

"CÁLCULO DA DISTRIBUIÇÃO DE DENSIDADE  
ELETRÔNICA DE MEMBRANAS MODELO COM  
HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS CANCERÍ  
GENOS INCORPORADOS"

Rita Maria Zorzenon dos Santos

Orientadora

Profa.Dra. Iris C.L. de Torriani

Tese apresentada ao Instituto de Física  
"Gleb Wataghin" da Universidade Estadual  
de Campinas - UNICAMP para a obten-  
ção do grau de Mestre em Física.

Dezembro de 1981

Este trabalho foi realizado no laboratório de Cristalografia do Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas, fundamentalmente com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicô esta Tese

Aos meus pais

À Barbára

Agradeço à Profa. Iris C. L. de Torriani  
pela sugestão do tema e orientação.

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais
- Ao Prof. Stepheson Caticha Ellis pelo apoio científico, pelas discussões indispensáveis e amizade.
- Aos Professores do Instituto de Física "Gleb Wataghin": Adolpho Hengeltraub, Gaston Barberis, Guilherme Cabrera; Luiz Marco Brescansin e Márcio D'Olne Campos pelas palavras de estímulo nos momentos difíceis.
- Ao Prof. José Augusto Chinellato pela ajuda indispensável na obtenção dos traçados microdensitométricos.
- Aos companheiros de Laboratório: Cícero Campos, José Otávio Bigatto e Lisandro Pavie Cardoso.
- Aos técnicos do Laboratório de Cristalografia: Ana Carolina, D. Lelé, Luiz Antonio, Silvano e Evaristo e em especial ao José Alfredo pelo trabalho fotográfico.
- Ao Sr. Roberto Schwab, técnico do Observatório Astronômico de La Plata, Argentina, pelo fornecimento das placas óticas.
- Ao Departamento de Biologia Celular pela utilização do aparelho de ultra-som.
- Aos operadores do Computador PDP-10 (IMECC) Amaral, Carlos e Maurício pela ajuda indispensável na obtenção dos mapas de densidade eletrônica e em especial ao Reinaldo por sua constante colaboração.

- Em especial ao Charles e Vasco pelos desenhos e à Loritilde, Ana Toma e Rosa pela datilografia, sem os quais este trabalho não seria realizado.
- Aos serviços de Xerox, Oficina Mecânica e Oficina Gráfica.
- Às bibliotecárias pela colaboração e às secretárias do Departamento de Estado Sólido, em especial à Irani pela constante ajuda.
- Ao Sérgio Luiz (Peninha) e Hypólito pela amizade e ajuda na correção desta Tese.
- À amiga Márcia Fantini pela amizade e colaboração indispensáveis.
- Às amigas Annette, Lucia e Sandra pela colaboração.
- Ao Simão, Eduardo e ao Grupo, por tudo.
- Em especial à Barbára Miglioli pela amizade, ajuda e compreensão nestes últimos dois anos.
- A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram durante a realização deste trabalho.
- À FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos foram incorporados em bicamadas úmidas de Dipalmitil Lecitina (DPL), no intuito de detetar as mudanças estruturais induzidas na membrana modelo hospedeira.

Foram obtidos diagramas de difração a baixo ângulo para os sistemas: DPL, DPL - pireno, DPL - 3, 4 - benzopireno e DPL - 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno. Estes diagramas, subsequentemente, foram analisados usando-se as intensidades das reflexões lamelares. A distribuição de densidade eletrônica normal ao plano da bicamada foi calculada pela síntese de Fourier, com resolução de  $7.5 \text{ \AA}^{\circ}$ . No caso do pireno, o mapa de densidade eletrônica mostra uma leve perturbação da estrutura na região hidrofóbica, próxima ao grupo glicerol. Este resultado concorda com as experiências de NMR realizadas por Vanderkooi e colaboradores (J. Chem. Phys., 63, 3662, 1975). Para os sistemas de DPL - 3,4 - benzopireno a distorção na região da queda abrupta existente no centro de simetria do perfil de densidade eletrônica é similar àquela observada para as amostras de DPL - pireno.

A incorporação do 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno dentro das bicamadas afeta bastante o empacotamento das cadeias, por perturbações ao longo das cadeias de carbono e na região do centro da bicamada correspondente aos grupos metila terminais.

## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons were incorporated into hydrated dipalmitoyl lecithin (DPL) multilayers in order to detect structural changes induced in the host model membrane.

Low angle patterns were obtained for the systems DPL, DPL - Pyrene, DPL - 3, 4 - Benzpyrene and DPL - 1, 2, 5, 6 - Dibenzanthracene. These patterns were subsequently analysed using the intensities of the lamellar reflections. The electron density distribution normal to the plane of the bilayer was calculated, by Fourier synthesis, with a resolution of  $7.5 \text{ \AA}^{\circ}$ . In the case of Pyrene, the electron density map shows a slight perturbation of the structure in the hydrofobic region, close to the glycerol group. This is in agreement with NMR experiments reported by Vanderkooi et al (J. Chem. Phys. 63, 3662, 1975). For the DPL - 3, 4 - Benzpyrene system the distortion of the central trough is similar to that observed for the DPL - Pyrene samples. The incorporation of 1, 2, 5, 6 - dibenzanthracene into the bilayers seems to have greatly affected the chain packing all along the acyl chains, including the center of the hydrocarbon core region.



## ÍNDICE

CAPÍTULO	I - Introdução	01
CAPÍTULO	II - Membranas	04
	II.1 - Membranas Biológicas	04
	II.2 - Componentes Básicos das Membranas	06
	II.2.1 - Lipídeos	06
	II.2.2 - Proteínas	12
	II.3 - O Estudo de Membranas e os Modelos de Membrana	13
	II.4 - O Modelo Mosaico-Fluído	20
	II.5 - Os Modelos de Bicamadas e suas Ca- racterísticas Principais	22
	II.6 - Os Hidrocarbonetos Aromáticos	25
CAPÍTULO	III - A Difração de Raios X por Membranas	32
	III.1 - Introdução	32
	III.2 - A Teoria Envolvida	35
	III.3 - O Problema da Determinação das Fa- ses do Fator de Estrutura	40
	III.4 - Correções consideradas sobre o Va- lor das Intensidades Registradas	42
	III.4.a - Fator de Polarização	42
	III.4.b - Fator de Temperatura	44
	III.4.c - Fator de Absorção	47
	III.4.d - Fator de Lorentz e Corrê- ções devidas à Geometria da Amostra	48
	III.5 - Determinação da Distribuição de Densidade Eletrônica	52

III.6 - O Programa de Computador utilizado para obter a Distribuição de Densidade Eletrônica	55
CAPÍTULO IV - Técnica Experimental	57
IV.1 - Preparação das Amostras	57
IV.1.1 - Material Utilizado	57
IV.1.2 - Método de Preparação das Dispersões	58
IV.1.2.1 - DPL Puro	58
IV.1.2.2.- DPL com Hidro- cabonetos Aromá- ticos	60
IV.1.3 - Preparação das Amostras no Substrato	61
IV.2 - Aparato Experimental	62
IV.2.1 - Descrição dos Aparelhos	64
IV.2.2 - Calibração do Aparelho e Obtenção dos Diagramas	67
IV.2.3 - O Diagrama de Difração de Raios X a Baixo Ângulo	68
IV.2.4 - Leitura dos Diagramas de Difração	71
CAPÍTULO V - Resultados e Conclusões	72
V.1 - Dados Obtidos	72
V.2 - Discussões e Resultados	92
V.3 - Conclusões	99
REFERÊNCIAS	101

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são conhecidos por induzir câncer em organismos vivos.

Muitos modelos assumem que o mecanismo da carcinogênese envolve a inclusão destes compostos na região hidrofóbica de componentes celulares macromoleculares, tais como ácidos nucleicos e proteínas.

Teorias recentes sobre o mecanismo da carcinogênese, sugerem a possibilidade de que o primeiro passo para iniciar o estado neoplásico esteja ligado a alterações na membrana celular. Se os hidrocarbonetos aromáticos cancerígenos atuam sobre a membrana alterando-a, a habilidade da célula controlar seus complexos mecanismos funcionais pode mudar, gerando assim um processo de crescimento descontrolado (ver por exemplo a referência (20)).

O estudo da alteração estrutural provocada pela inclusão de hidrocarbonetos aromáticos na membrana natural assume então, papel bastante importante no estudo da carcinogênese. No entanto, em virtude da complexidade estrutural das membranas biológicas naturais, que são sistemas moleculares altamente organizados e das dificuldades que surgem no preparo e manutenção das amostras, este estudo torna-se bastante complexo. Mesmo se conseguíssemos superar as dificuldades experimentais e obter dados estruturais, os resultados não seriam de fácil interpretação já que existe uma dificuldade grande em correlacionar a estrutura e organização molecular com as funções da membrana.

O surgimento de modelos que nos permitem reproduzir par

cialmente funções e propriedades físicas das membranas criou a possibilidade de estudos específicos, mais simplificados. Apesar dos resultados que se obtêm nestes casos, serem concernentes a sistemas simplificados, eles não perdem sua validade pois sempre acrescentam informações novas sobre funções, propriedades e estrutura das membranas.

O objetivo deste trabalho é estudar através de uma simulação artificial, bastante simplificada de uma membrana biológica, a alteração estrutural provocada pela incorporação de hidrocarbonetos aromáticos de diferentes graus de ação cancerígena.

A idéia deste trabalho surgiu a partir dos trabalhos de Sanioto e Schreier (21) e de Lesslauer e colaboradores (22).

Através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), Sanioto e Schreier estudaram as transições de fase geradas por inclusões de hidrocarbonetos aromáticos de diferentes graus de ação cancerígena em bicamadas de fosfolipídeos e correlacionaram estas mudanças de fase com o tamanho da molécula e sua atividade carcinogênica.

Lesslauer e colaboradores utilizando técnicas de Raios X a baixo ângulo estudaram as mudanças estruturais causadas na estrutura de bicamadas de lipídeos por inclusões de moléculas de prova fluorescentes do tipo: sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno (ANS), ácido 12-(9-antrolil) esteárico (AS) e ácido N-octadecilnaftil-2-amino-6-sulfônico (ONS).

Nosso trabalho consistiu em obter diagramas de difração de raios X para bicamadas de DPL com hidrocarbonetos aromáticos e calcular o perfil de densidade eletrônica de todas as amostras, o que

nos permitiu examinar a região entre as cabeças polares nas bicamadas.

No Capítulo II apresentamos um resumo sobre os dados conhecidos atualmente quanto à composição das membranas biológicas, os vários modelos que surgiram para tentar explicar a estrutura e funções das membranas, e em particular damos ênfase ao modelo do mosaico fluído. Neste capítulo também, falamos sobre os hidrocarbonetos aromáticos, estudos realizados sobre tais compostos, e em especial falamos sobre os hidrocarbonetos aromáticos por nós utilizados.

No Capítulo III apresentamos a parte da teoria de difração de Raios X concernente ao nosso experimento, as correções feitas às intensidades observadas nos diagramas de Raios X, o modelo do perfil de densidade eletrônica utilizado e uma descrição do programa de computador utilizado nos cálculos teóricos e no traçado do mapa de distribuição de densidade eletrônica de nossas amostras.

No Capítulo IV apresentamos a descrição da técnica utilizada na preparação de amostras e na montagem do aparato experimental.

No Capítulo V apresentamos os resultados obtidos e as conclusões do trabalho.

## CAPÍTULO II - MEMBRANAS

### II.1 - MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Em geral, todas as células da natureza são envolvidas por dois tipos de membranas: uma membrana protetora externa, também chamada de parede celular; e uma membrana que delimita a unidade protoplasmática (célula), denominada membrana protoplasmática ou membrana celular.

A composição da membrana protetora externa varia de acordo com o tipo de célula e organismo a que pertence e em sua estrutura encontramos moléculas do tipo: polissacarídeos, lipossacarídeos, glicoproteínas, glicolipídeos, etc (ver por exemplo a referência (1)).

A membrana protoplasmática é composta basicamente de lipídeos e proteínas.

Células do tipo procarióticas possuem somente o sistema de membranas descrito acima, o qual é responsável pela compartimentação extracelular, enquanto que, células do tipo eucarióticas possuem não só este sistema, como também membranas internas responsáveis pela compartimentação intracelular. As membranas internas separam o núcleo do citoplasma e envolvem organelas como: mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, etc.

Nas células eucarióticas, os diferentes sistemas de membranas podem ser responsáveis por cerca de 80% ou mais da massa total seca da célula.

A composição das membranas celulares varia entre 20 e 40% de lipídeos, 20 e 70% de proteínas e uma porcentagem muito pequena de outros componentes (ver por exemplo a referência (2)).

A membrana protetora externa pode ser removida por métodos mecânicos ou físico-químicos, restando então a membrana protoplasmática, a qual não pode ser removida sem que haja o rompimento da unidade celular.

Certos fenômenos observados para células cuja membrana protetora externa é removida previamente, fenômenos estes do tipo: contração da célula em solução hipertônica e obstrução do movimento de íons e moléculas entre a citoplasma e vizinhanças, sugerem que a membrana celular atua como barreira à difusão livre (ver por exemplo a referência (3)).

O isolamento e estudo morfológico das membranas celulares indicaram a presença de estruturas internas com funções específicas nas atividades metabólicas e as evidências disto estão no papel desempenhado pelas membranas:

1. Proporcionam compartimentação física e química;
2. Fornecem regiões organizadas que permitem a ocorrência de processos do tipo transferência de energia;
3. agem como campo de reações enzimáticas.

Além disso, as membranas também desempenham certo papel em funções reguladoras do tipo: síntese de proteínas; transporte ativo e passivo e conseqüentemente na transferência eletrônica; regulação volumétrica; excitação e comunicação nervosa; metabolismo de oxidação; controle genético; divisão e diferenciação celular e outras (ver por exemplo a referência (3)).

O problema básico no estudo de membranas está em correlacionar as diversas funções da membrana com a sua estrutura e organização a nível molecular.

## II.2 - COMPONENTES BÁSICOS DAS MEMBRANAS

### II.2.1 - Lipídeos

Há muitas famílias e classes de lipídeos cujas propriedades são derivadas da natureza das cadeias de carbono que compõem grande parte de suas estruturas.

Segundo a estrutura de seus esqueletos, os lipídeos são classificados como: lipídeos complexos, que são constituídos por ácidos graxos e denominados lipídeos saponificáveis pois produzem sabões sob hidrólise alcalina; e lipídeos simples, que não contêm ácidos graxos e não são saponificáveis.

Os lipídeos complexos incluem os acilgliceróis, os fosfoglicerídeos ou fosfolipídeos, os esfingolipídeos e as ceras, que diferem entre si quanto à estrutura dos esqueletos aos quais os ácidos graxos ligam-se covalentemente por esterificação. Atualmente, mais de 100 tipos de ácidos graxos já foram identificados nos diferentes lipídeos de organismos vivos. Os lipídeos simples incluem os terpenos e os esteróides.

Os lipídeos que compõem a membrana são polares, predominando os fosfoglicerídeos e pequenas quantidades de esfingolipídeos. Na realidade, quase todos os lipídeos polares das células encontram-se em suas membranas. A percentagem relativa das espécies diferentes de lipídeos nas membranas é característica do tipo de sistema de membranas, do órgão e da espécie de organismo; a razão molar entre estas espécies de lipídeos aparece como sendo geneticamente determinada (ver por exemplo a referência (1)).

Os lipídeos são biomoléculas orgânicas insolúveis em



água, os quais podem ser extraídos das células e tecidos por solventes apolares como: clorofórmio, éter ou benzeno.

Entre as funções biológicas dos lipídeos ressaltamos as seguintes:

- a) componentes estruturais das membranas;
- b) forma de armazenamento e transporte de combustível metabólico;
- c) servem como película protetora da superfície de muitos organismos;
- d) identificadores da superfície celular, servindo para o reconhecimento do tipo de célula, especificação de espécies e imunidade de tecidos.

Alguns lipídeos combinam-se com outras classes de biomoléculas, por ligações covalentes ou fracas, gerando moléculas híbridas como glicolipídeos (carboidratos e lipídeos) e lipoproteínas (lipídeos e proteínas). Estas moléculas têm propriedades físicas e químicas e funções biológicas específicas.

Os ácidos graxos possuem uma cadeia longa de carbonos, com um grupo metila terminal ( $\text{CH}_3$ ), que pode ser saturada, ou insaturada. Quando a cadeia é insaturada, as ligações duplas apresentam-se na configuração cis, raramente na configuração trans.

Os ácidos graxos diferem entre si pelo tamanho da cadeia de carbono ( $-\text{CH}_2-$ ) e pela posição das ligações duplas na cadeia insaturada. O número de carbonos na cadeia dos ácidos graxos presentes nos lipídeos das plantas superiores e animais, pode variar entre 14 e 22 e é sempre um número par. Predominam as cadeias de 16 e 18 carbonos. Entre os ácidos graxos saturados encontramos o ácido palmítico ( $\text{C}_{16}$ ) e ácido esteárico ( $\text{C}_{18}$ ) e entre os insaturados o ácido oléico ( $\text{C}_{18}$ ).

Nos ácidos graxos insaturados com apenas uma ligação dupla, esta encontra-se entre os carbonos nas posições 9 e 10; quando há mais que uma ligação, a primeira ligação encontra-se nesta mesma posição e as outras entre ela e o grupo metila terminal ( $\text{CH}_3$ ).

A cadeia dos ácidos graxos saturados é flexível e pode existir em várias configurações, pois cada ligação simples da estrutura dorsal da cadeia pode girar livremente, dando lugar a rotações "gauche" (ver figura II.1). No entanto, a forma estendida corresponde à configuração de energia mínima e portanto, é a configuração mais provável. Com o aumento de temperatura, aumenta-se a probabilidade de haver rotações "gauche" em torno de ligações C-C, envolvendo energias de aproximadamente 0,5 Kcal/mol, que são energias da ordem de  $kT$ , à temperatura ambiente (ver por exemplo a referência (1)).

Para a cadeia dos ácidos graxos insaturados há uma restrição para o movimento de rotação devida às ligações duplas (ver por exemplo a referência (1)).

Dentre os lipídeos, os mais comumente encontrados nas membranas são os fosfoglicerídeos ou glicerol-fosfatídeos.

Nos fosfoglicerídeos um dos grupos hidroxílicos primários do glicerol é esterificado pelo ácido fosfórico e os outros por ácidos graxos. Os fosfoglicerídeos, além dos dois resíduos de ácidos graxos esterificados por grupos hidroxílicos nos átomos de carbono 1 e 2 do glicerol, contém um grupo polar na cabeça, um álcool designado por X-OH, cujo grupo OH é esterificado pelo ácido fosfórico.

Os fosfoglicerídeos são moléculas anfipáticas pois possuem uma cabeça polar e cadeias de carbono apolares.

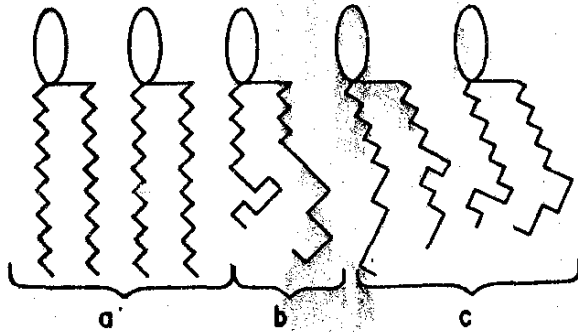
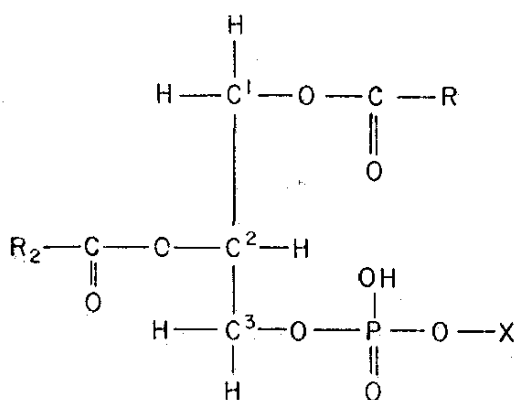
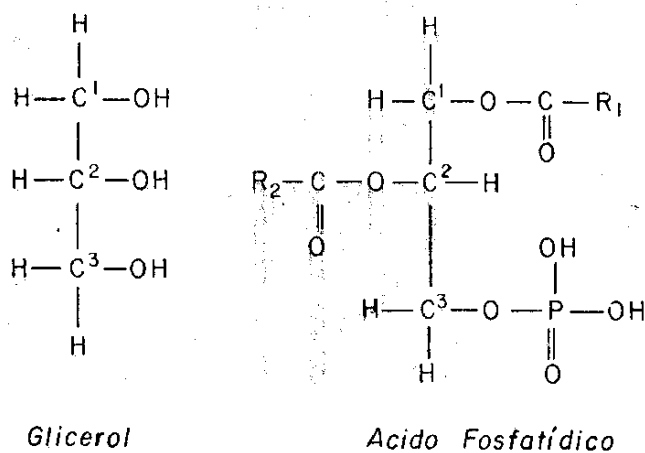


Figura II.1 - Esquema das configurações das cadeias acílicas dos fosfolipídeos, segundo a referência (11).

- (a) Configuração totalmente trans.
- (b) Configuração contendo várias rotações "gauche" na região inferior das cadeias.
- (c) Configuração contendo rotações "gauche" e as cadeias apresentando uma inclinação de  $30^\circ$  com respeito à normal ao plano das cabeças polares, segundo McFarland e McConnell (50).

Os diferentes tipos de fosfoglicerídeos diferem quanto ao tamanho, forma e carga elétrica de sua cabeça polar. Em geral estes lipídeos possuem um ácido graxo saturado na posição 1 do glicerol e outro insaturado na posição 2 (ver figura II.2).

O composto fundamental dos fosfoglicerídeos, que serve como intermediário na biosíntese dos mesmos, é o ácido fosfatídico, que não contém grupo polar alcoólico.



*Estrutura geral dos Fosfoglicerídeos*

Figura II.2 - Fórmula estrutural do glicerol, ácido fosfatídico e dos fosfoglicerídeos

Os fosfoglicerídeos mais comuns em plantas superiores e animais são: fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina que contêm como grupo polar os aminoalcóois etanolamina e colina respectivamente; estes fosfoglicerídeos são conhecidos também como cefalina e lecitina.

A figura II.3 mostra a fórmula estrutural da fosfatidilcolina.

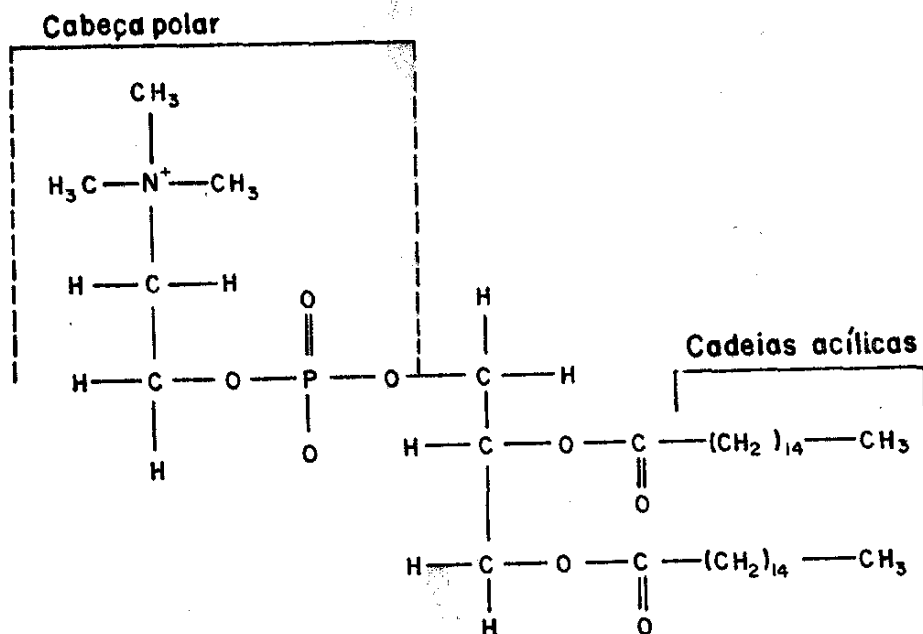


Figura II.3 - Fosfatidilcolina

Os aminoalcoóis da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (Figura II.3) têm carga positiva em  $\text{pH} = 7,0$ . Como todos os fosfoglicerídeos possuem carga negativa no grupo fosfato neste  $\text{pH}$ , estes dois fosfoglicerídeos são zwitteriônicos, ou seja, a carga líquida na cabeça é nula quando  $\text{pH} = 7,0$  (ver por exemplo a referência (1)).

Em geral, quando os lipídeos são colocados em água, somente uma pequena fração forma uma solução molecular.

Numa suspensão em meio aquoso, cuja concentração é maior que a concentração micelar crítica, as moléculas ordenam-se espontaneamente, submergindo o extremo polar e ocultando as zonas apolares, formando arranjos do tipo de micelas (Figura II.4) ou vesículas.

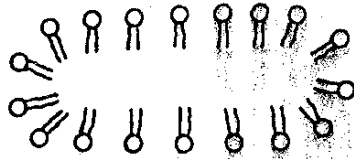


Fig. II.4 - Estrutura micelar

Em tais arranjos micelares, as cadeias de carbono evitam o contato com o meio aquoso, formando uma fase hidrofóbica interna, enquanto as cabeças polares que são hidrofílicas ficam expostas na superfície das micelas.

Os fosfolipídeos formam monocamadas na interface entre água e ar e bicamadas entre dois compartimentos aquosos.

Os sistemas de multibicamadas que são formados em suspensões aquosas de fosfolipídeos, são denominados de liposomas.

Tais sistemas são estudados como modelos de membranas naturais, as quais parecem conter como matriz da estrutura biológica, bicamadas de fosfoglicerídeos como uma fase contínua, do tipo bicamada molecular, de aproximadamente 60 Å de espessura (ver por exemplo a referência (2)).

### II.2.2 - Proteínas

Podemos classificar as proteínas que são encontradas nas membranas como (1,7):

- Proteínas Integrais - que englobam mais de 70% das proteínas da membrana. Estas proteínas estão fortemente ligadas à porção lipídica e só podem ser removidas por processos drásticos.

- As proteínas integrais são insolúveis em sistemas aquosos neutros, mas podem ser extraídas por detergentes ou solventes orgânicos;
- Proteínas Periféricas - são proteínas que se localizam na superfície das membranas e podem ser facilmente removidas por processos de extração suaves.

### II.3 - O ESTUDO DE MEMBRANAS E OS MODELOS DE MEMBRANA

Muitos métodos físicos vêm sendo empregados no estudo de membranas biológicas.

A microscopia eletrônica, um dos primeiros métodos empregados para este estudo, revelou que as membranas possuíam uma estrutura com uma região de baixa densidade eletrônica de cerca de 50 a 100 Å, compreendida entre duas regiões de alta densidade eletrônica (59). Além disso, medidas de alta resistividade elétrica indicavam a existência de uma fase contínua de cadeias de carbono.

Até 1960, o estudo de membranas evoluiu pouco devido às limitações das técnicas existentes: dificuldades em realizar medidas espectrofotométricas em substâncias do tipo lipídeos. Por outro lado, as membranas como entidades particuladas restringiam a aplicação de várias técnicas de espectroscopia óptica, devido à dispersão da luz.

O estudo de membranas ganhou grande impulso com o surgimento da cromatografia em fase gasosa para a análise química de lipídeos e com o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas técnicas espectrográficas.

Stein e colaboradores (60) utilizando a técnica de ca-

lorimetria diferencial de varredura, apresentam resultados que evidenciam a presença de lipídeos em forma de bicamadas em membranas obtidas de Acholeplasma Laidlawii.

Medidas através de técnicas de Raios X confirmam a organização em bicamadas dos lipídeos de Acholeplasma Laidlawii (40) e Escherichia Coli (61).

Na última década, houve um grande avanço na elucidação de propriedades organizacionais e dinâmicas dos componentes das membranas.

Um dos conceitos bastante estudados é o da assimetria da membrana (62-65), tanto do ponto de vista das diferenças entre o lado citoplasmático e o lado externo da membrana, como no arranjo de componentes num dado lado.

Outro aspecto da assimetria que vem sendo estudado é o do arranjo heterogêneo no plano da membrana e o problema das separações laterais de fases de lipídeos e entre lipídeos e proteínas, por ação da temperatura, ion ou pH, por técnicas de microscopia de fraturamento (66,67) e método de marcador de spin (68).

Uma técnica bastante utilizada no estudo de membranas é o processo de reconstituição de membranas, onde através da recombinação de um número limitado de componentes tenta-se a reprodução funcional da mesma (69).

O estudo da mobilidade dos componentes das membranas, tanto lateral (no plano da membrana) como o transversal (flip-flop), tem sido feito por técnicas do tipo microscopia de fluorescência (70), Ressonância Paramagnética Eletrônica (71,72), foto-destruição de fluorescência (73).

Atualmente, várias técnicas espectroscópicas têm sido



utilizadas no estudo de propriedades estruturais e dinâmicas de membranas artificiais, tais como: fluorescência, dispersão de luz, infravermelho, Raman, difração de neutrons, Ressonância Magnética Nuclear e Ressonância Paramagnética Eletrônica.

O estudo de membranas biológicas e o interesse em encontrar um modelo que descrevesse as membranas de maneira condizente com a estrutura básica das mesmas, datam do início do século e final do século passado.

Em 1855, Nägelli sugere a presença de membranas, observando que as superfícies das plantas unicelulares, algas, fungos, etc. eram impermeáveis a pigmentos presentes em soluções endo ou exoplasmáticas, segundo a referência (3).

Em 1896, E. Overton (54) sugere a membrana plasmática como componente de uma membrana maior (conjunto de membrana protetora e membrana plasmática) responsável pela limitação e controle da difusão livre dos solutos, o que indica a permeabilidade como característica básica da membrana celular.

Esta membrana plasmática apresenta baixa permeabilidade a íons e uma permeabilidade relativamente alta a substâncias solúveis em lipídeos e no início do século, esta observação foi interpretada sugerindo-se que a barreira de permeabilidade (membrana) tinha caráter lipídico, pois moléculas apolares têm grande solubilidade em solventes lipídicos (ver a referência (3)).

Em 1925, o experimento realizado por Gortel e Grendel (52) sugere as primeiras idéias sobre a organização molecular da membrana celular. Estes autores extraíram lipídeos de uma amostra que continha um número conhecido de eritrócitos e prepararam uma solução destes lipídeos em benzeno. Tendo dissolvido a solução nu

ma tina parcialmente cheia de água, observaram a formação de um filme de moléculas polares de lipídeos sobre a superfície da água. Se a quantidade dispersa for apropriada, a espessura do filme será de uma molécula. Gorter e Grendel verificaram também que esta camada superficial pode ser comprimida até certa área definida, pois a partir daí ela começa a oferecer resistência à compressão. Eles supuseram então, que neste ponto os lipídeos formam um arranjo monomolecular compacto com suas cadeias de carbono esticadas para o ar e as cabeças polares em contato com a água. A resistência oferecida à compressão deve surgir da possibilidade desta força puxar uma cadeia para dentro da água ou tirar uma cabeça polar para fora da fase aquosa. Eles compararam a área comprimida da monocamada com a área estimada para o eritrócito de coelho, porco, homem, etc., e encontraram uma razão de 1,8 a 2 para 1, respectivamente. Isto sugeriu a disposição dos lipídeos em forma de uma folha bimolecular (bicamada).

Com base nestas observações e no comportamento físico de uma dispersão lipídica aquosa, sugeriu-se que as cadeias de carbono compõem a parte interna da membrana e o grupo polar hidratado encontra-se na interface da membrana (ver a referência (3)).

Em 1935, Danielli e Davson propuseram o primeiro modelo estrutural para membranas biológicas, também conhecido como modelo paucimolecular (4).

Este modelo consiste em considerar a membrana como uma bicamada de lipídeos, coberta por duas camadas de proteínas ou polissacarídeos adsorvidas na superfície devido à baixa tensão superficial (4), como mostra a figura II.4. Segundo os autores do modelo, este filme de lipídeos é capaz de distinguir moléculas de

tamanhos e solubilidade diferentes e íons de cargas diferentes (4).

Este modelo, mais tarde, foi reformulado por seus autores com base nas propriedades das proteínas, considerando então, que as proteínas associadas a uma membrana difundem-se como uma camada macromolecular.

Mais tarde propôs-se que as proteínas podem ser incorporadas de maneira a interromper a camada de lipídeos em certos lugares, formando canais de proteínas, como poros, através da camada lipídica, o que reforçou a possibilidade de haver uma estrutura de poros de dimensões moleculares nestas membranas, que pudesse explicar a permeabilidade das membranas (5).

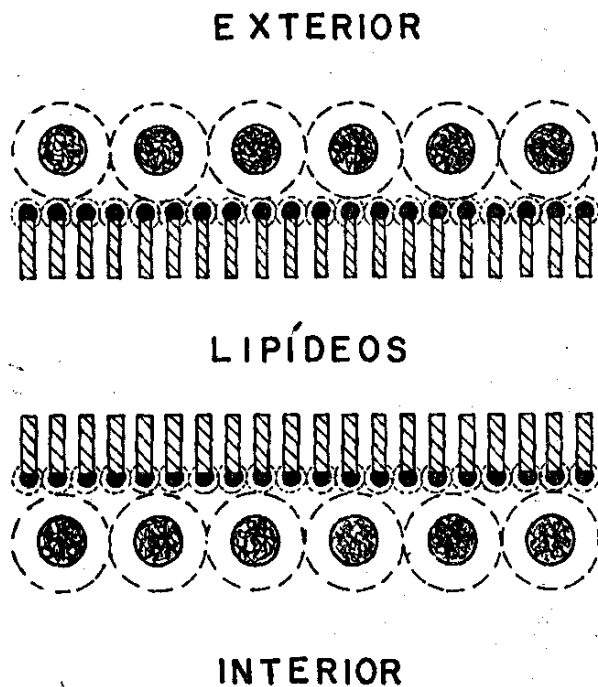


Figura II.5 - Representação Esquemática do Modelo de Danielli e Davson ou modelo paucimolecular, segundo os autores (4)

De 1936 a 1960, enquanto experiências de raios X, polarização óptica e elétrica e permeabilidade evidenciavam a existência de uma estrutura do tipo do modelo de Danielli e Davson para

as membranas, o surgimento de técnicas mais sofisticadas, como microeletrodos, "voltage clamp" e outras, começou a evidenciar certos comportamentos das membranas inexplicáveis por tal modelo tais como o potencial de ação. No entanto, durante este período o modelo paucimolecular ainda continuou sendo aceito por falta de outro modelo mais abrangente.

Em 1960, J.D. Robertson (ver a referência (6)), baseando-se nos resultados obtidos por raios X e microscopia eletrônica reelabora o modelo paucimolecular sugerindo o modelo de membrana unitária. A membrana unitária tem estrutura assimétrica sendo que a fase lipídica apresenta-se na fase smética. A camada lipídica está coberta por monocamadas de moléculas não lipídicas (6).

À diferença do modelo paucimolecular, o modelo da membrana unitária admite que a espessura do filme monomolecular que cobre a estrutura lipídica pode variar, como se admite uma assimetria na composição química do mesmo.

A membrana unitária como um todo tem espessura de 80 a 90A<sup>o</sup>, enquanto a bicamada de lipídeos varia entre 60 e 70A<sup>o</sup> (ver a referência (2)).

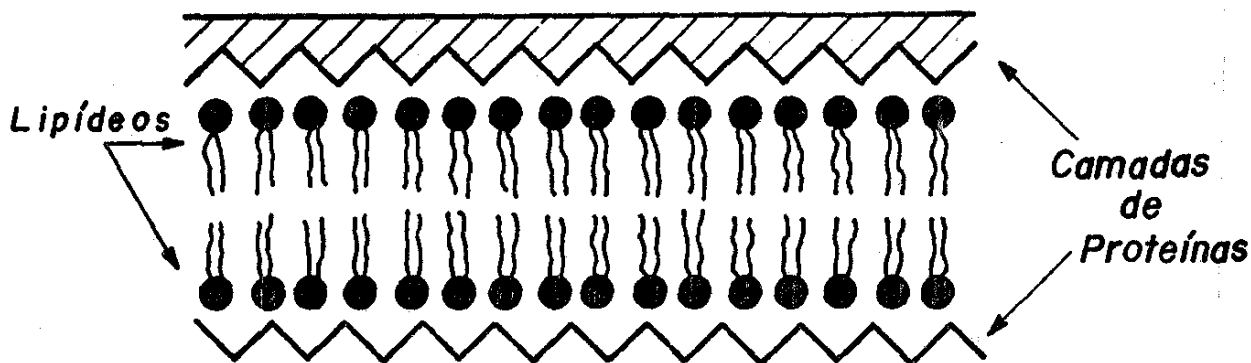


Figura II.6 - Modelo de membrana unitária

Por volta de 1966, Green e colaboradores (55), propuseram o modelo de subunidades, para explicar resultados experimentais obtidos por microscopia eletrônica para membranas de mitocôndria, segmentos externos de fotoreceptores de bovino, membranas de cloroplastos e outras. O modelo sugere a membrana como sendo formada de unidades lipoproteicas que se repetem num conglomerado polimérico e os autores desenvolvem uma teoria sobre a formação da membrana. Esta teoria depende fundamentalmente das restrições impostas pelos fosfolipídeos, sobre as interações entre as unidades repetitivas. No entanto este modelo não explica satisfatoriamente certas propriedades das membranas, tais como atividades enzimáticas.

Em 1968, Lenard e Singer (74) propuseram um modelo de bicamadas de lipídeos que são atravessadas por cadeias polipeptídicas simples (Figura II.7). As partes achuradas no modelo deveriam estar ocupadas por constituintes relativamente apolares (resíduos de amino-ácidos hidrofóbicos ou lipídeos).

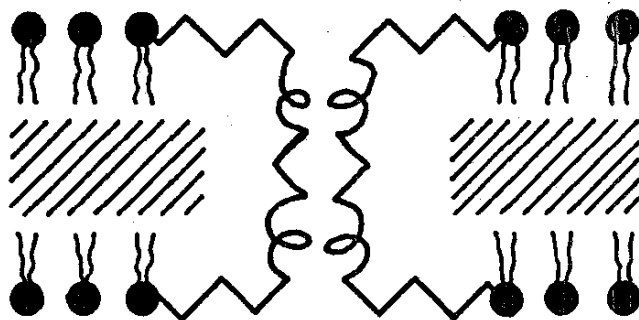


Figura II.7 - Modelo de Lenard e Singer segundo os autores

Este modelo foi precursor do modelo aceite, atualmente, como o mais apropriado e termodinamicamente compatível com o comportamento das membranas biológicas, que é o modelo mosaico-fluído (8), que será descrito a seguir.

#### II.4 - MODELO DO MOSAICO FLUIDO

Em 1972, Singer e Nicolson (8) propuseram o modelo do mosaico fluido para membranas biológicas no qual supõe-se que os fosfolipídeos da membrana estão arranjados numa bicamada fluida ou matriz líquido-cristalina.

Este tipo de bicamada, que pode ser idealizada como uma solução viscosa bidimensional orientada, de moléculas de lipídeos, o que facilita explicar a fluidez, a flexibilidade e a resistência elétrica características da membrana, além da relativa permeabilidade a moléculas polares, devido ao tipo de movimento das moléculas na bicamada.

O modelo é consistente com as restrições impostas pela termodinâmica. Neste modelo encontramos proteínas intrínsecas (integrals) à membrana, embebidas na matriz lipídica. Estas proteínas formam conjuntos heterogêneos de moléculas globulares, cada uma das quais arranjadas em estrutura anfipática, ou seja, com os grupos iônicos e polares saindo da membrana para a fase aquosa e os grupos apolares incrustados no interior hidrofóbico da membrana. Evidências experimentais indicam que as proteínas de vários tipos de membranas, em média, apresentam uma quantidade apreciável de estruturas em hélice -  $\alpha$  (53), o que sugere a presença de uma grande parte delas na forma globular. Algumas proteínas encontram-se parcialmente embebidas na matriz lipídica, penetrando somente por um dos lados da bicamada e outras atravessam completamente a mesma. Neste caso, a espessura da membrana será assimétrica, pois dependerá da profundidade de penetração da proteína na membrana.

A estrutura mosaico-fluído não é estática nem fixa, pois as proteínas são livres para se difundirem lateralmente, em duas dimensões pelo menos, em algumas membranas (8).

A viscosidade relativa da bicamada de lipídeos é considerada como sendo de 100 a 1000 vezes maior que a da água (ver a referência (1)).

A matriz de fosfolipídeos é organizada em forma de uma bicamada fluída descontínua, apesar de haver uma interação específica entre certa quantidade de lipídeos e as proteínas da membrana. O modelo mosaico-fluído não considera interações fortes entre lipídeos e proteínas (8).

Singer e Nicolson apresentam em seu trabalho evidências experimentais, obtidas por técnicas diferentes, da validade do modelo (ver a referência (8)).

Este modelo explica satisfatoriamente algumas propriedades e características das membranas biológicas, tais como a assimetria da membrana natural, em termos de diferenças entre o lado citoplasmático e o lado externo da bicamada; propriedades elétricas e permeabilidade das membranas, etc. (ver por exemplo referências (1,8)).

Em 1977, Israelachvilli (9) propôs um refinamento do modelo do mosaico fluído para membranas, considerando fatores termodinâmicos e de empacotamento molecular.

Tal como Singer e Nicolson, Israelachvilli não prevê interações fortes entre proteínas e lipídeos, mas faz considerações geométricas sobre o empacotamento molecular, sobre as alterações produzidas na bicamada pela presença das proteínas e sobre o arranjo dos lipídeos mais próximos a uma proteína. A configuração das cadeias de carbono dos fosfolipídeos próximos a uma proteína é relacionada à entropia configuracional do resto da bicamada. (9)

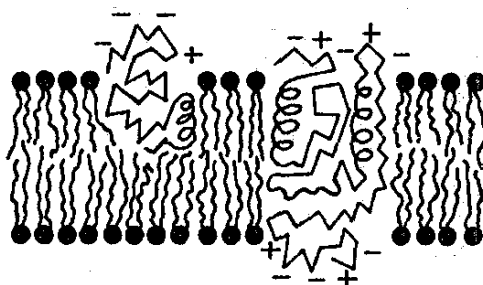
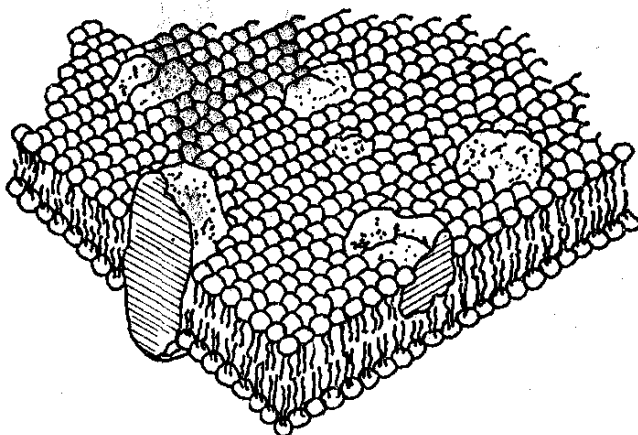


Figura II.8 - Representação esquemática do modelo do mosaico fluido para membranas biológicas proposto por Singer e Nicolson, segundo os autores (8).

## II.5 - OS MODELOS DE BICAMADAS E SUAS CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS

Se por um lado realizam-se experiências com membranas naturais no intuito de aprimorar os conhecimentos sobre sua estrutura, a nível molecular, suas propriedades e funções; por outro lado, realizam-se experiências com modelos de membrana que reproduzem até certo ponto as funções e propriedades das membranas biológicas.

A base dos modelos de membrana utilizados é a bicamada de fosfolipídeos, cuja estrutura termodinamicamente estável surge de interações do tipo hidrofóbico e de Van der Waals entre as cadeias alifáticas dos



fosfolipídeos; de forças eletrostáticas e de ligações feitas através de pontes de hidrogênio entre as cabeças polares e a água (ver a referência (2)).

Medidas de calorimetria diferencial de varredura (56), ressonância magnética, espectroscopia óptica e difração de raios X (41, 57), têm permitido determinar o estado conformacional das cadeias acílicas dos fosfolipídeos nas bicamadas e as mudanças deste estado em função da temperatura. Tais mudanças conformacionais das cadeias acílicas em função da temperatura evidenciam uma transição ordem-desordem na bicamada, para certa temperatura  $T_c$ , denominada temperatura de transição de fase (que no caso do di-palmitil lecitina é aproximadamente  $42^{\circ}\text{C}$  - ver por exemplo a referência (11)).

Para temperaturas menores que  $T_c$ , as cadeias acílicas estão provavelmente na configuração totalmente trans e rígidas, e alguns autores denominam tal estado de "estado gel". O aumento da temperatura gera o aparecimento de rotações "gauche" ao redor de ligações C-C, os quais levam a um estado de maior desordem das cadeias, onde a ordem a longo alcance desaparece e a bicamada comporta-se como um líquido bidimensional. Tal estado é denominado "estado fluido", "estado líquido-cristalino" ou fase lamelar  $\alpha$  ( $L_\alpha$ ).

A. Tardieu e seus colaboradores (57) utilizando técnicas de difração de raios X, estudaram extensivamente a estrutura e o polimorfismo das cadeias acílicas de uma série homóloga de lecitinas sintéticas (com cadeias de diferentes tamanhos), da lecitina de ovo e de uma lecitina sintética com cadeias heterogêneas, em misturas de lecitina e água. Os autores apresentam seus resultados sobre a fase  $L_\alpha$ , comum a todas lecitinas (acima de  $T_c$ ), confrontando-os com resultados obtidos por outros auto-

res e evidenciam a importância desta fase da bicamada, já que do ponto de vista químico as cadeias de carbono comportam-se como moléculas em líquidos miscíveis, tornando-se até certo ponto insensíveis a heterogeneidades químicas, mesmo na presença de grandes quantidades de "impurezas" (por exemplo: colesterol) (57).

Além disso, Tardieu e seus colaboradores apresentam resultados obtidos sobre as possíveis conformações das cadeias acílicas, abaixo da temperatura de transições, o que varia de acordo com o tipo de lecitina. Dentre estes resultados encontram-se os referentes ao dipalmitil lecitina (às temperaturas menores que  $T_c$ ), que segundo os autores apresenta-se na fase lamelar  $\beta'$  ( $L_{\beta'}$ ), fase esta comum às lecitinas sintéticas e caracterizada por cadeias rígidas, paralelas, empacotadas com desordem rotacional numa rede quasi-hexagonal com as cadeias formando certo ângulo (entre  $17^\circ$  e  $33^\circ$ ) com respeito à normal ao plano lamelar; ao contrário das lecitinas naturais e lecitinas sintéticas de cadeias heterogêneas, que são encontradas na fase lamelar  $\beta$  ( $L_\beta$ ), caracterizada por cadeias rígidas, paralelas, empacotadas com desordem rotacional numa rede hexagonal, com as cadeias orientadas perpendicularmente ao plano da bicamada.

Tardieu e colaboradores comparam seus resultados obtidos para o DPL com os obtidos por Pinto da Silva (58), que utilizando microscopia eletrônica apresenta evidências da bicamada de DPL encontrar-se na fase  $P_{\beta'}$ , que corresponde a fase  $L_{\beta'}$ , sujeita a ondulações periódicas. Eles supõem, então, que a bicamada pode apresentar-se na fase  $L_\beta$  ou  $P_{\beta'}$ , conforme as perturbações a que a bicamada fica sujeita.

Nagle (11) tentou descrever a termodinâmica das transições de fase termotrópicas, em bicamadas de DPL, através de um

modelo microscópico de ordem e desordem e obteve resultados concordantes com os obtidos experimentalmente para a transição principal ( $\sim 42^{\circ}\text{C}$ ).

## II.6 - OS HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam estrutura polícíclica e possuem um tipo especial de insaturação. Esta família de compostos tem sua estrutura baseada na do benzeno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ).

Informações obtidas por técnicas de raios X e espectroscopia óptica de fluorescência indicaram que o benzeno apresenta-se como uma molécula plana, em forma de um hexágono regular, com ligações C - C iguais em ângulos de  $120^{\circ}$ . Não existe nenhum tipo de ligação simples entre pares de elétrons, localizadas entre pares de átomos que seja consistente com estes dados geométricos. A ligação entre os átomos de carbono neste tipo de estrutura é feita pelos chamados elétrons  $\pi$ , que são elétrons localizados entre pares de átomos, mas que podem deslocar-se entre os átomos do anel benzênico. Em função deste tipo de ligação o benzeno pode ser considerado como um híbrido de ressonância entre duas estruturas extremas (12) como vemos na Figura II.9.

Alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com alto ponto de ebulição são, provavelmente, as substâncias responsáveis pela propriedade de produção de câncer do alcatrão e óleos minerais (13). Kennaway (14, 15) estudou a produção de câncer em animais (em particular ratos) por substâncias com atividade carcinogênica, substâncias estas produzidas por aquecimento de acetileno ou isopreno em atmosfera de hidrogênio. O estudo da fluores-

cência de tais substâncias indicou a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ver a referência (16)).

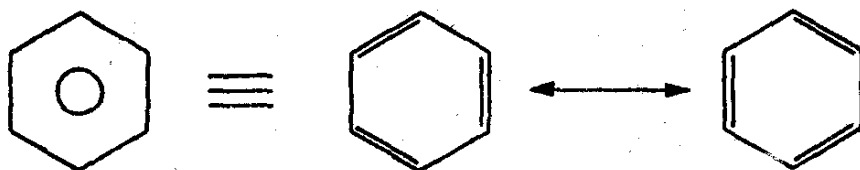


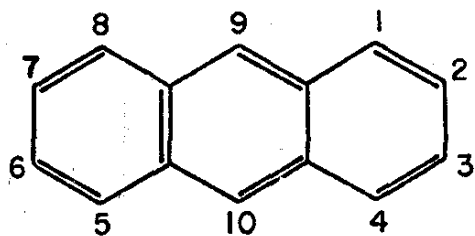
Figura II.9 - Representações dos híbridos de ressonância do anel benzênico.

Cook (13) estudou a ação carcinogênica de um grande número de compostos aromáticos de estrutura conhecida. Estudos posteriores de Cook e colaboradores (16) sobre a produção de câncer por hidrocarbonetos puros, evidenciam o fato de que hidrocarbonetos aromáticos com impurezas apresentam atividade carcinogênica, enquanto que os hidrocarbonetos aromáticos puros, os quais são praticamente insolúveis, não produzem tumores em animais, com exceção do 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno.

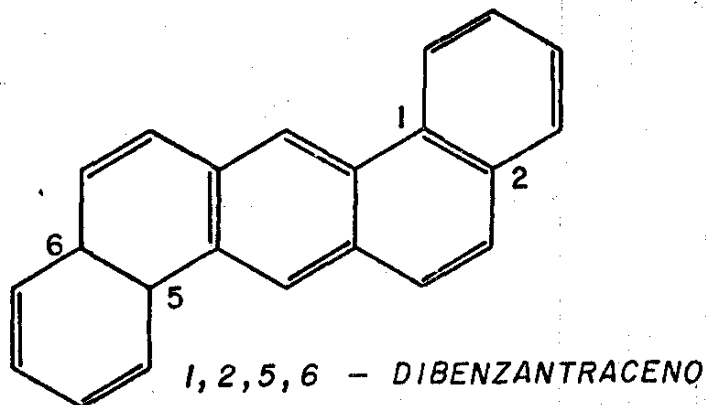
Experiências realizadas com 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno por estes autores (16) indicaram que tal substância purificada com ácido sulfúrico é tão ativa quanto no estado menos purificado. Isto indica que a atividade carcinogênica deste hidrocarboneto não surge da incorporação de impurezas à sua estrutura, o que não se pode afirmar para os outros compostos aromáticos que apresentam atividade carcinogênica. A diluição do 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno em benzeno retarda a aparição e diminui a produção de tumores em ratos. A inclusão do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) na estrutura do 1, 2, 5, 6 - dibenzan

traceno, formando o derivado 3'-metil-1,2,5,6 - dibenzantraceno diminui sua potência carcinogênica (16).

Cook e seus colaboradores (16) sugerem, baseados nos resultados de suas experiências, que as alterações na estrutura molecular dos hidrocarbonetos aromáticos podem modificar o grau de atividade carcinogênica dos mesmos no sentido de aumentá-lo ou diminuí-lo. Surgem também evidências experimentais de que as moléculas que apresentam anéis benzênicos nas posições 1, 2 e 5, 6 do sistema de anéis do antraceno (ver figura II.10) apresentam atividade carcinogênica (16).



ANTRACENO



1,2,5,6 - DIBENZANTRACENO

Figura II.10 - Antraceno e 1, 2, 5, 6 - Dibenzantraceno

Se considerarmos que os hidrocarbonetos devem atingir certas células particulares, sobre as quais atuarão e que dependem do transporte através de um meio aquoso, contendo complexos lipoprotéicos e outros agentes solubilizantes, é importante conhecer a solubilidade destes compostos. Um estudo neste sentido foi

realizado por Davis e colaboradores (17). Eles estudaram a solubilidade em água de 31 hidrocarbonetos aromáticos diferentes, usando métodos apropriados para determinação de solubilidade (18).

Em 1967, Snart (19) realizou um estudo sobre a interação molecular de seis tipos diferentes de hidrocarbonetos aromáticos em monocamadas lipídicas preparadas com lecitina de ovo. Ele estudou também a interação destes hidrocarbonetos com uma monocamada mista de lecitina e colesterol.

Belmonte e Swarbrick (20) estudaram o comportamento de dois isômeros do dibenzantraceno em monocamadas insolúveis de lipídeos. As monocamadas insolúveis são modelos que imitam bem as interfaces biológicas, onde supõem-se que os hidrocarbonetos aromáticos atuam na produção de câncer. Eles estudaram: o 1, 2, 3, 4 - dibenzantraceno que tem baixa atividade carcinogênica e o 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno que tem alta atividade carcinogênica. Há uma forte associação entre os lipídeos e estes dois isômeros, mas quando a pressão superficial é alta, não há desorção dos mesmos nas monocamadas. Para monocamadas mistas de lecitina e colesterol, o 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno associa-se com o colesterol, o mesmo não acontecendo com o 1, 2, 3, 4 - dibenzantraceno. Há um comportamento intermediário em monocamadas mistas, quando comparado ao descrito em relação a filmes puros de lipídeos.

Sanioto e Schreier (21) fizeram um estudo sobre as transições de fase em bicamadas lipídicas induzidas pela incorporação de hidrocarbonetos aromáticos de diferentes graus de ação carcinogênica nas mesmas, utilizando marcadores de spin e analisando os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) obtidos. Este estudo indicou que há uma diferença marcante entre os compostos carcinogênicos e não carcinogênicos, pois os primeiros podem induzir uma transição, na bicamada hos

pedreira, da fase gel para uma fase líquida-cristalina mais fluida. Os autores deste estudo também associaram os efeitos observados por RPE com a correlação já conhecida entre o tamanho da molécula de hidrocarboneto e o aumento na potência carcinogênica.

Os hidrocarbonetos são intercalados nas bicamadas de Di palmítol Lecitina (DPL) em diferentes proporções. O espectro de RPE do marcador de spin em DPL puro apresenta um grau pequeno de anisotropia, o qual aumenta conforme incluem-se os hidrocarbonetos aromáticos. Quanto maior o tamanho da molécula inclusa, maior o grau de anisotropia. Como as alterações que surgem nos espectros são semelhantes às provocadas por uma mudança de fase, Sanioto e Schreier sugerem que os hidrocarbonetos intercalam-se entre as cadeias de carbono e acarretam uma diminuição na interação fosfolipídeo-fosfolipídeo e existente na bicamada.

Os hidrocarbonetos aromáticos não-cancerígenos, cujas moléculas são menores, não induzem tal efeito de transição, ou se induzem o mesmo não é significativo. Os hidrocarbonetos aromáticos, cujas moléculas são menores, são solubilizados de forma diferente dos que possuem atividade carcinogênica reconhecida (e cujas moléculas são maiores) os quais alinham-se paralelamente às cadeias acílicas dos fosfolipídeos. Isto indica que a permeabilidade destes compostos cancerígenos através da membrana é diferente, o que pode constituir uma das características da potência carcinogênica.

Os hidrocarbonetos aromáticos por nós escolhidos neste trabalho foram: pireno, considerando como não cancerígeno, ou de baixa atividade carcinogênica; o 3, 4 - benzopireno e o 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno que apresentam alta atividade carcinogênica. A figura II.11 apresenta a fórmula estrutural do pireno e 3, 4 - benzopireno.

Sanioto e Schreier (21) propõem uma ordem crescente para os hidrocarbonetos aromáticos segundo o tamanho da molécula e a indução da transição de fase. Segundo esta ordem, os hidrocarbonetos aromáticos por nós utilizados estão dispostos da seguinte maneira:

pireno < 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno < 3, 4 - benzopireno.

Por outro lado segundo Cook e colaboradores (16), o 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno possui alta potência carcinogênica, produzindo tumores malignos tanto puro como com impurezas.

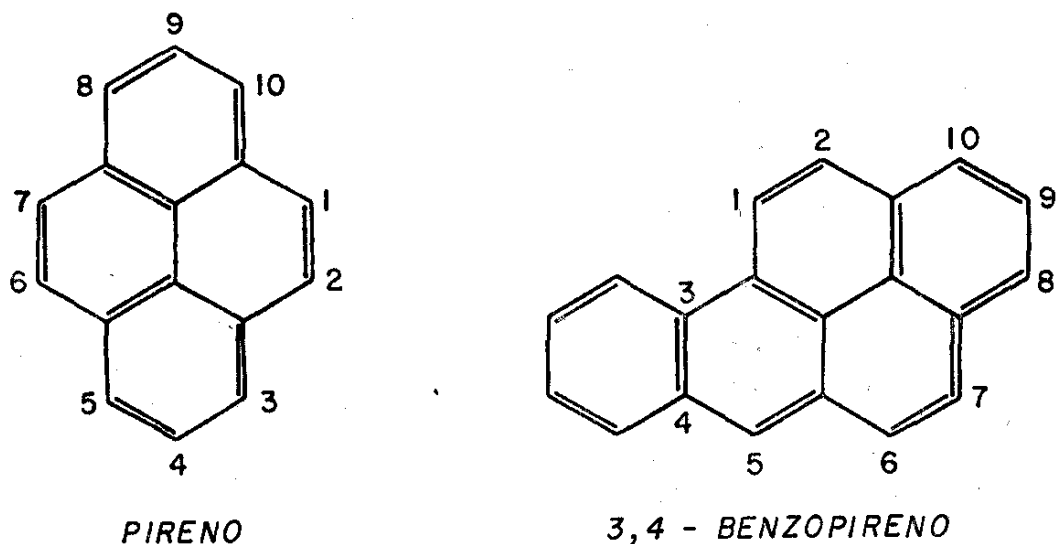


Figura II.11 - Fórmula estrutural do pireno e 3, 4 - benzopireno.

O 3, 4 - benzopireno também tem uma atividade carcinogênica bastante significativa e tem sido bastante estudado, pois é um dos agentes do câncer pulmonar. Este composto é encontrado no alcatrão do tabaco.



Segundo o trabalho de Davis e colaboradores (17), o grau de solub<sup>l</sup>idade em água aumenta segundo a mesma ordem proposta por Sanioto e Schreier, sendo que o 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno e o 3, 4 - ben<sup>z</sup>opireno estão separados por apenas um grau de solubilidade na classificação proposta.

Os resultados por nós obtidos quanto às perturbações es<sup>tr</sup>uturais provocadas por estes hidrocarbonetos em bicamadas de DPL, são apresentadas no Capítulo V.

III.1 - INTRODUÇÃO

A utilização da técnica de difração de Raios X na resolução da estrutura de certas moléculas biológicas, estruturas estas bastante complexas, nos permite determinar o posicionamento dos átomos com uma resolução de aproximadamente  $2 \text{ \AA}$ , através da utilização de métodos de refinamento para o cálculo da distribuição de densidade eletrônica.

No caso das membranas modelo por nós estudadas, não é possível chegar a uma localização precisa dos átomos nas bicamadas por duas razões importantes:

1. Não se trata de sistemas tridimensionais periódicos, como no caso de proteínas, que são estudados no estado cristalino.
2. As amostras de membranas são mantidas em condições de umidade constante, para simular melhor as condições naturais em que elas se encontram na célula viva. Além disso, os diagramas de difração por nós obtidos contém no máximo uma dezena de reflexões do tipo  $(00l)$ . Comparando estes diagramas com os que em geral são obtidos para cristais de proteínas, os quais contém, milhares de reflexões do tipo  $(hkl)$ , é fácil ver que a nossa análise não nos permite obter mapas de densidade eletrônica muito detalhados.

Devemos ressaltar também, que a difração de raios X

nos possibilita calcular uma média temporal e espacial da estrutura, haja vista o longo tempo de exposição necessário para a obtenção dos diagramas e em geral o alto grau de liberdade dos componentes da membrana.

A radiação difratada pelas membranas naturais ou empilhadas artificialmente, como no nosso caso, dá origem a um espectro de Bragg, já que as bicamadas de fosfolipídeos empilhadas apresentam um espaçamento bastante regular.

Se por um lado, o arranjo comporta-se como uma estrutura unidimensional, na direção perpendicular ao plano das bicamadas, por outro lado, as cadeias de carbono arranjam-se numa estrutura lateral que difrata independentemente. A intensidade difratada na direção equatorial, permite calcular a distância entre as cadeias de carbono da bicamada. Esta distância varia de 4,3 Å a 4,6 Å, dependendo da configuração das cadeias na bicamada (ver por exemplo a referência (23)).

Desta forma, podemos obter informações sobre a estrutura interna das membranas, tanto a partir da difração lamelar como daquela devida ao empacotamento lateral (na direção equatorial).

Podemos considerar o problema da difração lamelar como os planos das bicamadas moleculares refletindo os raios X e introduzindo diferenças de fase devidas à separação espacial dos mesmos.

Estas diferenças de fase introduzidas pela separação espacial devem ser iguais a múltiplos inteiros do comprimento de onda dos raios X, para que os raios difratados surjam da interferência construtiva da radiação espalhada (ver figura III.1).

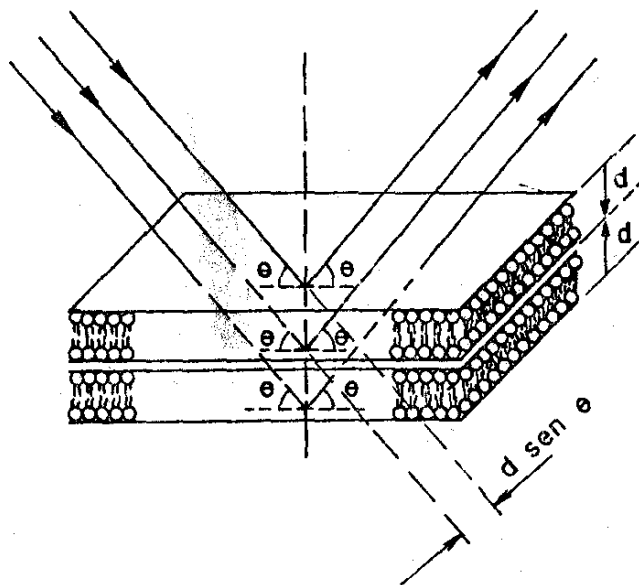


Fig. III.1 - Esquemática da difração de Raios X por bicamadas de fosfolipídeos de espessura  $\underline{d}$

A lei de Bragg é escrita como:

$$2d \text{ sen } \theta = n \lambda \quad , \quad \text{(III.1)}$$

onde  $n$  é um número inteiro e define a ordem de reflexão,  $\theta$  é o ângulo formado pelos feixes incidente e difratado com o plano difratante (ângulo de Bragg),  $\underline{d}$  é o espaçamento interplanar (espessura da bicamada de fosfolipídeos) e  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X.

Da equação III.1, vemos que para um dado  $\lambda$ , quanto maior o espaçamento menor será o ângulo de Bragg.

Os diagramas de difração dos arranjos lamelares das membranas são obtidos na região de ângulos pequenos ( $\theta < 5^\circ$ ), denominada região de baixo ângulo. Isto se deve ao fato da espessu

ra da membrana ser da ordem de algumas dezenas de angstroms e  $\lambda$  ser muito menor que a espessura.

Sob estas condições  $\sin \theta \approx \theta$ .

As reflexões que aparecem no diagrama ocorrem em posições definidas por múltiplos inteiros do inverso do espaçamento lamelar ( $n/d$ ).

Assim, as posições das reflexões no diagrama de difração, nos levam à dimensão da unidade repetitiva e as intensidades registradas no diagrama, dão informações sobre a variação da densidade eletrônica  $\rho(x)$ , na direção perpendicular ao plano da membrana, tal como veremos mais adiante.

Na realidade, tais intensidades estão afetadas por aberrações e devem ser corrigidas, segundo o descrito no item III.4.

### III.2 - A TEORIA ENVOLVIDA

Sabe-se que quando os raios X são difratados numa certa direção do espaço por um cristal, arranjo de átomos ou no caso, por membranas, apresentando máximos de intensidade, as condições de Laue, e portanto a condição de Bragg, que corresponde a um formalismo matemático mais simplificado das primeiras, devem ser satisfeitas nessa direção.

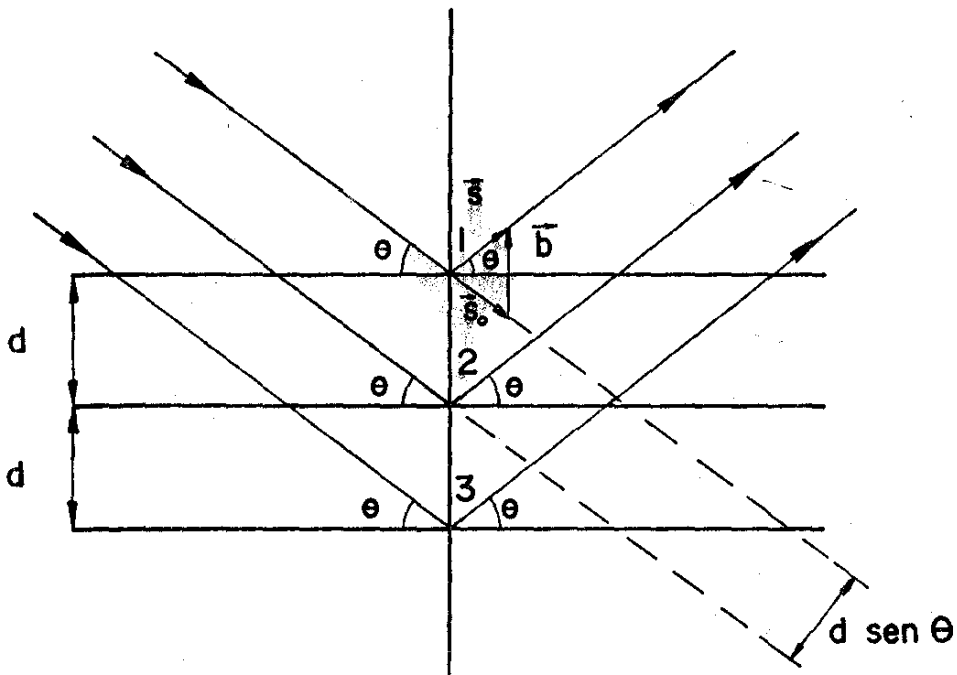


Figura III.2 - Representação esquemática dos vetores  $\vec{S}$ ,  $\vec{S}_0$  e  $\vec{b}$  e do conjunto de planos paralelos usado para a dedução da Lei de Bragg no caso unidimensional.

Chamamos de  $\vec{S}_0$  e  $\vec{S}$ , aos vetores unitários nas direções dos feixes incidente e difratado pelos planos, respectivamente. Definimos o vetor  $\vec{b} = \vec{S} - \vec{S}_0$ , perpendicular aos planos, como na figura III.2 (ver por exemplo referência (24)), onde:

$$|\vec{b}| = \frac{1}{d} \quad . \quad (\text{III.2})$$

Para se obter interferência construtiva, as ondas espalhadas devem estar em fase, portanto a diferença de caminho entre elas deve ser igual a um número inteiro de comprimentos de onda, o que nos leva à lei de Bragg dada pela equação (III.1), que permite determinar a distância interplanar do arranjo considerado.

Portanto:

$$|\vec{b}| = \frac{1}{d} = \frac{2 \operatorname{sen} \theta}{\lambda} \quad \text{se } n=1 \quad (\text{III.3})$$

Podemos obter informações a respeito da estrutura deste arranjo, através das intensidades registradas, como veremos a seguir.

Consideraremos um conjunto de  $N$  átomos cuja posição é dada pelos vetores  $\vec{x}_1, \vec{x}_2, \vec{x}_3, \dots, \vec{x}_N$ , a partir de uma origem arbitrária. Se  $f_1, f_2, f_3, \dots, f_N$  são os fatores de espalhamento dos  $N$  átomos, i.e., a amplitude de onda espalhada por cada um deles (sob um certo ângulo e um dado  $\lambda$ ), a transformada de Fourier da densidade eletrônica do  $n$ -ésimo átomo,  $f_n$ , é proporcional à amplitude de espalhamento de um elétron isolado (ver por exemplo a referência (25)).

A amplitude  $F(\vec{b})$  da onda resultante é obtida da adição das ondas espalhadas pelos  $N$  átomos, levando-se em conta as diferenças de fase geradas pelas diferentes posições  $\vec{x}_j$  de cada átomo. Assim,

$$F(\vec{b}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(-2\pi i \vec{b} \cdot \vec{x}_j) \quad (\text{III.4})$$

Este tratamento é feito no caso de termos  $N$  átomos atuando como centros espalhadores individuais na amostra. No en-

tanto, pode-se descrever a distribuição dos N átomos difratantes por uma função densidade eletrônica  $\rho(\vec{x})$ , onde  $\rho(\vec{x})$  dá o número de elétrons por unidade de volume, num elemento de volume  $dv_x$  do espaço real (pois a influência dos núcleos atômicos é desprezível),

$$F(\vec{b}) = \int_V \rho(\vec{x}) \exp(-2\pi i \vec{b} \cdot \vec{x}) dv_x \quad , \quad (\text{III.5})$$

integrando sobre todo o espaço real (V). Esta equação é diferente da equação (III.4), que integra apenas numa cela unitária.

Inversamente, pela transformada de Fourier, integrando-se no espaço recíproco ( $V^*$ ) (ver por exemplo a referência (26)), podemos escrever:

$$\rho(\vec{x}) = \int_{V^*} F(\vec{b}) \exp(2\pi i \vec{b} \cdot \vec{x}) dv_b \quad . \quad (\text{III.6})$$

Para uma onda eletromagnética, a intensidade é proporcional ao quadrado da amplitude, que neste caso é  $|F(\vec{b})|$ . Quando a integração é feita apenas sobre uma cela unitária,  $F(\vec{b})$  recebe o nome de fator de estrutura. A intensidade teórica seria então,

$$I(\vec{b}) \propto |F(\vec{b})|^2 \quad . \quad (\text{III.7})$$

Entretanto, a intensidade observada não coincide com a teórica, podendo ser obtida da mesma através de diversas correções, algumas das quais serão descritas mais adiante.



À primeira vista, se temos a intensidade difratada, podemos calcular a amplitude de onda difratada e determinar a função densidade eletrônica da membrana. No entanto, da equação (III.4):

$$F(\vec{b}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(-2\pi i \vec{b} \cdot \vec{x}_j) ,$$

ou seja,  $F(\vec{b})$  é um número complexo

$$F(\vec{b}) = A(\vec{b}) + i B(\vec{b}) , \quad (\text{III.8})$$

onde

$$A(\vec{b}) = \sum_{j=1}^N f_j \cos(2\pi \vec{b} \cdot \vec{x}_j) , \quad (\text{III.9})$$

e

$$B(\vec{b}) = \sum_{j=1}^N f_j \sin(-2\pi \vec{b} \cdot \vec{x}_j) . \quad (\text{III.10})$$

Portanto, há um ângulo de fase  $\phi(\vec{b})$  associado a cada amplitude de onda difratada.

$$F(\vec{b}) = |F(\vec{b})| \exp(i \phi(\vec{b})) . \quad (\text{III.11})$$

Ou seja,

$$\phi(\vec{b}) = \text{arc tg} \frac{B(\vec{b})}{A(\vec{b})} . \quad (\text{III.12})$$

Com,

$$A(\vec{b}) = |F(\vec{b})| \cos \phi(\vec{b}) , \quad (\text{III.13})$$

$$B(\vec{b}) = |F(\vec{b})| \sin \phi(\vec{b}) , \quad (\text{III.14})$$

Há então, um fator de fase associado a cada amplitude, que não pode ser obtido diretamente do diagrama de difração, que contém apenas informações sobre as intensidades. No entanto é necessário conhecer este fator de fase para calcularmos a função densidade eletrônica pela equação (III.6), que é reescrita como:

$$\rho(\vec{x}) = \int_{V^*} |F(\vec{b})| \exp\{i(2\pi \vec{b} \cdot \vec{x} + \phi(\vec{b}))\} dv_b \quad . \quad (\text{III.15})$$

### III.3 - O PROBLEMA DA DETERMINAÇÃO DAS FASES DO FATOR DE ESTRUTURA

O problema da determinação de fases da amplitude difratada tem sido extensivamente estudado e discutido, e as soluções apresentadas, em geral, são bastante complexas, principalmente no caso de cristais, onde temos centenas de reflexões num diagrama. Este problema representa a maior dificuldade para o cálculo da função densidade eletrônica de uma dada amostra, a partir do diagrama de difração, pois ele deve ser resolvido antes de se calcular  $\rho(\vec{x})$ .

Se considerarmos uma estrutura centrossimétrica, tal como no nosso caso, para todo átomo em  $\vec{x}$  existe outro em  $-\vec{x}$ .

Desta forma,

$$B(\vec{b}) = \sum_{j=1}^N f_j \operatorname{sen}(2\pi \vec{b} \cdot \vec{x}_j) \quad ,$$

se anulará por simetria.

Assim,

$$\operatorname{tg} \phi(\vec{b}) = 0 \rightarrow \phi(\vec{b}) = \begin{cases} 0 \\ \text{ou} \\ \pi \end{cases} \quad (\text{III.16})$$

O fator de estrutura ou amplitude da onda difratada, pode ser escrito como:

$$F(\vec{b}) = \pm |F(\vec{b})| \quad (\text{III.17})$$

Se representarmos em gráfico as intensidades difratadas por uma estrutura centrossimétrica unidimensional, como função de  $\vec{b}$ , veremos que a intensidade será proporcional a  $\cos^2 \phi(\vec{b})$ , e encontraremos uma curva de caráter ondulatório, apresentando vários picos localizados para valores de  $|\vec{b}| = \frac{n}{d}$ , onde os ns são números inteiros. Nos pontos de intensidade nula, o fator de estrutura também será nulo, o que indica uma mudança de fase das amplitudes, de zero a  $\pi$  ou vice-versa (ver por exemplo a referência (23)).

Resta-nos então determinar a combinação de fases que descreve a estrutura.

O número de combinações possíveis é dada por  $(2)^{n_{\max}}$ , onde  $n_{\max}$  é o número total de reflexões obtidas no diagrama.

Existem alguns métodos, que nos permitem determinar tal combinação, tais como o "método de inchamento" descrito por Levine e Wilkins (28) e o "método de substituição isomorfa", encontrado na literatura usual sobre difração de raios X.

O método por nós utilizado consiste em tomar um modelo baseado na composição química da amostra, para a distribuição de densidade eletrônica, como base de comparação.

No caso da amostra de DPL puro, utilizamos a combinação de fases apresentada como resultado no trabalho realizado por Zaccai, Blasie e Schoenborn (29).

Para as amostras com inclusões de hidrocarbonetos aromáticos: DPL com pireno, DPL com 3,4-benzopireno e DPL com 1, 2, 5, 6-dibenzantraceno, testamos as  $\frac{(2)^{n_{\max}}}{2}$  combinações possíveis.

O fator 2 dividindo  $(2)^{n_{\max}}$  surge do centro de simetria proposto para a estrutura.

Dos resultados obtidos para cada amostra, em geral só um descreve um perfil que se aproxima do modelo por nós considerado, como veremos mais adiante.

### III.4 - CORREÇÕES CONSIDERADAS SOBRE O VALOR DAS INTENSIDADES REGISTRADAS

Analisaremos as correções que comumente são feitas às intensidades observadas dos raios X difratados: fator de polarização; fator de temperatura; fator de absorção; fator de Lorentz e correções devidas à geometria da amostra. Além disso, analisaremos as correções que são feitas às aberrações instrumentais, devido ao tipo de colimação usada.

#### III.4a. - Fator de Polarização

Em geral a radiação característica direta produzida por um tubo de Raios X não é polarizada.

No entanto, o processo de espalhamento faz com que o

feixe difratado seja parcialmente polarizado, sendo que o grau de polarização dependerá do ângulo de espalhamento (ver por exemplo a referência (30)).

Pela forma clássica de Thomson, a intensidade  $I_e$  espalhada, a uma distância  $R$  de um elétron livre é:

$$I_e = I_o \left( \frac{e^4}{m^2 c^4 R^2} \right) \sin^2 \alpha \quad , \quad (\text{III.18})$$

onde  $I_o$  é a intensidade do feixe incidente,  $m$  e  $e$  são a massa e a carga do elétron respectivamente,  $c$  é a velocidade da luz e  $\alpha$  é o ângulo entre a direção do espalhamento e a direção de aceleração do elétron. A equação (III.18) explica o porquê de não levarmos em conta nas intensidades as contribuições dos núcleos atômicos.

No entanto, após ser espalhada pelos elétrons de um átomo, a radiação encontra-se plano polarizada num grau que depende do ângulo  $\theta$  de Bragg.

$$I_e = I_o \left( \frac{e^4}{m^2 c^4 R^2} \right) \left( \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right) \quad , \quad (\text{III.19})$$

pois, por considerações geométricas (ver por exemplo a referência (30)), chegamos que  $\alpha_z = 90^\circ - 2\theta$  e  $\alpha_y = 90^\circ$ , onde  $\alpha_y$  e  $\alpha_z$  são os ângulos entre a direção do feixe espalhado e os eixos  $y$  e  $z$ .

A quantidade  $\left( \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right)$  é conhecida como fator de polarização.

De medidas de posição das linhas de difração nos diagramas de raios X obtidos a partir de nossas amostras, obtive -

mos para a amostra de DPL puro (foto 3 do capítulo V), que a distância angular entre duas linhas sucessivas (aproximadamente constante por ser baixo ângulo) é de:

$$\Delta\theta \cong 0.0127 \text{ rd} \cong 0.73^\circ \cong 44'$$

Assim, para a 1<sup>a</sup> ordem:

$$\cos 2\theta \cong 0.9997 \quad \text{e} \quad \cos^2 2\theta \cong 0.9994$$

$$\left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}\right) \cong \frac{1 + 0.9994}{2} \cong 0.9997$$

e para a 8<sup>a</sup> ordem,

$$\left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}\right) \cong 0.9796$$

O fator de polarização é praticamente igual à unidade com erro de  $10^{-4}$  para a 1<sup>a</sup> ordem e de  $10^{-2}$  para a 8<sup>a</sup> ordem.

#### III.4.b - Fator de Temperatura

Os fatores de espalhamento atômico, são em geral calculados para átomos em repouso. À temperatura ambiente constante, os átomos num cristal não estão em repouso, e sim estão em vibração térmica em torno de suas respectivas posições de "equilíbrio".

Do ponto de vista das reflexões de Bragg, isto significa que o plano refletor não é um plano matemático, pois num dado instante os átomos encontram-se em posições, que variam em torno de sua posição média (ver por exemplo a referência (30)).

Admite-se em primeira aproximação, que cada átomo vibra em movimento harmônico isotrópico e independente, logo os deslocamentos em relação às posições de equilíbrio de todos os átomos cristalograficamente equivalentes, num dado instante, são iguais ao de um átomo qualquer vibrando na rede. Os deslocamentos dos átomos individuais ~~ser~~ ser portanto dados por uma função distribuição Gaussiana, tendo então, um deslocamento quadrático médio igual a  $\bar{\mu}^2$  (ver por exemplo as referências (24) e (31)).

Assim, se a densidade eletrônica  $\rho_0(\vec{x})$  na posição teórica (em repouso) é avaliada sobre todas as posições  $\vec{x}$  por uma função densidade eletrônica efetiva  $\rho_{ef}(\vec{x})$  será a convolução (\*) entre  $\rho_0$  e a função gaussiana  $\rho_1(\vec{x})$  citada acima:

$$\rho_{ef}(\vec{x}) = \rho_0(\vec{x}) * \rho_1(\vec{x}) \quad . \quad (\text{III.20})$$

Desta forma, o fator de espalhamento atômico efetivo (à temperatura ambiente)  $f_{ef}$  será:

$$f_{ef}(\vec{b}) = \int_{\text{vol. atômico}} \rho_0(x) * \rho_1(x) \, dv_x \quad , \quad (\text{III.21})$$

$$f_{ef}(\vec{b}) = f_0(\vec{b}) \exp(-2 \pi^2 \bar{\mu}^2 b^2) \quad , \quad (\text{III.22})$$

onde  $f_0(\vec{b})$  é o fator de espalhamento teórico (em repouso),

$$f_{ef}(\vec{b}) = f_0(\vec{b}) \exp\left(-8 \pi^2 \bar{\mu}^2 \left(\frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right)\right) \quad , \quad (\text{III.23})$$

usando o valor de  $|\vec{b}|$  dado pela equação (III.3).

Por conseguinte, o fator de estrutura efetivo será:

$$|F(n)|_{ef} = |F(n)|_0 \exp \left( -8\pi^2 \bar{\mu}^2 \left( \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right) \right), \quad (\text{III.24})$$

onde definimos o fator D, conhecido como fator de Debye-Waller:

$$D = \exp \left( -8\pi^2 \bar{\mu}^2 \left( \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right) \right), \quad (\text{III.25})$$

e chamando,  $B = 8\pi \bar{\mu}^2$ ,

$$D = \exp \left( -B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right), \quad (\text{III.26})$$

onde B é conhecido como fator de temperatura.

No nosso experimento, para o caso DPL puro

$$\lambda = 1,5417 \text{ \AA},$$

$$\Delta\theta = 0,0127 \quad \text{e} \quad \sin \theta \cong \theta.$$

Como os valores típicos de B para este tipo de estrutura e reflexões lamelares encontram-se entre 2 e 3  $\text{\AA}^2$ , se  $B=3 \text{ \AA}^2$ , para a 1ª ordem de reflexão,

$$D = \exp \left( - \frac{3 (0,0127)^2}{(1,5417)^2} \right) \cong \exp (-0,0002),$$

$$D \cong 0,9998.$$

Se  $B = 2 \text{ \AA}^2$

$$D = \exp \left( - \frac{2 (0,0127)^2}{(1,5417)^2} \right) \cong \exp (-0,00014),$$

$$D \cong 0,99986.$$



Podemos então, aproximar o fator de Debye-Waller para a unidade, com um erro da ordem de  $10^{-4}$  para a 1ª ordem e  $10^{-3}$  para a 8ª ordem.

### III.4.c - Fator de Absorção

Quando um feixe de raios X direto ou difratado atravessa a matéria, ele é absorvido de acordo com a expressão:

$$\frac{I}{I_0} = \exp (- \mu t) \quad , \quad (\text{III.27})$$

onde  $t$  é a espessura da amostra e  $\mu$  é o coeficiente de absorção linear,  $I_0$  é a intensidade incidente e  $I$  a intensidade após o feixe atravessar a espessura  $t$ .

Para um dado elemento, o coeficiente de absorção linear aumenta, em geral, com o comprimento de onda ( $\lambda$ ) mas este aumento não é contínuo. A curva  $(\mu/\rho)$  v.s.  $\lambda$  apresenta descontinuidades denominadas "cantos de absorção" correspondentes aos comprimentos de onda de raios X de energia suficiente para arrancar elétrons da camada K, L ou M deste elemento, por emissão foto-elétrica.

Se definirmos o coeficiente de absorção de massa, como a razão entre o coeficiente de absorção linear  $\mu$  e a densidade do material  $\rho$ , temos que

$$\frac{I}{I_0} = \exp \left( - \left( \frac{\mu}{\rho} \right) \rho t \right) \quad . \quad (\text{III.28})$$

Se por um lado o coeficiente  $\mu$  depende do estado físico e químico da substância, a quantidade  $(\mu/\rho)$  não dependerá (ver por exemplo a referência (32)).

Tabelas de variação do coeficiente de absorção de massa com o comprimento de onda dos raios X são encontradas na coleção "International Tables for X-Ray Crystallography" (49).

Calculos baseados no volume da dispersão utilizado para preparar a amostra e na concentração de fosfolipídeos na mesma indicam que a espessura (t) atravessada pelos raios X é aproximadamente de 27  $\mu\text{m}$ .

Admite-se para o DPL uma densidade de  $1,02 \text{ g/cm}^3$ , aproximadamente igual a do material em pó ( $1,03 \text{ g/cm}^3$ ). Calculando-se o valor do coeficiente total  $(\frac{\mu}{\rho})$  para a molécula de DPL, levando-se em conta todos os átomos que compõem a mesma, obtem-se  $(\frac{\mu_T}{\rho}) = 3,06$ .

Desta forma, para o caso DPL puro:

$$\frac{I}{I_0} \cong 0,9917 \quad ,$$

ou seja podemos admitir que  $I \cong I_0$  com um erro de  $10^{-3}$ .

Os efeitos de extinção primária e secundária não são levados em consideração para o caso de nossas amostras, pois o grau de perfeição da rede cristalina das mesmas é muito baixo e a espessura da mesma é muito pequena (27).

#### II.4.d - Fator de Lorentz e Correções devidas à Geometria da Amostra

O fator de Lorentz surge da geometria de difração, no

caso do cristal ter um movimento controlado em relação ao feixe incidente. Desta forma, vários planos da amostra apresentar-se-ão ao feixe incidente, sucessivamente, nos seus ângulos de Bragg e terão oportunidade de refletir. O fator de correção neste caso é  $(1/\sin 2\theta)$ , que é proporcional ao tempo relativo que um dado plano leva para girar através de um pequeno intervalo de variação de  $\theta$ , sobre o qual ocorre a reflexão e são satisfeitas as condições de Bragg (ver por exemplo a referência (30)).

No nosso caso o fator de Lorentz não é levado em conta, visto que a amostra permanece fixa durante a incidência do feixe de raios X.

Entretanto, serão feitas correções levando-se em conta efeitos de absorção, que surgem devido a geometria da amostra e curvatura do substrato.

Este tipo de correção, é comumente usada em cálculos de densidade eletrônica de sistemas lamelares (29).

Estas correções baseiam-se:

- a) na desordem da amostra;
- (b) na curvatura do substrato;
- (c) na distribuição das intensidades ao longo das linhas de difração.

No caso de um foco pontual de raios X, a desordem da amostra e a curvatura do substrato fazem com que, o nó que seria esperado no espaço recíproco alargue-se formando uma casca esférica. A área destas cascas esféricas varia com o quadrado da coordenada recíproca ( $\vec{b}$ ), que por sua vez é proporcional à ordem de reflexão  $n$ , portanto variam com  $n^2$  (ver por exemplo a referência (29)). A interseção destas cascas esféricas com a esfera de Ewald, resulta nas linhas

(arcs) de difração observados, que por sua vez vão depender somente de  $n$ . Devemos, então corrigir as intensidades observadas por um fator  $n$ , devido ao fato de estarmos "perdendo" intensidade nas ordens mais altas (ver figura III.4).

Por outro lado, quando efetuamos a leitura das intensidades, fazemos uma varredura microdensitométrica na região central das linhas do diagrama. Como dissemos anteriormente, estas linhas no caso de um foco pontual são arcos cujo diâmetro aumenta, conforme elas se afastam da origem do espaço recíproco, ou seja crescem com  $n$ , o qual dá a ordem de reflexão (ver figura III.3).

Portanto, se efetuarmos a leitura com fenda de altura limitada, o erro será proporcional ao valor da ordem de reflexão, que está sendo registrada. Devemos então multiplicar a intensidade observada por outro fator  $n$ . Assim, a correção usada para o foco pontual é  $n^2$ .

No caso de termos foco linear, esta correção re-

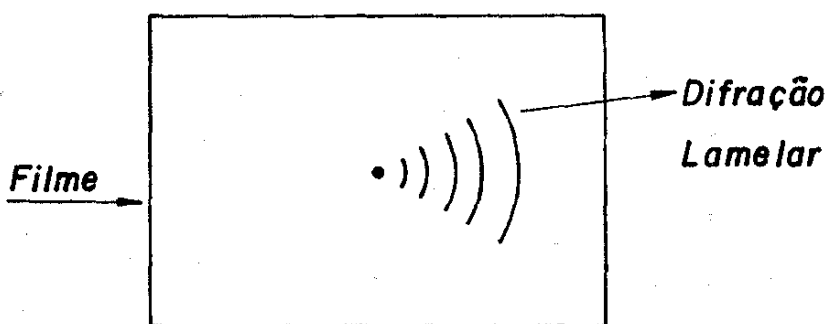


Figura III.3 - Esboço da difração lamelar registrada no filme, quando utilizamos um foco pontual.

duz-se a  $n$  somente, e será devida à geometria da amostra. O microdensitômetro, neste caso, varre uma secção constante das linhas de difração onde a intensidade das mesmas é praticamente uniforme, não havendo necessidade então, de corrigir em relação à leitura microdensitométrica.

Vamos considerar agora, o fato de estarmos usando um feixe de secção linear.

As correções devido às aberrações produzidas pelo uso de um foco linear, são bastante relevantes no caso de medidas de intensidade de espalhamento central, e para este caso sugestões apropriadas são feitas por Guinier e Fournet (33) e por Schmidt (34).

No nosso caso estamos trabalhando com medidas de intensidades relativas das linhas de difração lamelar originadas por bicamadas de lipídeos, e não efetuamos as correções convencionais para obter o perfil de tais linhas livres de aberrações produzidas pelo uso do foco linear.

Em 1977, Pape e colaboradores (35) aplicaram métodos apropriados de correção para obter o perfil de linha livre de aberrações, na determinação do perfil de densidade eletrônica da membrana de eritrócitos humanos.

Esta correção de intensidades pode levar a algumas diferenças, principalmente no caso dos diagramas de difração de sistemas muito desordenados, como as membranas de eritrócitos humanos, com linhas muito difusas.

Para controlar a influência do perfil de linha no cálculo da densidade eletrônica, em geral pode-se obter diagramas com foco pontual e comparar.

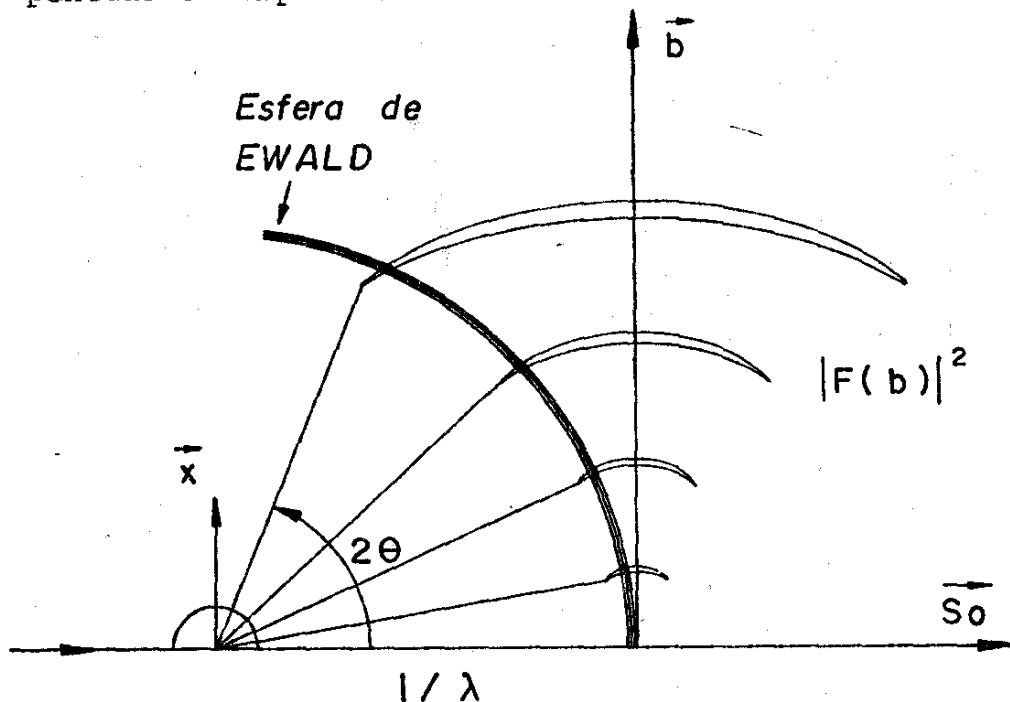


Figura III.4 - Alargamento dos nós do espaço recíproco em cascas esféricas, e a intersecção destas cascas com a esfera de Ewald, gerando as linhas de difração.

### III.5 - DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE DENSIDADE ELETRÔNICA

Para determinar a distribuição de densidade eletrônica das bicamadas de fosfolipídeos torna-se essencial resolver o problema das fases.

Como dissemos anteriormente, este problema pode ser resolvido usando o método de inchamento (ver por exemplo a referência (28)), no entanto há indicações de que pode haver alteração na estrutura da bicamada durante o processo de inchamento(36).

Durante estes últimos anos têm surgido vários métodos

de determinação de fases, tais como: os chamados métodos diretos (37,38); o método proposto por Worthington e Khare (39) que utiliza o método de convolução associado a um processo de refinamento por aproximações sucessivas; e outros.

Além disso, têm sido desenvolvidos modelos teóricos para a distribuição de densidade eletrônica de bicamadas por vários métodos diferentes, entre os quais podemos citar o modelo baseado na análise harmônica, modelo de poços quadrados, etc (ver por exemplo a referência (23)).

No nosso caso optamos por escolher as fases para a bicamada de DPL puro baseando-nos em estudos realizados anteriormente (22,28,40) e admitimos um modelo de distribuição de densidade eletrônica baseada na composição química das bicamadas de DPL, compatível com os resultados apresentados por Lesslauer e colaboradores (22). Este modelo é apresentado na figura III.5.

Para as amostras com inclusões de hidrocarbonetos aromáticos procuramos entre todas as combinações de fase possíveis de cada uma das amostras, aquela que nos levasse a uma distribuição de densidade eletrônica semelhante à do modelo por nós considerado. Devido ao fato de que as alterações introduzidas pelos hidrocarbonetos aromáticos no perfil de densidade eletrônica, tal como o estreitamento da distância entre os picos de alta densidade eletrônica são menores que a resolução dos mapas  $7,5 \text{ \AA}$ , a periodicidade é quase a mesma, o que faz com que as três primeiras fases permaneçam inalteradas.

No modelo escolhido (figura III.5), consideramos a densidade eletrônica média da água, que neste caso é o meio de suspensão, como origem, mas na realidade é  $0,334 \text{ elétrons/\AA}^3$ . Estu

dos anteriores realizados sobre a densidade eletrônica dos componentes das bicamadas, apresentam os grupos de cabeça polar de lipídeos com densidade eletrônica de  $0,45 \text{ elétrons}/\text{Å}^3$  em face a  $0,296 \text{ elétrons}/\text{Å}^3$  e  $0,165 \text{ elétrons}/\text{Å}^3$  para as cadeias de metileno e grupos metila terminais ( $\text{CH}_3$ ) no estado líquido (43), respectivamente.

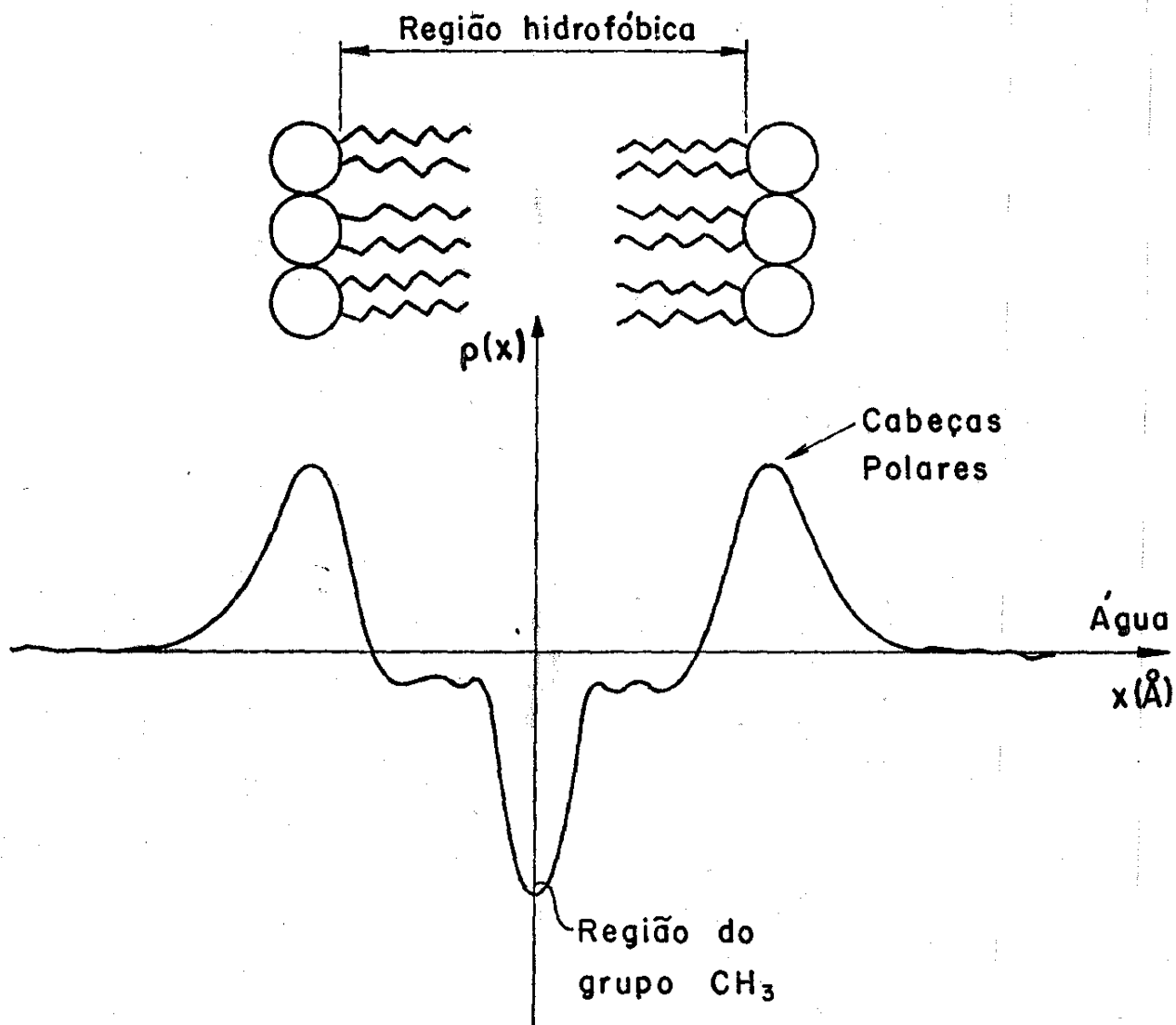


Figura III.5 - Modelo do perfil de Densidade Eletrônica utilizado em nosso trabalho



### III.6 - O PROGRAMA DE COMPUTADOR UTILIZADO PARA OBTER A DISTRIBUIÇÃO DE DENSIDADE ELE- TRÔNICA

Para o cálculo da distribuição de densidade eletrônica de nossas amostras utilizamos o computador PDP-10 e um programa em linguagem Fortran.

O programa calcula e mapeia a distribuição de densidade eletrônica a partir das intensidades observadas no diagrama de difração de raios X de nossas amostras.

Primeiramente, o programa corrige as intensidades observadas  $I(n)$ , onde  $n$  dá a ordem de difração, por um fator  $n$ , conforme discussão anterior (secção III.4).

A partir das intensidades corrigidas  $I_{\text{corr}}(n)$ , ele calcula o módulo dos fatores de estrutura  $F(n) = |I_{\text{corr}}(n)|^{1/2}$

A partir das amplitudes das ondas difratadas (fator de estrutura), das fases atribuídas e utilizando o teorema da amostragem de Fourier, o programa obtém os dados suficientes para construir uma função  $F(\vec{b})$  contínua, onde  $\vec{b}$  é a coordenada do espaço recíproco.

Com  $F(\vec{b})$  determinada ele calcula a Transformada de Fourier de  $F(\vec{b})$  que é a função densidade eletrônica  $\rho(\vec{x})$ .

Um esquema dos cálculos efetuados pelo programa pode ser visto na figura III.6, e o programa se encontra a disposição em nosso laboratório.

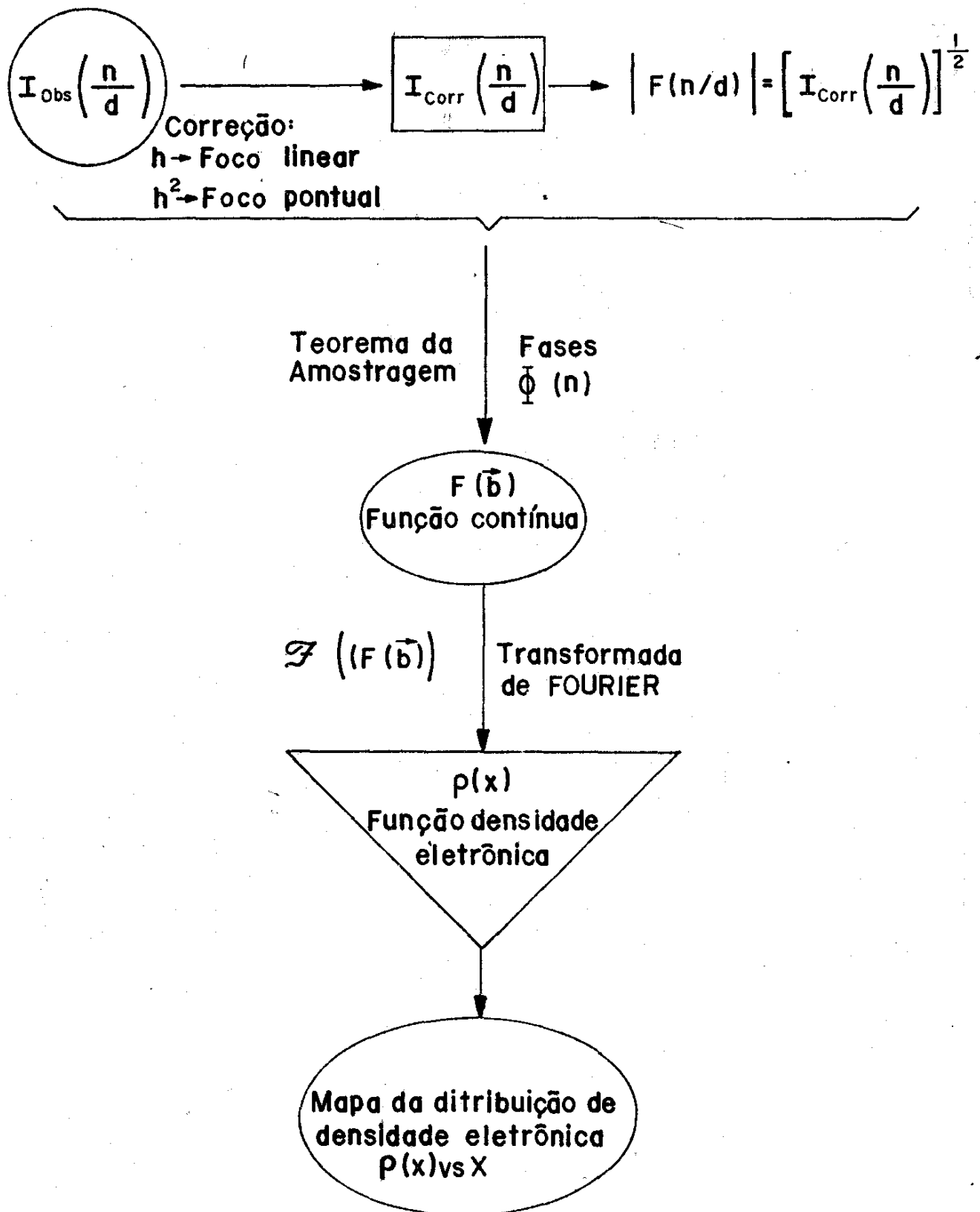


Figura III.6 - Esquema dos cálculos realizados pelo Programa.

## CAPÍTULO IV - TÉCNICA EXPERIMENTAL

### IV.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste trabalho utilizamos quatro tipos de amostras, cuja estrutura básica é composta de bicamadãs de dipalmitil lecitina (DPL). Uma das amostras contém somente DPL, enquanto os outros três tipos contém hidrocarbonetos aromáticos incorporados: DPL com pireno, DPL com 3,4-benzopireno e DPL com 1, 2, 5, 6-dibenzantraceno.

As amostras são preparadas em forma de dispersões, das quais tomamos a quantidade necessária (aproximadamente 0,1 ml) e depositamos sobre um substrato apropriado. A secagem da amostra é feita lentamente mantendo-a numa atmosfera com a umidade desejada, como veremos a seguir.

#### IV.1.1 - Material Utilizado

Utilizamos as seguintes substâncias: DL- $\alpha$  Dipalmitil Lecitina sintética, fornecido pela Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA, com 99,0% de pureza, na preparação de todas as amostras; pireno, 3,4-benzopireno e 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno fornecidos pela L. Light & Co., Ltda. Colnbrook, England, foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

A tabela IV.1 contém os pesos moleculares das substâncias citadas.

Na preparação das dispersões utilizamos também cloro-  
fórmio (P.A) e uma solução tampão de fosfato ( $K^+ - Na^+$ )  $PO_4^{--}$ ,  
0,01M, de PH  $\cong$  7,0, preparada segundo especificações do Chemical  
Rubber Company Manual (1974).

#### IV.1.2 - Método de Preparação das Dispersões

Estudos preliminares realizados em nosso laboratório, utilizando difração de raios X, indicaram que a proporção adequada de fosfolipídeos para hidrocarbonetos aromáticos é de 8:1, ou seja, 8 moléculas de DPL para uma molécula de hidrocarboneto. Esta proporção permite notar o efeito da incorporação dos hidrocarbonetos sem causar uma separação das fases na dispersão. A presença dos hidrocarbonetos nas camadas aquosas pode ser detectada nos diagramas de difração de raios X, já que após a secagem da amostra os hidrocarbonetos formam microcristais, os quais difratam independentemente.

##### IV.1.2.1 - DPL Puro

Na preparação da dispersão de DPL puro dissolvemos 10mg de DPL - DL $\alpha$  em cerca de 0,5ml de cloroformio e fizemos passar por esta solução um fluxo de nitrogênio gasoso, até secá-la totalmente nas paredes do tubo de ensaio. Adicionamos 0,5ml de solução tampão, obtendo assim uma dispersão de DPL de concentração de 20 mg de DPL/ml.

A dispersão assim preparada apresenta vesículas multilamelares concêntricas de fosfolipídeos separadas por camadas aquosas. As multicamadas se formam espontaneamente, quando os fosfolipídeos são colocados em água (ver figura IV.1).

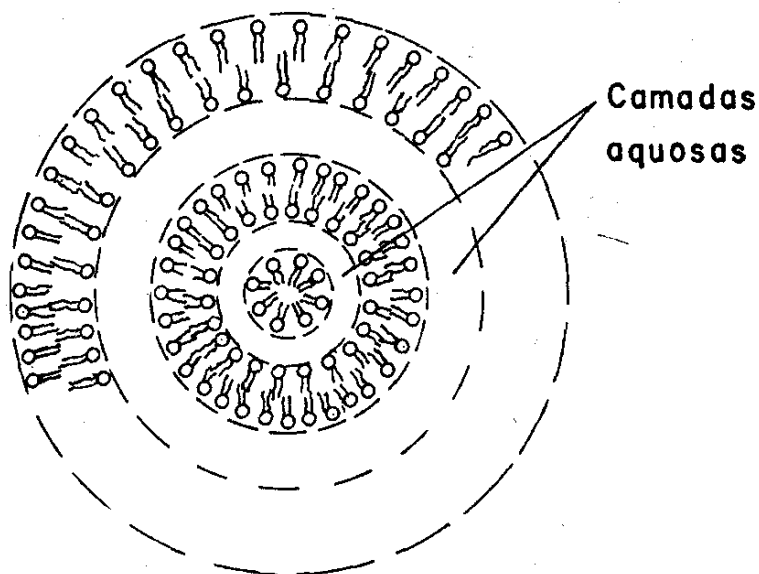


Fig. IV.1 - Vesículas multilamelares concêntricas separadas por camadas aquosas

No intuito de obter vesículas unilamelares, submetemos então a dispersão ao ultra-som, a uma potência de aproximadamente 40 watts durante 0,5 minuto à temperatura ambiente, repetindo este procedimento por três vezes consecutivas com intervalos de 1 minuto.

Através do fenômeno de cavitação gerado pelo ultra-som, provocamos o rompimento das vesículas multilamelares. Este fenômeno corresponde à implosão de uma quantidade enorme de bolhas microscópicas que são formadas durante a propagação da onda de ultra-som no líquido, pois tal propagação consiste de movimentos alternados de compressão e rarefação. Quando temos energia suficientemente intensa envolvida neste processo, a implosão das bolhas produz mudanças na pressão local, da ordem de milhares de atmosferas, atingindo assim as condições necessárias para haver o rompimento das vesículas multilamelares.

#### IV.1.2.2 - DPL com Hidrocarbonetos Aromáticos

Inicialmente, preparamos uma solução de hidrocarboneto em clorofórmio na concentração de 1mg de hidrocarboneto/ml.

Adicionamos então 1  $\mu$ mol hidrocarboneto na forma de solução a uma massa de DPL correspondente a 8  $\mu$ moles.

A tabela IV.1, abaixo indica a massa correspondente às quantidades em moles utilizadas de cada composto.

Secamos a solução obtida usando um fluxo de nitrogênio gasoso, como no caso do DPL puro.

Em seguida acrescentamos 0,5ml de solução tampão à massa resultante da secagem e obtemos assim uma solução cuja concentração será: (16  $\mu$ moles de DPL + 2  $\mu$ moles de hidrocarboneto)/ml.

A dispersão é então submetida ao ultra-som.

TABELA IV.1 - Quantidades das Substâncias Utilizadas na Preparação de Amostras e Pesos Moleculares das Mesmas

Substância	Peso Molecular (g)	1 $\mu$ mol (mg)	8 $\mu$ moles (mg)
DPL	734,10	0,734	5,872
Pireno	202,26	0,202	-
3,4-Benzopireno	252,32	0,252	-
1,2,5,6-Dibenzantraceno	310,36	0,310	-

Aparelho de ultra-som utilizado: Branson, B-12, que foi gentilmente cedido pelo Departamento de Biologia da UNICAMP.

#### IV.1.3 - Preparação de Amostras no Substrato

Os substratos utilizados foram obtidos cortando-se um quadrado de 1cm de lado, aproximadamente, das paredes de um tubo cilíndrico, de vidro ou de quartzo, cujo diâmetro externo é de 4cm, aproximadamente. A espessura do substrato, a mesma das paredes do tubo, é de cerca de 2mm.

Utilizamos tanto o substrato de vidro como o de quartzo na obtenção dos diagramas. No caso das amostras de DPL puro, o melhor diagrama foi obtido de uma amostra colocada num substrato de quartzo, o mesmo acontecendo no caso da amostra de DPL com 1, 2, 5, 6-dibenzantraceno. Já para os diagramas de DPL com pireno e de DPL com 3,4-benzopireno, o melhor resultado foi obtido de amostras que estavam em substratos de vidro.

Teoricamente os substratos de quartzo deveriam ser melhores, apresentando menor radiação de fundo que o de vidro. No entanto, os substratos de quartzo apresentam estrias na superfície que acreditamos não contribuir para a obtenção de bons diagramas, influenciando nos resultados.

Deve-se tomar cuidado em relação a possíveis rebordos que possam surgir do corte, pois estes rebordos influenciarão os diagramas, já que o feixe entra rasante ao substrato, na geometria de difração utilizada.

Sendo assim, escolhemos vários substratos, preparamos várias amostras e expusemos as mesmas aos raios X, muitas vezes repetindo exposições para uma mesma amostra.

De um total de 88 exposições, escolhemos os quatro diagramas que melhor representam cada um dos tipos de amostras, veri

ficando a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

A amostra é colocada no substrato em forma de uma gota, colhida em cerca de 15mm do capilar de uma pipeta Pasteur. Feita a deposição da gota no substrato, a amostra é colocada para secar na umidade desejada, num vidro contendo uma pequena quantidade de solução salina saturada adequada.

Variamos também a umidade de secagem das amostras. No entanto, as umidades correspondentes às amostras dos diagramas escolhidos foram de 56% (solução de  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  saturada) para o DPL puro e para as de DPL com hidrocarbonetos aromáticos foi de 75% (solução saturada de  $NaClO_3$ ) nos três casos.

#### IV.2 - APARATO EXPERIMENTAL

Desde o início da preparação da montagem experimental de nossas experiências de difração de raios X, procuramos otimizar as condições experimentais de forma a obtermos diagramas de difração de raios X a baixo ângulo com maior resolução.

Este tipo de diagrama é de interesse no estudo de diversos tipos de amostras, que envolvem espaçamentos da ordem de algumas dezenas ou centenas de angstroms e requer condições especiais de colimação do feixe incidente.

Dos modelos de câmara de baixo ângulo podemos citar três como os mais usados na obtenção deste tipo de diagramas:

1. A colimação do feixe de raios X é feita por um sistema de fendas lineares estreitas ou circulares do tipo "pinholes". Em geral, a radiação é filtrada. Apesar dos diagramas serem de baixa resolução, é



possível resolver com este tipo de câmara espaçamentos da ordem de centenas de Angstroms (44).

2. O feixe é focalizado e parcialmente monocromatizado por reflexão em um ou mais monocristais curvos. Espaçamentos de até  $150\text{Å}^{\circ}$  podem ser resolvidos, usando-se monocromador de um cristal. No entanto, a resolução aumenta muito com o monocromador de cristal duplo. Aqui as intensidades ainda são baixas, devido à ineficiência das reflexões de Bragg.
3. O feixe de raios X é refletido por uma superfície plana polida, encurvada. O ângulo crítico de incidência é aproximadamente proporcional ao comprimento de onda incidente, de forma que a radiação refletida é parcialmente monocromatizada. Para a radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54\text{Å}^{\circ}$ ), o ângulo é aproximadamente  $11'$  para vidros e  $30'$  para refletores de ouro (44). Este tipo de refletores curvos foram sugeridos para a produção de feixes bastante intensos de raios X, por Ehrenberg e Franks em 1952 (45). A resolução é muito maior quando se utiliza este tipo de câmara. O ângulo de inclinação  $\theta$ , entre a superfície e o feixe refletido é tal que somente são refletidos comprimentos de onda da radiação característica e maiores do que este.

No nosso caso utilizamos um sistema de colimação por fendas lineares comuns, mais simples, descrito mais adiante.

Em geral, utiliza-se radiação monocromática para o estudo de estruturas por meio de difração de raios X, devido ao fato de que pela lei de

Bragg a um certo  $d$  e um certo  $\lambda$  corresponde um certo  $\theta$  médio. No caso, não necessitamos de monocromador para as linhas características do anticatodo do tubo (Cu), pois a radiação  $K_{\beta}$  é praticamente eliminada por um filtro de Ni e o dubleto formado pela radiação  $K_{\alpha}$  ( $K_{\alpha_1}$  e  $K_{\alpha_2}$ ) não é resolvido para baixo ângulo, isto é, a diferença dos ângulos  $\theta$  médios ( $\Delta\theta$ ) para  $K_{\alpha_1}$  e  $K_{\alpha_2}$  é bastante inferior à largura das linhas. Ou seja,  $\Delta\theta \propto \Delta\lambda$ , onde  $\Delta\lambda$  é da ordem de  $0.004 \text{ \AA}$ .

Só seria necessário usar o monocromador se  $\Delta\theta$  fosse maior que a largura de linha.

#### IV.2.1 - Descrição dos Aparelhos

Utilizamos um tubo de raios X com alvo de cobre, foco grosso e linear com potência máxima de 2KW, alimentado por um gerador Philips, PW-1140, de alta estabilidade, operando sempre dentro do intervalo de 40-45KV e 20-30mA (0,8 - 1,35KW).

As exposições variaram entre 10 e 20 horas.

Usamos um goniômetro de baixo ângulo (câmara de baixo ângulo) da Rigaku Denki Co., e a colimação do feixe foi feita por um sistema de três fendas lineares, conforme o esquema da figura IV.2.

Os diagramas de difração foram obtidos por método fotográfico. O filme usado foi o Kodak - AA - Industrex, de grão fino.

O goniômetro da câmara é mantido na posição  $0^{\circ}$ .

O ângulo entre o eixo da câmara e o plano do alvo é de  $6^{\circ}$  (ângulo de "take-off"). Sendo assim, a largura efetiva do foco ( $W$ ) é determinada pelo ângulo de "take-off" ( $\alpha$ ) e

a largura real da sombra do filamento (B). No nosso caso,  $\alpha = 6^\circ$  e para o tubo de foco grosso  $B = 2\text{mm}$ . Sabendo-se que  $W = B \text{ sen } \alpha$ , temos que a largura efetiva do foco (W) será de  $0,2\text{mm}$ .

A figura IV.2 mostra a disposição das fendas.

A primeira fenda colimadora, que é fixa, por onde passa o feixe proveniente do foco linear, é colocada bem próxima à janela do tubo de raios X e sua função é formar o feixe de raios X primário (figura IV.2 (b)). As dimensões desta fenda são:  $10\text{mm}$  de altura e  $0,2\text{mm}$  de largura.

A  $100\text{mm}$  desta, encontra-se a segunda fenda colimadora, com dimensões  $10,0 \times 0,1\text{mm}$ , fixa também, que tem largura máxima "a" de ampliação na superfície do filme, como mostra a figura IV.2 (b), ou seja, ela limita a largura do feixe. Junto a ela coloca-se uma fenda limitadora de altura do feixe, de  $2\text{mm}$ , que limita também a ampliação da altura do feixe no filme.

A  $40\text{mm}$  da segunda fenda encontra-se a terceira fenda limitadora, ajustável, que serve para diminuir o espalhamento parasítico. Ela é usada em aproximadamente  $0,1\text{mm}$  de largura. Com esta fenda o limite de espalhamento parasítico nas vizinhanças dos raios primários pode ser reduzido à largura "b", como mostra a figura IV.2 (b).

A amostra é colocada entre a terceira fenda e o filme, sendo que o último encontra-se a  $50\text{mm}$  aproximadamente da amostra. A distância da terceira fenda à amostra é de cerca de  $28\text{mm}$ . Durante a exposição, a amostra é mantida num compartimento com umidade controlada. Esta umidade é produzida por um fluxo de nitrogênio gasoso que passa através de uma solução salina adequada, colocada num frasco lavador.

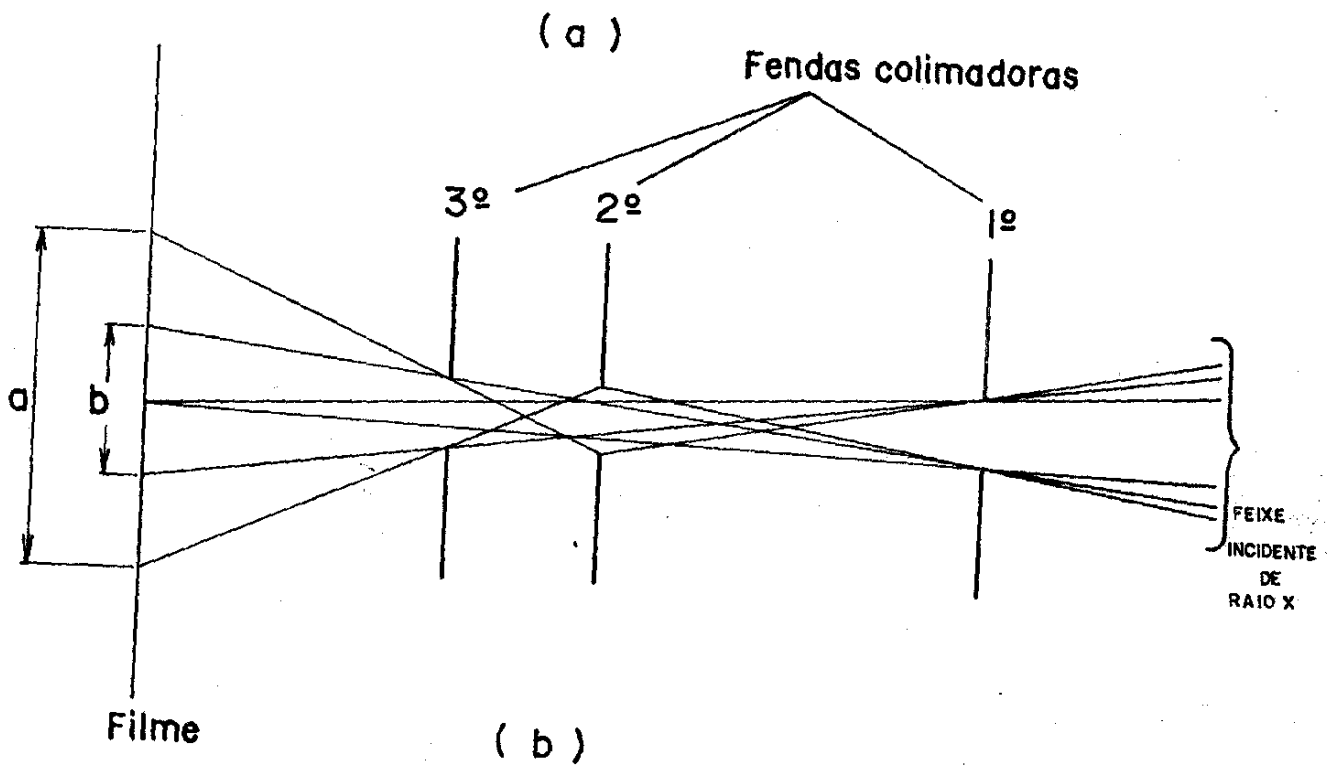
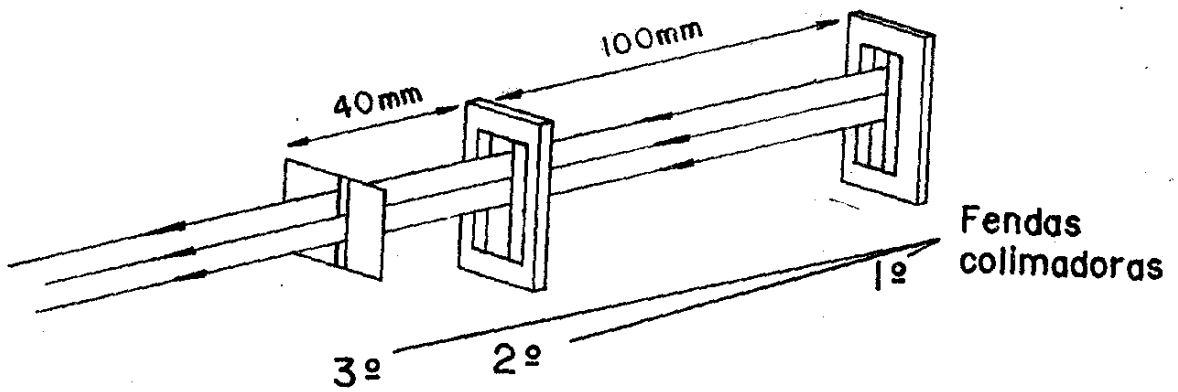


Figura IV.2 - (a) O Sistema de Fendas  
 (b) A Colimação feita pelo Sistema

Para alinhar a câmara usamos um contador de cintilação acoplado a um sistema eletrônico adequado, com registrador.

Uma quarta fenda de 10mm x 0,02mm é colocada junto ao contador (fenda receptora).

Para a leitura dos filmes obtidos nas exposições, utilizamos o microdensitômetro Nalumi, do Departamento de Altas Energias e Raios Cômicos, UNICAMP, para medir as intensidades relativas das linhas de difração. Este microdensitômetro tem varredura automática e foi utilizado com a fenda de iluminação fixada em 240 x 360 $\mu$ m e a fenda da fotomultiplicadora em 180 x 300 $\mu$ m.

#### IV.2.2 - Calibração do Aparelho e Obtenção dos Diagramas

Primeiramente, a amostra e a segunda e terceira fendas são removidas e a fenda receptora do contador é substituída por uma tela fluorescente. A primeira fenda nesta fase, tem dimensões de 10mm x 0,05mm. O feixe é centrado regulando-se o pé frontal da câmara de baixo ângulo.

Troca-se a primeira fenda por outra de dimensões 10,0x x 0,2mm e coloca-se a segunda fenda. A tela fluorescente é então substituída pela fenda receptora. Procura-se a intensidade máxima através deslocamento da segunda fenda, perpendicular a direção do feixe e com o auxílio do goniômetro verifica-se a simetria do pico (centralização).

Com a terceira fenda ajustável, novamente procura-se o máximo de intensidade. A seguir verifica-se novamente a simetria do pico.

Para alinhar a amostra, usa-se o eixo A, ao qual ela está presa, o qual permite girá-la em torno de si mesma e deslocá-la verticalmente. Este eixo, por sua vez pode deslocar horizontalmente juntamente com o porta-amostra, na direção B-C.

A seguir, traz-se a amostra até a posição desejada pelo mecanismo BC de deslocamento perpendicular à direção do feixe, como na figura IV.3, até que ela absorva cerca de 20% da intensidade do feixe.

Coloca-se a seguir o cassete que contém o filme na extremidade de um caminho de vácuo e inicia-se a exposição. A duração de cada exposição varia conforme o tipo de amostra.

A figura IV.3 esquematiza a obtenção dos diagramas.

O feixe de raios X sai colimado do sistema de fendas e passa rasante à amostra.

O feixe difratado passa por um caminho de vácuo curto (cerca de 40mm) indo impressionar o filme, que está colocado perpendicularmente à direção de incidência do feixe difratado.

#### IV.2.3 - O Diagrama de Difração de Raios X a Baixo Ângulo

Num diagrama de bicamadas de fosfolípídeos observa-se as reflexões lamelares na direção DE da figura IV.3, que denominamos direção meridional. Estas são as reflexões de Bragg devidas

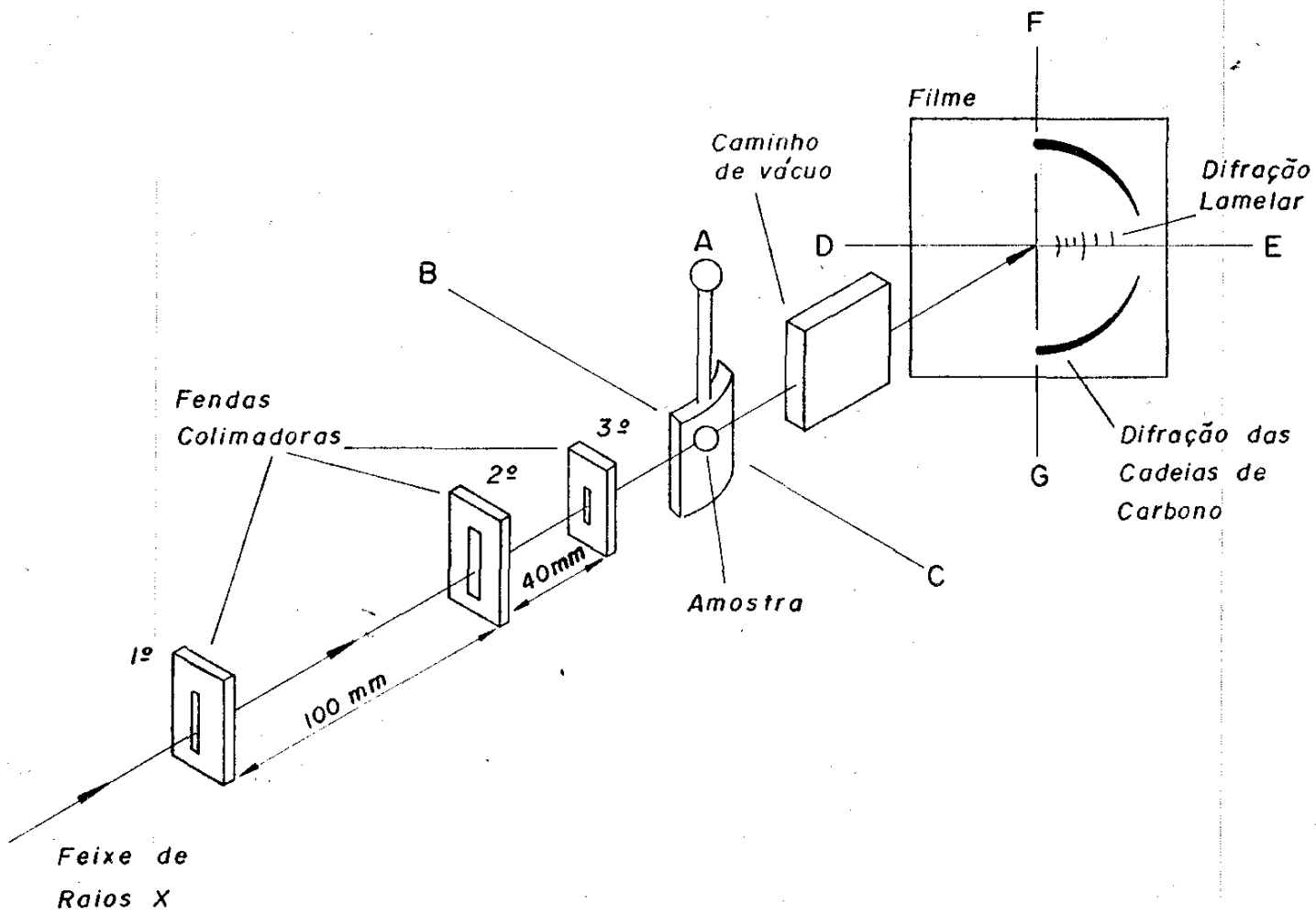


Figura IV.3 - Esquema da Montagem Experimental

ao empilhamento das membranas, onde as bicamadas são consideradas como planos. Observa-se também, um anel de difração com intensidade mais marcada, na direção equatorial (FG), devido ao arranjo das cadeias de carbono (ver por exemplo a referência (46)).

As características deste anel nos diagramas, em particular seu grau de nitidez, permite prever a maneira como as cadeias de carbono orientam-se dentro da membrana, dando informação sobre a desordem da região hidrofóbica. Quanto mais difuso é o anel, maior o grau de desorientação da região hidrofóbica.

No nosso caso em virtude de limitações geométricas (longa distância filme - amostra), não registramos este anel, porque para nós a difração lamelar é mais importante. Porém, sabemos que, alterando a geometria utilizada podemos registrá-lo, conforme experiências anteriores realizadas em nosso laboratório.

Para cada exposição utilizamos quatro filmes sobrepostos. Considerando que as exposições são demoradas, muitas vezes o primeiro filme fica bastante saturado, e neste caso trabalhamos com os filmes subsequentes (2º ou 3º, se for o caso), que não ficam saturados, efetuando então as normalizações necessárias.

Os filmes foram revelados a 20°C, durante 5 minutos.

A tabela V.1 apresenta as condições experimentais principais, nas quais cada um dos diagramas aqui apresentados (ver Capítulo V), foram obtidos.

As exposições foram realizadas à temperatura ambiente.



#### IV.2.4 - Leitura dos Diagramas de Difração

A leitura dos diagramas, como dito anteriormente, foi feita por um microdensitômetro e as intensidades obtidas no traçado microdensitométrico são dadas em unidades arbitrárias.

A radiação de fundo é determinada traçando-se uma curva suave em torno das bases dos picos (ver traçados no Capítulo V). A resposta da leitura microdensitométrica é direta, em escala linear e podemos calcular as intensidades relativas dos picos pela área ou altura dos mesmos, descontando-se a parte correspondente à radiação de fundo. A diferença em calculá-las por área ou por altura de pico não é significativa, como podemos verificar efetuando os cálculos.

Os traçados V.1, V.2, V.3 e V.4 que se encontram no capítulo V, correspondem respectivamente aos diagramas das amostras de: DPL puro, DPL com pireno, DPL com 3, 4 - benzopireno e DPL com 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno.

Destes traçados microdensitométricos podemos calcular a distância pico a pico do traçado ( $S_p$ ) e a distância pico a pico no filme ( $S_f$ ), usando as constantes instrumentais próprias da varredura. Com estes dados, podemos determinar  $\theta$  (ângulo de Bragg) e calcular o espaçamento lamelar  $d$ , a partir da lei de Bragg.

A tabela V.2, apresenta os valores obtidos das intensidades, distâncias pico a pico na leitura microdensitométrica e no filme e o espaçamento lamelar para cada uma das amostras.

As intensidades obtidas  $I(n)$  devem ser corrigidas por um fator  $n$  como discutido no capítulo anterior.

## CAPÍTULO V - RESULTADOS E CONCLUSÕES

### V.1 - DADOS OBTIDOS

Os resultados aqui apresentados correspondem a diagramas que foram criteriosamente escolhidos numa série de 88 experimentos, como dissemos anteriormente.

Certas alterações nas condições experimentais, tais como: preparação da amostra, umidade de exposição, tempo de exposição e condições de revelação do filme influenciam fortemente os resultados obtidos nos diagramas.

Sendo assim, para cada tipo de amostra procuramos qual o tempo e a umidade de exposição que nos levassem a diagramas mais nítidos e de maior resolução possível, com o aparato experimental por nós utilizado. A cada revelação procuramos manter sempre o mesmo tempo de revelação (5 min.) e mantivemos as mesmas condições durante a preparação das amostras.

A umidade de exposição para todas as amostras nos diagramas escolhidos foi de 56%.

A distância filme- amostra medida com paquímetro, para o DPL foi de 60,0 mm e para o DPL com hidrocarbonetos aromáticos foi de 52,7 mm.

Após uma escolha prévia dos melhores diagramas, a escolha definitiva foi baseada nos traçados microdensitométricos dos mesmos.

As fotos V.1 e V.2, mostram a montagem experimental uti

lizada.

As fotos V.3, V.4, V.5 e V.6, mostram os filmes escolhidos de cada tipo de amostra. De maneira geral, todos os diagramas apresentam a primeira e quarta ordens bastantes intensas comparadas às demais, o que é comum em diagramas de difração de lecitina. Isto é confirmado pela leitura microndensitométrica das intensidades, cujos valores obtidos são apresentados na tabela V.1.

As fotos V.3 correspondem ao primeiro e segundo filmes de DPL puro. No primeiro filme, nota-se a primeira ordem totalmente saturada, o que nos levou a utilizar o segundo filme para extrapolar a intensidade desta reflexão. A foto apresenta as seis primeiras ordens bastante nítidas, enquanto que, a oitava ordem é quase imperceptível, por ser bastante fraca. Neste diagrama não aparecem a quinta e sétima ordens, como consequência do fator de estrutura ser nulo para estas reflexões.

Na foto V.4, vemos o diagrama da amostra de DPL com pireno, o qual apresenta somente seis ordens de difração, apesar de esforços terem sido feitos, no sentido de obter a oitava ordem, aumentando-se o tempo de exposição. Neste diagrama não aparece a quinta ordem.

As fotos V.5 correspondem ao primeiro e segundo filmes obtidos para amostras de DPL com 3, 4 - benzopireno. O primeiro filme apresenta-se bastante saturado, o que nos levou a escolher o segundo filme para a leitura das intensidades das reflexões. As oito ordens aparecem bastante nítidas. A quinta e sétima ordens não aparecem.

A foto V.6 apresenta o diagrama da amostra de DPL com 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno, onde a oitava ordem não aparece muito nítida. Neste diagrama aparece a quinta ordem, mas a sétima ordem não aparece.

A seguir podemos ver os traçados microdensitométricos dos diagramas escolhidos. Baseamo-nos nestes traçados para obter o valor das intensidades por altura de pico em unidades arbitrárias  $I(n)$ , a distância pico a pico das reflexões no traçado ( $S_p$ ), a distância pico a pico das reflexões no filme ( $S_f$ ) para a qual utilizamos os fatores de conversão apropriados e a distância lamelar ( $d$ ). Os valores obtidos encontram-se na tabela V.2.

Os traçados 1 correspondem ao primeiro (25.1) e o segundo (25.2) filmes de DPL puro.

O traçado 2 corresponde ao primeiro filme (52.1) de DPL com pireno.

O traçado 3 corresponde ao segundo filme (50.2) da amostra de DPL com 3, 4 - benzopireno.

Os traçados 4 correspondem a leituras diferentes do primeiro filme da amostra de DPL com 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno. A escala utilizada na leitura 1, nos permitiu ler a intensidade da primeira reflexão, mas não foi possível ler a da segunda reflexão. Assim na leitura 2, utilizamos uma escala maior, efetuando a varredura da segunda ordem em diante. Calculando o fator de escala da leitura 2 para a leitura 1, baseado nos valores das intensidades da quarta ordem em diante, é possível extrapolar os valores de todas as intensidades da leitura 1.

A tabela V.1 apresenta todas as condições experimentais principais na obtenção dos diagramas de cada uma das amostras.

A tabela V.3 apresenta os espaçamentos lamelares calculados e as fases escolhidas para cada uma das amostras.

Por fim vemos os mapas de distribuição de densidade eletrônica calculados com as fases escolhidas para cada amostra. O primeiro mapa é o obtido para o DPL puro considerando 8 ordens de reflexão. Os mapas 2, 3, 4, correspondem aos mapas de DPL com pirreno, DPL com 3, 4 - benzopireno e DPL com 1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno, respectivamente, superpostos ao mapa de DPL puro.

FOTOS COM DISPOSITIVOS DE DIFRAÇÃO DE  
RAIOS X EM BAIXO ÂNGULO  
Fotos da Montagem Experimental Utilizada



Foto V.1  
Vista lateral  
da montagem  
experimental



Foto V.2  
Vista de con-  
junto da mon-  
tagem experi-  
mental

FOTOS DOS DIAGRAMAS DE DIFRAÇÃO DE  
RAIOS X OBTIDOS A BAIXO ÂNGULO

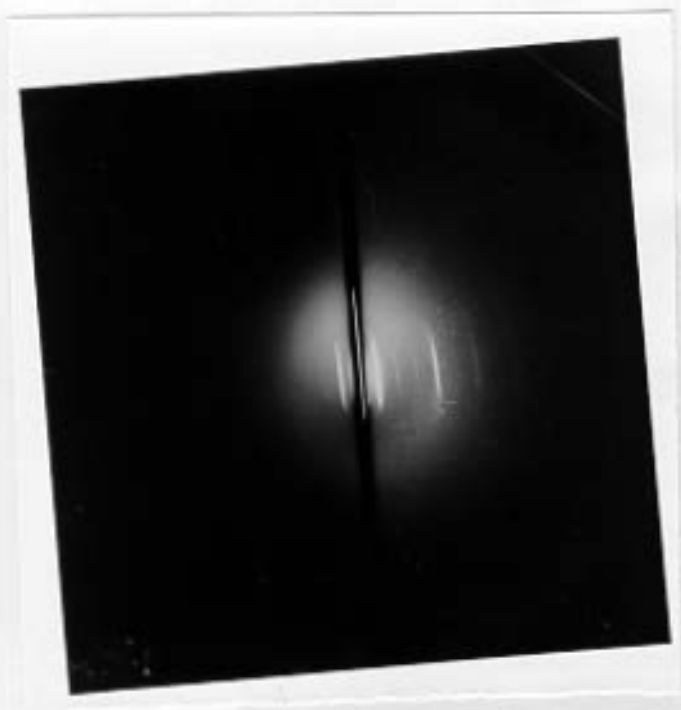
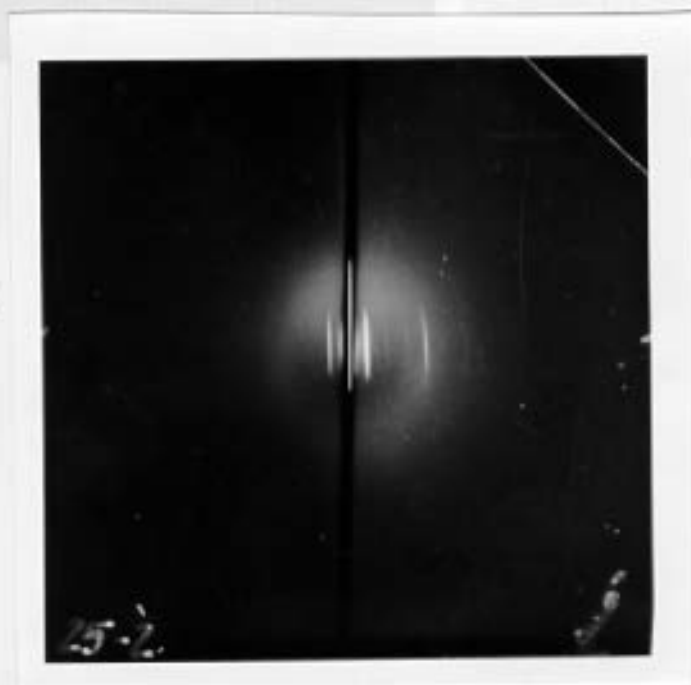


Foto V.3.a-  
1º Filme exposto  
da Amostra de DPL  
Puro

Foto V.3.b-  
2º Filme exposto  
da Amostra de DPL  
Puro



Fotos V.3 - Diagramas de DPL Puro

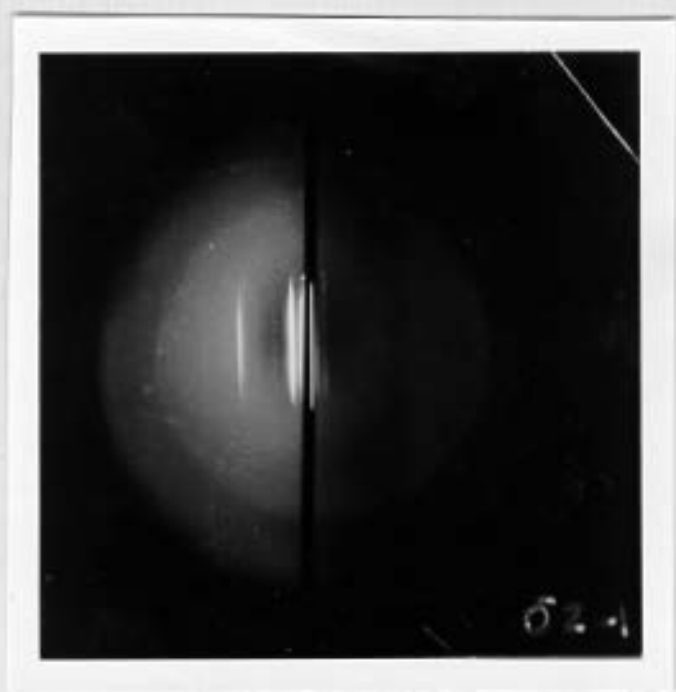


Foto V.4 - Diagrama de DPL com pireno



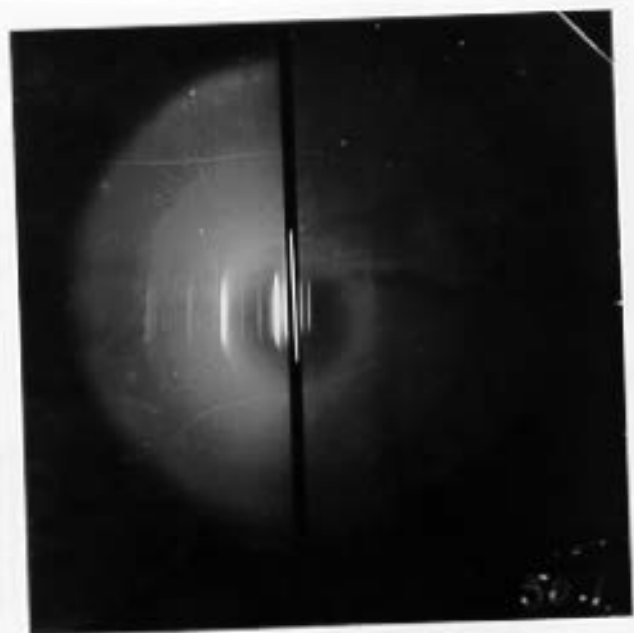


Foto V.5.a-  
1ª Filme Exposto da  
Amostra de DPL com  
3, 4 - benzopireno

Foto V.5.b-  
2ª Filme Exposto da  
Amostra de DPL com  
3, 4 - benzopireno

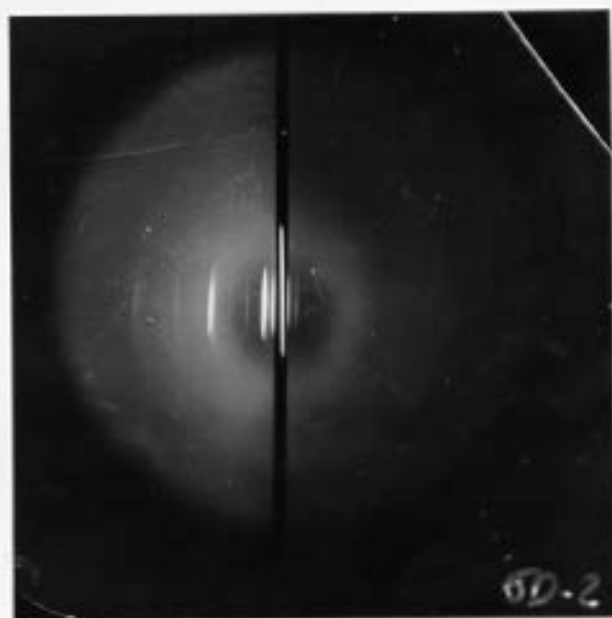


Foto V.5 - Diagramas de DPL com 3, 4 benzopireno

INTENSIDADE LUMINOSA (W/m²)

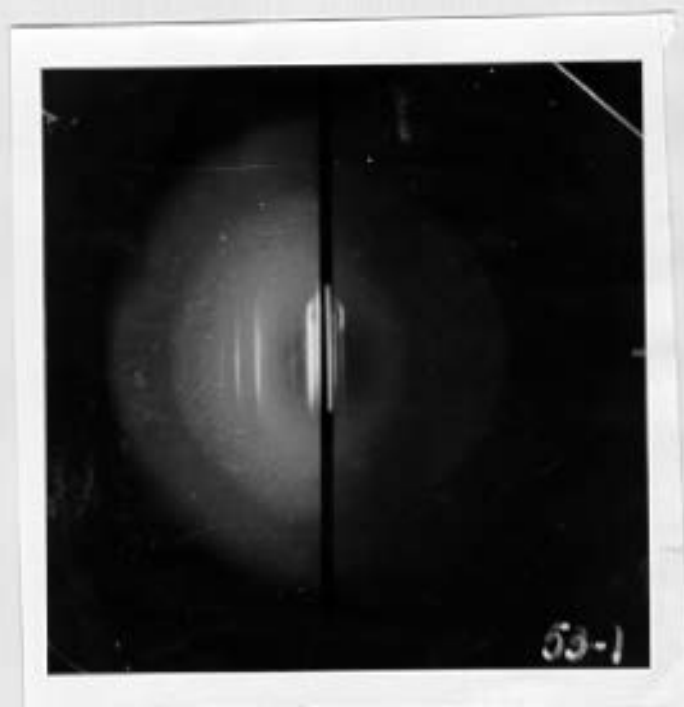
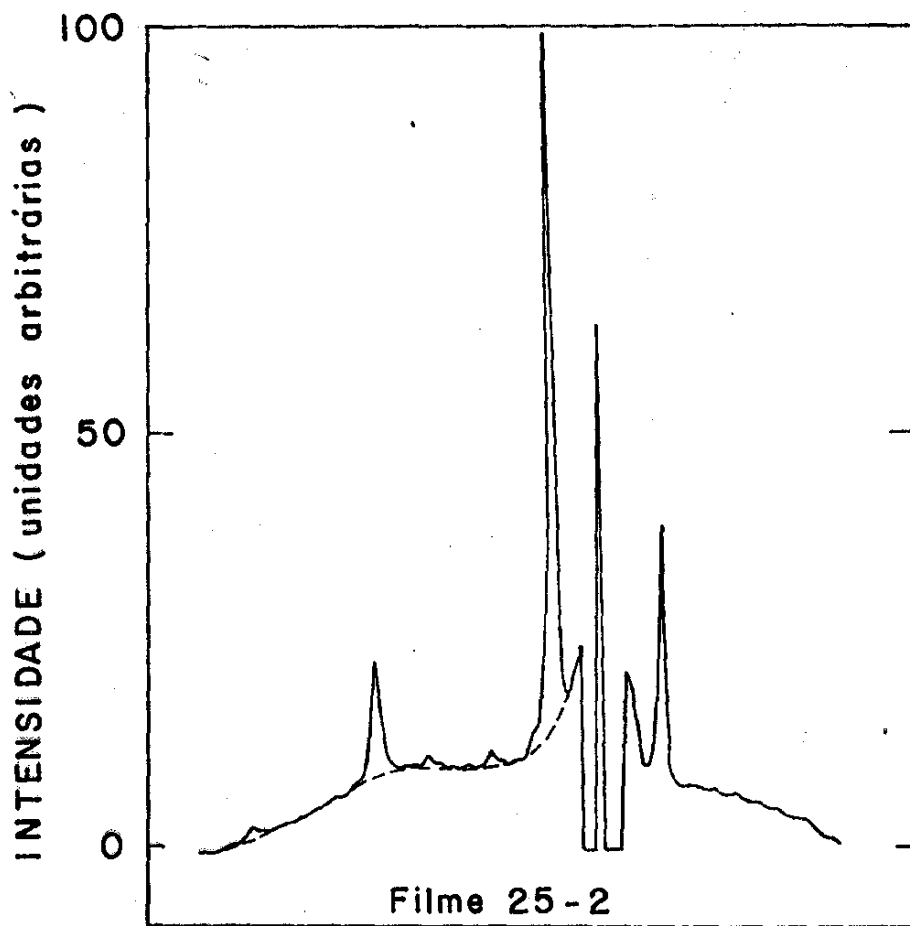
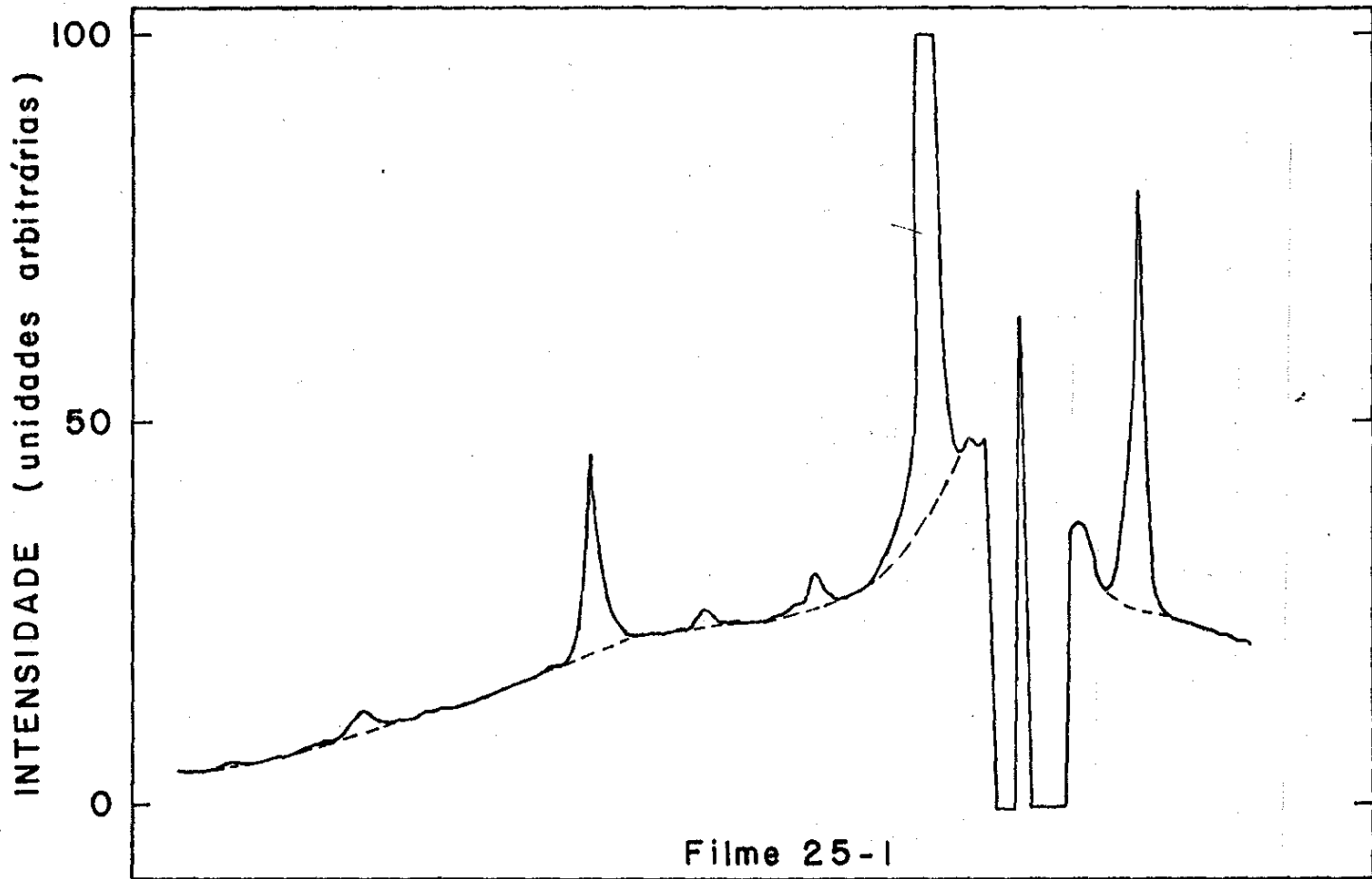
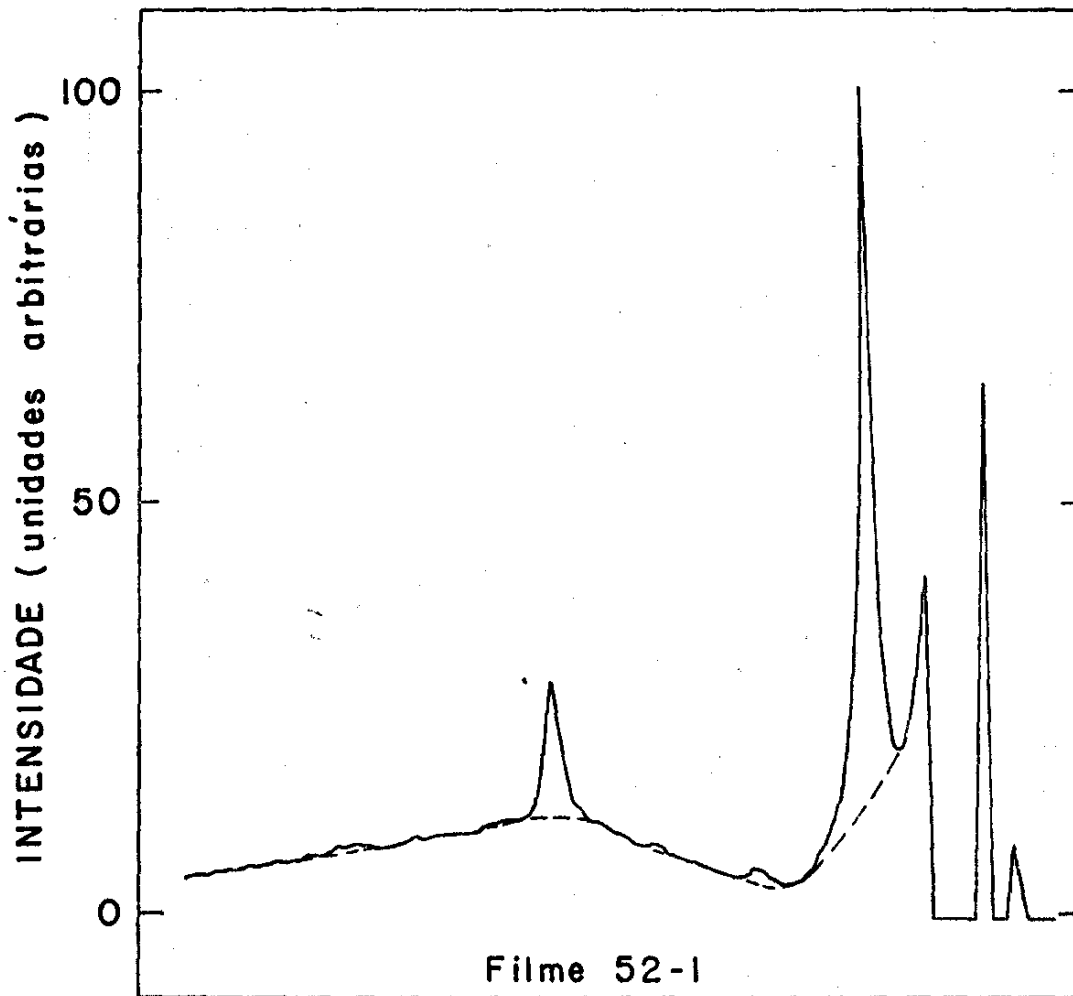


Foto V.6 - Diagrama de DPL com  
1, 2, 5, 6 - dibenzantraceno

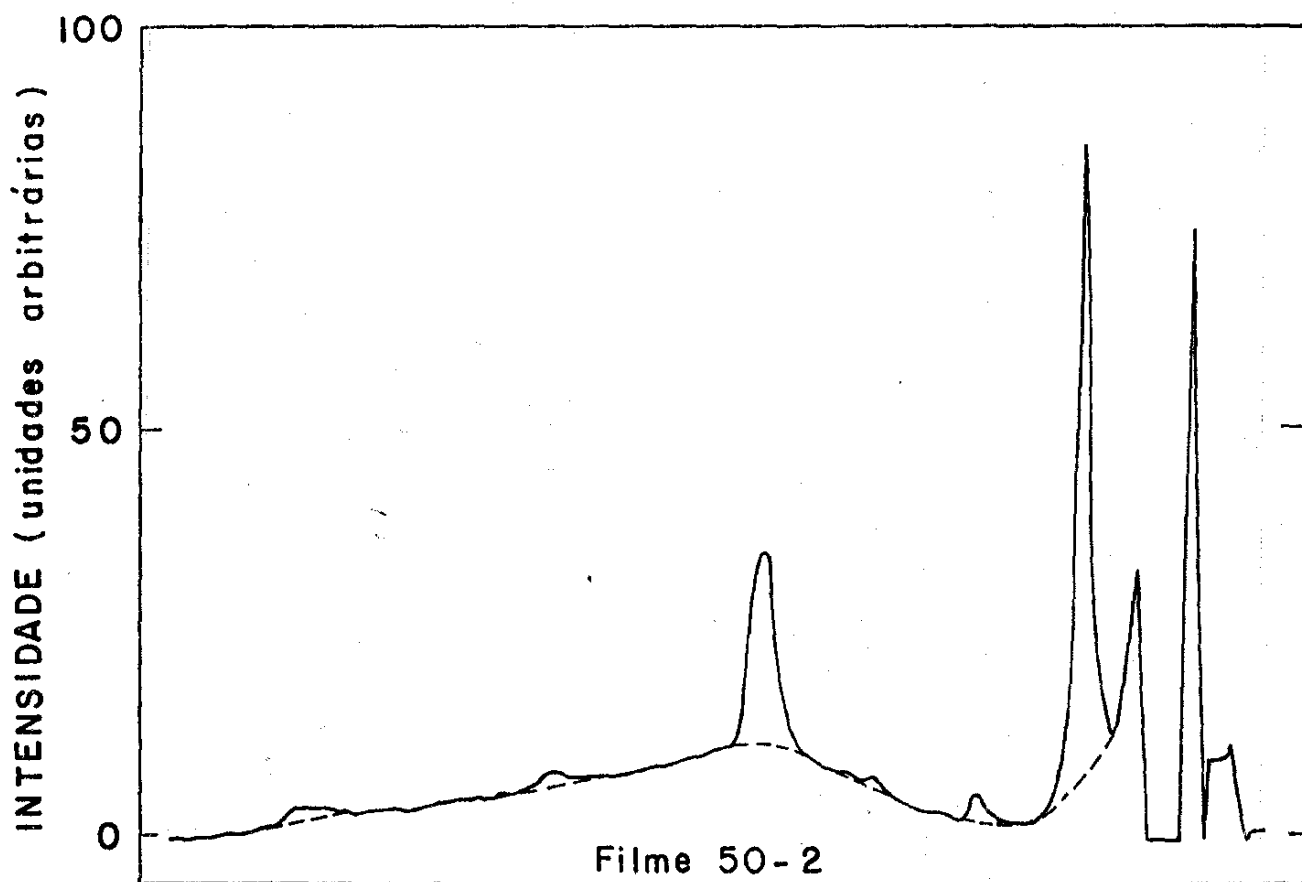
Traçado microdensitométrico I  
Amostra DPL Puro



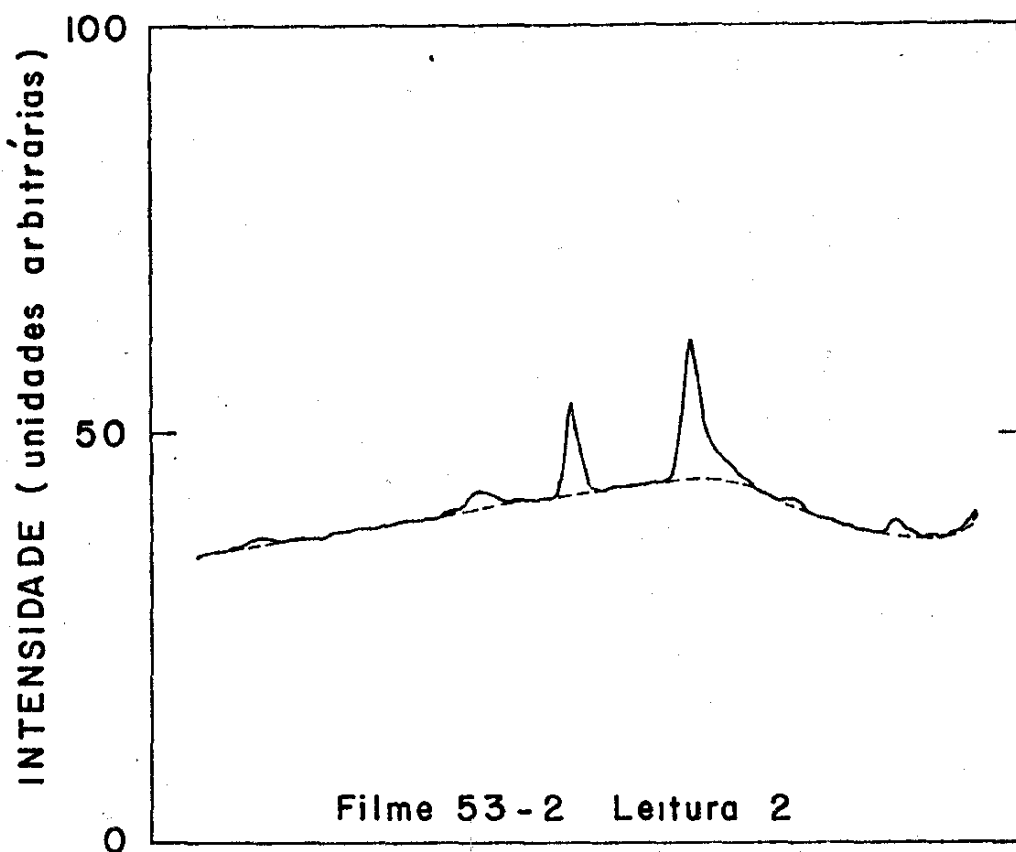
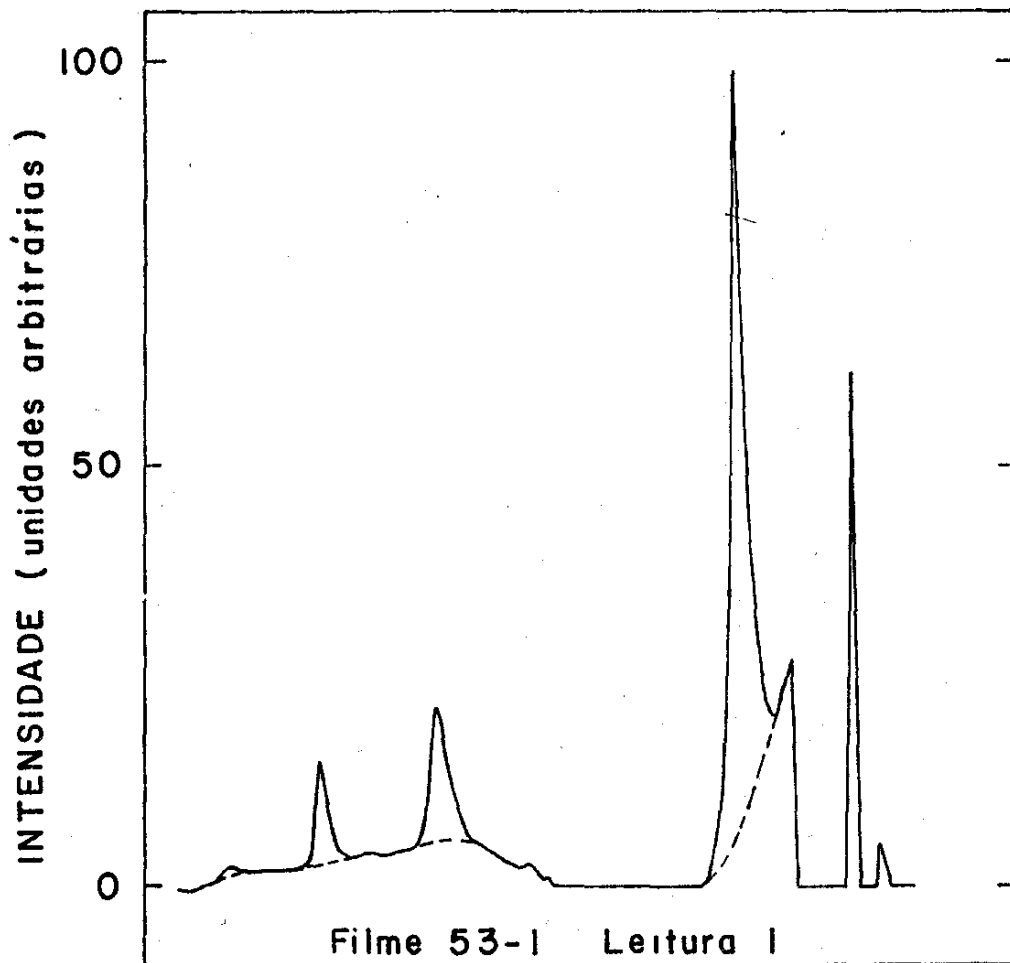
Traçado microdensitométrico 2  
Amostra DPL com Pireno



Traçado microdensitométrico 3  
Amostra DPL com 3,4 Benzopireno



Tracado microdensitométrico 4  
Amostra DPL com 1,2,5,6 Dibenzantraceno



**TABELA V.1 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PRINCIPAIS NA OBTENÇÃO DOS DIAGRAMAS**

Nº do Filme	Amostra	Distancia Filme - Amostra (mm)	Unidade de preparação (%)	Unidade de exposição (%)	Tempo de exposição (h)	Absorção da Amostra (%)	Tensão (KV)	Corrente (mA)
25	DPL - Puro	60,0	56	56	8	20	45	30
52	DPL - Pireno	52,7	75	56	9	20	40	20
50	DPL - 3,4 BZP	52,7	75	56	10:30	20	40	20
53	DPL - 1,2,5,6 DBZA	52,7	75	56	9:30	20	40	20

TABELA V.2 - VALORES DE INTENSIDADES EM UNIDADES ARBITRARIAS  
E ESPAÇAMENTO LAMELAR (d)

Nº do Filme	Amostra	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	S (mm)	X <sub>f</sub> S <sub>f</sub> (mm)	d(Å)
25	DPL - Puro	167,6	4,5	2,5	26,0	0,0	3,0	0,0	1,5	36,6	1,23	60,6
52	DPL - Pireno	93,0	2,0	1,0	16,5	0,0	1,0	0,0	0,0	32,6	1,37	59,4
50,2	DPL - 3,4 BZP	77,0	3,0	1,5	23,5	0,0	2,0	0,0	1,0	33,0	1,38	59,1
53	DPL - 1,2,5,6 DBZA	92,5	2,0	1,0	16,0	12,0	2,0	0,0	1,0	33,2	1,38	58,8

onde :

3,4 - BZP = 3,4 - Benzopireno

1,2,5,6 - DBZA ≡ 1,2,5,6 - Dibenzantraceno.

I<sub>n</sub> = Intensidade da reflexão de ordem n

n = 1, 2, ..... 8

S<sub>p</sub> = Distância entre picos de intensidade no traçado microdensitométrico

S<sub>f</sub> = Distância entre picos de intensidade no filme

d = Espaçamento Lamelar.



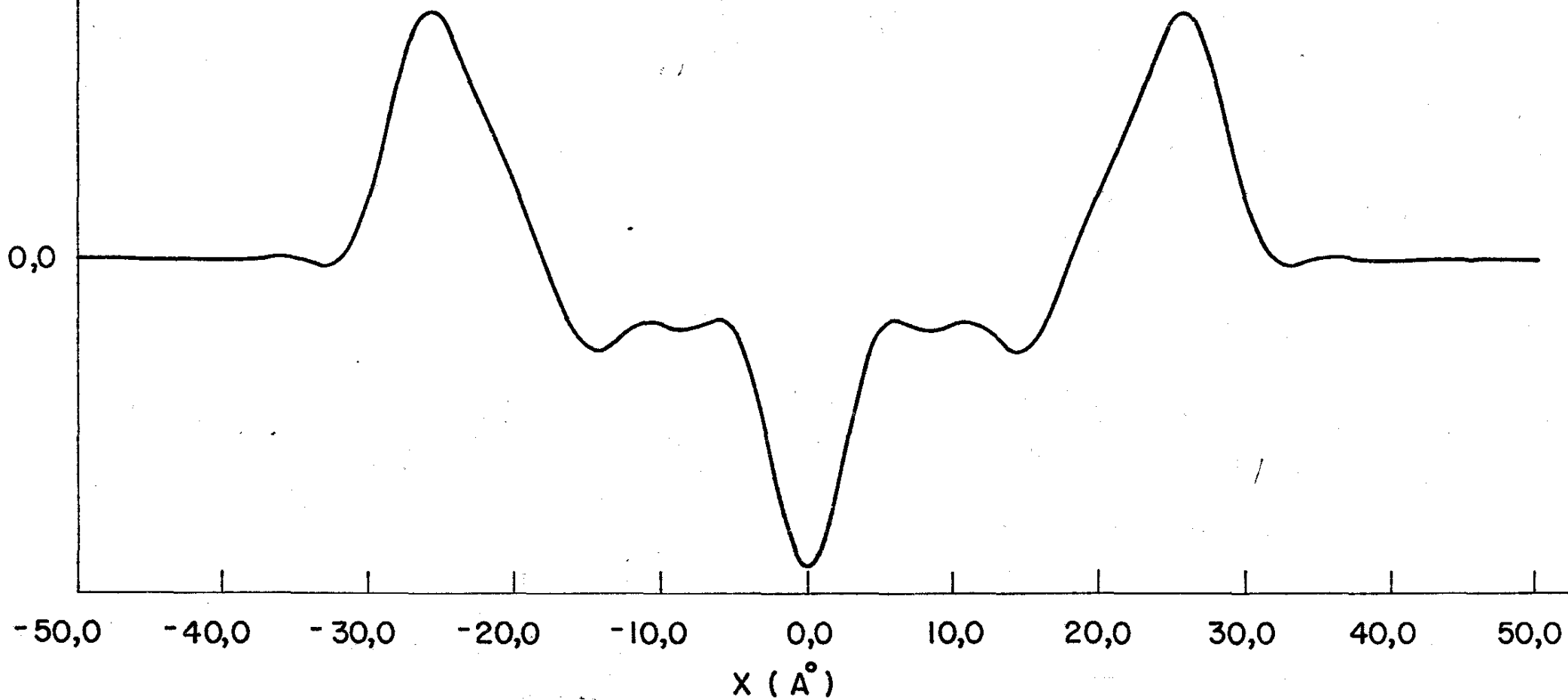
TABELA V.3 - ESPAÇAMENTO LAMELAR E FASES PROVÁVEIS

Nº do Filme	Amostra	d (Å)	Fases
25	DPL - Puro	60,6	(-1, 1, -1, -1, 0, -1, 0, -1)
52	DPL - Pireno	59,4	(-1, 1, -1, -1, 0, -1)
50,2	DPL - 3,4 BZP	59,1	(-1, 1, -1, -1, 0, -1, 0, -1)
53	DPL - 1,2,5,6 DBZA	58,8	(-1, 1, -1, -1, 1, -1, 0, -1)

DENSIDADE ELETRÔNICA

Mapa de Distribuição de Densidade Eletrônica I

DPL puro 8 ordens

 $(-1, 1, -1, -1, 0, -1, 0, -1)$  $D_{pp} = 55,0 \text{ \AA}$  $D_{pp}$  = distância entre os picos de alta densidade eletrônica

Mapa De Distribuição de Densidade Eletrônica 2

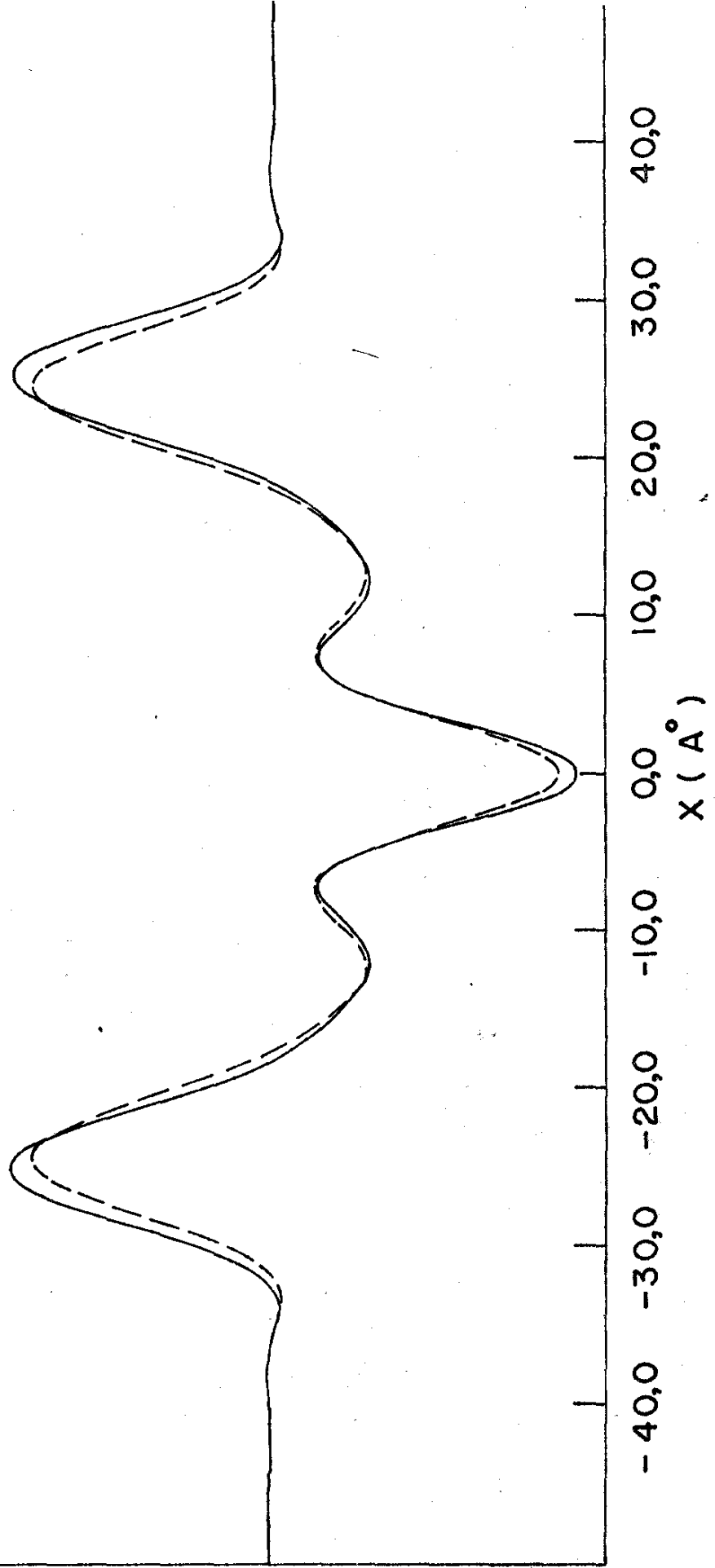
DPL + Pireno ( 6 ordens )      Dpp - DPL = 50,1 Å ( 50,1 )

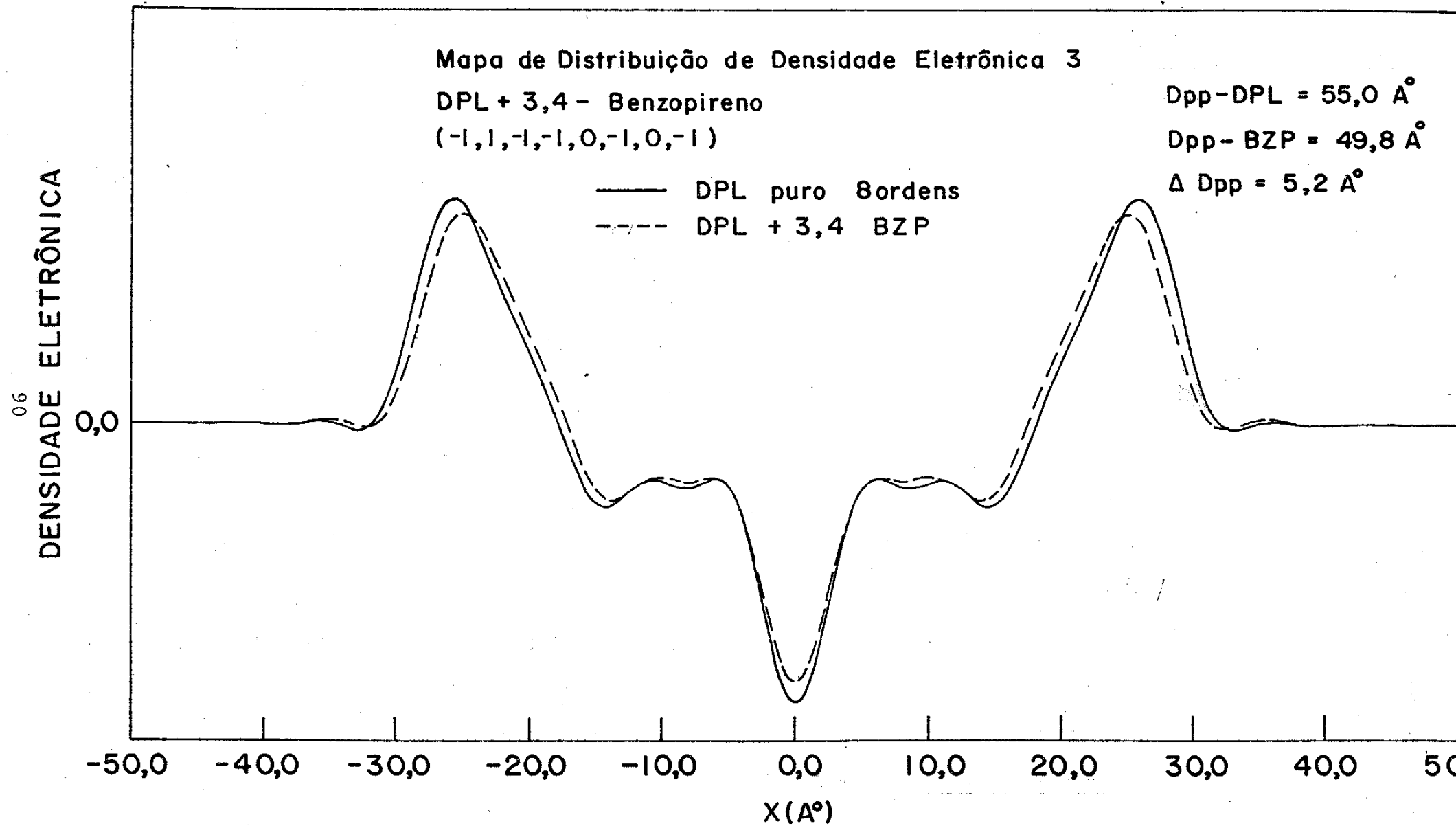
( -1, +1, -1, -1, 0, -1 )      Dpp - Pir = 48,8 Å

Δ Dpp = 1,3 Å

— DPL puro 6 ordens

- - - DPL + Pireno





Mapa de Distribuição de Densidade Eletrônica 4

DPL + 1,2,5,6 - Dibenzantraceno 8 ordens

(-1,1,-1,-1,1,-1,0,-1)

Dpp - DPL = 55,0 Å

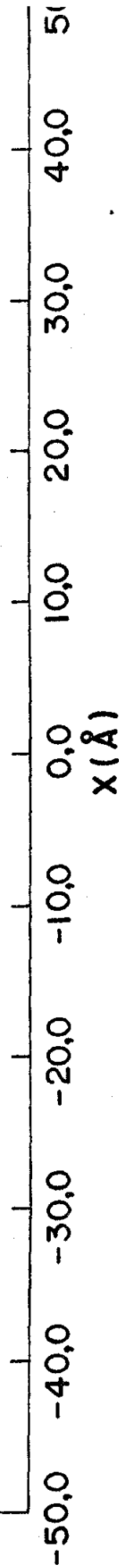
Dpp - DBZA = 49,0 Å

$\Delta Dpp = 6 \text{ Å}$

DENSIDADE ELETRÔNICA

0,0

— DPL Puro - 8ordens  
- - - DPL + 1,2,5,6 DBZA



## V.2 - DISCUSSÕES E RESULTADOS

No mapa de distribuição de densidade eletrônica do DPL puro aparece uma queda abrupta no centro de simetria do perfil, onde devem estar situados os grupos metila terminais ( $\text{CH}_3$ ) os quais estão confinados numa região estreita no centro da bicamada de fosfolipídeos. Aos picos de alta densidade eletrônica corresponde a região das cabeças polares dos fosfolipídeos. Nota-se que tais picos apresentam certa assimetria, a qual mesmo que esperada devido à estrutura da cabeça polar, não pode ser interpretada detalhadamente. No nosso caso, devido à baixa resolução dos mapas de densidade eletrônica obtidos.

Segundo Lesslauer e colaboradores (22), esta assimetria dos picos de alta densidade eletrônica torna-se mais pronunciada quanto menor a umidade relativa a que a membrana está exposta. Estes autores sugerem a existência de duas regiões no pico de alta densidade eletrônica. Na região externa do pico (ao lado da interface lipídio-água) provavelmente encontram-se os grupos fosfato e trimetilamônia e na região interna (dentro da bicamada) encontram-se os grupos de ésteres dos ácidos graxos.

As regiões entre os picos de alta densidade eletrônica e a queda abrupta ( $\text{CH}_3$ ) no centro de simetria do perfil estão associadas às cadeias de carbono ( $-\text{CH}_2-$ ).

Segundo Lesslauer e colaboradores (22), a região das cadeias de carbono no mapa de densidade eletrônica permanece inalterada quando a umidade relativa a que a membrana está exposta varia de 15% a 95%, mas os picos de alta densidade eletrônica tornam-se menos definidos, com o aumento da umidade.

O mapa de distribuição de densidade eletrônica, por

nós obtido, para a amostra de DPL puro concorda com os resultados apresentados por outros autores (22).

Os perfis de densidade eletrônica do DPL puro foram calculados com 8 ordens e 6 ordens de difração. Este último foi calculado para que pudéssemos comparar o perfil de DPL puro com o perfil de DPL com pireno, já que o diagrama obtido para a amostra contendo pireno apresenta apenas 6 reflexões.

A resolução dos mapas de densidade eletrônica depende do número de reflexões ( $n$ ) obtidas no diagrama e é definida como o valor do espaçamento  $d$ , dividido pelo número de reflexões utilizadas no cálculo do perfil (ver por exemplo a referência (23)).

A seguir nos referimos às diferenças que surgem nos mapas de densidade eletrônica de cada amostra em relação ao mapa de dipalmitil lecitina pura.

Os cálculos da espessura lamelar ( $d$ ) a partir da distância entre os máximos de intensidade obtidos dos filmes indicam um estreitamento da membrana quando os hidrocarbonetos aromáticos são incorporados. Este estreitamento, embora pequeno, foi confirmado em todas as experiências realizadas. Isto pode ser interpretado como um aumento da desordem na região hidrofóbica, o que levaria a uma diminuição da espessura da bicamada, ou também pode ser interpretado como uma mudança na inclinação média das cadeias acílicas em relação à normal ao plano da bicamada, já que este estreitamento é pequeno comparado a espessura da mesma.

Chamando  $D_{pp}$  à distância entre os pontos de máxima densidade eletrônica no mapa, os quais estão localizados nos picos

referentes às cabeças polares, observa-se que estes picos também se aproximam quando os hidrocarbonetos aromáticos são incorporados à membrana. Os valores de Dpp calculados, encontram-se anotados nos mapas de densidade eletrônica das amostras. Contudo, devido à baixa resolução dos mapas, não se considera significativo o valor dos deslocamentos dos máximos obtidos, já que estes dependem do número de ordens considerado na série de Fourier.

O estreitamento poderia ser correlacionado com o aumento do tamanho da molécula de hidrocarboneto que é incorporada à bicamada, na seguinte ordem:

pireno < 3,4 - benzopireno < 1,2,5,6 - dibenzantraceno.

Quanto à relação entre esta ordem apresentada e a atividade carcinogênica destes hidrocarbonetos, devemos ressaltar que para o pireno não tem sido verificada atividade carcinogênica, enquanto que para os outros dois que a possuem é ainda discutível a ordem em que devem ser colocados.

#### DPL - Pireno (6 ordens de difração)

O mapa de densidade eletrônica da amostra de DPL com pireno comparado com o mapa de DPL puro, calculado com o mesmo número de ordens, mostra que há um estreitamento na distância entre os pontos de densidade eletrônica mais alta, localizados nos picos referentes aos grupos de cabeça polar.



Dpp DPL (6 ordens): 50,1 Å .

Dpp DPL com pireno: 48,8 Å .

Resolução : 10 Å .

Há uma pequena alteração na região dos grupos metila terminais devido ao aumento da desordem na região hidrofóbica e talvez também devido à localização da molécula introduzida.

Superpondo-se os picos de alta densidade eletrônica do mapa de DPL puro com os picos do mapa de DPL com pireno, nota-se uma pequena alteração na região dos ésteres e início das cadeias de carbono.

#### DPL - 3,4 - Benzopireno (8 ordens de difração)

O mapa obtido para esta amostra comparado ao mapa de DPL puro, com 8 ordens de difração, acusa um estreitamento da distância entre os pontos de densidade eletrônica mais alta, como no caso de DPL com pireno.

Dpp DPL (8 ordens): 55,0 Å .

Dpp DPL com 3,4-benzopireno: 49,8 Å .

Resolução: 7,5 Å .

Há uma leve alteração na região dos grupo metila terminais (CH<sub>3</sub>), devido à desordem provocada pela inclusão do hidrocarboneto.

DPL - 1,2,5,6 - Dibenzantraceno (8 ordens de difração)

Comparando o mapa de densidade eletrônica desta amostra com o de DPL puro, com 8 ordens de difração, também se nota um estreitamento da distância entre os pontos do perfil de densidade eletrônica mais alta.

Dpp DPL puro (8 ordens): 55,0 Å

Dpp DPL com 1,2,5,6 - dibenzantraceno: 49,0 Å

Resolução: 7,5 Å

Há uma alteração notável do perfil entre os picos de alta densidade eletrônica.

Na realidade era de se esperar que o perfil de densidade eletrônica desta amostra, diferisse bastante do de DPL puro, já que no diagrama de difração obtido para a mesma, aparece a quinta ordem de difração, ordem esta que não aparece nos diagramas das outras amostras, o que evidencia uma mudança no fator de estrutura  $F(005)$  da amostra difratante e portanto no posicionamento dos átomos na unidade repetitiva.

O fato da quinta ordem não ser nula, neste caso, indica uma mudança maior da distribuição atômica na membrana, embora os dados que possuímos no momento não sejam suficientes para determinar com precisão estas alterações. Poderia-se até pensar na possibilidade de haver alguma relação entre essa distribuição atômica e a atividade carcinogênica do hidrocarboneto incorporado, o que também não passaria do campo das hipóteses.

Há uma redução acentuada na profundidade da região do

CH<sub>3</sub>.

Nota-se um alargamento da região dos grupos metila e um aumento na sua densidade eletrônica, comparada à densidade eletrônica desta mesma região no mapa do DPL puro.

A região referente às cadeias de carbono (-CH<sub>2</sub>-) apresenta-se bastante alterada também.

Superpondo-se somente os picos de alta densidade eletrônica dos dois mapas, nota-se leve deformação na região interna destes picos.

Resultados apresentados por Vanderkooi e colaboradores (48) de estudos sobre a localização do pireno na bicamada de fosfolipídeos, através de RMN indicam que o pireno apresenta um tempo de permanência maior no início da cadeia de carbono, conforme figura V.1.

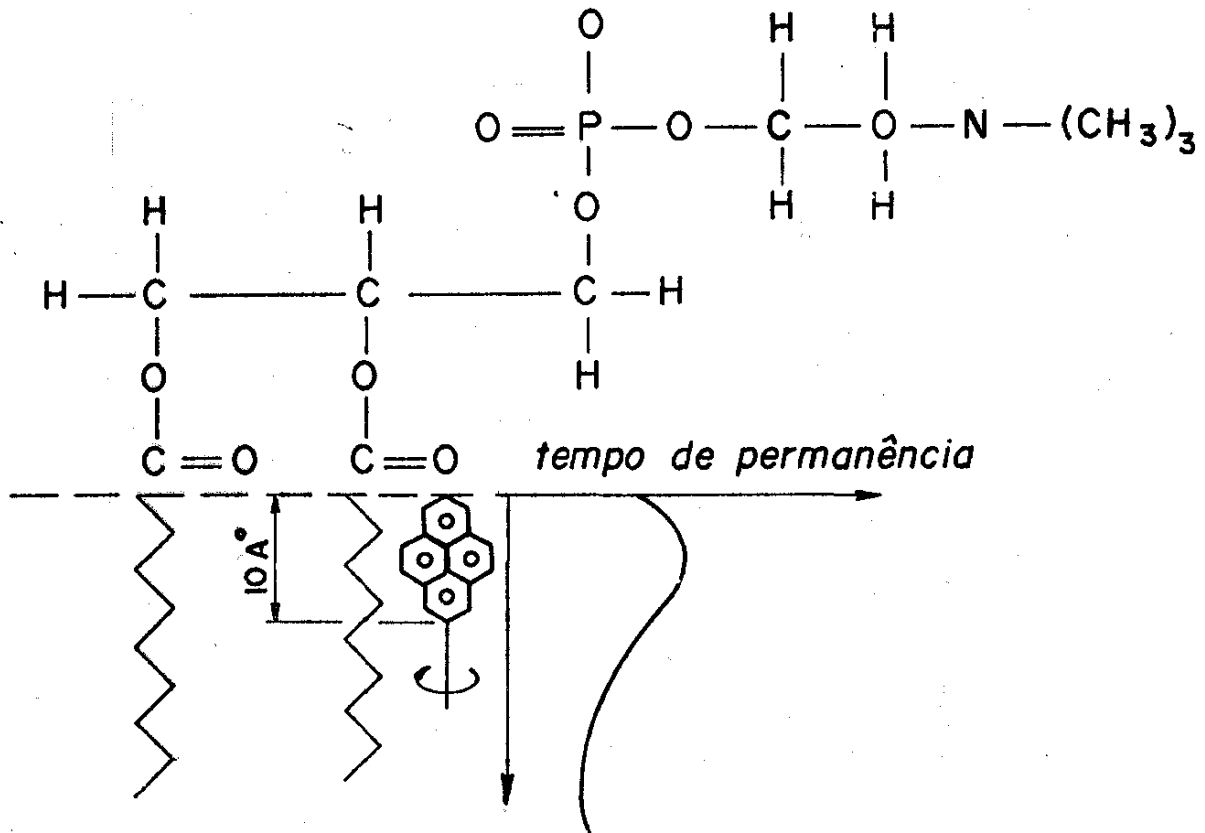


Figura V.1 - Resultados obtidos por Vanderkooi, Podo e colaboradores (48) sobre a localização do pireno em bicamadas de fosfolipídeos.

Medidas recentes e ainda não publicadas feitas por F. Podo, no Instituto de Sanità, Roma, Itália, utilizando técnicas de RMN, foram interpretadas pela autora como indicando que, à princípio, a incorporação de 3,4 - benzopireno em bicamadas de DPL provoca perturbações muito similares às provocadas pelo pireno na região entre as cabeças polares. Estas medidas realizadas acima da temperatura de transição de fase do DPL, seriam uma indicação adicional de que a interação destes dois hidrocarbonetos (pireno e 3,4 - benzopireno) com a bicamada parece não depender do tamanho da molécula (ver discussão anterior sobre influência do tamanho da molécula de hidrocarboneto).

Experiências de difração de raios X, com bicamadas de lipídeos cuja temperatura de transição seja maior que a do DPL, contribuiriam bastante para correlacionarmos melhor os dados aqui apresentados.

Convém mencionarmos também, que em nossas experiências não obtivemos dados que nos permitam verificar exatamente a inclinação das cadeias na bicamada de DPL puro, mas, por cálculos aproximados, vimos que a inclinação das cadeias de nossas amostras de DPL puro, encontra-se no intervalo de variação do ângulo encontrado por Tardieu e colaboradores, que varia de  $17^{\circ}$  a  $33^{\circ}$  para o DPL dependendo da quantidade de água, devendo estar portanto, numa fase do tipo  $L_{\beta}$ .

Sobre a imprecisão nos cálculos do espaçamento lamelar ( $d$ ) a partir das distâncias entre os máximos de difração nos filmes obtidos e da distância filme-amostra, obtivemos um erro de  $\pm 0,2 \text{ \AA}$  para todas as espessuras calculadas.

### V.3 - CONCLUSÕES

1. À princípio, podemos dizer que a introdução dos hidrocarbonetos aromáticos aumenta a desordem dentro das bicamadas, como discutido anteriormente.
2. Com referência às amostras de DPL com pireno, além do estreitamento, observa-se uma leve alteração na região dos ésteres e início das cadeias de carbono.
3. Os resultados obtidos pela superposição dos mapas de densidade eletrônica de DPL com pireno e DPL puro e dos de DPL com 3,4 - benzopireno e DPL puro, indicam que aparentemente estes dois hidrocarbonetos aromáticos comportam-se da mesma maneira, pois neste caso temos apenas informação sobre a desordem provocada por estes compostos na região entre as cabeças polares da bicamada.
4. No caso das amostras de 1,2,5,6 - dibenzantraceno, vemos uma alteração na região que vai do glicerol até o  $\text{CH}_3$ , além de uma leve alteração na região dos ésteres. Podemos dizer então, que o 1,2,5,6 - dibenzantraceno pode estar difundindo-se ao longo da região das cadeias de carbono, incluindo o centro da bicamada, já que o mesmo altera a configuração das cadeias de carbono em toda sua extensão.
5. A presença do 1,2,5,6 - dibenzantraceno nesta região pode ser responsável também, pelo aumento da densidade eletrônica na região dos grupos metila terminais.
6. Concluimos então, que os hidrocarbonetos aromáticos entram na região compreendida entre as cabeças polares da bicamada de fosfolipídeos.

Poderíamos sugerir que quanto mais extendida for a molecula, maior a desordem provocada por ela na estruturam mas para isto necessitaríamos fazer um estudo mais detalhado, com moleculas de hidrocarbonetos de tamanhos e formas diferentes.

#### SUGESTÕES PARA POSSÍVEIS EXTENSÕES DESTE TRABALHO

Em continuação a este trabalho visa-se melhorar as condições experimentais, no intuito de obter mapas de densidade eletrônica mais detalhados com maiores informações sobre as alterações provocadas pela presença dos hidrocarbonetos, para o que torna-se indispensável aumentar o número de ordens de reflexões medidas.

É sabido também, que os hidrocarbonetos aromáticos interagem com proteínas. Sendo assim, outra sugestão seria incluir proteínas na estrutura da bicamada, caso isto seja possível, o que tornaria o sistema modelo mais complexo e verificar as alterações provocadas pelo hidrocarbonetos aromáticos neste tipo de sistema, comparando os mapas de densidade eletrônica obtidos das amostras com inclusão destes compostos com o mapa da bicamada com proteína.

Em relação ao estudo das alterações estruturais provocadas pela inclusão de hidrocarbonetos aromáticos, em bicamadas de fosfolipídeos, seria interessante realizar o mesmo tipo de experiências com bicamadas de fosfolipídeos de cadeias mais curtas, ou seja, fosfolipídeos com temperatura de transição menor.

## REFERÊNCIAS

- (1) A.L. Lehninger - "Biochemistry - The molecular basis of cell structure and function", 2<sup>a</sup> ed., Worth Publishers Inc., New York (1975).
- (2) P.J. Garrahan e A.F. Rega - "Transporte a través de la membrana celular" - Monografía 18 - Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico - OEA, Venezuela (1977).
- (3) M.K. Jain - "The Bimolecular Lipid Membrane: A System", Van Nostrand Reinhold Company, New York (1972).
- (4) J.F. Danielli e H. Davson - J. Cell Comp. Physiol., 5, 494 (1935).
- (5) J.A. Lucy - "Biological Membranes" (ed. D. Chapmann), Academic Press, London (1968), p. 233-285.
- (6) J.D. Robertson - "Molecular Organization and Biological Function" (ed. J.M. Allen), Harper & Row Publishers, New York (1967).
- (7) D. Chapman e D.F.H. Wallach - "Biological Membranes" (ed. D. Chapmann), Academic Press, London (1968), p. 125-199.
- (8) S.J. Singer e G.L. Nicolson, Science, 175, 720 (1972).
- (9) J.N. Israelachvilli, Biochim. Biophys. Acta, 469, 221 (1977).
- (10) E. Sackman, Ber. Bunsenges Phys. Chem., 82, 891 (1978).
- (11) J.F. Nagle, J. Chem. Phys., 58, 252 (1973).
- (12) B.H. Mahan - "Química", Edgar Blücher, São Paulo (1970).
- (13) J.W. Cook, J. Chem. Soc., 1087 (1930).
- (14) E.L. Kennaway, J. Path. Bact., 27, 234 (1924).

- (15) E.L. Kennaway, Brit. Med. J., 2, 1 (1925).
- (16) J.W. Cook, I. Hieger, E.L. Kennaway e W.V. Mayneord, Proc. Royal Soc. B, 111, 455 (1932).
- (17) W.W. Davis, M.E. Krahl e G.H.A. Clowes, J. Am. Chem. Soc., 64, 3 (1942).
- (18) W.W. Davis e T.V. Parke, J. Am. Chem. Soc., 64, 101 (1942).
- (19) R.S. Snart, Biochim. Biophys. Acta , 144, 10 (1967).
- (20) A.A. Belmonte e J. Swarbrick, Biochim. Biophys. Acta, 323, 647 (1973).
- (21) D. Samioto e S. Shreier, Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 530 (1975).
- (22) W. Lesslauer, J.E. Cain e J.K. Blasie, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1499 (1972).
- (23) Y.K. Levine, Prog. Biophys. Mol. Biol., 24, 1 (1972).
- (24) N. Kakudo e N. Kasai - "X-Ray Diffraction by Polymers", Kodansha Ltd., Elsevier Publishing Company, Tokyo (1972).
- (25) A. Guinier - "X-Ray Diffraction in crystals, imperfect crystals and amorphous bodies", W.H. Freeman and Company, San Francisco (1963).
- (26) M.M. Woolfson - "An Introduction to X-Ray Crystallography", Cambridge University Press, London (1970).
- (27) W.H. Zachariasen - "Theory of X-Ray Diffraction in Crystals", Dover Publ. Inc., 1<sup>a</sup> ed., New York (1945).
- (28) Y.K. Levine e M.F. Wilkins, Nature New Biology, 230, 69 (1971).
- (29) G. Zaccai, J.K. Blasie e B.P. Schoenborn, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 376 (1975).
- (30) E.W. Nuffield - "X-Ray Diffraction Methods", J. Wiley & Sons, Inc., New York (1966).



- (31) A.J.C. Wilson - "Elements of X-Ray Crystallography", Addison-Wesley Publishing Company, Reading-Mass. (1970).
- (32) H.P. Klug e L.E. Alexander - "X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials", 2<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons, Inc., New York (1974).
- (33) A. Guinier e G. Fournet - "Small-Angle Scattering of X-Rays", J. Wiley & Sons, Inc., New York (1955).
- (34) P.W. Schmidt, Acta Cryst., 19, 938 (1965).
- (35) E.H. Pape, K. Klott e W. Krentz, Biophys. J., 19, 141 (1977).
- (36) J. Torbet e M.H.F. Wilkins, J. Theor. Biol., 62, 447 (1976).
- (37) W. Lesslauer e J.K. Blasie, Biophys. J., 12, 175 (1972).
- (38) W. Lesslauer, J. Cain e J.K. Blasie, Biochim. Biophys. Acta, 241, 547 (1971).
- (39) C.R. Worthington e R.S. Khare, Biophys. J., 23, 407 (1978).
- (40) M.H.F. Wilkins, A.R. Blaurock e D.M. Engelman, Nature New Biology, 230, 72 (1971).
- (41) V. Luzzati - "Biological Membranes" (ed. D. Chapman), Academic Press, London (1968), p. 71-121.
- (42) D.L.D. Caspar e M.D.A. Kirchner, Nature New Biology, 231, 46 (1971).
- (43) T. Gulik-Krzywicki, E. Rivas e V. Luzzati, J. Mol. Biol., 27, 303 (1967).
- (44) A. Franks, Proc. Phys. Soc. (London)B, 68, 1054 (1955).
- (45) W. Ehrenberg e A. Franks, Nature, 170, 1076 (1952).
- (46) D.M. Engelman, Biophys. J., 15, 940 (1975).
- (47) M.H.F. Wilkins, Ann. New York Acad. Sci., 195, 291 (1972).

- (48) J.M. Vanderkooi, S. Fischkoff, M. Andrech, F. Podo e C.S. Owen, *J. Chem. Phys.*, 63, 3661 (1975).
- (49) "International Tables for X-Rays Crystallography", 3, 3<sup>a</sup> ed., The Kynoch Press, Birmingham, England (1969).
- (50) B.G. McFarland e H.M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 1274 (1971).
- (51) D.F. Hoelze Wallach e A. Gordon - "Membrane Models and the Formation of Biological Membranes" (ed. L. Bolis e B.A. Pethica), North Holland Publ. Co. , Amsterdam (1968), p. 293-300.
- (52) E. Gorter e F. Grendel, *J. Exp. Med.*, 41, 439 (1925).
- (53) B. Ke, *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 554 (1965).
- (54) E. Overton, *Vjchr. Naturforsch. Ges. Zurich*, 41, 383 (1896).
- (55) D.E. Green, D.W. Almann, E. Bachmann, H. Baum, K. Kopaczyk, E.F. Korman, S. Lipton, D.H. McLennan, D.G. McConnell, J.F. Perdue, J.S. Rieske, A. Tzagoloff, *Arch. Biochem. Biophys.*, 119, 312 (1967).
- (56) H.J. Hinz e J.M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.*, 247, 6071 (1972).
- (57) A. Tardieu, V. Luzzati e F.C. Reman, *J. Mol. Biol.*, 75, 711 (1973).
- (58) P. Pinto da Silva, *J. de Microsc.*, 12, 185 (1967).
- (59) J.D. Robertson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 339 (1961).
- (60) J. Steim, M.E. Tourtellotte, J.C. Reinert, R.D. McElhaney e L.D. Rader, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 104 (1969).
- (61) M. Esfahafani, A.R. Limbrick, S. Knutton, T. Oka, S.J. Wakil, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 3180 (1971).

- (62) M.S. Bretscher, *Nature New Biol.*, 231, 229 (1971).
- (63) J.E. Rothman e J. Lenard, *Science*, 195, 743 (1977).
- (64) J.P. Segrest, I. Kahane, R.L. Jackson e V.T. Marchesi, *Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 167 (1973).
- (65) R.C. Hughes, *Essays in Biochem.*, 11, 1 (1975).
- (66) V.T. Marchesi, T.W. Tillack, R.L. Jackson, J.P. Segrest e R.E. Scott, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 1445 (1972).
- (67) J.A. McIntyre, M.J. Karnovsky e N.B. Gilula, *Nature New Biol.*, 245, 147 (1973).
- (68) W. Kleeman e H.M. McConnell, *Biochim. Biophys. Acta*, 419, 206 (1976).
- (69) S. Razin, *Biochem. Biophys. Acta*, 265, 241 (1972).
- (70) L.D. Frye e M. Edidin, *J. Cell. Sci.*, 7, 319 (1970).
- (71) C.J. Scandella, P. Devaux e H.M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 2056 (1972).
- (72) E. Sackmann, H. Trauble, H.J. Galla e P. Overath, *Biochemistry*, 12, 5360 (1973).
- (73) D.E. Wolff, J. Schlessinger, E.L. Elson, W.W. Webb, R. Blumenthal e P. Henkert, *Biochemistry*, 16, 3476 (1977).
- (74) J. Lenard e S.J. Suiger, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 1828 (1966).