

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Reconhecimento Molecular de Autoanticorpos e
Desenvolvimento de Sinal Colorimétrico utilizando
Lipossomas Polimerizados**

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Eng^a. Elaine Christine de Magalhães Cabral

Autora

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

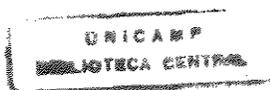
Co-orientador

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Setembro de 2000

2000/09/24



UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C112r
V.	Ex.
TOMBO BC/	43236
PROC. 16-	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC. R\$	11,00
DATA	16/12/00
N.º CPD	

CM-00153267-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C112r Cabral, Elaine Christine de Magalhães
Reconhecimento molecular de autoanticorpos e desenvolvimento de sinal colorimétrico utilizando lipossomas polimerizados / Elaine Christine de Magalhães Cabral.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana,
Ricardo de L. Zollner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Reconhecimento molecular. 2. Lipossomos. 3.
Biosensores. 4. Imunoensaio. I. Santana, Maria Helena
Andrade. II. Zollner, Ricardo de L. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por Elaine Christine de Magalhães Cabral e aprovada em 12 de setembro de 2000 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof^a.Dr^a. Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)



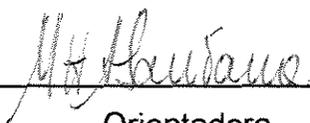
Prof^a.Dr^a. Iolanda Midea Cuccovia (Titular)



Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia (Titular)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Elaine Christine de Magalhães Cabral e aprovada pela comissão julgadora em 12 de setembro de 2000.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. H. Andrade Santana', is written over a solid horizontal line.

Orientadora

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana

**Aos meus Pais, João e Rosineide , os quais admiro profundamente,
por todo amor, apoio, amizade e compreensão
em todos os momentos da minha vida.**

**Aos meus irmãos, João Paulo e Lilianne, pela alegria, harmonia,
paz e amor existentes em minha vida.**

**Às minhas queridas tias, por estarem sempre comigo,
pelo amor e cuidado.**

**Ao Édler, por todo amor, felicidade, paz, dedicação,
atenção e paciência .**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo. Por estar comigo, sempre me iluminando, conduzindo e mostrando a cada amanhecer e anoitecer a verdadeira felicidade da vida.

À prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana, pelo presente maravilhoso que foi esse trabalho. Por me ensinar, incentivar e compreender. Pela confiança e amizade. Pelas alegrias, tristezas do dia-a-dia, as quais me orgulho de ter compartilhado. Meu eterno obrigado.

Ao prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pelo apoio e orientação nesse trabalho. Pela confiança, ensinamentos e ajuda nesse pequeno período que trabalhamos, mas que tanto aprendi. Muito obrigada.

Às amigas: Samantha, Maria Helena Zanin e Denise Pinheiro.

À Luciana Lins pelo companheirismo nesses oito anos de vida acadêmica.

À Débora Nakai pela amizade e preciosa ajuda durante esse período. Ao Paulo de Tarso Hennies pela paciência e ensinamentos.

A todos os meus colegas do DPB: Heron, Giuliana, Fernanda, Terezinha, Salah, Cristiane, Carla, Oselys, Líbia, Vinícius, Elcimar, Mirela, Ana Carolina, Rosana, Adriano.

Ao prof. Dr. César Costapinto Santana pela utilização dos seus laboratórios.

À prof^a Dr^a Sônia Alves Bueno pelas grandes sugestões.

À prof^a Eneida (Lab. de Biomembranas. IB/UNICAMP) pelo uso do sonificador.

Ao Prof. Watson Loh e ao Luís Henrique pelas grandes discussões.

À Conceição (Lab. de Imunologia Clínica. FCM/UNICAMP) pela grande ajuda na seleção dos soros autoimunes.

À FAPESP pelo apoio financeiro necessário para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

NOMENCLATURAS	21
RESUMO	23
ABSTRACT	25
Capítulo 1 - INTRODUÇÃO	27
Capítulo 2 - OBJETIVO	31
Capítulo 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 - Considerações sobre Doenças auto-imunes	33
3.2 - Métodos de detecção das doenças auto-imunes.	36
3.3 - Cardiolipina	38
3.4 - Lipossomas	40
3.5 - Lipossomas em imunoensaios	41
3.6 - Lipossomas polimerizados	44
3.7 - Análise da transição e mudança de cor de lipossomas polimerizados.	55
3.8 - Reconhecimento e transdução de sinal molecular com lipossomas	58

Capítulo 4 - MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 – Material	65
4.2 – Equipamentos	66
4.3 – Métodos	66
4.3.1 – Estudo da agregação de misturas de lipídios e cardiolipina em filmes de Langmuir-Blodgett	66
4.3.2 - Preparação e caracterização de lipossomas formado por ácidos diacetilênicos.	67
4.3.3 – Ensaios de adsorção de anticorpos em lipossomas polimerizados.	72
Capítulo 5 – RESULTADOS	75
5.1 - Estudo de agregação em filmes de Langmuir-Blodgett	75
5.2 - Preparação e caracterização de lipossomas com ácido polimerizável.	83
5.3 - Estudos de adsorção de auto-anticorpos em lipossomas polimerizados	93
Capítulo 6 – CONCLUSÕES	103
Capítulo 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	105
Capítulo 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO I	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Vias que conduzem a falhas no sistema imunológico.	34
Figura 3.2 - Estrutura de uma molécula de anticorpo (esq). Molécula de anticorpo (dir.)	35
Figura 3.3 - Etapas do ensaio Elisa.	37
Figura 3.4 – Fórmula estrutural da cardiolipina.	38
Figura 3.5 - Estrutura típica de lipossomas	40
Figura 3.6 – Capacidade de associação de moléculas marcadoras, ligantes específicos e antígenos na estrutura dos lipossomas.	42
Figura 3.7 – Tipos de imunoenaios usando lipossomas	43
Figura 3.8 – Esquema da seção transversal de um lipossoma polimerizado, mostrando os vários sítios de polimerização.	45
Figura 3.9 – Posições relativas dos grupos diacetilênicos nas cadeias de ácidos.	46
Figura 3.10 – Diferentes estruturas de agregação formadas a partir de fosfolipídios.	47
Figura 3.11 - Gráfico Pressão x área/molécula – Isoterma de Langmuir.	48
Figura 3.12 – Distribuição molecular de um filme misto em superfície aquosa.	49
Figura 3.13 (A e B) - Isotermas de componentes miscíveis (A) e imiscíveis (B).	51
Figura 3.14 – Representação esquemática de uma polimerização topoquímica (esquerda) e de uma polimerização de diacetilenos (direita)	52

- Figura 3.15** - Geometria apropriada do monômero na forma cristalina para a polimerização topoquímica de diacetilenos, onde $d=45^\circ$ e $\gamma=5 \text{ \AA}$ **53**
- Figura 3.16** – Espectro transiente de um diino irradiado à $\lambda = 250\text{nm}$ após diferentes tempos de exposição. **54**
- Figura 3.17** – Possíveis mecanismos de transição e mudança de cor de PDA. **55**
- Figura 3.18** - Resposta Colorimétrica termocrômica de vesículas-PDA. **57**
- Figura 3.19** - Representação esquemática do sistema utilizado no ensaio para a detecção de autoanticorpos usando cardiolipina e lipossomas. **59**
- Figura 3.20** - Área molecular de monocamadas mistas, compostas por TCDA/DGG (A) e PCDA/DGG (B), como função da fração molar de DGG a diferentes pressões de superfícies na água pura, a pH 5,8. **62**
- Figura 3.21** - Vesículas biocrômicas, compostas de DMPC natural, mostrando o ataque da PLA_2 . **63**
- Figura 4.1** – Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho de partículas por espalhamento de luz. **69**
- Figura 4.2** – Disposição das amostras em placas de polietileno. **70**
- Figura 4.3** - Esquema da montagem do sistema de polimerização direta para vesículas de PDA/CI 20 % mol. **71**
- Figura 5.1** - Isotermas de Langmuir para os fosfolipídios 10,12 (tricosadiinoil) fosfatidilcolina ($\text{DC}_{8,9}\text{PC}$), e 3,5 (tricosadiinoil) fosfatidilcolina DC_{215}PC , à 27°C , e ácido 10,12-tricosadiinóico (PDA) à 24°C . **75**

- Figura 5.2** – Conformação molecular, do tipo Gauche, das cadeias de hidrocarboneto de uma molécula anfifílica (NEW, 1990) 76
- Figura 5.3** – Isotermas de misturas de lipídios DC₈₉PC/CL (esquerda) e PDA/CL (direita), onde a fração molar da CL variou de 0 a 1. Todas as isotermas foram obtidas à temperatura de 24°C. 78
- Figura 5.4** – Desvios da regra da aditividade obtidos a partir das isotermas de Langmuir das misturas de DC₈₉PC e CL, a diferentes pressões. 80
- Figura 5.5** – Desvios da regra da aditividade obtidos a partir das isotermas de Langmuir das misturas de PDA e CL, a diferentes pressões. 81
- Figura 5.6** – Isotermas de Langmuir para o ácido 10,12-tricosadiinóico (PDA) a diferentes pH's (5.06, 5.70, 6.17) e à temperatura de 26°C. 83
- Figura 5.7** – Estabilidade de estocagem dos lipossomas monoméricos, à pH 5.7 e diferentes tempos de sonicação, em termos de polidispersidade da amostra (A). Estabilidade de estocagem dos lipossomas polimerizados, à pH 5.7 e 25 min. de sonicação, em termos de diâmetro médio das vesículas (B), onde: mon.-monômero e fresh - lipossomas logo após a polimerização 84
- Figura 5.8** – Perfis de estabilidade de lipossomas, monoméricos e polimerizados, compostos de PDA/CL 20%. 87
- Figura 5.9** - Micrografia obtida da microscopia eletrônica de transmissão (MET) de vesículas polimerizadas formada por PDA/CL 20%. 88
- Figura 5.10** –Termogramas, obtidos através da microcalorimetria diferencial de varredura (DSC), de lipossomas constituídos de PDA/CL 20%, em água deionizada a pH 5.7 (esquerda) e pH 6.3 (direita). 89

- Figura 5.11** – Espectros da polimerização dos lipossomas compostos de ácido diacetilênico/cardioplipina 20% (concentração da solução: 1mM em lipídio total; temperatura inicial: 4°C; solvente: água). **90**
- Figura 5.12** – Fotografia das soluções lipossomais nos diferentes estágios da polimerização: A) inicial (azul - $\lambda = 635\text{nm}$), B) intermediário (púrpura - $\lambda = 540\text{nm}$) e C) final (rosa - $\lambda = 480\text{nm}$). **91**
- Figura 5.13** – Deconvolução química a partir dos espectros decorrentes da polimerização de lipossomas compostos de PDA/CL 20%. **91**
- Figura 5.14** – Influência do pH na absorbância das soluções no decorrer da polimerização de lipossomas, compostos de PDA/CL 20%. **92**
- Figura 5.15** - Espectros obtidos do soro de referência(IgG/a-Cl), soro sadio e soro do autoimune . **94**
- Figura 5.16** – Resposta colorimétrica (RC%) x concentração de IgG total (mg/dL). O gráfico a esquerda mostra a RC % de lipossomas 0.5mM, enquanto o da direita mostra a RC% de lipossomas 1mM. **95**
- Figura 5.17** Comparação da resposta colorimétrica % x concentração de IgG entre 2 sistemas lipossomais. O gráfico da esquerda mostra a RC% de lipossomas polimerizados na faixa da cor azul e o da direita exibe a RC% dos lipossomas polimerizados na faixa da cor púrpura. **96**
- Figura 5.18** – Espectros das soluções lipossomais 0,5mM, azul (esquerda) e púrpura (direita) após as adições sucessivas de autoanticorpos específicos (IgG/a-Cl) presentes no soro de referência. **97**
- Figura 5.19** - Comparação entre os valores de resposta colorimétrica obtidos com soro sadio e o soro autoimune puros, com intervalos de medidas de 2 min. e de 10 min., para lipossomas polimerizados na faixa do azul à 0,5 mM. **98**

Figura 5.20 - Comparação entre os valores de resposta colorimétrica obtidos com soro sadio e soro autoimune: a várias diluições, com intervalos de medidas de 2 min. (superior) e com BSA 0.5mg/mL (inferior). Os lipossomas usados foram polimerizados na faixa do azul com concentração de 0,5 mM. **99**

Figura 5.21 - – Resposta colorimétrica obtida através de cinética realizada em placas de polietileno com concentração fixa de lipossomas (0,5mM) polimerizados e diferentes concentrações dos soros **100**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1** – Valores de área/molécula e pressão de colapso para misturas de DC₈₉PC/CL e PDA/CL em diferentes composições. **69**
- Tabela 5.2** – Valores de Bo referentes a amostra de lipossomas polimerizados na faixa do azul ($\lambda = 635\text{nm}$), recém preparados e 5 meses depois. **86**

NOMENCLATURA

Letras latinas:

A – área molecular

A_1 e A_2 – áreas moleculares do filme de cada componente à mesma pressão

A_{12} – área molecular do filme bicomponente

$A_{\text{azul/vermelho}}$ – absorvância azul/vermelho

C_b – número de componentes do seio aquoso

C_s – número de componentes confinados na superfície da fase aquosa

D – coeficiente de difusão das partículas

F – número de graus de liberdade

k – constante de Boltzmann

l - espessura da bicamada

N – número de moléculas de lipídio/lipossomas

N_1 e N_2 – frações molares dos componentes

P_b – número de fase existentes

P_{bf} – percentagem final de azul

P_{bo} – percentagem inicial de azul

q – número de fases na superfície aquosa

R_h - raio hidrodinâmico

T – temperatura termodinâmica

Letras gregas:

π - pressão superficial

μ - viscosidade do solvente

Abreviaturas:

BSA – Albumina do soro bovino

CL - Cardioplipina

CR - Resposta colorimétrica

CLIF - Chrtidia luciliae immunofluorescence

DC_{8,9}PC – 1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosfocolina

DC_{2,15}PC – 1,2-bis(3,5-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosfocolina

DMPC – Dimiristoilfosfatidilcolina

DNA - Ácido desoxiribonucléico

ELISA - Enzyme -linked immunosorbent assay

FANA - Fluorescent antinuclear antibody test

GPLU/mL – Unidades de imunoglobulina G por mL

IgG – Imunoglobulina G não específica

IgG/anti-CL – Imunoglobulina G com anticorpos anti-cardioplipina proveniente de soro de referência, disponível em kits diagnóstico.

LB – Langmuir-Blodgett

LES - Lupus Eritematoso Sistêmico

PC - Fosfatidilcolina

PDA – Ácido 10,12-tricosadiinóico

RNA - Ribonucleoproteínas

UV - Ultravioleta

RESUMO

Cabral, E.C.M. – Reconhecimento molecular de autoanticorpos e desenvolvimento de sinal colorimétrico utilizando lipossomas polimerizados.

Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2000.

A pesquisa no campo de doenças auto-imunes vem despertando grande interesse, pelas dificuldades de diagnóstico preciso e necessidade de melhor conhecimento das suas causas e mecanismos. O ensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) é o mais utilizado para a detecção de auto-anticorpos. Nesse método, os problemas apresentados estão baseados na variabilidade dos kits disponíveis e na natureza multi-etapas envolvida na detecção dos auto-anticorpos.

Visando contornar esses problemas, neste trabalho, foi desenvolvido um método de detecção de auto-anticorpos, quantitativo e qualitativo, em única etapa, baseado no reconhecimento molecular e desenvolvimento do sinal colorimétrico, usando lipossomas polimerizados.

Na preparação dos lipossomas monoméricos foi usada cardiolipina como ligante específico e ácido 10,12-tricosadiinóico como lipídio estrutural. Os lipossomas polimerizados sob irradiação UV, absorveram a luz no comprimento de onda referente ao azul_{635nm}, púrpura_{540nm} e rosa_{480nm}. A adsorção de auto-anticorpos na superfície dos lipossomas e o desenvolvimento do sinal colorimétrico foram estudados com soros de referência, de indivíduo sadio e auto-imunes. Os resultados experimentais mostraram que a preparação dos lipossomas polimerizados foi reprodutível. A adsorção de auto-anticorpos na superfície desses lipossomas produziu resposta colorimétrica, com alta sensibilidade de mudança de cor do “azul” ou “púrpura” para “rosa”, detectável em única etapa. A especificidade do sistema foi 7 vezes maior com soro de referência que com IgG. A utilização de soros auto-imune e sadio reduziu a especificidade do sistema, devido às interferências dos outros componentes do soro. Esses resultados mostraram a potencialidade dos lipossomas polimerizados para a detecção de auto-anticorpos, pela reprodutibilidade do sistema e desenvolvimento de sinal em única etapa.

Palavras-chave: reconhecimento molecular, lipossomas polimerizados, biossensor.

ABSTRACT

Cabral, E.C.M. – Molecular recognition of autoantibodies and signal colorimetric development using polymerized liposomes.

Master Thesis – Chemical Engineering School, State University of Campinas, 2000.

The research in the field of autoimmune diseases has been increased in the last years, due to the difficulties on the precise diagnostic, and the knowledgement of its causes and mechanisms. ELISA (Enzyme -linked immunosorbent assay), commercially available, is the most used method for detection of autoantibodies. The problems presented in its procedure are based on the variability of the commercial kits and on the multi-steps included on the autoantibodies detection.

Aiming to circumvent these problems, a alternative method for detection of autoantibodies using polymerized liposomes was developed in this work. The main advantage of this approach is the reproductibility of the liposomes and the molecular recognition and development of colorimetric signal in only one step.

Monomeric liposomes were prepared using cardiolipin a na affinity ligand and 10,12-tricosadiynoic acid as structural lipid. The polymerization was performed by UV irradiation in the blue, purple and pink phase. The adsorption of antibodies and the development of the colorimetric signal was studied using reference, normal and autoimmune sera. The experimental results showed that the polymerized were reproductibles and stable during 5 months. The adsorption of autoantibodies on the surface of polymerized liposomes produced a colorimetric response from the blue or purple to pink phase. The sensibility of the system was high, and the specificity was 60% compared the responses with reference serum and non specific immunoglobulin G. When real sera was used, the specificity of decreased due to interferences of the other components of the serum. The results show the potentiality of polymerized liposomes for detection of antibodies, due to reproductibility of liposomes preparation and development of a colorimetric signal in only one step.

Key-words: biosensor, polymerized liposomes, molecular recognition, immunoassays.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Falhas na manutenção da auto-tolerância do indivíduo, decorrentes de deficiências no funcionamento do sistema imunológico podem conduzir a doenças auto-imunes. Pacientes portadores desta deficiência desenvolvem resposta imunológica indesejável contra seus próprios constituintes comuns, como por exemplo: hemácias, ácidos nucleicos, membranas celulares, entre outros.

A mediação das respostas imunes é feita por uma variedade de células do tipo B ou T. Ao receberem o antígeno, essas células são ativadas, produzindo glicoproteínas conhecidas como anticorpos. No caso das doenças auto-imunes esses anticorpos são denominados auto-anticorpos devido à resposta imunológica ser contra os próprios antígenos do indivíduo.

A literatura básica apresenta moléculas de imunoglobulinas (glicoproteínas), divididas em 5 classes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Os auto-anticorpos são basicamente moléculas de IgG, IgM e em menor proporção IgA. Indivíduos portadores de doenças auto-imunes apresentam heterogeneidade ampla de auto-anticorpos, o que representa um dos principais problemas no diagnóstico dessas doenças.

Dentre as técnicas convencionais de detecção das doenças auto-imunes, a mais utilizada, atualmente, é o ensaio heterogêneo em fase sólida, conhecido como ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), disponível comercialmente.

Este ensaio, apesar de atualmente constituir uma poderosa técnica de diagnóstico, apresenta algumas limitações críticas, tais como a necessidade de multi-etapas e variabilidade nos resultados, devido ao controle impreciso da densidade de antígenos sobre os suportes. De uma maneira geral, o diagnóstico de doenças auto-imunes é complexo, tanto pela heterogeneidade clínica, quanto pela variabilidade laboratorial dos resultados obtidos de diferentes kits comerciais (Reber et.al., 1995).

A adsorção específica de auto-anticorpos na superfície de lipossomas polimerizados e o desenvolvimento de sinal colorimétrico resultante da ligação, constitui técnica alternativa promissora para o diagnóstico de doenças auto-imunes. Estudos recentes, apresentado na literatura nos últimos 5 anos, mostram que as interações receptor-ligante presentes nas membranas celulares e transmitidas por meio de sinais

moleculares, podem ser mimetizadas através de lipossomas polimerizados, com receptores específicos incorporados na matriz lipídica. Os trabalhos nesse campo ainda são escassos e até então foram estudados a detecção da toxina da cólera, através de gangliosídeos (Charych et.al., 1997), vírus *influenza* através do ácido siálico como receptor (Charych, 1995) e *Escherichia coli*, usando glicolipídio como receptor (Ma et.al., 1998). Não há trabalhos na literatura relatando a detecção de compostos menores, tais como moléculas de anticorpos, utilizando lipossomas polimerizados.

Lipossomas polimerizados são constituídos de moléculas anfífilas que apresentam elevada área superficial, podendo acomodar na superfície ligantes de afinidade e insaturações nas suas cadeias de hidrocarbonetos. Essas insaturações permitem a polimerização das moléculas de lipídios, presentes em agregados, por irradiação com luz ultravioleta, produzindo mudanças estruturais significativas no empacotamento dos compostos agregados, sendo uma delas a alteração de cor. Com exposição à irradiação, uma série de mudanças espectrais na faixa de comprimento de onda da luz visível podem ser observadas. Essas mudanças são causadas pelas tensões mecânicas que são impostas à estrutura durante a polimerização.

A estrutura sob tensão dos lipossomas polimerizados, embora estável em solução, é susceptível à alterações produzidas no meio, tais como mudanças de pH, presença de íons ou adsorção de compostos sobre a sua superfície. No último caso, o sinal molecular decorrente da adsorção de biomoléculas na superfície dos lipossomas, contendo um receptor específico ou ligante de afinidade, produz mudanças de cor na faixa de comprimento de onda da luz visível, e o fenômeno associado é conhecido como Biocromismo.

O conhecimento das limitações existentes no diagnóstico laboratorial de doenças auto-imunes e das propriedades de biocromismo dos lipossomas polimerizados, motivou-nos ao desenvolvimento deste trabalho, voltado para a produção de lipossomas polimerizados para a detecção de auto-anticorpos.

Estando o sinal colorimétrico associado a tensões causadas na bicamada lipídica, uma condição fundamental para a produção de resposta colorimétrica, decorrente da adsorção de moléculas na superfície de um ligante específico, é que os lipossomas formem bicamadas bem empacotadas, e que o ligante de afinidade tenha uma forte

interação com os lipídios polimerizáveis. Portanto, a miscibilidade do ligante na bicamada e as suas interações são requisitos fundamentais para o desenvolvimento de sinal.

Assim, na primeira parte deste trabalho foram estudados o comportamento de agregação das moléculas polimerizáveis puras e em misturas em filmes de Langmuir-Blodgett. Na segunda etapa, foi estudada a formação dos lipossomas, em estruturas capazes de serem polimerizadas em toda a faixa de comprimento de onda da luz visível, para possibilitar o aparecimento do fenômeno de biocromismo. Os lipossomas polimerizados foram caracterizados em relação ao tamanho, forma das vesículas e determinação do tempo de polimerização para absorção na faixa do azul (635nm), púrpura (540nm) e, finalmente, no rosa (480nm), sob condições pré-estabelecidas.

Finalmente, na terceira etapa, foram feitos ensaios em batelada com imunoglobulina G, soro de pacientes com doenças auto-imunes e soro de indivíduo sadio, demonstrando a potencialidade da aplicação dos lipossomas polimerizados, com cardiolipina como ligante de afinidade, na adsorção de auto-anticorpos.

Nesta trabalho são apresentados os resultados relativos à abordagem destes aspectos e discussão, seguidos de conclusões deste direcionamento adotado nessa tese de mestrado, bem como sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o aprimoramento dos métodos de detecção de auto-anticorpos através da preparação de lipossomas polimerizados e do desenvolvimento de um método colorimétrico para a transdução de sinal molecular produzido pela ligação de auto-anticorpos à sítios de cardiolipina presentes na superfície dos lipossomas.

Para que esse objetivo pudesse ser atingido, durante a execução do trabalho foram cumpridas as seguintes etapas específicas:

- Estudo do comportamento de mistura dos componentes dos lipossomas polimerizados.
- Estabelecimento de condições de processo para a preparação de lipossomas;
- Caracterização dos lipossomas em relação ao raio hidrodinâmico e à concentração de cardiolipina;
- Polimerização dos lipossomas por irradiação UV;
- Estudo da influência das variáveis tempo e intensidade de radiação no grau de polimerização dos lipossomas;
- Caracterização dos efeitos da polimerização sobre a integridade do empacotamento da bicamada lipídica polimerizada na presença de tensoativo não iônico C₁₂E₅;
- Estudo da transdução do sinal molecular obtido pela ligação dos auto-anticorpos nos sítios de cardiolipina presentes na superfície dos lipossomas;
- Avaliação da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade do sistema na adsorção de auto-anticorpos, usando soro sadio, soro de referência (contendo anticorpos anticardiolipina) e soro de pacientes com doenças auto-imunes.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica, apresentada neste trabalho, abrange os seguintes aspectos: considerações sobre doenças auto-imunes e métodos de detecção; identificação, natureza e propriedades dos auto-anticorpos, visando um melhor conhecimento das biomoléculas envolvidas no processo de adsorção; estrutura e propriedades da cardiolipina; agregação de biomoléculas em filmes de Langmuir-Blodget e miscibilidade de misturas binárias de compostos anfifílicos em monocamadas; utilização de lipossomas em imunoenaios; lipossomas polimerizados; estrutura, composição e preparação de lipossomas, propriedades biocrômicas e os trabalhos da literatura envolvidos no reconhecimento molecular e desenvolvimento de sinal colorimétrico.

3.1- Considerações sobre doenças auto-imunes

A ausência de controle das respostas imunes fisiológicas contra antígenos estranhos ou a falha na manutenção da autotolerância (capacidade do indivíduo não reagir imunologicamente diante de certos antígenos) conduz a doenças em que o mecanismo patogênico é imunológico [Abbas et al., 1995]. Existem, basicamente, três vias que conduzem a falhas no sistema imunológico, são elas: hipersensibilidade, imunodeficiência e a auto-imunidade, como ilustrado na Figura 3.1 [Roitt et al., 1997].

Desordens resultantes de reações imunes, excessivas ou descontroladas conduzem à hipersensibilidade. Defeitos em um ou mais componentes do sistema imune podem conduzir a sérias desordens, como a imunodeficiência, resultando numa maior suscetibilidade às infecções. Reações indesejadas com o próprio tecido ou constituinte do corpo desencadeia a auto-imunidade [Abbas et al., 1995]. A grande diferença entre imunodeficiência e auto-imunidade está relacionada aos anticorpos. Enquanto na primeira há deficiências na produção de anticorpos, na segunda ocorre produção excessiva, havendo ampla variedade de anticorpos.

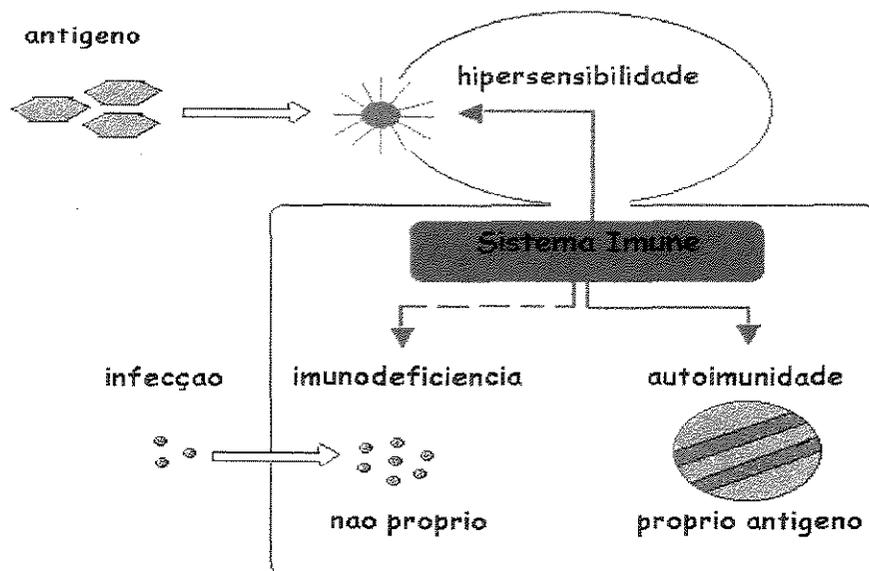


Figura 3.1 – Vias que conduzem a falhas do sistema imunológico (adaptação: Roitt et al., 1997).

A auto-imunidade decorre de resposta imune contra componentes próprios do indivíduo. O organismo humano dispõe de dispositivos que impedem que o sistema imune reaja de maneira deletéria contra seus próprios antígenos. Falhas na discriminação de antígenos próprios e antígenos estranhos conduzem a auto-imunidade com potencial patogênico [Klein, J., 1990].

Os mecanismos e as causas destas doenças ainda não foram completamente elucidados, isto porque não se sabe ao certo qual antígeno que inicia a resposta imune.

Como nas doenças auto-ímmunes, o antígeno é um próprio constituinte do corpo, os anticorpos produzidos são, então, designadas de auto-anticorpos. As doenças auto-ímmunes podem ser classificadas como tecido ou órgão-específica (resposta imunológica é contra um antígeno localizado em um órgão ou tecido particular), sistêmica (resposta imunológica é contra antígenos próprios amplamente distribuídos na corrente sanguínea) ou intermediária (acometimento de um órgão ao lado de manifestações em outros territórios) [Calich & Vaz, 1989].

As doenças auto-ímmunes, de um modo geral, caracterizam-se por uma variedade ilimitada de auto-anticorpos que são moléculas de imunoglobulinas. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE [Goodman, J.W., 1991]. Os auto-anticorpos encontrados em doenças auto-ímmunes são, basicamente, moléculas de

imunoglobulinas do tipo IgG, IgM e em menor proporção IgA. A determinação de IgM é um indicador do diagnóstico no início da doença auto-imune, enquanto a IgG é encontrada em estágios progressivos da doença [Naparstek, 1993].

As moléculas de anticorpos são compostas de polipeptídeos (82-96%) e carboidratos (4-18%) e caracterizam-se pela sua especificidade e diversidade. As diferentes atividades destas moléculas são devido aos reflexos das diferenças estruturais ditadas pela sequência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. Estas moléculas bifuncionais são constituídas por: cadeias leves (L) e pesadas (H), onde estão situadas os fragmentos: Fab, Fab' e Fc, como mostrado na Figura 3.2. A parte da molécula de anticorpo que se liga ao antígeno é formada por um pequeno número de aminoácidos, na região designada como V, das cadeias leve e pesada, referentes à porção Fab e Fab' [Goodman, J. in: Unanue, E. et. al., 1984].

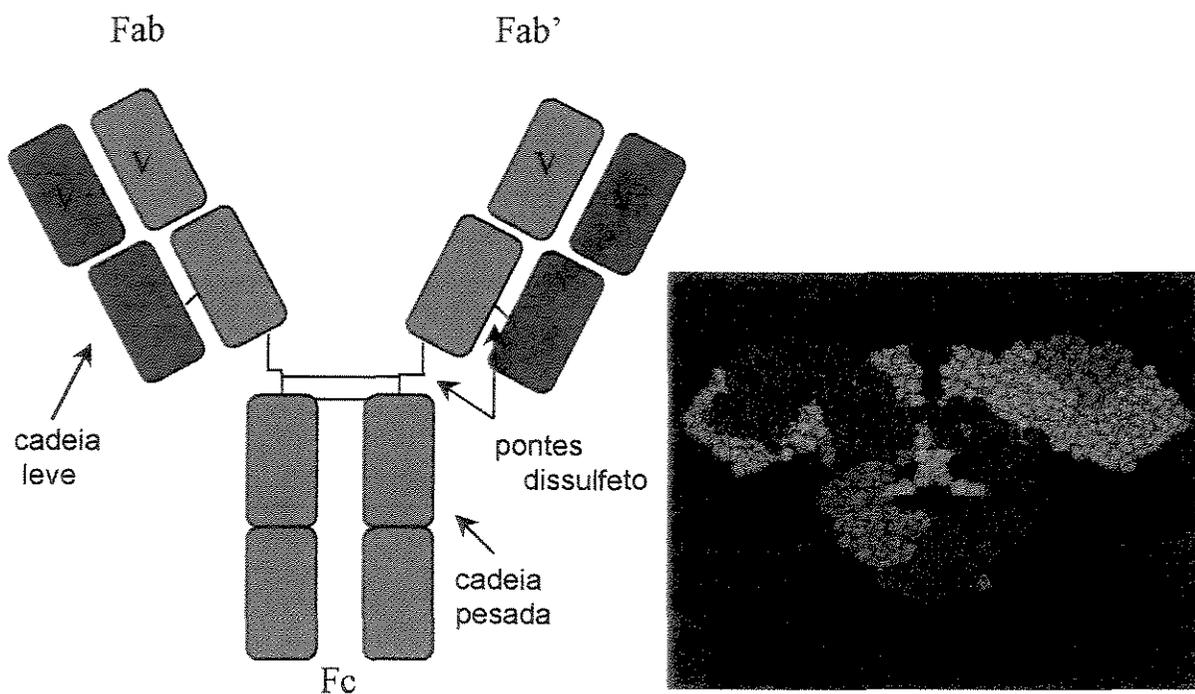


Figura 3.2 – Estrutura de uma molécula de anticorpo (esquerda). Molécula de anticorpo (direita) [Roitt, 1997]

Há diferentes formas de imunoglobulinas humana sendo essa variedade, típica dos mamíferos em geral. Além das 5 Classes de imunoglobulinas existentes: IgG, IgM, IgA,

IgD e IgE, existem 4 subClasses de IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) e duas subclasses de IgA (IgA₁ e IgA₂). Há evidências, na literatura, que a maioria dos auto-anticorpos presentes em portadores de doenças auto-imunes não específicas sejam predominantemente das subClasses IgG₁ e IgG₃.

Segundo Calich & Vaz (1989) os anticorpos encontrados em doenças auto-imunes sistêmicas são: anticorpos antiglobulina humana, anticorpos antinuclear, anticorpos anticardiolipina e anticorpos antilinfócitos.

3.2 - Métodos de detecção das doenças auto-imunes

Os métodos convencionais de detecção das doenças auto-imunes são baseados na análise dos auto-anticorpos. Os mais conhecidas são: FAN ou FANA (Fluorescent antinuclear antibody test), CLIF (Chrtidia luciliae immunofluorescence) e o ensaio ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Destes, o mais utilizado atualmente é o ensaio ELISA, disponível comercialmente na forma de kits diagnóstico.

Os testes FANA e CLIF são análises baseados em imunofluorescência e detectam anticorpos circulantes, principalmente, do tipo antinuclear, como o anti-DNA. Esses testes são de fácil execução, baixo custo, porém compostos de multi-etapas, demandando bastante tempo para a sua conclusão.

O FANA apresenta algumas limitações no uso, dentre elas a não disponibilidade de soros de pacientes com anticorpos especificamente definidos [Fritzler, 1986].

O teste CLIF também apresenta algumas desvantagens: a principal delas é a variabilidade na preparação do substrato que será usado no teste, ou seja, há imprecisões na padronização, podendo levar a variações nos resultados de diferentes kits. Além disso, os seus resultados são expressos em termos semi-quantitativos [Ballou et al., 1986].

Janoff, A. et al. [1983] avaliando a especificidade e sensibilidade dos métodos FANA e CLIF, na detecção de pacientes portadores do lupus eritematoso sistêmico, mostraram que o teste FANA possui alta sensibilidade, porém apresenta baixa especificidade, o que pode conduzir a resultados do tipo falso positivo. Já o CLIF apresenta especificidade elevada, mas sensibilidade baixa, podendo, por sua vez, conduzir a resultados falso negativos.

Atualmente, o método de detecção de auto-anticorpos mais usado é o ensaio heterogêneo em fase sólida, conhecido como ensaio ELISA. Estudos comparativos mostraram que há uma considerável variabilidade nos resultados, não só quando se utiliza diferentes métodos, mas também, com os diferentes kits vendidos comercialmente para um mesmo ensaio, além das dificuldades inerentes à condução de ensaios multi-etapas [Reber et al.,1995]. A Figura 3.3 mostra esquematicamente as etapas do ensaio ELISA.

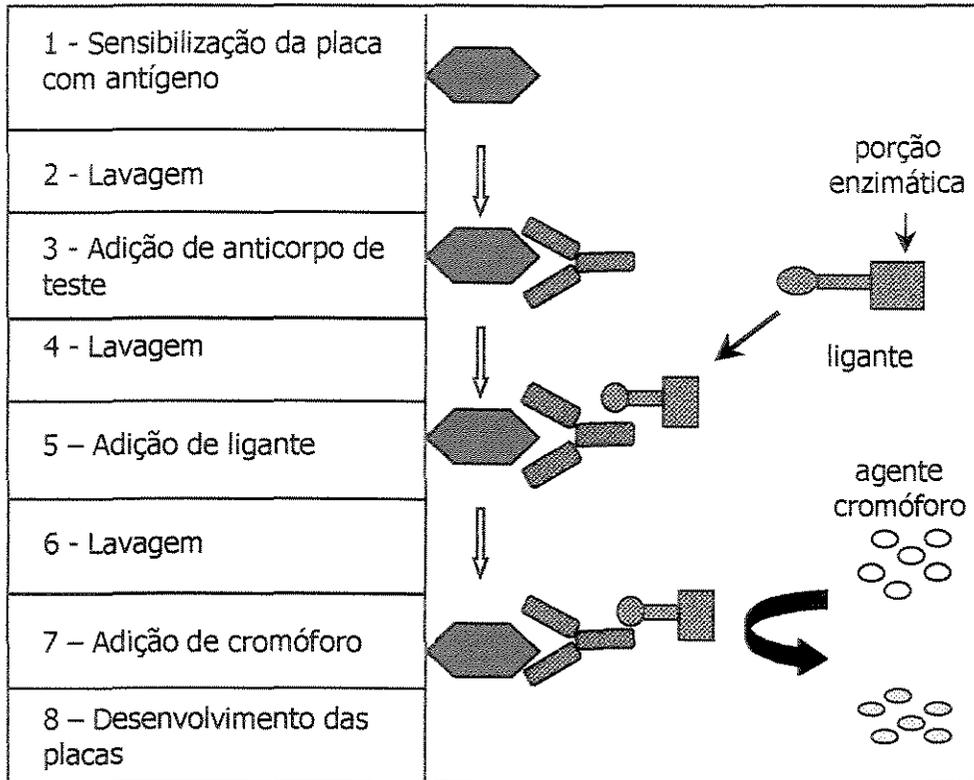


Figura 3.3 - Etapas do ensaio ELISA (adaptação: Roitt et al., 1997).

O ensaio ELISA é geralmente conduzido em placas de poliestireno, contendo 96 poços de aproximadamente 200 μ L. Na primeira etapa, os poços são recobertos com o antígeno por reação ou adsorção física. Em seguida, efetua-se uma lavagem para a remoção dos antígenos não ligados (etapa 2) e adiciona-se o anticorpo de teste contido no soro do paciente (etapa 3). A placa é então incubada para que a reação antígeno-anticorpo se desenvolva e em seguida faz-se outra lavagem para retirar o excesso de anticorpo (etapa 4). As etapas posteriores estão voltadas para o

desenvolvimento do sinal colorimétrico. A etapa 5 consiste na adição de um ligante enzimático que se associa ao anticorpo. Após remoção do excesso de ligante (etapa 6), adiciona-se um substrato cromogênico capaz de produzir uma reação colorimétrica (etapa 7), completando-se, assim, o desenvolvimento da placa. Após o aparecimento de cor, os auto-anticorpos são quantificados indiretamente por medidas de densidade ótica.

As principais dificuldades apresentadas pelo ensaio ELISA são: multiplicidade de etapas, aumentando a probabilidade de erros; necessidade de várias diluições do soro do paciente para garantir que o sinal colorimétrico esteja na faixa da linearidade correspondente à densidade ótica; controle da densidade de antígenos sobre as placas, conduzindo à variabilidade e falta de reprodutibilidade quando são usadas diferentes placas. Devido à heterogeneidade dos anticorpos encontrados em pacientes portadores de doenças auto-imunes, como o LES, torna-se necessário que mais de um tipo de ensaio seja realizado [Kandiah et al., 1996].

A cardiolipina é o antígeno mais usado em ensaios ELISA para a detecção de auto-anticorpos. O seu espectro de detecção não se restringe aos auto-anticorpos anticardiolipina, mas também a vários outros, como os anticorpos anti-DNA.

3.3 – Cardiolipina

Quimicamente a cardiolipina pode ser definida como um fosfolípídio duplo, contendo quatro ácidos graxos e em pH, dois grupos fosfatos carregados. Na Figura 3.4 é apresentada a fórmula estrutural da cardiolipina.

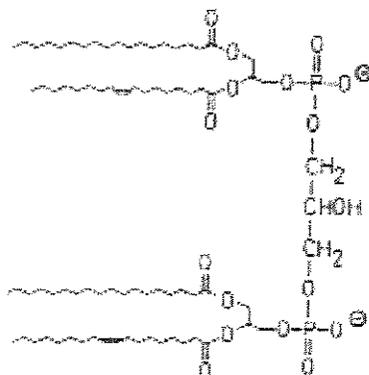


Figura 3.4 – Fórmula estrutural da Cardiolipina (NEW, 1990)

Esse fosfolípido pode ser sintético ou proveniente de membranas internas de mitocôndrias. Em geral, a cardiolipina isolada de mamíferos é altamente insaturada, especificamente enriquecida em ácido linoléico e desempenha importante função estrutural na membrana celular.

Uma das características marcantes deste fosfolípido é o polimorfismo que apresenta em dispersões aquosas. Em excesso de tampão, a cardiolipina em sal de sódio é organizada em bicamadas. Sob condições similares em sais de cálcio, magnésio, bário e manganês, a depender da temperatura, pode haver formação das fases lamelar, hexagonal ou a coexistência destas duas fases. À temperaturas fisiológicas predomina a fase hexagonal [Kruijff, B et al., 1982].

Rang & Sengputa (1972) verificaram que a cardiolipina precipita na forma hexagonal pura em todas as soluções onde a concentração de cloreto de cálcio varia de 0,001 a 1,0M. O mesmo acontece com $MgCl_2$ e $BaCl_2$, sendo que para a fase hexagonal pura existir com íons magnésio, a temperatura deve variar entre 20-40°C à concentração de 0,03-0,5M e com os íons bário, a faixa de concentração pode variar de 0,01 a 0,7M, mas somente à 40°C.

Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que o fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserina (PS), também carregados negativamente, na presença de íons cálcio (concentração variando de 0,01 a 0,7M), não precipitavam na forma hexagonal, confirmando a característica única da cardiolipina, de precipitação na presença dos referidos íons.

Estudos realizados por Janoff et al. [1983] mostraram que a cardiolipina pode se ligar competitivamente a anticorpos monoclonais, inclusive auto-anticorpos anti-DNA. A reação antinuclear de um simples auto-anticorpo monoclonal do L.E.S. foi especificamente inibida pela cardiolipina, implicando que o epítipo éster-fosfato da cardiolipina representa o principal sítio de reconhecimento antigênico de anticorpos anticardiolipina. Takashi et al. [1980] verificaram que a associação de lipídios auxiliares como fosfatidilcolina e colesterol é importante para uma melhor reatividade da cardiolipina com auto-anticorpos. A ligação dos anticorpos a matriz lipídica de lipossomas, contendo cardiolipina, ocorreu a temperaturas abaixo e acima da temperatura de transição de fases dos lipídios, porém o estado fluido das membranas foi essencial para que as reações imunes efetivamente acontecessem.

Janoff et.al. [1980] e Chaimovich [1996] utilizaram essas propriedades para o desenvolvimento de lipossomas, contendo cardiolipina para aplicações em imunoenaios.

3.4 - Lipossomas

Lipossomas são vesículas aproximadamente esféricas, formadas por moléculas anfifílicas dispostas em bicamadas, capazes de encapsular no seu interior, parte do meio em que se encontram. A Figura 3.5 ilustra a estrutura típica de lipossomas. As cabeças polares dos compostos são expostas ao meio aquoso, na superfície ou cavidade central das vesículas, enquanto que as caudas apolares formam uma membrana capaz de permear substâncias encapsuladas.

Os lipossomas assemelham-se às membranas biológicas em estrutura e composição e podem ser construídos a partir de lipídios naturais ou sintéticos. Devido à flexibilidade na composição, os lipossomas podem ser projetados e construídos para uma vasta gama de aplicações, tais como na química, como suporte de catalisadores e em processos de fotólise da água, biomineralização e bioeletrônica, na farmacologia e medicina como um sistema de liberação controlada de medicamentos.

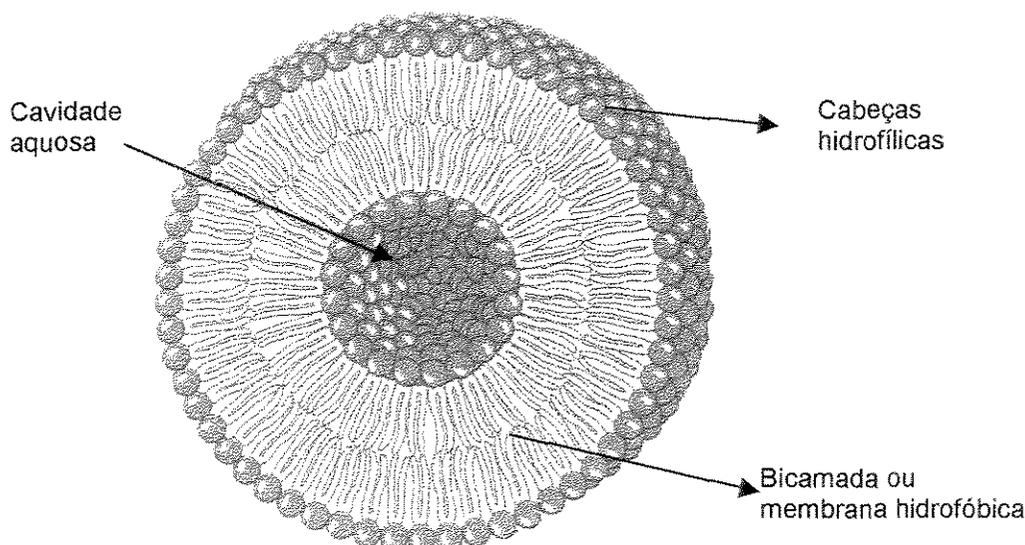


Figura 3.5 – Estrutura típica de Lipossomas. (adaptação: Voet & Voet, 1995).

Na última década, essas aplicações estenderam-se também até os processos de separação e purificação de biomoléculas e em diagnóstico, os quais envolvem o

reconhecimento molecular e adsorção na superfície de ligantes de afinidade específicos (Lasic, 1993). As aplicações de lipossomas em processos de adsorção por afinidade oferecem várias vantagens, tais como: a enorme área superficial das vesículas, cerca de $100 \text{ m}^2/\text{mL}$ para lipossomas de 200Å de raio; o seu pequeno tamanho facilita o controle cinético da adsorção, onde as limitações de transferência de massa são desprezíveis; a incorporação e o controle da densidade de ligantes na superfície e a sua estabilidade em relação a variações de pH e força iônica do meio [Powers, 1990].

3.5 - Lipossomas em imunoenaios.

Desde a sua primeira utilização em 1968 por Kynski et.al., os lipossomas vêm sendo estudados em aplicações na área de imunodiagnósticos, com vários trabalhos desenvolvidos nos últimos 10 anos.

Os imunoenaios podem ser usados para detectar analitos, tais como anticorpos, antígenos, hormônios ou drogas em amostras clínicas. Esses ensaios são fundamentados na ligação do analito à uma molécula, cuja afinidade é específica, seguida pela detecção do complexo resultante. As substâncias comumente usadas para reconhecimento molecular são: anticorpos, enzimas, lecitinas, proteínas transportadoras e receptores da superfície de células. As moléculas selecionadas para gerar o sinal de detecção são fluoróforos, marcadores de spins e marcadores radioativos.

Os lipossomas têm exibido grande potencial para o melhoramento de sinal e alta sensibilidade quando utilizados em aplicações de imunodiagnóstico. As vantagens que estas vesículas apresentam para a sua utilização em imunoenaios são: volume interior elevado, capaz de encapsular milhares de moléculas de um marcador, e grupos hidrofílicos na superfície que podem servir de sítios para o acoplamento de ligantes ou moléculas sinalizadoras. Estas vantagens podem ser evidenciadas na Figura 3.6. Comparado ao sistema convencional, usado em diagnóstico, no qual existem poucas moléculas sinalizadoras da ligação antígeno-anticorpo, os lipossomas oferecem a possibilidade de associar milhares de moléculas marcadoras para uma pequena quantidade de ligante, proporcionando assim maior sensibilidade e desempenho na detecção das moléculas de interesse [Singh e Carbonell, 1995].

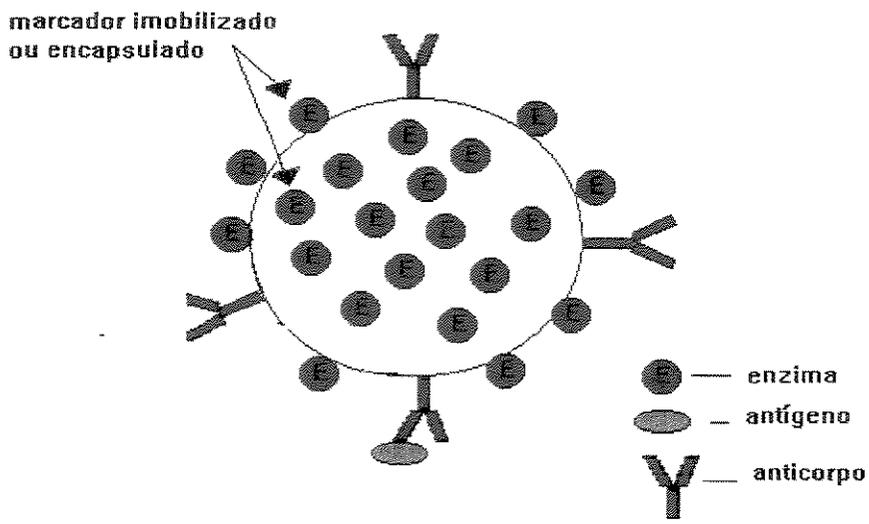


Figura 3.6 – Capacidade de associação de moléculas marcadoras (enzimas), ligantes específicos (anticorpos) e antígenos na estrutura dos lipossomas. (adaptação: Singh e Carbonell, 1995).

Os imunoenaios com lipossomas podem ser conduzidos de várias maneiras, tal como mostrado na Figura 3.7, e se classificam em ensaios homogêneos e heterogêneos. No ensaio heterogêneo, um procedimento de separação ou lavagem é necessário para retirar o excesso de moléculas livres não ligadas aos anticorpos. Nos ensaios homogêneos, a medida da extensão da reação é feita em solução sem a separação de componentes livres e ligados aos anticorpos. Os ensaios heterogêneos são mais longos que os homogêneos, entretanto a sensibilidade e precisão dos resultados são melhores, possibilitando o seu uso em uma maior gama de aplicações.

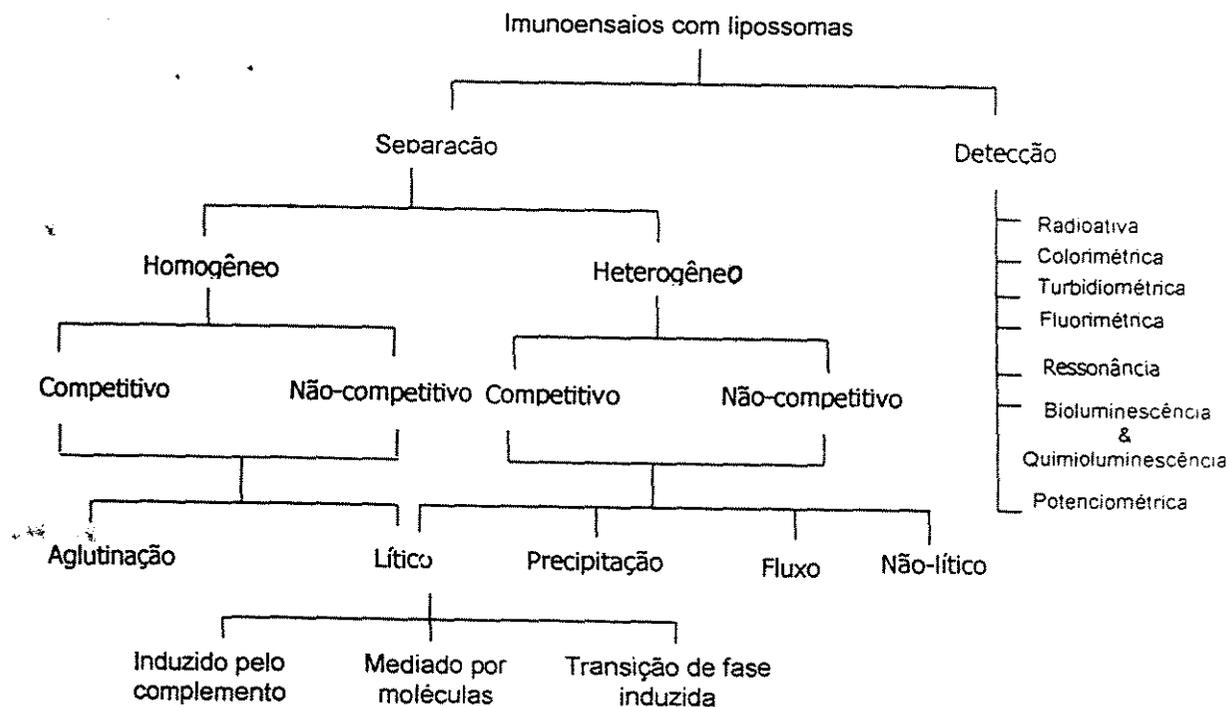


Figura 3.7 - Tipos de imunoenaios usando lipossomas. (Singh & Carbonell, 1995).

Cada ensaio pode ser dividido em 2 categorias: competitivo e não competitivo. No método competitivo para determinar antígenos, a quantidade de moléculas de anticorpos presente na solução (na forma homogênea) ou adsorvida na fase sólida é insuficiente para ligar todo o antígeno presente. Uma concentração conhecida de lipossomas contendo o antígeno é adicionada à amostra contendo o antígeno livre. A mistura é incubada com o anticorpo, permitindo a competição da ligação do antígeno na forma livre e na forma imobilizada na superfície do lipossoma. Nesse tipo de ensaio competitivo ou de inibição, o sinal é inversamente proporcional à concentração de antígeno na amostra. No ensaio não competitivo ou direto, as moléculas de anticorpo estão em excesso e o sinal é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra. Num outro tipo de ensaio, tipo sanduíche, o antígeno é ligado na forma de um sanduíche à 2 anticorpos diferentes, um para o reconhecimento e o outro marcador. Os ensaios homogêneos ainda podem ser de natureza lítica ou produzirem aglutinação e os heterogêneos podem ser líticos, não líticos ou desenvolvido em um sistema com escoamento [Singh & Carbonell, 1995].

Embora não tenham sido aplicados comercialmente em larga escala, os imunoenaios usando lipossomas possuem um grande potencial, evidenciado pelas centenas de patentes obtidas por companhias estrangeiras bem como por pesquisadores individuais.

Neste contexto, destacam-se os trabalhos de Janoff (1986) e Chaimovich (1996). Janoff et.al. empregaram lipossomas com o corante arsenazo III encapsulado no seu interior e contendo cardiolipina como antígeno para a detecção de auto-anticorpos. A geração do sinal foi baseada na transição de fases induzida na cardiolipina pela ligação de cátions divalentes. Já Chaimovich et.al. utilizaram lipossomas, contendo cardiolipina na superfície e carboxifluoresceína encapsulada no cerne aquoso, também para detectar anticorpos anticardiolipina. A geração do sinal foi obtida através da ligação dos auto-anticorpos na superfície da cardiolipina, provocando um novo rearranjo estrutural na molécula. Ambos os ensaios são do tipo lítico, pois ambos incorporam um ligante de afinidade na superfície dos lipossomas e encapsulam moléculas marcadoras no seu interior.

3.6 - Lipossomas polimerizados

Lipossomas polimerizados são agregados de monômeros anfifílicos contendo insaturações ao longo da unidade molecular, que constitui os grupos polimerizáveis. Essas insaturações nas cadeias de hidrocarbonetos permitem a polimerização dos monômeros por irradiação com luz ultravioleta, radiação- γ ou radiação térmica. Lipossomas polimerizados apresentam propriedades diferenciadas dos convencionais, tais como: aumento da estabilidade, aumento do tempo na circulação "*in vivo*" e amplificação das características óticas, como sinal e amplitude do espectro de absorção [Charych, D., 1998].

A natureza organizada de anfifílicos hidratados oferece várias características atrativas para aplicações dos lipossomas polimerizados nas ciências biológicas e de materiais e o número de trabalhos na literatura que utilizam essas vesículas tem aumentado nos últimos 5 anos. A bicamada lipídica fornece uma estrutura organizada para as reações de polimerização, embora as condições de polimerização, tais como temperatura e concentração não estejam bem definidas na literatura. Técnicas de

microscopia eletrônica e espalhamento quase elástico da luz demonstram que a polimerização não altera, significativamente, a forma ou diâmetro de vesículas, entretanto altera drasticamente suas propriedades. Os lipossomas podem ser polimerizados em vários locais da estrutura, como ilustrado na Figura 3.8.

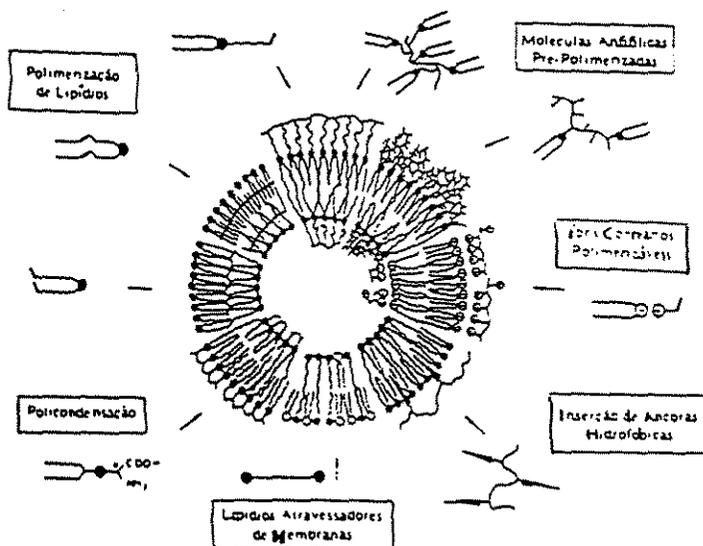


Figura 3.8 - Esquema da seção transversal de um lipossoma polimerizado, mostrando os vários sítios de polimerização. (adaptação: Lasic, D., 1993).

Vários são os grupos polimerizáveis empregados nos lipídios constituintes dos lipossomas. Os mais comuns são: diacetilenil, dienol, sorbil, metaciloil, aciloil e lipoil. Todos os compostos, exceto o grupo diacetilenil, podem ser polimerizados na fase líquido-cristalina. Já os anfífilos diacetilênicos são polimerizados eficientemente apenas na fase sólida ou na fase condensada das monocamadas de Langmuir. A polimerização parece, portanto, ser favorecida em condições nas quais a mobilidade das moléculas é diminuída, resultando em uma maior aproximação das mesmas, como a baixas temperaturas.

A polimerização das vesículas compostas por lipídios dissubstituídos pode decrescer a fluidez da bicamada, bem como a sua permeabilidade. Dados deste mesmo trabalho comprovaram que cadeias acil de comprimentos iguais penetram diferentemente na bicamada. É necessário cerca de 30% mol de lipídios com o grupo polimerizável no fim

da cadeia para polimerizar uma bicamada, contra apenas 10% mol do lipídio que contém o grupo polimerizável próximo à região polar. Esta diferença na efetividade da ligação se deve ao fato da maior liberdade conformacional de grupos reativos localizados no fim da cauda lipídica. O efeito da posição do grupo reativo pode ser compreendido melhor em termos de energia coesiva da cadeia alquil entre o grupo reativo e a cabeça polar [O'Brien, D.F. et al., 1998].

A figura 3.9 mostra o posicionamento do grupo diacetilênico em relação ao comprimento das cadeias alquilas, constituintes dos ácidos. Essas cadeias de ácidos podem ser usadas diretamente para a formação de lipossomas polimerizáveis ou como componentes das caudas de alguns fosfolipídios polimerizáveis. Estes ácidos diacetilênicos não são disponíveis comercialmente.

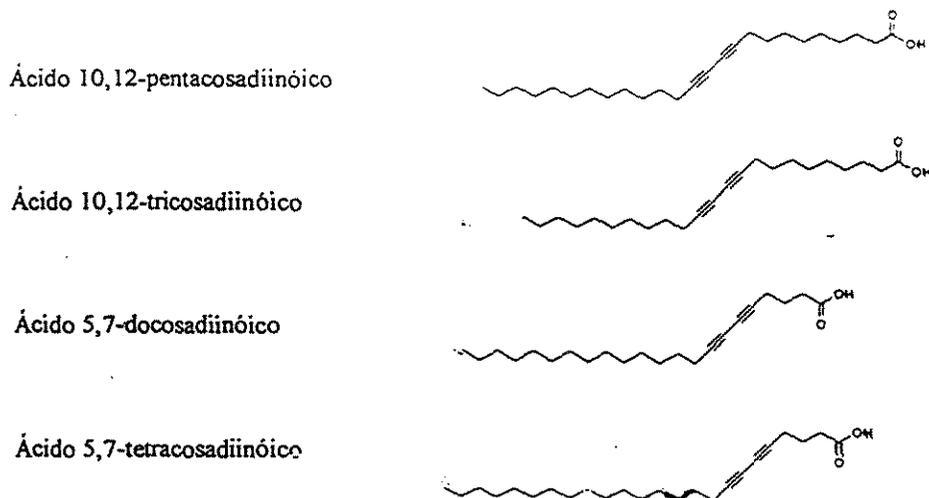


Figura 3.9 – Posições relativas dos grupos diacetilênicos nas cadeias de ácidos.

Esses ácidos diacetilênicos não são disponíveis comercialmente, porém podem ser obtidos através de síntese a partir do composto 1,4-bis(trimetilsilil)butadiino, precursor do grupo diino conjugado no ácido diacetilênico produzido [Hennies, P.T., 1996].

Os lipossomas polimerizados podem ser preparados pelos mesmos métodos usados para lipossomas convencionais. Em meio aquoso, a força motriz é o efeito hidrofóbico, que tende a agregar as moléculas anfifílicas em micelas ou bicamadas, expondo as suas porções hidrofílicas ao meio e escondendo as caudas hidrofóbicas.

As dimensões relativas entre caudas e cabeças são de extrema importância na formação das vesículas, uma vez que diferenças acentuadas podem favorecer a formação de estruturas inversas ou micelas. Na Figura 3.10 são apresentadas as várias estruturas agregadas formadas a partir de fosfolipídios.

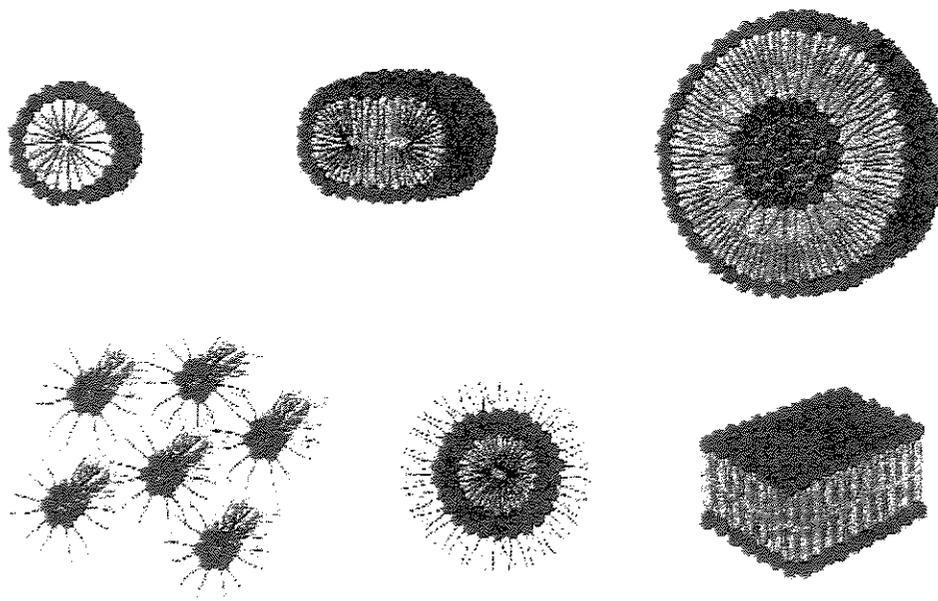


Figura 3.10 – Diferentes estruturas de agregação formadas a partir de fosfolipídios.

No caso de lipossomas formados de ácidos, o tamanho da parte polar é muito menor que a apolar, de modo que condições severas de sonicação devem ser usadas para impedir a agregação dessas moléculas. Lipossomas unilamelares estáveis compostos pelo ácido 10,12-hexacosadiinóico somente são preparados quando submetidos a sonicação por mais de 30 minutos [Ringsdorf, H. et al., 1980].

- Agregação de Moléculas Anfifílicas em Filmes de Langmuir-Blodgett.

Filmes de Langmuir-Blodgett consistem de moléculas anfifílicas dispostas em uma interface gás-líquido.

Quando moléculas anfifílicas são dissolvidas em solvente orgânico volátil e dispostas numa superfície aquosa, o solvente evapora, deixando a parte polar da molécula situada na água e a parte hidrofóbica na fase gasosa (ar). As forças que afetam

as regiões polares submersas na fase aquosa são de caráter iônico, enquanto as forças que governam as regiões hidrofóbicas são interações tipo Van der Waal's.

Ao comprimir estas moléculas na superfície aquosa, através de uma barreira móvel que exerce pressão, forma-se uma monocamada compacta. O gráfico da pressão superficial *versus* área ocupada por molécula à temperatura constante é conhecido como isoterma P – A. As isotermas são constituídas de 3 regiões distintas que caracterizam as propriedades de agregação das moléculas na monocamada, conforme ilustrado na Figura 3.11.

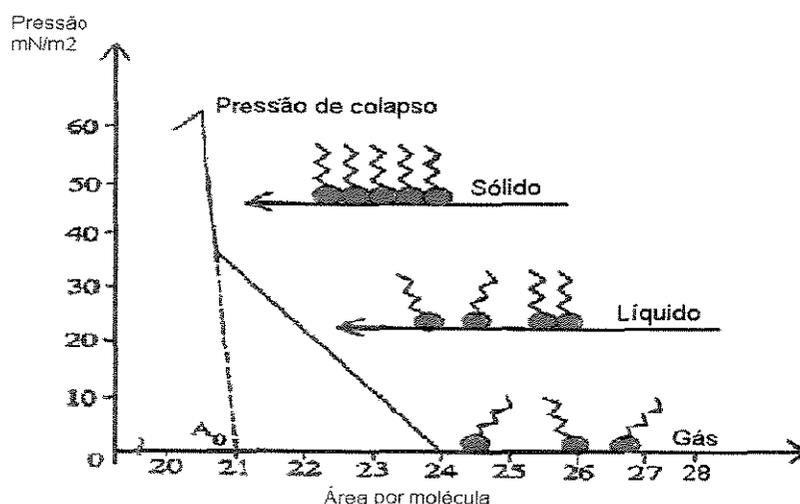


Figura 3.11 – Gráfico Pressão x área/molécula – Isoterma de Langmuir (Nima Technologies, 1995).

No instante inicial da deposição, quando não há pressão externa aplicada à monocamada, as moléculas comportam-se como gás bidimensional, cujo comportamento pode ser definido por:

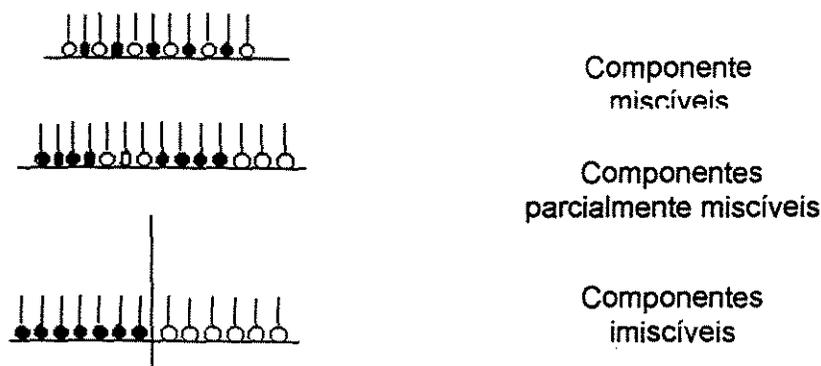
$$\pi A = kT \quad [1]$$

onde π é a pressão superficial, A é a área molecular, k é a constante de Boltzman e T a temperatura termodinâmica. À medida que a compressão aumenta, as moléculas vão se ordenando, assemelhando-se ao comportamento de líquidos bidimensionais. Com a contínua compressão da barreira sobre a superfície aquosa há um ordenamento da

monocamada, comportando-se agora como uma fase sólida. Este estado sólido é caracterizado pelas relações lineares entre a pressão superficial e a área molecular.

A pressão de colapso é alcançada com a perda irreparável da estrutura da monocamada. A força exercida é forte o suficiente para ejetar as moléculas densamente empacotadas para fora do plano da monocamada. A pressão de colapso pode então ser definida como a pressão máxima, na qual a monocamada pode ser comprimida sem a expulsão detectável de moléculas do filme de Langmuir para a formação de uma nova fase. Nessas condições a área por molécula representa a área mínima ocupada pelas moléculas no empacotamento, antes do colapso da monocamada [Nima, 1995 e Adamson, A.W., 1990].

Os filmes de Langmuir-Blodgett podem também ser usados para estudar as propriedades de agregação e mistura de dois ou mais componentes. A Figura 3.12 ilustra o comportamento de misturas de dois componentes na monocamada.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANT

Figura 3.12 – Distribuição molecular de um filme misto em superfície aquosa.

(adaptação: Gaines, G.L., 1966).

As propriedades das monocamadas nas quais os componentes são imiscíveis obedecem a equações, conhecidas como regra da aditividade, na qual a propriedade resultante da mistura é a soma da propriedade dos seus componentes individuais. Assim, a área por molécula ocupada por uma mistura binária, seria expressa pela equação 2.

$$A_{12} = N_1A_1 + N_2A_2,$$

[2]

onde A_{12} é a área ocupada por molécula na mistura, N_1 e N_2 são frações molares dos componentes e A_1 e A_2 são as áreas moleculares do filme de cada componente à mesma pressão.

Os desvios do comportamento da equação 2 fornecem evidências da miscibilidade dos componentes do filme e das suas interações. Para filmes mistos não homogêneos, torna-se necessário a investigação de várias propriedades para melhor interpretações da miscibilidade da agregação do sistema.

Informações valiosas para a verificação da miscibilidade de componentes agregados podem ser obtidas das isotermas de Langmuir, aplicando a regra das fases de CRISP, expressa pela equação 3 (in: Gaines, G.L., 1966):

$$F = C_b + C_s - P_b - q + 3 \quad [3]$$

Onde:

F = número de graus de liberdade

C_b = número de componentes do seio aquoso

C_s = número de componentes confinados na superfície da fase aquosa

P_b = número de fases existentes

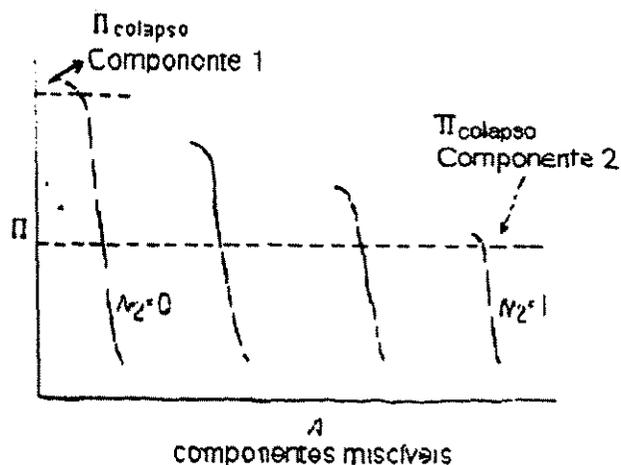
q = número de fases na superfície aquosa

No caso de misturas binárias, teríamos $C_b = 2$, $C_s = 2$ e $P_b = 2$, de maneira que o número de graus de liberdade seria: $F = 5 - q$.

Se os compostos forem miscíveis, havendo uma fase na superfície, o valor de F será referente a 4 graus de liberdade, que são temperatura, pressão externa, pressão interna e composição dos componentes. Se temperatura e pressão externa são fixas, então a pressão superficial e a pressão de colapso variará com a composição da mistura [Figura 3.13 A].

Caso os compostos sejam imiscíveis, haverá duas fases e o valor de F será referente a 3 graus de liberdade, que são temperatura, pressão externa e composição da mistura. Todas estas variáveis podem ser fixadas, e assim, qualquer que seja a fração dos componentes na mistura a pressão de colapso será sempre a mesma [Figura 3.13 B].

A)



B)

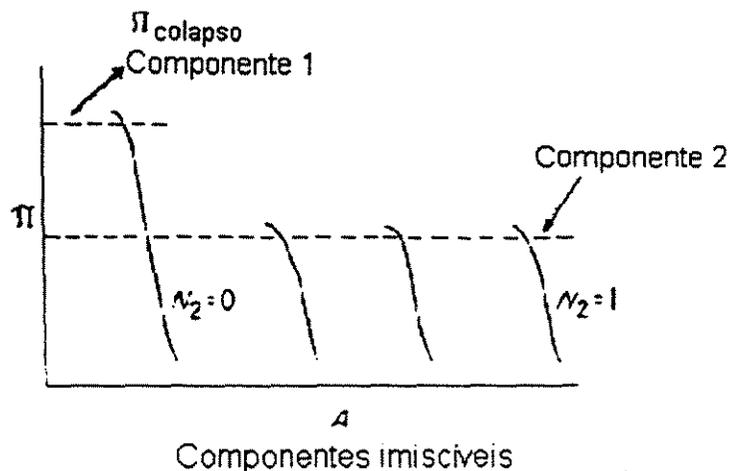


Figura 3.13 – Isothermas de componentes miscíveis (A) e Isothermas de componentes imiscíveis (B). (adaptação: Gaines, G.L., 1966).

As informações sobre a miscibilidade de compostos em monocamadas são importantes porque predizem o seu comportamento na bicamada lipídica dos lipossomas. Assim, vesículas mais estáveis são obtidas com componentes miscíveis, os quais produzem estruturas com distribuição mais uniforme das tensões, evitando pontos de fragilidade.

No caso das aplicações de lipossomas polimerizados usados para o reconhecimento molecular, a miscibilidade entre os componentes é de fundamental importância na transdução do sinal, uma vez que representa a situação de maior interação entre o ligante específico e os componentes estruturais das vesículas.

- Mudanças estruturais decorrentes da polimerização em filmes de Langmuir-Blodgett.

Diferentes classes de compostos orgânicos podem sofrer polimerização quando irradiados por luz ultravioleta. A polimerização de fosfolipídios insaturados e ácidos diacetilênicos presentes em agregados produz mudanças estruturais significativas no empacotamento dos compostos agregados.

Wegner [1977] realizou um estudo sobre a polimerização no estado sólido ou polimerização topoquímica de monômeros diacetilênicos e diolefinas. A Figura 3.14 mostra as mudanças estruturais que ocorrem após a polimerização.

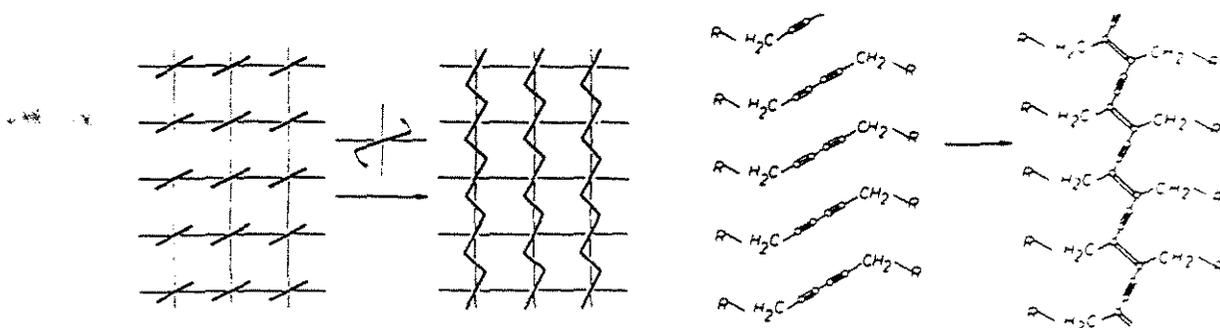


Figura 3.14 - Representação esquemática de uma polimerização topoquímica (esquerda) e de uma polimerização de diacetilenos (direita) (Wegner, 1977).

A polimerização em estado sólido de diacetilenos segue uma reação de adição 1-4 da tripla ligação presente na molécula monomérica. A reação pode ser iniciada termicamente, fotoquimicamente ou por irradiação γ . Na polimerização em estado sólido ocorre uma mudança de fase, devido às tensões mecânicas que são impostas à estrutura, com o crescimento das cadeias sob polimerização.

O empacotamento do monômero diacetilênico é o fator determinante para a reatividade em estado sólido. Quando o monômero na forma cristalina tem geometria apropriada, onde a distância d e o ângulo γ são cerca de 5 Å e 45° , respectivamente, torna-se possível a polimerização via topoquímica destas moléculas, passando nos comprimentos de onda referentes ao azul, púrpura e vermelho (Figura 3.15) (Sarkar et. al, 1998).

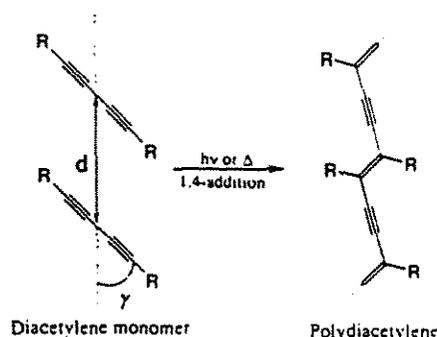


Figura 3.15 – Geometria apropriada do monômero na forma cristalina para a polimerização topoquímica de diacetilenos, onde $d=45^\circ$ e $\gamma=5 \text{ \AA}$. (Sarkar et al, 1998).

A exposição desses monômeros à irradiação não só provoca mudanças de fases, mas também mudanças de cores correspondentes à variações no espectro visível, como mostrado na Figura 3.16. À medida que aumenta-se o tempo de exposição do material à luz ultravioleta, aumenta-se também o crescimento da cadeia sob polimerização. Existe sempre uma absorção máxima obtida a um comprimento de onda maior que 600nm sob pequenos tempos de irradiação, o qual gradualmente muda com o tempo para uma absorção centrada em torno de 560nm. Finalmente com o aumento do tempo de irradiação, uma absorção máxima é obtida em torno de 490nm [Wegner,1977]. Deste comportamento, pode-se ressaltar que as mudanças observadas no espectro correspondem as diferentes conformações das cadeias dos monômeros, buscando sempre uma forma de acomodação mais estável no agregado polimerizado. Esse agregado torna-se cada vez mais empacotado à medida que aumenta-se o tempo de irradiação do material.

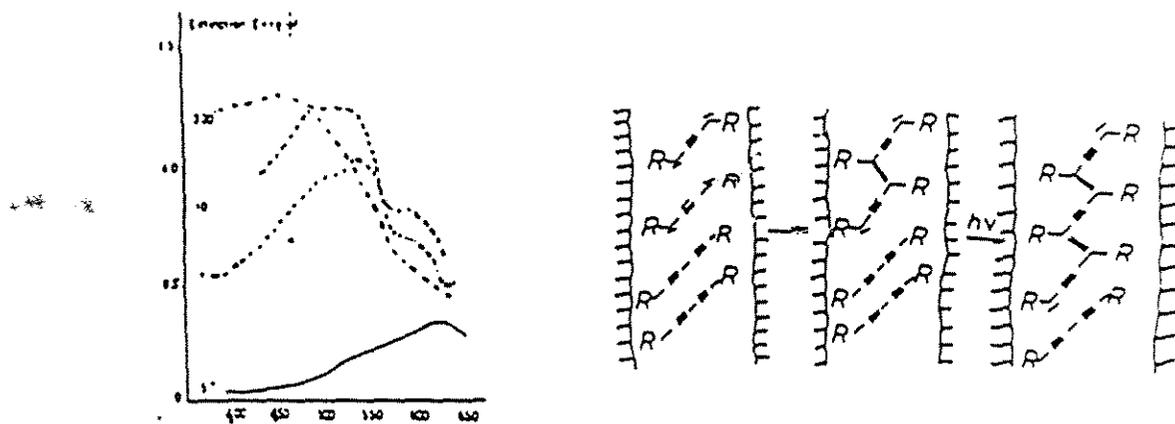


Figura 3.16 - Espectro transiente de um diino irradiado à $\lambda = 250\text{nm}$ após diferentes tempos de exposição. (Wegner, 1977).

Ainda utilizando derivados diacetilênicos que possuem ligações triplas em seus esqueleto, Tamura et al. (1991) verificaram que estes diacetilenos quando polimerizados sofriam transição de cor em solução, com conseqüente mudança reversível do azul ao vermelho, causada por alterações na temperatura, pH ou irradiação a luz UV. Um dos aspectos mais fascinantes da química dos polidiacetilenos é o cromismo destes materiais. Nesse mesmo trabalho os autores verificaram os efeitos da transição e mudança de cor no filme de Langmuir-Blodgett (LB) do ácido 10,12-pentacosadiinóico (PDA) a temperaturas diferentes (50°C e acima de 70°C). A mudança de cor do PDA polimerizado foi acompanhada em espectrofotômetro. Os possíveis mecanismos de transição e mudança de cor são ilustrados na figura 3.17. A transição de cor é causada pela mudança do comprimento do conjugado da ligação polidiacetilênica, a qual depende da ordem do arranjo dos grupos de cadeias laterais. A mudança de cor ocorre pela mudança do comprimento do conjugado efetivo o qual é causada pela desordem do esqueleto do polímero.

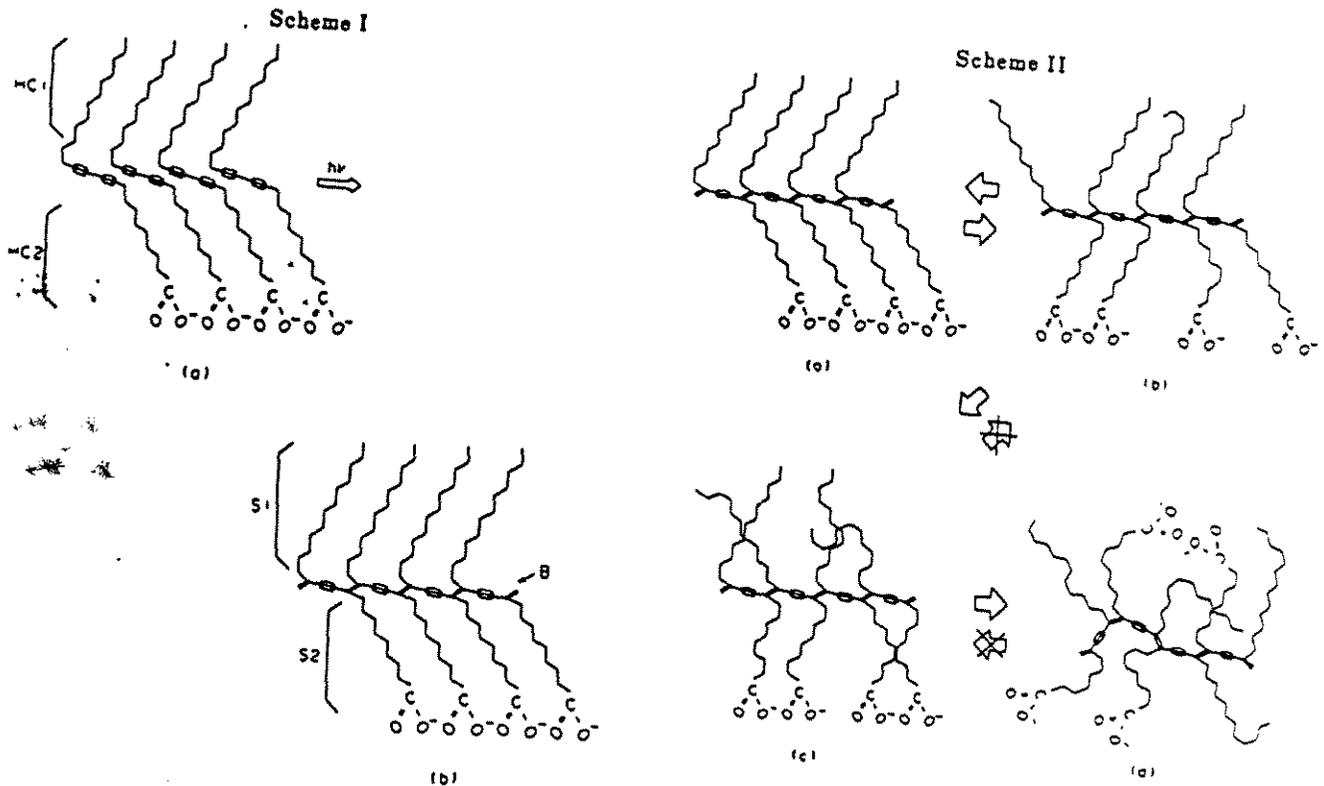


Figura 3.17 - Possíveis mecanismos de transição e mudança de cor de PDA.. (Tamura et al., 1991)

A transição de cor, analisada à 50°C, é observada no esquema II, a e b, no qual a cadeia lateral oscila reversivelmente ao contrário do esqueleto que não oscila. Verificou-se que a transição era reversível abaixo da temperatura de fusão dos monômeros PDA, que neste caso era de 67.1°C. A razão para a mudança de cor, de azul à vermelho, ocorrida à 72.8°C, pode ser explicada pela oscilação vigorosa e o emaranhamento das cadeias laterais (S1 e S2) que se aproximam muito uma da outra, como mostrado no esquema II.c. Esta mudança começa a ocorrer à temperaturas superiores à temperatura de fusão do monômero PDA. Este emaranhamento descaracteriza a estrutura original, provocando mudanças irreversíveis no esqueleto conjugado.

3.7 - Análises da transição e mudança de cor de lipossomas polimerizados

Lipossomas polimerizados apresentam as mesmas propriedades de transição e mudança de cor que os ácidos diacetilênicos (PDA) em monocamadas de Langmuir-

Blodgett. Charych et al. (1998) estudaram as mudanças de cor de vesículas polimerizadas compostas de PDA.

Se os grupos R do monômeros diacetilênicos forem projetados para transmitir o caráter anfifílico a molécula, o monômero reativo pode ser altamente organizado em filmes ou vesículas, formando agregados moleculares. Essas vesículas foram sensíveis a mudanças de cor do azul ao vermelho, por perturbações impostas ao sistema, como alterações na temperatura ou mesmo ligação de uma molécula na superfície da vesícula.

O polímero diacetilênico foi formado a partir da reação de adição do tipo 1-4 dos monômeros diacetilênicos e iniciado por irradiação UV apresentou inicialmente a coloração azul.

Nesse mesmo trabalho, foram estudadas as propriedades crômicas de vesículas-PDA. Os estudos mostraram que a transição de cor do azul ao vermelho está associada com a mudança conformacional do esqueleto do PDA de uma forma planar para uma não planar e que a localização das insaturações na cadeia lateral parece desempenhar uma função crítica nessa mudança de estrutura.

As transições de cor das vesículas polimerizadas foram monitoradas por espectroscopia de absorção visível, observando-se picos característicos da fase azul nos comprimentos de onda 620-640nm e da fase vermelha em 490-540nm. A intensidade de mudanças de cor foi avaliada, através da resposta colorimétrica em função do percentual de azul inicial. A percentagem de azul inicial, Pb_0 , foi definida como:

$$Pb_0 = A_{\text{azul}} / [A_{\text{azul}} + A_{\text{vermelho}}] \times 100\% \quad [4]$$

Onde A é a absorbância em ambos os comprimentos de onda. A resposta colorimétrica que caracteriza a conversão percentual à fase vermelha a uma dada temperatura e tempo foi expressa pela equação [5]:

$$CR = (Pb_0 - Pb_f) / Pb_0 \times 100\% \quad [5]$$

onde Pb_f é a percentagem final de azul após a transição termocrômica.

As vesículas converteram totalmente a fase azul à vermelha na faixa de temperaturas entre 61-68°C. A Figura 3.18 mostra a resposta colorimétrica para os 4 compostos usados na análise de cor, como função do tempo à 50°C.

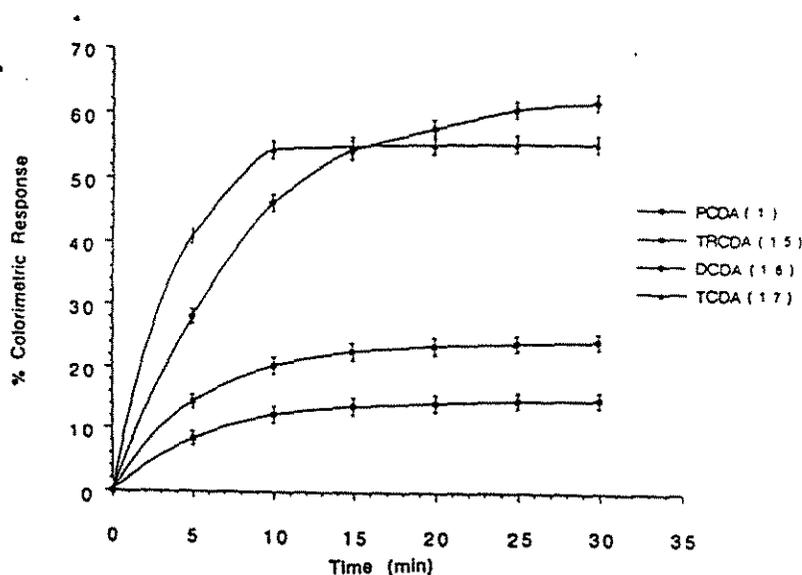


Figura 3.18 - Resposta Colorimétrica termocrômica de vesículas-PDA. (Charych et al., 1998).

Do gráfico, pode-se concluir que a resposta colorimétrica é dependente do posicionamento da tripla ligação do PDA ao longo da cadeia acila. Os resultados mostraram que a CR para o PDA que tinha a tripla ligação na posição 5-7 da cadeia foi 6 vezes maior que o PDA que tinha a tripla na posição 10-12. O efeito da posição do grupo diacetilênico pode ser compreendido melhor em termos de energia coesiva da cadeia alquil entre o grupo diino e a cabeça polar. A energia coesiva para o C-3 da cadeia alquil do PDA com o grupo diino na posição 5,7 foi de ~20KJ/mol comparada a ~55KJ/mol para o C-8 do PDA com o grupo diino na posição 10,12. Esses dados sugerem que quanto mais distante a ligação tripla estiver da cabeça polar, mais rígida a ligação em torno do carbono que antecede o grupo diino, estando a estabilização do conjugado associada à fase azul.

3.8 - Reconhecimento e transdução de sinal molecular com lipossomas.

Chaikof [1996] descreveu em seu artigo sobre materiais que mimetizam membranas biológicas, que os eventos de reconhecimento molecular em receptores localizados na superfície de membranas, podem ser convertidos em sinais mensuráveis. As propriedades de reconhecimento molecular e transdução de sinal dessas estruturas representam um modelo atrativo para o desenvolvimento de biossensores [Charych & Nagy, 1996]. Lipossomas são provavelmente a estrutura mais rudimentar e que melhor mimetizam às membranas biológicas. Essas membranas sintéticas formam estruturas supramoleculares altamente organizadas que assemelham-se as superfícies de células naturais na região interfacial. Associadas a um polímero conjugado cromofórico são capazes de transduzirem, através de propriedades óticas de absorção de luz, os eventos de reconhecimento molecular ocorrido na interface [Charych & Pan, 1997].

Janoff et al. [1983] utilizou lipossomas convencionais, contendo cardiolipina como antígeno (sítio de reconhecimento) para a detecção de auto-anticorpos do soro de pacientes portadores de LES. A geração do sinal foi baseada na transição de fases induzida na cardiolipina pela ligação de cátions divalentes, tais como Ca^{2+} e o Mg^{2+} . A Figura 3.19 mostra a representação esquemática do ensaio. Este sistema difere das membranas biológicas porque os autores utilizaram um corante encapsulado no interior dos lipossomas para gerar a resposta colorimétrica. Arsenazo III, um corante sensível à cátions divalentes foi utilizado. Os lipossomas foram preparados com 40% de cardiolipina (CL). A adição de Mg^{2+} na solução contendo lipossomas produziu a transformação de fase de bicamada pura hexagonal, resultando na lise dos lipossomas. O complexo formado entre o corante e os íons divalentes resultou em uma mudança de cor a qual foi quantificada por espectrofotometria. O ensaio foi do tipo competitivo e a presença de auto-anticorpos na amostra estabilizava a estrutura dos lipossomas, através da ligação com a CL, impedindo a ligação dos íons Mg^{2+} com o corante e consequentemente inibindo a mudança de cor.

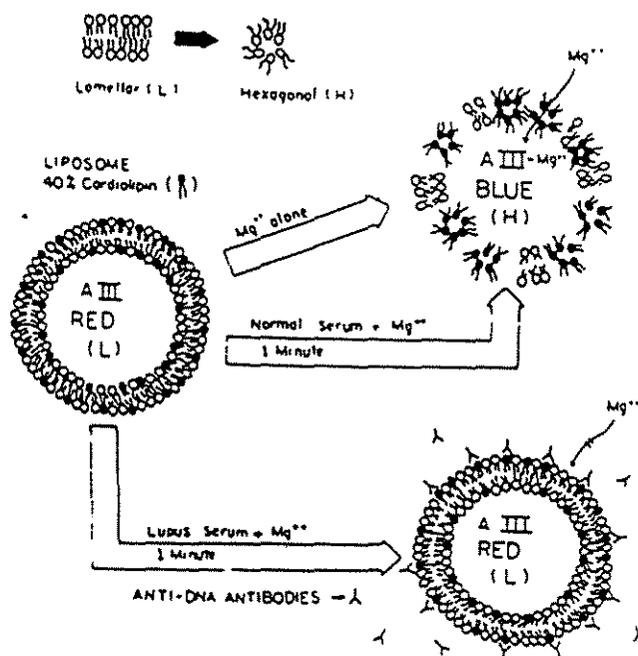


Figura 3.19 - Representação esquemática do sistema utilizado no ensaio para a detecção de auto-anticorpos usando lipossomas com cardiolipina como ligante de afinidade. (Janoff, A. et al., 1983)

Frost, S. J. e colaboradores (1996) afirmaram que a lise lipossômica significativa foi observada somente na presença de ambos anticorpos anti-CL e íons Mg^{+2} , sugerindo que sob estas condições de análises, sua combinação é necessária para qualquer grau de lise das vesículas. Esta afirmação é contraditória com aquela de Janoff e colaboradores, onde em seu artigo há relatado que a lise ou desestabilização da bicamada depende apenas da presença de cátions divalentes.

Chaimovich e colaboradores (1996) demonstraram que anticorpos anti-CL do isotipo IgG induzem o desprendimento de um marcador encapsulado em vesículas unilamerares pequenas de cardiolipina e fosfatidilcolina. A ligação de anticorpos anti-CL à CL na superfície dos lipossomas promove um rearranjo na bicamada, conduzindo ao vazamento do seu conteúdo interno. A quantidade vazada foi dependente da composição do meio.

Nesse mesmo artigo foi demonstrado que anticorpos anti-CL, encontrados em pacientes portadores do LES e sífilis, são capazes de se ligar a CL independentemente

da β 2-glicoproteína (β 2-GPI) a baixa força iônica, embora McNeil et al. tivessem sugerido que a β 2-GPI fosse essencial para a ligação entre anticorpos anti-CL e a CL. Harris et al já haviam relatado que embora o cofator aumentasse a ligação entre anticorpos anti-CL do LES e CL purificados, este efeito variava significativamente entre preparações de anticorpos.

Charych e colaboradores [1993] produziram um agregado polimerizado em bicamada, composto de uma monocamada de octadeciltriclorosilano e uma monocamada de um filme de LB-PDA funcionalizado com ácido siálico, para detectar eventos de reconhecimento molecular. Os autores escolheram o filme de LB-PDA para poder explorar as suas propriedades crônicas. Os monômeros lipídicos diacetilênicos foram polimerizados em monocamadas por irradiação com luz UV. Este filme foi projetado para sofrer mudança de cor, azul à vermelho, devido a interações receptor-ligante ocorrendo na superfície da bicamada. Charych e colaboradores [1995] também realizaram um experimento semelhante, utilizando lipossomas PDA funcionalizados com ácido siálico. Este sistema apresentou as vantagens de reconhecimento molecular e transdução do sinal molecular em uma única etapa. A bicamada resultante apresentou uma absorção máxima no espectro visível de 620nm característico da cor azul. Quando este filme foi incubado com o vírus influenza A, a ligação da hemaglutinina viral ao resíduo de ácido siálico na superfície, resultou na mudança de cor do azul para vermelho (550nm). Estes resultados demonstram que a transição de cor do PDA surge da ligação de afinidade entre a hemaglutinina e o ácido siálico.

O grau da mudança de cor foi rapidamente quantificado por espectroscopia de absorção na região visível. A quantificação da resposta colorimétrica no filme a uma dada quantidade do vírus foi calculada pela equação 5 do item 3.7. A resposta colorimétrica foi diretamente proporcional à quantidade de vírus ligada.

Charych [1995] na continuação de seus trabalhos, utilizando lipossomas-PDA de cor azul (resultante de 8 min de irradiação) e púrpura (resultante de 24 min. de irradiação), obteve respostas colorimétricas diferentes para uma mesma quantidade de hemaglutinina. A incubação da solução de lipossomas azul com 60 unidades de hemaglutinina de vírus influenza produziu uma resposta colorimétrica de 47%, enquanto os lipossomas púrpura, com a mesma quantidade de hemaglutinina viral, produziu uma resposta de 87%. Especulou-se que o aumento da sensibilidade do sinal dos lipossomas

púrpura deveu-se ao aumento do conteúdo do polímero. A fim de estudar os efeitos de adsorção não específica, os lipossomas foram preparados sem o ácido siálico na matriz lipídica. Estes lipossomas não apresentaram mudança de cor quando expostos ao vírus. A natureza específica da interação entre o vírus influenza e o ácido siálico foi confirmada por experimentos de inibição competitiva, mostrando que se adsorção não específica ocorre na superfície, parece não afetar a cor das soluções lipossômicas.

Outro trabalho semelhante foi realizado pelo mesmo grupo [1997], utilizando moléculas do gangliosídeo G_{m1} como receptores na superfície de lipossomas. As vesículas foram compostas de 95% de ácido 5-7-docosadiinóico e 5% de G_{m1} . A polimerização foi efetuada com lâmpada UV 254nm por 60 minutos, conduzindo à formação de cadeia polimérica com duplas e triplas ligações conjugadas, e o desenvolvimento de cor azul escuro/púrpura.

No ensaio colorimétrico, incubou-se, com a toxina de cólera, os lipossomas contendo G_{m1} . Determinou-se o espectro de absorção da luz na região visível. A análise dos espectros obtidos foram feitas comparando a intensidade do pico a 620nm(azul) com o pico a 490 nm (vermelho). A percentagem da fase azul a 620 nm foi então determinada pela relação percentual da sua intensidade da absorção a 620nm em relação à absorção total (620 + 490nm). A resposta colorimétrica foi calculada pela variação percentual da fração da fase azul após exposição à toxina.

Os resultados mostraram comportamento sigmoidal, sugerindo cooperatividade na transição colorimétrica, ou seja, a ligação do toxina ao gangliosídeo torna favorável as ligações subsequentes. A variação da cor indicou que a ligação toxina-gangliosídeo produziu perturbações no esqueleto do polímero, devido à movimentação da cauda da molécula de gangliosídeo imersa no interior da matriz polimérica. A sensibilidade da resposta colorimétrica foi maior quando o posicionamento do grupo acetilênico situou-se mais próximo à superfície dos lipossomas. A resposta na ausência de gangliosídeo foi de somente 6%, contra 43% com a presença de 233 $\mu\text{g/ml}$ de toxina, podendo considerar positivos os testes com CR maior que 7%. A substituição da toxina da coléra por outras proteínas, tais como a BSA, avidina e aglutinina de germe de trigo, produziu resposta negativa em todos os casos.

Seguindo a linha de reconhecimento molecular de biomoléculas em vesículas polimerizadas, Ma, Z. et al. (1998) utilizaram uma matriz PDA incorporada com um

glicolípido, DGG (dioctadecil gliceril éster- β -glicosídeo), para reconhecimento de *Escherichia coli* em solução de NaCl. Para isto foram usados dois tipos de diacetilenos: ácido 2,4-tricosadiinóico (TCDA) e ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA). Houve mudança de cor (azul/vermelho) nas vesículas de TCDA/DGG quando expostas à solução de NaCl com *E. coli*. O mesmo não aconteceu com as vesículas de PCDA/DGG, comprovando que a posição do grupo diacetilênico no lipídio desempenha uma função dominante na resposta colorimétrica.

Dados de isotermas, comprovaram que o TCDA ocupa $20,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ à uma pressão de ruptura de 55 mN/m^2 e o PCDA ocupa $27,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ à pressão de 15 mN/m^2 . Uma análise da interação entre TCDA/DGG e PCDA/DGG foi realizada plotando um gráfico de fração molar de DGG *versus* área molecular ocupada pela fração, conforme figura 3.20. Observou-se desvios negativos da área molecular para o TCDA, em relação à regra da aditividade, indicando que existe forte interação e boa miscibilidade, o que não acontece com o PCDA, pois o desvio positivo sugere que existem fortes forças de repulsão entre as moléculas.

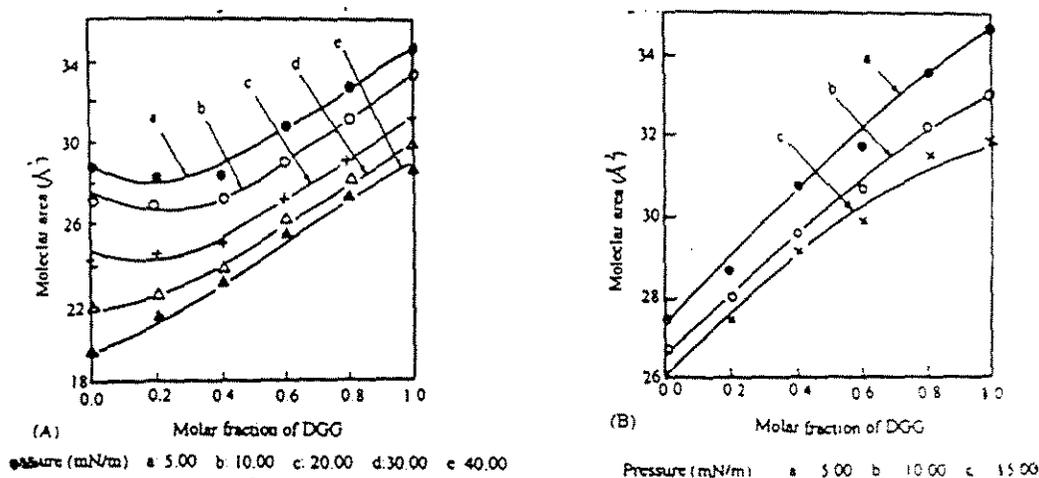


Figura 3.20– Área molecular de monocamadas mistas, compostas por TCDA/DGG (A) e PCDA/DGG (B), como função da fração molar de DGG a diferentes pressões de superfícies na água pura, pH 5,8. (fonte: Ma, Z et. Al., 1998).

Mudança de cor também foram observadas em vesículas polimerizadas compostas pelo ácido 10-12-tricosadiinóico e dimiristoilfosfatidilcolina(DMPC), quando as mesmas foi

adicionada a enzima fosfolipase (PLA_2). A PLA_2 catalisa a reação pela hidrólise da ligação acil-éster, exclusivamente na posição 2 do glicerofosfolípido (figura 3.21). No estado inicial aparecem na cor azul intensa como resultado da absorção de luz no comprimento de onda de 620nm. A suspensão rapidamente se tornou vermelha quando a PLA_2 foi adicionada, exibindo um comprimento de onda máximo em torno de 540nm, podendo a mudança de cor ser regulada pela alteração da percentagem molar do lipídio natural DMPC, permanecendo azul. Neste caso, a mudança de cor ocorreu pela modificação química das vesículas, devido a catálise interfacial da PLA_2 (Charych, D. et.al., 1999).

A mudança de cor das vesículas foi atribuída a reorganização lipídica e desestabilização dos mesmos pela hidrólise do DMPC incorporado na matriz de PDA.

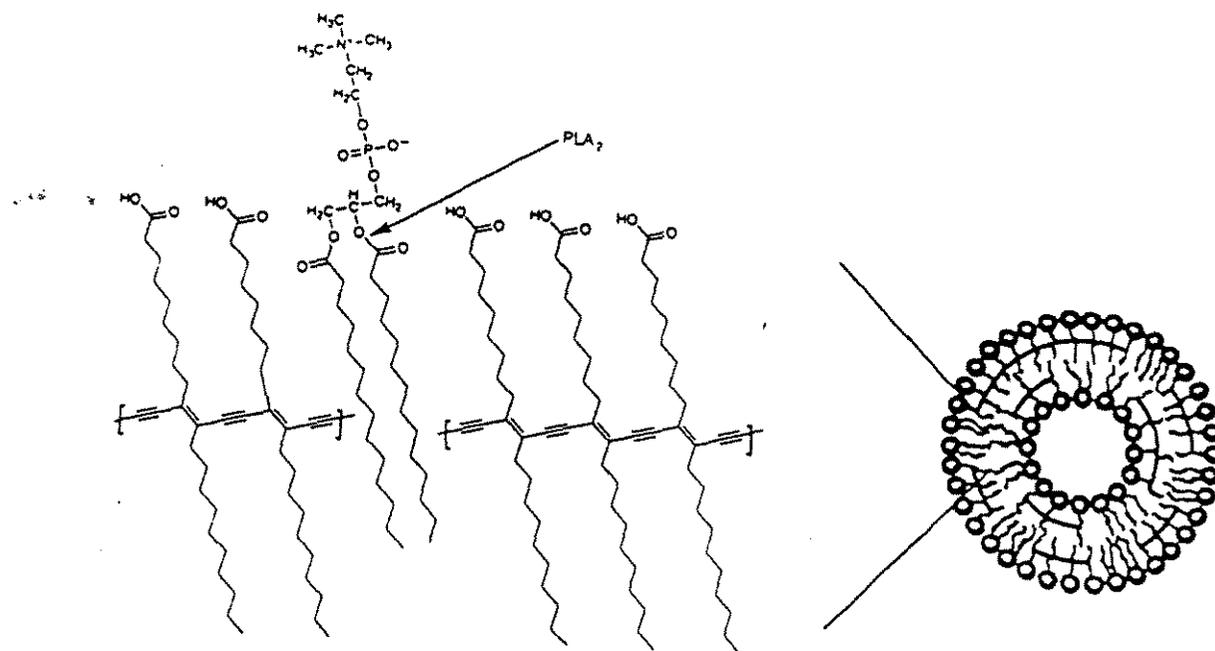


Figura 3.21 – Vesículas biocrômicas, compostas de DMPC natural, mostrando o ataque da enzima PLA_2 . (Charych et. al., 1999).

Assim, podemos concluir que os lipossomas polimerizados podem ser utilizados como biossensores, pois estes sistemas mudam de cor, rapidamente, em resposta direta ao reconhecimento molecular na superfície dos lipossomas. A natureza multivalente da superfície dos lipossomas oferece a possibilidade de associação de ligantes biológicos de modo semelhante às membranas celulares.

Capítulo 4

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, serão discutidos os principais materiais e equipamentos utilizados, além da metodologia empregada no desenvolvimento de cada análise.

No item relacionado à metodologia, encontra-se a descrição dos seguintes experimentos: estudo da agregação de misturas de lipídios com cardiolipina em filmes de Langmuir-Blodgett, preparação e caracterização de lipossomas com lipídios polimerizáveis, quantificação da cardiolipina em misturas de lipídios, ensaios de polimerização, identificação qualitativa e quantitativa de soros auto-ímmunes e ensaios batelada de adsorção de imunoglobulinas em lipossomas polimerizados.

4.1 – Material

- *Preparação dos lipossomas polimerizados:* DC_{8,9}PC [1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosfocolina] obtido da Avanti Polar Lipids INC.; DC₂₁₅PC [1,2-bis(3,5-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosfocolina e PDA [ácido 10,12-tricosadiinóico] gentilmente cedido por Paulo de Tarso Hennies; Cardiolipina [Difosfatidilglicerol (sal sódico)] e tampão HEPES (N-[2-Hidroxietilpiperine-N'-[ácido etanosulfônico)], fornecido pela Sigma Chemical Co. e clorofórmio de grau analítico obtido da Merck.
- *Análises quantitativas dos fosfolipídios e análise qualitativa da integridade da bicamada lipídica:* ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico (HCl), peróxido de hidrogênio livre de fosfato (H₂O₂), e ácido ascórbico (C₆H₈O₆) obtidos da Merck; Molibdato de amônio ((NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Na₂HPO₄.7H₂O) obtidos da Ecibra (Brasil); C₁₂E₅ – Polioxietileno-5-Lauril éter obtido da Sigma Chemical Co.; Membranas de policarbonato – 100nm poro x 25mm diâmetro fornecida pela Poretics products;
- *Adsorção de imunoglobulinas em lipossomas polimerizados:* Imunoglobulinas G (IgG) em solução salina 0.9%, usada em terapia de reposição de pacientes com deficiência de IgG, obtida da Sandoz (Suíça); soro de indivíduo sadio (Samantha

de Pinho, 25 anos); soro auto-imune composto por mistura de soros de indivíduos portadores de doenças auto-imunes (designado como "pool 11") obtido do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP); reagente para IgG e solução de calibração de IgG para nefelometria obtidos da Beckman (EUA); kit Kallestad anticardiolipina obtido da Sanofi Diagnostic Pasteur; soro de referência, composto de proteínas do soro humano, obtido do kit anticardiolipina anteriormente citado; monolaurato de polioxietileno sorbitan (tween-20) obtido da Aldrich.

Durante os experimentos, utilizou-se água deionizada de grau analítico milli-Q.

4.2 – Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram:

- Espectrofotômetro HITACHI, modelo 2001; Evaporador rotatório ART LAB; Banho térmico Yamato, modelo RE52; Extrusora de aço inox de 10mL de volume, com camisa térmica para circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranas Inc.; Leitora de placas do tipo ELISA, modelo EL_x 808 da Bio-Tek Instruments, INC.; Balança de Langmuir-Blodgett tipo 611, número de série 061, fabricada pela Nima Technology, Coventy, Inglaterra; Equipamento de detecção de espectro Malvern Autosizer, modelo 4700; Espectrofotômetro de UV-visível, modelo HP 8042 – A; Peltier, modelo HP 89090; Lâmpada UV Germitech 65W; Sonicador modelo UC 50, Sonics & Materials INC.; Microcalorímetro VP-DSC, MicroCal INC.; Nefelômetro Beckman Array Protein (USA); Espectrofotômetro SpectraMax 190 (USA);

4.3 – Métodos

4.3.1. – Estudo da agregação de misturas de lipídios com cardiolipina em filmes de Langmuir-Blodgett.

O estudo da agregação das moléculas lipídicas em monocamadas foi feito através das isotermas de *pressão x área/molécula*, obtida dos filmes de Langmuir-Blodgett.

Os filmes mistos foram constituídos das misturas do fosfolipídio diacetilênico (DC_{8,9}PC) e cardioplipina (CL) e do ácido diacetilênico (PDA) e cardioplipina (CL) com composição de cardioplipina variando de 0 a 100 (mol %). Em ambos os casos, o procedimento experimental foi o seguinte: inicialmente os lipídios foram devidamente pesados e solubilizados em Clorofórmio na concentração de 1mg /1mL CH₂Cl₂. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 50µL dessa solução, aplicando-a com uma seringa, no centro da cuba da balança de Langmuir-Blodgett, contendo água. A velocidade da barreira móvel da balança foi calibrada para 100cm/min e efetuada a medida da temperatura da água.

As isotermas foram obtidas através de medidas automatizadas da pressão superficial durante a compressão, registrada em um gráfico de *pressão x área/molécula*. Os ensaios foram conduzidos em balança de Langmuir, tipo 611, fabricada pela Nima Technology.

4.3.2 – Preparação e caracterização de lipossomas formados por ácidos diacetilênicos.

4.3.2.1 – Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelo método da hidratação do filme seco de lipídios e sonicação (NEW, 1990). Os lipídios foram solubilizados em Clorofórmio e posteriormente, o solvente foi evaporado à vácuo, em evaporador rotatório, até a formação de um filme seco de lipídios no fundo do balão. Este filme foi em seguida hidratado com água deionizada, sob agitação, para a formação de vesículas multilamelares. Os lipossomas foram homogeneizados e tornados unilamelares através de sonicação à 80°C (acima da transição de fase dos componentes), durante 25 minutos e de modo intermitente(30s ligado; 30s desligado).

O tempo de sonicação foi estabelecido através de ensaios preliminares de modo a se obter vesículas unilamelares mais homogêneas. As suspensões formadas pela mistura de PDA/CL 20% foram sonicadas em diferentes tempos de sonicação.

4.3.2.2 – Quantificação de cardiolipina.

A cardiolipina foi quantificada através do teor total de fosfato (PO_4^{4-}) nas amostras, segundo o método de Chen (1956), com modificações introduzidas por Moraes, A. (1996) e Ribas, A (1997). O método consiste na oxidação com H_2SO_4 dos compostos de carbono a carbono elementar, que é transformado a CO_2 pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O fósforo é convertido em ortofosfato que forma um complexo com molibdato de amônio, sendo em seguida reduzido pelo ácido ascórbico, fazendo surgir a cor azul. A intensidade da cor produzida é proporcional ao teor de cardiolipina presente na amostra, o qual é quantificado através da curva de calibração de absorvância x concentração de fósforo, previamente construída.

Utilizou-se $100\mu\text{L}$ de solução em cada tubo de ensaio (amostras, padrões fosfato e o branco), juntamente com $500\mu\text{L}$ de H_2SO_4 10N. Os tubos foram aquecidos em placa térmica (em capela) à 200°C por 30 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se $165\mu\text{L}$ de H_2O_2 isento de fosfato, em cada um dos tubos, aquecendo-os por mais 30 minutos em placa térmica à 200°C . Após resfriamento até a temperatura ambiente, adicionou-se 4mL de água deionizada, $500\mu\text{L}$ de solução de molibdato de amônio e $500\mu\text{L}$ de uma solução 8% de ácido ascórbico. Os tubos foram, posteriormente, aquecidos em água à 100°C por 7 minutos, favorecendo o aparecimento da cor azul. Em seguida foram resfriados e a intensidade da cor medida a 830nm.

4.3.2.3 – Determinação do raio hidrodinâmico.

O raio hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das vesículas foram determinadas por espalhamento quase elástico da luz - “quasi-elastic light scattering” – em equipamento de detecção de espectro Malvern Autosizer. A técnica baseia-se na dependência das flutuações de intensidade do espalhamento de luz em função do tempo, devido ao Movimento Browniano das partículas em suspensão. Partículas menores difundem-se mais rápido do que partículas grandes e a taxa de flutuação da intensidade de luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão (New, 1990). O coeficiente de difusão médio translacional dos lipossomas

em solução diluída pode ser medido e o raio hidrodinâmico médio, R_h , é calculado pela equação de Stokes-Einstein (Lasic, D. et al, 1991):

$$R_h = (kT)/(6D\mu) \quad [6]$$

Onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, D é o coeficiente de difusão das partículas e μ é a viscosidade do solvente. O equipamento utilizado foi um Autosizer 4700, acoplado a um sistema de aquisição de dados. A análise dos dados feita através do software PCS 4700. As medidas foram realizadas a um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente, conforme esquema da figura 4.1.

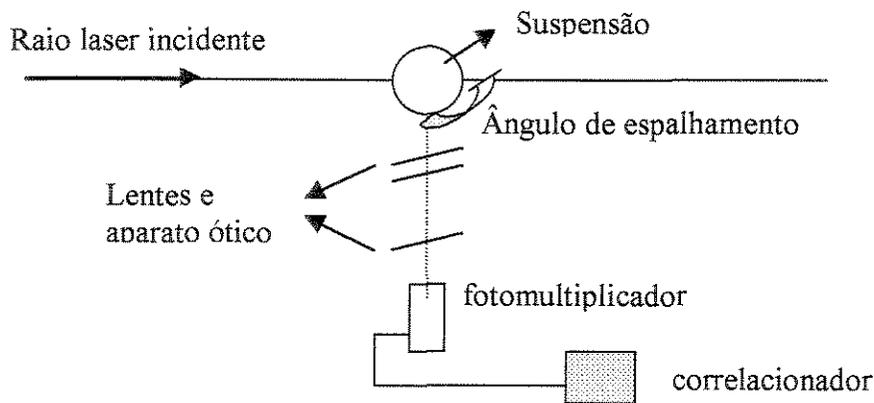


Figura 4.1 – Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho de partícula por espalhamento de luz (adaptado de Ostrowsky, 1993).

4.3.2.4 – Ensaio de estabilidade de lipossomas.

Os ensaios de estabilidade de lipossomas em presença de tensoativos não-iônicos permite obter informações sobre o empacotamento e a integridade da bicamada lipídica. Neste trabalho, foi usado o tensoativo não iônico $C_{12}E_5$, e a estabilidade dos lipossomas monitoradas através de medidas de turbidez total das soluções, expressa em termos de absorbância.

As medidas de turbidez total das soluções foram feitas em placas de microtitulação de poliestireno, com 96 poços ($200\mu\text{L}$) de fundo redondo a 340nm , usando leitora de placas do tipo ELISA – “microtiter plate reader”.

A cada um dos poços da placa foram adicionados 120 μ L de soluções estoque de tensoativo de diferentes concentrações (na faixa de 3 a 96%), dissolvidos em tampão HEPES 10 mM (pH 7.4), com 80 μ L de lipossomas 2,5mM. As amostras foram preparadas em triplicatas e distribuídas conforme esquema da figura 4.2. Os valores médios das absorbâncias foram subtraídos das soluções da mesma concentração de tensoativo isenta de lipossomas (brancos). Os brancos foram constituídos por 120 μ L de solução de tensoativo na concentração desejada e 80 μ L de solução tampão.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
B	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
C	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
D	br0	br5	br10	br20	br30	br40	br50	br60	br70	br80	br90	br96
E	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
F	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
G	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
H	br3	br7	br15	br25	br35	br45	br55	br65	br75	br85	br93	br100

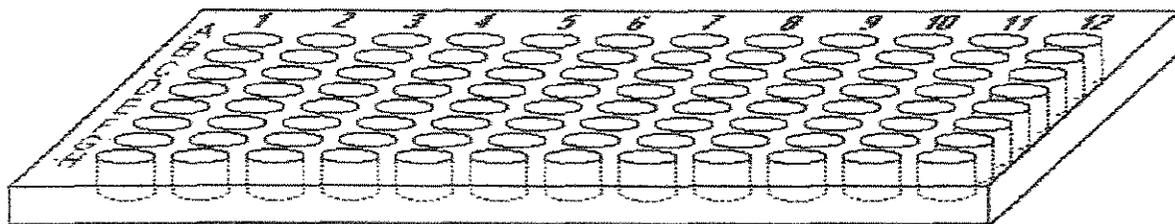


Figura 4.2 – Disposição das amostras em placas de polietileno do tipo ELISA.

4.3.2.5 – Ensaio de polimerização

Os ensaios de polimerização foram realizados a fim de determinar o tempo de polimerização das suspensões para as faixas do azul ($\lambda=635\text{nm}$), púrpura ($\lambda=540\text{nm}$) e rosa ($\lambda=480\text{nm}$). Para isso utilizou-se suspensões de lipossomas compostas de PDA/CL 20%. O esquema da figura 4.3 ilustra a montagem experimental usada nos ensaios de polimerização.

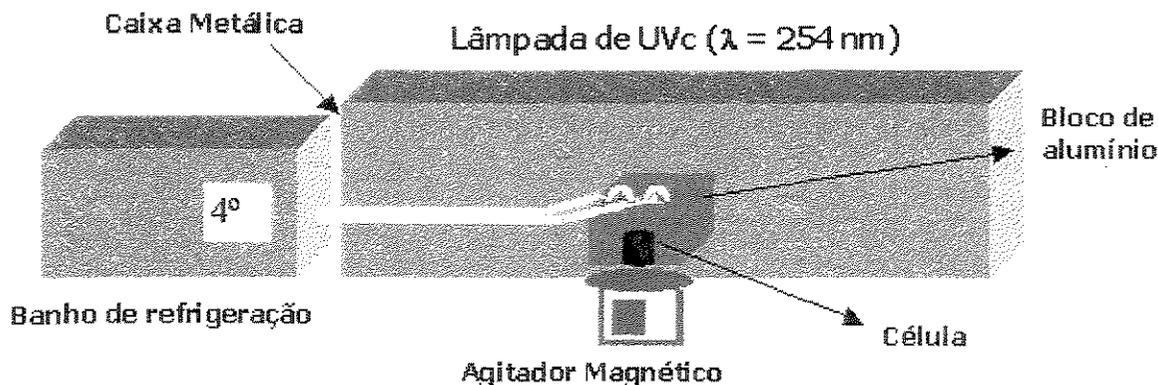


Figura 4.3 – Esquema de montagem da polimerização direta da suspensão lipossomal formada por PDA/CL 20%.

Inicialmente, a amostra foi resfriada à 4°C por 15 minutos na jaqueta térmica. Após esse tempo cubeta foi colocada à distância de 4 cm da lâmpada e iniciada a irradiação. Nessas condições a intensidade de luz, medida através de radiômetro, foi de aproximadamente 2.90mW/cm². A polimerização foi acompanhada através dos espectros de absorção das amostras a diferentes tempos de exposição à irradiação UV.

4.3.2.6 – Microscopia de transmissão eletrônica (TEM)

A microscopia de transmissão eletrônica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por NEW [1990].

As imagens foram feitas com lipossomas compostos de PDA e CL 20% (solução 1mM). As amostras foram colocadas em uma tela de aço Inox (d=3mm) cobertas com filmes hidrofóbicos de paríódio e carbono, filme de mancha negativa. Inicialmente, adicionou-se uma gota da amostra polimerizada e aguardou-se 10 minutos para que a amostra aderisse na tela. O excesso de líquido foi removido com papel de filtro (whatman nº!), posicionado perpendicularmente à borda da tela. Após 30 minutos, tempo necessário para a completa secagem da amostra, adicionou-se sobre a tela uma gota do corante negativo, acetato de uranila 2% (em água deionizada). O excesso do corante foi removido com papel de filtro (da mesma maneira já citada acima) e esperou-se a secagem total da tela antes de proceder a microscopia.

4.3.2.7 – Microcalorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os ensaios para a determinação da temperatura de transição de fase dos lipossomas monoméricos, formados de ácido diacetilênico e 20% de cardiolipina preparados à pH 5.7 e 6.2, foram estudados por microcalorimetria diferencial de varredura. Nessa técnica, as temperaturas da amostra e da referência aumentam linearmente com o tempo e a diferença entre elas é mantida igual a zero. À medida que a amostra sofre uma transição endotérmica, é fornecida uma certa quantidade de energia, de maneira que sua temperatura mantenha-se igual à da referência. Essa quantidade de energia representa a entalpia de transição de fase. Na ausência de eventos térmicos, obtêm-se uma linha base.

No procedimento dos ensaios, usou-se 0,5mL de amostra e a mesma quantidade de água como referência. Várias varreduras de 20–70°C foram realizadas a uma taxa de 30°C/hora.

4.3.3 – Ensaio de adsorção de anticorpos em lipossomas polimerizados.

4.3.3.1 – Identificação dos “pools” de soros contendo anticorpos antifosfolípidos.

A identificação dos “pools” de soros contendo anticorpos antifosfolípidos foi realizada com o intuito de selecionar os soros que posteriormente seriam usados nos ensaios de adsorção de anticorpos.

O ensaio foi feito conforme metodologia descrita por Fernandes et.al. (1990). Em uma placa de poliestireno de fundo chato (96 poços), colocou-se 100µL de solução 50µg/mL de cardiolipina. Incubou-se a placa a 4°C por uma noite. A seguir, a placa foi lavada com 200µL de tampão fosfato/Tween 20 (0.5% v/v). Posteriormente, adicionou-se 200µL da solução de lavagem acrescida de 5% de soro fetal bovino. A placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, lavando-se 3 vezes com tampão fosfato/Tween 20 ao final desse tempo. Em cada poço, colocou-se 100µL dos “pools” de soros a diversas diluições, incubando-se novamente à 4°C por uma noite. Ao final do processo, a placa foi lavada 3 vezes, conforme descrito anteriormente. Para a detecção dos anticorpos adsorvidos na placa, adicionou-se 100µL de anticorpos do isotipo IgG e IgM conjugados

com peroxidase, incubando-se por 30 minutos. Após lavagem a reação antígeno-anticorpo foi revelada com 100 μ L de ácido sulfúrico 1N. Dos 13 “pools” testados, apenas um deu resultado bastante positivo quanto à presença de anticorpos anticardiolipina.

4.3.3.2 – Quantificação de anticorpos anticardiolipina nos “pools” de soros auto- imunes.

A quantificação de auto-anticorpos antifosfolípidos nos “pools” de soros foi realizada através do kit Kallestad da Sanofi Diagnostic Pasteur, conforme procedimento padrão recomendado e fornecido pelo fabricante.

4.3.3.3 – Adsorção dos auto-anticorpos na superfície dos lipossomas polimerizados.

Os ensaios de adsorção foram realizados com o objetivo de determinar a seletividade, especificidade e reprodutibilidade dos lipossomas polimerizados na detecção dos anticorpos antifosfolípidos.

Os processos foram conduzidos em cubeta de quartzo de 3mL e em microplacas do tipo Elisa.

ENSAIOS EM CUBETA

- Ensaios com soro de referência (IgG/anti-CL) e imunoglobulinas G (IgG não específica).

A avaliação da ligação de anticorpos nos sítios de cardiolipina presentes na superfície dos lipossomas polimerizados foi feita usando soro de referência (IgG/anti-CL) e imunoglobulina G. Inicialmente, adicionou-se 1,5mL de lipossomas polimerizados (0.5mM) na faixa do azul ($\lambda=635\text{nm}$) à cubeta de quartzo de 3mL. Em seguida, foi adicionado à cubeta volumes de 50 μ L de soluções de soro de referência (IgG/anti-CL). Após cada adição, esperou-se 10 minutos e então foram feitas varreduras na faixa de 400 a 700nm.

O ensaio prosseguiu até a estabilização da coloração rosa ($\lambda=540/480\text{nm}$) e constância dos espectros.

Repetiu-se esse ensaio para lipossomas polimerizados na faixa do azul ($\lambda=635\text{nm}$) a 1mM e para lipossomas polimerizados na faixa do púrpura ($\lambda=540\text{nm}$) à 0.5mM.

O mesmo procedimento foi usado para IgG não específica, com lipossomas nas 3 condições; polimerizados na faixa do azul ($\lambda=635\text{nm}$) à 0.5mM e 1.0mM e polimerizados na faixa do púrpura ($\lambda=540\text{nm}$) à 0.5mM.

- Ensaio com soros sadios e auto-ímmunes

A avaliação da ligação dos auto-anticorpos nos sítios de cardiolipina presentes na superfície dos lipossomas polimerizados foi feita usando soro de indivíduo sadio e soro auto-ímmune, pertencente ao “pool 11”, previamente caracterizado.

Inicialmente, adicionou-se 1,5mL de lipossomas polimerizados (0.5mM) na faixa do azul ($\lambda=635\text{nm}$) à cubeta de quartzo de 3mL. Em seguida, foi adicionando à cubeta volumes acumulativos do soro a várias diluições. Após 10 minutos foram feitas varreduras na faixa de 400 a 700nm em espectrofotômetro. O ensaio prosseguiu até que os espectros obtidos permanecessem inalterados.

Os soros foram usados na sua forma original e nas diluições: 1/20, 1/50, 1/100 e 1/200 (soro sadio) e 1/20 e 1/50 (soro auto-ímmune).

ENSAIOS EM PLACAS DO TIPO ELISA

A avaliação da ligação dos auto-anticorpos nos sítios de cardiolipina presentes na superfície dos lipossomas polimerizados, em placas do tipo ELISA com 96 poços, foi feita usando soro de indivíduo sadio e soro auto-ímmune, pertencente ao “pool 11”. Inicialmente, adicionou-se, em cada poço, 150 μL de lipossomas polimerizados (0.5mM) na faixa do azul ($\lambda=635\text{nm}$). Em seguida, foram adicionados 50 μL de soro sadio e auto-ímmune na sua forma original e nas diluições: 1/20, 1/50, 1/100, 1/500. Foram realizadas varreduras na faixa de 400 a 700nm, a cada 10 minutos até 1 hora após a adição. Antes de cada leitura o sistema foi agitado por 5s.

Capítulo 5

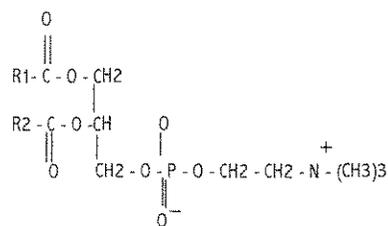
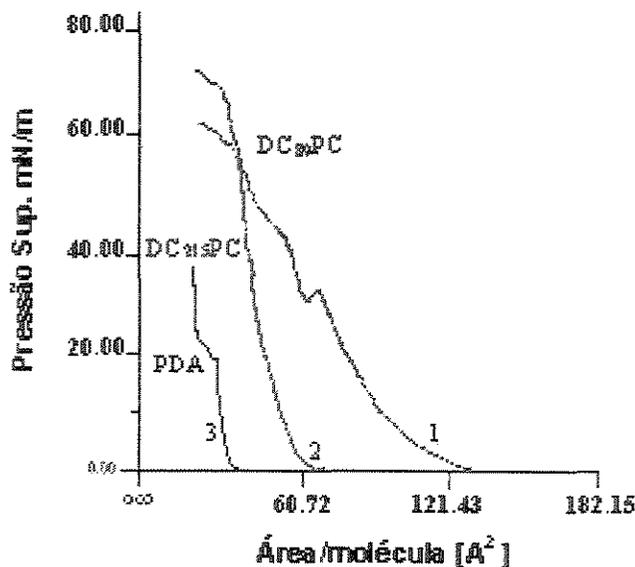
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Estudo de agregação em filmes de Langmuir-Blodgett.

A agregação dos compostos 10,12(tricosadiinóil)fosfatidilcolina (DC_{8,9}PC), 3,5(tricosadiinóil)fosfatidilcolina (DC_{2,15}PC) e ácido 10,12 tricosadiinóico (PDA), nas formas puras e em misturas com cardiolipina (CL) foi estudada em filmes de Langmuir Blodgett, através das isotermas de Langmuir (pressão X área/molécula).

ISOTERMAS DOS COMPOSTOS PUROS

As isotermas obtidas para os compostos puros são apresentadas na figura 5.1.



- DC_{2,15}PC R1=R2 = -CH₂-CH₂-≡C-≡C-(CH₂)₁₅-CH₃
- DC_{8,9}PC R1=R2 = -CH₂-(CH₂)₇-≡C-≡C-(CH₂)₉-CH₃
- PDA -COOH-CH₂-(CH₂)₇-≡C-≡C-(CH₂)₉-CH₃

Figura 5.1 - Isotermas de Langmuir para os fosfolipídios 10,12 (tricosadiinóil) fosfatidilcolina (DC_{8,9}PC), e 3,5 (tricosadiinóil)fosfatidilcolina DC_{2,15}PC, à 27°C, e ácido 10,12-tricosadiinóico (PDA) à 24°C.

A isoterma do fosfolípido DC_{8,9}PC, curva 1, apresenta uma perturbação na sua continuidade na região de 70Å^2 /molécula aproximadamente., sugerindo mudanças no estado de agregação original das moléculas. Este comportamento deve-se, provavelmente, à maior energia necessária para alinhar as cadeias de hidrocarboneto na compressão. Para o DC_{8,9}PC, a área mínima ocupada por molécula, calculada através da tangente à curva na região de colapso do filme, é de 68.3Å^2 . O posicionamento das insaturações na região central da molécula favorece o afastamento das cadeias, dando origem à conformação semelhantes às aquelas designadas como do tipo Gauche (figura 5.2).

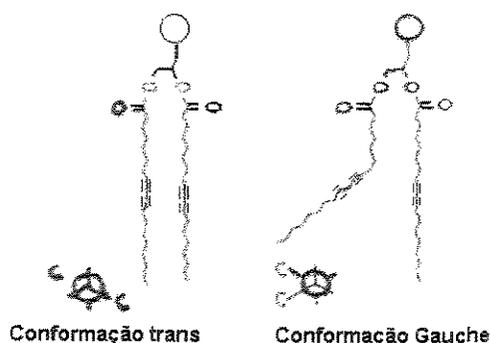


Figura 5.2 – Conformação molecular, do tipo Gauche, das cadeias de hidrocarboneto de uma molécula anfifílica. [Adaptação: New, 1990].

Xu e colaboradores [1992], obtiveram isortermas semelhantes à da curva 1, para os compostos análogos dioctadecadiinoilfosfatidilcolina, com triplas ligações localizadas no carbono 3-5 e 8-10 da cadeia de hidrocarboneto. Eles atribuíram esse efeito à restrição da mobilidade pela pressão sobre as cadeias desemparelhadas, originada pelas insaturações na região central das cadeias de hidrocarboneto.

Para o fosfolípido DC_{2,15}PC, curva 2, a redução da área por molécula na faixa de 140 até aproximadamente 70Å^2 não resultou em aumento significativo da pressão superficial. Esse resultado sugere que a localização das insaturações próxima à região polar da

molécula produz um empacotamento estável e compressível da monocamada. Nesse caso, a área mínima ocupada por molécula é de aproximadamente $53,8 \text{ \AA}^2$.

As diferenças na agregação em monocamadas para os dois fosfolipídios, deve-se ao posicionamento das suas insaturações na cadeia de hidrocarbonetos. As insaturações próximas à região polar parecem favorecer o alinhamento da cauda na posição paralela.

A isoterma correspondente ao PDA, curva 3, apresenta comportamento semelhante ao fosfolipídio $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$, característico da presença das insaturações na posição central da cadeia de hidrocarbonetos. No entanto, o menor tamanho da região polar do ácido favorece a agregação, restringindo a mobilidade das cadeias. A área mínima ocupada por molécula para o PDA é de 37 \AA^2 .

A área ocupada por molécula e o alinhamento das cadeias de hidrocarbonetos são de fundamental importância para a polimerização e obtenção de sinal colorimétrico em resposta à perturbações na bicamada lipídica. Charych (1996) verificou que ácidos diacetilênicos que apresentam área mínima por molécula na faixa de 20 a 40 \AA^2 produzem melhores sinais colorimétricos.

ISOTERMAS DOS COMPOSTOS EM MISTURAS COM CARDIOLIPINA

O estudo realizado com as misturas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC} / \text{CL}$ e PDA / CL mostrou que as áreas ocupadas por molécula na mistura é função da concentração de cardiolipina e os seus valores situam-se entre os valores dos componentes puros. As isotermas obtidas são apresentadas na figura 5.3.

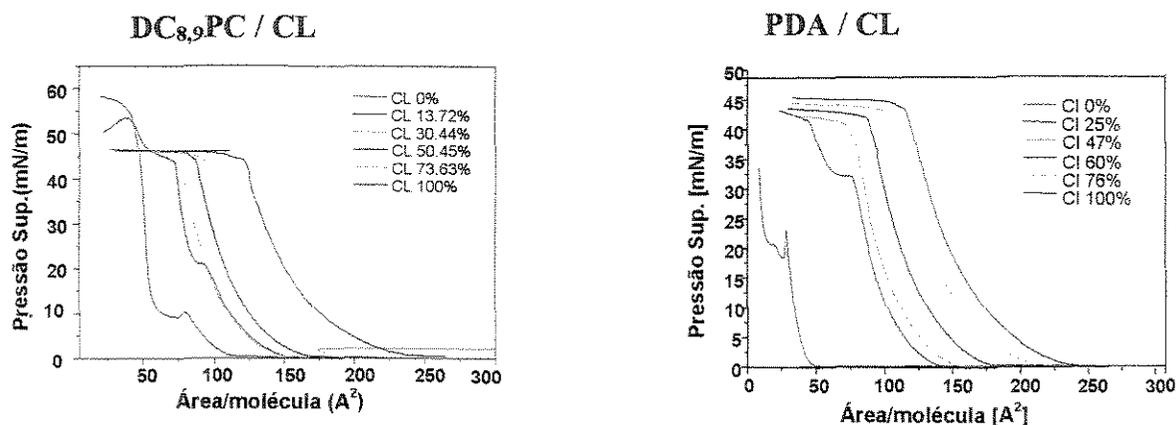


Figura 5.3 – Isothermas de misturas de lipídios DC_{8,9}PC/CL (esquerda) e PDA/CL (direita), onde a fração molar da CL variou de 0 a 1. Todas as isothermas foram obtidas à temperatura de 24°C.

Analisando as isothermas, pode-se observar que a presença de cardiolipina promove o desaparecimento das perturbações, característica das isothermas dos compostos puros. Isso sugere que a cardiolipina posiciona-se entre as moléculas de ácido ou fosfolípido, produzindo melhor organização da monocamada e empacotamento mais denso.

Na tabela 5.1, são apresentados os valores da área mínima por molécula e pressão de colapso para as várias composições das misturas. Observa-se que embora não se tenha atingido um ponto de colapso bem definido da monocamada, considerou-se esse ponto como a máxima pressão obtida nas isothermas. Os diferentes valores de área/molécula obtidos para a cardiolipina pura, deve-se ao fato das isothermas serem realizadas a diferentes temperaturas.

Tabela 5.1 – Valores de área/molécula e pressão de colapso para misturas de DC_{8,9}PC/CL e PDA/CL em diferentes composições.

Mistura	Área _{mínima} /molécula (Å ²)	Pressão de colapso (mN/m ²)
DC ₈₉ PC	68,3	58
DC _{8,9} PC 80%/CL 20%	114,5	54
DC _{8,9} PC 60%/CL 40%	110,2	46
DC _{8,9} PC 40%/CL 60%	122,7	43
DC _{8,9} PC 20%/CL 80%	142,6	43
CL	178,2	43
Ácido diacetilênico (PDA)	37,5	24
PDA 75%/CL 25%	110	30
PDA 53%/CL 47%	118	43
PDA 40%/CL 60%	130	44
PDA 24%/CL 76%	157	45
CL	172	45

As Interações e miscibilidade dos componentes nas misturas, também podem ser verificadas através da regra da aditividade, nos gráficos de *área molecular x %molar* de cardiolipina, tendo a pressão como parâmetro [Gaines, 1966].

Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 5.4 e 5.5, nas quais as retas representam a regra da aditividade ou comportamento ideal (ausência de interações) e as curvas, os dados experimentais obtidos. Em ambos os casos, os desvios do comportamento linear indicam a presença de interações com conseqüente miscibilidade da cardiolipina com os componentes estruturais DC_{8,9}PC ou PDA.

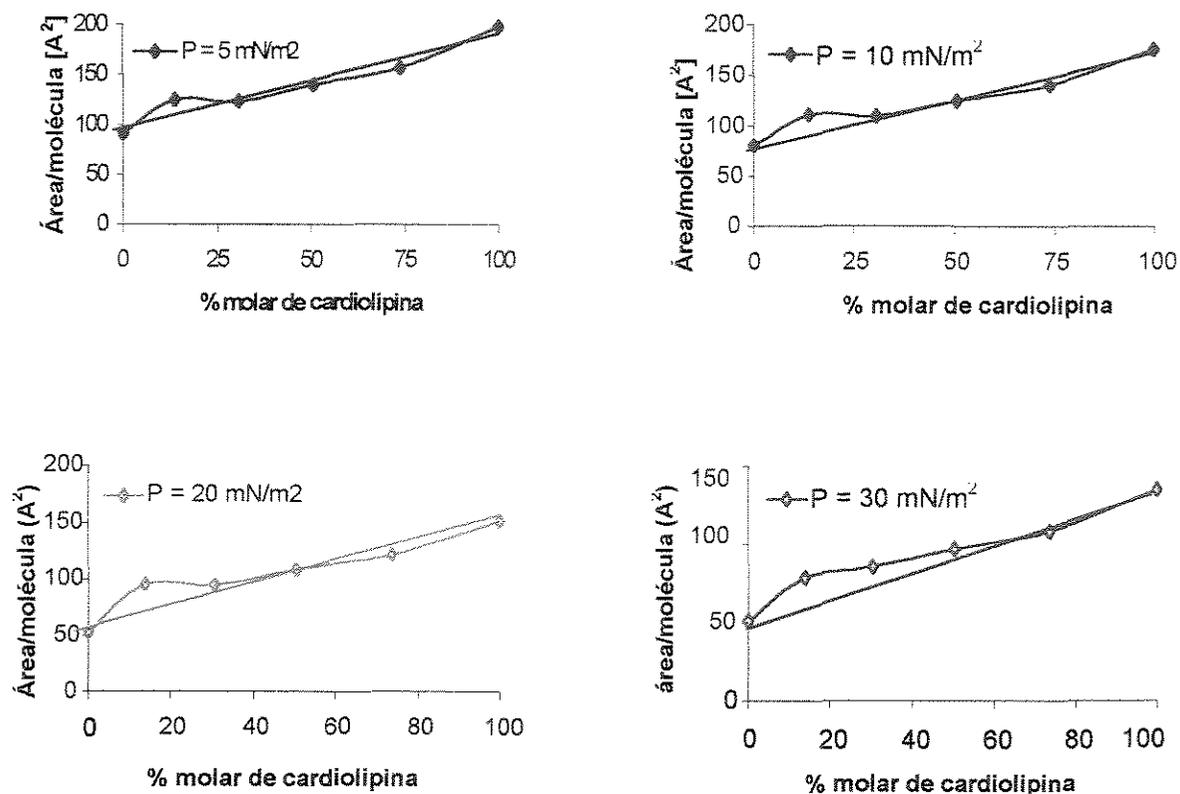


Figura 5.4 – Desvios da regra da aditividade obtidos a partir das isotermas de Langmuir das misturas de DC_{8,9}PC e CL, a diferentes pressões.

Para o fosfolípido DC_{8,9}PC (figura 5.4), os desvios são positivos para frações molares menores que 30%, indicando provável repulsão entre as moléculas e negativos para maiores frações molares, caracterizando atração entre as moléculas.

Os resultados para o ácido diacetilênico, (figura 5.5), mostram desvios mais acentuados e positivos em toda a faixa. Isso é devido à natureza da região polar, neste caso constituída do grupo carboxila e a cabeça polar da cardiolipina.

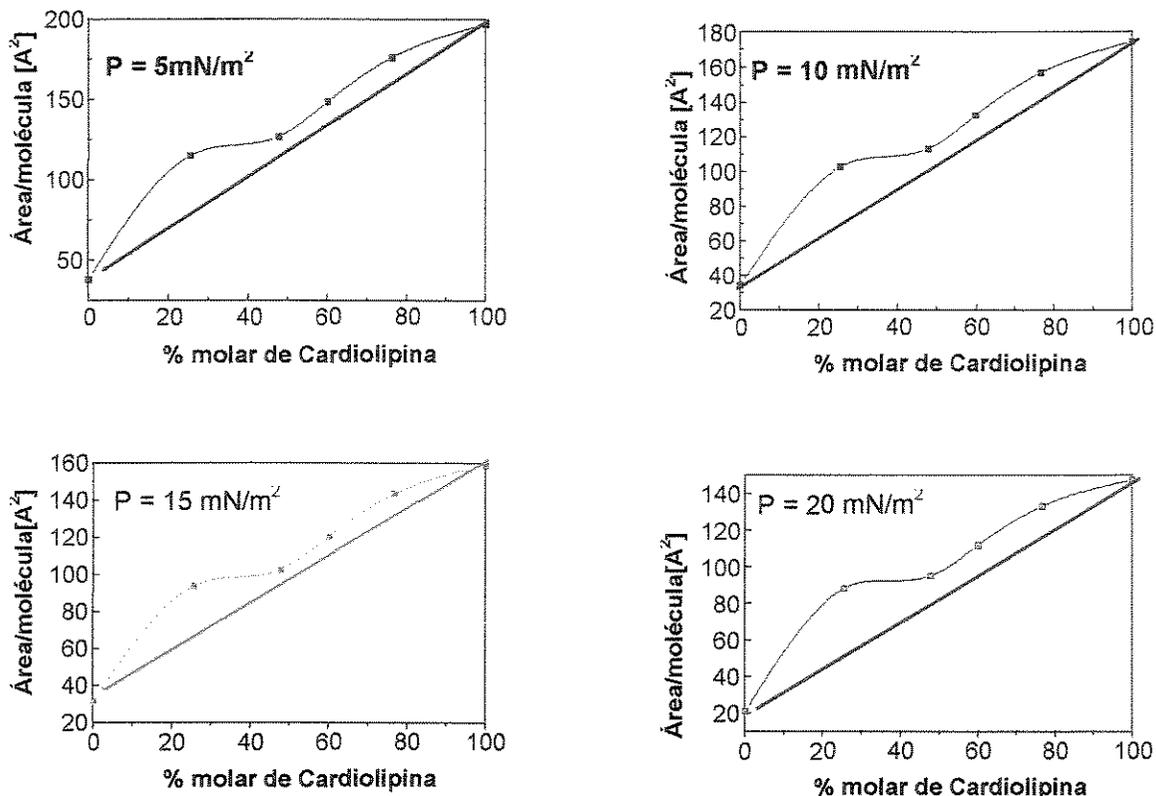


Figura 5.5 – Desvios da regra da aditividade obtidos a partir das isothermas de Langmuir das misturas de PDA e CL, a diferentes pressões.

Com os resultados conseguidos desse estudo de agregação, observa-se que os níveis de área/molécula obtidos da agregação do fosfolípido diacetilênico e a maior tendência de mobilidade das suas cadeias de hidrocarboneto parecem desfavorecer a proximidade e o alinhamento das insaturações. Nessa situação, a polimerização em toda a faixa de comprimento de onda, desde o azul ($\lambda=635\text{nm}$) até o rosa ($\lambda=480\text{nm}$) passado pelo púrpura (540nm), tende a ser prejudicado. Ensaio posteriores de polimerização, realizados com os fosfolípidos, confirmaram a predição, obtendo-se somente a polimerização na faixa do rosa ($\lambda=480\text{nm}$). Os espectros obtidos são apresentados no anexo I.

Para o ácido, observa-se uma tendência bem maior à agregação em monocamada, mesmo com a presença de cardioplipina. Nesse caso, a polimerização, cujos resultados são apresentados nos itens subsequentes, ocorreu desde o azul ($\lambda=635\text{nm}$) até o rosa

($\lambda=480\text{nm}$). Desse modo, prosseguiu-se o trabalho usando somente o ácido diacetilênico, visando aliar a necessidade de uma quantidade significativa de sítios de cardiolipina na superfície dos lipossomas, com as menores alterações na área ocupada por molécula, devido à presença de cardiolipina. Assim, selecionou-se o máximo de 20% para a concentração de cardiolipina nas vesículas.

INFLUÊNCIA DO pH NA ÁREA/MOLÉCULA

As isotermas obtidas com o ácido diacetilênico puro em monocamadas a diferentes pH's as fase aquosa, mostram pequenas diferenças na área por molécula com a variação do pH. Os valores de área mínima/molécula obtidos são 43.50, 43,00 e 42,00.0 $\text{Å}^2/\text{molécula}$ para os pH's 5.06, 5.70 e 6.17, respectivamente.

As pequenas diferenças apresentadas não permitem concluir quanto ao efeito do pH, sobre a área ocupada por molécula. Sabe-se, porém, que o pH interfere significativamente na fotopolimerização das moléculas diacetilênicas, dificultando a reação de adição do tipo 1,4 que acontece entre as mesmas, devido ao aumento da densidade molecular na bicamada lipídica.

Para melhor caracterização desses efeitos, foram realizadas análises por microcalorimetria diferencial de varredura dos lipossomas preparados a pH 5.7 e 6.3, cujos resultados são descritos no item 5.2.6.

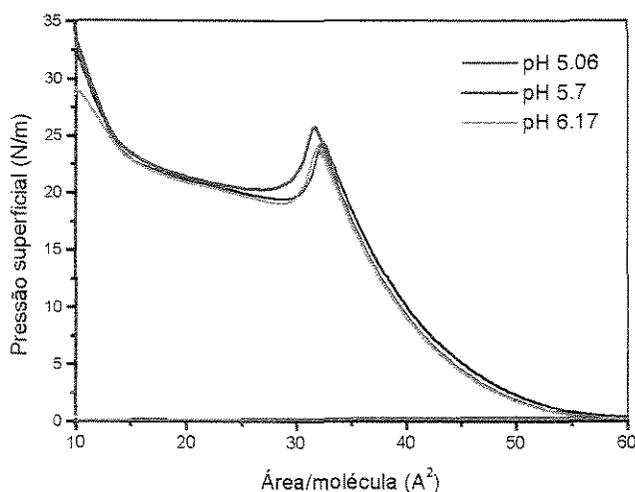


Figura 5.6 – Isotermas de Langmuir para o ácido 10,12-tricosadiinóico (PDA) a diferentes pH's (5.06, 5.70, 6.17) e à temperatura de 26°C.

5.2 – Preparação e Caracterização de lipossomas com ácido polimerizável.

A preparação dos lipossomas pelo ácido 10,12-tricosadiinóico apresentou dificuldades quanto à estabilidade das dispersões obtidas. Observa-se uma grande tendência à agregação 12 horas após a preparação, usando tampão HEPES 10mM (pH 7,4) na hidratação. Quando a hidratação do filme foi feita com água deionizada, a estabilidade das vesículas aumentou. A agregação também foi observada, porém somente 48 horas após a preparação.

A instabilidade dessas vesículas deve-se, provavelmente, à formação de precipitados, devido à dimensão da região hidrofílica, desfavorecendo a formação de vesículas. A ausência de estruturas em bicamada nessa preparação foi evidenciada nos ensaios de polimerização, nos quais não observou-se alteração de cor das soluções, visto que sistemas micelares não sofrem reação de polimerização. A sonicação das vesículas agregadas durante 10, 15 e 30 minutos, também não produziu estruturas lamelares.

A incorporação da cardiolipina nas estruturas favorece a vesiculação do ácido, provavelmente, devido às pequenas dimensões da cabeça hidrofílica desse composto. No entanto, os lipossomas obtidos ainda são instáveis, agregando-se 48 horas após a sua preparação. Para prevenir a agregação, a polimerização deve ser feita nesse intervalo de tempo.

5.2.1 –Quantificação da cardiolipina

A quantificação da cardiolipina nas vesículas foi feita através do teor de fosfato inorgânico, visto ser este o único fosfolípido presente na estrutura. O rendimento médio da incorporação de cardiolipina nos lipossomas foi de $98 \pm 20\%$, em relação à 0.2mM de CL total. Os erros envolvidos no processo estão relacionados às imprecisões devido à reduzida concentração de cardiolipina presente nos lipossomas, cerca de 0.2mM.

5.2.2 – Diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanhos dos lipossomas.

As vesículas monoméricas de PDA/CL 20% preparadas pelo método da hidratação do filme seco de lipídios seguido de 15 minutos de sonicação produzem vesículas unilamelares com 2 populações, sendo a maior em torno de $230 \pm 30\text{nm}$. Aumentando o tempo de sonicação para 25 minutos, não observou-se variações significativas no diâmetro principal das vesículas. Em geral, as vesículas monoméricas apresentaram uma estreita distribuição de tamanho. No entanto, as vesículas polimerizadas apresentam uma redução média no tamanho em torno de 13%, apresentando somente uma população com uma ampla faixa de distribuição.

Os relatórios correspondentes à estas medidas encontram-se no anexo I. Ressalta-se que os parâmetros críticos de medida: contagens de partículas por segundo e polidispersidade estiveram nas faixas ótimas de medidas, sendo de 100 a 350 para as milhares de contagens/s e 0.03 a 0.5 para a polidispersidade. Isto indica que as medidas realizadas são reprodutíveis e com confiabilidade obtida em torno de 96%.

5.2.3 – Estabilidade de estocagem dos lipossomas

Os resultados de estabilidade de estocagem dos lipossomas monoméricos e polimerizados mostraram que os primeiros possuem baixa estabilidade com o tempo, agregando em poucos dias, enquanto que os polimerizados mostraram-se altamente estáveis por 5 meses.

Na figura 5.7 são apresentados o resultado de estabilidade das vesículas monoméricas e polimerizadas com o tempo.

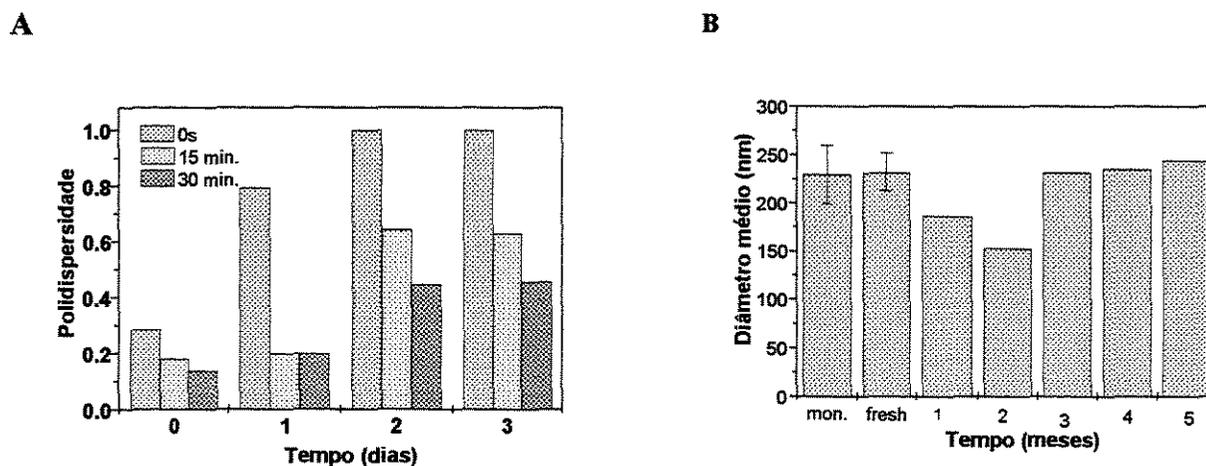


Figura 5.7 – Estabilidade de estocagem dos lipossomas monoméricos, à pH 5.7 e diferentes tempos de sonicação, em termos de polidispersidade da amostra (A). Estabilidade de estocagem dos lipossomas polimerizados, à pH 5.7 e 25 min. de sonicação, em termos de diâmetro médio das vesículas (B), onde: mon.- monômero e fresh - lipossomas logo após a polimerização.

Através da figura 5.7A, percebe-se que à medida que o tempo (dias) aumenta, a polidispersidade (heterogeneidade da população) das vesículas monoméricas também aumenta. Porém, em geral, para um mesmo dia, as vesículas que foram sonicadas por

período maior, apresentaram polidispersidade menor, indicando maior estabilidade dessas vesículas.

A análise da figura 5.7B, permite observar que lipossomas polimerizados na faixa do $\lambda=635\text{nm}$ (azul) permaneceram estáveis por 5 meses, durante a estocagem em geladeira à 4°C em ambiente escuro, conforme monitorização do tamanho das vesículas. Essa estabilidade foi também observada através dos valores de absorbância das vesículas polimerizadas, os quais não variaram significativamente após 5 meses, apresentando valor da resposta colorimétrica em torno de 9%, conforme mostrado na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores de B_0 referentes a amostra de lipossomas polimerizados na faixa do azul ($\lambda = 635\text{nm}$), recém preparados e 5 meses depois.

Tempo	B_0 %	Resposta Colorimétrica %
0	44.3	0
Após 5 meses	40.3	9.03

5.2.4 – Estabilidade de lipossomas constituídos de PDA e CL em tensoativo.

Os perfis de estabilidade da bicamada lipídica na presença do tensoativo não iônico (C_{12}E_5), obtidos com lipossomas, monoméricos e polimerizados, de PDA/CL 20% são mostrados na Figura 5.8.

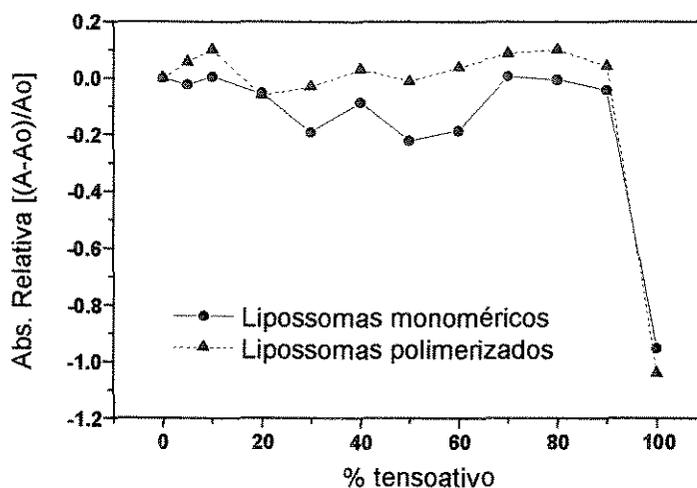


Figura 5.8 – Perfis de estabilidade de lipossomas, monoméricos e polimerizados, compostos de PDA/CL 20%.

Os resultados revelam que a estabilidade dos lipossomas monoméricos e polimerizados é semelhante. Em ambos os casos, têm-se um bom empacotamento da bicamada, produzindo partículas estáveis ao ataque do tensoativo em praticamente toda a faixa de concentrações.

5.2.5 – Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 5.9 mostra a micrografia de lipossomas polimerizados formados por PDA e 20% de CL. Pela imagem, percebe-se que as vesículas têm formato esférico e tamanhos médios em torno de 60 nm. Esse resultado confirma os valores da distribuição de tamanhos dos lipossomas obtidos por espalhamento quase elástico de luz, cujas populações variaram de 40 a 600nm. No campo da micrografia aparecem, portanto, somente as partículas de menor diâmetro.

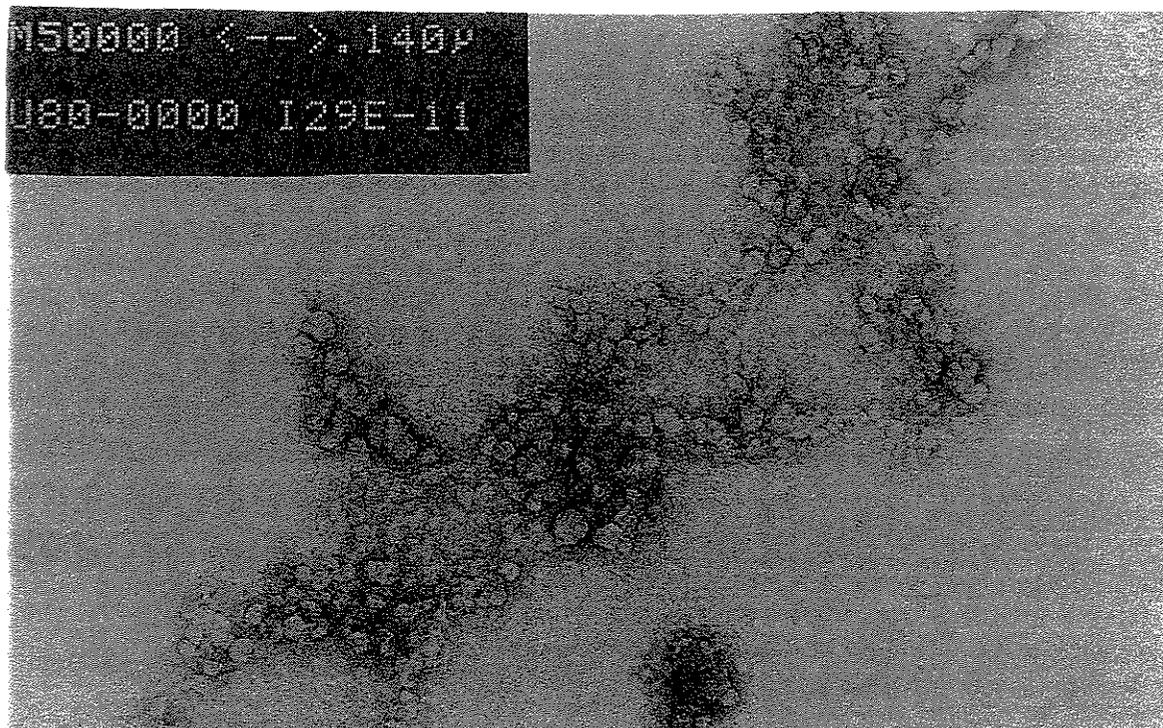


Figura 5.9– Micrografia obtida da microscopia eletrônica de transmissão (MET) de vesículas polimerizadas formada por PDA/CL 20%, dispostas em aglomerados.

5.2.6 – Microcalorimetria diferencial de varredura

O estudo de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC), de lipossomas formados por ácido diacetilênico/cardioplipina 20%, a diferentes pH's, revelou a presença de uma transição endotérmica, como mostrado na Figura 5.10.

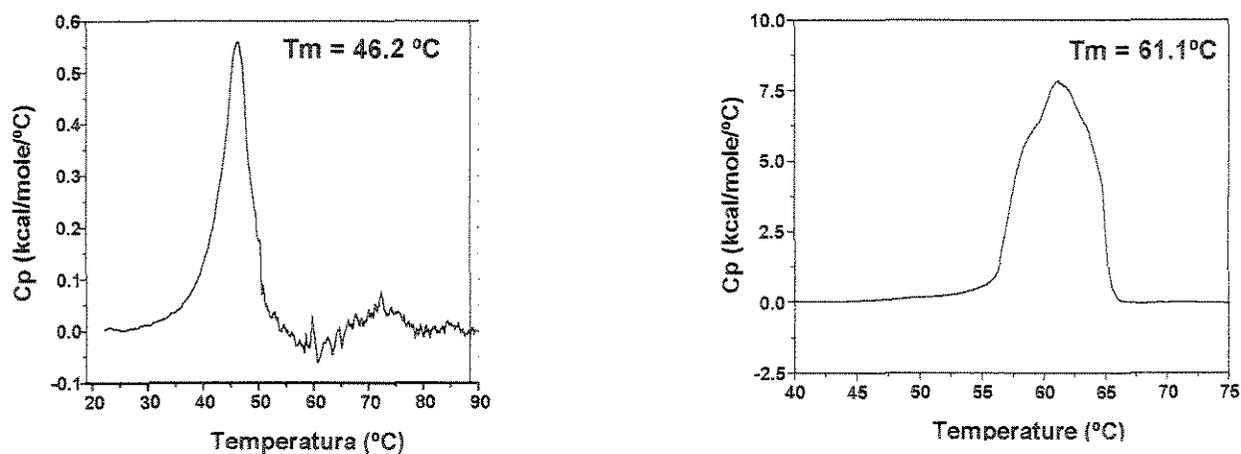


Figura 5.10 –Termogramas, obtidos através da microcalorimetria diferencial de varredura (DSC), de lipossomas constituídos de PDA/CL 20%, em água deionizada a pH 5.7 (esquerda) e pH 6.3 (direita).

O fenômeno da transição de fase está relacionado com as interações hidrofóbicas existentes entre as cadeias de hidrocarbonetos das moléculas. Quanto mais próximo estas moléculas estiverem, maior será a força que as une (interações hidrofóbicas) e maior energia será requerida para romper essas interações, favorecendo uma mudança conformacional destas cadeias de all-trans para trans-gauche.

Através dos termogramas, observa-se uma maior área sobre a curva para o pH 6.3, indicando que foi necessário o fornecimento de maior quantidade de energia, para romper as interações hidrofóbicas entre as cadeias de hidrocarboneto da molécula.

Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Mino et. al. (1992) para o ácido 10-12-pentacosadiinóico, onde foram observadas reduções da área por molécula com o aumento do pH.

5.2.7 – Ensaios de polimerização

A Figura 5.11 apresenta os espectros obtidos com a polimerização por irradiação das amostras de lipossomas, compostos de ácido diacetilênico (PDA) e 20% de cardiolipina.

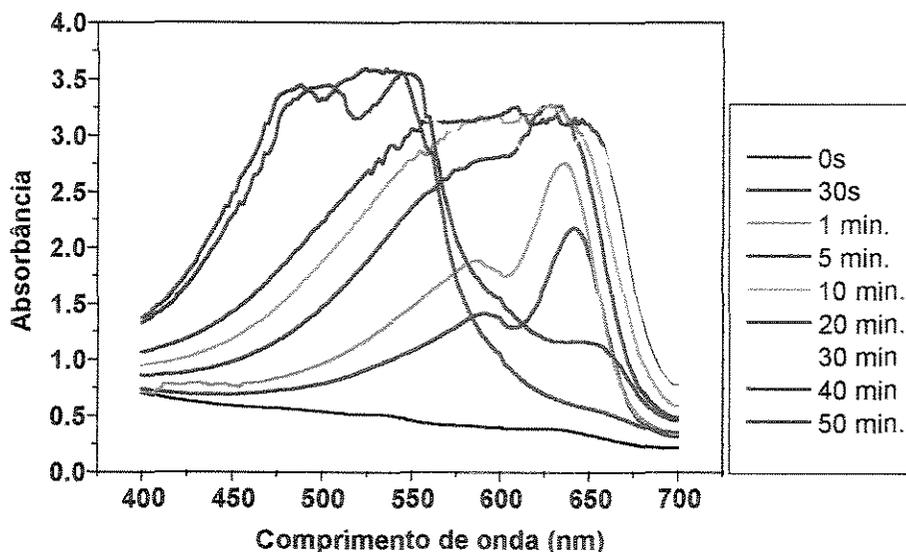


Figura 5.11 – Espectros da polimerização dos lipossomas compostos de ácido diacetilênico/cardiolipina 20% (concentração da solução: 1mM em lipídio total; temperatura inicial: 4°C; solvente: água).

Os espectros da figura 5.11 mostram, com o tempo, absorção de luz na faixa de comprimento de onda de 635-640 nm (azul), caracterizando a polimerização. Com o decorrer do tempo o pico da região azul vai se reduzindo, originando dois novos picos na região do púrpura ($\lambda=540\text{nm}$) e rosa ($\lambda=480\text{nm}$). O aparecimento da coloração púrpura e rosa ocorre nos primeiros 30 segundos da reação e a polimerização completa-se em 50 minutos, com o desaparecimento dos picos da região azul e estabilidade dos espectros.

Na fotografia da figura 5.12, pode-se observar as colorações das soluções obtidas.



Figura 5.12 – Fotografia das soluções lipossomais nos diferentes estágios da polimerização: **A)** inicial (azul - $\lambda = 635\text{nm}$), **B)** intermediário (púrpura - $\lambda = 540\text{nm}$) e **C)** final (rosa - $\lambda = 480\text{nm}$).

A razão para o aparecimento das cores, deve-se ao emparelhamento das insaturações nas cadeias de hidrocarboneto. Assim, inicialmente, o alinhamento dessas insaturações produz o aparecimento da cor azul. Com a continuidade da polimerização, o emparelhamento do conjugado é distorcido, originando as cores púrpura e rosa.

ANÁLISE DOS ESPECTROS POR QUIMIOMETRIA

Através do tratamento quimiométrico, realizado com os espectros obtidos na polimerização foi possível observar mais claramente a cinética de polimerização. A figura 5.13 mostra a deconvolução química dos espectros.

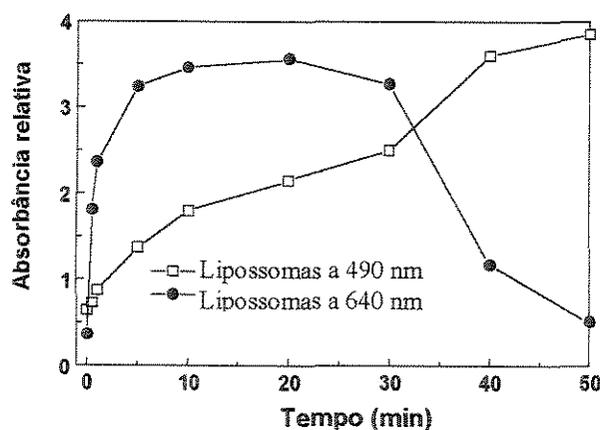


Figura 5.13 – Deconvolução química a partir dos espectros decorrentes da polimerização de lipossomas compostos de PDA/CL 20%.

A análise das curvas permite observar que a polimerização na faixa do comprimento de onda referente ao azul ($\lambda = 635\text{nm}$), cresce nos momentos iniciais e permanece estável de 5 a 20 minutos de irradiação, quando a absorvância decresce. A polimerização na faixa do comprimento de onda referente ao rosa ($\lambda=480\text{nm}$), aumenta significativamente desde o início da polimerização, tendendo a estabilizar a partir de 50 minutos. A análise visual das amostras durante a polimerização confirma esses resultados, pois até 20 minutos percebe-se uma coloração azul intensa da solução, de 20 a 30 minutos a cor púrpura é nítida e 40 minutos depois é que a cor rosa surge, permanecendo estável a partir dos 50 minutos.

INFLUÊNCIA DO pH NA POLIMERIZAÇÃO

Os resultados obtidos com a polimerização de vesículas Nos 3 diferentes pH's (5.06, 5.77 e 6.30) estudados, mostraram que a intensidade de cor obtida para a amostra em pH 6.30 foi menor que aquelas obtidas nos outros pH's, durante todo o tempo de polimerização (figura 5.14).

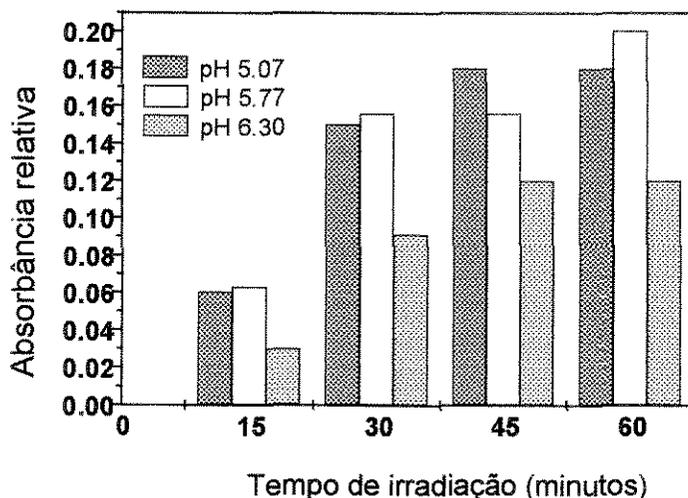


Figura 5.14 – Influência do pH na absorbância das soluções no decorrer da polimerização de lipossomas, compostos de PDA/CI 20%.

Apesar da menor área por molécula apresentada pela agregação do ácido nesse pH, a maior proximidade das moléculas desfavoreceu a polimerização dos lipossomas. Segundo Mino et.al. [1992] verificaram comportamento semelhante com a polimerização de compostos análogos ao ácido diacetilênico e atribuíram o desfavorecimento da polimerização à elevada densidade das moléculas resultante da sua proximidade.

Além do pH, observou-se neste trabalho, que a cinética de formação da estrutura lamelar após a sonicação é outro fator de fundamental importância para a reação de polimerização. Quando o sistema é submetido a uma energia muito alta, como é o caso de sonicação, torna-se necessário estabilizar a sua estruturação em bicamadas antes da polimerização. Assim, para o ácido diacetilênico usado neste trabalho, a reação de polimerização somente foi efetiva, no mínimo, 12 horas após preparação dos lipossomas.

5.3 - Estudos de adsorção de auto-anticorpos em lipossomas polimerizados

5.3.1 - Seleção de soros

A análise de 5 "pools" de soros de indivíduos com doenças auto-imunes pertencentes ao banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Unicamp, revelou em apenas um deles alta atividade de anticorpos anticardiolipina, 80 GPLU/mL, enquanto que os outros apresentaram atividade média, na faixa de 15-60 GPLU/mL. O "pool" de soros de alta atividade foi usado nos testes de adsorção de auto-anticorpos.

O "pool" de soros selecionado, os soros sadios e de referência (IgG/anti-CL) foram analisados por nefelometria para quantificação da imunoglobulina G total. No soro sadio a concentração de IgG total foi 1390 mg/dL, enquanto para os soros auto-imune e de referência foram 1600 mg/dL e 5,0 mg/dL (aprox.) respectivamente.

Na Figura 5.15 são apresentados os espectros de absorção de luz dos soros usados nos ensaios de adsorção: soro auto-imune, soro de referência e soro sadio. Pode-se observar que na faixa característica de absorção entre 400-800nm, as diferenças entre os espectros tornam-se bem acentuadas. Nessa faixa, o espectro do soro de referência

evidencia um certo grau de purificação em relação aos outros. Para o soro sadio e positivo, observa-se elevada concentração de materiais nessa faixa, característica das imunoglobulinas e de outras proteínas.

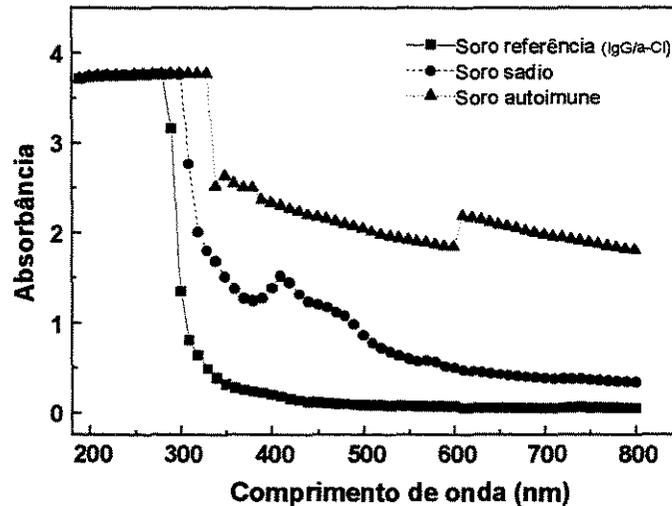


Figura 5.15 Espectros de absorção de luz obtidos do soro de referência(IgG/anti-CL), soro sadio e soro do auto-imune .

5.3.2 - Estudos com soro de referência (IgG/anti-CL) e IgG não específica

Os gráficos da Figura 5.16 mostram os resultados dos ensaios de adsorção usando soro de referência (IgG/anti-CL) e IgG não específica usada na terapia de reposição de pacientes com baixos níveis de IgG total. Nesses ensaios foram usados lipossomas polimerizados na faixa do azul, nas concentrações 0,5 e 1,0 mM. As concentrações de anticorpos nas soluções foram expressas em termos de IgG total

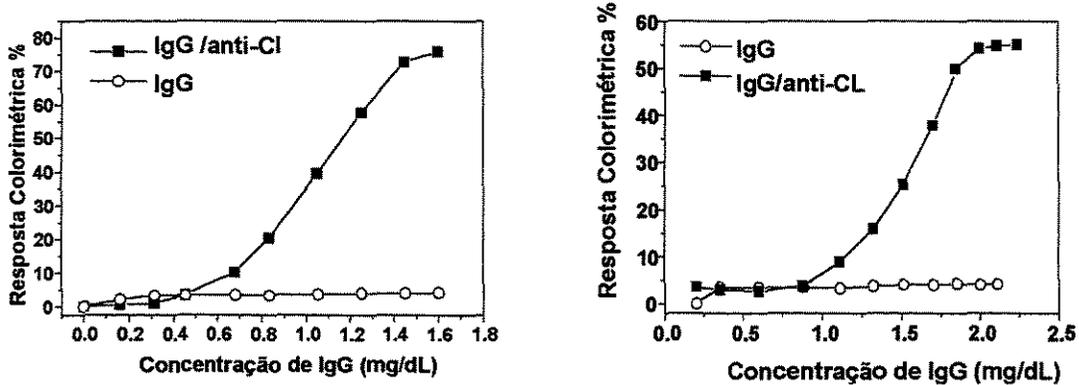


Figura 5.16 – Resposta colorimétrica (RC%) x concentração de IgG total (mg/dL). O gráfico a esquerda mostra a RC % de lipossomas 0.5mM, enquanto o da direita mostra a RC% de lipossomas 1mM.

Analisando as curvas obtidas observa-se que em ambos os casos a resposta colorimétrica foi menor que 7% para a IgG não específica. Para a IgG anticardiolipina, as curvas são de forma sigmoide, caracterizando cooperatividade dos sítios de ligação para o desenvolvimento da resposta colorimétrica. Esses resultados evidenciam a seletividade do sistema em relação às imunoglobulinas específicas, bem como a sua sensibilidade, uma vez que a concentração de anticorpos anticardiolipina é muito baixa (5mg/dL aprox.). Charych e colaboradores [1997, 1995] obtiveram uma curva sigmoide semelhante usando o sistema da toxina da cólera pura e GM1 como ligante e vírus influenza com ácido siálico como ligante, ressaltando a cooperatividade na transdução colorimétrica.

A mais alta resposta colorimétrica (71%), foi obtida na solução com menor concentração de lipossomas polimerizados (0,5 mM), quando comparada àquela obtida para a solução 1mM (55%), embora em ambos os casos se tenha atingido a saturação dos sítios de cardiolipina sobre a superfície dos lipossomas. Esses resultados sugerem que a adsorção de imunoglobulinas fica prejudicada quando se tem uma maior concentração de lipossomas em solução, provavelmente por impedimento estérico, devido à proximidade das vesículas, ou por interação entre elas.

Na saturação, a relação IgG/anti-CL foi $7,70 \cdot 10^4$ U/mmol_{Cl}, o que representa $4,06 \cdot 10^{-12}$ U/lipossoma para vesículas à 0,5mM e $6,11 \cdot 10^4$ U/mmol_{Cl}, o que representa $3,19 \cdot 10^{-12}$ U/lipossoma, para vesículas 1mM, respectivamente.

O mesmo ensaio foi realizado com solução 0,5 mM de lipossomas polimerizados na cor púrpura. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.17, em comparação com as curvas obtidas para os lipossomas polimerizados na faixa do azul.

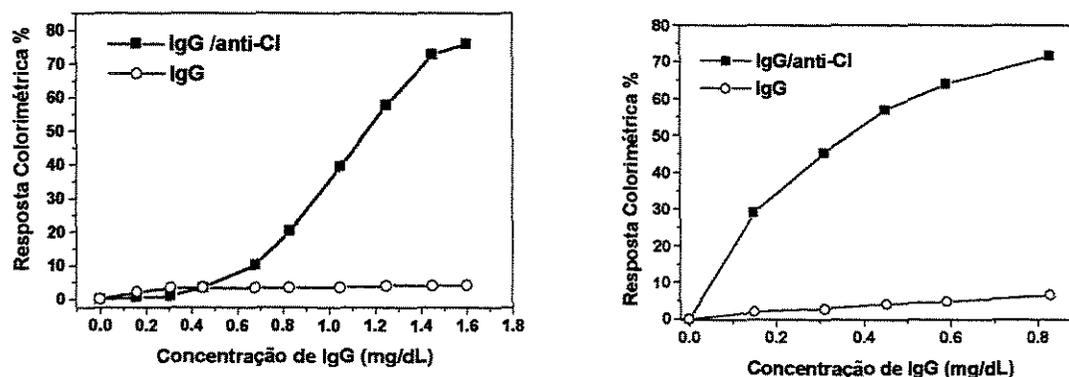


Figura 5.17 – Comparação da resposta colorimétrica % x concentração de IgG entre 2 sistemas lipossomais. O gráfico da esquerda mostra a RC% de lipossomas polimerizados na faixa da cor azul e o da direita exibe a RC% dos lipossomas polimerizados na faixa da cor púrpura.

Analisando-se os gráficos da figura 5.17, pode-se também verificar a expressiva diferença entre as curvas, caracterizando a seletividade do sistema para a adsorção dos auto-anticorpos específicos. Observe-se que para os lipossomas de cor púrpura, a curva perde a característica sigmoidal, apresentando-se hiperbólica. Esse comportamento reflete o estado de maior tensão a que estão submetidas as triplas ligações com o avanço da polimerização do azul para o púrpura, resultando em maior sensibilidade à mudança de cor em resposta às perturbações externas. Nesse caso, a relação IgG/anti-CL na saturação foi $3,3 \cdot 10^4$ U/mmol_{Cl} ou $1,74 \cdot 10^{-12}$ U/lipossoma

Na Figura 5.18 são apresentados os espectros das soluções antes e depois da adição sucessiva do soro de referência. Neles, a mudança de cor do azul ($\lambda=635\text{nm}$) ou púrpura ($\lambda=540\text{nm}$) para o rosa ($\lambda=480\text{nm}$) é evidente.

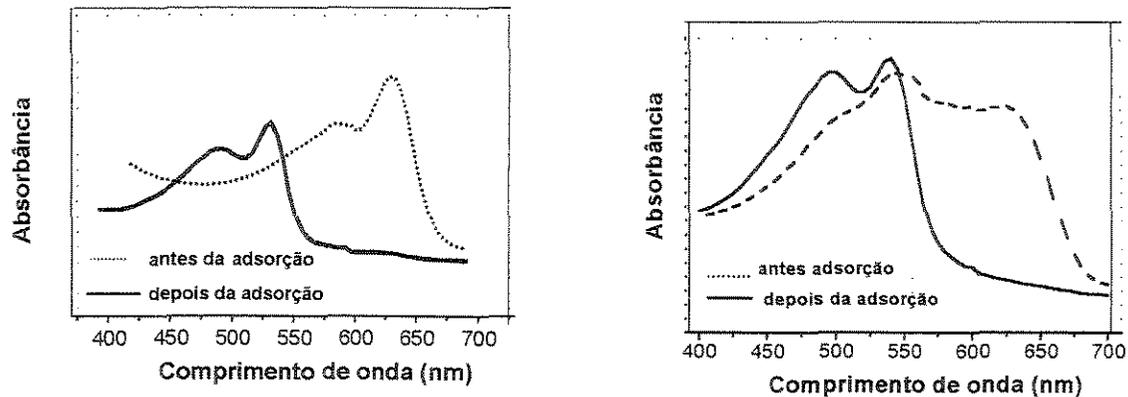


Figura 5.18 – Espectros das soluções lipossomais 0,5mM, azul (esquerda) e púrpura (direita) após as adições sucessivas de auto-anticorpos específicos (IgG/anti-CL) presentes no soro de referência

5.3.3 - Estudos com soro de indivíduo sadio, auto-imune e albumina (BSA).

Os ensaios realizados em cubeta com adições sucessivas dos soros, mostraram diferenças significativas na resposta colorimétrica quando o tempo de incubação dos soros era de 2 ou 10 minutos. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 5.19.

Pode-se observar que inicialmente a curva do soro sadio situa-se acima da curva do soro auto-imune, porém após 10 minutos essas posições se invertem. Tendo em vista que a reação antígeno-anticorpo é praticamente instantânea, esse efeito cinético observado na resposta colorimétrica deve-se principalmente às limitações de transferência de massa no meio, as quais influenciam a dinâmica do processo de adsorção.

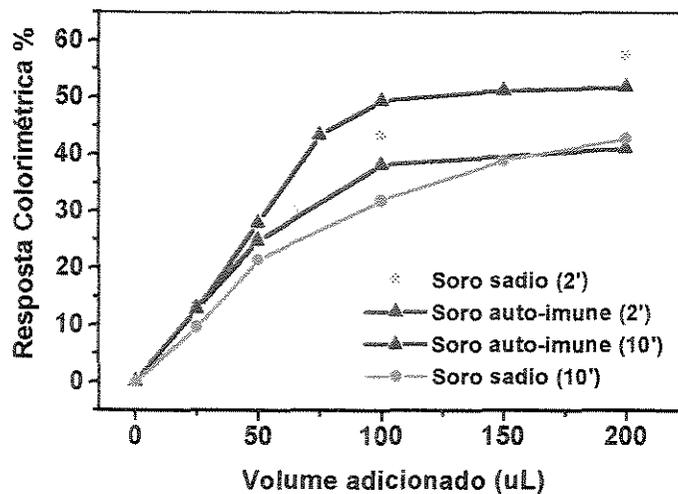


Figura 5.19– Comparação entre os valores de resposta colorimétrica obtidos com soro sadio e o soro auto-imune puros, com intervalos de medidas de 2 min. e de 10 min., para lipossomas polimerizados na faixa do azul à 0,5 mM.

Analisando as curvas obtidas com adição de soro a cada 10 minutos, pode-se observar a seletividade do sistema em relação à adsorção dos anticorpos específicos. Na região do patamar, a diferença entre as respostas colorimétricas dos soros auto-imune e sadio é 10,47%.

Comparando-se essas curvas com as obtidas na Figura 5.16, observa-se nesse caso, um comportamento do tipo hiperbólico, caracterizando a interferência dos outros componentes presentes no soro. Por outro lado, verifica-se que as diferenças entre as curvas já não é tão acentuada como nos sistemas modelos. Cabe ressaltar, que nos trabalhos da literatura encontram-se somente resultados para sistemas modelo.

Com o objetivo de verificar o efeito da diluição dos soros, bem como o da adsorção de albumina (BSA) na resposta colorimétrica, foram feitos ensaios com ambos os soros (sadio e auto-imune) à várias diluições, e com BSA 0,5 mg/mL. Os resultados, apresentados na Figura 5.20 mostram que a partir da diluição 1:20 de ambos os soros, o sistema perde a sensibilidade. Por outro lado, aparentemente a BSA não foi significativamente

adsorvida nos sítios de cardiolipina, produzindo resposta colorimétrica menor que 4% e confirmando a seletividade do sistema.

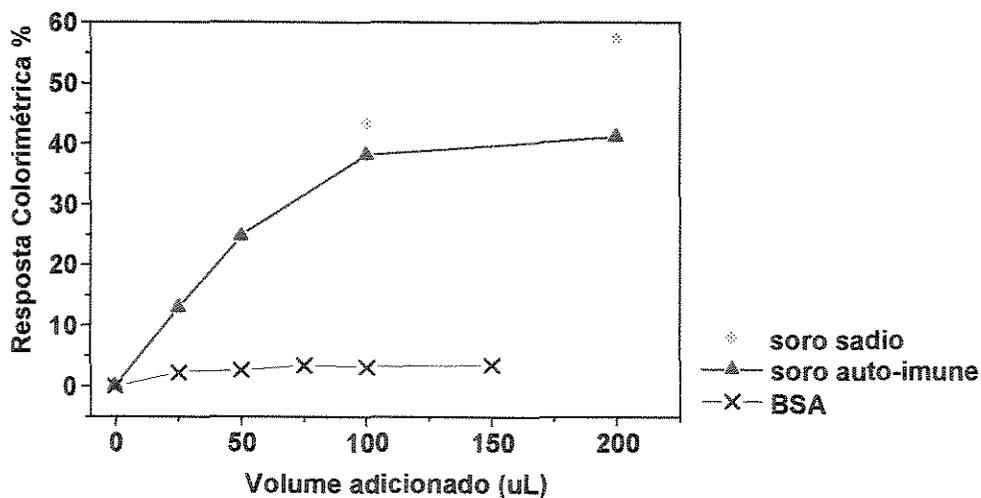
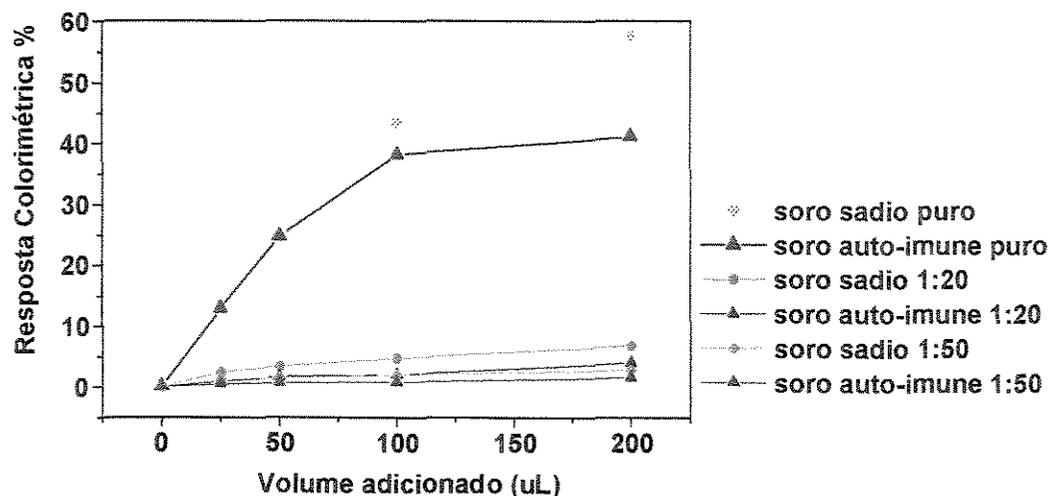


Figura 5.20 - – Comparação entre os valores de resposta colorimétrica obtidos com soro sadio e soro auto-imune: a várias diluições, com intervalos de medidas de 2 min. (superior) e com BSA 0.5mg/mL (inferior). Os lipossomas usados foram polimerizados na faixa do azul com concentração de 0,5 mM.

Uma observação experimental importante que deve ser ressaltada, é que as soluções resultantes dos ensaio com soros sadio e auto-imune, quando armazenadas por 2 a 3 dias em refrigerador, à 4°C, tendem a sedimentar, o mesmo não acontecendo com as soluções contendo somente lipossomas. Isso deve-se provavelmente à formação de uma rede de imunoglobulinas e proteínas em torno dos lipossomas, favorecendo a agregação com conseqüente sedimentação das vesículas.

5.3.4 - Estudos da adsorção em placas de polietileno

Com o objetivo de contornar os efeitos de transferência de massa observados anteriormente, e de se ter uma maior flexibilidade para experimentos simultâneos à várias diluições, foram feitos ensaios com os soros sadio e auto-imune em placas de polietileno.

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 5.21 para ambos os soros puros e diluídos. Pode-se observar que após 10 minutos tem-se a saturação dos sítios de cardiolipina nos lipossomas, referente a $1,93 \cdot 10^{-7} U/\text{lipossoma}$. Para os soros puros, a diferença entre a resposta colorimétrica entre os soros sadio e auto-imune é em média 5.70 %

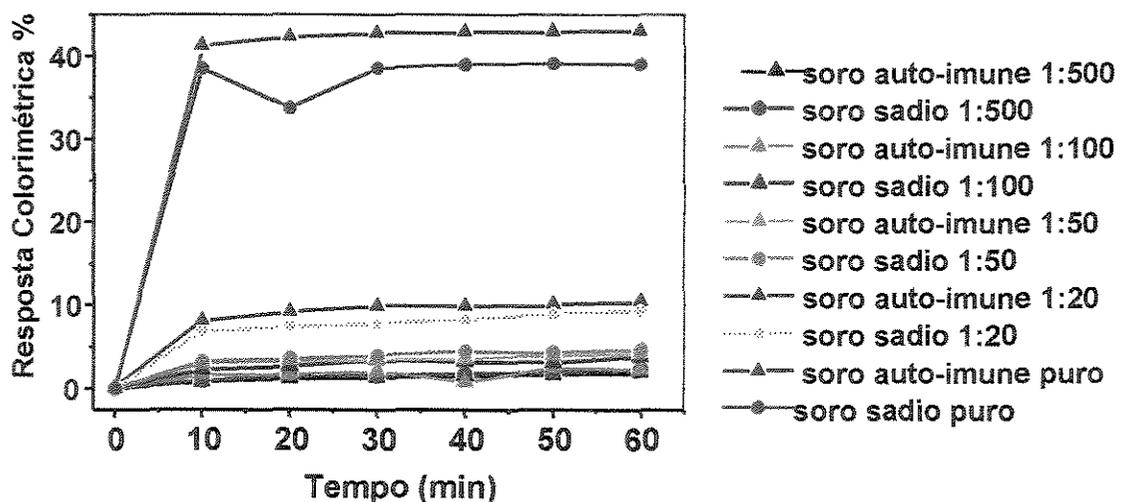


Figura 5.21 – Resposta colorimétrica obtida através de cinética realizada em placas de polietileno com concentração fixa de lipossomas (0,5mM) polimerizados e diferentes concentrações dos soros.

Embora adsorção dos auto-anticorpos nos sítios de cardiolipina seja evidente, o funcionamento do sistema com soros reais apresenta limitações quanto à adsorção de outros componentes provavelmente em sítios não específicos, tensionando a estrutura e produzindo resposta colorimétrica. A diluição do soro auto-imune não diminuiu esse efeito, uma vez que o sistema perdeu a sensibilidade, por encontrar-se abaixo da relação estequiométrica de saturação. Nesses ensaios, observou-se que diluições menores que 0,5mM dos lipossomas, não puderam ser usadas, por comprometer a intensidade de cor das soluções.

Esses resultados mostram que os lipossomas polimerizados são potencialmente importantes para a detecção de auto-anticorpos em ensaios simples, em uma única etapa. Deve-se portanto identificar os componentes não específicos mais responsáveis pelas interferências, e/ou usar na preparação dos lipossomas fosfolípidios polimerizáveis com diferentes posicionamentos das insaturações ao longo da cadeia de hidrocarboneto, para diminuir a sensibilidade, aumentando assim a especificidade da resposta colorimétrica.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Capítulo 6

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- É factível a preparação de lipossomas compostos de ácido 10,12-tricosadiinóico e cardiolipina com 25 minutos de sonicação, produzindo vesículas com diâmetro médio em torno de $230 \pm 30\text{nm}$;
- A polimerização dos lipossomas formados pelo ácido 10,12-tricosadiinóico e cardiolipina produz partículas capazes de absorver luz, inicialmente, no comprimento de onda do “azul” ($\lambda = 635\text{nm}$), passando pelo “púrpura” ($\lambda = 540\text{ nm}$) até o “rosa” ($\lambda = 480\text{nm}$).
- A adsorção de anticorpos IgG/anti-CL produziu sinal colorimétrico, caracterizado pela mudança de coloração das soluções do “azul” e “púrpura” para “rosa”.
- O sistema apresentou boa sensibilidade e especificidade com soro de referência e imunoglobulinas G não específica. A diferença entre as respostas colorimétricas foi de aproximadamente 60%
- Lipossomas polimerizados e monoméricos apresentaram boa integridade da bicamada lipídica. Os lipossomas monoméricos apresentaram-se instáveis, agregando-se em aproximadamente 48 horas, enquanto que os polimerizados mantiveram-se estáveis durante 5 meses.
- Os liposomas polimerizados na faixa do “azul” exibiram aproximadamente 5% de diferença de resposta colorimétrica entre soro auto-imune e soro sadio. O sistema não mostrou qualquer mudança de cor, apresentando resposta colorimétrica menor que 4% quando albumina do soro bovino foi testada.
- A aplicação de lipossomas polimerizados formados por ácido 10,12-tricosadiinóico e cardiolipina mostra-se promissora para promover o reconhecimento molecular e transdução de sinal molecular de auto-anticorpos em uma única etapa.

Capítulo 7

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificar os possíveis interferentes existentes nos soros que contribuem para aumento da resposta colorimétrica nos lipossomas polimerizados.
- Preparar lipossomas com diferentes lipídios polimerizáveis, contendo insaturações em posições distintas, para avaliar especificidade e sensibilidade dessas vesículas em ensaios de adsorção de anticorpos.
- Verificar a sensibilidade do sistema, utilizando vários conjuntos de soros auto-ímmunes.
- Verificar o comportamento do sistema polimerizado na faixa do púrpura, com diluição dos soros.
- Preparar lipossomas com diferentes composições de cardiolipina para avaliar a influência do ligante na polimerização e na resposta colorimétrica.
- Estudar a estequiometria de ligação entre a cardiolipina, presente na superfície dos lipossomas polimerizados, e os anticorpos.
- Verificar a distribuição da cardiolipina na superfície dos lipossomas polimerizados, através de técnicas como ressonância magnética ou fluorescência.
- Realizar medidas de potencial zeta para verificar melhor a estabilidade de prateleira dos lipossomas polimerizados.

Capítulo 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS,A.K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: 1995.

ADAMSON,A.W. **Physical chemistry of surfaces**. Califórnia:1990.

CHAIMOVICH, H. et.al. Anticardiolipin antibodies from syphilis and systemic lupus erythematosus induce leakage in cardiolipin vesicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 489-94, 1996.

CHARYCH, D. et al. Direct colorimetric detection of a receptor-ligand interaction by a polymerized bilayer assembly. **Science**, v. 261, p.585-588, 1993.

CHARYCH, D., PAN, J.J. Molecular recognition and colorimetric detection of Cholera toxin by poly(diacetylene) liposomes incorporating Gm1Ganglioside. **Langmuir**, v. 13, p.1365-1357, 1997.

CHARYCH, D. et.al. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. **Accounts of chemical research**, v. 31, p. 229-39, 1998.

CHARYCH, D. et al. Artificial cell membranes for diagnostics and therapeutics. **Chemtech**, sep. 1996.

CHARYCH, D. et al. Polydiacetylene liposomes functionalized with sialic acid bind and colorimetrically detect influenza virus. **Journal of American Chemical Society**., v. 117, p. 829-30, 1995.

- CHARYCH, D. et.al. Induced color change of conjugated polymeric vesicles by interfacial catalysis of phospholipase A₂. **Angewandte. Chemie International edition.**, v. 38, p. 656-659, 1999.
- CHEN, P.S. et. al. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 1756-1758, 1956.
- FERNANDES, S.R.M.; COSTALLAT, L.T. e ZOLLNER, R.L. Detecção de anticorpos anticomponentes lipídicos (cardiolipina, gangliosídeos e galactocerebrosídeos) em pacientes com doença de Behçet. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.30, p. 173-177, 1990.
- FRITZLER, M.J. Immunofluorescent ANA/tests. In: ROSE, N.R. et.al. **Manual of clinical Laboratory Immunology**. Wanshington: 1986. p.733-739.
- FROST, S.J. et. al. Novel homogeneous liposomal immunoassay for colorimetric estimation of serum IgG anticardiolipin antibodies. **Clinical chemistry**, v.42, p. 874-879, 1996.
- GAINES, G.L. **Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces**. New York: 1966.
- GOODMAN, J.W. Função e estrutura das Imunoglobulinas. in: TERR, A.I. et. al.; **Imunologia básica**, Rio de Janeiro:1991. P. 85-94.
- Hennies, P.T. **Preparação e caracterização de Lipossomas polimerizados formado fosfolipídios diacetilênicos**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1996. Tese (Doutorado) em andamento – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

- JANOFF, A. et.al. Novel liposome composition for a rapid colorimetric test for systemic lupus erithematosus. **Clinical Chemistry**, v.29, p.1587-1592, 1983.
- KANDIAH, D.A e KRILIS, S.A Laboratory detection of antiphospholipid antibodies. **Lupus**, v.5, p. 160-162, 1996.
- KRUIJFF, B. de, et. al. Further aspects of the Ca²⁺-dependent polymorphism of bovine heart cardiolipin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 693, p.1-12, 1982.
- KUSHNER, J. et. al. C. luciliae immunofluorescence test for antibodies to DNA. In: ROSE,N.R. et.al. **Manual of clinical Laboratory Immunology**. Wanshington: 1986. p.740-743.
- MA, Z. et. al. Colorimetric detection of Escherichia coli by polydiacetylene vesicles functionalized with glycolipid. **Journal of American Chemical Society**, v. 120, p. 2678-2679, 1998.
- MATTIOLI, M. et. al. Antigens and antibodies characteristic of systemic lupus Erythemathosus. **Bulletin on the Rheumatic Diseases**, v. 24, p.756-760, 1974.
- MORAES, A.M.; **Preparação e caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L-p-boronofenilalanina e dexorrubicina. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996.**
- MINO, N.; TAMURA, H. e OGAWA, K. Analysis of color transitions and changes on Langmuir-Blodgett films of a polydiacetylene derivative. **Langmuir**, v. 7, p. 2336-2341, 1991.

- MINO, N.; TAMURA, H. e OGAWA, K. Photoreactivity of 10,12-tricosadynoic acid monolayers and color transitions of the polymerized monolayers on an aqueous subphase. **Langmuir**, v. 8, p. 594-598, 1992.
- RAINIER, S. et. al. Phase transition characteristics of diphosphatidylglycerol (cardiolipin) and stereoisomeric phosphatidylglycerol bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 558, p. 187-198, 1979.
- NEW, R.R.C. **Liposomes: a practical approach**. New York: IRL press, 1990.
- NIMA TECHNOLOGY. **Operating manual - Tensiometers and Langmuir-Blodgett troughs**, England: 1995.
- O'BRIEN, D.F. et. al. Polymerization of preformed self-organized assemblies. **Accounts of chemical Research**, v.31, p. 861-868 (1998).
- O'BRIEN, D.F. et. al. Effects of membrane composition and lipid structure on the photopolymerization of lipid diacetylenes in bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.693, p. 437-443, 1982.
- OSTROWSKY, N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.64, p.45-64, 1993.
- PETIT, J-M. et. al. 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 267-273, 1992.
- POWERS, J.D. et. al. Trypsin Purification by Affinity Binding to Small unilamellar Liposomes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 506-519, 1990

- POWERS, J.D.L.; KILPATRICK, P.K. e CARBONELL, R.G. Protein purification by affinity binding to unilamellar vesicles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, p.173-182, 1987.
- RAND, R.P., SENGPUTA,S. Cardiolipin forms hexagonal structures with divalent cations. **Biochimica et biophysica acta**, v. 255, p.484-492, 1972.
- REBER, G. et.al. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of cardiolipin antibodies. **Thromb. Haemostasis**, v. 73, p. 444-452, 1995.
- RIBAS, A.M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Campinas: FEQ, UNICAMP,1997. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- RINGSDORF, H. et.al. Molecular architecture and function of polymeric oriented systems: models for the study of organization. Surface recognition and dynamics of biomembranes. **Angewandte chemie: international edition**, v.27, p.113-158, 1988.
- ROITT et. al. **Immunology**. Barcelona: 1996.
- SARKAR, A. et. al. Heteroaryl functionalised diacetylenes preparation and solid-state reactivity. **J. of Chemical Society Perkin T1**, v. ,p. 4141-4146, 1998.
- STEWART, J.C.M. **Anal. Biochem.**, v. 104, p. , 1959.
- TAMURA,H. et. al. Analysis of color transitions and changes on Langmuir-Blodgett films of a polydicacetylene derivative. **Lagmuir**, v. 7, p. 2336-2341. 1991.
- TAKASHI, T. et al. Immune reactions of liposomes containing cardiolipin and their relation to membrane fluidity. **Journal of Biochemistry**, v. 87, p.679-685, 1980.

UNANUE, E.R. et. al. **Imunologia**. Rio de Janeiro: 1984.

VENTURA, R.C.A. Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes empregando filtração em membranas de afinidade. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.**

VOET & VOET, **Biochemistry**. New York: 1996.

XU, Z. et.al. Microdomain Structures in Polymerizable and Nonpolymerizable diacetylenic Phosphatidylcholine Monolayers. **Langmuir**, vol.8, p.2724-2729, 1992.

WEGNER, G. Solid-state polymerization mechanisms. **Pure & Applied Chemistry**, v.49, p. 443-454, 1977.

WILSCHUT, J. et. al. Ca^{2+} -induced fusion of cardiolipin/phosphatidylcholine Vesicles monitored by mixing of aqueous contentes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 690, p. 297-30, 1982.

ANEXO I

1 – Perfis de polimerização do fosfolípido DC₈₉PC

Perfis de polimerização obtidos através de ensaios, conforme esquema citado na metodologia, do fosfolípido DC₈₉PC. Os perfis mostrados confirmam a polimerização desse fosfolípido somente na faixa do rosa ($\lambda = 480-490\text{nm}$).

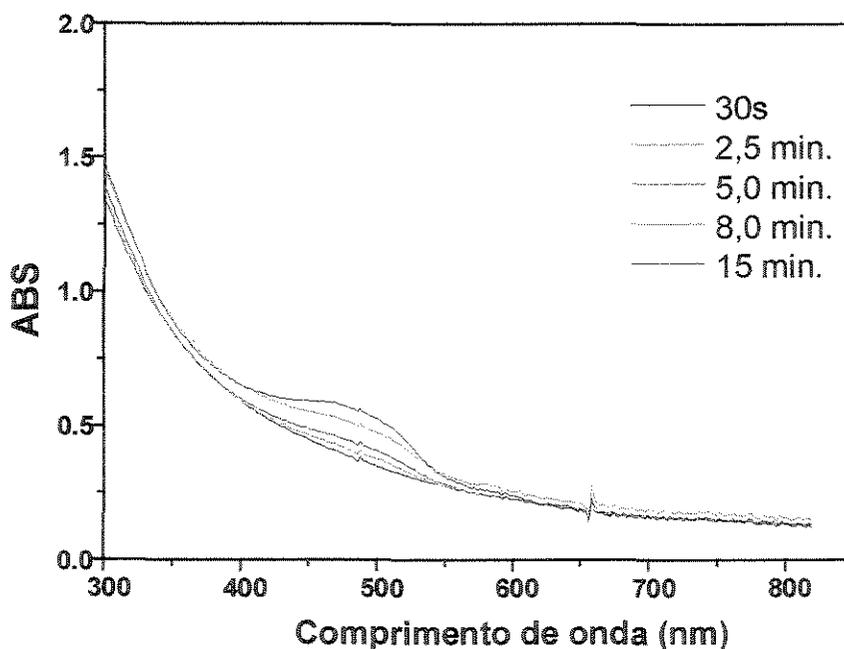


Figura I – Espectros obtidos por exposição direta da amostra de lipossomas formado por DC₈₉PC à lâmpada. UV (254nm).

2 – Distribuição de tamanhos de lipossomas monoméricos 1mM de lipídio total.

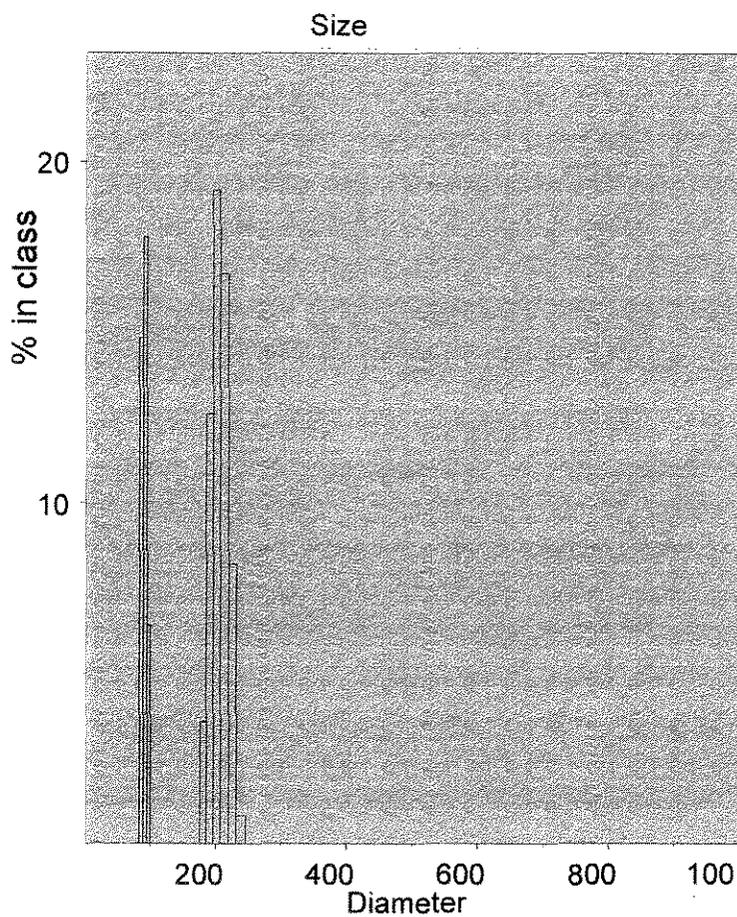


Figura II - Distribuição de tamanhos de lipossomas monoméricos formados por PDA /Cl 20% à pH 5,70.

Tabela I - Valores dos diâmetros encontrados para as 2 populações existentes em lipossomas monoméricos constituídos de PDA/Cl20% mol.

Pico	Área	Valor do diâmetro
1	39%	91.4 nm
2	61%	205,2 nm

3 – Distribuição de tamanhos de lipossomas polimerizados 1mM de lípidio total.

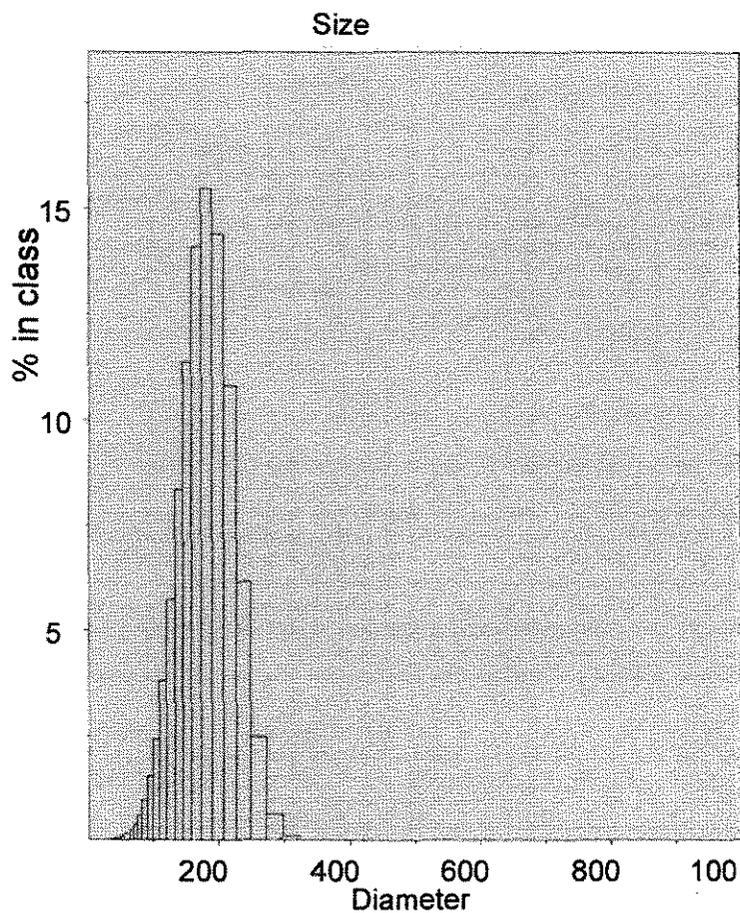


Figura III - Distribuição de tamanhos de lipossomas polimerizados formados por PDA/Cl 20% à pH 5,70.

Tabela II - Valores dos diâmetros encontrados para a população existente de lipossomas polimerizados constituídos de PDA/Cl 20% mol.

Pico	Área	Valor diâmetro
1	100%	173 nm

4 – Memória de cálculo do número de sítios de ligação disponíveis.

- Lipossomas polimerizados 0,5mM na faixa do azul ($\lambda = 635\text{nm}$) contendo 20% mol de cardiolipina

Dados:

Concentração de lipídio total: $C_{LT} = 0,5\text{mM}$

Raio médio dos lipossomas polimerizados: $R = 115 \text{ nm}$

Espessura da bicamada lipídica: $l = 4 \text{ nm}$

Área ocupada pela molécula de PDA = $37^{\text{Å}^2}$ ou $0,37 \text{ nm}^2$

Área ocupada pela molécula de CI = $172^{\text{Å}^2}$ ou $1,72 \text{ nm}^2$

Volume de lipossomas polimerizados: $V_{LP} = 1,5\text{mL}$

➤ Número de moléculas de lipídio em solução:

$$n_{LT} = V_{LP} \times C_{LT} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L} = 0,75 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$0,75 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 6,023 \times 10^{23} = \underline{4,52 \times 10^{17} \text{ moléculas de lipídio.}}$$

➤ Número de moléculas de lipídio / lipossoma:

$$N = [(4\pi R^2/a) + (4\pi(R-l)/a)], \quad [7]$$

Onde a é a área mínima ocupada pelas moléculas de lipídios, que é dada pela média ponderada das áreas do PDA e CI individualmente. Portanto:

$a = \text{fração molar de CI} \times \text{área ocupada pela molécula de CI} + \text{fração molar do PDA} \times \text{área ocupada pela molécula do PDA}$

$$a = 0,2 \times 1,72\text{nm}^2 + 0,8 \times 0,37 \text{ nm}^2 = 0,64 \text{ nm}^2$$

Substituindo-se os dados na equação acima, tem-se que $N = \underline{2,62 \times 10^5 \text{ molécula de lipídio/lipossoma.}}$

- Quantidade de lipossomas em solução:

$$N_{lip} = n_{LT}/N = 1,72 \times 10^{12} \text{ lipossomas.}$$

- Número de moles de cardioplipina disponíveis na superfície dos lipossomas polymerizados

Concentração de lipídio total = $C_{Cl} = 0,5\text{mM}$

Volume da solução = $V_{sol.} = 1,5\text{mL}$

Composição molar da cardioplipina: 20%

Assumindo que 60% da cardioplipina existente está na superfície dos lipossomas

$$N_{Cl} = (C_{Cl} \times V_{sol}) \times (0,2 \times 0,6) = 0,5 \times 1,5 \times 10^{-3} \times 0,2 \times 0,6$$

$$N_{Cl} = 0,09 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{Cl \text{ superfície.}}$$

- Cálculo de Unidades de IgG total (U) presente no soro de referência.

-soro de referência : 10U/mL de atividade anti-cardiolipina.

-Para lipossomas 0,5mM na faixa do "azul", o volume de saturação foi correspondente a 700 μ L de soro de referência. Então:

$$10\text{U/mL} \times 700 \times 10^{-3}\text{mL} = \underline{7\text{U}}$$

$$\text{razão: } 7\text{U}/1,72 \times 10^{12} \longrightarrow$$

$$\boxed{\text{razão} = 4,07 \times 10^{-12} \text{ U/lipossoma}}$$

ou

$$\text{razão : } 7\text{U}/0,09 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{Cl \text{ superfície}} \longrightarrow$$

$$\boxed{\text{razão} = 7,7 \times 10^{-4} \text{ U/ mmol}_{Cl \text{ superfície.}}}$$

-Para lipossomas 0,5mM na faixa do "púrpura", o volume de saturação foi correspondente a 300 μ L de soro de referência. Então:

$$10\text{U/mL} \times 300 \times 10^{-3}\text{mL} = \underline{3\text{U}}$$

$$\text{razão: } 3\text{U}/1,72 \times 10^{12}$$



$$\text{razão} = 1,74 \times 10^{-12} \text{ U/lipossoma}$$

ou

$$\text{razão : } 3\text{U}/0,09 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{\text{Cl}} \text{ superficie}$$



$$\text{razão} = 3,3 \times 10^{-4} \text{ U/ mmol}_{\text{Cl}} \text{ superficie.}$$

Para lipossomas de concentração 1mM, os cálculos foram semelhantes, corrigindo apenas o valor da concentração e o volume de soro de referência na saturação, correspondente à 1,1mL.