



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diogo António da Cruz Figueiredo Pereira

PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANAS
POR ULTRASSONS DE ALTA FREQUÊNCIA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal,
orientada pelo Professor Doutor Luis Arnaut e co-orientada pela Professora Doutora Maria João Moreno
e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

Diogo António da Cruz Figueiredo Pereira

Permeabilização de membranas por ultrassons de alta frequência

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Medicinal**

Orientador: Professor Doutor Luis Arnaut
Co-Orientador: Professora Doutora Maria João Moreno

Setembro de 2019

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Com o fim de mais um ciclo fica o sentimento de que não era possível cumprir os objetivos propostos sem o contributo de muitas pessoas que foram essenciais para mim, a nível pessoal, e para os projetos em que me inseri.

Ao meu orientador, Professor Luis Arnaut, pelo apoio científico e por toda a ajuda que permitiu o desenvolvimento deste projeto ambicioso. Agradeço também a oportunidade de, ao longo dos últimos anos, desenvolver projetos diversificados que me possibilitaram crescer a nível académico.

À minha co-orientadora, Professora Maria João Moreno, pelo apoio científico e por todos os conselhos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Patrícia Martins, pelo tempo dedicado, pela transmissão de conhecimentos e pelo fulcral apoio experimental. Um agradecimento especial por todas as questões respondidas, e por toda a paciência, uma ajuda indispensável para a concretização deste projeto.

Ao Alexandre Silva ficam a faltar as palavras para todo apoio e amizade ao longo dos anos. Obrigado por todas as experiências e conquistas que tivemos juntos. Todos os projetos em que estás inserido ficam mais completos com a tua presença, e este não foi, de forma alguma, uma exceção.

A todo o grupo de Estrutura, Energia e Reatividade, pelo ambiente fantástico vivido que permite o crescimento a nível pessoal e científico. Ao Fábio, à Claire e ao Professor Carlos Serpa, pela discussão constante dos trabalhos, o que permite que eles cresçam. Ao Hélder por, mesmo depois de os nossos caminhos terem divergido, continuar sempre disponível para tudo o que eu necessito. À Maria Inês por toda a ajuda e amizade nos últimos meses, em especial no último e derradeiro mês, sem ti tinha sido muito mais difícil. Ao Amílcar pelas brilhantes imagens realizadas. À Catarina pelo exemplo que dá a todo o grupo. Ao Daniel Malva por ser o companheiro de muitas batalhas difíceis. À Lígia pela ajuda na citometria de fluxo. A todos, por fantásticos anos de muito trabalho e amizade.

À Doutora Luísa Cortes e à Doutora Tatiana Catarino pela ajuda nos ensaios da microscopia de confocal e análise das imagens.

A todos os meus amigos pela companhia, aventuras e distrações. O caminho era sem dúvida impossível de percorrer sem vocês.

Ao meu padrinho, Bernardo, por estar sempre lá quando eu precisava. Pelos puxões de orelhas, mas também pela amizade que me fez crescer imenso desde o primeiro dia que entrei na faculdade até ao último.

A Coimbra que sabe tão bem receber e proporcionar momentos inesquecíveis.

À minha família por todo o apoio incondicional e por me darem todo o apoio e espaço que necessitei ao longo destes anos.

Índice

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Símbolos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 – Membranas Biológicas	2
1.1.1 – Bicamada Lipídica	3
1.1.2 – Propriedades das membranas biológicas	5
1.1.3 – Permeabilidade	6
1.1.4 – Modelos de Membranas	10
1.2 – Métodos físicos para aumentar a permeabilidade	12
1.2.1 - Caracterização das ondas fotoacústicas	14
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	17
2.1 Preparação de GUV's	18
2.1.1 Preparação de Soluções	18
2.1.2 Preparação de GUV's por PVA-assisted swelling	19
2.2 Técnicas de Imagiologia	21
2.2.1 Microscopia de Fluorescência	21
2.2.2 Microscopia Confocal	22
2.3 Aplicação de Ondas Fotoacústicas	24
2.3.1 Caracterização das Ondas Fotoacústicas	25
2.4 Caracterização dos GUV's	26
2.4.1 Microscopia Confocal	26
2.4 Citometria de Fluxo	27
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	29
3.1 – Otimização do protocolo de formação de GUV's	30

3.2 – Geração de ondas Fotoacústicas	33
3.3 – Permeabilidade através das membranas dos GUUV's	35
3.3.1 – Microscopia de Fluorescência.....	36
3.3.2 – Microscopia Confocal.....	39
3.3.3 – Resultados de Citometria de Fluxo	44
3.3.4 Permeação utilizando GFP	47
Capítulo 4 - Conclusão	51
4.1 - Perspetivas futuras	53
Capítulo 5 - Bibliografia	55
Material Suplementar	63

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura química do POPC e estrutura química da Rho-DPPE.	5
Figura 2 Difusão passiva de moléculas pela bicamada lipídica de membranas.	7
Figura 3 Estrutura química de FITC-dextran.	9
Figura 4 Tipos de vesículas unilamelares.	11
Figura 5 Representação esquemática da produção de GUV's por hidratação de um filme lipídico seco sob um filme de polímero.	12
Figura 6 Ondas de pressão produzidas por um material piezofotónico	15
Figura 7 Espectro de absorção UV/visível de soluções de FITC-dextran e de GFP em Sacarose 280 mM.	19
Figura 8 Espectros de excitação e emissão de fluorescência de Rho-DPPE e FITC-dextran.	22
Figura 9 Imagem ilustrativa do funcionamento do microscópio de confocal.	23
Figura 10 Imagem ilustrativa da montagem experimental para aplicação das ondas fotoacústicas.	25
Figura 11 Demonstração do tratamento das imagens utilizando o programa ImageJ e imagens de Microscopia de Confocal.	27
Figura 12 Efeito do repouso nos GUV's. GUV's produzidos sem repouso e com repouso de 30 min entre a hidratação e a diluição.	30
Figura 13 Efeito da presença de FITC-dextran no filme de PVA na produção de GUV's. Solução com 5% de PVA em sacarose 280 mM e FITC-dextran 180 μ M e solução com 5% PVA em sacarose 280 mM.	32
Figura 14 Ensaio de pressão com e sem a placa de 8 poços aplicando um laser com 50 mJ cm^{-2} de intensidade.	34
Figura 15 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 50 mJ cm^{-2} e uma exposição de 10 minutos.	36
Figura 16 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 50 mJ cm^{-2} e uma exposição de 20 minutos.	37
Figura 17 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 100 mJ cm^{-2} e uma exposição de 10 minutos.	37
Figura 18 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 100 mJ cm^{-2} e uma exposição de 20 minutos.	38

Figura 19 Efeito de diferentes intensidades e tempos de exposição das ondas fotoacústicas nos GUV's.	41
Figura 20 Efeito das ondas fotoacústicas na área dos GUV's.	42
Figura 21 Efeito das ondas fotoacústicas na intensidade de fluorescência média do interior aquoso dos GUV's.	43
Figura 22 Intensidade de fluorescência para amostras de GUV's encapsulando diferentes concentrações de FITC-dextran em sacarose 280 mM	44
Figura 23 Comparação dos eventos de uma amostra de FITC-dextran em sacarose 280 mM, com uma amostra de GUV's com FITC-dextran encapsulado.	45
Figura 24 Número de eventos normalizados analisados por citometria de fluxo e a intensidade de fluorescência média normalizada.	46
Figura 25 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade de 100mJ cm^{-2} durante 10 minutos em GUV's com GFP encapsulado, observado por microscopia de confocal.	48
Figura 26 Efeito de ondas fotoacústicas na área e na fluorescência de GUV's com GFP encapsulado.	48
Figura 27 Número de contagens e intensidade de fluorescência média de GUV's com GFP encapsulado, analisado por citometria de fluxo.	49
Figura 28 Espectros normalizados de fluorescência de GFP. A- Análise da fluorescência do GFP antes e depois da exposição a ondas fotoacústicas com uma fluência do laser de 100 mJ cm^{-2} durante 10 minutos por espectroscopia de fluorescência. B - Fluorescência normalizada de GFP antes e depois de exposição a ondas fotoacústicas com uma fluência do laser de 100 mJ cm^{-2} durante 10 minutos por citometria de fluxo.	50

Lista de Tabelas

Tabela 1 Principais alterações do protocolo durante a fase de otimização do mesmo	33
---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	Absorvância
C	Concentração
CD	Dicroísmo circular (do inglês <i>Circular dichroism</i>)
CMC	Concentração Micelar Crítica (do inglês <i>Critical micelle concentration</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPPE	1,2-dipalmitoil,sn,glicero-3-fosfatidiletanolamina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FSC	Retrodispersão (do inglês <i>Foward Scatter</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês <i>Green fluorescent protein</i>)
GUV	Vesícula unilamelar gigante (do inglês <i>Giant unilamellar vesicle</i>)
LUV	Vesícula unilamelar grande (do inglês <i>Large unilamellar vesicle</i>)
MnTPP	Mn (III) 5, 10, 15, 20-tetrafenilporfirinato
PAT	Tomografia Fotoacústica (do inglês <i>Photoacoustic tomography</i>)
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PVA	Álcool polivinílico (do inglês <i>Polyvinyl alcohol</i>)
Rho	Rodamina (do inglês <i>Rhodamine</i>)
SSC	Dispersão lateral (do inglês <i>Side Scatter</i>)
SUV	Vesícula unilamelar pequena (do inglês <i>Small unilamellar vesicle</i>)
TM	Temperatura de Fusão (do inglês <i>Melting Temperature</i>)
UV	Ultravioleta
Pmax+	Pressão de compressão
Pmax-	Pressão de rarefação
Δt+	Duração da pressão de compressão
Δt_r	Tempo de subida do primeiro ciclo positivo
ε	Coefficiente de Absortividade Molar

Resumo

O estudo de ondas fotoacústicas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, pela sua versatilidade em inúmeras aplicações. Uma das aplicações recentemente descrita na literatura é o facto de os métodos acústicos serem outra abordagem a um problema difícil e dispendioso de resolver, a transfeção.¹ A utilização de ondas fotoacústicas consiste na conversão rápida e eficiente da energia de um pulso de laser, numa onda de pressão intensa capaz de, transientemente, permeabilizar camadas exteriores de pele ou a membrana celular.²

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das ondas fotoacústicas nas propriedades das bicamadas lipídicas, em particular ao nível da permeabilidade através das mesmas. Para este estudo foram usadas Vesículas Unilamelares Gigantes como modelo simples da membrana celular.

Foram usados GUV's contendo no seu interior aquoso uma molécula fluorescente com grande peso molecular que devido ao seu tamanho e polaridade não permeia a bicamada lipídica em condições normais. Para avaliar a permeação utilizaram-se várias técnicas complementares como a microscopia de fluorescência, entre elas, a microscopia confocal, e a citometria de fluxo. Estes recursos foram utilizados para perceber se a fluorescência dos GUV's diminui depois de estes serem expostos a ondas fotoacústicas.

Os GUV's foram sujeitos a fluências de um laser de picossegundos 50 e 100 mJ cm⁻² durante 10 e 20 minutos. Após a exposição às ondas fotoacústicas o tamanho dos GUV's não se alterou, mas observou-se uma diminuição da fluorescência do interior dos GUV's quando comparado com os controlos efectuados. Conclui-se assim que as ondas fotoacústicas conseguem aumentar a permeabilidade ao nível da bicamada lipídica.

Abstract

The study of Photoacoustic waves has notably increased in recent years, due to his versatility in numerous applications. One of the applications described recently, is that acoustic methods are another approach to a difficult and expensive problem to solve, transfection.¹ Use of photoacoustic waves consists in the fast and efficient conversion of energy, from a pulsed laser, into a pressure wave capable of, transiently, permeabilizing outer layers of skin or cell membrane.²

The objective of this work was to evaluate the effect of photoacoustic waves on the properties of lipid bilayers, with special focus on the permeability of the cell membrane and understand the underlying mechanism. For this study we used Giant Unilamellar Vesicles as a simple model for the cell membrane.

GUV's were encapsulated with a fluorescent molecule with a large molecular weight which in a, without external stimuli, doesn't permeate the lipid bilayer. To evaluate this permeation, several complementary techniques were used, namely fluorescence microscopy, like confocal microscopy and flow cytometry. These resources were used to understand if the fluorescence in the inner medium of the formed GUV's would decrease after they were exposed to photoacoustic waves.

The GUV's were subjected to a 50 and 100 mJ cm⁻² picosecond laser for 10 and 20 minutes. After the exposure to the generated photoacoustic waves GUV's size remained the same but, there the inner fluorescence of the GUV's decreased compared to the controls used. It can be concluded that photoacoustic waves can increase the permeability of large molecules through the lipid bilayer.

Capítulo 1 – Introdução

1.1 – Membranas Biológicas

A ideia da existência de uma membrana que cobre a superfície das células, tem a sua origem na descoberta da osmose. Este fenómeno foi originalmente descrito por Jean Antoine Nollet em 1748.^{3,4}

As membranas biológicas são constituídas por lípidos, maioritariamente da classe fosfolípidos, e por proteínas. Elas estão organizadas numa bicamada fosfolipídica que é a estrutura básica de todas as membranas.⁵ Estas membranas fornecem a estrutura fundamental de células e vírus. Como muito do que acontece numa célula ocorre dentro ou através das membranas biológicas, o estudo destas rapidamente despertou o interesse de campos científicos como da Biologia, da Química entre outras áreas.⁶

Nos últimos anos, a comunidade científica tem olhado para a membrana celular como uma folha fina fechada que cumpre dois papéis fundamentais: (a) um papel morfológico – delimita a célula do seu microambiente externo e confina os seus organelos celulares; (b) um papel funcional – regula a troca de substâncias entre os meios interno e externo, mantém ativamente a assimetria iónica entre os dois lados da membrana e internaliza ou externaliza intermediários de sinais físicos e químicos importantes para as suas funções celulares.⁷

Devido a estas importantes características estruturais e funcionais, as membranas biológicas podem ser consideradas como essências à vida. Muitos processos biológicos importantes na célula ocorrem nas membranas ou são mediados por membranas, como transporte, crescimento, resposta imunológica, sinalização e atividade enzimática. Uma função importante da bicamada lipídica é atuar como uma barreira de permeabilidade passiva a iões, e outras substâncias moleculares, deixando o transporte transmembranar de moléculas com maior peso molecular para transportadores e canais ativos⁴, gerar impulsos nervosos, a transdução de sinal por recetores hormonais, processos de infeção viral,⁸ regular a utilização de energia armazenada em gradientes iónicos transmembranares e ser precursor para a geração de segundos mensageiros.⁹

O grande interesse da comunidade científica no estudo das propriedades das membranas celulares e a grande complexidade da sua composição e organização,

têm motivado o desenvolvimento de uma variedade de sistemas modelo mais simples.¹⁰ Estes modelos permitem o estudo das características físicas e químicas das membranas em separado. É possível então, partindo de modelos simplificados de membranas, controlar a sua composição lipídica e tornar este modelo mais complexo, ou não, adicionando ou retirando proteínas de membranas, glicoproteínas entre outras moléculas que ajudam a perceber alguns comportamentos da bicamada.

1.1.1 – Bicamada Lipídica

Sabe-se que as membranas são tipicamente fluidos, líquidos cristalinos, contendo principalmente lipídios e proteínas.¹¹ O estado dinâmico da bicamada lipídica foi descrito em 1972 por Singer e Nicolson¹² como um dos princípios fundamentais do modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana.¹³

Os lípidos são moléculas pequenas hidrofílicas de um lado e hidrofóbicas do outro.¹⁴ Estas moléculas chamam-se anfífilas e são muito importantes em estudos de bicamadas lipídicas. O tipo de agregação mais simples de moléculas anfífilas são as micelas. Estas são formadas quando o surfactante é dissolvido em excesso de água e atinge uma certa concentração, chamada de concentração micelar crítica (CMC)¹⁵, em que se torna energeticamente mais favorável juntar as caudas hidrofóbicas e posicionar as cabeças polares em direção ao solvente. Esta estabilidade energética causada devido a esta configuração dos lípidos é principalmente assegurada por interações hidrofílicas e hidrofóbicas, não covalentes, exercidas entre as moléculas da membrana e o meio aquoso.⁷ Os grupos polares estão orientados para o solvente, onde interagem por ligações por pontes de hidrogénio, e as cadeias hidrofóbicas estão orientadas para o centro das duas camadas. Apesar das interações hidrofóbicas serem a maior causa da estrutura da bicamada lipídica existem outros tipos de interações que estão também envolvidos como, por exemplo, interações eletrostáticas e forças de *van der Waals*.

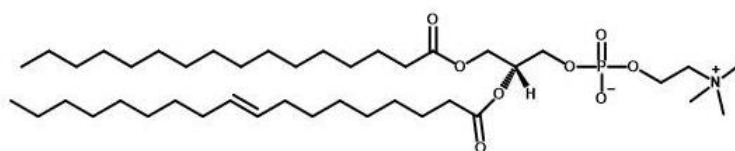
A grande maioria dos modelos inclui, como característica comum, a existência de uma bicamada lipídica. De acordo com este modelo, as proteínas estão incorporadas na bicamada fosfolipídica e conferem à membrana um aspeto semelhante a um mosaico. Por outro lado, o carácter fluido é fornecido pela capacidade de todos os componentes da membrana se difundirem lateralmente no plano da bicamada.⁷ A espessura desta bicamada varia entre 4 e 6 nm.¹⁶

Em membranas biológicas, os lípidos podem encontrar-se em duas fases distintas. Essa separação é conhecida por separação de fases lipídicas gel-fluido. Os fosfolípidos puros são caracterizados por uma temperatura de fusão (T_m) à qual eles mudam de um estado de gel sólido para o estado líquido cristalino que está geralmente presente em membranas biológicas.¹⁷ O estado de gel é caracterizado por uma estrutura ordenada e firmemente compactada, já o estado fluído é caracterizado pelo seu empacotamento mais solto e um movimento molecular mais rápido.

Existem centenas de diferentes espécies lipídicas nas células¹⁸ que podem ser agrupadas em três classes principais: glicerofosfolípidos, esfingolípidos e esteróides.

Neste trabalho foram utilizados maioritariamente duas fosfatidilcolinas, que pertencem ao grupo dos glicerofosfolípidos, representados na figura 1: o POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) e o DPPE (1,2-dipalmitoil,sn,glicero-3-fosfatidiletanolamina) ligado a uma molécula de Rho (Rodamina B).

A - POPC



B - Rho-DPPE

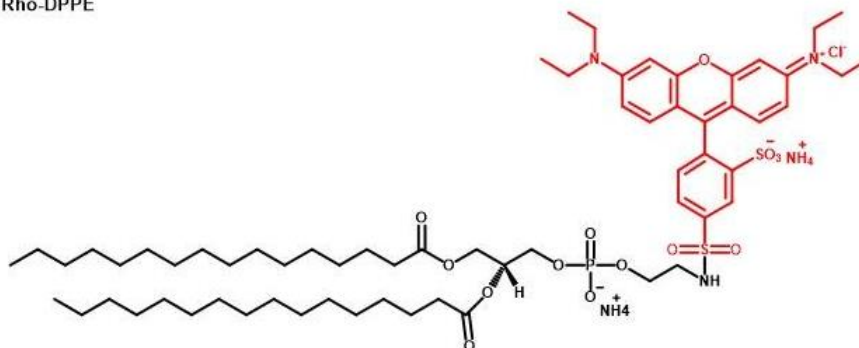


Figura 1 Estrutura química do POPC (A), e estrutura química da Rho-DPPE (B).

Também é possível utilizar outro componente importante da bicamada lipídica em modelos simples. O colesterol é uma molécula lipídica que é sintetizada por animais. Tem um papel fulcral por modular a rigidez,²¹ espessura,²² estabilidade²³ e fluidez²⁴ da membrana.²⁵ Além disso é responsável por proteger a integridade da membrana e a viabilidade celular, aumentando ou diminuindo a sua rigidez e manter a fluidez da membrana, contribuir para os movimentos celulares, sinalização celular e alterar a forma da célula.⁵

1.1.2 – Propriedades das membranas biológicas

Do ponto de vista biofísico, as membranas biológicas possuem certas características que se alteram quando se modificam os lípidos que formam a bicamada. Essas propriedades passam pelo ponto de fusão (T_m), a fase em que se encontra bicamada, a curvatura, a elasticidade, a fluidez, o potencial electroestático e a permeabilidade.

Uma das características mais importantes das membranas é o seu ponto de fusão. Os processos de fusão são transições entre as duas fases da membrana que exibem propriedades físicas diferentes. A baixas temperaturas, as cadeias lipídicas são ordenadas em configuração totalmente *trans*. Quando o sistema está sujeito a altas temperaturas, estas cadeias são desordenadas devido à rotação em torno das ligações C-C dentro das cadeias. As membranas estão numa fase gel ordenada em temperaturas baixas, abaixo da sua T_m , enquanto que estão numa fase fluída em temperaturas elevadas, acima da sua T_m . Outras condições que influenciam o ponto de fusão são a pressão, o solvente, a voltagem e as proteínas presentes na membrana.¹⁴

Outra das propriedades essenciais é o potencial eletrostático. O fenómeno eletrostático desempenha um papel crucial em muitos processos biológicos. O potencial zeta é o termo científico para potencial electrostático em sistemas coloidais, e relaciona o potencial elétrico na interface da dupla camada e o potencial elétrico do meio.²⁶ O potencial resulta da orientação anisotrópica dos lípidos numa bicamada e da orientação dos dipolos da água na interface bicamada lipídica-água.¹⁵ Para as membranas é significativo porque, por exemplo, as interações eletrostáticas podem levar a uma acumulação de espécies carregadas perto da superfície da membrana, que podem então atuar como um local catalítico.²⁷ Estas cargas, quando acumuladas, afetam a distribuição de iões na zona da interface entre a bicamada e o meio. Um aumento na concentração de contra iões próximos à superfície da membrana resulta na formação de uma dupla camada elétrica.²⁸ O potencial zeta é, tipicamente, medido em mV.

1.1.3 – Permeabilidade

O transporte de substâncias através de uma membrana lipídica é um processo biológico fundamental que é importante para pequenas moléculas neutras e muito relevante em entrega de fármacos. O transporte de substâncias por membranas biológicas tem um papel fundamental na distribuição de fármacos, no seu efeito terapêutico e nos seus efeitos adversos.²⁹ Os mecanismos de transporte molecular

através das membranas podem ser classificados em duas categorias: transporte ativo e transporte passivo³⁰ A maioria das moléculas neutras são transportados passivamente através da membrana (Figura 2). Assim, o conhecimento da permeação passiva é importante pois é o mecanismo predominante na permeação de fármacos.³¹ Este tipo permeação tem inúmeras aplicações em química medicinal, nanotecnologia, toxicologia ambiental e aplicações médicas e farmaceuticas.³² Infelizmente o mecanismo de permeação deste tipo de moléculas através de membranas, apesar de muito estudado pela comunidade científica, é difícil de replicar experimentalmente devido à pequena escala e complexidade dos sistemas de bicamada.³³

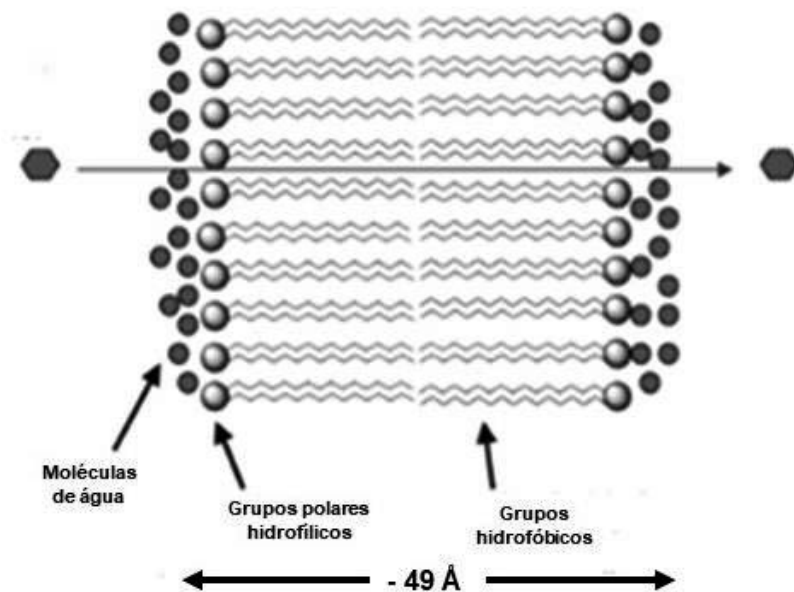


Figura 2 Difusão passiva de moléculas pela bicamada lipídica de membranas. (adaptado de ³¹).

O facto de um fármaco ter menor peso molecular pode influenciar a sua passagem por uma bicamada lipídica por permeação passiva. Contudo existem outras propriedades que influenciam a passagem de certas moléculas como a sua carga e a sua lipofilicidade. Moléculas com maiores lipofilicidade são tipicamente mais permeáveis que moléculas menos lipofílicas através do núcleo central apolar da membrana biológica.³¹ Moléculas com cargas positivas vão ter mais dificuldades em permear passivamente uma membrana biológica.

Quanto maior for a molécula menos facilitada é a permeação passiva por membranas biológicas. Moléculas muito grandes, com grande peso molecular, não conseguem passar pela região compacta da bicamada lipídica como as moléculas mais pequenas.³⁴ Para este tipo de moléculas maiores e menos lipofílicas as membranas biológicas têm mecanismos seletivos para a permeação, tais como, a difusão facilitada, o transporte mediado por proteínas, entre outros.⁵

Outro aspeto a ter em conta quando se fala em permeabilidade de membranas biológicas são os seus constituintes. Um destes constituintes muito importante é o colesterol. O colesterol influencia substancialmente as propriedades de permeabilidade da bicamada lipídica e membranas celulares.³⁵ Para estas barreiras o aumento ou a diminuição do colesterol tem várias consequências. Por exemplo, a sua diminuição afeta a função da membrana, diminuindo a sua permeabilidade e alterando seu comportamento de maneiras imprevisíveis.³⁶

Tendo em conta que a permeação por transporte passivo de membranas biológicas é uma área de enorme expansão e muito importante para áreas de estudo em que ao longo dos anos têm sido desenvolvidas por grupos de investigação no Departamento de Química, foi proposto para este trabalho o desenvolvimento de uma forma de aumentar a permeação num modelo simples de uma bicamada lipídica com uma técnica mecânica, que utiliza ondas fotoacústicas.

Para estudar a permeabilidade num modelo simples de uma membrana biológica, neste trabalho usou-se um marcador fluorescente: dextran marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextran). O FITC-dextran é um polissacarídeo de vários comprimentos composto de moléculas de glucose ramificadas (Figura 3).³⁷ Estas moléculas estão disponíveis comercialmente em diferentes pesos moleculares variando de 3 a 2000 kDa.³⁸ Este marcador é muito utilizado em ensaios de permeação para tentar entender alguns mecanismos de permeação de moléculas grandes por bicamadas lipídicas pois, por microscopia de fluorescência, entre outras técnicas, é possível a sua visualização e quantificação.

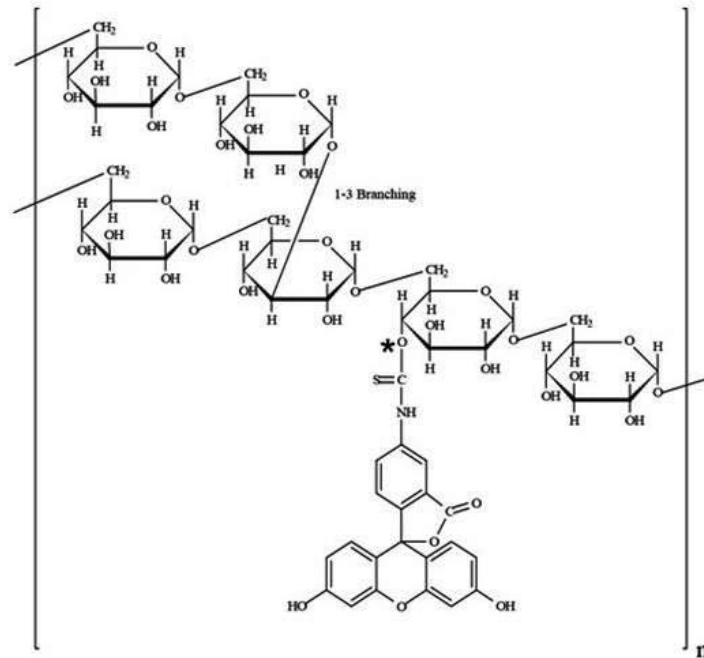


Figura 3 Estrutura química de FITC-dextran. (adaptado de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/fluorescein-isothiocyanate-dextran.html>).

Além de todos os tipos de permeação descritos em cima, temos também métodos mecânicos que ajudam a permear moléculas que não seriam espetáveis, como o FITC-dextran. Estes métodos produzem deformações mecânicas temporárias na membrana celular e facilitam a passagem de moléculas¹ que não permeariam a membrana de uma forma espontânea/natural. Existem algumas técnicas descritas na literatura que conseguem destabilizar a membrana, sendo um exemplo, as ondas de stress induzidas por laser.^{39,40} Já foi conseguido permear células com DNA utilizando as ondas fotoacústicas.¹ No seguimento deste sentiu-se a necessidade de utilizar um modelo mais simples para tentar compreender o mecanismo de ação destas ondas, que ainda é desconhecido. Neste trabalho foi utilizado este método mecânico que consegue destabilizar membranas biológicas e aumentar a sua permeabilidade. Para isso foi utilizado um laser pulsado para gerar ondas fotoacústicas⁴¹ e avaliar a permeação de moléculas que não eram expectáveis que conseguissem permear uma bicamada lipídica.

1.1.4 – Modelos de Membranas

Um problema característico dos estudos das membranas biológicas é o ambiente complexo no qual as proteínas constituintes e os lípidos são expostos : um núcleo de membrana apolar separado de dois compartimentos aquosos distintos por uma interface aquosa-hidrofóbica complexa.⁴² Devido a esta complexidade, a comunidade científica tem tentado desenvolver sistemas menos complexos para estudar algumas das propriedades mais importantes da bicamada lipídica.

Bicamadas lipídicas de um único ou de um número reduzido de espécies lipídicas, são frequentemente usadas como modelos biomiméticos de membranas celulares. São possíveis mimetizar várias estruturas de membranas com as propriedades intrínsecas de uma bicamada lipídica, bem como a sua interação com outras moléculas biológicas.⁴³ Entre essas estruturas existem vesículas multilamelares e unilamelares de diferentes tamanhos.

As vesículas unilamelares são modelos de bicamadas lipídicas cujo tamanho, geometria e composição podem ser adaptados com precisão. Estes incluem bicamada na forma de vesículas de tamanhos variados de 50 nm (vesículas unilamelares pequenas, SUV's) a 100 μ m (vesículas unilamelares gigantes, LUV's).⁴⁴ Os SUV's apresentam uma curvatura pronunciada e são menos compactados que as outras vesículas. No entanto, os SUV's oferecem vantagens específicas para alguns estudos físico-químicos. Devido ao seu pequeno diâmetro, a sua atividade de dispersão da luz é mínima e os métodos espectroscópicos, como a espectroscopia de dicroísmo circular (CD), podem ser utilizados para detetar alterações na conformação de proteínas depois de estas estabelecerem uma ligação.⁴⁵ Existem também os LUV's (vesículas unilamelares grandes) que podem ser produzidos por múltiplas extrusões a pressões moderadas usando filtros de policarbonato com tamanho de poro definido.⁴⁶ As vantagens dos LUV's são a homogeneidade na sua produção, versatilidade na composição da bicamada lipídica e a média da curvatura da bicamada é considerada praticamente igual a membranas planares.

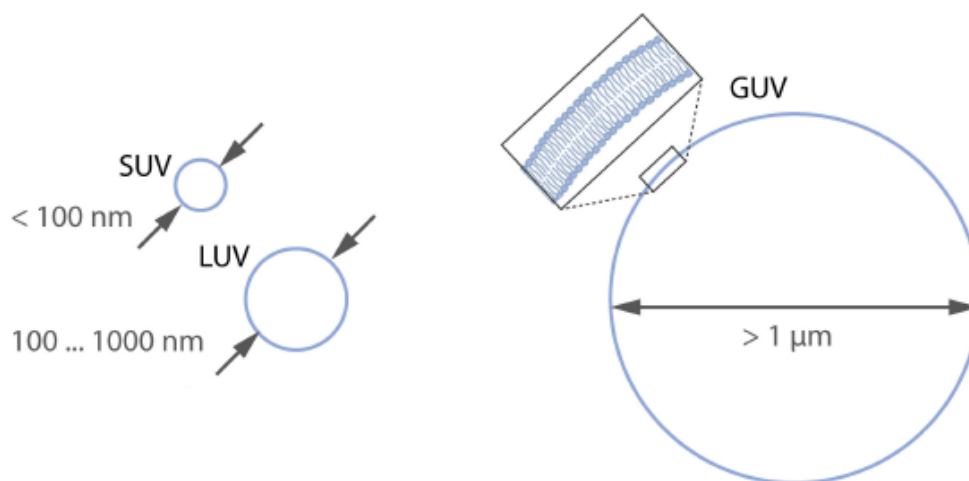


Figura 4 Tipos de vesículas unilamelares (adaptado de ⁴⁷).

Neste trabalho foram usados GUV's (vesículas unilamelares gigantes). Estes modelos são estruturas atrativas e auto-organizadas que são usadas como modelos de membrana celular, permitindo obter informações sobre fenômenos biológicos e físicos.⁴⁸ Têm algumas vantagens que se relacionam com as suas grandes dimensões, na ordem de grandeza das células, e podem ser facilmente observados e micromanipulados sob um microscópio ótico, permitindo assim a observação direta de fenômenos biofísicos relevantes.⁴³ Existem dois métodos principais para a formação destas espécies lipídicas. O primeiro método, descrito pela primeira vez por Reeves and Dowben em 1969⁴⁹ em que os GUV's são formados com uma hidratação suave num filme. O segundo método, descoberto por Angelova e Dimitrov em 1986⁵⁰, utiliza uma técnica de eletroformação. Esta técnica consiste em formar este tipo de vesículas sob um filme lipídico seco com a aplicação de um campo elétrico externo.⁵¹

Para a preparação dos GUV's usou-se um método "gel-assisted", usando um filme de álcool polivinílico (PVA) descrito pela primeira vez por Weinberger et al. (2013)⁴³. Esta técnica, além de ser simples, tem como principal vantagem as vesículas não conterem quaisquer restos do polímero no interior, pois o lípido não penetra no filme de PVA, mas é adsorvido à sua superfície em várias camadas (Figura 5). Além disso o PVA não se dissolve em solução à temperatura ambiente e, portanto, não há impurezas detetáveis de polímero na membrana.⁴⁷ Esta técnica foi aperfeiçoada e adaptada, antes de ser melhorada nos nossos laboratórios, por um grupo de

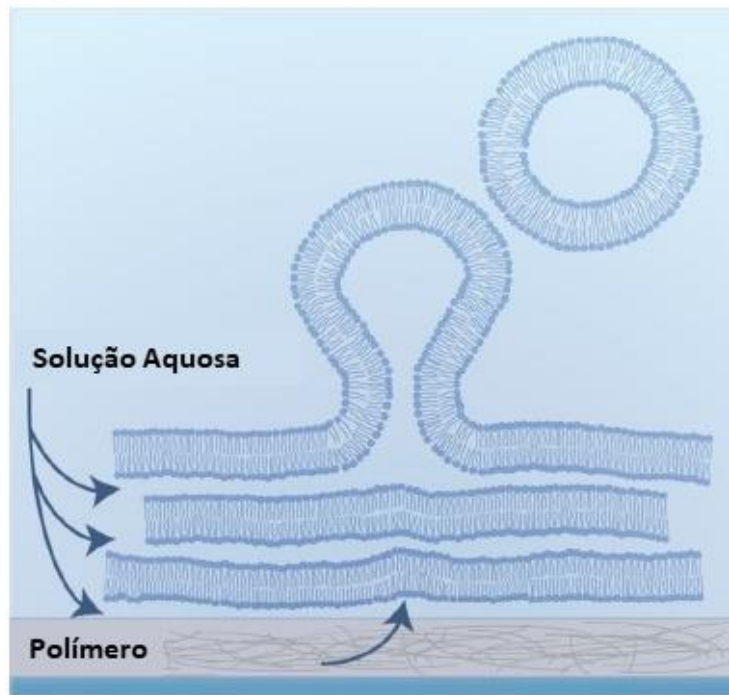


Figura 5 Representação esquemática da produção de GUV's por hidratação de um filme lipídico seco sobre um filme de polímero. (adaptado de ⁴⁷).

1.2 – Métodos físicos para aumentar a permeabilidade

Nos últimos anos, a investigação sobre ultrassons e sua interação com materiais biológicos tem levado à descoberta de aplicações terapêuticas importantes em medicina. A interação do ultrassom com materiais biológicos, ainda que possa ter alguns riscos, é muito utilizada em algumas técnicas de diagnóstico. O estudo de como o tecido afeta a onda acústica pode ser visto como a base para a ultrassonografia diagnóstica.⁵²

A utilização de ultrassons para o diagnóstico clínico tem sido uma das modalidades de imagiologia mais utilizada e mais segura disponível na prática clínica.⁵³ Uma das utilizações mais recentes de ultrassões é a Tomografia Fotoacústica (PAT). Ao contrário da imagiologia por ultrassons, esta combina o contraste das técnicas óticas com a profundidade de penetração e a resolução espacial das técnicas

acústicas.⁵⁴ Nesta técnica de imagiologia, é utilizado um laser pulsado, com um determinado comprimento de onda, para excitar um agente de contraste. Após a excitação do agente de contraste, há uma libertação de calor, resultante do decaimento não radiativo da molécula, que leva à produção de uma onda de pressão (onda fotoacústica). Mais recentemente, foi descoberta a possibilidade de aplicar ultrassons de alta frequência para a transfeção genética. A utilização das ondas fotoacústicas, como outros tipos de métodos que não utilizam vírus, tem vindo a despertar algum interesse, pois todas as técnicas atualmente utilizadas são dispendiosas, demoram muito tempo e, principalmente, têm um grau diminuto de segurança.⁵⁵ Assim é perceptível que esta técnica possa vir a ser uma mais valia no tratamento de doenças genéticas como a hemofilia.

O termo “fotoacústica” geralmente refere-se à geração de ondas acústicas por radiação ótica modulada. No seu sentido mais amplo, fotoacústica pode significar a geração de ondas acústicas, ou outros efeitos termoelásticos, por qualquer tipo de radiação energética.⁵⁶ Este efeito foi descrito pela primeira vez por Alexander Graham Bell⁵⁷, que descobriu que um sinal acústico é produzido quando uma amostra, numa célula fechada, é iluminada com luz tendo uma intensidade variando periodicamente.⁵⁸

A interação destas ondas de pressão com tecidos biológicos, células e macromoléculas é uma área ativa de investigação envolvendo investigadores de todo o mundo, focados em fotoacústica. Estudos recentes mostraram a capacidade deste tipo de ondas para retardar o crescimento tumoral, isoladamente ou na combinação com fármacos, o que chamou a atenção para as inúmeras aplicações médicas destas ondas.⁵⁹ Para além da elevada importância na medicina moderna, as ondas fotoacústicas têm um papel relevante em várias áreas da física, química e biologia.⁵⁶

As ondas fotoacústicas são ondas de pressão de frequências ultrassónicas geradas pela absorção de um pulso laser de curta duração por um material adequado.⁶⁰ Este material é composto por uma molécula que absorve luz a um determinado comprimento de onda com um elevado coeficiente de absorção e um polímero capaz de sofrer uma expansão termoelástica de forma eficiente. O processo de absorção de luz por este material piezofotónico, descrito em cima, primeiro altera a

distribuição eletrônica dessas moléculas do estado fundamental para um estado eletronicamente excitado. Em seguida, o estado excitado retorna ao estado fundamental convertendo a energia em calor.⁶¹

A expansão termoelástica deve ser ultra-rápida e de uma duração inferior à do pulso do laser, o que significa que a largura de banda da onda acústica é determinado pelo pulso do laser.⁶² Como este material está confinado entre uma janela ótica e um vidro, esta mudança drástica de volume vai levar à criação de uma onda fotoacústica.

Resumidamente as ondas Fotoacústicas caracterizam-se por um processo de absorção ótica de radiação por um material específico, uma consequente expansão térmica e geração da onda acústica.⁶³

1.2.1 - Caracterização das ondas fotoacústicas

Como descrito na literatura, é possível gerar ondas fotoacústicas por exposição de um material piezofotônico, por exemplo MnTPP (Mn (III) 5, 10, 15, 20-tetrafenilporfirinto) disperso num filme polimérico, a um laser pulsado. Este material está confinado entre um vidro e um espelho e, por isso, é capaz de converter a energia radiativa do laser pulsado com um comprimento de onda de 532 nm numa onda de pressão com a duração do pulso do laser.⁶²

Neste trabalho o laser utilizado foi um laser que tem um pulso de 30 picossegundos e a frequência é de 10 disparos por segundo (10 Hz).

Na Figura 6 estão representadas duas ondas fotoacústicas geradas por pulsos de laser, 8ns e 30ps, com 100 mJ cm^{-2} de intensidade. As características deste tipo de onda são principalmente, o $P_{\text{max}+}$ e $P_{\text{max}-}$ que é a pressão de compressão e rarefacional do pico, a duração da pressão de compressão (Δt_+) e o tempo de subida do primeiro ciclo positivo (Δt_r) que é definido como o tempo que demora entre 10% e 90% da pressão máxima do pico.¹

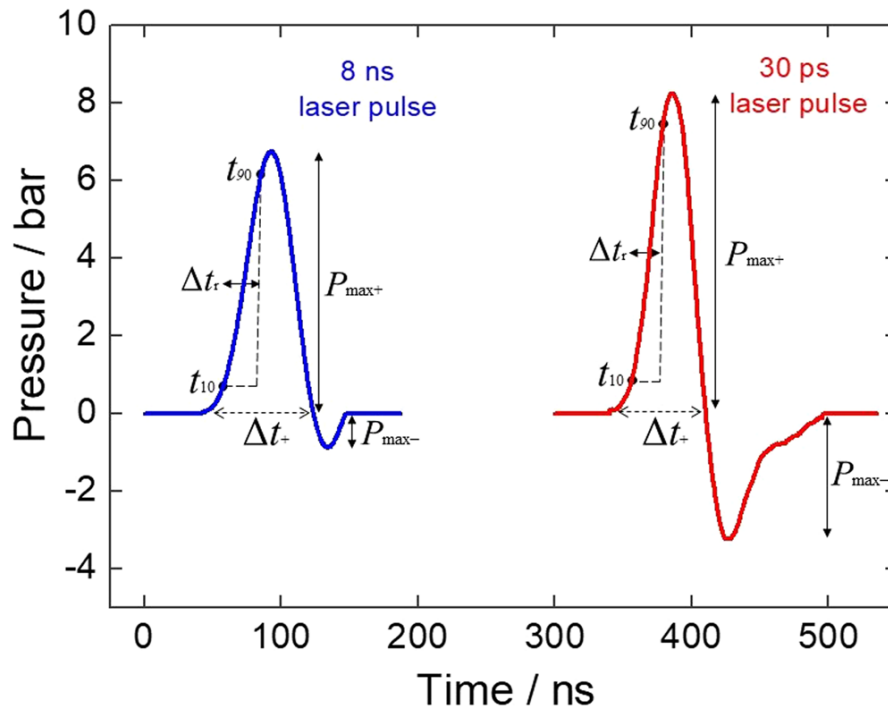


Figura 6 Ondas de pressão produzidas pelo material piezofotônico como resultado da absorção de um pulso de laser de 100 mJ cm^{-2} a 532 nm . Ondas medidas com um hidrofone de agulha de 20 MHz . A linha azul (esquerda) e vermelha (direita) correspondem às ondas de pressão obtidas com irradiação por um laser de nanossegundos e picossegundos, respectivamente.¹

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 Preparação de GUV's

2.1.1 Preparação de Soluções

As soluções de glucose 280 mM e sacarose 280 mM foram preparadas numa placa de aquecimento com agitação magnética, com a massa adequada de glucose e sacarose, respetivamente, em água desionizada (com uma condutividade de 18,2 MΩ.cm) com aquecimento de cerca de 45 °C e agitação delicada. As soluções foram armazenadas a 4 °C sempre que não estavam a uso.

Com vista a produzir filmes de PVA, foi dissolvido 5% de PVA numa solução aquosa de sacarose 280 mM, a 95 °C, numa placa de aquecimento com agitação, durante aproximadamente uma hora e, de seguida, armazenada à temperatura ambiente.

Várias soluções lipídicas, com diferentes misturas de lípidos, foram preparadas no decorrer deste trabalho com diversos fins. Foram preparadas soluções de POPC (1,5 mM) e soluções de POPC (1,5 mM) e Rho-DPPE 1:100. Todas estas soluções foram preparadas em clorofórmio. Por fim, as soluções foram armazenadas a -20 °C.

A solução de isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-dextran, Sigma-Aldrich, 4 KDa) foi preparada em sacarose 280 mM com uma concentração aproximada de 200 μM, sendo que esta concentração foi aferida recorrendo ao espectro de absorção da solução, Figura 7, utilizando um espectrofotómetro UV-Visível (Spectronic Unicam UV 500) e um coeficiente de absorvidade molar 75 000 M⁻¹cm⁻¹, a 492 nm. A solução de Proteína Verde Fluorescente (GFP) foi também preparada em sacarose 280 mM e a sua concentração real verificada por UV-Visível a 502 nm com um coeficiente de absorvidade molar 70 000 M⁻¹cm⁻¹.

Para o cálculo destas concentrações foi utilizada a lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon l c \quad (\text{Equação 1})$$

Onde A é a absorvância ao comprimento de onda escolhido, ε ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) é o coeficiente de absorvidade molar, l (cm) é o percurso ótico e c (M) é a concentração da amostra. Depois das soluções prontas e as suas concentrações reais calculadas por espectroscopia de UV-visível, foram protegidas da exposição à luz e armazenada a 4 °C sempre que não estavam a uso.

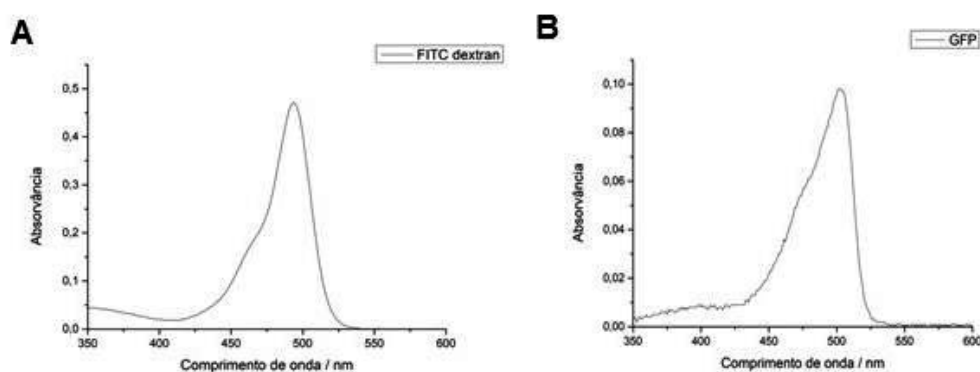


Figura 7 Espectro de absorção UV/visível de soluções de FITC-dextran (A) e de GFP (B), em Sacarose 280 mM.

2.1.2 Preparação de GUV's por PVA-assisted swelling

Vesículas Unilamelares Gigantes (GUV's) foram preparadas utilizando por base um método com assistência de um filme de PVA, descrito pela primeira por Weinberger et al. (2013)⁴³. Este protocolo foi adaptado com a ajuda de um grupo de investigação do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa⁴⁸ e otimizado durante o ano anterior neste departamento.²⁰

Numa placa retangular de 8 poços não revestida (Ibidi, Alemanha) colocou-se 200 μL da solução de PVA 5% em sacarose 280 mM, previamente aquecida (para ficar um pouco menos viscosa e diminuir a quantidade de ar dissolvido bem como facilitar a remoção de bolhas de ar). A placa foi levada a um spincoater (Speciality Coating System, Inc., Model P6700) em que foi spincoated, utilizando o programa que melhor se adequou: este programa sujeita a placa a 1200 rotações por minutos durante 120 segundos. O filme de PVA foi seco numa estufa, a 50 °C, durante 15 minutos, com a placa destapada. Para a preparação do filme de lípido sobre o PVA, a placa, com o filme de PVA completamente seco, foi colocada numa placa de aquecimento morna, sobre um suporte de metal. Este leve aquecimento serve para que, a quando do contacto da solução lipídica com o filme, o solvente, clorofórmio, possa ser rapidamente evaporado pois, este solvente em contacto com o filme pode destabilizar o mesmo formando fendas, o que levaria a uma posterior formação dos GUV's menos efetiva. A solução de lípido em clorofórmio, 15 μL , é colocada sobre o centro do filme de PVA, recorrendo a uma seringa de vidro, e a placa é posteriormente deixada em vácuo, num excicador durante 15 minutos para evaporar os vestígios de solvente. Hidratou-se o filme de lípido com a adição de 300 μL de sacarose 280 mM, com ou sem FITC-dextran 200 μM ou GFP 44,2 μM . A placa foi então mantida durante 2 horas num local plano, isento de trepidações e protegido da luz. Este processo ocorre como o demonstrado na Figura 5, em que a solução de hidratação difunde para o espaço entre os filmes, sendo eles ambos lipídicos ou de PVA e lipídico, fazendo com que os GUV's se formem por aumento de volume destes mesmos filmes compostos por lípido. Ao fim deste tempo, recolheram-se os 300 μL de solução para eppendorfs que se deixaram em repouso durante 30 minutos, protegidos da luz, para estabilizar os GUV's entretanto formados.

Dependendo se os GUV's são preparados ou não com solução fluorescente o método de diluição diferiu. Para os GUV's preparados em solução de sacarose 280 mM, os 300 μL são diluídos em 10 mL de glucose 280 mM. Para os GUV's preparados com solução fluorescente, pretendendo ter sinal de fluorescência no interior dos GUV's e um contraste elevado em relação ao exterior, a solução de GUV's é diluída em dois passos. Primeiro os 300 μL são colocados gentilmente em 10 mL de glucose 280 mM em tubos de fundo cónico, deixados em repouso ao

abrigo da luz durante 1 hora. Após a hora volvida recolhem-se 9 mL do topo dos tubos colocando o mesmo volume de glucose em substituição. Por último são recolhidos entre 300 a 600 μ L do fundo do tubo após a segunda diluição que contém os GUV's com solução fluorescente no interior e a solução exterior suficientemente diluída para permitir um bom contraste entre o interior e o exterior dos GUVs aquando da observação ao microscópio. O passo da diluição é de uma importância extrema por vários motivos. Primeiro permite fazer alguma seleção em termos de tamanho pois, como os GUV's maiores se depositam primeiro, quando se retira o meio, alguns GUV's mais pequeno como não sedimentaram, são retirados, o que deixa os GUV's maiores que depositaram primeiro. Em segundo lugar permite diluir o meio extremamente concentrado em FITC-dextran, permitindo levar esta amostra a algumas técnicas de imagiologia, como a microscopia de fluorescência, coisa que, com a concentração de FITC-dextran anterior, não iria ser possível.

2.2 Técnicas de Imagiologia

2.2.1 Microscopia de Fluorescência

Numa primeira abordagem experimental neste trabalho, a formação dos GUV's foi controlada por Microscopia de Fluorescência utilizando um microscópio Olympus CKX41 SF-5 com um sistema de fluorescência incorporado Olympus URF LT50 que se encontra no Centro de Química de Coimbra. Este microscópio foi utilizado, além da aquisição de imagem de transmissão, usando filtros de excitação no azul (460-490nm) e no verde (480-550 nm).

Quando comparados estes filtros de excitação com os espectros de excitação do FITC-dextran e da Rodamina, Figura 8, percebemos que conseguimos excitar o FITC-dextran usando o filtro de excitação no azul (460-490nm) e conseguimos excitar a Rodamina-DPPE com o filtro de excitação no verde (480-550nm). Isto permite a visualização da sonda fluorescente presente na membrana dos GUV's, Rodamina-DPPE, e a sonda fluorescente encapsulada nos GUV's, FITC-dextran.

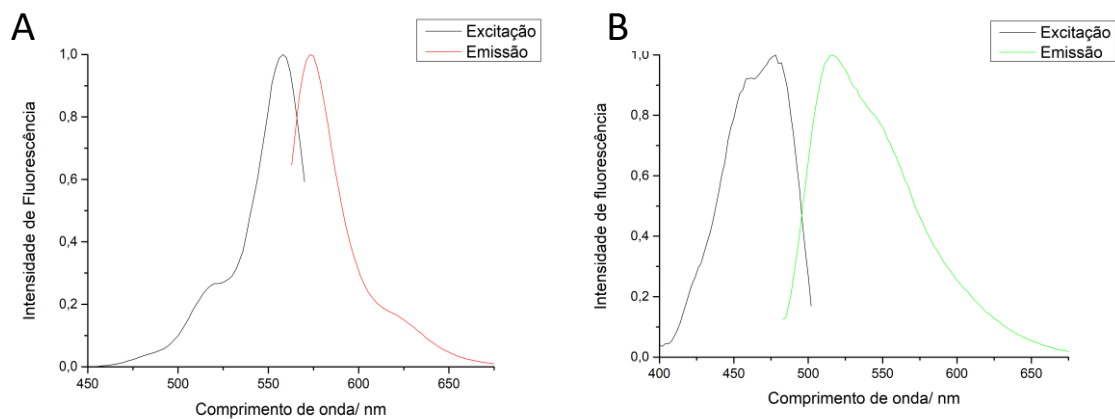


Figura 8 Espectros de excitação e emissão de fluorescência de Rho-DPPE (A) e FITC-dextran (B).

2.2.2 Microscopia Confocal

A microscopia confocal foi realizada num Carl Zeiss no MICC (Microscopy Imaging Center of Coimbra) que se encontra sediado no CNC (Center for Neuroscience and Cell Biology, Coimbra). A microscopia de confocal tem a vantagem de colocar uma pequena abertura (pinhole) feito num material opaco no plano da imagem permitindo que apenas a luz proveniente do ponto focal da amostra passe para o detetor (Figura 9). Em contraste, a luz vinda de cima e abaixo do plano de foco não estará em foco no plano da imagem e será rejeitada pelo material opaco que envolve o orifício.⁶⁴ Com este pinhole podemos focar o meio dos GUV's, dando a percepção real da fluorescência dos mesmos.

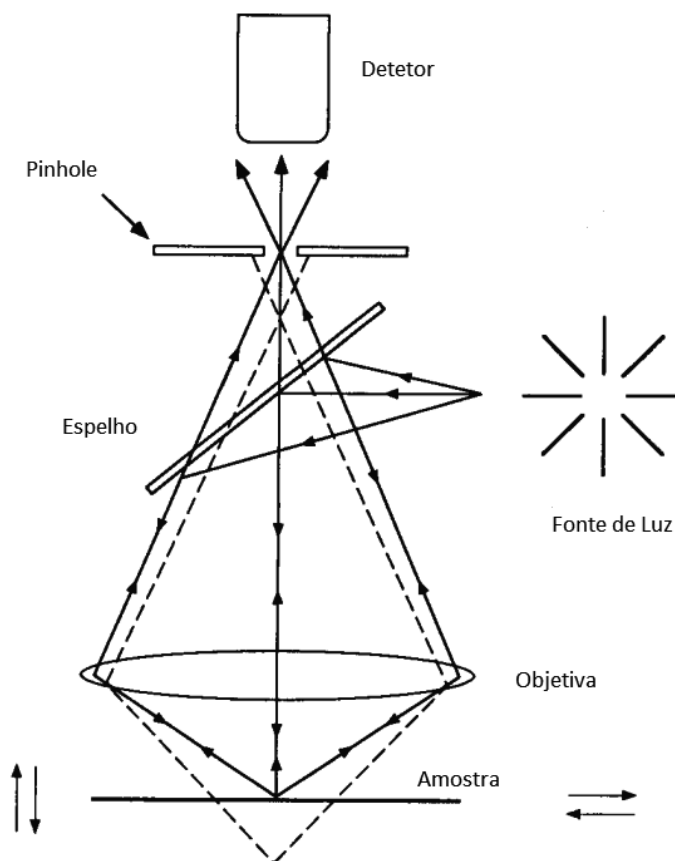


Figura 9 Imagem ilustrativa do funcionamento do microscópio de confocal. (Adaptado de ⁶⁵).

Para este estudo utilizou-se as lâmpadas de excitação de 488 nm e 561 existentes no microscópio confocal.

As amostras foram observadas numa placa de 8 poços “uncoated μ -slide” (Ibidi, Alemanha) com 200 μ L de solução. Estas placas, depois de observadas pelo confocal e depois de recolhidas as imagens foram levadas para serem expostas às ondas fotoacústicas, e observadas novamente para avaliar o efeito das ondas.

Para tratamento das imagens foi utilizado o programa informático ImageJ. Este tratamento passou pela escolha das imagens, colocação de uma escala com 25 μ m de comprimento e análise quantitativa dos GUV's, como irá ser descrito posteriormente na secção 2.4.

2.3 Aplicação de Ondas Fotoacústicas

A exposição dos GUV's a ondas fotoacústicas foi realizada segundo o design experimental esquematizado na Figura 10A. A luz, a 532 nm, emitida pelo laser de picossegundos (EKSPLA PL 2143 A, 30 ps pulse FWHM) vem da esquerda atravessando as primeiras interfaces do setup experimental (janela ótica e material piezofotónico) atingindo o espelho onde é refletida de novo para as primeiras interfaces. O design do setup experimental é da autoria do grupo de investigação e todas as interfaces estão acopladas com gel de ultrassons para permitir um melhor acoplamento acústico (Figura 10B). Uma placa de oito poços contendo 200 μL de uma amostra de GUV's é colocada no setup para exposição. O material piezofotónico, filmes de MnTPP e poliestireno foram atenciosamente fornecidos por LaserLeap Technologies, S.A. (Coimbra, Portugal).

A energia do pulso do laser de picossegundos foi medida com um Power Meter (Newport Model 1918-C). Foram usadas fluências de 50 e 100 mJ cm^{-2} , durante 10 e 20 minutos.

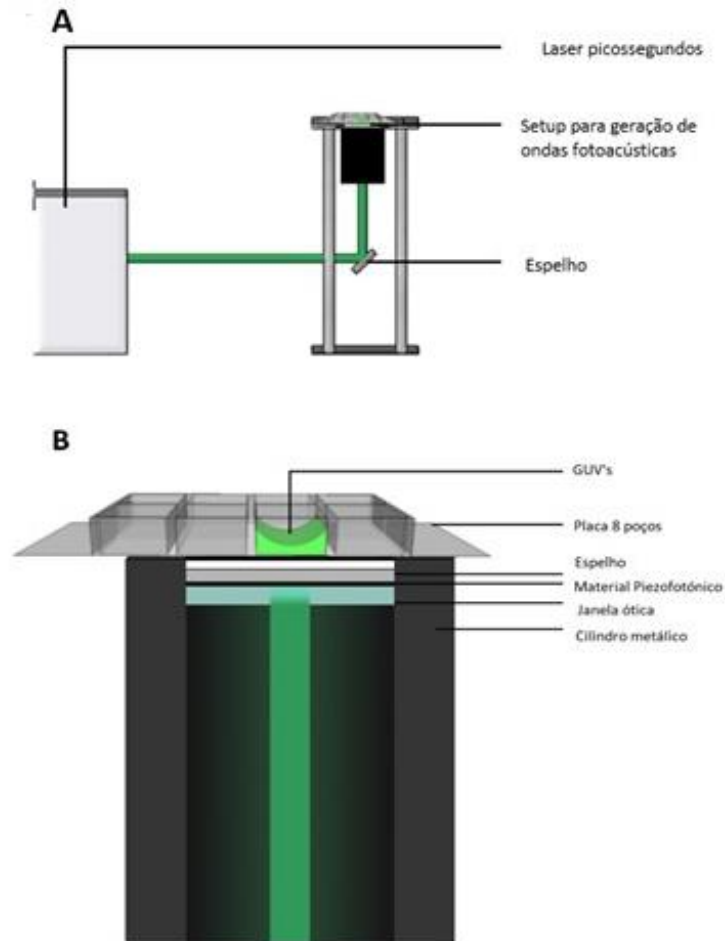


Figura 10 Imagem ilustrativa da montagem experimental para aplicação das ondas fotoacústicas. (adaptado de ²⁰).

2.3.1 Caracterização das Ondas Fotoacústicas

Para a caracterização das ondas fotoacústicas e comparação de uma onda gerada pelo nosso setup com e sem placa foi usado um microfone de agulha calibrado para detectar valores entre 1MHz e 20Mhz (model MH28 Force Technologies).

No primeiro ensaio, foi utilizada a montagem da Figura 10 em que o microfone foi mergulhado num poço com água e foi observado a onda a que os GUUV's são sujeitos durante as experiências. No segundo ensaio foi substituído a placa de oito poços por uma gota de água para a água servir de meio de propagação da onda. O microfone foi colocado dentro da gota de água e obteve-se a onda máxima

gerada pela nossa montagem. Esta onda foi comparada com a onda recolhida pelo microfone mergulhado dentro de um poço, da placa de 8 poços.

2.4 Caracterização dos GUV's

2.4.1 Microscopia Confocal

Com a finalidade de se perceber a saída do FITC-dextran, ou da GFP, encapsulado nos GUV's também se utilizou a microscopia confocal.

Depois de tiradas algumas imagens por poço utilizando o microscópio confocal, usou-se o programa ImageJ para o tratamento de dados. Este tratamento consistiu em, primeiro, definir a área de cada GUV, como o demonstrado na Figura 11. De seguida o programa calcula automaticamente a área seleccionada e a média da intensidade de fluorescência dos pixéis que se encontram na secção seleccionada da imagem. Com a fluorescência média de cada GUV e o seu tamanho é possível analisar os resultados quantitativamente. com a finalidade pretendida neste trabalho.

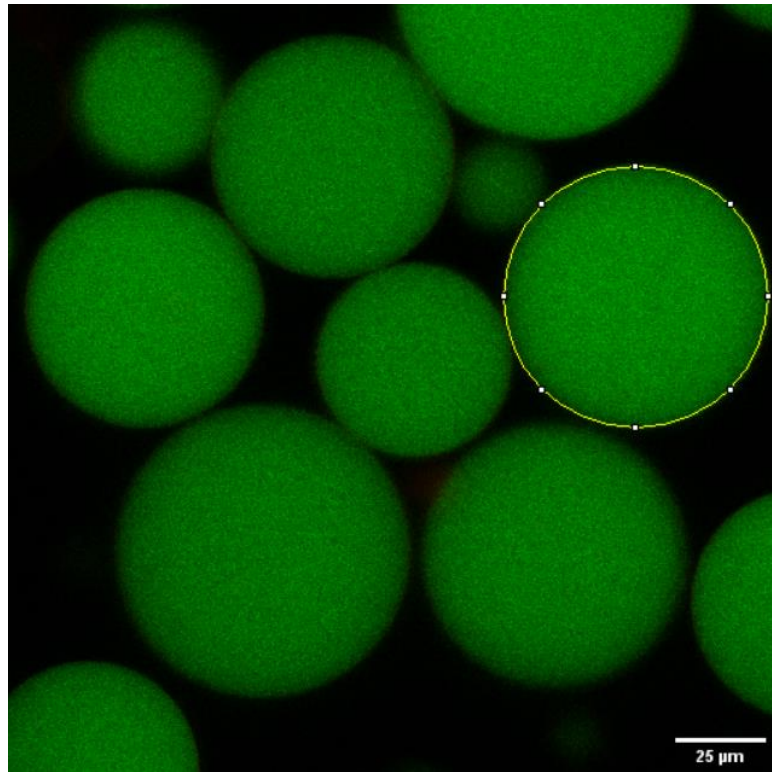


Figura 11 Demonstração do tratamento das imagens utilizando o programa ImageJ e imagens de Microscopia de Confocal. GUV com 36,28 µm de raio e uma intensidade de fluorescência de 1257.

2.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo serve para medir rápida e quantitativamente uma variedade de características de células, ou vesículas similares, individuais. Ela é usada nos campos da imunologia, da biologia celular, da biologia molecular, em patologia e em microbiologia diagnóstica.⁶⁶

Esta técnica mede características óticas e de fluorescência de partículas. As propriedades físicas, como o tamanho (representado pela dispersão de luz, light scatter) e a complexidade interna (representada pela dispersão do ângulo reto, Side Scatter) que podem caracterizar certas populações.⁶⁷

As experiências de citometria de fluxo foram realizadas num citómetro (Cytometer Novocyte 3000) que se encontra no Centro de Química de Coimbra.

Neste trabalho o Forward e Side Scatters foram utilizados para identificar os GUV's e a intensidade de fluorescência permitiu avaliar o efeito das experiências realizadas.

Em todas as medições foi utilizado o laser de excitação de 488 nm e filtro de emissão de 530/30 excitar e quantificar a intensidade de fluorescência do FITC-dextran.

A citometria de fluxo realizada no âmbito do trabalho descrito teve como objetivos perceber se é possível observar a diminuição da fluorescência dentro dos GUV's, tentar observar a sedimentação dos GUV's e as experiências de permeação de uma sonda fluorescente de dentro para fora destas vesículas unilamelares gigantes por exposição a ondas fotoacústicas.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 – Otimização do protocolo de formação de GUV's

Na primeira parte deste trabalho foi desenvolvido um modelo de bicamada lipídica capaz de satisfazer os objetivos propostos. Para conseguir este modelo de membrana, e partindo de um protocolo já testado no Departamento de Química²⁰, começou-se por tentar fazer GUV's com eficácia e reprodutibilidade. Para isso, testaram-se várias alterações ao protocolo, de modo a maximizar a sua reprodutibilidade: i) composição do solvente na solução de PVA, ii) programa do *spincoater* para a elaboração do filme de PVA, iii) uma metodologia diferente para a hidratação, iv) tempo de repouso após a formação dos GUV's na placa, v) outras pequenas alterações.

O primeiro passo para a otimização do protocolo já revisto e utilizado pelo Grupo de Química Biológica do Departamento de Química foi testar um tempo de repouso para os GUV's depois da sua formação. Após as duas horas de hidratação no filme de PVA, os GUV's foram colocados num eppendorf para repouso durante 30 minutos ou recolhidos diretamente para o tubo de que já tinha 10 mL de glucose (Figura 12).

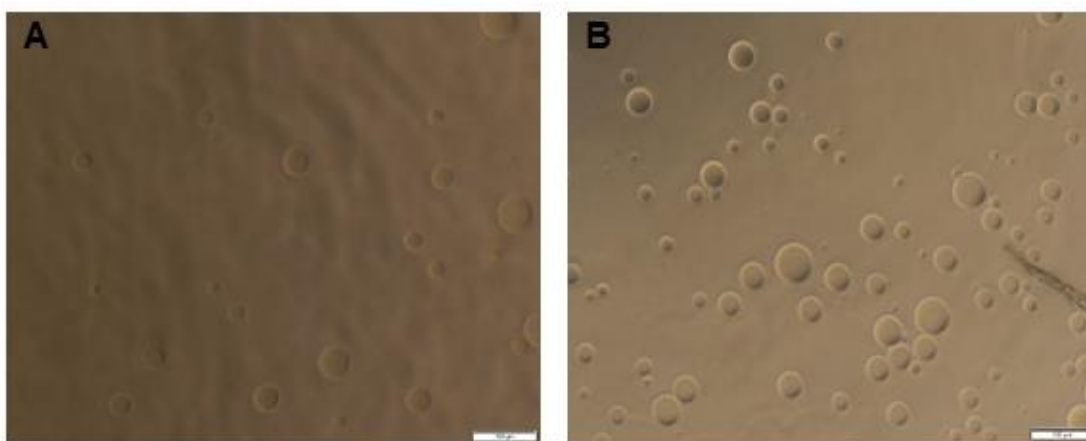


Figura 12 Efeito do repouso nos GUV's. GUV's produzidos sem repouso (A) e com repouso de 30 min (B) entre a hidratação e a diluição.

É possível verificar que os GUV's obtidos adicionando ao protocolo o passo intermédio de 30 minutos de repouso entre a hidratação e diluição final, se mostraram mais homogêneos, em maior quantidade, com um tamanho médio de 35 μm e, principalmente, reproduzíveis. Assim, começou-se a integrar no protocolo estes 30 minutos de repouso num eppendorf, protegido da luz e seguido da diluição necessária para as experiências consequentes.

Uma vez que nem sempre os filmes de PVA se mostravam lisos e secos após a utilização do spincoater e da estufa, testaram-se várias condições para melhorar a reprodutibilidade de obtenção dos GUV's. Foram testados filmes com diferentes composições e volumes, diferentes metodologias para secagem do filme e um programa diferente no spincoater.

Utilizando o protocolo anterior²⁰ foi possível observar que ocasionalmente existia uma interação menos favorável do lípido com o filme, levando a que os GUV's não se formassem. Aumentou-se o volume da solução de PVA 5% em sacarose 280 mM para 200 μL , em vez de 150 μL e alterou-se o programa de spincoater para 1200 rpm, durante 120 segundos, em vez do programa original que incluía duas rampas com diferentes velocidades.

Também o tempo de secagem do filme de PVA sofreu alterações. No protocolo inicial²⁰ os filmes de PVA eram deixados num forno a 37 °C durante 2 horas e deixados a repousar num excicador durante a noite, protegido da luz para posterior aplicação do lípido. Para que o filme não ficasse demasiado seco optámos por, depois de formados os filmes, colocar a placa com filmes, destapada, num forno a 50 °C, durante 15 minutos e de seguida aplicar logo o lípido.

Estas alterações ao protocolo apresentam algumas mais valias. O aumento do volume e a alteração no programa de rotação do spincoater permitiram que os filmes formados cobrissem toda a área da base do poço e por conseguinte que o lípido posteriormente aplicado não passasse para trás do filme de PVA. A formação de GUV's passou a ser bastante mais reproduzível. A alteração no período e temperatura de secagem permitiu reduzir significativamente o tempo total do protocolo e adicionalmente, o facto de a placa estar ainda "quente" aquando da aplicação do lípido em clorofórmio, permite uma evaporação bastante rápida do

solvente e conseqüentemente um filme de lípido bastante homogêneo e com menos probabilidade de ficar retido na parte inferior do filme de PVA.

Para verificar se o solvente em que se dissolve o PVA tem alguma influência na encapsulação do meio de hidratação nas vesículas finais, testaram-se filmes de PVA dissolvido em diferentes condições: i) 5% de PVA em água ii) 5% de PVA em sacarose 280 mM e iii) 5% de PVA em sacarose 280 mM com 180 μ M de FITC-dextran. Os GUV's produzidos no filme de PVA 5% em água são mais pequenos, e descontinuou-se a utilização desta solução de PVA para preparar os filmes. A presença de FITC-dextran na solução de PVA não mostrou ter influência na encapsulação de FITC-dextran 180 μ M nos GUV's, como se pode observar nas imagens correspondentes (Figura 13). Adicionalmente, não parece influenciar a sua formação e estabilidade. Por isso escolheu-se o filme de 5% PVA com Sacarose 280 mM para a continuação das experiências.

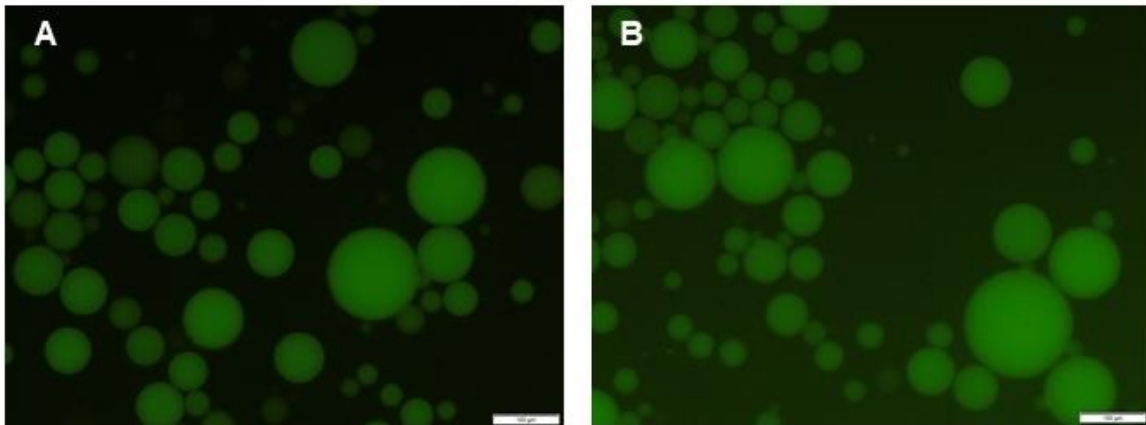


Figura 13 Efeito da presença de FITC-dextran no filme de PVA na produção de GUV's. Solução com 5% de PVA em sacarose 280 mM e FITC-dextran 180 μ M (A) e solução com 5% PVA em sacarose 280 mM (B).

Em resumo, várias alterações ao protocolo foram testadas de modo a tornar os GUV's mais reprodutíveis sem alterar muito o seu tamanho. As principais alterações passaram pelo filme de PVA, de modo a otimizar a sua interação com o lípido e pelo tempo de repouso entre a hidratação e a diluição dos GUV's. Estas alterações encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 Principais alterações do protocolo durante a fase de otimização

	Protocolo Inicial ²⁰	Protocolo final
Solvente PVA 5 %	Sacarose	Sacarose
V (PVA 5 %)	150 μ L	200 μ L
spincoater	10 s – 400 rpm 60 s – 2500 rpm	1200 rpm, 120 s
Secagem PVA	37 °C, 2h + overnight RT	50 °C, 15 min
Δt (hidratação – diluição)	-	30 min

3.2 – Geração de ondas Fotoacústicas

Com a finalidade de percebermos o efeito que a montagem do equipamento tem na geração da onda fotoacústica foram realizados ensaios.

Como o objetivo era perceber se a colocação de mais interfaces entre a fonte de ultrassons e os GUV's diminuiria drasticamente a amplitude da onda de pressão, foram realizados dois ensaios. O primeiro foi realizado com a montagem da Figura 10B com o microfone mergulhado num poço com água. Este primeiro teste mimetizou a onda a que os GUV's são sujeitos. O segundo teste consistiu em substituir a placa de oito poços por uma gota de água, em que se mergulhou o microfone. Este segundo ensaio visa descobrir a onda máxima que a montagem do equipamento consegue gerar quando se aplica nele um laser pulsado com 50 mJ cm^{-2} de fluência.

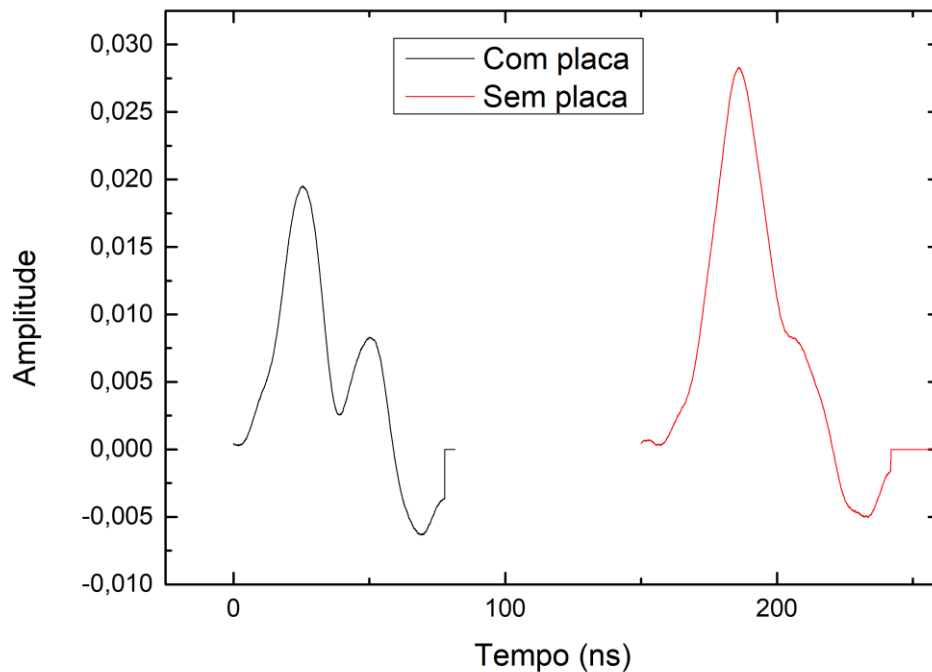


Figura 14 Ensaio de pressão com e sem a placa de 8 poços aplicando um laser de 30 ps com 50 mJ cm^{-2} de intensidade.

A escala temporal utilizada na figura 14 é apenas utilizada para a comparação das ondas, sendo que elas não aparecem no tempo demonstrado.

O efeito da passagem da onda em mais interfaces é notório na figura 14. Este efeito é observável pelo decréscimo na amplitude da onda e também pelo facto de, quando o ensaio de pressão foi feito com placa, obtivemos duas ondas sobrepostas em vez de uma só onda. Podemos concluir que a onda que aplicamos aos GUV's, quando os mesmos se encontram na placa de 8 poços, é menos intensa que uma onda normal.

3.3 – Permeabilidade através das membranas GUV's

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito das ondas fotoacústicas em algumas propriedades da bicamada lipídica, em particular ao nível da permeabilidade, através das mesmas. O objetivo era avaliar a permeação de uma sonda fluorescente, FITC-dextran, por um modelo simples de bicamada lipídica. Pretendia-se não só perceber se este fenómeno era possível, mas também tentar identificar o mecanismo da permeação. Este mecanismo é importante porque pode ser utilizado em algumas aplicações de entrega de fármacos. Um possível aumento da permeabilidade da bicamada lipídica a algumas moléculas pode ser muito importante do ponto de vista da medicina e farmacologia pois possibilita a introdução de fármacos, ou outras substâncias, numa célula para se conseguir um tratamento novo e/ou mais eficaz para algumas patologias.

Com o primeiro objetivo alcançado, produzir GUV's, foram testadas várias técnicas para perceber se é possível aumentar a permeação de moléculas grandes através de uma bicamada lipídica. Numa primeira abordagem foram analisadas imagens de microscopia de fluorescência antes e depois da exposição dos GUV's a ondas fotoacústicas. Esta análise qualitativa permitiu melhorar e ter mais experiência com as técnicas em uso e dar uma primeira perceção da possibilidade de estarmos a permear FITC-dextran para fora dos GUV's.

Numa segunda abordagem foram realizados ensaios recorrendo a microscopia de confocal e citometria de fluxo. A microscopia de confocal, além de ter a mesma função que a microscopia de fluorescência tem a vantagem de conseguirmos analisar as imagens quantitativamente ao nível da fluorescência e do tamanho dos GUV's. A citometria de fluxo é uma técnica que, neste trabalho, completou a microscopia de confocal pois na citometria é possível ter uma perspetiva geral do conteúdo da amostra. Assim esta técnica foi usada para percebermos se o número de GUV's diminui depois da exposição às ondas fotoacústicas e se a fluorescência de FITC-dextran ou GFP encapsulado diminui.

3.3.1 – Microscopia de Fluorescência

Para avaliar o efeito das ondas fotoacústicas na permeabilidade de um modelo de bicamada lipídica composta por POPC, foram aplicadas fluências de 50 e 100 mJ cm^{-2} durante 10 e 20 minutos, a amostras de GUV's. Foram observados por microscopia de fluorescência, os poços contendo GUV's com FITC-dextran 180 μM encapsulado, antes e depois da exposição às ondas fotoacústicas (Figuras 15, 16, 17 e 18). A análise é unicamente feita com base nas imagens recolhidas utilizando um microscópio com fluorescência com filtros no azul e no verde. A bicamada lipídica foi observada por excitação da rodamina e utilizando o filtro verde. O FITC-dextran, encapsulado dentro dos GUV's, foi excitado utilizando um filtro azul.

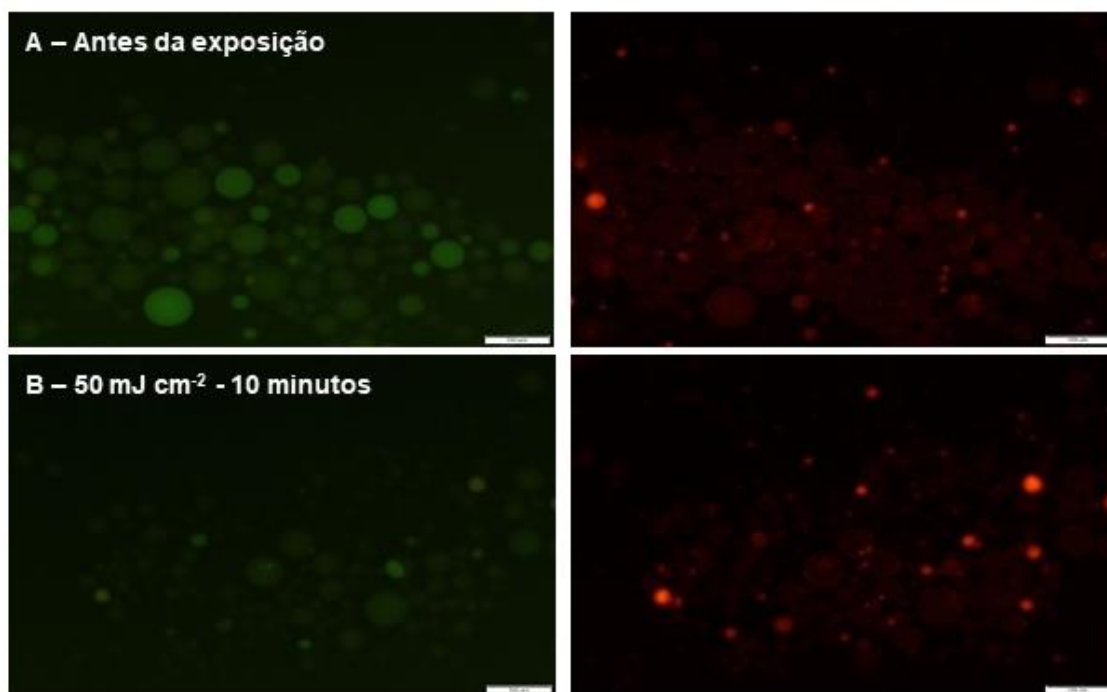


Figura 15 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 50 mJ cm^{-2} e uma exposição de 10 minutos.

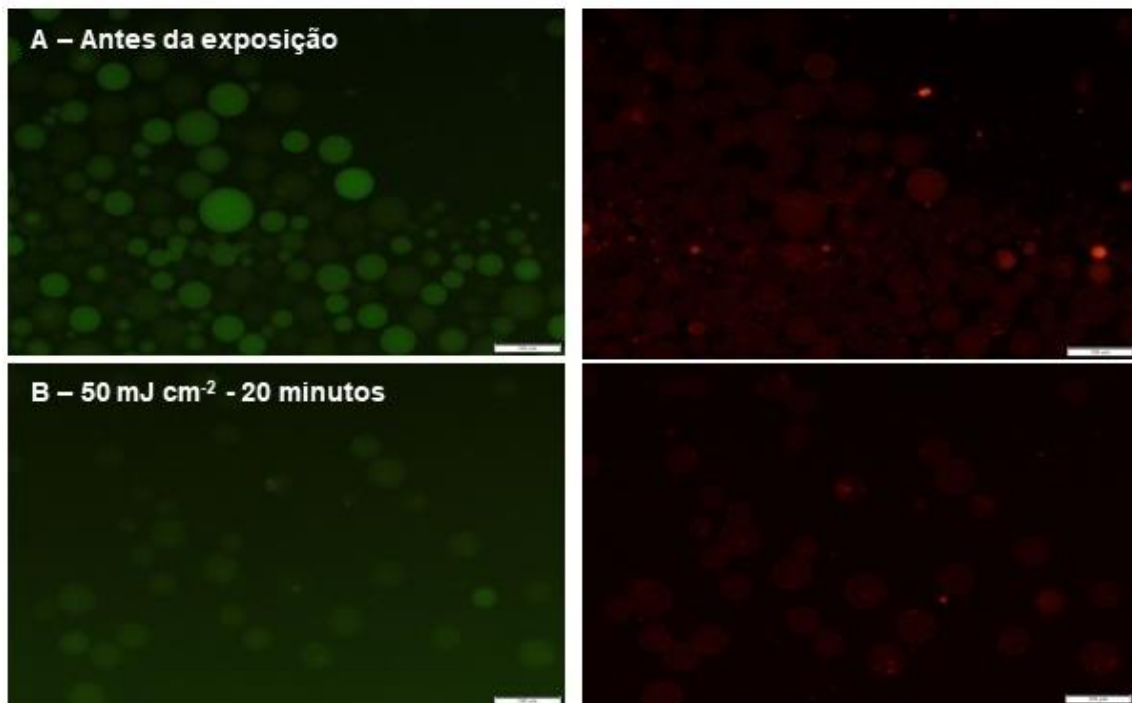


Figura 16 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 50 mJ cm⁻² e uma exposição de 20 minutos.

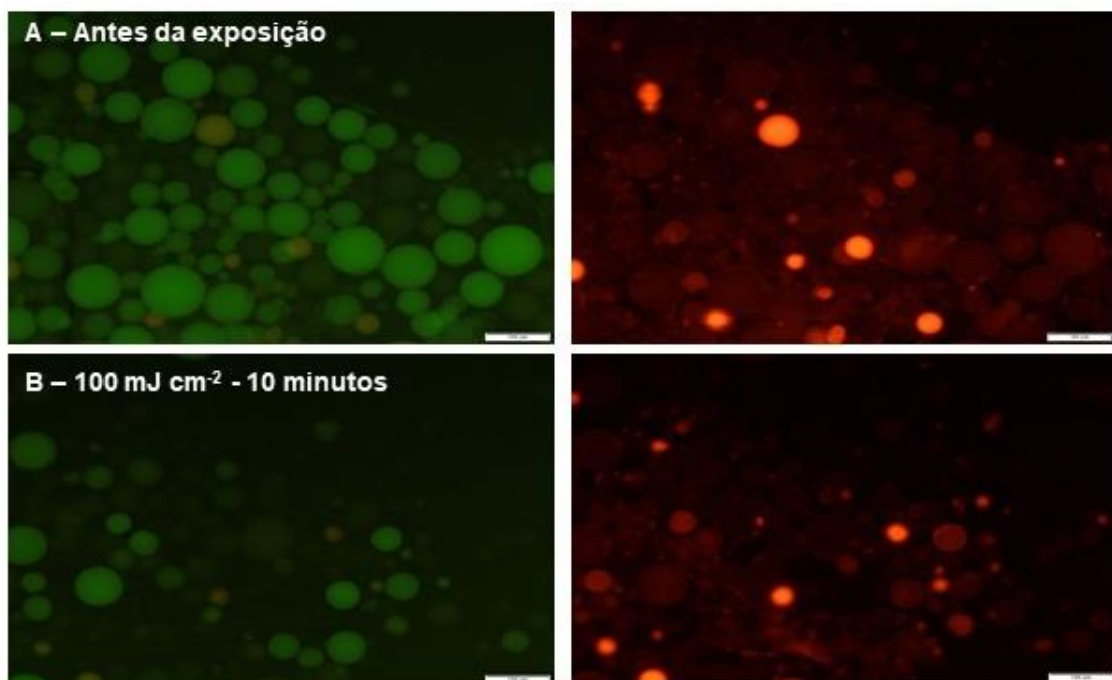


Figura 17 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 100 mJ cm⁻² e uma exposição de 10 minutos.

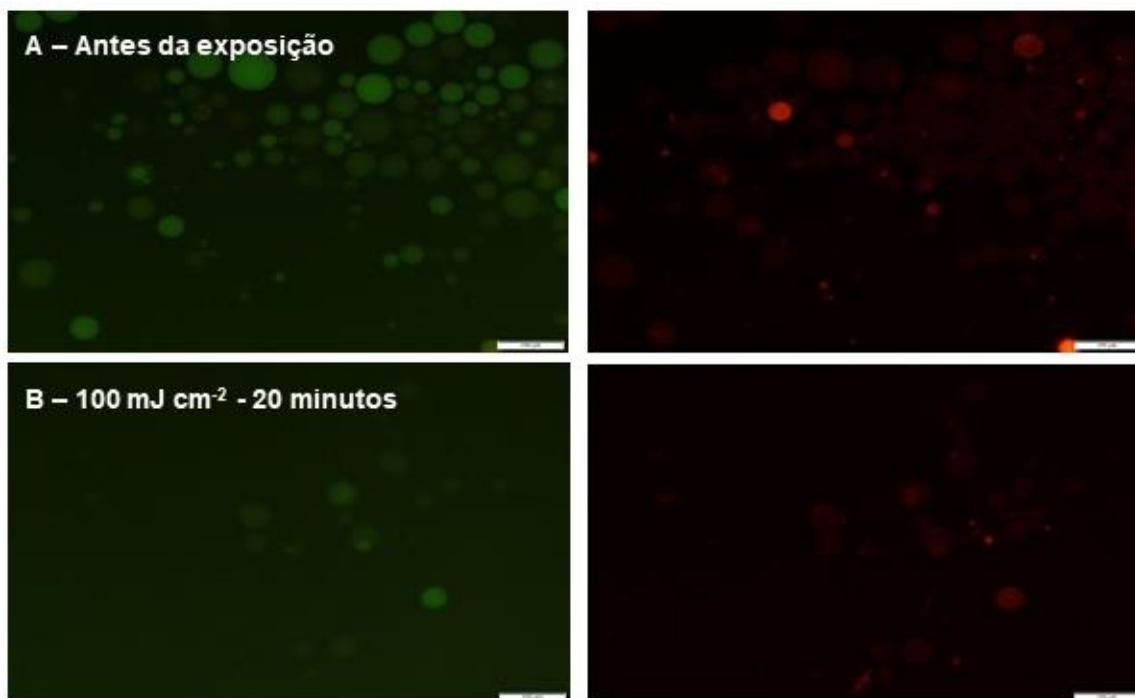


Figura 18 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade do laser de 100 mJ cm^{-2} e uma exposição de 20 minutos.

A análise das imagens recolhidas permite perceber que houve uma diminuição na intensidade de fluorescência do FITC-dextran encapsulado nos GUV's, depois de estes serem expostos às ondas fotoacústicas, em todas as condições testadas. Esta observação aplica-se às imagens recolhidas tanto com a excitação com o filtro azul, em que percebemos que existe menos intensidade de fluorescência dentro dos GUV's, como com a respetiva imagem recolhida para a excitação com o filtro verde, em que se observa a presença dos GUV's mesmo após a irradiação, pela observação da bicamada lipídica marcada com Rho-DPPE. Observa-se adicionalmente que é possível existir uma diminuição do tamanho e do número de GUV's após as várias exposições às ondas fotoacústicas. Uma vez que esta análise qualitativa se baseia na interpretação visual das imagens recolhidas, foi necessário repetir estas análises utilizando ferramentas que permitam quantificar a diminuição de fluorescência de FITC-dextran e as alterações ao número e tamanho dos GUV's após irradiação.

3.3.2 – Microscopia Confocal

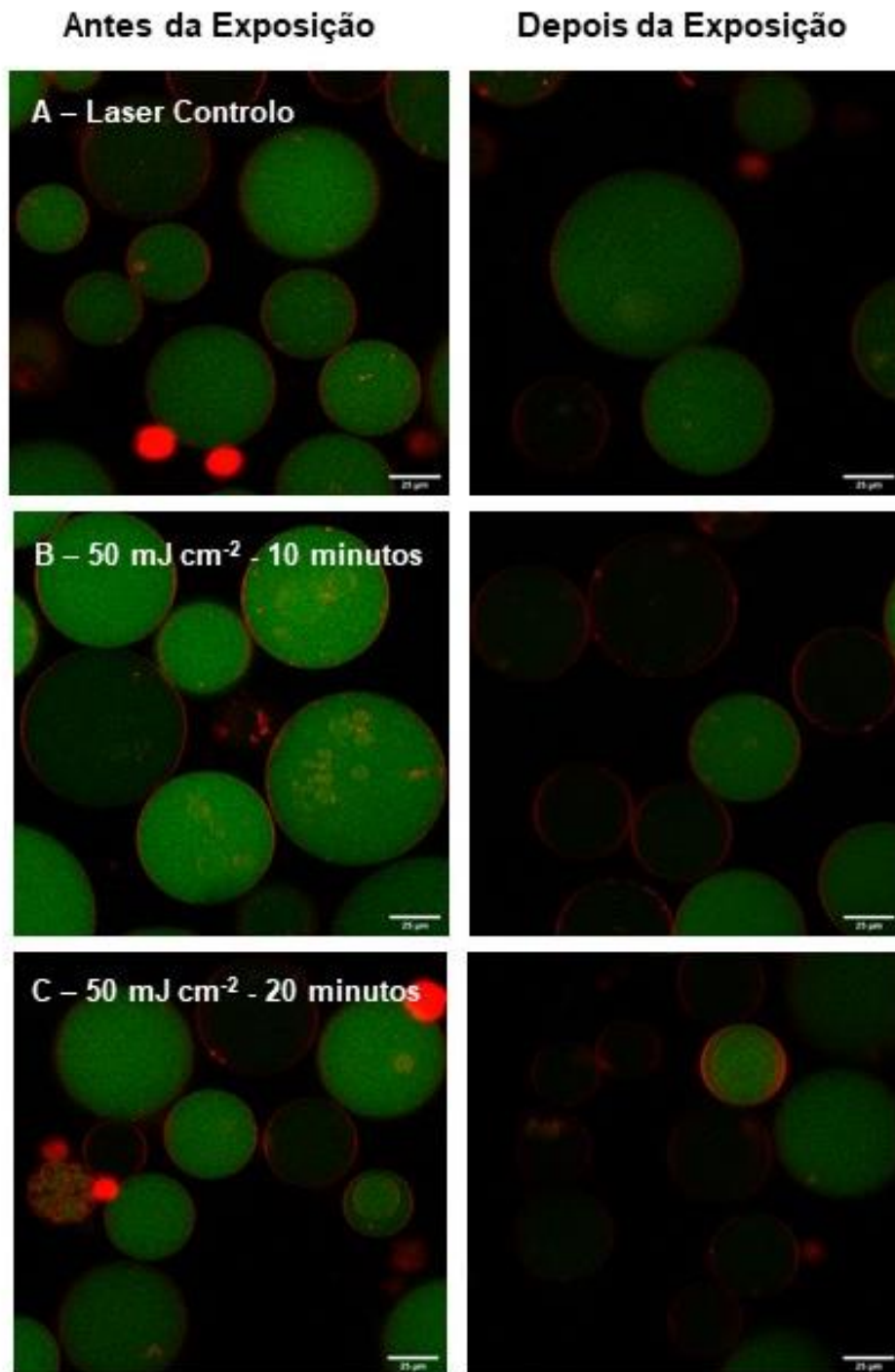
A microscopia confocal permitiu colmatar a necessidade de quantificar o aumento da permeação do FITC-dextran encapsulado nos GUV's por exposição a ondas fotoacústicas. Com esta quantificação podemos fazer várias análises como a percentagem de permeação e melhores comparações com o controlo. Além da fluorescência e através de alguns programas computacionais, podemos também medir o tamanho dos GUV's o que nos permite saber se eles estão a diminuir de tamanho com a técnica.

As imagens recolhidas de cada poço, antes e depois da irradiação, são analisadas utilizando o software ImageJ que permite quantificar a média da intensidade de fluorescência numa secção da imagem selecionada. As condições de recolha das imagens/os parâmetros do microscópio são mantidas dentro de uma mesma experiência, antes e depois da irradiação da amostra para permitir a comparação direta dos valores obtidos para a intensidade de fluorescência utilizando o software de análise. A análise das imagens recolhidas consiste também na determinação da área dos GUV's através da seleção da secção interior, delimitada pelo sinal da Rho-DPPE. Durante esta análise o contraste do sinal de Rho-DPPE foi por vezes alterado, apenas para efeitos de visualização.

Recolheram-se, em média, seis imagens por cada poço, antes e depois da exposição às ondas fotoacústicas, para se considerar este conjunto de imagens representativo da população de GUV's dentro de cada poço. A escolha das áreas onde se recolheram as imagens foi feita por observação do sinal da Rho-DPPE, minimizando assim a interferência pessoal na escolha de GUV's com mais ou menos intensidade de fluorescência. Assim os GUV's foram escolhidos pela população existente na imagem, tamanho e número de GUV's, e não pela presença de FITC-dextran encapsulada.

Foram recolhidas imagens antes e depois da irradiação nas 4 condições em teste e de dois controlos, uma amostra que não foi irradiada e que permaneceu na sala de microscopia durante todo o tempo das experiências (controlo) e uma outra

amostra que não foi irradiada, mas foi submetida ao mesmo manuseamento das amostras irradiadas, antes e depois das irradiações (controlo laser) (Figura 19)



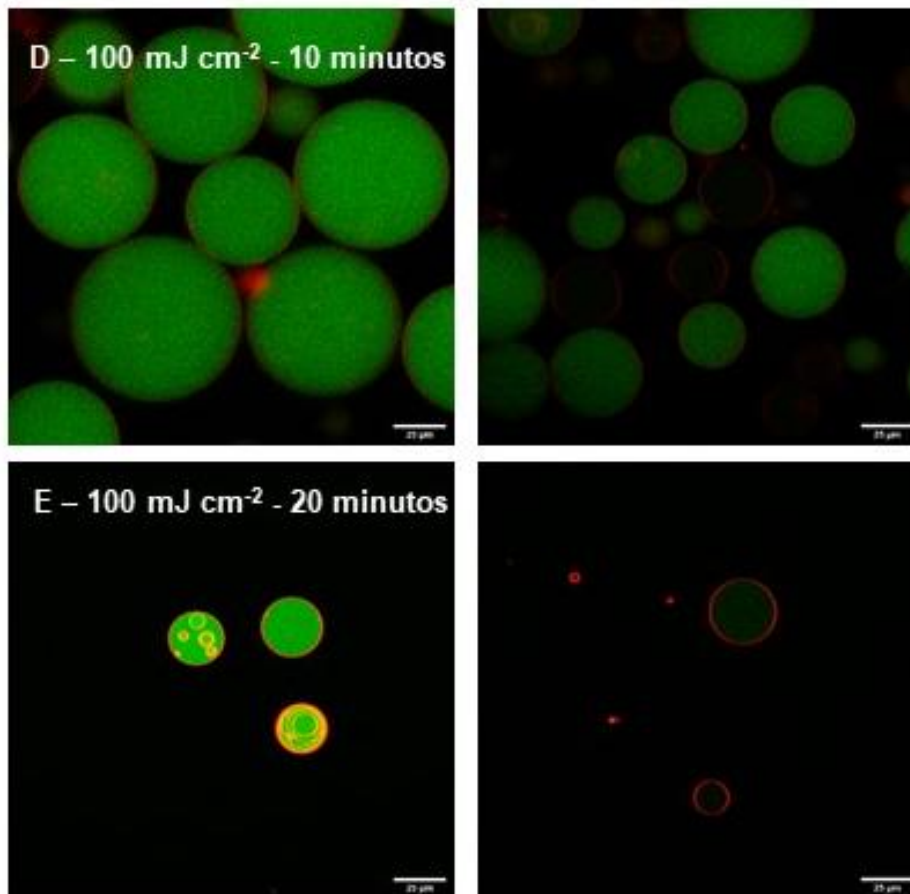


Figura 19 Efeito de diferentes intensidades e tempos de exposição das ondas fotoacústicas nos GUV's. **A** – Controlo do Laser. **B** - Intensidade do laser de 50 mJ cm^{-2} e uma exposição de 10 minutos. **C** - Intensidade do laser de 50 mJ cm^{-2} e uma exposição de 20 minutos. **D** - Intensidade do laser de 100 mJ cm^{-2} e uma exposição de 10 minutos. **E** - Intensidade do laser de 100 mJ cm^{-2} e uma exposição de 20 minutos.

Numa primeira interpretação visual das imagens pode-se observar que o interior dos GUV's apresenta menor fluorescência do FITC-dextran, comparando o antes e o depois da exposição ao laser, em todas as condições menos no controlo que permaneceu sempre na sala do confocal. Também é aparente que não houve uma diminuição do tamanho dos GUV's.

A área média recolhida por GUV utilizando o software de análise ImageJ está representada na Figura 20. A análise deste parâmetro permite perceber se a metodologia utilizada provoca a destruição das vesículas maiores ou se o tamanho se mantém antes e depois de serem expostas às ondas fotoacústicas.

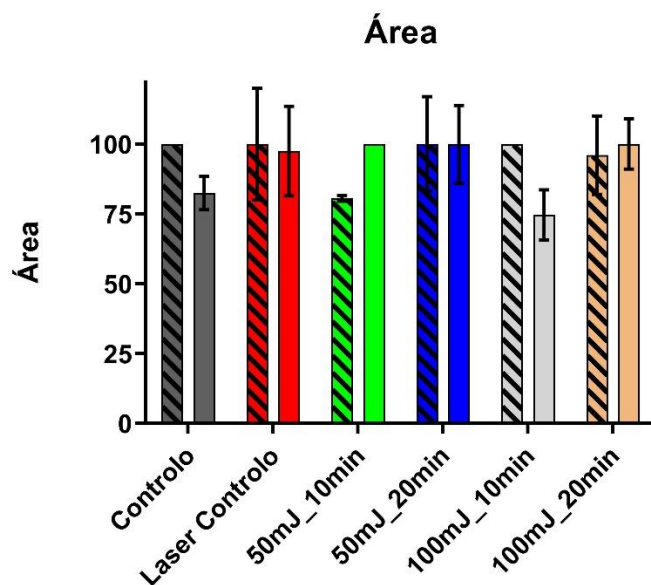


Figura 20 Efeito das ondas fotoacústicas na área dos GUV's. Barras com riscas – Antes da exposição, Barras sem riscas – Depois da exposição

Como as áreas médias dos GUV's variam de experiência para experiência foi necessária a normalização dos valores médios de cada amostra para se juntar as três experiências aqui analisadas, num só gráfico. Optou-se por normalizar às condições (antes ou depois da aplicação das ondas foto-acústicas) que apresentavam áreas superiores.

Podemos concluir, a partir da Figura 20, que o tamanho se mantém constante, dentro do erro padrão, em todas as condições testadas. Há uma diminuição maior no Controlo e nas amostras que foram expostas a 100 mJ cm⁻² durante 10 minutos, mas está dentro do erro associado. Temos também um ligeiro aumento na condição 50 mJ cm⁻² durante 10 minutos que pode estar relacionado com a escolha das imagens. Fazendo uma média de todos os GUV's analisados concluímos que os GUV's tinham aproximadamente 35 μm de diâmetro em média.

A fluorescência média de cada GUV foi quantificada utilizando o software e está representada para as várias condições, na Figura 21.

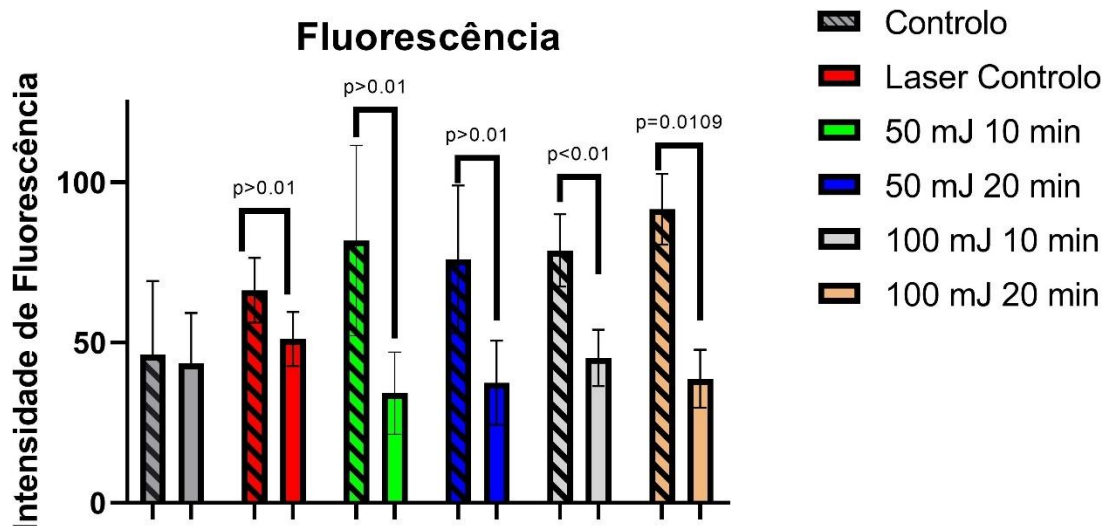


Figura 21 Efeito das ondas fotoacústicas na intensidade de fluorescência média do interior aquoso GUV's. Barras com riscas – Antes da exposição, Barras sem riscas – Depois da exposição

A amostra que não sofreu manuseamento (controlo) não sofreu alteração na sua fluorescência, contudo a amostra que esteve exposta ao mesmo manuseamento que as amostras que foram expostas à irradiação com o laser (laser controlo) - observa-se uma variação do valor de fluorescência de FITC-dextran no interior das vesículas na condição final da amostra que esteve sujeita às mesmas condições de stresse das amostras irradiadas. Esta observação implica que o manuseamento da amostra provoca libertação do FITC-dextran do interior das vesículas por comparação com a amostra que não sofreu manuseamento e que mantém a mesma fluorescência média nas condições inicial e final, mesmo que não seja significativa esta diminuição. Existe diferença, mesmo que algumas delas não sejam significativas estatisticamente, entre a diminuição de fluorescência nas condições inicial e final do laser controlo e a diminuição de fluorescência nas condições inicial e final das várias amostras irradiadas. Esta diferença permite concluir que as ondas fotoacústicas tem um efeito na membrana dos GUV's permitindo a passagem do FITC-dextran para o meio exterior. Provavelmente atuam ao nível da destabilização da membrana lipídica por pressão da onda. Pensasse que, pela atuação das ondas fotoacústicas, os GUV's vão contrair e distender com a passagem das ondas. Esta pressão poderá estar a abrir poros nos

GUV's aumentando a permeação do FITC-dextran pela bicamada lipídica. Não se observou nenhuma dependência na diminuição da fluorescência do FITC-dextran, em função do tempo de exposição ou da fluência do laser sendo a fluorescência da condição final nas várias amostras, igual dentro do erro médio.

3.3.3 – Resultados de Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a permeação do FITC-dextran pela bicamada lipídica dos GUV's. Foi necessário estabelecer os parâmetros do citômetro a utilizar para recolher a informação pertinente e depois foram realizadas várias experiências para complementar as conclusões observadas utilizando a microscopia de confocal.

Foi necessário confirmar a linearidade do sinal recolhida com o citômetro de fluxo e a concentração de FITC-dextran utilizada nas nossas experiências. Prepararam-se GUV's encapsulando concentrações de FITC-dextran em sacarose 280 mM, entre 0 e 200 μM . Estas amostras foram levadas ao citômetro de fluxo e utilizou-se o laser de excitação e o filtro de emissão adequado para a observação da fluorescência do FITC-dextran.

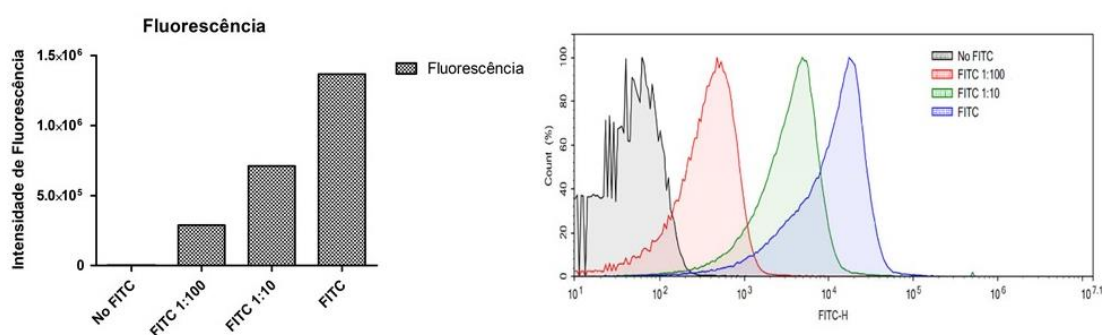


Figura 22 Intensidade de fluorescência para amostras de GUV's encapsulando diferentes concentrações de FITC-dextran em sacarose 280 mM (0, 2, 20 e 200 μM).

O sinal recolhido varia com a concentração de sonda fluorescente presente no interior dos GUV's, permitindo a utilização desta técnica para avaliar quantitativamente a variação da quantidade de FITC-dextran por influência da aplicação de ondas fotoacústicas.

Para eliminar o sinal correspondente ao FITC-dextran em sacarose 280 mM presente no meio exterior das amostras de GUV's a utilizar, analisou-se uma amostra de FITC-dextran 200 uM em sacarose 280 mM que nos permitirá definir a janela para análise das amostras controlo e irradiadas (Figura 23).

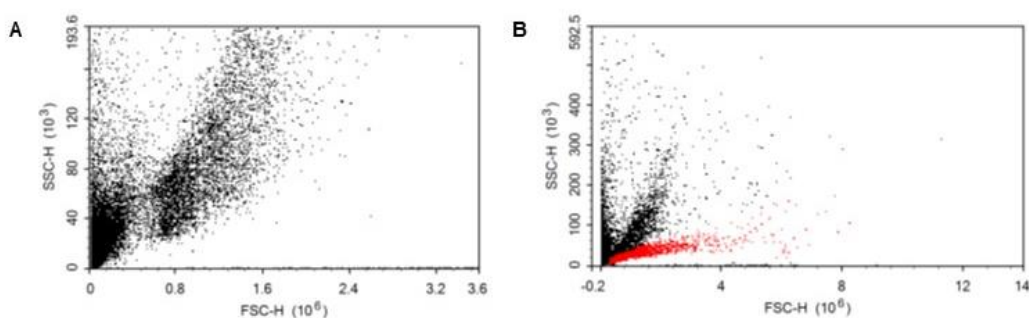


Figura 23 Comparação dos eventos de uma amostra de FITC-dextran em sacarose 280 mM (A), com uma amostra de GUV's com FITC-dextran encapsulado (B).

A zona assinalada a vermelho no painel B da Figura 23 corresponde aos eventos originados pelos GUV's com FITC-dextran encapsulado. Nas experiências seguintes, foi usado o gate representado, pelos eventos assinalados a vermelho, para obtermos um sinal que corresponda maioritariamente à intensidade de fluorescência do FITC-dextran encapsulado, evitando o sinal correspondente ao FITC-dextran que está no meio exterior aos GUV's.

As amostras de GUV's contendo FITC-dextran encapsulado foram expostas às ondas fotoacústicas, nas várias condições em estudo e de seguida analisadas utilizando a citometria de fluxo. (Figura 24) O laser controlo é uma amostra que sofre a mesma manipulação que as restantes, mas não é exposta à irradiação com o laser.

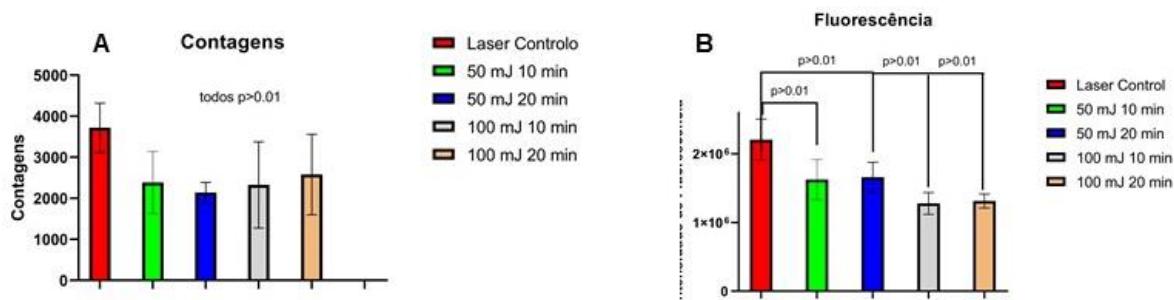


Figura 24 Número de eventos analisados por citometria de fluxo (A) e a intensidade de fluorescência média normalizada (B).

Os dados apresentados na Figura 24 são o resultado dos dados recolhidos para três experiências independentes. Observa-se que o número de contagens diminuiu, mas não significativamente, quando comparado o laser controlo com as amostras expostas às ondas fotoacústicas. Já se tinha verificado esta diminuição no número de vesículas utilizando a microscopia de confocal, indicando que apesar de os GUV's não diminuírem de tamanho, alguns podem estar a ser destruídos tanto pela aplicação das ondas fotoacústicas como pelo manuseamento durante a experiência. A intensidade fluorescência recolhida nas amostras após irradiação é menor que a fluorescência da amostra laser controlo, confirmando o que anteriormente se tinha verificado por microscopia de confocal, de que a intensidade de fluorescência do FITC-dextran encapsulado diminuiu após aplicação das ondas fotoacústicas. Esta diminuição, apesar de não estatisticamente significativa, é de cerca de 25 % e não apresenta dependência com a intensidade ou o tempo de exposição ao laser.

Para haver a certeza que esta diminuição de FITC-dextran não se deve a fotobranqueamento do FITC-dextran por parte do laser de 532 nm utilizado para gerar as ondas fotoacústicas foi realizado um ensaio em que foi exposto um poço com 200 μ L de FITC-dextran em sacarose 280 mM a ondas fotoacústicas. Analisando os dados da fluorescência antes e depois de o poço ser irradiado concluímos que a fluorescência não diminuiu, o que nos leva a concluir, mais uma vez, que a diminuição da fluorescência observa tanto na análise dos resultados da microscopia de confocal como dos dados da citometria de fluxo se deve a um aumento da permeação da bicamada lipídica.

O método utilizado destabiliza suficientemente a membrana para permitir a permeação de FITC-dextran, uma molécula de grandes dimensões que não tem capacidade de permear passivamente a bicamada lipídica.

3.3.4 Permeação utilizando GFP

Para testar condições experimentais mais próximas de ensaios biológicos, substituiu-se o FITC-dextran 200 μM em sacarose 280 mM por GFP, uma proteína fluorescente com cerca de 27 kDa⁶⁸, encapsulado dentro das vesículas de POPC. O objetivo é verificar se a saída da GFP do interior dos GUUV's também é potenciada pela aplicação de ondas fotoacústicas e adicionalmente avaliar o efeito da estabilidade da proteína à exposição às ondas fotoacústicas.

Foram produzidos GUUV's encapsulando 44,2 μM de GFP em sacarose 280 mM, que foram expostos às ondas fotoacústicas 100 mJ cm^{-2} durante 10 minutos e as amostras foram avaliadas antes e depois da exposição, utilizando a microscopia confocal de fluorescência e a citometria de fluxo (Figuras 25 e 26). O controlo utilizado é similar ao utilizado nas secções anteriores e adicionalmente expôs-se ao laser uma alíquota da solução de GFP 44,2 μM em 280 mM sacarose. Traçaram-se os espectros de fluorescência e absorção desta amostra antes e depois da exposição ao laser.

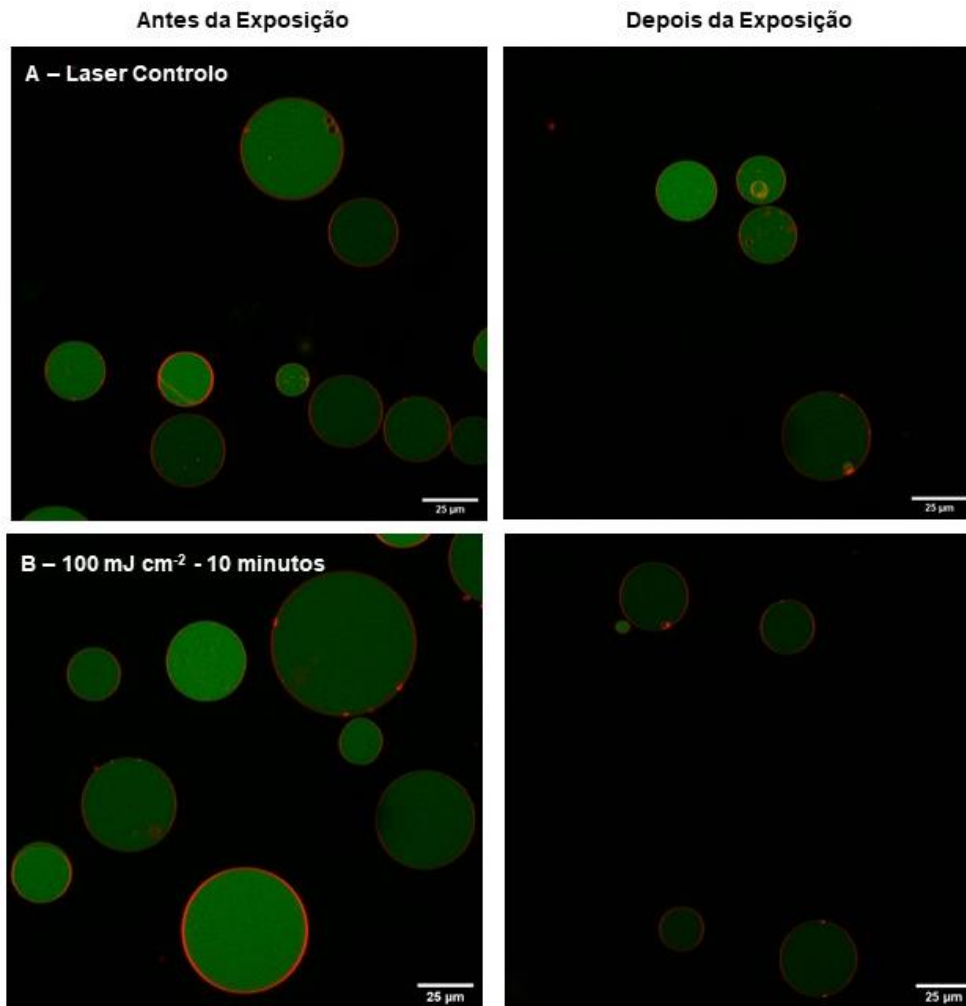


Figura 25 Efeito de ondas fotoacústicas com uma intensidade de 100mJ cm^{-2} durante 10 minutos em GUV's com GFP encapsulado, observado por microscopia de confocal.

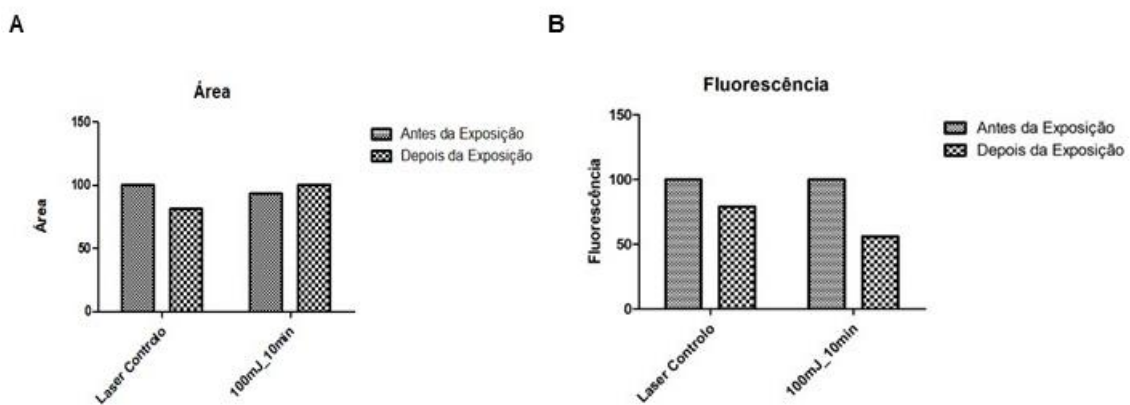


Figura 26 Efeito das ondas fotoacústicas na área normalizada (A) e na fluorescência normalizada (B) de GUV's com GFP encapsulado.

Os resultados apresentados na figura 26 foram normalizados. Observa-se, tanto visualmente como após análise das imagens utilizando o software ImageJ que, houve uma diminuição maior da intensidade de fluorescência da GFP nos GUV's, após aplicação das ondas fotoacústicas, cerca de 45%, comparado com a diminuição que ocorreu na amostra laser controlo, cerca de 20%. A área dos GUV's não sofreu alteração após exposição às ondas fotoacústicas. O tamanho médio dos GUV's desta experiência, 33 μm , é aproximadamente igual ao tamanho médio dos GUV's encapsulados com FITC-dextran. Esta variação não é significativa (estatística) o que permite concluir que não houve diferenças no passo da hidratação com a variação da molécula encapsulada.

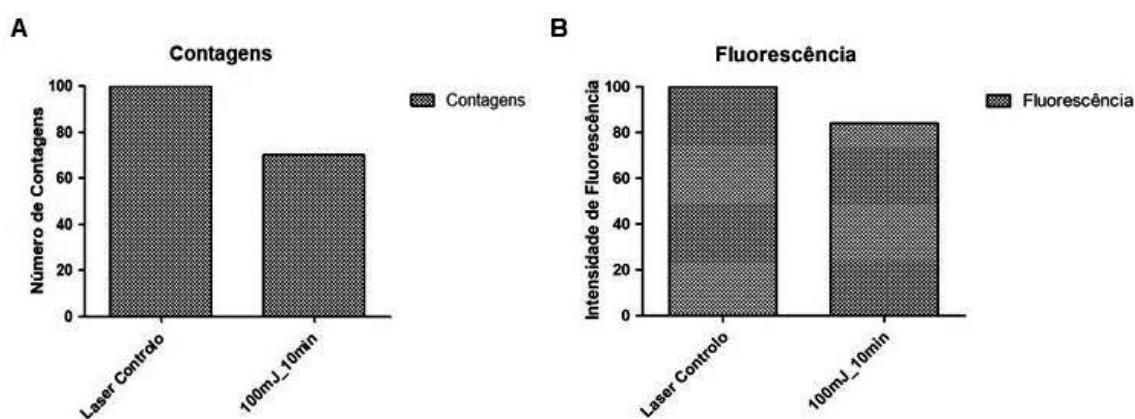


Figura 27 Número de contagens normalizado (A) e intensidade de fluorescência média normalizada (B) de GUV's com GFP encapsulado, analisado por citometria de fluxo.

Através da citometria de fluxo, observa-se a diminuição da intensidade de fluorescência da GFP nos GUV's após exposição às ondas fotoacústicas em cerca de 20% comparativamente à amostra controlo que sofreu a mesma manipulação experimental com exceção da exposição ao laser. Este resultado complementa a informação obtida pela análise das imagens de microscopia confocal. Como já tinha sido observado nas experiências com FITC-dextran encapsulado, o número de contagens diminui na amostra que foi exposta ao laser indicando que no processo algumas vesículas são destruídas. Esta destruição deve-se ao manuseamento dos GUV's durante todo o procedimento de exposição às ondas fotoacústicas e também às próprias ondas que podem causar demasiada pressão à bicamada lipídica.

A amostra de GFP 44,2 μM em sacarose 280 mM apresenta a mesma intensidade de fluorescência antes e após exposição às ondas fotoacústicas e o espectro traçado inicialmente não varia, na sua forma, no final, obtido após exposição (Figura 28A). Também foi controlada fluorescência por citometria, (Figura 28B) não havendo variação na fluorescência entre o controlo e o poço de GFP exposto às ondas fotoacústicas. Estes dados revelam que não houve mudança na conformação da GFP e que a variação na intensidade de fluorescência nos GUV's com GFP encapsulada se deve à permeação da proteína de dentro para fora dos GUV's. Dadas as suas dimensões é de esperar que a permeação ocorra por efeito das ondas de pressão na membrana.

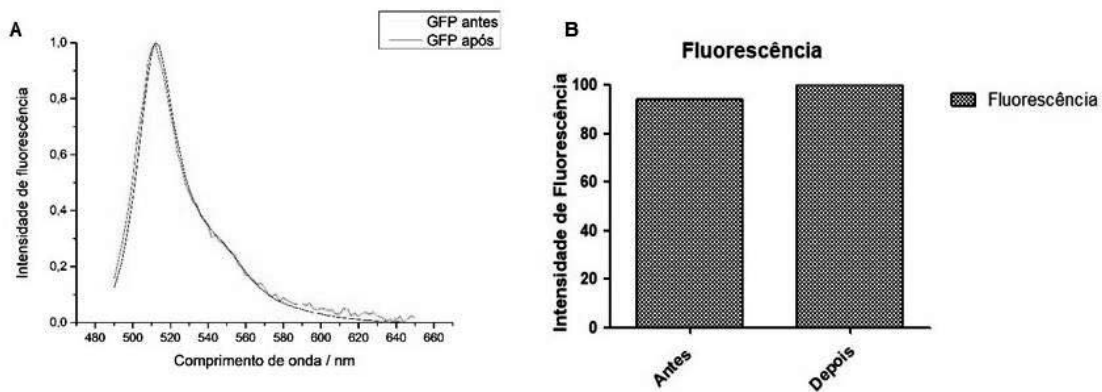


Figura 28 Espectros normalizados de fluorescência de GFP. **A-** Análise da fluorescência do GFP antes e depois da exposição a ondas fotoacústicas com uma fluência do laser de 100 mJ cm^{-2} durante 10 minutos por espectroscopia de fluorescência. **B -** Fluorescência normalizada de GFP antes e depois de exposição a ondas fotoacústicas com uma fluência do laser de 100 mJ cm^{-2} durante 10 minutos por citometria de fluxo.

Capítulo 4 - Conclusão

O efeito das ondas fotoacústicas em membranas biológicas, principalmente ao nível da permeação, é uma área de interesse entre a comunidade científica e é o objeto de estudo deste trabalho. Para estudar esse efeito utilizando um sistema mais simples, utilizou-se um modelo de bicamada lipídica, os GUV's, compostos por POPC. Estes GUV's foram sujeitos a ondas fotoacústicas com diferentes intensidades e tempos de exposição.

Os GUV's são um bom modelo de bicamada lipídica e o protocolo para a produção destas vesículas foi otimizado ao longo deste trabalho. O tempo de repouso entre a hidratação e a diluição, o filme de PVA e o método de diluição foram as condições melhoradas. Com estas alterações foi possível produzir GUV's de forma uniforme e reprodutível, tanto em tamanho como quantidade.

Os GUV's utilizados como modelo de bicamada para o estudo da aplicação de ondas fotoacústicas continham uma solução de FITC-dextran encapsulada, uma molécula fluorescente de dimensões elevadas (4 kDa). Com a utilização de microscopia confocal de fluorescência e de citometria de fluxo, mostrou-se que as ondas fotoacústicas são capazes de aumentar a permeação de moléculas grandes através da bicamada lipídica. Este resultado foi reprodutível em vários ensaios independentes e para diferentes fluências e tempos de exposição ao laser. Contudo, e devido a só analisarmos a média dos poços, os resultados não têm toda significância estatística. Mais ensaios são precisos para que este estudo fique mais relevante estatisticamente. Mesmo com esta implicação, ficou claro que existe menos FITC-dextran dentro dos GUV's, depois de estes serem expostos a ondas fotoacústicas, quando comparado com os controlos. Foi possível verificar que as ondas fotoacústicas não diminuem o tamanho médio dos GUV's mas podem interferir com o número final de GUV's que se encontra na amostra antes e depois da exposição.

A hipótese de que a exposição de macromoléculas biológicas a ondas fotoacústicas leva à sua desnaturação foi também colocada e para refutar esta hipótese utilizou-se a proteína GFP em substituição do FITC-dextran. Os resultados obtidos indicam não só que a GFP conseguiu permear a bicamada lipídica com a intervenção das ondas fotoacústicas mas também que esta não sofreu alterações significativas à sua estrutura.

4.1 - Perspetivas futuras

O estudo do mecanismo pelo qual as ondas fotoacústicas conseguem aumentar a permeação através de membranas biológicas ao nível da bicamada lipídica é um passo fulcral na continuação deste projeto. Para essa finalidade, é necessário acoplar uma montagem para a geração de ondas fotoacústicas a um microscópio confocal permitindo observar a interação entre as ondas e as membranas. Esta metodologia permitiria observar os efeitos na bicamada lipídica, em tempo real, e perceber o que torna esta camada mais permeável a moléculas com maior peso molecular.

Outro objetivo futuro é desenvolver uma experiência para mimetizar a entrega de fármacos/material genético em células e, para isso, o protocolo utilizado neste estudo pode ser invertido. Sendo assim, vão ser desenvolvidos GUV's sem moléculas fluorescentes no interior para analisar a penetração do FITC-dextran e/ou da GFP por acção das ondas fotoacústicas. Este estudo permitirá confirmar se o efeito observado em trabalhos anteriores¹ está relacionado com o efeito das ondas de pressão ao nível da bicamada lipídica.

Os GUV's são modelos da bicamada simples e estas experiências podem ser feitas em modelos membranares mais complexos, utilizando outros lípidos para além do POPC. A introdução de outros fosfolípidos biologicamente relevantes e de uma percentagem de colesterol na bicamada lipídica que forma os GUV's, aproximará o nosso modelo de condições mais relevantes a nível biológico.

Capítulo 5 - Bibliografía

- (1) Silva, A. D.; Serpa, C.; Arnaut, L. G. Photoacoustic Transfection of DNA Encoding GFP. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2553.
- (2) Sá, G. F. F. Photoacoustic Waves for Transdermal Drug Delivery, Tese de douturamento em Química, Universidade de Coimbra, 2012.
- (3) Abbe Nollet, T. S. Part of a Letter from Abbe Nollet, of the Royal Academy of Sciences at Paris, and F. R. S. to Martin Folkes Esq; President of the Same, Concerning Electricity. *Philos. Trans.* **1748**, *45*, 187–194.
- (4) Mouritsen, O. G.; Bagatolli, L. A. *Life - As a Matter of Fat, 2nd Ed*; Springer International Publishing, 2015, 978-3-319-22614-9.
- (5) Banfalvi, G. *Permeability of Biological Membranes*; Springer International Publishing, 2016, 978-3-319-28098-1.
- (6) Yeagle, P. L. *The Structure of Biological Membranes, 3rd Edition*; CRC Press, 2011, 978-1-439-80957-0.
- (7) Raicu, V.; Popescu, A. *Integrated Molecular and Cellular Biophysics*; Springer Netherlands, 2008, 978-1-4020-8268-9.
- (8) Miller, L.; LB, R. Cellular Membranes. *Science (80-)*. **1992**, *258*, 871.
- (9) Hazel, J. Thermal Adaptations in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, *57*, 19–42.
- (10) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle. *Science (80-)*. **2010**, *327*, 46–50.
- (11) Brown, M. F. Modulation of Rhodopsin Function by Properties of the Membrane Bilayer. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *73*, 159–180.
- (12) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-)*. **1972**, *175*, 720–731.
- (13) Spector, A. A.; Yorek, M. A. Membrane Lipid Composition and Cellular Function. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 1015–1035.
- (14) Heimburg, T. Physical Properties of Biological Membranes. In *Handbook of Molecular Biophysics*; Wiley-VCH, 2009; pp 593–616, 978-3-527-40702-6.

- (15) Vaz, W. L. C. Lipid Bilayers: Properties. *Wiley Encycl. Chem. Biol.* **2008**, 1–16.
- (16) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Biochemistry, 5th Edition*; W H Freeman, 2002, 978-0-716-74684-3
- (17) Brown, D. A.; London, E. Structure of Detergent-Resistant Membrane Domains: Does Phase Separation Occur in Biological Membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 1–7.
- (18) Feigenson, G. W. Phase Behavior of Lipid Mixtures. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 560–563.
- (19) Ziblat, R.; Leiserowitz, L.; Addadi, L. Crystalline Domain Structure and Cholesterol Crystal Nucleation in Single Hydrated DPPC: Cholesterol: POPC Bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9920–9927.
- (20) Cunha, J. Development of Methodologies for Permeability and Vesicle Fusion Evaluation, Tese de Mestrado em Química, Universidade de Coimbra, 2018.
(<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/86451?mode=full>)
- (21) Najafinobar, N.; Mellander, L. J.; Kurczyk, M. E.; Dunevall, J.; Angerer, T. B.; Fletcher, J. S.; Cans, A. S. Cholesterol Alters the Dynamics of Release in Protein Independent Cell Models for Exocytosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33702.
- (22) Simons, K.; Sampaio, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004697.
- (23) Miao, Z. L.; Deng, Y. J.; Du, H. Y.; Suo, X. Bin; Wang, X. Y.; Wang, X.; Wang, L.; Cui, L. J.; Duan, N. Preparation of a Liposomal Delivery System and Its in Vitro Release of Rapamycin. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *9*, 941–946.
- (24) Peetla, C.; Vijayaraghavalu, S.; Labhasetwar, V. Biophysics of Cell Membrane Lipids in Cancer Drug Resistance: Implications for Drug Transport and Drug Delivery with Nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1686–1698.
- (25) Kaddah, S.; Khreich, N.; Kaddah, F.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Cholesterol Modulates the Liposome Membrane Fluidity and Permeability for

- a Hydrophilic Molecule. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *113*, 40–48.
- (26) Honary, S.; Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 255–264.
- (27) Cevc, G. Membrane Electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1990**, *1031*, 311–382.
- (28) Kaszuba, M.; Corbett, J.; Watson, F. M. N.; Jones, A. High-Concentration Zeta Potential Measurements Using Light-Scattering Techniques. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368*.
- (29) Keogh, J. P. Membrane Transporters in Drug Development. *Adv. Pharmacol.* **2012**, *63*, 1–42.
- (30) Shinoda, W. Permeability across Lipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, *1858*, 2254–2265.
- (31) Di, L.; Kerns, E. H. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*; Academic Press, 2016, 978-0-1236-9520-8.
- (32) Seydel, J. K.; Wiese, M. *Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling*; Wiley-VCH, 2002, 978-3-527-61649-7.
- (33) Orsi, M.; Essex, J. W. Permeability of Drugs and Hormones through a Lipid Bilayer: Insights from Dual-Resolution Molecular Dynamics. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3797–3808.
- (34) Xiang, T. X.; Anderson, B. D. A Computer Simulation of Functional Group Contributions to Free Energy in Water and a DPPC Lipid Bilayer. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2052–2066.
- (35) Szabo, G. Dual Mechanism for the Action of Cholesterol on Membrane Permeability. *Nature* **1974**, *252*, 47–49.
- (36) Haines, T. H. Do Sterols Reduce Proton and Sodium Leaks through Lipid Bilayers? *Prog. Lipid Res.* **2001**, *40*, 299–324.
- (37) Hoffmann, A.; Bredno, J.; Wendland, M.; Derugin, N.; Ohara, P.;

- Wintermark, M. High and Low Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran to Assess Blood-Brain Barrier Disruption: Technical Considerations. *Transl. Stroke Res.* **2011**, *2*, 106–111.
- (38) Natarajan, R.; Northrop, N.; Yamamoto, B. Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran Extravasation as a Measure of Blood-Brain Barrier Permeability. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2017**, *79*, 9.58.1-9.58-15.
- (39) Ogura, M.; Sato, S.; Nakanishi, K.; Uenoyama, M.; Kiyozumi, T.; Saitoh, D.; Ikeda, T.; Ashida, H.; Obara, M. In Vivo Targeted Gene Transfer in Skin by the Use of Laser-Induced Stress Waves. *Lasers Surg. Med.* **2004**.
- (40) Terakawa, M.; Ogura, M.; Sato, S.; Wakisaka, H.; Ashida, H.; Uenoyama, M.; Masaki, Y.; Obara, M. Gene Transfer into Mammalian Cells by Use of a Nanosecond Pulsed Laser-Induced Stress Wave. *Opt. Lett.* **2004**, *29*, 1227–1229.
- (41) Doukas, A. G.; Kollias, N. Transdermal Drug Delivery with a Pressure Wave. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 559–579.
- (42) Coskun, Ü.; Simons, K. Cell Membranes: The Lipid Perspective. *Structure* **2011**, *19*, 1543–1548.
- (43) Weinberger, A.; Tsai, F. C.; Koenderink, G. H.; Schmidt, T. F.; Itri, R.; Meier, W.; Schmatko, T.; Schröder, A.; Marques, C. Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 154–164.
- (44) Bhatia, T.; Husen, P.; Brewer, J.; Bagatolli, L. A.; Hansen, P. L.; Ipsen, J. H.; Mouritsen, O. G. Preparing Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) of Complex Lipid Mixtures on Demand : Mixing Small Unilamellar Vesicles of Compositionally Heterogeneous Mixtures. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, *1848*, 3175–3180.
- (45) Wieprecht, T.; Apostolov, O.; U, J. S. Binding of the Antibacterial Peptide Magainin 2 Amide to Small and Large Unilamellar Vesicles. *Biophys. Chem.* **2000**, *85*, 187–198.
- (46) Hopea, M. J.; Ballya, M. B.; Webbb, G.; Cullis, P. R. Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure. Characterization of

- Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1985**, *812*, 55–65.
- (47) Stein, H.; Spindler, S.; Bonakdar, N.; Wang, C.; Sandoghdar, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 1–16.
- (48) Dao, T. P. T.; Fauquignon, M.; Fernandes, F.; Ibarboure, E.; Vax, A.; Prieto, M.; Le Meins, J. F. Membrane Properties of Giant Polymer and Lipid Vesicles Obtained by Electroformation and Pva Gel-Assisted Hydration Methods. *Colloids Surfaces A* **2017**, *533*, 347–353.
- (49) Reeves, J. P.; Dowben, R. M. Formation and Properties of Thin-walled Phospholipid Vesicles. *J. Cell. Physiol.* **1969**, *1969*, 69–60.
- (50) Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc* **1986**, *81*, 303–311.
- (51) Witkowska, A.; Jablonski, L.; Jahn, R. A Convenient Protocol for Generating Giant Unilamellar Vesicles Containing SNARE Proteins Using Electroformation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9422.
- (52) O'Brien, W. D. Ultrasound-Biophysics Mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2007**, *93*, 212–255.
- (53) O'Brien, W. D.; Yang, Y.; Simpson, D. G.; Frizzell, L. A.; Miller, R. J.; Blue, J. P.; Zachary, J. F. Threshold Estimation of Ultrasound-Induced Lung Hemorrhage in Adult Rabbits and Comparison of Thresholds in Mice, Rats, Rabbits and Pigs. *Ultrasound Med. Biol.* **2006**, *32*, 1793–1804.
- (54) Wang, L. V.; Hu, S. Photoacoustic Tomography: In Vivo Imaging from Organelles to Organs. *Science (80-.)*. **2012**, *335*, 1458–1462.
- (55) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555.
- (56) Tam, A. C. Applications of Photoacoustic Sensing Techniques. *Rev. Mod. Phys.* **1986**, *58*, 381.

- (57) Bell, A. G. On the Production and Reproduction of Sound by Light. *Am. J. Sci.* **1881**, 29, 115–136.
- (58) McDonald, F. A.; Wetsel, G. C.; McDonald, F. A.; Wetsel, G. C. Generalized Theory of the Photoacoustic Effect. *J. Appl. Phys.* **1978**, 49, 2313.
- (59) Thomas J. Flotte, Shun Lee, Hong Zhang, Daniel J. McAuliffe, Tina Douki, A. G. D. Laser-Induced Stress Transients: Applications for Molecular Delivery. *Laser-Tissue Interact. VI* **1995**, 2391, 202–207.
- (60) Sá, G. F. F.; Serpa, C.; Arnaut, L. G. Stratum Corneum Permeabilization with Photoacoustic Waves Generated by Piezophotonic Materials. *J. Control. Release* **2013**, 167, 290–300.
- (61) Sá, G. F. F.; Serpa, C.; Arnaut, L. G. Photoacoustic Waves as a Skin Permeation Enhancement Method. *Percutaneous Penetration Enhanc. Phys. Methods Penetration Enhanc.* **2017**, 175–191.
- (62) Schaberle, F. A.; Nunes, R. M. D.; Barroso, M.; Serpa, C.; Arnaut, L. G. Analytical Solution for Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry Data and Applications to Two Typical Photoreactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 812–822.
- (63) Sun, T.; Diebold, G. J. Generation of Ultrasonic Waves from a Layered Photoacoustic. *Nature* **1992**, 355, 806–808.
- (64) Price, R. L., Jerome, W. G. *Introduction and Historical Perspective. Basic Confocal Microscopy*; Springer-Verlag New York, 2018, 978-0-387-78175-4.
- (65) Paddock, S. W. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Mol. Biotechnol.* **2000**, 16, 127–149.
- (66) Mcsharry, J. J. Uses of Flow Cytometry in Virology. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, 7, 576–604.
- (67) Brown, M.; Wittwer, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin. Chem.* **2000**, 46, 1221–1229.
- (68) Inouye, S.; Tsuji, F. I. Evidence for Redox Forms of the Aequorea Green Fluorescent Protein. *FEBS Lett.* **1994**, 351, 211–214.

Material Suplementar

Tabela 1 Resultados, separados por condição e experiência, de cada GUV tratado no programa ImageJ.

Controlo (Segunda Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	2073,54	49,65	1	1	451,26	15,80
	2	487,54	7,06		2	1286,18	13,75
	3	515,89	10,78		3	705,71	46,66
	4	1077,35	5,98		4	1293,38	13,64
	5	782,75	4,27		5	1402,03	11,51
	6	972,66	33,29		6	594,39	11,83
	7	537,34	41,94		7	746,47	10,74
	8	983,86	25,68	2	8	692,10	9,40
	9	751,55	4,48		9	751,77	11,37
	10	259,28	12,62		10	3717,02	44,47
2	11	308,48	5,38	3	11	630,66	17,48
	12	1163,87	31,65		12	554,06	11,66
	13	782,53	6,16		13	881,15	11,80
	14	1464,46	61,82	4	14	876,67	95,53
	15	1260,81	35,18		15	1300,23	117,22
	16	264,71	5,75		16	439,76	14,71
	17	818,85	6,18		17	954,18	19,59
	18	662,97	5,38		18	797,31	11,68
	19	579,91	6,73		19	740,87	12,28
	20	463,41	6,43		20	265,05	110,76
	21	887,70	16,89	5	21	813,60	13,63
	22	387,45	6,70		22	1013,55	66,57
	23	781,67	13,68		23	413,61	11,16
	24	589,52	8,33		24	1029,27	12,78
	25	1638,39	9,61		25	524,24	10,36
	26	802,18	42,70		26	961,03	16,36
	27	424,76	35,25		27	818,85	14,52
	28	750,74	6,82				
	29	725,88	5,61				
	30	736,39	53,46				
3	31	1464,46	11,00				
	32	1183,64	6,91				
	33	1183,64	30,20				
	34	1164,56	16,66				
	35	1367,70	63,05				
	36	2778,39	63,03				
	37	849,87	6,26				
	38	802,39	7,28				
	39	802,39	8,28				
4	40	2439,15	86,89				
	41	432,09	14,49				
	42	299,17	75,34				
	43	2466,42	20,68				
	44	1428,92	43,87				
	45	726,82	14,84				
	46	954,18	7,84				
	47	527,05	6,07				
	48	677,97	5,23				
5	49	2253,28	27,21				
	50	3188,94	18,60				
	51	2615,84	42,69				
	52	899,59	35,74				
	53	677,80	10,86				
	54	838,50	21,66				
	55	1728,48	66,26				

Controlo (Terceira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF avg	Img	GUV	Area	IF avg
1	1	1828,995	8,644	1	1	2273,491	47,05
	2	2540,74	82,529		2	1744,421	9,722
	3	1727,834	92,237		3	1925,072	71,003
	4	781,885	7,262		4	2079,57	87,265
	5	4288,005	29,436		5	2195,983	68,448
	6	1586,088	89,626		6	716,656	15,372
2	7	7005,13	121,222	7	170,483	46,123	
	8	4288,866	86,563	8	1621,029	106,489	
	9	4109,164	103,477	9	3045,682	89,801	
3	10	1260,848	44,813	10	2569,089	48,469	
	11	2217,611	110,645	11	1253,395	101,15	
	12	2758,83	74,707	12	1797,113	74,618	
4	13	3697,024	109	2	13	1060,207	51,565
	14	2331,869	114,388		14	1751,789	100,75
	15	1997,582	102,388		15	1209,449	11,045
	16	2413,556	56,807		16	1457,181	26,914
	17	1127,332	14,328		17	2039,589	71,328
	18	692,486	4,812		18	2512,908	108,409
	19	211,154	97,579		19	786,711	26,68
	20	4301,49	123,829		20	1492,898	14,522
	21	3864,404	19,952		21	305,895	79,671
	22	5494,567	108,102		22	1736,106	96,719
	23	432,088	94,184		23	520,453	40,584
	24	584,561	59,53		24	876,541	49,646
	25	185,907	45,866		25	1449,512	62,402
	26	2072,332	96,711		3	26	1981,986
27	1457,612	9,419	27	3797,452		43,065	
28	3797,064	141,75	28	1974,274		96,384	
5	29	696,149	114,585	29	2225,969	65,542	
	30	3541,75	133,635	30	1464,161	7,809	
	31	2192,536	116,71	31	972,661	67,176	
	32	818,42	37,454	32	2090,428	28,573	
	33	3530,979	125,424	33	1121,214	7,472	
	34	3005,011	103,808	4	34	1194,93	9,93
	35	2999,281	8,968		35	770,511	12,034
	36	1468,986	9,174	36	1682,51	88,029	
	6	37	1675,013	16,782	37	1675,358	121,526
		38	1195,619	18,159	38	1682,725	141,944
39		1127,332	26,866	39	4133,032	122,933	
40		1450,202	114,224	40	154,499	40,342	
41		1190,234	70,847	41	782,532	45,534	
42		1578,893	98,61	42	1883,754	45,262	
43		2340,141	95,02	5	43	2191,244	98,322
44		983,259	32,552		44	2681,452	103,315
45		1966,174	70,268	45	1279,935	10,828	
46		3507,67	97,549	46	1759,673	9,634	
47		1121,214	62,69	47	1845,194	33,976	
48		1214,792	8,15	48	2158,414	8,909	
49		1234,309	6,7	6	49	2564,608	67,186
			50		2672,792	93,187	
			51		4532,592	104,769	
			52		3797,237	105,786	
			53		1932,568	15,478	
			54		1246,975	11,41	
			55		2768,352	58,322	
			56		4482,442	9,721	

Laser Controle (Primeira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	2244,15	72,39	1	1	2895,06	52,69
	2	1924,73	31,37		2	2394,73	15,77
	3	849,87	57,29		3	1360,42	40,37
	4	725,53	30,16		4	909,59	5,04
	5	2115,20	12,92		2	5	5564,45
2	6	3376,48	70,97	6		3444,12	36,96
	7	1808,83	64,62	7	4517,94	25,72	
	8	904,11	59,60	3	8	1402,03	40,03
	9	2875,07	21,93		9	1622,75	41,30
	10	1201,69	45,07	10	813,60	33,79	
	11	1127,25	37,08	11	2113,69	23,26	
	12	3015,78	49,87	12	576,38	42,63	
	13	1608,88	46,00	13	1065,72	6,15	
3	14	746,04	21,15	14	777,15	6,84	
	15	787,75	17,76	4	15	2830,31	49,58
	16	1644,94	53,26		16	3308,11	48,48
	17	1542,66	25,46	5	17	6550,25	46,64
	18	1485,62	49,55		18	3169,03	47,91
	19	1828,91	49,19	19	1012,47	27,03	
	20	1183,43	53,21	6	20	2032,18	40,75
4	21	726,82	65,29		21	3283,68	34,18
	22	1018,50	61,30				
	23	1318,62	57,77				
	24	2994,50	67,25				
	25	1107,77	60,02				
	26	2183,62	32,35				
	27	1235,13	53,91				
5	28	1506,94	28,61				
	29	1506,94	65,28				
	30	1932,40	73,49				
6	31	1908,79	61,83				
	32	1346,63	48,66				
	33	1260,16	72,78				
	34	1563,94	67,11				
	35	696,67	17,45				
	36	1997,58	7,47				
	37	1470,54	8,32				

Laser Controle (Segunda Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	1932,53	129,11	1	1	782,2	135,4
	2	1667,90	155,37		2	762,2	34,5
	3	849,38	91,43		3	351,2	78,1
	4	1251,24	70,28		4	459,3	13,1
	5	1025,74	69,14		5	321,8	96,0
	6	932,55	82,04	2	6	1364,3	108,1
2	7	2064,58	133,41		7	689,7	146,1
	8	988,86	12,46	8	617,5	101,6	
	9	1557,39	129,78	9	195,6	102,1	
	10	1202,64	12,51	10	701,6	15,0	
	11	616,27	12,49	11	988,9	16,0	
	12	1736,28	130,05	12	909,5	61,5	
	13	751,60	13,79	13	602,9	14,6	
	14	5701,97	73,78	14	696,7	12,8	
3	15	795,59	58,28	3	15	2095,1	122,4
	16	1781,73	91,46		16	440,0	111,4
	17	900,37	79,65	17	4312,6	41,2	
	18	1112,17	115,95	18	1157,6	16,7	
	19	2209,90	66,46	19	955,7	16,1	

	20	362,42	11,35	4	20	986,5	107,4
	21	420,67	36,02		21	746,4	105,9
	22	706,83	12,29		22	932,8	18,2
	23	677,80	15,59		23	1183,1	14,3
	24	1422,50	29,64		24	288,8	15,3
4	25	868,79	147,39	5	25	904,8	14,1
	26	763,14	146,82		26	687,7	14,1
	27	738,11	137,07		27	162,9	39,9
	28	1110,18	139,36		28	932,9	69,5
	29	1488,76	125,95		29	899,6	15,2
	30	1344,82	123,76		30	594,4	107,9
	31	420,84	18,24		31	421,3	26,4
5	32	2049,11	117,17		32	915,5	84,2
	33	1492,42	145,82		33	1019,3	67,9
	34	908,25	86,11		34	192,8	56,8
	35	976,54	79,05		35	861,3	17,7
	36	987,27	79,24		36	802,4	71,6
	37	1270,76	65,88		37	412,9	121,3
	38	982,44	66,47		38	507,8	73,3
	39	978,13	14,57		39	205,5	33,8
6	40	338,60	69,20		40	416,8	12,7
	41	545,61	95,67		41	792,6	12,8
	42	2105,77	37,09		42	325,3	17,7
	43	649,10	11,09		43	807,6	15,2
	44	1007,39	12,43		44	462,4	108,4
	45	5306,21	77,11	6	45	543,8	79,4
	46	978,48	14,93		46	1491,6	75,1
					47	537,5	124,9
					48	955,3	15,3
					49	904,8	14,8
					50	706,7	78,0
					51	424,6	130,0
					52	948,8	13,3
					53	797,4	11,8
					54	617,0	59,5
					55	746,4	24,4
					56	706,7	11,6
					57	208,4	94,2
					58	1571,4	110,5
					59	620,6	51,8
					60	1131,7	32,2

Laser Controle (Terceira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	308,74	12,41	1	1	802,39	100,16
	2	373,62	101,56		2	546,17	100,75
	3	362,42	16,13	2	3	910,06	105,16
	4	216,63	23,19		4	537,47	87,70
2	5	208,44	191,29	3	5	113,91	100,58
	6	463,28	99,71		6	127,87	22,38
	7	208,44	126,61		7	152,39	76,05
3	8	696,58	148,45		8	283,32	11,86
	9	500,12	133,75		9	108,31	12,14
4	10	2132,00	119,24	4	10	1286,53	103,67
	11	86,34	32,22		11	904,85	11,68
5	12	1066,41	5,49	5	12	369,83	97,97
	13	148,04	18,59		13	626,74	52,96
	14	639,88	9,03		14	366,04	105,07
	15	152,39	35,40		15	318,52	11,63
6	16	1221,81	170,31		16	541,31	66,64
	17	1171,54	109,62	6	17	520,45	114,79
					18	616,96	35,40

					19	612,05	12,52
					20	756,04	11,90

Exposição a 50 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Primeira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	2159,41	94,35	1	1	2868,35	47,86
	2	3202,59	67,89		2	1088,17	45,23
	3	3025,22	93,87		3	1690,27	13,37
	4	2586,67	77,10		4	1500,01	9,50
	5	4133,98	89,10		2	2556,12	20,77
2	6	2599,46	65,00	6	1974,10	40,95	
	7	2192,24	64,44	7	775,42	35,56	
	8	1428,75	56,89	8	2062,94	33,50	
	9	1583,59	68,55	9	2305,55	5,83	
	10	2729,06	74,30	3	2350,91	48,17	
	11	2435,57	12,01	11	2512,91	10,55	
	12	1908,01	8,33	12	3912,31	6,52	
	13	1084,33	62,32	13	1690,18	6,15	
	14	2875,33	55,31	14	1767,47	10,34	
	15	3542,18	44,87	15	2090,43	7,14	
	16	1177,65	21,45	4	4508,16	41,42	
	17	1428,57	16,23	17	4508,16	37,24	
	18	3974,79	98,57	18	3242,58	45,78	
	19	3497,37	88,89	19	2157,12	28,32	
	20	1630,47	86,65	20	1638,35	8,08	
	21	4783,30	25,95	5	4545,60	49,14	
	22	5717,23	75,81	22	3442,27	37,32	
	23	3368,12	89,33	23	2367,63	17,65	
	24	2314,46	85,68	24	2895,41	9,56	
	25	3190,10	79,18	25	1883,93	3,98	
	26	2314,55	62,24	6	1876,65	50,50	
	27	2005,64	38,14	27	3262,91	7,56	
	28	2278,36	43,63	28	2056,56	9,80	
	29	987,87	17,76	29	2864,56	7,12	
	30	362,42	45,00	30	1260,85	5,83	
	31	550,09	36,94				
	32	563,58	38,09				
	33	545,61	40,94				
	34	372,80	31,14				
	35	2776,93	68,48				
6	36	3272,35	75,16				
	37	2494,30	69,86				
	38	3649,63	46,29				
	39	1557,48	33,11				

Exposição a 50 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Segunda Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	1273,86	136,56	1	1	405,68	77,11
	2	1260,16	99,70		2	318,82	10,88
	3	1090,80	16,23		3	570,39	10,03
	4	1107,99	15,35		4	612,39	10,04
	5	417,44	79,98		2	345,36	11,44
	6	305,42	143,37	6	250,40	6,33	
	7	568,19	12,85	7	777,15	21,97	
	8	459,27	12,83	8	247,04	11,14	
	9	1299,93	103,85	9	475,90	13,05	
	10	612,39	91,98	3	472,20	15,71	
	11	639,80	23,77	11	711,06	13,99	
	12	1151,37	119,78	12	279,23	20,54	
	13	1457,61	108,77	13	1054,26	11,94	

2	14	2296,45	98,59	4	14	1246,98	11,03
	15	2314,55	17,20		15	115,21	68,43
	16	899,07	50,04	5	16	236,19	12,74
	17	1332,84	137,88		17	1089,94	11,50
	18	1029,79	47,17	6	18	667,63	21,54
	19	1464,51	116,30		19	554,23	12,09
	20	424,63	115,55				
	21	1001,10	15,47				
	22	524,42	13,61				
	23	402,23	31,43				
	24	1600,74	124,63				
	25	1332,76	28,80				
	26	409,60	10,56				
	27	474,27	14,00				
3	28	2914,36	98,54				
	29	1373,43	14,11				
	30	701,58	12,77				
	31	954,18	13,65				
	32	2587,27	73,50				
	33	581,12	14,74				
4	34	807,82	152,23				
	35	1409,14	12,90				
	36	1018,67	102,11				
	37	2098,10	45,35				
	38	797,40	12,95				
	39	1408,24	14,26				
	40	558,97	116,01				
	41	1414,79	12,10				
	42	467,55	10,58				
	43	491,24	15,01				
	44	1208,11	14,18				
	45	983,52	34,41				
	46	1195,62	14,69				
	47	1339,91	12,27				
	48	1005,53	11,61				
	49	328,82	26,00				
5	50	598,91	96,67				
	51	471,51	14,79				
	52	1360,67	106,95				
	53	1202,64	130,99				
	54	1528,27	126,51				
	55	1019,28	135,42				
	56	1190,23	150,68				
	57	792,74	12,90				
	58	504,25	97,76				
	59	1024,71	154,86				
	60	1267,27	94,06				
	61	230,41	110,49				
	62	948,36	91,60				
	63	1138,96	14,49				
	64	544,80	16,11				
	65	593,87	16,83				
	66	849,87	26,98				
	67	630,66	21,09				
	68	571,59	11,99				
	69	961,03	79,03				
	70	358,63	18,30				
	71	621,87	23,65				

Exposição a 50 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Terceira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	467,46	178,60	1	1	766,20	69,09
	2	256,44	183,88		2	424,94	114,94
	3	482,71	176,45		3	554,06	19,87
	4	338,64	18,08		4	152,39	117,50
2	5	828,85	128,84	2	5	943,92	74,64
	6	554,70	178,01		6	1108,63	63,45
3	7	352,21	190,64	3	7	345,36	18,08
	8	79,45	157,33		8	662,63	11,77
	9	117,75	180,43		9	455,44	83,05
4	10	60,15	59,67	4	10	1354,17	39,29
	11	436,44	103,44		11	112,10	69,38
	12	268,15	158,22		12	504,21	91,54
	13	309,08	144,39		13	322,10	74,57
5	14	1090,80	99,09	5	14	882,87	90,98
	15	662,93	162,91		15	983,52	114,66
6	16	792,74	110,61	6	16	696,15	16,16
	17	374,18	168,34		17	253,42	13,74
					18	922,04	9,84
				19	352,25	41,92	

Exposição a 50 mJ cm ⁻² - 20 minutos (Primeira Experiência)								
Antes				Depois				
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF	
1	1	1296,65	66,99	1	1	949,14	26,33	
	2	1217,08	62,77		2	1401,43	5,93	
	3	1217,08	62,77		3	630,66	12,02	
	4	716,66	44,41		4	1615,21	21,21	
	5	1163,87	5,65		5	972,32	5,86	
	6	855,99	7,06		2	6	2885,71	41,73
2	7	2513,25	67,08	7		3147,40	27,52	
	8	358,85	62,00	8	1148,70	36,35		
	9	1133,84	57,54	9	938,11	7,79		
	10	771,37	43,11	3	10	4681,96	30,71	
11	1054,35	16,36	11		3852,64	51,23		
12	2208,22	31,89	12		1674,41	6,19		
3	13	792,44	5,12	3	13	3254,29	5,83	
	14	3303,58	67,02		14	1022,64	24,65	
	15	1571,35	65,85		4	15	1751,79	8,32
	16	2934,79	72,70			16	1483,68	7,58
	17	1492,73	15,72		17	2984,55	32,16	
	18	1464,46	57,25		18	4367,67	41,93	
	19	871,33	43,91		19	1713,23	18,73	
4	20	2474,99	74,57	4	20	2131,36	9,38	
	21	1065,72	86,15		5	21	3561,74	39,51
	22	1202,64	62,40			22	1853,08	22,16
5	23	2349,10	8,47	5	23	2014,43	4,96	
	24	3922,78	82,27		6	24	948,79	4,81
	25	6652,66	57,47			25	1366,79	8,67
	26	2676,37	52,84		26	1852,61	6,45	
	27	5814,16	4,49		27	1751,79	8,94	
6	28	2530,83	62,91	6	28	915,27	5,44	
	29	2481,50	48,95		29	802,35	5,81	
	30	1949,24	7,50		30	721,53	5,11	
	31	937,33	37,98		31	1262,70	5,85	
	32	2701,53	66,55		32	1360,59	54,04	
	33	1346,37	58,79		33	3213,84	39,00	
	34	1829,00	25,46					
	35	3599,57	44,61					

Exposição a 50 mJ cm ⁻² - 20 minutos (Segunda Experiência)								
Antes				Depois				
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF	
1	1	397,75	19,90	1	1	405,68	63,74	
	2	695,89	16,50		2	649,10	14,71	
	3	524,24	17,59		3	943,92	92,82	
	4	682,92	73,32		2	4	507,61	11,25
	5	448,29	73,54			5	797,14	12,70
	6	479,44	57,27		6	1615,39	10,58	
	7	2394,73	13,37		3	7	338,60	14,34
	8	286,08	15,36			8	682,28	14,15
2	9	771,59	19,63	9	576,29	13,14		
	10	706,75	57,28	10	576,29	12,65		
	11	654,57	155,05	4	11	380,00	57,23	
	12	222,31	138,22		12	930,91	12,39	
	13	751,60	18,78	13	467,46	16,87		
	14	259,11	119,19	14	305,42	11,00		
	15	721,91	115,73	15	172,94	53,25		
	16	696,67	26,49	16	161,00	70,10		
17	711,62	19,39	5	17	2031,66	15,09		
18	283,75	17,72		18	907,26	12,90		
19	495,34	16,19	19	1122,38	57,98			
20	1246,98	14,65	20	501,84	10,36			
21	132,27	53,71	6	21	955,73	12,75		
3	22	1107,77		142,34	22	383,62	99,94	
	23	692,14	23,34	23	771,59	10,20		
24	1042,37	107,86	24	1273,04	27,64			
25	1876,65	13,00						
26	639,80	15,04						
27	409,30	14,52						
28	580,25	20,14						
29	771,42	105,98						
30	394,82	11,67						
31	154,07	37,77						
32	503,69	104,24						
33	792,44	67,41						
34	1607,67	126,36						
35	1048,96	15,81						
36	1373,43	16,66						
37	731,43	27,04						
38	144,68	61,16						
39	630,40	24,56						
40	771,42	29,36						
4	41	634,75	12,45					
	42	904,85	11,79					
	43	1133,84	27,64					
	44	1637,70	134,20					
	45	1421,12	120,46					
	46	1190,23	14,86					
	47	1470,37	12,19					
	48	1622,75	90,56					
	49	1513,97	12,86					
	50	590,21	112,32					
	51	944,10	112,61					
	52	787,75	12,39					
53	787,75	10,61						
54	471,81	93,11						
55	589,17	12,75						
56	692,49	98,73						
57	658,58	46,94						
58	1306,56	98,82						
59	829,36	11,75						
60	1012,64	92,72						
5	61	2140,49	124,10					

	62	1884,32	123,72				
	63	2925,22	100,24				
	64	777,15	46,42				
	65	1682,04	95,09				
	66	1286,18	123,35				
	67	726,57	51,40				
	68	630,58	17,51				
	69	1421,12	84,06				
	70	1421,12	64,69				
	71	1171,19	12,53				
	72	978,52	22,41				
	73	1145,99	106,42				
6	74	802,18	39,57				
	75	2531,00	121,82				
	76	558,71	104,69				
	77	829,36	120,67				
	78	1720,25	78,89				
	79	2540,40	29,31				
	80	2358,71	47,04				
	81	1844,94	113,09				
	82	1109,02	113,39				

Exposição a 50 mJ cm ⁻² - 20 minutos (Terceira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	861,33	152,59	1	1	1401,69	96,52
	2	524,24	132,09		2	142,74	65,75
	3	2270,00	104,52	2	3	630,58	79,34
	4	696,15	160,73		4	1892,67	18,41
	5	247,04	149,50	3	5	515,89	56,73
2	6	216,45	124,16		6	524,24	62,42
	7	1102,52	17,88		7	731,39	114,39
	8	877,19	165,74	4	8	475,90	50,23
	9	516,49	59,99		9	771,20	25,49
	10	871,33	150,51		10	663,10	37,22
	11	154,33	167,32	5	11	359,36	56,85
	12	654,19	176,89		12	533,46	68,27
	13	834,10	178,33		13	802,39	139,93
3	14	374,18	124,91	6	14	383,71	86,01
	15	247,13	105,89		15	362,85	81,71
	16	236,10	184,33		16	711,27	15,11
	17	236,01	144,47		17	516,49	15,31
	18	771,20	28,63				
	19	265,05	137,86				
	20	268,03	147,72				
4	21	280,43	191,48				
	22	475,13	20,58				
	23	338,64	202,45				
	24	373,62	154,95				
	25	454,97	27,70				
	26	823,59	132,92				
5	27	677,58	184,70				
	28	192,59	73,94				
	29	626,74	186,70				
	30	147,65	182,61				
	31	295,81	22,90				
	32	550,18	175,80				
	33	68,81	147,13				
	34	154,50	147,58				
	35	654,57	167,62				
	36	289,70	131,23				
	37	256,13	19,24				
6	38	110,17	123,16				

	39	491,24	156,67				
	40	499,69	68,30				
	41	86,77	39,10				
	42	180,44	21,77				
	43	108,31	95,33				
	44	168,63	59,92				
	45	607,48	158,59				
	46	97,03	55,13				
	47	203,53	151,52				
	48	855,99	161,52				
	49	338,60	92,71				
	50	119,77	101,56				
	51	183,11	100,50				
	52	1608,75	144,60				

Exposição a 100 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Primeira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	668,23	59,75	1	1	283,32	6,07
	2	485,47	57,64		2	721,53	67,27
	3	1123,37	52,88		3	1103,94	55,13
	4	1545,12	39,29		4	2700,84	52,58
	5	585,08	9,09		5	1279,94	42,68
2	6	2767,88	100,79		6	1925,07	47,16
	7	8373,26	128,05		7	508,22	59,08
	8	3283,07	132,59		8	537,90	7,27
3	9	4530,87	104,00	2	9	1235,43	71,32
	10	1580,32	96,29		10	1056,72	65,55
	11	4619,97	111,09		11	876,63	57,61
	12	3939,84	112,25		12	759,87	51,49
	13	621,61	79,90		13	1554,59	76,06
	14	562,85	76,72		14	893,56	7,37
	15	1036,25	63,28		15	787,14	6,24
4	16	1482,13	100,49		16	558,80	43,78
	17	3594,27	97,06		17	575,86	6,57
	18	2079,57	85,96		18	428,25	4,27
	19	1987,07	81,75		19	1467,01	40,13
	20	777,10	87,72		20	993,69	27,86
	21	2225,97	93,75	3	21	4430,96	88,01
	22	1013,55	71,96		22	3099,32	82,57
	23	369,57	70,60		23	1584,54	74,36
5	24	3921,71	115,90		24	3904,13	57,43
	25	3103,54	110,94	4	25	1385,84	56,49
	26	3662,82	99,16		26	1360,16	29,48
	27	4746,89	95,27		27	836,04	25,01
	28	2073,54	100,87		28	1095,49	4,46
	29	3231,33	100,96	5	29	5264,41	77,62
	30	1139,91	93,58		30	4734,01	52,46
6	31	5166,92	95,25		31	1183,64	63,21
	32	4526,04	83,02		32	1997,71	44,82
	33	527,86	68,70	6	33	3709,69	99,43
	34	1391,31	71,26		34	3934,59	86,98
	35	1175,03	58,43		35	4532,59	73,90
	36	533,12	65,85		36	4913,11	82,88
	37	1434,99	8,75				

Exposição a 100 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Segunda Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	662,93	169,32	1	1	653,19	44,14
	2	899,59	115,60		2	653,19	16,01
	3	533,12	13,31		3	431,18	16,23

	4	448,07	14,30	2	4	782,06	9,87
	5	554,70	42,93		5	325,20	12,34
	6	581,12	13,16		6	315,12	12,80
	7	515,89	14,85		7	211,28	17,19
	8	576,38	15,17		8	128,39	14,42
	9	871,33	86,72	3	9	233,00	12,82
	10	861,33	58,67		10	233,00	24,52
	11	515,89	44,22		11	352,73	14,45
	12	439,76	12,61		12	299,13	86,53
	13	854,61	13,88		13	206,07	11,28
	14	475,90	43,23	4	14	855,69	126,25
	15	593,44	14,00		15	463,24	81,95
	16	494,95	11,26		16	98,88	16,75
	17	870,98	11,55		17	123,65	17,89
	18	110,34	113,30	5	18	439,76	16,29
2	19	882,87	17,74		19	725,53	15,20
	20	108,31	142,73		20	558,71	29,40
	21	710,58	14,17		21	491,67	10,41
	22	555,44	18,13	6	22	926,99	14,43
	23	711,06	14,15				
	24	904,85	14,60				
	25	265,05	163,66				
	26	89,44	131,47				
	27	731,39	139,51				
	28	593,95	13,98				
	29	626,27	18,21				
	30	225,07	40,08				
	31	598,91	14,09				
	32	616,96	151,23				
	33	823,72	119,43				
	34	823,72	139,03				
3	35	281,21	149,05				
	36	387,80	10,56				
	37	113,91	55,69				
	38	871,24	134,29				
	39	537,47	13,96				
	40	537,47	19,68				
	41	467,46	85,84				
	42	823,72	137,71				
	43	630,58	150,64				
	44	766,29	12,04				
	45	639,80	69,17				
	46	654,57	139,09				
	47	342,26	3,43				
4	48	54,42	147,80				
	49	358,80	16,91				
	50	893,56	15,22				
	51	118,05	67,22				
	52	119,69	151,01				
	53	823,72	172,44				
	54	525,02	113,30				
	55	487,54	145,63				
	56	113,91	7,30				
5	57	366,34	138,10				
	58	448,29	22,97				
	59	362,42	141,20				
	60	1133,32	14,98				
	61	1133,32	14,14				
	62	462,76	17,64				
	63	558,71	14,01				
	64	428,25	23,76				
	65	454,97	13,77				
	66	721,91	39,01				
	67	374,18	13,75				

	68	459,02	12,18				
	69	972,57	94,26				
	70	420,67	17,42				
	71	580,99	13,02				
	72	667,28	14,52				
	73	544,80	122,12				
	74	479,44	2,16				
6	75	1107,77	12,01				
	76	1107,77	9,89				
	77	1107,77	13,24				
	78	1254,00	16,85				
	79	829,36	10,41				
	80	949,05	13,62				
	81	2123,69	61,17				
	82	2748,75	101,75				
	83	533,03	12,30				

Exposição a 100 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Terceira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	238,86	194,95	1	1	959,44	25,65
	2	983,86	21,88		2	750,56	58,86
	3	155,96	43,78	2	3	776,54	42,17
	4	1660,88	117,96		4	861,33	44,46
2	5	443,94	64,37	3	5	432,09	146,26
	6	545,61	20,56		6	140,80	14,14
	7	1292,86	115,20		7	558,97	20,69
3	8	706,83	162,45	4	8	170,66	16,95
	9	802,39	141,66		9	86,77	14,16
	10	305,42	15,09		10	71,48	82,20
4	11	89,44	155,19		11	786,97	36,65
	12	672,84	190,79		12	58,34	109,94
	13	487,54	18,17	5	13	1007,47	80,02
	14	341,83	18,35		14	154,50	19,22
5	15	823,72	177,49		15	127,79	19,34
	16	413,61	136,11		16	292,32	24,66
	17	233,00	63,09		17	86,34	18,90
	18	711,92	17,84		18	93,41	115,76
6	19	1484,15	188,77		19	129,90	157,35
	20	904,76	48,84		20	280,43	19,32
					21	110,17	15,28
					22	571,59	21,48
					23	479,65	72,24
					24	79,71	16,11
					25	420,67	134,86
					26	216,45	32,61
					27	96,85	10,86
					28	121,84	138,69
					29	439,97	45,81
					30	373,62	108,02
					31	190,47	148,44
					32	115,72	11,91
					33	153,85	25,18
				6	34	410,85	85,82
					35	417,44	20,98
					36	861,42	14,57
					37	443,85	137,95
					38	104,26	20,97
					39	108,31	15,16
					40	271,34	12,52
					41	359,36	107,20
					42	398,87	21,38
					43	345,36	61,57

					44	302,45	52,01
					45	192,59	13,04
					46	73,24	107,47
					47	455,27	100,41
					48	424,94	108,06
					49	311,58	10,71
					50	127,44	82,35
				7	51	252,73	14,49
					52	81,34	126,71
					53	54,46	123,04
					54	136,40	11,93
					55	302,28	17,37
					56	338,60	42,75
					57	355,44	14,49
					58	213,87	131,96
					59	60,15	11,74
					60	499,95	14,97
					61	158,64	133,68
					62	730,36	61,90
					63	567,41	55,27
					64	253,42	110,17

Exposição a 100 mJ cm ⁻² - 20 minutos (Primeira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	872,23	72,76	1	1	1690,95	42,33
	2	1656,92	66,78		2	1533,61	22,76
	3	881,11	66,62		3	1354,17	25,56
	4	1125,95	63,31		4	2005,90	12,22
	5	1779,62	69,69		5	1007,47	7,32
	6	1088,99	73,88		6	2164,92	34,79
2	7	2599,68	89,12		7	741,17	18,36
	8	2055,96	84,38		8	1939,98	4,43
	9	1927,53	76,76	2	9	972,62	59,14
	10	1494,23	88,35		10	1493,63	53,71
	11	3036,03	94,71		11	696,67	7,26
	12	431,18	85,09		12	563,19	5,22
	13	515,97	77,83		13	1065,81	44,14
	14	1884,32	48,25		14	1853,47	11,12
3	15	847,63	77,76		15	1652,52	5,31
	16	1706,21	76,24		16	3136,59	47,36
	17	859,18	70,85		17	1924,99	49,91
	18	1054,61	61,62		18	1127,33	24,60
	19	1215,14	33,06		19	398,87	46,31
	20	1065,16	84,26	3	20	1614,14	44,89
	21	325,20	35,88		21	2107,02	39,90
4	22	2221,06	82,98		22	1011,01	38,95
	23	927,34	78,83		23	590,21	15,57
	24	2157,12	58,53		24	1157,92	10,11
	25	1184,55	53,82		25	3301,08	33,23
	26	2786,92	89,60		26	672,15	28,36
	27	2314,55	77,79	4	27	1813,57	75,09
	28	3158,39	98,99		28	1699,44	63,66
	29	828,85	83,27		29	493,09	68,13
	30	692,10	77,45		30	1938,73	52,58
	31	1240,64	60,39		31	967,02	38,01
	32	2029,90	84,53		32	1500,01	6,38
	33	2074,79	99,43		33	1066,41	12,26
5	34	2214,38	82,58		34	1183,94	6,12
	35	1689,49	78,09		35	2023,39	55,10
	36	1301,52	72,42		36	558,97	55,66
	37	2844,48	88,77	5	37	1222,94	40,57
	38	1155,29	80,56		38	1609,91	58,38

	39	1030,74	79,88		39	1320,65	62,52
	40	771,59	85,24		40	975,29	55,20
	41	897,44	58,13		41	1096,40	6,86
	42	1810,21	84,84		42	667,80	36,26
	43	1151,80	46,30		43	1593,28	32,23
	44	1164,64	54,12		44	978,13	28,21
	45	1836,45	62,74		45	1940,93	21,28
	46	3100,74	78,31		46	1736,11	8,24
6	47	1002,17	77,60		47	532,43	18,34
	48	1553,26	82,50	6	48	1022,72	71,75
	49	1325,04	74,98		49	1900,00	6,80
	50	2047,00	53,38		50	1666,66	12,59
	51	1361,45	88,96		51	298,27	4,66
	52	866,80	84,94		52	802,39	49,47
	53	888,35	91,16		53	3293,46	56,66
	54	325,20	48,95		54	3146,84	53,16
	55	1745,54	69,46		55	823,59	27,05
	56	927,34	51,72				
	57	2132,35	83,12				
	58	2402,79	73,65				
	59	932,81	73,80				
	60	1342,58	75,86				
	61	1222,89	80,97				

Exposição a 100 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Segunda Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	227,66	25,65	1	1	1035,78	12,02
	2	100,30	107,46		2	988,86	13,34
	3	106,50	30,75	2	3	376,81	15,19
	4	163,29	138,65		4	1698,54	16,66
2	5	161,00	23,15		5	283,66	24,98
	6	79,45	149,42		6	93,41	11,61
	7	644,66	137,84	3	7	219,30	14,08
	8	216,93	170,56		8	558,71	13,91
3	9	299,35	192,31		9	590,21	25,03
	10	163,29	19,17		10	677,97	11,79
	11	259,19	164,34		11	447,08	9,79
	12	322,10	83,43	4	12	495,16	10,53
	13	311,58	78,02		13	259,11	76,97
4	14	391,12	115,03		14	113,40	38,67
	15	424,94	24,00		15	398,44	29,93
	16	524,85	57,95		16	282,89	17,33
	17	607,96	115,64	5	17	1285,97	15,46
	18	472,20	115,64		18	198,10	15,84
	19	126,32	152,47		19	213,35	12,76
5	20	448,07	21,93		20	850,48	16,55
	21	1060,21	158,29	6	21	235,58	27,27
	22	882,96	88,42		22	325,33	13,13
	23	571,77	14,04		23	662,63	13,88
	24	165,92	66,21		24	629,71	14,44
	25	253,42	140,67		25	132,27	105,91
	26	383,45	25,71				
	27	338,08	18,71				
6	28	345,58	173,00				
	29	626,74	14,23				
	30	455,83	71,05				
	31	271,34	181,43				
	32	271,34	22,63				
	33	70,05	127,93				
	34	345,58	21,62				
	35	515,28	16,81				
	36	421,27	19,73				

	37	626,74	180,63				
	38	746,47	73,91				
	39	308,74	22,41				
	40	428,25	152,90				
	41	455,44	40,34				
	42	299,13	13,54				
	43	792,44	149,73				
	44	432,09	13,17				
	45	409,30	123,76				
	46	227,14	178,73				
	47	355,44	18,69				
	48	314,77	53,24				
	49	376,47	26,66				
	50	838,50	29,44				
	51	362,42	21,80				
	52	233,00	15,44				

Exposição a 100 mJ cm ⁻² - 10 minutos (Terceira Experiência)							
Antes				Depois			
Img	GUV	Area	IF	Img	GUV	Area	IF
1	1	961,03	43,69	1	1	1095,49	16,96
	2	1078,30	31,04	2	2	1299,93	97,95
2	3	537,34	68,56	3	3	682,28	42,99
	4	292,84	174,65		4	409,30	11,89
	5	786,45	143,71		5	387,80	110,48
	6	170,96	22,57	4	6	380,13	122,10
	7	104,26	32,49		7	265,05	40,96
3	8	158,64	177,35		8	424,81	18,84
	9	1307,51	181,69	5	9	236,19	116,72
	10	192,59	144,71		10	545,96	111,19
	11	716,74	134,90		11	108,31	107,09
4	12	683,14	184,50		12	156,61	13,35
	13	731,43	84,93		13	843,93	15,09
	14	756,04	165,45		14	75,14	12,40
	15	954,39	50,24	6	15	766,38	23,93
5	16	525,02	180,12		16	250,23	9,61
	17	662,63	153,39				
	18	479,65	171,64				
6	19	496,02	184,08				
	20	568,19	133,33				
	21	230,15	18,66				
	22	545,96	20,32				

