. 45: 30828 – 30837.
48. Stryer, L. (1988). *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company.
49. Tanford, C. (1991). *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Krieger Publishing Company.
50. Taylor, R. P., A. V. Broccoli, et al. (1978). *Enzymatic and colorimetric determination of total serum cholesterol. An undergraduate biochemistry laboratory experiment*. J Chem Educ 55(1): 63-64.
51. Vaz, W. L. C. (2008). *Properties of Lipid Bilayers*. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, John Wiley & Sons, Inc.
52. Vereb, J. S., Matkó J., Nagy, P., Farkas, T., Vígh, L., Mátyus, L., Waldmann T.A. (2003). *Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model*. PNAS. 100. 8053–8058.
53. Voet, D., Voet J. (2006). *Biochemistry*. Wiley.
54. Yeagle, P. L. (2004). *The Structure of Biological Membranes*. CRC Press.

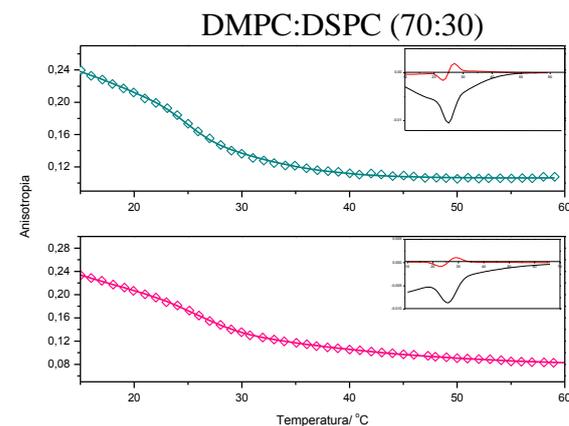
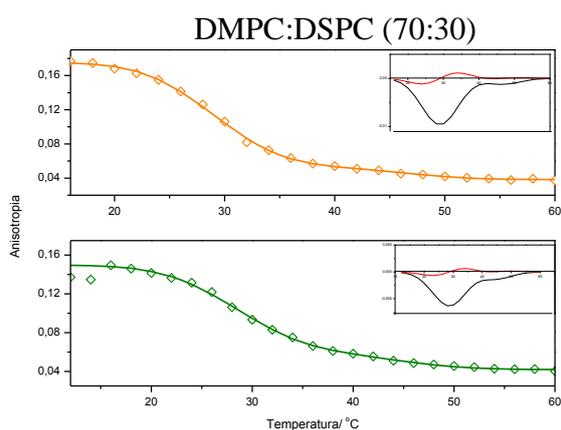
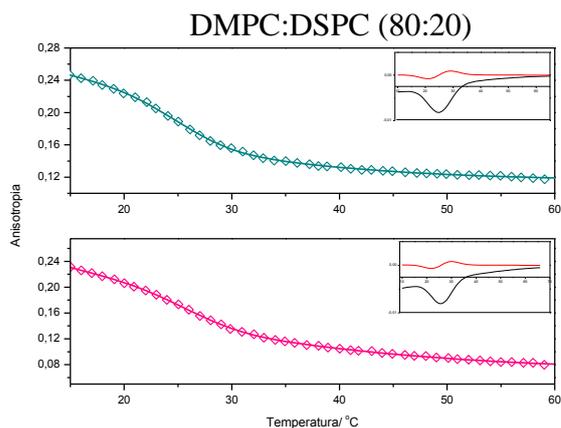
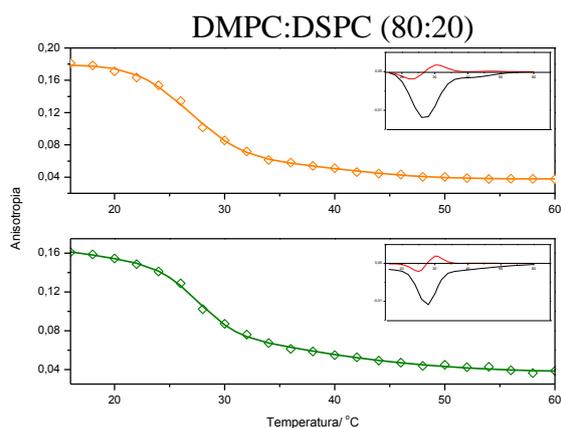
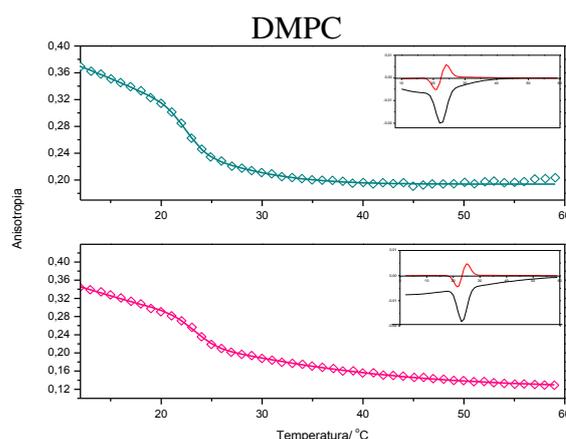
Anexos

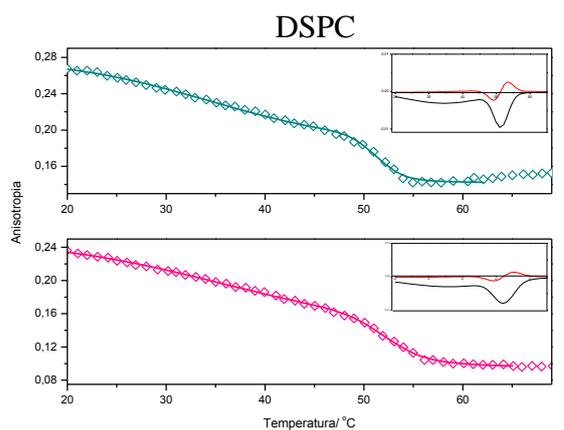
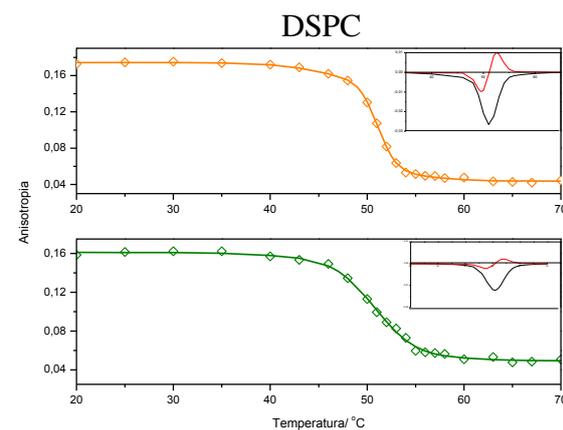
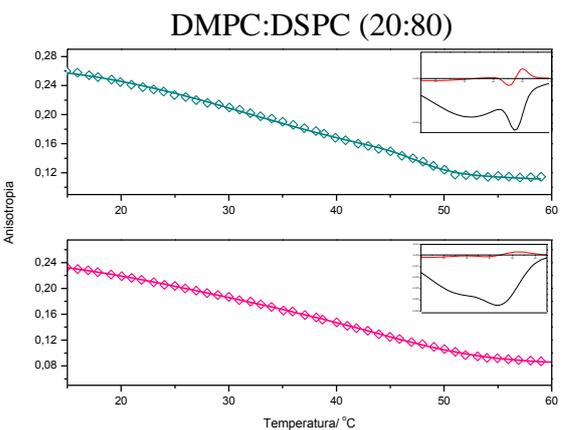
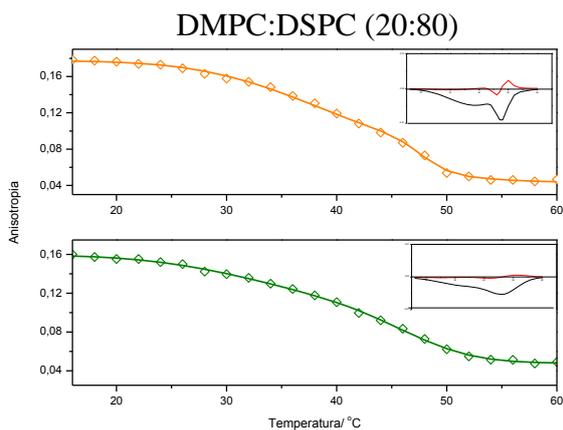
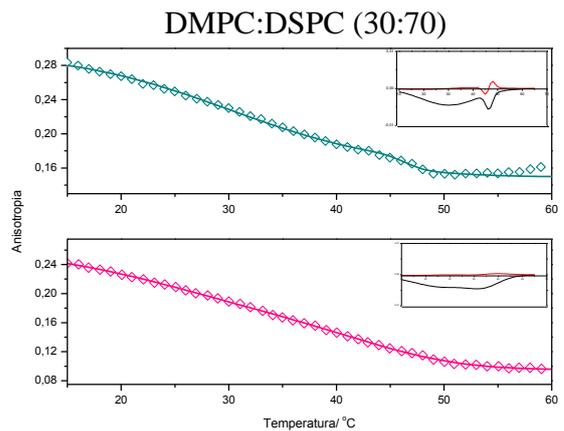
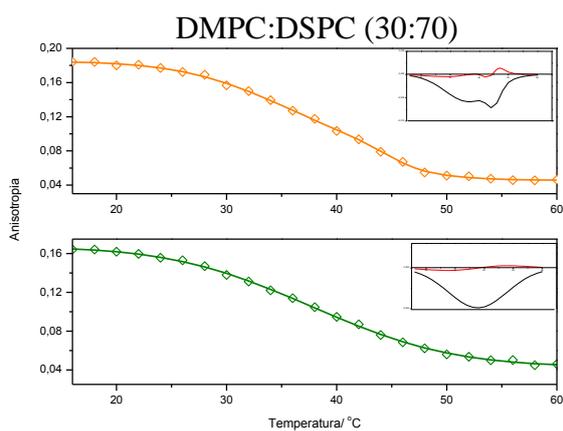
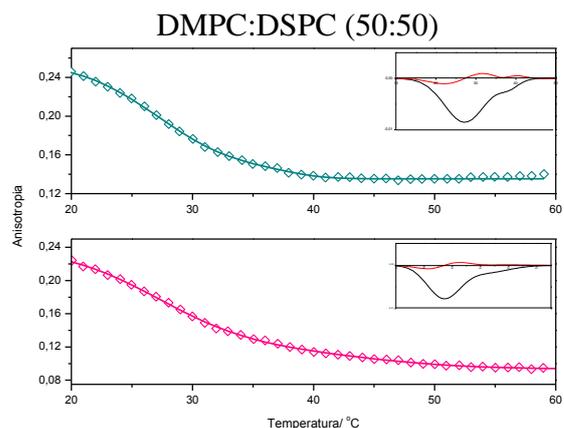
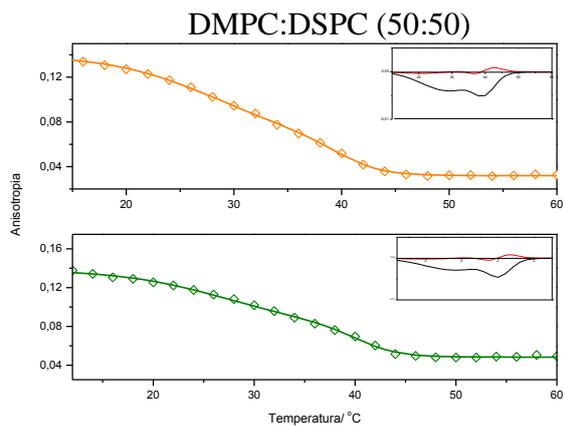
1. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE numa bicamada sólido ordenado – líquido desordenado, DMPC:DSPC, em diferentes fracções molares.

- Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH em **tampão HEPES** e em **tampão HEPES com trealose**



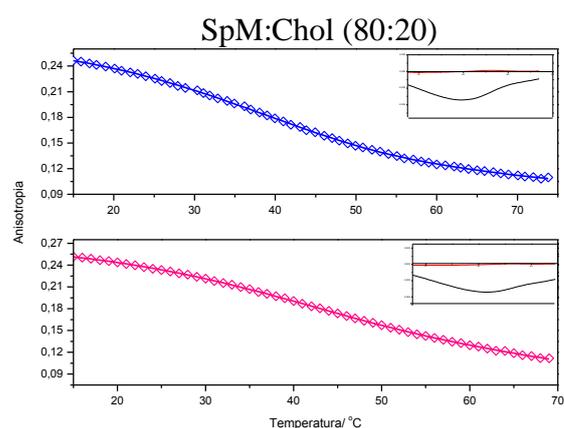
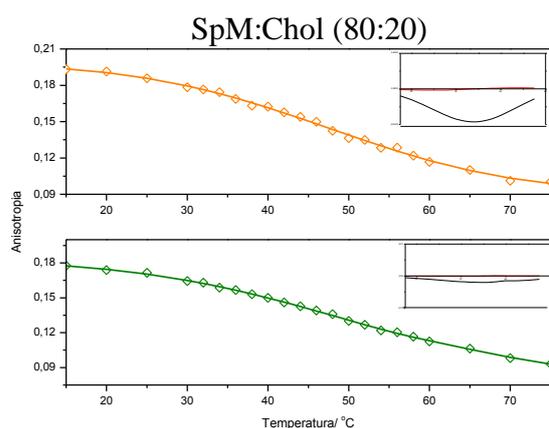
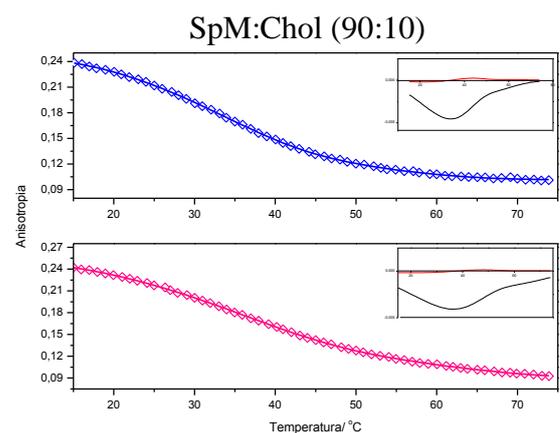
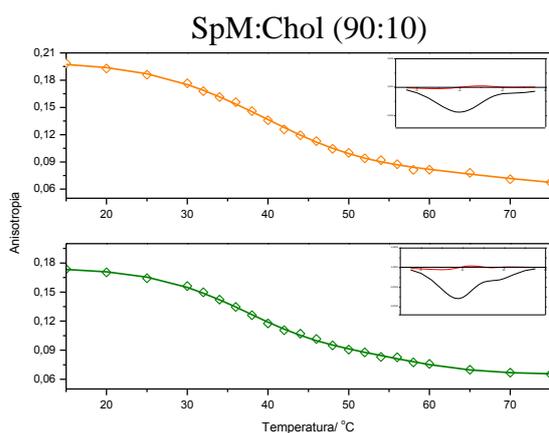
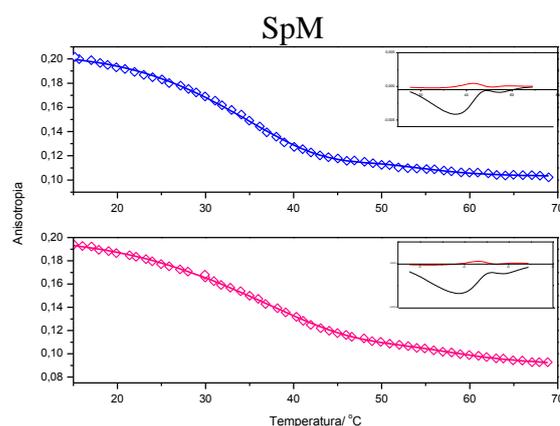
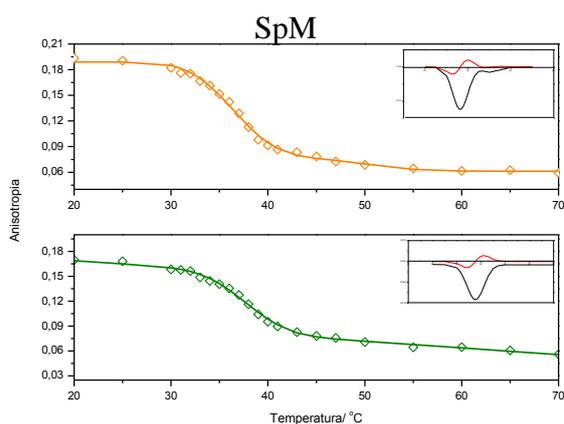
- Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em **tampão HEPES** e em **tampão HEPES com trealose**

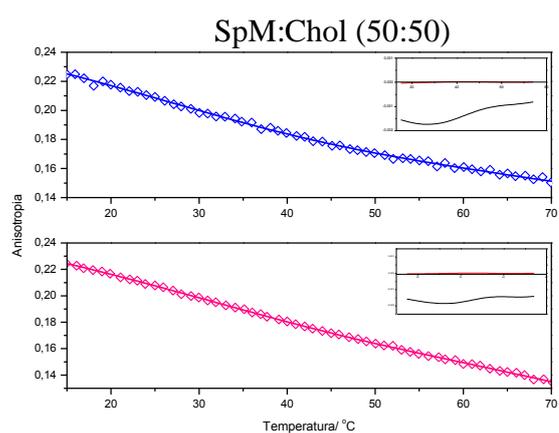
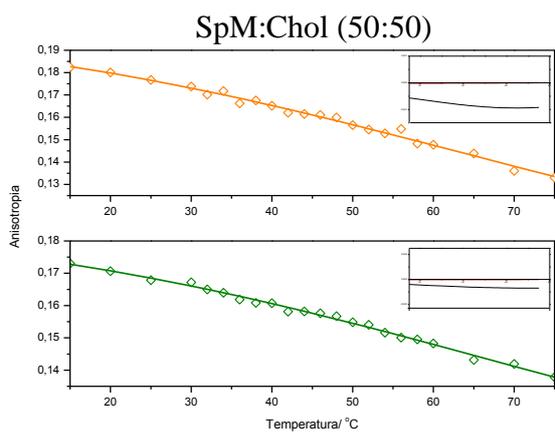




2. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE numa bicamada sólido ordenado – líquido desordenado – líquido desordenado, SpM:Chol, em diferentes frações molares.

- Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH em **tampão HEPES** e em **tampão HEPES com trealose**
- Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em **tampão HEPES** e em **tampão HEPES com trealose**





3. Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH e do NBD-DMPE numa bicamada POPC:SpM, em diferentes fracções molares.

- Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH em **tampão HEPES** e em **tampão HEPES com trealose**
- Anisotropia de fluorescência do NBD-DMPE em **tampão HEPES** e em **tampão HEPES com trealose**

