

"ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO DE PIRENO EM BICAMADAS  
DE FOSFOLIPÍDIOS USANDO DIFRAÇÃO DE RAIOS X"

*Christina Franco de Souza*

Orientadora

*Profa. Dra. Iris C. L. de Torriani*

*Este exemplar corresponde a edição  
final da tese defendida pela aluna  
e aprovada pela Comissão Julgadora.*

*Campinas, 14 de março de 1985*

*I. Torriani*

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

*Dezembro de 1984*

A meus pais e meus irmãos.

A G R A D E C I M E N T O S

A Profa. Dra. Iris C.L. de Torriani pela sugestão do tema e orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. Stephenson Caticha-Ellis pelos ensinamentos de Cristalografia e por ceder as facilidades do laboratório.

A Ana Carolina, Evaristo, José Alfredo, D. Júlia , D. Lelê, Luis Antonio, Rangel, Silvano e D. Vilma pela constante colaboração e amizade.

Aos funcionários da biblioteca pela ajuda indispensável à realização deste trabalho.

A Edina pelo excelente trabalho de datilografia e constante boa vontade.

Aos serviços de gráfica, xerox, vidraria e oficina mecânica pelos diversos serviços prestados.

Ao Laboratório de Raios Cômicos pela utilização do microdensitômetro.

Aos funcionários do Centro de Processamento de Dados do Instituto de Física pelo apoio no trabalho de computação envolvido nesta tese.

A todos meus amigos pelas horas de apoio, alegria e convivência.

Ao CNPq, FAPESP e Instituto de Física da UNICAMP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Neste trabalho apresentamos um estudo sistemático da difração de raios X a alto e baixo ângulos produzida por multi camadas úmidas de dipalmitil lecitina (DPL) com incorporação de pi reno em concentrações que variaram entre as relações moleculares 5:1 (DPL:pireno) e 100:1.

O pireno é um composto aromático muito usado em espectroscopia de fluorescência como sonda da região hidrofóbica de membranas celulares e artificiais. Tem sido observado que moléculas do tipo do pireno possuem uma certa mobilidade em bicamadas lipídi cas. Portanto, é interessante saber que perturbações elas produzem na região das cadeias acílicas e se há agregação do pireno dentro da bicamada.

Nos diagramas de difração obtidos, as reflexões de vidas às lamelas permitiram determinar as variações na espessura da bicamada em função da concentração de pireno. O halo correspondente à difração das cadeias acílicas mostra mudanças devidas aos diferen tes graus de ordenamento. Para altas concentrações de pireno, obser vamos a difração devida aos agregados cristalinos.

Os perfis de densidade eletrônica unidimensionais na direção normal ao plano das bicamadas refletem todas estas mudan ças e nos permitem sugerir um mecanismo de saturação para o pireno na bicamada.

## ABSTRACT

In this work we present the results of a systematic study of high angle and low angle X-ray diffraction from hydrated dipalmitoyl lecithin (DPL) multilayers with pyrene incorporated in concentrations varying between the molecular ratios 5:1 (DPL:pyrene) e 100:1.

Pyrene is an aromatic compound extensively used in fluorescence spectroscopy as a probe of the hydrophobic region of cell membranes and model systems. It has been pointed out that pyrene and similar molecules have a certain mobility in lipid bilayers. Consequently, it is interesting to know wich perturbations they will produce in the acyl chain region and if there is aggregation of pyrene inside the bilayer.

The diffraction patterns obtained showed the reflections due to the lamellae, from wich we could determine the changes in bilayer thickness as a function of pyrene concentration. The halo corresponding to the diffraction of the acylic chains shows changes due to the different degree of order. For high concentrations of pyrene we observe the diffraction due to the crystalline aggregates.

The one-dimensional electron density profiles in the direction normal to the plane of the bilayers reflects all these changes and allows us to suggest a saturation mechanism for the pyrene in the bilayer.

# Í N D I C E

CAPÍTULO 1	-	INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 2	-	BICAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS.....	03
2.1	-	NATUREZA E PROPRIEDADES DOS FOSFOGLICERÍDIOS..	05
2.2	-	PROPRIEDADES DE SISTEMAS FOSFOLIPÍDIOS/ÁGUA...	05
2.3	-	PIRENO - PROPRIEDADES FÍSICAS E INTERAÇÃO COM BICAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS.....	12
CAPÍTULO 3	-	DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR BICAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS.....	20
3.1	-	INFORMAÇÃO FORNECIDA PELA GEOMETRIA DAS FIGURAS DE DIFRAÇÃO.....	20
3.2	-	ANÁLISE DAS INTENSIDADES DAS REFLEXÕES.....	23
CAPÍTULO 4	-	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE EXPERIMENTAL..	31
4.1	-	AMOSTRAS.....	31
4.1.1	-	DISPERSÕES.....	31
4.1.2	-	MULTICAMADAS ORIENTADAS.....	33
4.2	-	MONTAGEM EXPERIMENTAL.....	34
4.2.1	-	MONTAGEM PARA DETEÇÃO FOTOGRÁFICA.....	35
4.2.2	-	MONTAGEM PARA A VARREDURA $\theta$ - $2\theta$ .....	37
CAPÍTULO 5	-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	-	RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO FOTOGRÁFICO....	41
5.2	-	RESULTADOS OBTIDOS COM VARREDURA $\theta$ - $2\theta$ .....	44
5.2.1	-	VARREDURAS $\theta$ - $2\theta$ PARA A DETERMINAÇÃO DAS FASES PARA BICAMADAS DE LECITINA COM PIRENO PELO MÉTODO PROPOSTO POR TORBET E WILKINS.....	47
5.3	-	ANÁLISE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS E CÁLCULO DOS PERFIS DE DENSIDADE ELETRÔNICA.....	51
CONCLUSÕES.....			59
BIBLIOGRAFIA.....			61

## CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

O arranjo de bicamada de sistemas lecitina/água tem sido bastante estudado desde que foi comprovado que tal estrutura constitui a base de membranas naturais.

A fluidez e a permeabilidade de bicamadas são características que dependem do tipo de lecitina que as compõem, de conformação das cadeias hidrocarbônicas dentro do arranjo e de possíveis moléculas que estejam incorporadas.

Técnicas como espectroscopia de fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica fornecem informações sobre a evolução dinâmica dessas características em função de parâmetros como temperatura, concentração e tipo de molécula dissolvida na bicamada. Um composto aromático muito utilizado em tais estudos, como sonda da região hidrofóbica, é o pireno.

A difração de raios X, por outro lado, nos fornece informações sobre a estrutura em si; por exemplo, a conformação das cadeias hidrocarbônicas.

O objetivo deste trabalho é confirmar e completar informações sobre bicamadas de dipalmitil lecitina com incorporações de pireno obtidas por espectroscopia de fluorescência, ressonância magnética eletrônica e ressonância magnética nuclear. Através de um estudo de altas concentrações de pireno em bicamadas de lecitina por difração de raios X a baixo ângulo, pretendemos verificar as perturbações causadas na região hidrofóbica e, entre outras coisas, a possível formação e localização de cristalitos do composto aromático nas amostras.

No Capítulo 2, temos uma descrição de propriedades e características de sistemas fosfolipídios/água e do pireno. Completando o capítulo, apresentamos um breve resumo de trabalhos envolvendo o pireno e sua interação com bicamadas de lecitina.

No Capítulo 3, apresentamos a teoria de difração de raios X envolvida no estudo de bicamadas, assim como o procedimento seguido na análise das reflexões obtidas.

As amostras usadas e sua preparação são apresentadas no Capítulo 4 junto com as montagens experimentais utilizadas na obtenção dos diagramas de difração.

Os resultados obtidos e sua discussão se encontram no Capítulo 5. Em seguida ao Capítulo 5, temos as conclusões finais do trabalho.



lina (Figura 2.1).

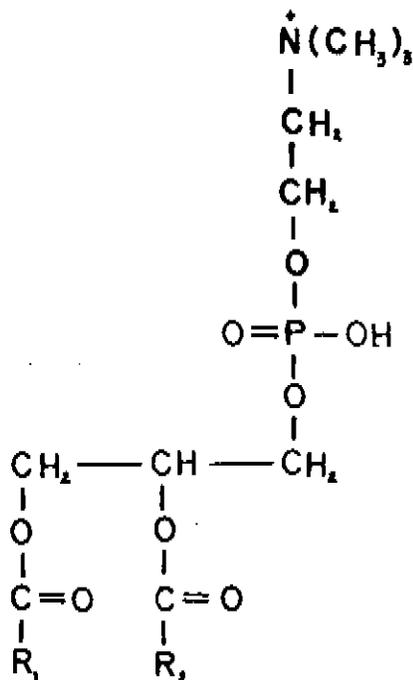
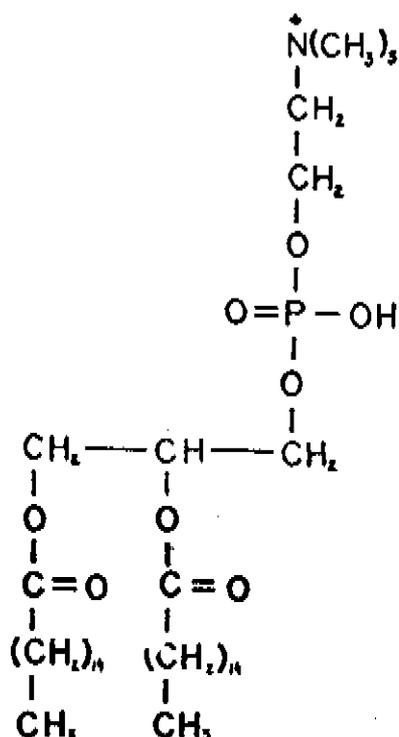


Figura 2.1 - Fosfatidilcolina

Todos os fosfoglicerídios têm carga negativa no grupo fosfato em pH 7,0, enquanto que o grupo colina tem carga positiva<sup>(1)</sup>. Assim, a fosfatidilcolina é um fosfolipídio zwitteriônico, i.e., a carga líquida na cabeça polar é nula neste pH.

Na dipalmitil lecitina, usada em nosso trabalho, os ácidos graxos substituintes possuem 16 carbonos cada um (ácido palmítico). Sua fórmula é:



## 2.2 - Propriedades de Sistemas Fosfolipídios/Água

Em solução aquosa, os fosfolipídios podem se associar em uma variedade de estruturas dependendo da natureza de seu grupo polar, do meio e do comprimento e grau de insaturação das cadeias hidrocarbônicas. Esse polimorfismo se deve, principalmente, a dois tipos de interação<sup>(2)</sup>:

(a) hidrofílica - entre os grupos polares e as moléculas de água;

(b) hidrofóbica - entre as cadeias hidrocarbônicas e as moléculas de água.

É o efeito hidrofóbico que determina a tendência de autoassociação de moléculas anfipáticas em água, propriedade muito forte em fosfolipídios.

Na Figura 2.2 é mostrado, esquematicamente, o diagrama de fase para o sistema diacilfosfatidilcolina/água<sup>(2)</sup>. Acima de 80% de conteúdo lipídico, se obtém bicamadas lipídicas empilhadas paralelamente. No limite de concentração lipídica muito baixa (0,1%), o estado termodinamicamente estável é a dispersão de vesículas de parede simples constituída por uma bicamada de fosfolipídios. No intervalo de concentração intermediária, são formadas estruturas do tipo mielina, multilamelares, fechadas. Sob variação de temperatura, todos estes sistemas sofrem transições de fase estruturais. A mais importante é a correspondente à fusão das cadeias hidrocarbônicas.

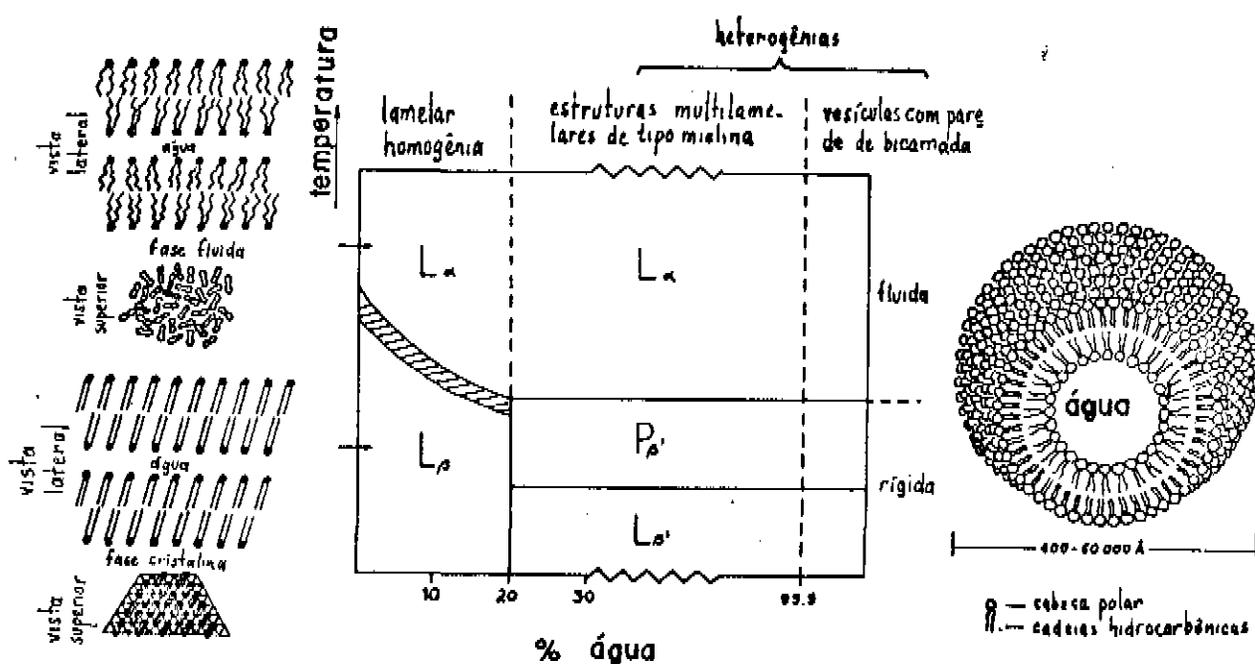


Figura 2.2 — Diagrama de fase para o sistema diacilfosfatidilcolina / água.

O arranjo de bicamada minimiza o contato hidrofóbico hidrocarbônico-água e proporciona uma interação efetivamente atrativa, via pontes de H e interações de van der Waals<sup>(3)</sup>. Podem existir, também, interações atrativas entre as cargas do grupo-cabeça localizadas no grupo fosfato e o grupo colina na lecitina.

Em temperaturas baixas, todas as cadeias hidrocarbônicas devem estar na conformação trans (ver Figura 2.3). Aumentando a temperatura, podem aparecer rotações *gauche* em torno das liga

ções C-C. Entretanto, as interações repulsivas entre cadeias impedem a maioria das mudanças trans-gauche até uma temperatura suficientemente alta para que ocorra uma fusão cooperativa<sup>(3)</sup>. Essa temperatura, conhecida como temperatura de transição de fase, depende da natureza das cadeias hidrocarbônicas, da região polar da molécula, da quantidade de água presente e de quaisquer solutos dissolvidos na água<sup>(4)</sup>.

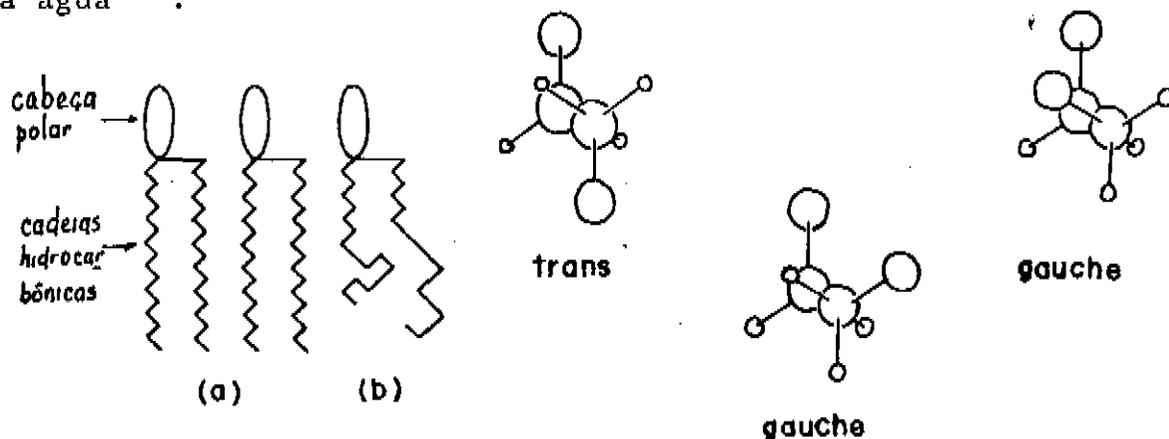


Figura 2.3 - Esquema das configurações das cadeias hidrocarbônicas em bicamadas (ref. (3)): a) totalmente trans; b) com rotações gauche.

Medidas feitas em  $L\alpha$ -dipalmitil lecitina<sup>(3)</sup> mostram uma transição bem definida em  $41^{\circ}\text{C}$ , com uma entalpia de  $\sim 9,5$  Kcal/mole, indicação de um processo bastante cooperativo.

LUZZATI, TARDIEU e REMAN<sup>(5)</sup> usaram letras latinas e gregas para designar as fases em misturas lecitina/água que dependem de parâmetros como conteúdo de água, temperatura, tipos de fosfolipídios presentes, etc. (ver Figura 2.4).

A letra latina maiúscula caracteriza o tipo de organização de longo alcance (rede uni-, bi- ou tridimensional, grupo espacial):

L - unidimensional lamelar;

H - bidimensional hexagonal;

P - bidimensional oblíqua ou centrada;

- R - romboédrica (grupo espacial  $R\bar{3}m$ );  
 Q - cúbica (grupo espacial  $Ia\bar{3}d$ );  
 C - tridimensional cristalina.

As letras gregas caracterizam a conformação de curto alcance das cadeias hidrocarbônicas:

$\alpha$  - organização do tipo líquido, observada acima da temperatura de fusão das cadeias hidrocarbônicas; conformação comum à maioria dos fosfolipídios na presença de água e a temperaturas suficientemente altas;

$\beta$  - cadeias esticadas e paralelas, orientadas a ângulos retos com o plano das lamelas e empilhadas com desordem rotacional em uma fase hexagonal bidimensional; observada, em temperaturas mais baixas, em fosfolipídios com cadeias heterogêneas na presença de quantidades muito pequenas de água;

$\beta'$  - similar a  $\beta$ , mas com as cadeias inclinadas em relação à normal às lamelas; encontrada em lecitinas sintéticas com cadeias idênticas, na presença de quantidades variáveis de água;

$\delta$  - cadeias em hélice, com os eixos perpendiculares ao plano dos grupos polares, e arranjadas com desordem rotacional em uma rede quadrada bidimensional; observada em lecitinas secas.

Duas fases exibem redes bidimensionais:  $P\delta$  e  $P\beta'$ ;  $P\beta'$  é formada por lamelas do tipo  $\beta'$  distorcidas por ondulações periódicas. A maioria das lecitinas secas apresenta uma fase cristalina bastante ordenada, mas com desordem rotacional das cadeias. As mudanças estruturais que ocorrem na fase lamelar devido ao conteúdo de água e à temperatura são mudanças reversíveis.

A conformação das cadeias acíclicas e o grau de mo

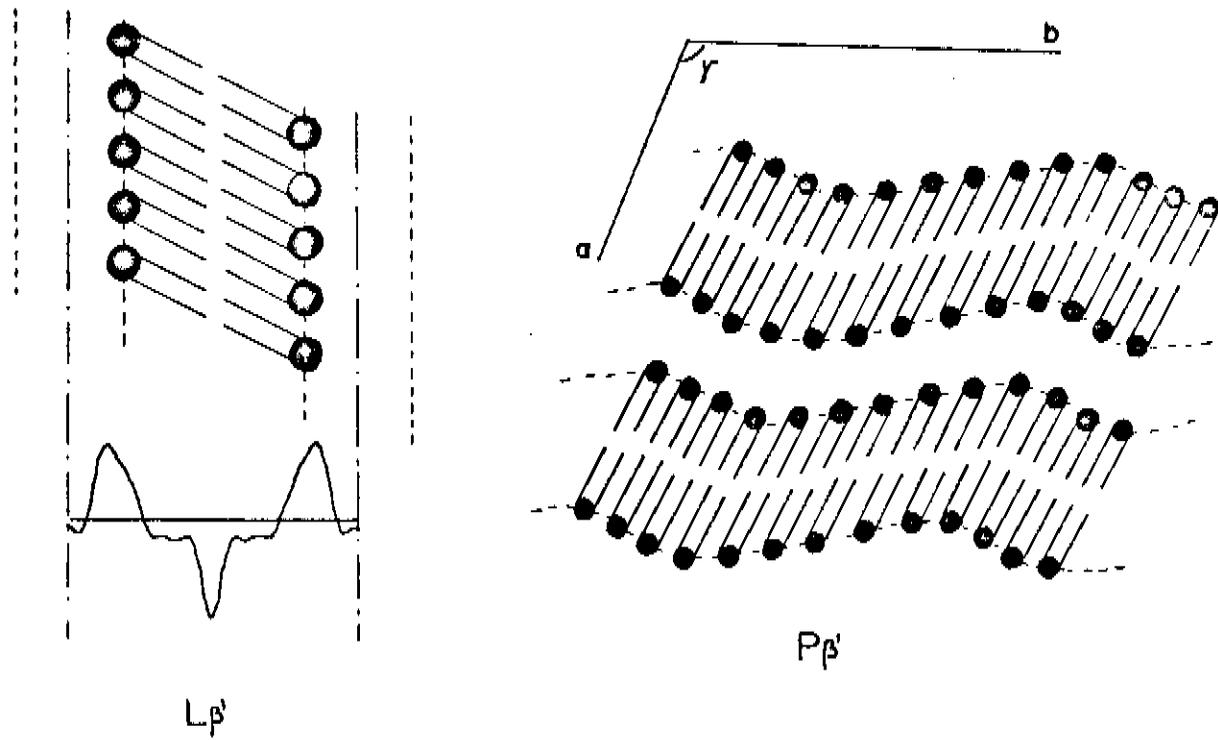
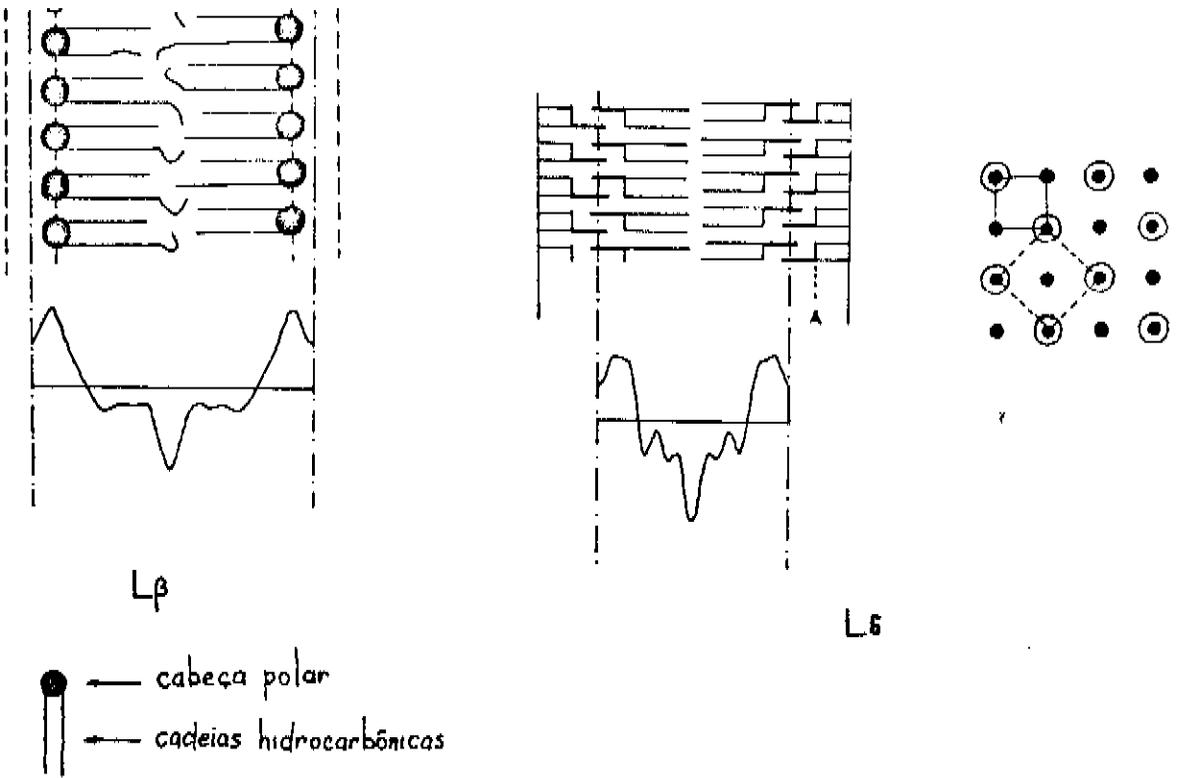


Figura 2.4 - Fases em sistemas lecitina/água de acordo com a notação de Luzzati, Tardieu e Reman (5).

vimentação que apresentam seus diferentes segmentos a uma dada temperatura são fatores que determinam a fluidez da fase lipídica da bicamada.

Em sistemas de lecitinas sintéticas, a espessura da camada lipídica decresce à medida que se adiciona água. Este comportamento está associado a um aumento na inclinação das cadeias em relação às lamelas.

A dipalmitil lecitina sintética, pura, tem suas cadeias na conformação  $\beta'$  à temperatura ambiente<sup>(5)</sup>.

É importante o estudo da estrutura de fosfolipídios no estado de bicamadas (fase lamelar) já que estas constituem a base dos modelos para membranas biológicas. Particularmente, os estados conformacionais das cadeias hidrocarbônicas podem ser estudados por diferentes métodos físicos: ressonância magnética eletrônica, espectroscopia de fluorescência, ressonância magnética nuclear e difração de raios X.

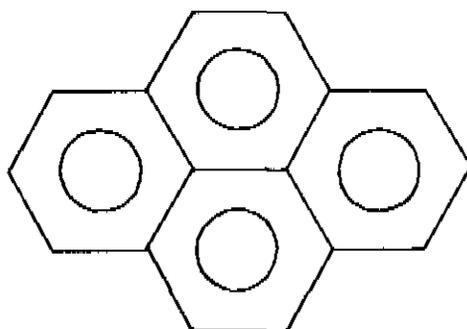
A ressonância magnética eletrônica e a espectroscopia de fluorescência dependem de moléculas *sonda* que devem ser introduzidas no sistema estudado. A ressonância magnética nuclear e a difração de raios X permitem detectar o estado conformacional do sistema sem a introdução de tais moléculas.

A espectroscopia de fluorescência tem fornecido muita informação sobre a organização de fosfolipídios nas bicamadas usando o pireno como sonda da região hidrofóbica.

O estudo de bicamadas de fosfolipídios com incorporação de pireno, objetivo de nosso trabalho, visa a determinação da perturbação produzida por estas moléculas aromáticas na região hidrofóbica das bicamadas.

### 2.3 - Pireno - Propriedades Físicas e Interação com Bicamadas de Fosfolipídios

É um composto aromático com fórmula molecular  $C_{20}H_{12}$  e fórmula estrutural:



Sua molécula é alongada e tem  $\sim 10\text{Å}$  de comprimento e, na direção do eixo plano mais curto,  $\sim 7\text{Å}$  de diâmetro<sup>(6)</sup>. Seu peso molecular é 202,24 e o ponto de fusão,  $156^{\circ}\text{C}$ .

O pireno cristaliza no sistema monoclínico. A cela contém quatro moléculas e tem dimensões<sup>(7)</sup>

$$a_0 = 13,649\text{Å}; \quad b_0 = 9,256\text{Å}; \quad c_0 = 8,470\text{Å} \quad \text{e} \quad \beta = 100^{\circ}28'.$$

Seu grupo espacial é  $P2_1/a$ .

As moléculas estão arranjadas em pares paralelos na rede cristalina (ver Figura 2.5) e a menor distância entre elas é  $3,53\text{Å}$ <sup>(7,8)</sup>.

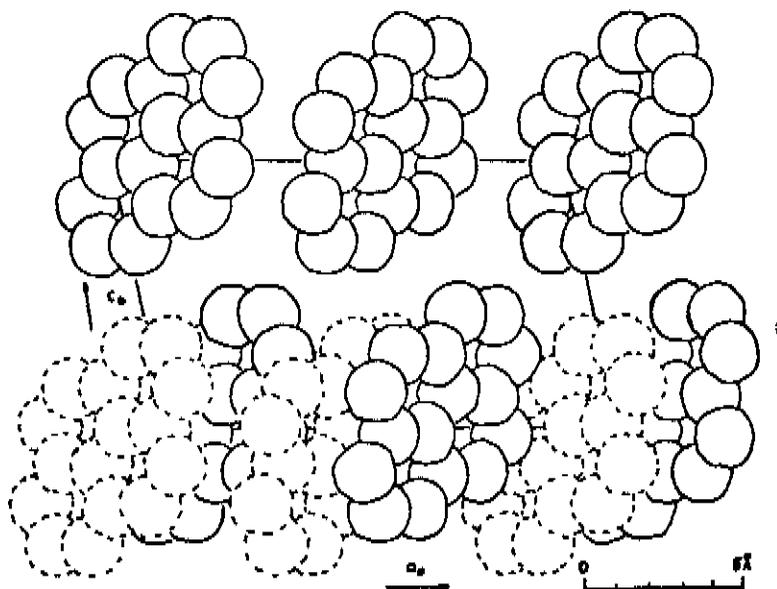


Figura 2.5 - Estrutura monoclínica de pireno projetada ao longo de seu eixo  $b_0$ . As moléculas estão distribuídas em pares.

A espectroscopia de fluorescência utiliza compostos aromáticos que se localizam na região hidrocarbônica de bicamada lipídica fornecendo informações sobre o grau de ordenamento das cadeias acíclicas. O pireno é bastante usado para este fim por ser praticamente insolúvel em água (solubilidade de  $\sim 10^{-6}$  moles/l<sup>(6)</sup>), por formar excímeros<sup>(8)</sup> e ter um tempo de vida muito grande (a formação de excímeros ocorre em concentrações bem baixas).

VANDERKOOI e CALLIS<sup>(10)</sup> mediram os coeficientes de difusão lateral do pireno em uma série de sistemas de membranas naturais e artificiais. Utilizaram o fato de que, durante seu tempo de vida, uma molécula fotoexcitada de pireno pode, por difusão translacional, se aproximar o suficiente de uma molécula não excitada pa

ra formar um excímero. A fluorescência do excímero (verde-azulada, sem estrutura e larga) é prontamente distinguida da fluorescência do monômero (violeta e bastante estruturada). Um dos resultados encontrados foi que, em uma suspensão de membranas, a formação do dímero depende da razão lipídio : pireno.

Outro resultado encontrado pelos mesmos autores<sup>(10)</sup> foi que, em membranas de dipalmitil lecitina abaixo da temperatura de transição de fase, a formação de excímeros não pode ser descrita pela teoria de difusão simples ou pelo tratamento de Smoluchowski. A teoria de difusão simples supõe que a distribuição de moléculas de pireno na membrana é randômica. É mais provável que ocorra o contrário nas membranas de dipalmitil lecitina - a inserção de uma molécula de pireno na região hidrocarbônica cristalina introduz desordem, aumentando a probabilidade da próxima ser inserida nesta área. Além disso, observaram efeitos de saturação na formação de dímeros em altas concentrações de pireno em membranas biológicas e artificiais que também não são previstos pela teoria de difusão simples. Há duas explicações possíveis. A primeira é que pode haver uma quantidade de acumulação finita para o pireno na parte fluida da membrana. Em altas concentrações, algumas moléculas de pireno podem ser forçadas e ocupar sítios mais próximos dos grupos-cabeça polares dos lipídios; moléculas, aí localizadas, difundiriam mais lentamente e formariam menos excímeros. Outra possibilidade apresentada pelos autores<sup>(10)</sup> é que as moléculas de pireno induzem um ordenamento local das cadeias lipídicas em sua vizinhança imediata, levando a um *enrijecimento* da bicamada.

GALLA e SACKMANN<sup>(6)</sup> descrevem um método para determinação do coeficiente de difusão lateral de moléculas aromáticas na região hidrofóbica de bicamadas lipídicas. Seu método está basea

do na suposição de que a formação de excímeros de pireno em membranas fluidas é um processo controlado por difusão e foi aplicado em membranas de dipalmitil lecitina e dipalmitil lecitina-colesterol. Um resultado importante deste trabalho é a forte redução na razão de excímeros na passagem do estado cristalino da membrana para o líquido-cristalino. Este comportamento mostra que a formação de excímeros não é um processo controlado por difusão no intervalo de transição de fase ou no estado cristalino da matriz lipídica. Os autores apresentam, como sendo a única explicação razoável para isto, a baixa solubilidade do pireno na matriz lipídica cristalina. As moléculas de pireno se agregariam em pequenos aglomerados (ou cristálitos submicroscópicos) em temperaturas menores que a de transição de fase. Microcristais de pireno exibem uma fluorescência excímera muito alta devido a um arranjo tipo *sanduíche* das moléculas nos cristálitos, que favorece a formação de excímeros. A formação dos aglomerados começa em concentrações muito baixas. Para as dispersões lipídicas estudadas no trabalho de GALLA e SACKMANN<sup>(6)</sup>, o limite mínimo na razão molar pireno : lipídio para início da formação de aglomerados de pireno é  $\sim 0,001$ . Este resultado é uma indicação de que a matriz lipídica das dispersões forma uma estrutura cristalina bastante regular abaixo da temperatura de transição de fase, contendo somente um número muito pequeno de espaços vazios. Em vesículas pequenas,  $\sim 300\text{Å}$  de diâmetro, obtidas por sonicação, a solubilidade do pireno na matriz lipídica cristalina é muito maior,  $\sim 0,01$ . A tensão presente em pequenas vesículas impede a formação de uma estrutura cristalina regular.

GLUSHKO, THALER e KARP<sup>(11)</sup> descrevem um novo método para investigação de polaridade em meios hidrofóbicos utilizando o pireno. O método está baseado na variação da estrutura fina de

fluorescência do pireno. Em contraste com outras sondas sensíveis à polaridade, que possuem grupos polares, o pireno se dirige diretamente à região mais hidrofóbica. Assim, poderá registrar a polaridade da região hidrofóbica central e não a de regiões próximas ou na própria interface fosfolipídio-água. Como acontece com qualquer sonda extrínseca, é essencial ter certeza de que a introdução de pireno não irá perturbar a polaridade e organização de regiões hidrofóbicas em proteínas e membranas. Além disso, é preciso verificar a localização e heterogeneidade dos sítios de incorporação de pireno. Particularmente, em altas concentrações, ele pode vir a ser incorporado em muitos sítios diferentes. Sob estas condições, o espectro de fluorescência será uma composição de padrões de estrutura fina individuais. De acordo com os autores<sup>(11)</sup>, o pireno mostrou ser uma das sondas de fluorescências mais versáteis da polaridade das regiões hidrofóbicas.

VANDERKOOI, FISCHKOFF, ANDRICH, PODO e OWEN<sup>(9)</sup> propõem um modelo para a localização de pireno em uma membrana de dipalmitil lecitina a 60°C. Assumem que a molécula está limitada a permanecer com seu eixo longo perpendicular ao plano da bicamada e que, portanto, é difícil acomodar duas moléculas de pireno com as bordas em contato dentro da região hidrofóbica. Como a região mais imobilizada de uma membrana modelo ocorre no nível dos grupos glicérol, foi proposto o modelo apresentado na Figura 2.6. Segundo os autores<sup>(9)</sup>, este modelo é consistente com os dados de ressonância magnética nuclear e permite rotações da sonda em torno da direção perpendicular à membrana, assim como difusão lateral nas regiões hidrofóbicas da bicamada.

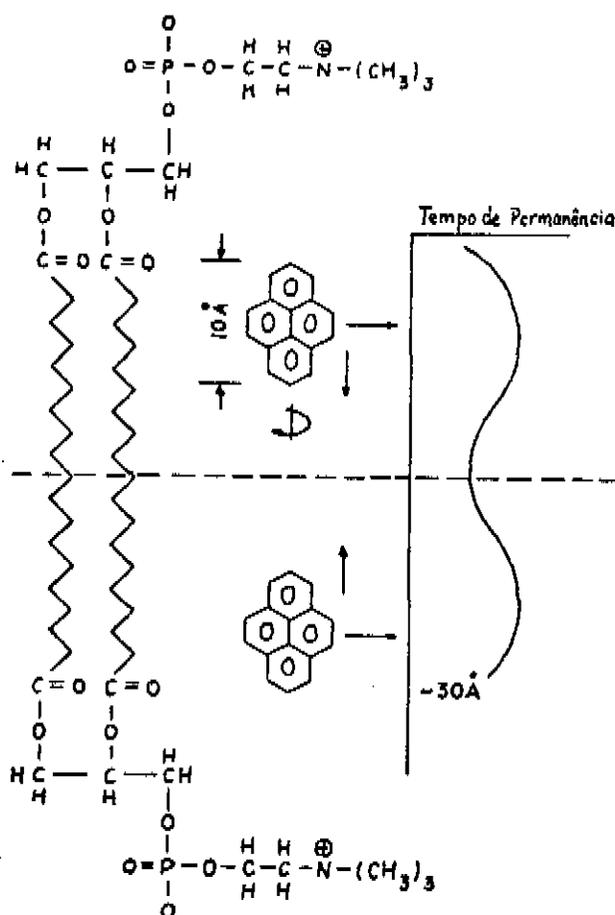


Figura 2.6 - Modelo proposto por Vanderkooi e colaboradores (9) para a localização de pireno em uma bicamada de dipalmitil lecitina a  $66^{\circ}\text{C}$ .

BADLEY, MARTIN e SCHNEIDER<sup>(12)</sup> procuraram determinar a relação entre o comportamento de sondas de fluorescência e o de bicamadas que as contêm. O comportamento das sondas parece ser determinado por uma combinação de propriedades químicas, tamanho, rigidez e forma das mesmas junto com as propriedades dos fosfolipídios da bicamada. Foi observado pelos autores<sup>(12)</sup> um grande grau de liberdade para várias sondas aromáticas, o que reflete sua habilidade em criar ou utilizar espaço nas bicamadas. As oscilações rápidas de várias sondas foram atribuídas à existência de buracos ou espa

ços livres dentro das bicamadas lipídicas. A suposição é que tais buracos surjam de imperfeições no empacotamento de resíduos de ácidos graxos causadas por torção em torno das ligações simples C-C ou a presença de ligações C=C. A introdução de moléculas que tenham estruturas diferentes das moléculas que formam a bicamada provocaria imperfeições adicionais no empacotamento e criaria espaço para a mobilidade desejada.

SANIOTO e SCHREIER<sup>(13)</sup> estudaram as interações de alguns compostos aromáticos policíclicos com as bicamadas de dipalmitil lecitina usando o método de marcador de spin. Observaram que os hidrocarbonetos pequenos (em particular, o pireno) não alteram em grande extensão o grau de organização das moléculas de fosfolipídios. Por outro lado, os hidrocarbonetos aromáticos grandes interagem com as bicamadas promovendo uma transição das cadeias da fase cristalina para a fluida. Os autores concluíram que é possível que a habilidade em provocar uma transição de fase esteja relacionada com a posição do composto na bicamada. Os compostos maiores se intercalariam entre as cadeias acíclicas dos fosfolipídios diminuindo as interações fosfolipídio-fosfolipídio. Os menores se dissolveriam na região central da bicamada, próximo dos grupos metil terminais.

Num estudo similar, por difração de raios X<sup>(14)</sup>, foram estudadas bicamadas de dipalmitil lecitina com hidrocarbonetos aromáticos incorporados em concentração molecular 8:1 (lecitina : hidrocarboneto). A introdução dos hidrocarbonetos aumentou a desordem dentro das bicamadas. No que se refere à estrutura molecular, foi observada uma leve alteração na região dos ésteres e início das cadeias de carbono no perfil de densidade eletrônica (calculado na direção perpendicular ao plano das bicamadas) para a amostra de lecitina com pireno. Além disso, comparando este perfil com o calcula

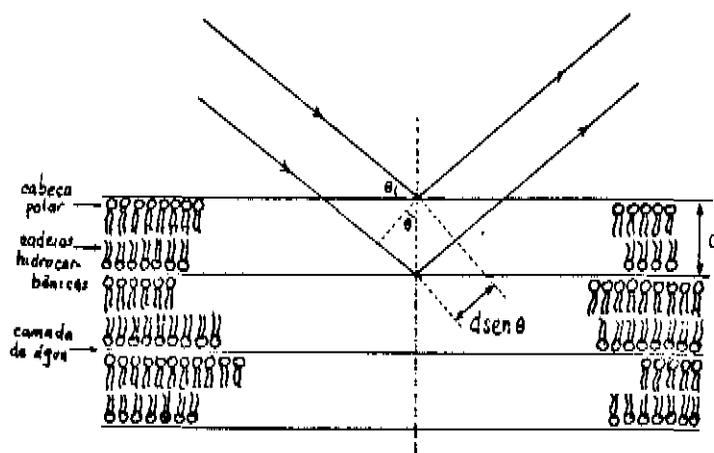
do para dipalmitil lecitina pura, observou-se uma separação menor entre as regiões correspondentes aos grupos polares.

## CAPÍTULO 3

## DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR BICAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS

## 3.1 - Informação Fornecida pela Geometria das Figuras de Difração

Em nossas amostras, as moléculas de lecitina se ordenam em um arranjo lamelar conforme o desenho:



Estas multicamadas formam uma estrutura com periodicidade  $d$  na direção perpendicular aos planos das bicamadas que difrata de acordo com a lei de Bragg:

$$2d \operatorname{sen} \theta = n\lambda$$

onde:  $\theta$  - ângulo formado pelos feixes incidente e difratado com o plano;

$n$  - número inteiro que representa a ordem de difração;

$d$  - espaçamento interplanar;

$\lambda$  - comprimento de onda de raios X.

O arranjo se comporta como uma estrutura unidimensional na direção perpendicular a seus planos.

Considerando:

- 1) Todo vetor da rede recíproca  $\vec{r}_{hkl}^* = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + \ell\vec{c}^*$  é normal ao plano  $(hkl)$  da rede cristalina e seu módulo é o inverso da distância interplanar  $d_{hkl}$  <sup>(15)</sup>:

$$|\vec{r}_{hkl}^*| = \frac{1}{d_{hkl}} ;$$

- 2) Sendo  $\vec{S}_0$  e  $\vec{S}$  os vetores unitários nas direções dos feixes incidente e difratado, respectivamente. Define-se um vetor

$$\vec{b} = \frac{\vec{S} - \vec{S}_0}{\lambda} ,$$

perpendicular aos planos, conforme Figura 3.1.

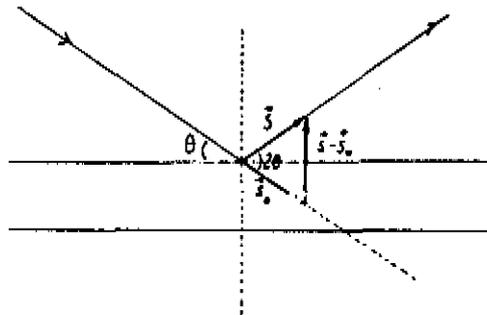


Figura 3.1 - Definição geométrica do vetor  $\vec{b}$ .

Um feixe incidente na direção  $\vec{S}_0$  dará origem a um feixe difratado na direção  $\vec{S}$  somente quando o vetor  $\vec{b}$  for igual a um vetor da rede recíproca,  $\vec{r}_{hkl}^*$ .

- 3) Seja uma rede unidimensional no espaço real formada por uma série de planos e descrita pela função

$$R(\vec{r}) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \delta(x-x_n)$$

onde os  $x_n$  são números inteiros e  $x, y, z$  são números reais. Portanto,  $R(\vec{r}) = 0$  para  $x$  não inteiro.

A imagem de  $R(\vec{r})$  no espaço recíproco é definida como sendo o quadrado de sua transformada de Fourier

$$L(\vec{b}) = \{T[R(\vec{r})]\}^2.$$

Assim,

$$L(\vec{b}) = \delta^2(y^*) \delta^2(z^*) \sum_{\ell=-\infty}^{+\infty} \delta(x^*-x_\ell^*)$$

onde os  $x_\ell^*$  são números inteiros. Portanto,  $L(\vec{b}) = 0$  para valores de  $y^*$  e  $z^*$  diferentes de zero e valores de  $x^*$  que não sejam inteiros.

Logo, a imagem da rede unidimensional de planos paralelos ao  $yz$  no espaço real é uma rede unidimensional de pontos sobre o eixo  $x^*$  no espaço recíproco<sup>(16)</sup>.

Se tivermos uma função densidade eletrônica  $\rho(\vec{r})$  com a forma de  $R(\vec{r})$ , sua imagem no espaço recíproco

$$\{T[\rho(\vec{r})]\}^2 = \{|F(\vec{b})|\}^2 \propto I(\vec{b}),$$

proporcional à intensidade  $I(\vec{b})$ , será uma sucessão de pontos igualmente espaçados.

Lembrando que no arranjo lamelar temos uma rede

unidimensional de planos e levando em conta as considerações acima, devemos obter diagramas de difração com as reflexões igualmente espaçadas e em posições definidas por múltiplos inteiros do inverso do espaçamento interplanar:

$$\frac{n}{d} = \frac{2 \operatorname{sen} \theta}{\lambda}$$

que, para a região de baixo ângulo ( $d > 20 \text{ \AA}$  e  $\operatorname{sen} \theta \approx \theta$ ), pode ser aproximado para:

$$\frac{n}{d} = \frac{2\theta}{\lambda}$$

Assim, as posições das reflexões definem a simetria da unidade de repetição e suas dimensões.

### 3.2 - Análise das Intensidades das Reflexões

A variação da intensidade espalhada no espaço recíproco fornece informações sobre a variação da densidade eletrônica média na direção perpendicular aos planos das bicamadas.

Seja  $F(\vec{b})$  a amplitude da onda resultante da adição das ondas espalhadas por  $N$  átomos nas posições  $\vec{r}_j$  ( $j=1, N$ ), cujos fatores de espalhamento atômico são  $f_j$  ( $j=1, N$ ).

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

Outra maneira de representar  $F(\vec{b})$  é descrever os  $N$  átomos difratantes por uma função densidade eletrônica contínua,  $\rho(\vec{r})$ , que dá o número de elétrons por unidade de volume, num elemen

to de volume  $dV_r$  do espaço real:

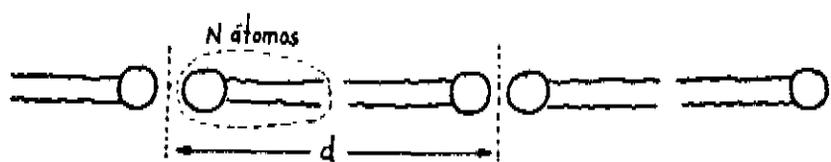
$$F(\vec{b}) = \int_V \rho(r) \exp(2\pi i \vec{b} \cdot \vec{r}) dV_r \quad (2)$$

integrando em todo espaço real.

Aplicando a transformada de Fourier, pode-se escrever:

$$\rho(r) = \int_{V^*} F(\vec{b}) \exp(-2\pi i \vec{b} \cdot \vec{r}) dV_b \quad (3)$$

Considerando um arranjo unidimensional de moléculas com  $N$  átomos



o fator de estrutura será dado por

$$F(x^*) = \sum_{j=1}^{2N} f_j \exp(2\pi i x^* x_j) \quad (4)$$

onde  $f_j$  é o fator de espalhamento atômico do  $j$ -ésimo tipo de átomo da cela. O somatório é sobre todos os átomos na cela unitária, mesmo que, em casos especiais, certos átomos possam ser equivalentes;  $x_j$  é a coordenada do  $j$ -ésimo átomo na cela.

A relação exponencial (4) leva a uma composição simples de amplitudes e fases através de vetores no plano complexo:

$$F(x^*) = \sum_{j=1}^{2N} f_j (\cos 2\pi x^* x_j + i \sin 2\pi x^* x_j) = \sum_j f_j (A_j + i B_j) \quad (5)$$

Assim,  $F(x^*)$  pode ser representada no plano complexo por

$$F(x^*) = |F(x^*)| \exp[i\alpha(x^*)] \quad (6)$$

onde  $\alpha(x^*)$  é o ângulo de fase dado por

$$\operatorname{tg} \alpha(x^*) = \frac{\sum_{j=1}^{2N} f_j \operatorname{sen} 2\pi x^* x_j}{\sum_{j=1}^{2N} f_j \cos 2\pi x^* x_j} = \frac{\sum_{j=1}^{2N} f_j B_j}{\sum_{j=1}^{2N} f_j A_j} \quad (7)$$

O equivalente da eq.(3) para uma dimensão é:

$$\rho(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x^*) \exp(-2\pi i x^* x) dx^* \quad (8)$$

Para uma onda eletromagnética, a intensidade é proporcional ao quadrado da amplitude. Como a amplitude é  $|F(x^*)|$ ,

$$I(x^*) \propto |F(x^*)|^2. \quad (9)$$

Para o cálculo de  $\rho(x)$ , é preciso conhecer  $F(x^*)$ , ou seja, a amplitude e a fase. De (9), vê-se que as intensidades fornecem sô as amplitudes. Logo, há um fator de fase associado a cada amplitude que não pode ser determinado diretamente dos diagramas de difração. A expressão (8) pode ser reescrita como:

$$\rho(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} |F(x^*)| \exp[-2\pi i x^* x + i\alpha(x^*)] dx^* \quad (10)$$

Em nosso caso, temos uma estrutura centrossimétrica. Considerando a origem no centro de simetria, temos que

$$\rho(x) = \rho(-x) \quad (11)$$

Assim,

$$F(x^*) = 2 \int_0^{\infty} \rho(x) \cos 2\pi x^* x \, dx$$

ou

$$F(x^*) = 2 \sum_{j=1}^N f_j \cos 2\pi x^* x_j = \sum_{j=1}^{2N} f_j \cos 2\pi x^* x_j$$

Portanto, para uma estrutura centrossimétrica,

$$\sum_{j=1}^{2N} f_j \operatorname{sen} 2\pi x^* x_j = 0$$

e, de (7), temos

$$\operatorname{tg} \alpha(x^*) = 0 \Rightarrow \alpha(x^*) = \begin{cases} 0 \\ \pi \end{cases}$$

Logo,

$$F(x^*) = \pm |F(x^*)|$$

e

$$\rho(x) = \int_0^{\infty} \pm |F(x^*)| 2 \cos 2\pi x^* x \, dx^*$$

No caso de reflexões lamelares de multicamadas o rientadas, se obtêm os valores  $|F(x^*)|^2$  nos pontos  $x^* = \frac{n}{d}$  da rede recíproca.

Para calcular  $\rho(x)$ , é preciso conhecer as fases associadas a  $|F(x^*)|$ , para  $x^* = \frac{n}{d}$ , ou  $F(x^*)$  contínua. A função  $F(x^*)$

contínua pode ser reconstruída, usando o teorema da amostragem de Fourier, a partir dos valores  $|F(n/d)|$  obtidos nas varreduras. Este método foi proposto por SAYRE<sup>(17)</sup>, em 1952, e aplicado na análise estrutural de bicamadas de fosfolipídios por LESSLAUER, CAIN e BLASIE<sup>(18)</sup> e ZACCAI, BLASIE e SCHOENBORN<sup>(19)</sup>.

O teorema da amostragem nos diz que, se a transformada de Fourier de uma função  $F(x^*)$  é zero acima de um certo valor  $d/2$ :

$$\rho(x) = 0 \quad \text{para} \quad |x| \geq \frac{d}{2},$$

então  $F(x^*)$  pode ser unicamente determinada por seus valores

$$F_n = F\left(\frac{n}{d}\right), \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$$

escrevendo

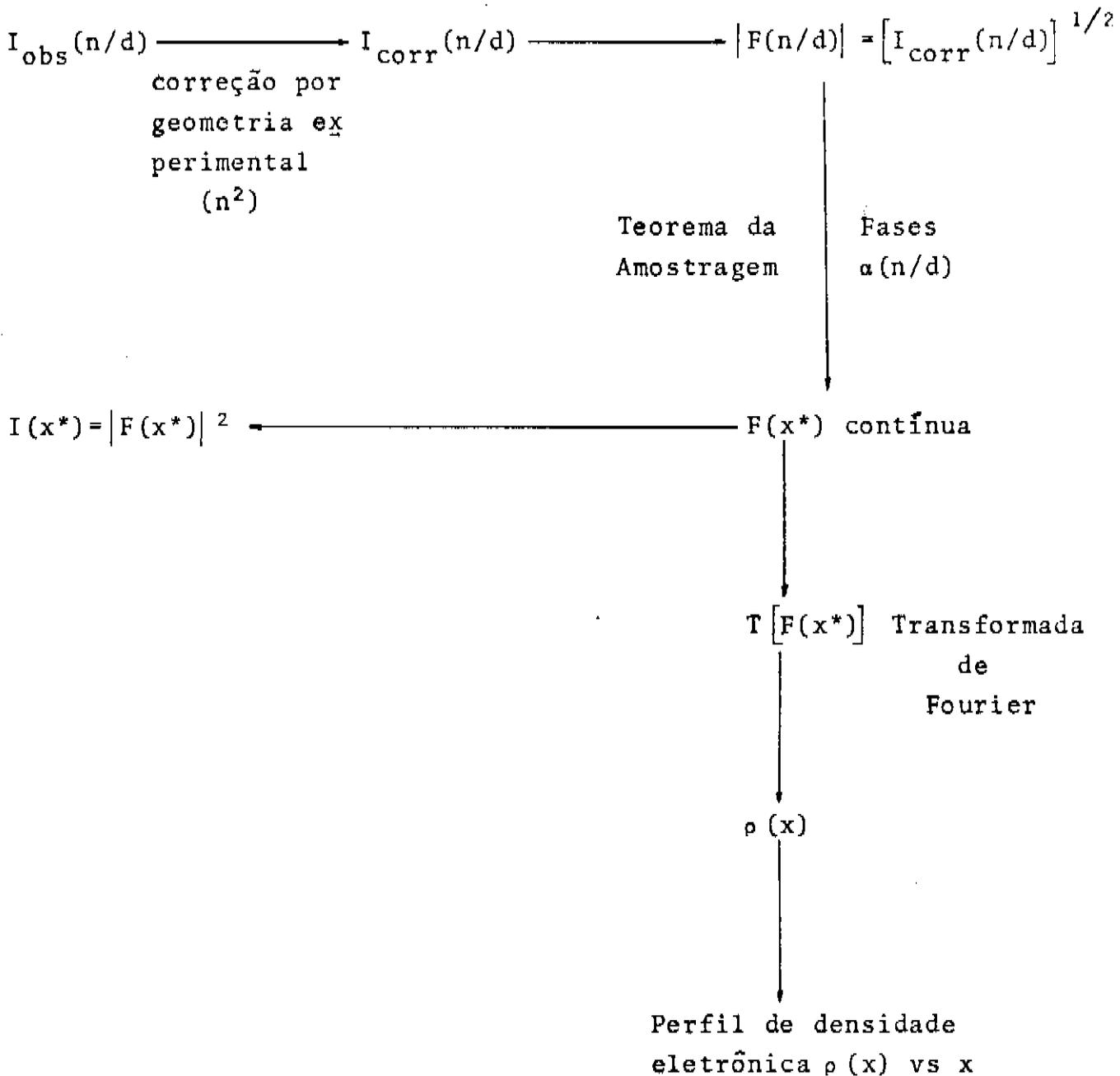
$$F(x^*) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} F_n \frac{\text{sen } \pi(x^*d-n)}{\pi(x^*d-n)}.$$

No nosso caso, temos:

$$F(x^*) = \sum_{n=-n_{\text{máx}}}^{n_{\text{máx}}} |F(n/d)| \exp [i\alpha(n/d)] \frac{\text{sen } \pi(x^*d-n)}{\pi(x^*d-n)} \quad (12)$$

onde  $n_{\text{máx}}$  é o número total de reflexões obtidas.

Dessa forma, conhecendo  $F(x^*)$ , pode-se calcular a distribuição de densidade eletrônica da bicamada projetada sobre um eixo  $x$  normal aos planos lamelares partindo dos valores observados da intensidade nos pontos  $\frac{n}{d}$ ,  $n=0, n_{\text{máx}}$ . O cálculo é feito através de um programa, segundo o esquema a seguir:



Um ponto importante que, ainda, precisa ser discutido é como determinar as fases  $\alpha(n/d)$  que devem ser fornecidas para o cálculo de  $F(x^*)$  contínua.

Se as intensidades difratadas por uma estrutura centrossimétrica unidimensional forem graficadas em função de  $x^*$ , obter-se-á uma curva proporcional a  $\cos^2\alpha(x^*)$  com picos localizados em valores de  $|x^*| = n/d$ . Nos pontos de intensidade nula, o fator de estrutura também será nulo, o que indica uma mudança de fase das amplitudes de zero a  $\pi$  ou vice-versa (ver ref.(20)).

É preciso, portanto, determinar a combinação de fases que descreve a estrutura. O número de combinações possíveis é dado por  $\frac{2^{n_{\text{máx}}}}{2}$ . O fator 2 que divide se deve ao fato da estrutura ter um centro de simetria.

As fases para bicamadas de dipalmitil lecitina são conhecidas dos trabalhos de LESSLAUER, CAIN e BLASIE<sup>(18)</sup> e TORBET e WILKINS<sup>(21)</sup>. De acordo com estas referências, as fases para as 8 primeiras ordens são: -1, 1, -1, -1, 0, -1, 0, -1. Foram estes os valores que utilizamos no cálculo do perfil de densidade eletrônica das bicamadas de lecitina.

Na literatura, encontra-se diferentes métodos para a determinação das fases<sup>(22)</sup>.

Em 1954, PERUTZ<sup>(23)</sup> propôs um método que permitia assinalar fases somente se, durante o processo de inchamento, a estrutura permanecesse constante, exceto pelo aumento da espessura da camada de solvente. TORBET e WILKINS<sup>(21)</sup> estenderam este método para o caso de uma estrutura que muda de maneira simples durante o inchamento. O método de Perutz está baseado em duas suposições: (a) é mais provável que uma solução simples e única esteja correta do que qualquer uma entre várias soluções alternativas complicadas; (b) uma estrutura que permanece constante com a hidratação é fisicamente plausível. De acordo com Torbet e Wilkins, se não puder ser encontrada uma solução baseada nestas suposições, pode-se considerar uma

em termos de uma estrutura que mude de modo simples e fisicamente plausível com a hidratação. Se for encontrada uma solução única deste tipo, é razoável assumir que seja correta.

Para encontrar esta solução, as curvas de  $F(x^*)$  são reconstruídas, usando o método de Sayre, para diferentes umidades relativas. A combinação de fases que fornece uma família de curvas  $F(x^*)$  que evolua com a variação de umidade de uma forma simples e quase-senoidal deverá ser a combinação correta. Basta provar que ela é única, ou seja, que todas outras combinações destroem a forma quase-senoidal e fornecem famílias de  $F(x^*)$  muito mais complicadas.

Em nosso trabalho, seguimos o seguinte procedimento para as amostras de lecitina com pireno. Após o cálculo de perfis de densidade eletrônica com todas combinações de fase possíveis, selecionamos duas que forneceram perfis compatíveis com a composição química da bicamada. Estas duas combinações foram: -1, 1, -1, -1, 0, -1, 0, -1 e -1, -1, 1, -1, 0, -1, 0, -1.

Os valores de intensidade obtidos da curva de intensidade reconstruída nos pontos correspondentes às posições das reflexões observadas tiveram melhor concordância com os valores experimentais para a seguinte combinação de fases: -1, 1, -1, -1, 0, -1, 0, -1.

Além disso, procuramos confirmar esta escolha aplicando o método de inchamento proposto por Torbet e Wilkins. Os resultados obtidos estão no Capítulo 5.

## CAPÍTULO 4

## PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE EXPERIMENTAL

## 4.1 - Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho consistem em multicamadas orientadas de dipalmitil lecitina preparadas a partir de dispersões.

Trabalhamos com 6 amostras: cinco constituídas por lecitina e diferentes concentrações de pireno e uma, apenas por lecitina.

4.1.1 - Dispersões

Utilizamos as seguintes substâncias na preparação das dispersões: DL $\alpha$  - dipalmitil lecitina, sintética, fornecida pela Sigma Chemical Co., com 99,0% de pureza; pireno, da Aldrich Chemical Company, Inc., com 99+% de pureza; solução tampão de fosfato, pH 7,0 à 25°C, fornecida pela QEEL - Indústrias Químicas Ltda., e clorofórmio P.A.

O pireno foi purificado por recristalização em n-hexano e cloreto de metileno (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) antes de ser usado. A solução tampão foi diluída até 0,01 N.

Dispersão de Lecitina

Dissolvemos 10 mg de lecitina em 0,5 ml de clorofórmio e deixamos secar sob um fluxo de nitrogênio. A massa resul

tante, acrescentamos 0,5 ml de solução tampão, obtendo uma dispersão com uma concentração de 20 mg de lecitina/ml ou  $\approx 27$   $\mu$ moles/ml.

### Dispersão de Lecitina com Pireno

Dissolvemos 1 mg de pireno em 5 ml de clorofórmio. Colocamos em 5 tubos de ensaio uma massa de lecitina equivalente a 10  $\mu$ moles (= 7,34 mg) e acrescentamos pireno em solução nas quantidades necessárias para obter as seguintes relações moleculares:

<i>LECITINA:PIRENO</i> ( $\mu$ moles)		<i>Pireno</i> (mg)	<i>Volume da Solução de 1 mg Pireno/5ml CHCl<sub>3</sub></i> (ml)
100:1	10:0.1	0.02	0.10
50:1	10:0.2	0.04	0.20
20:1	10:0.5	0.10	0.50
10:1	10:1	0.20	1.01
5:1	10:2	0.40	2.02

Secamos as soluções resultantes sob um fluxo de nitrogênio e adicionamos 0,5 ml de solução tampão a cada uma.

Todas dispersões foram, então, submetidas ao ultra-som durante 0,5 min, à temperatura ambiente, 3 vezes consecutivas, com intervalos de 0,5 min. A finalidade deste procedimento é romper as vesículas multilamelares (formadas espontaneamente) para obter vesículas unilamelares. O rompimento é conseguido devido ao fenômeno de cavitação. Utilizamos um aparelho de ultra-som Branson, B12, gentilmente cedido pelo Instituto de Biologia da UNICAMP.

#### 4.1.2 - Multicamadas Orientadas

Para a obtenção das multicamadas orientadas, a dispersão é gotejada em um substrato de vidro com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Devido à geometria dos métodos empregados para obter os diagramas de difração, foi preciso preparar as amostras em 2 tipos de substratos:

(a) curvo - quadrados de 1 cm de lado, cortados de um tubo de vidro de 40 mm de diâmetro externo e 1,5 mm de espessura (Figura 4.1);

(b) plano - lâminas de vidro de 25 mm de largura e 1,10 mm de espessura (Figura 4.2).

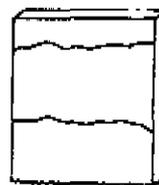
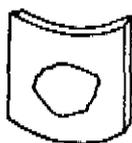


Figura 4.1 - Substrato curvo.

Figura 4.2 - Substrato plano.

Depois de gotejadas as dispersões sobre os substratos, as amostras foram colocadas para secar em recipientes com atmosfera de 75% de umidade relativa. Esta umidade é obtida através de uma solução saturada de  $\text{NaClO}_3$ . Durante a secagem, ocorre a deposição das bicamadas de fosfolipídios que vão compor a estrutura de multicamadas orientadas estudada neste trabalho.

4.2 - *Montagem Experimental*

Usamos duas montagens para a obtenção dos diagramas de difração: uma própria para varredura  $\theta$ - $2\theta$ , com um detetor de cintilação ligado a um registrador, e outra onde o diagrama de difração é registrado em um filme fotográfico.

Os dois arranjos foram feitos em uma câmara de baixo ângulo montada em um gerador de ânodo rotatório, modelo Rotaflex (da Rigaku), com alvo de cobre e foco fino pontual ( $0,2 \times 2 \text{ mm}^2$ ). A câmara, também da Rigaku, foi alinhada em um ângulo de *take off* entre  $3^\circ$  e  $6^\circ$ , o que determina uma dimensão efetiva do foco entre  $0,2 \times 0,1 \text{ mm}^2$  e  $0,2 \times 0,2 \text{ mm}^2$ .

Em cada uma das montagens, usamos porta-amostras que permitiram manter a umidade constante durante as exposições. O controle de umidade foi conseguido passando-se um fluxo de nitrogênio por um frasco lavador, contendo uma solução saturada, cuja saída estava conectada ao porta-amostra. Como as umidades relativas obtidas de soluções saturadas dependem da temperatura, é necessário que esta também seja controlada. No nosso caso, os diagramas foram obtidos à temperatura ambiente, que se manteve entre  $20^\circ\text{C}$  e  $22^\circ\text{C}$ . Os sais usados no controle de umidade foram

TABELA 4.1

<i>Sal</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Temperatura (<math>^\circ\text{C}</math>)</i>
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	51	24.5
	56	18.5
$\text{NaClO}_3$	75	20.0

Usamos um filtro de Ni na 2<sup>a</sup> fenda para atenuar a linha  $k\beta$  do cobre.

#### 4.2.1 - Montagem para Detecção Fotográfica

De acordo com o esquema da Figura 4.3, o arranjo se compõe de um suporte com fenda fixa (A), um suporte para fenda com translações nas direções x e y (B), um porta-amostra com janelas de *mylar* (C) e um porta-filme (D) com *beam stop* de chumbo. O porta-amostra e o porta-filme podem ser transladados na direção x.

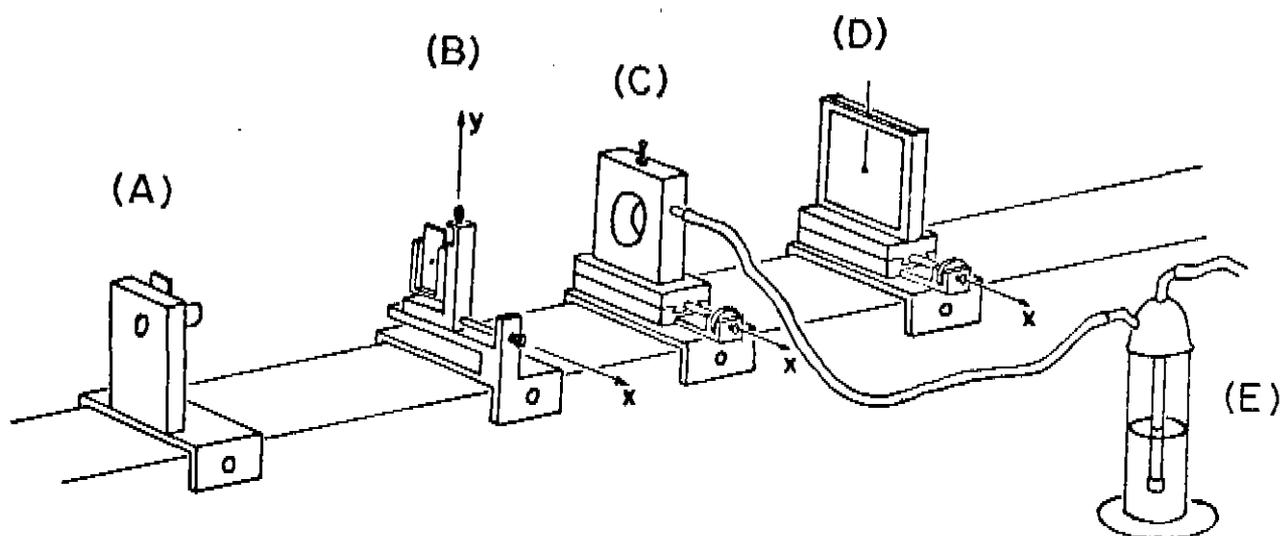


Figura 4.3 - Esquema da montagem para detecção fotográfica.

Usamos fendas circulares para a colimação do feixe incidente. Uma fenda, com 0,3 mm de diâmetro, foi colocada no supor

te (A), que fica junto à janela do tubo. A outra, com um diâmetro de 0,2 mm, foi colocada à 110 mm da primeira no suporte (B). As translações deste suporte possibilitam a centralização da segunda fenda no feixe.

O porta-amostra possui um parafuso onde é fixado o substrato (ver Figura 4.4). Com este parafuso, podemos alinhar a amostra de modo que o feixe passe tangencialmente pelo seu centro. Usando a translação do porta-amostra, concluímos o alinhamento da amostra fazendo-a penetrar no feixe até cortar sua intensidade em aproximadamente 15%. Usamos uma distância amostra-2.<sup>a</sup> fenda de 39 mm.

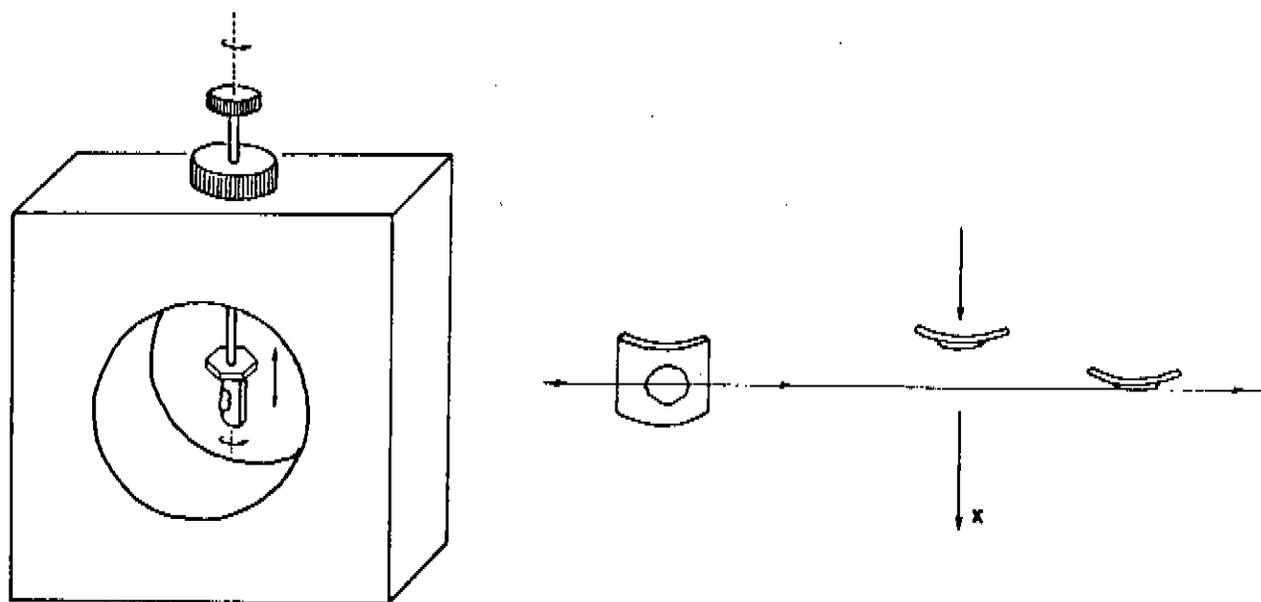


Figura 4.4 - Porta-amostra utilizado e alinhamento da amostra.

Na Figura 4.3, pode-se ver, também, o frasco lavador (E) com a saída conectada ao porta-amostra. O frasco lavador faz parte do sistema para controle de umidade. Para as exposições selecionadas, utilizamos uma solução saturada de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  que, de acordo com a Tabela 4.1, produz uma atmosfera de  $\sim 56\%$  de umidade.

O porta-filme foi posicionado para uma distância a mostra-filme de 63,1 mm. O filme usado foi o CEA REFLEX 25 e os tempos de exposição variaram entre 12 e 13 horas com o gerador em uma potência de 1,5 kW (30 kV - 50 mA).

Em resumo, as exposições selecionadas foram feitas nas seguintes condições experimentais:

- colimação do feixe incidente: fendas circulares
  - . 1.<sup>a</sup> fenda : 0,3 mm  $\phi$
  - . 2.<sup>a</sup> fenda : 0,2 mm  $\phi$
  - . distância 1.<sup>a</sup>-2.<sup>a</sup> fenda: 110 mm
  
- distância 2.<sup>a</sup> fenda-amostra: 39 mm
  
- distância amostra-filme: 63.1 mm
  
- umidade: 56%
  
- radiação: cobre
  
- tempo de exposição: ~12 horas
  
- potência: 1,5 kW (30 kV - 50 mA)

#### 4.2.2 - Montagem para Varredura $\theta$ -2 $\theta$

A varredura  $\theta$ -2 $\theta$  é conseguida através de algumas adaptações da câmara de baixo ângulo que podem ser observadas na Figura 4.5.

0,1 x 15 mm<sup>2</sup> e uma fenda de espalhamento de 0,3 x 15 mm<sup>2</sup>. O detector foi posicionado

por passos.

(30 kV-50 mA)

de contagem

contínua e

ia de 1,5kW

em um tempo

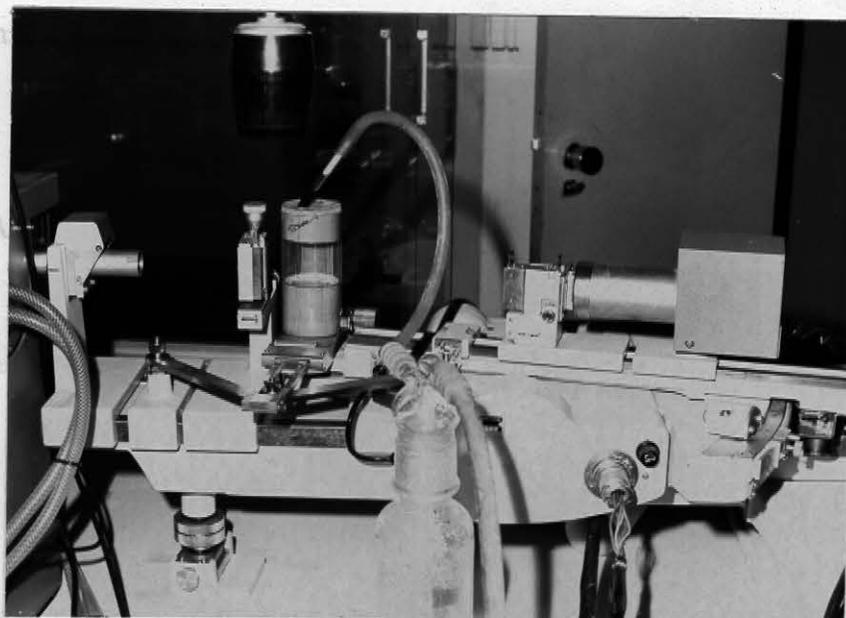


Figura 4.5 - Foto da montagem utilizada para varredura  $\theta$ - $2\theta$ .

A amostra, agora em um substrato de vidro plano, é colocada em um suporte análogo ao de um difratômetro de pó, dentro de um compartimento fechado com janela de *mylar*, necessário para o controle de umidade. Durante as varreduras, as amostras foram mantidas em uma atmosfera de 75% de umidade. Para isto, usamos uma solução saturada de  $\text{NaClO}_3$  no frasco lavador.

Usamos fendas lineares para colimação do feixe incidente. No primeiro suporte, junto à saída do tubo, foi colocada uma fenda de 0,3 x 10 mm<sup>2</sup>. A 154 mm desta, no segundo suporte, colocamos duas fendas: uma com 0,2 x 10 mm<sup>2</sup> e uma limitadora de altura de 4 mm. A amostra ficou a uma distância de 45,5 mm da 2.<sup>a</sup> fenda.

No detector, utilizamos uma fenda receptora de

0,1 x 15 mm<sup>2</sup> e uma fenda de espalhamento de 0,3 x 15 mm<sup>2</sup>. O detector foi posicionado a 200 mm da amostra.

Fizemos dois tipos de varredura  $\theta$ -2 $\theta$ : contínua e por passos. Em ambas, o gerador trabalhou com uma potência de 1,5kW (30 kV-50 mA).

Na varredura por passos, trabalhamos com um tempo de contagem de 10 segundos para cada passo de 0,01°.

CAPÍTULO 5  
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme foi visto no Capítulo 3, nos diagramas de um arranjo lamelar, as reflexões aparecem igualmente espaçadas em posições definidas por múltiplos inteiros do inverso do espaçamento interplanar.

Em bicamadas de dipalmitil lecitina, dependendo do conteúdo de água e da temperatura, as cadeias hidrocarbônicas se orientam perpendicularmente às bicamadas, mantendo uma distância aproximadamente constante entre si. Assim, elas formam uma estrutura bastante regular que tem condições de difratar, dando origem a uma reflexão difusa mas marcadamente orientada na direção perpendicular às reflexões lamelares.

Na Figura 5.1, temos um esquema de um diagrama de difração de bicamadas de dipalmitil lecitina para um feixe incidente com geometria pontual, que pode ser obtido com a montagem experimental descrita na Figura 4.3.

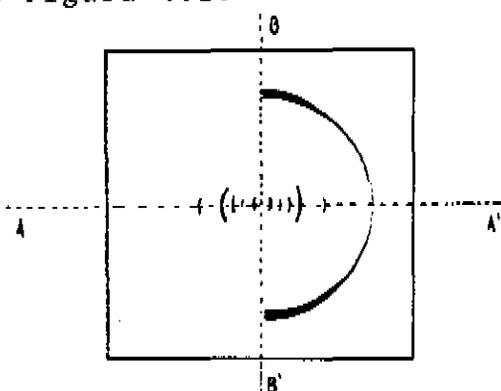


Figura 5.1 - Diagrama de difração de bicamadas de dipalmitil lecitina para feixe incidente pontual.

O anel mais externo corresponde à difração das cadeias hidrocarbônicas (espaçamento entre  $4.2$  e  $4.6\text{\AA}$  ( $2\theta$ )). Se as cadeias estiverem

bem ordenadas, a intensidade do anel deverá ser mais fraca na região das reflexões lamelares ( $\overline{AA'}$ ), aumentando à medida que se aproxima da região perpendicular a elas ( $\overline{BB'}$ ). Caso contrário, quanto mais desordenadas estiverem as cadeias, mais difuso e menos orientado espacialmente ficará o anel. Logo, a difração das cadeias hidrocarbônicas fornece informação sobre a conformação e o espaçamento entre cadeias.

No caso de bicamadas de lecitina com incorporação de pireno, sistema estudado neste trabalho, devemos considerar, ainda, o fato de que, quando as concentrações de pireno nas amostras são altas, existe a possibilidade de formação de aglomerados de cristalitos nas membranas. Nesse caso, será observada a presença das reflexões referentes a estes cristalitos nos diagramas de difração. A observação do anel referente às cadeias hidrocarbônicas pode informar também o quanto e como sua organização é afetada pelo aumento da concentração de pireno na bicamada.

Todas estas informações são obtidas pelo método fotográfico.

A varredura 0-2 $\theta$  nos fornecerá informação mais precisa sobre a intensidade das reflexões. Esta informação, porém, estará limitada a uma dimensão, o eixo AA' (ver Figura 5.1) que corta o centro das reflexões lamelares.

### 5.1 - Resultados Obtidos pelo Método Fotográfico

Foram feitas várias séries de experiências com o grupo de amostras descrito no Capítulo 4 para determinar condições ótimas de umidade, absorção do feixe incidente pela amostra, tipo

de substrato e tipo de *mylar* a ser usado na janela do porta-amostra.

A série de exposições selecionadas para análise foi feita sob as mesmas condições experimentais quanto a substrato utilizado, fendas e distância entre elas, distâncias fenda-amostra e amostra-filme, umidade relativa e potência do gerador, conforme citado no Capítulo 4.

O tempo de exposição variou entre 12 e 13 horas.

Os filmes (Cea Reflex 25) foram todos revelados à mesma temperatura ( $20^{\circ}\text{C}$ ), durante 6 minutos, com o revelador apropriado para filmes de alto contraste (Kodak D19).

Na Figura 5.2, podemos acompanhar a evolução das reflexões nos diagramas com o aumento da concentração de pireno nas bicamadas. Os filmes a, b, c, d, e, f correspondem às amostras de dipalmitil lecitina pura e dipalmitil lecitina com pireno nas concentrações molares 100:1, 50:1, 20:1, 10:1 e 5:1 (lecitina:pireno), respectivamente.

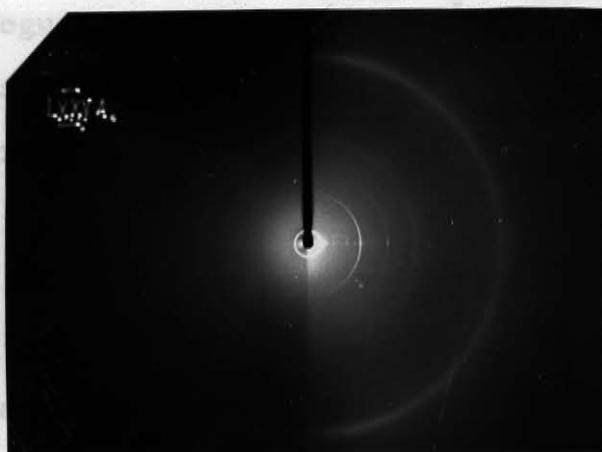
Em todos os filmes, obtivemos seis ordens de difração lamelar, sendo que a 1.<sup>a</sup> e a 4.<sup>a</sup> são mais intensas e a 5.<sup>a</sup> não aparece, como é esperado para estruturas do tipo da lecitina sintética<sup>(20)</sup>.

Nos diagramas, podemos ver, também, o anel referente à reflexão das cadeias hidrocarbônicas. No filme (a), para amostra de lecitina pura, ele aparece orientado, com uma região de maior intensidade em torno de  $76^{\circ}$  em relação à reta que corta o centro das reflexões lamelares. Para a concentração molar 100:1 (lecitina-pireno), filme (b), este anel se torna mais difuso, mas ainda conserva uma certa orientação. À medida que se aumenta a concentração de pireno, para 50:1 (filme (c)) e 20:1 (filme (d)), o anel vai se tornando mais difuso e menos orientado até que, para a relação mole



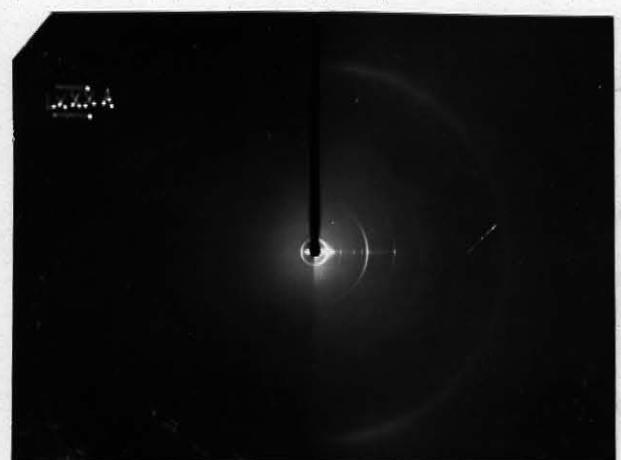
(a) dipalmitil lecitina pura

(d) 20:1



(b) 100:1

(e) 10:1



(c) 50:1

(f) 5:1

Figura 5.2 - Diagramas de difração obtidos pelo método fotográfico.

cular de 10:1 de lecitina:pireno (filme (e)), ele aparece completamente sem orientação. Destes resultados, conclui-se que a desordem das cadeias hidrocarbônicas aumenta com a concentração de pireno.

Entretanto, quando continuamos a aumentar a concentração de pireno para 5:1 (filme (f)), observamos duas coisas: 1) o anel volta a se orientar indicando um maior ordenamento das cadeias; 2) aparecem linhas de difração pontilhadas logo depois da reflexão lamelar correspondente a 6.<sup>a</sup> ordem.

O cálculo dos espaçamentos correspondentes às reflexões pontilhadas forneceu os seguintes valores: 8,39 Å e 7,66 Å. Dentro da precisão da medida, tais resultados podem corresponder aos espaçamentos 8,3 Å e 7,5 Å encontrados na Tabela ASTM<sup>(25)</sup> para reflexões do pireno cristalino.

Não foi possível calcular o espaçamento interplana das bicamadas a partir destes filmes devido à saturação das ordens 1 e 4. Foi possível, entretanto, estimar o espaçamento correspondente ao anel das cadeias hidrocarbônicas em torno de 4,2 Å.

## 5.2 - Resultados Obtidos com Varredura $\theta$ -2 $\theta$

Como foi dito no Capítulo 4, fizemos dois tipos de varredura  $\theta$ -2 $\theta$ : contínua e por passos. Em ambos, foram mantidas as mesmas condições experimentais para todas as amostras.

Os resultados apresentados aqui para as amostras de lecitina pura e lecitina com pireno na concentração molar 10:1 (lecitina: pireno) foram obtidos por varredura  $\theta$ -2 $\theta$  contínua. Para as amostras restantes, os resultados foram obtidos por varredura  $\theta$ -2 $\theta$  por passos.

Em todos os diagramas, tanto para a amostra de le citina pura quanto para as de lecitina com pireno, conseguimos até a 8ª ordem de difração. Na Tabela 5.1, são mostrados os valores, já normalizados, das intensidades correspondentes às oito ordens obtidas.

TABELA 5.1 - INTENSIDADES NORMALIZADAS (EM UNIDADES ARBITRÁRIAS)

<i>n</i>	<i>Lecitina Pura</i>	100:1	50:1	20:1	10:1	5:1
1	944.0	978.8	991.0	989.2	983.3	985.9
2	5.1	7.8	3.4	4.8	4.4	4.4
3	3.6	2.3	0.6	1.1	1.4	1.4
4	42.3	10.4	4.7	4.6	8,3	7.3
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	3.5	0.5	0.3	0.3	1.8	0.6
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	1.6	0.2	0.1	0.1	0.8	0.5

\* A normalização é feita considerando  $I_N = \frac{I(\text{OBS})}{\sum I(\text{OBS})} \times 1000$ .

Os valores calculados para os espaçamentos interplanares estão na Tabela 5.2.

TABELA 5.2 - ESPAÇAMENTOS INTERPLANARES CALCULADOS

AMOSTRA	$d(\text{Å})$
<i>Lecitina Pura</i>	57.8 ± 0.1
100:1	58.2 ± 0.2
50:1	58.2 ± 0.2
20:1	58.3 ± 0.2
10:1	58.3 ± 0.1
5:1	58.0 ± 0.2

Nos difratogramas das amostras de lecitina com pireneno nas concentrações molares 10:1 e 5:1, obtivemos a difração correspondente ao pireneno cristalino. Os espaçamentos calculados podem ser vistos nas Tabelas 5.3 e 5.4.

TABELA 5.3 - REFLEXÕES DO PIRENO OBTIDAS POR VARREDURA  $\theta$ - $2\theta$  CONTÍNUA PARA A AMOSTRA DE 10:1

$2\theta$ ( $^{\circ}$ )	$d$ ( $\text{Å}$ )	$d_{ASTM}$ ( $\text{Å}$ )
10.57	$8.37 \pm 0.02$	8.3 (95%)
11.57	$7.65 \pm 0.02$	7.5 (75%)

TABELA 5.4 - REFLEXÕES DO PIRENO OBTIDAS POR VARREDURA  $\theta$ - $2\theta$  POR PASSOS PARA A AMOSTRA DE 5:1

$2\theta$ ( $^{\circ}$ )	$d$ ( $\text{Å}$ )	$d_{ASTM}$ ( $\text{Å}$ )
9.54	$9.27 \pm 0.01$	9.2
10.58	$8.36 \pm 0.01$	8.3
11.57	$7.65 \pm 0.01$	7.5

Nos difratogramas das amostras restantes, não apareceram reflexões correspondentes ao pireneno.

5.2.1 - Varreduras  $\theta$ -2 $\theta$  para a Determinação das Fases para Bicamadas de Lecitina com Pireno pelo Método proposto por Torbet e Wilkins

Usamos o método de inchamento em uma amostra de lecitina com pireno cuja concentração molar era 10:1 (lecitina:pireno). Primeiro, foram obtidos os diagramas de difração por varredura  $\theta$ -2 $\theta$  contínua para as umidades relativas de 56%, 75% e 90%. Nestes diagramas, obtivemos seis ordens de difração para cada umidade.

Como iam ser comparados conjuntos de dados diferentes, foi feita a normalização entre os valores de intensidade para as umidades de 56% e 75% em relação aos de 90% de acordo com a expressão proposta por WORTHINGTON e BLAUROCK<sup>(24)</sup>:

$$K \frac{1}{d_{90\%}} \sum_n I_{90\%} \left( \frac{n}{d_{90\%}} \right) = \frac{1}{d_m} \sum_n I_m \left( \frac{n}{d_m} \right)$$

onde:  $d$  - espaçamento da bicamada na atmosfera de 90% de umidade relativa;

$d_m$  - espaçamento da bicamada em outra umidade (56% ou 75%);

$I_{90\%} \left( \frac{n}{d_{90\%}} \right)$  - valores de intensidade das  $n$  ordens obtidas em 90% de umidade relativa;

$I_m \left( \frac{n}{d_m} \right)$  - valores de intensidade das  $n$  ordens para outra atmosfera (56% ou 75%);

$K$  - constante de normalização.

Os valores de intensidade já normalizados podem ser vistos na Tabela 5.5. Os espaçamentos das bicamadas nas diferentes unidades estão na Tabela 5.6.

TABELA 5.5 - INTENSIDADES NORMALIZADAS (UNIDADES ARBITRÁRIAS)

$n$	90%	75%	56%
1	983.4	974.4	970.2
2	6.5	4.4	2.3
3	2.5	1.4	0.8
4	6.8	8.3	6.5
5	0.0	0.0	0.0
6	0.8	1.8	0.7

TABELA 5.6 - ESPAÇAMENTOS DAS BICAMADAS NAS 3 UNIDADES RELATIVAS

	90%		75%		56%	
$d$ (Å)	58.9	0.1	58.3	0.1	58.0	0.1

A partir dos valores de intensidade normalizados, calculamos a  $F(x^*)$  contínua para cada unidade usando a expressão (12) e o programa descrito no Capítulo 3. O cálculo foi feito para as duas combinações de fase: -1, 1, -1, -1, 0, -1 e -1, -1, 1, -1, 0, -1.

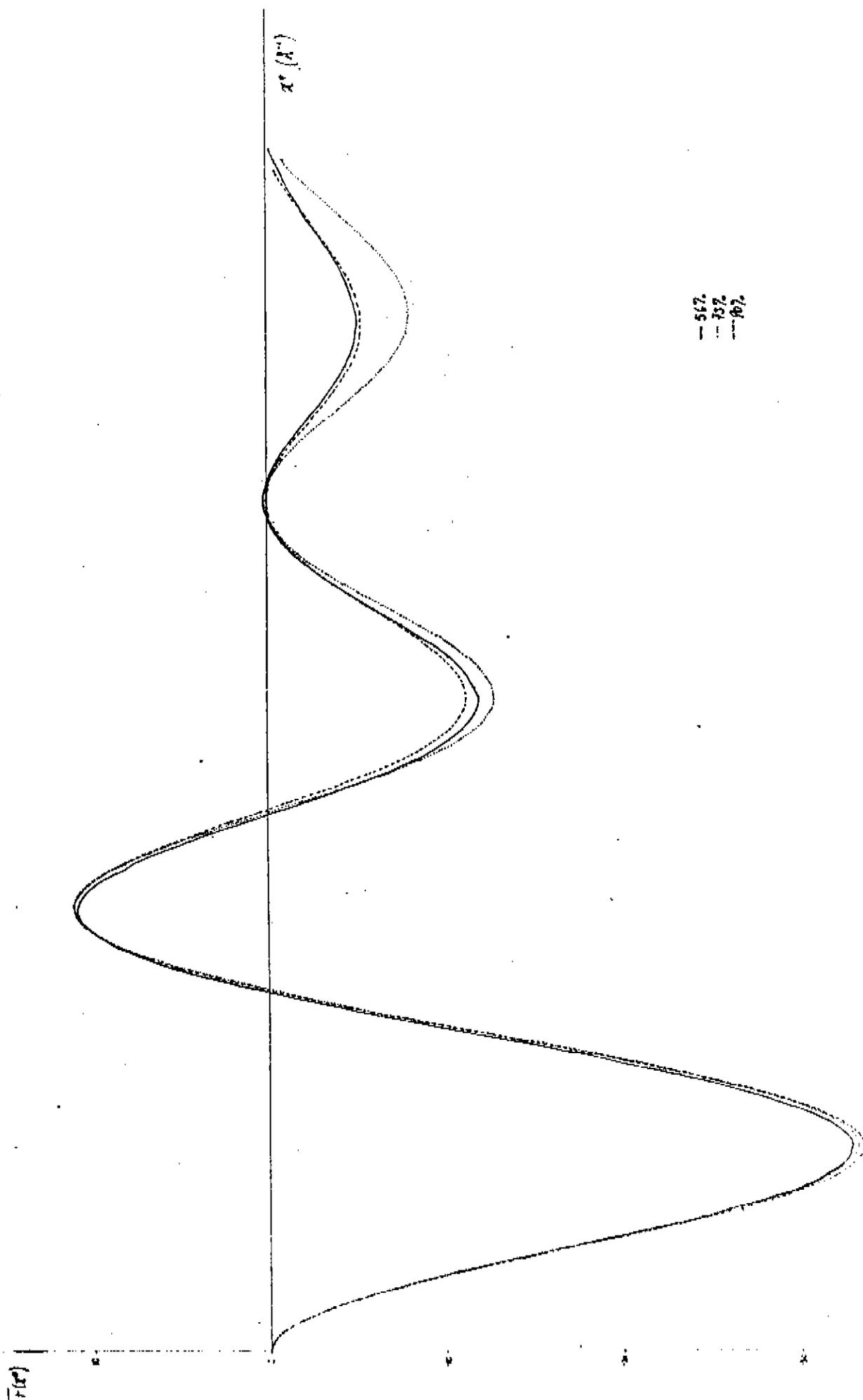


Figura 5.3 - Curvas  $F(x^*)$  calculadas para a amostra de dipalmitil lecitina com pireno (10:1) para as umidades de 56% , 75% e 90% usando a combinação de fases: -1, -1,1, -1,0, -1,

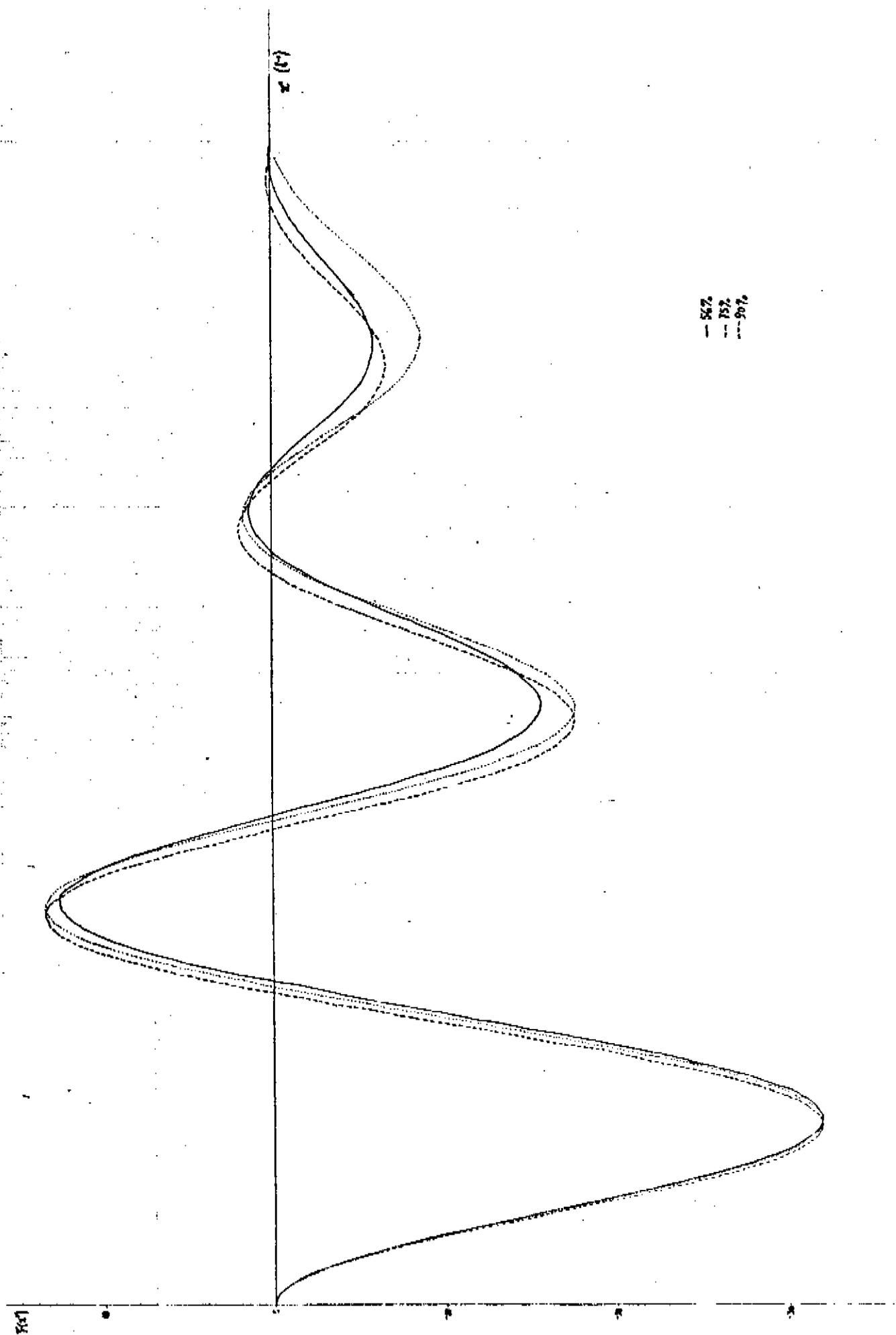


Figura 5.4 - Curvas  $F(x^*)$  calculadas para a amostra de dipalmitil lecitina com pireno (10:1) para as umidades de 50% , 75% e 90% usando a combinação de fases: -1,1,-1,-1,0,-1.

Entre as duas combinações de fase para as bicamadas de dipalmitil lecitina com pireno, a que forneceu uma família de curvas  $F(x^*)$  com evolução mais simples para as umidades de 50%, 75% e 90% (ver Figuras 5.3 e 5.4) foi -1, 1, -1, -1, 0, -1, confirmando a escolha feita anteriormente (ver penúltimo parágrafo do Capítulo 3).

### 5.3 - Análise dos Resultados Experimentais e Cálculo dos Perfis de Densidade Eletrônica

A intensidade registrada tanto nos filmes como nas varreduras  $\theta-2\theta$  é afetada por fatores tais como: fator de polarização, fator de absorção, fator de temperatura, fator de Lorentz e geometria da amostra. Estes fatores foram discutidos com detalhe na ref. (14) para bicamadas de dipalmitil lecitina, onde chegou-se à conclusão que os devidos à polarização, temperatura e absorção podem ser aproximados para a unidade com um erro de  $10^{-2}$  para a 8.<sup>a</sup> ordem.

Portanto, em nosso caso, antes do cálculo dos perfis de densidade eletrônica, as intensidades medidas nos diagramas de difração foram corrigidas em um fator  $n^2$  ( $n$  é o número da ordem). Um fator  $n$  é devido à desordem intrínseca da amostra<sup>(14)</sup> e o outro, ao fator de Lorentz (a correção de Lorentz -  $\text{sen } 2\theta$  - é proporcional a  $n$  para ângulos pequenos<sup>(19)</sup>).

Esta correção é feita no próprio programa utilizado para o cálculo dos perfis de densidade eletrônica, de acordo com o esquema apresentado no Capítulo 3.

Os perfis de densidade eletrônica calculados para

bicamadas de dipalmitil lecitina e dipalmitil lecitina com pireno nas concentrações molares 100:1, 50:1, 20:1, 10:1 e 5:1 (lecitina : pireno) podem ser vistos nas Figuras 5.5a, b, c, d, e, f, respectivamente.

Nos mapas de densidade eletrônica, analisaremos as diferentes regiões que dão idéia das perturbações ocorridas nas bicamadas. São elas: (1) região central, correspondente aos grupos metil terminais; (2) região dos picos referentes às cabeças polares e (3) região intermediária.

Comparando os perfis (Figura 5.6), podemos observar:

(1) na região central:

- a) a densidade eletrônica para a amostra de lecitina pura é menor que a densidade eletrônica para as amostras de lecitina com pireno;
- b) a densidade eletrônica aumenta com a concentração de pireno para as amostras de lecitina com pireno nas concentrações molares de 100:1 e 50:1;
- c) para a amostra de lecitina:pireno = 10:1, a densidade eletrônica nesta região diminui e fica entre a de lecitina pura e lecitina com pireno na concentração 100:1.
- d) aumentando a concentração para 5:1 (lecitina:pireno), há um aumento na densidade eletrônica em relação à de 10:1; no entanto, ela ainda é menor que a densidade correspondente à amostra de lecitina:pireno 100:1;
- e) há um alargamento do *poço* central do perfil de densidade eletrônica com a introdução do pireno nas bicamadas. À medida que aumenta a concentração de pireno, o *poço* vai se alargar

do. Aqui, novamente, os resultados para as amostras de lecitina:pireno 10:1 e 5:1 ficam entre o de lecitina pura e o de lecitina:pireno = 100:1.

(2) na região dos grupos polares:

- a) a distância entre os picos referentes aos grupos polares é maior para as bicamadas de dipalmitil lecitina com pireno;
- b) há um alargamento do pico referente aos grupos polares para as amostras de lecitina com pireno em relação à amostra de lecitina pura.

(3) na região intermediária da bicamada, entre os grupos polares e os grupos metil terminais, os perfis de densidade eletrônica também apresentam variações com o aumento de concentração de pireno. As curvas para as amostras de lecitina com pireno nas concentrações 10:1 e 5:1 apresentam formas intermediárias entre as formas das curvas de lecitina pura e lecitina:pireno = 100:1. Nesta região, a densidade eletrônica diminui com o aumento de concentração de pireno na bicamada.

De acordo com as variações apresentadas pelos perfis, podemos concluir que o pireno se localiza na região das cadeias hidrocarbônicas, desordenando-as e causando o afastamento dos grupos polares. A desordem das cadeias é confirmada pelos filmes. A desorientação do anel de difração correspondente às cadeias aumenta com a concentração de pireno.

Para as amostras de lecitina com as maiores concentrações de pireno (10:1 e 5:1), temos o aparecimento de reflexões devidas ao pireno cristalino nos difratogramas. Além disso, os per

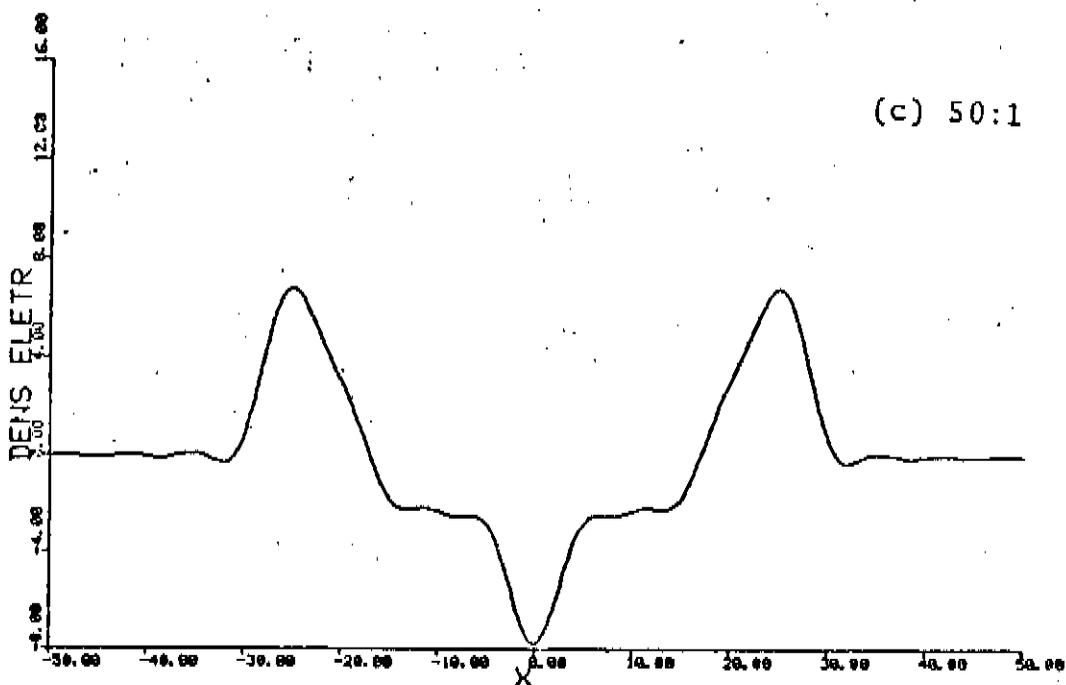
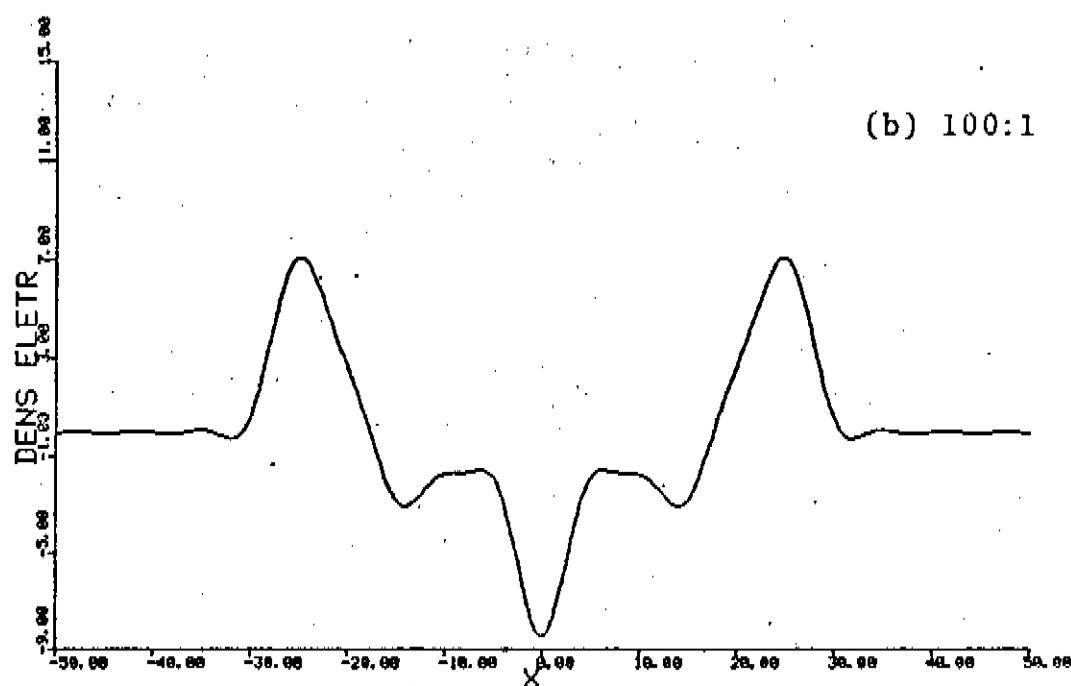
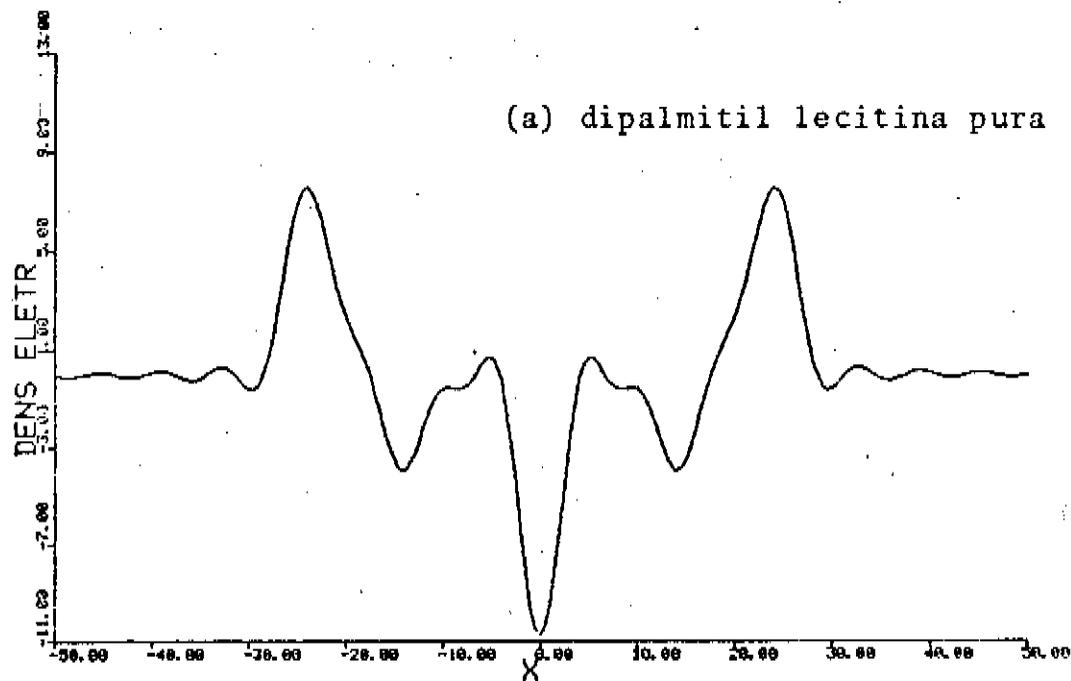
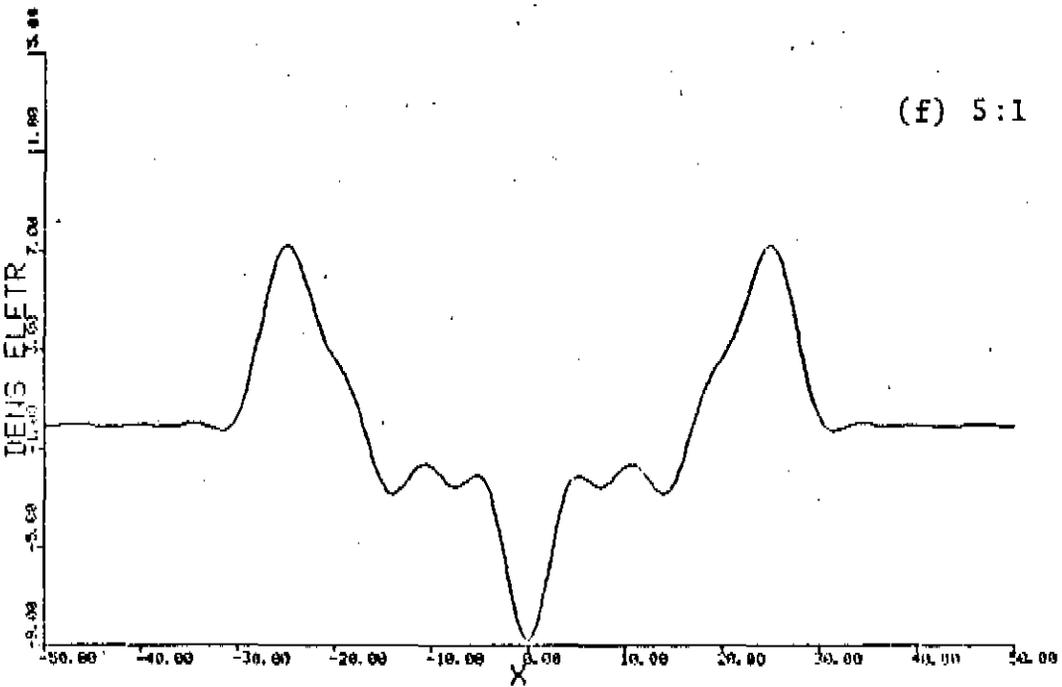
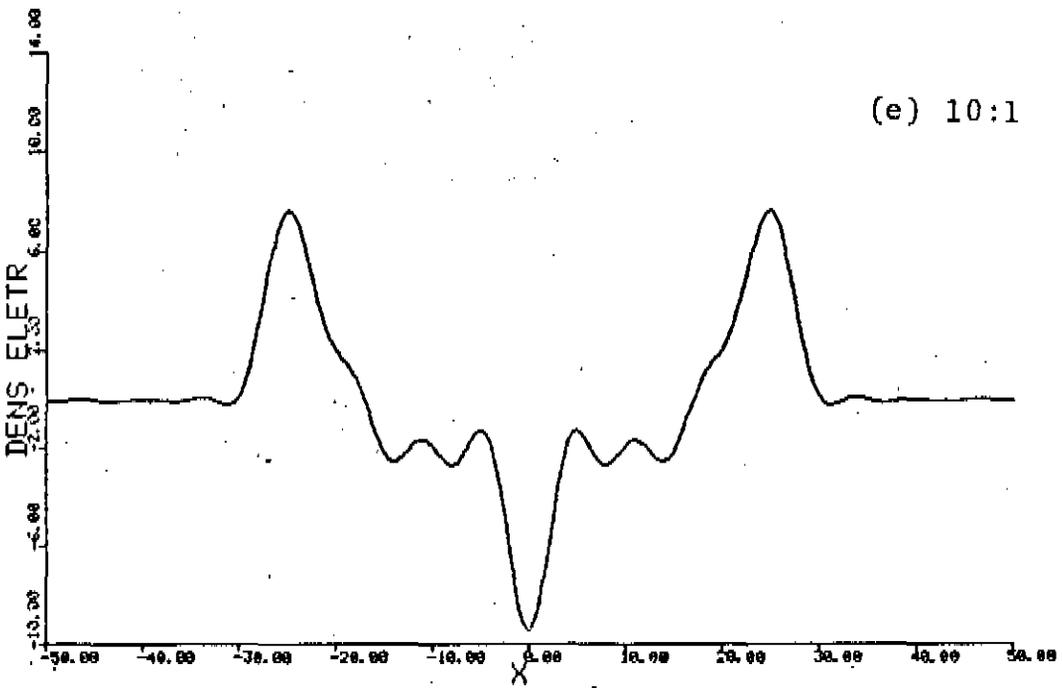
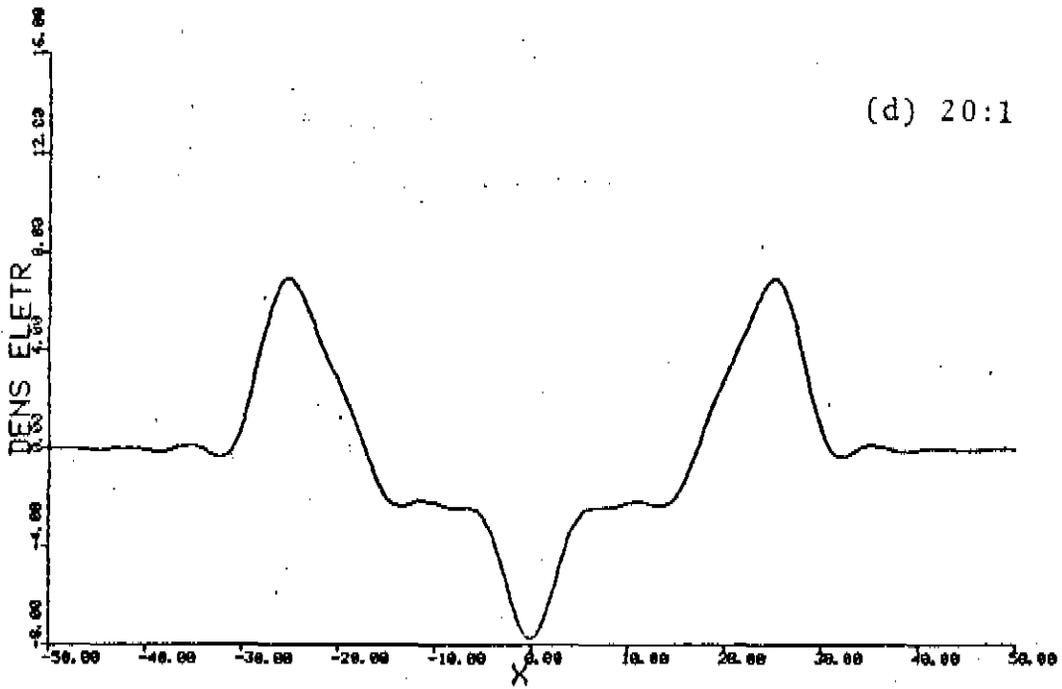


Figura 5.5 - Perfis de densidade eletrônica na direção perpendicular ao plano da bicamada.



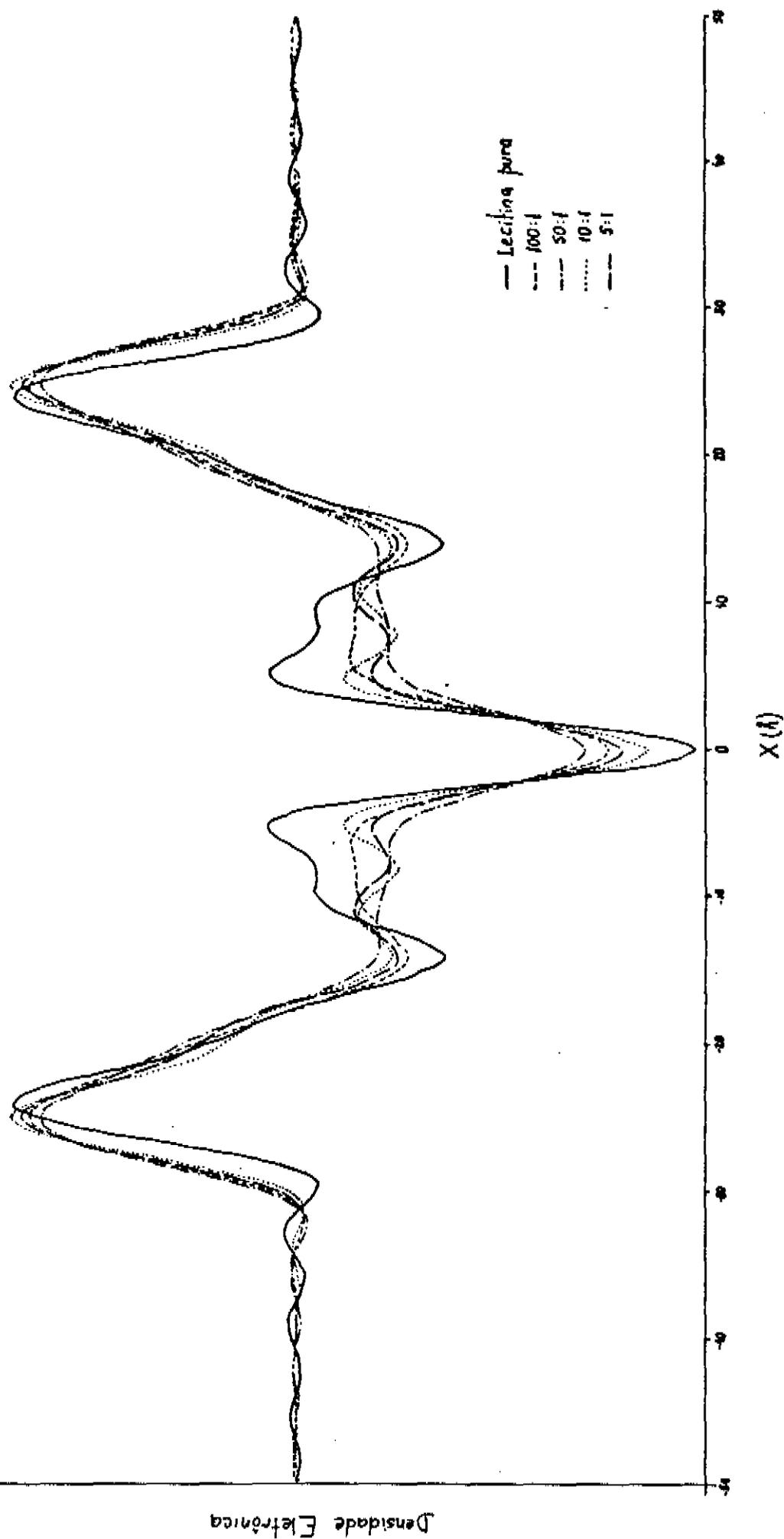


Figura 5.6 - Superposição dos perfis de densidade eletrônica

fis de densidade eletrônica se apresentam como se correspondessem a amostras com concentrações menores que 100:1.

De acordo com estes resultados, podemos supor que, em altas concentrações, o pireno se agrega formando cristalitos em condições de difratar e é parcialmente expulso da bicamada, se localizando na região ocupada pela água. Dessa forma, a concentração do composto aromático dentro da bicamada deve ser menor que a da amostra de lecitina:pireno = 100:1. Sabemos que nem todo pireno é expulso da região hidrofóbica porque, neste caso, deveríamos obter um perfil de densidade eletrônica igual ao da bicamada de lecitina pura.

Nos filmes, as reflexões de pireno cristalino aparecem somente para a amostra com maior concentração do composto (5:1), enquanto que, nos difratogramas, elas já podem ser observadas para a concentração de 10:1. As amostras usadas para a obtenção dos diagramas por detecção fotográfica e por varredura  $\theta$ -2 $\theta$  foram preparadas a partir das mesmas dispersões. Entretanto, como os difratogramas foram obtidos depois dos filmes, houve um intervalo de tempo em que as dispersões ficaram guardadas sob refrigeração a uma temperatura bem mais baixa. Durante este período, é possível que tenha ocorrido um maior ordenamento das cadeias nas bicamadas e, conseqüentemente, a expulsão parcial do pireno e a formação dos aglomerados. Pode-se pensar, assim, na concentração lecitina:pireno 10:1 como uma concentração instável, mais sensível a uma variação de temperatura deste tipo.

Junto com as reflexões do pireno, observamos no mesmo filme um maior ordenamento das cadeias hidrocarbônicas, semelhante ao observado para a amostra de lecitina pura. Tal resultado concorda com a hipótese de que ocorre uma expulsão parcial do pireno

acordo com estes pesquisadores, a inserção de uma molécula de pireno na região hidrocarbônica de membranas de dipalmitil lecitina in troduz desordem. Além disso, eles supõem que, para altas concentrações de pireno, possa haver um limite de acumulação para o composto na parte fluida da bicamada, forçando-o a ocupar sítios mais próximos dos grupos-cabeça polares dos fosfolipídios. Outra hipótese levantada é que, em altas concentrações, as moléculas de pireno induzem um ordenamento local das cadeias, levando a um *enrijecimento* da bicamada. O resultado que obtivemos para as amostras de lecitina com pireno na concentração 5:1 - maior ordenamento das cadeias - está de acordo com esta hipótese.

O aparecimento das reflexões cristalinas do pireno em nossas amostras de concentrações 10:1 e 5:1 indicam a formação de aglomerados. GALLA e SACKMANN<sup>(6)</sup>, ver Capítulo 2, supõem a formação de pequenos aglomerados de pireno para explicar o fato de a formação de excímeros não ser um processo controlado por difusão no estado cristalino da matriz lipídica. De acordo com os resultados que eles obtiveram, o limite mínimo na razão molar lipídio:pireno para a formação de aglomerados é de 100:1 em dispersões lipídicas submetidas ao ultra-som.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados descritos no capítulo anterior, podemos concluir que o pireno se incorpora na região hidrofóbica das bicamadas, preferencialmente na parte central, mas se intercalando, também, entre as cadeias hidrocarbônicas. Devido a isto, as distâncias interplanares das bicamadas de lecitina com pireno são maiores que a da bicamada de lecitina pura. Os espaçamentos interplanares para as amostras com diferentes concentrações de pireno não sofrem grandes variações pois, com o aumento da concentração, ele vai se intercalando entre as cadeias.

Além disso, a partir de uma determinada concentração, temos a formação de cristalitos suficientemente grandes para difratar. Uma cela unitária de pireno cristalino tem um volume de  $13,7 \times 9,3 \times 8,5 \text{ \AA}^3$ . Portanto, tais cristalitos não podem se localizar na região hidrofóbica da bicamada e, conseqüentemente, devem estar na região ocupada pela água, o que podemos confirmar na análise dos filmes e perfis de densidade calculados. Nos filmes, observamos um ordenamento das cadeias hidrocarbônicas junto com o aparecimento das reflexões de pireno na maior concentração (lecitina:pireno=5:1), enquanto que, na concentração de 10:1, as cadeias estavam completamente desordenadas e não havia reflexões devidas a cristalitos. A análise dos perfis de densidade eletrônica nos leva à mesma conclusão. As curvas para as amostras com concentrações 10:1 e 5:1 (lecitina:pireno) são intermediárias entre as curvas para lecitina pura e lecitina com pireno na concentração de 100:1. Ou seja, a concentração de pireno na região hidrofóbica para estas amostras é menor do

que a da amostra de lecitina:pireno=100:1. Foi nestas concentrações que obtivemos as reflexões devidas aos cristalitos. Portanto, pode mos concluir que o pireno que falta na região hidrofóbica se encontra na região da camada de água na forma de cristalitos.

Finalmente, os resultados obtidos podem ser resumidos como segue:

(1) A desordem das cadeias hidrocarbônicas nas bicamadas de dipalmitil lecitina aumenta com o aumento da concentração de pireno;

(2) Verifica-se a tendência das distâncias interplanares aumentarem com o aumento da concentração de pireno;

(3) Para altas concentrações de lecitina:pireno (10:1 e 5:1), verifica-se a formação de cristalitos de pireno nas amostras;

(4) Nos perfis de densidade eletrônica, constata-se um afastamento dos picos referentes aos grupos polares com a introdução de pireno na bicamada;

(5) Com o aumento da concentração de pireno na bicamada, aumenta a densidade eletrônica na parte central do perfil correspondente aos grupos metil terminais;

(6) Para as amostras com concentrações lecitina:pi reno de 10:1 e 5:1, os perfis de densidade eletrônica indicam que o pireno é parcialmente expulso da bicamada, formando cristalitos que se localizam na região aquosa.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) LENINGHER, A.L. Biochemistry - The molecular basis of cell structure and function 2<sup>a</sup> ed. New York, Worth Publishers Inc./1975
- (2) SACKMANN, E. Ber Busenges. Phys. Chem., 82 : 891, 1978
- (3) NAGLE, J.F. The J. Chem. Phys., 58 : 252, 1973
- (4) CHAPMAN, D. Quart. Rev. of Bioph., 2 : 185, 1975
- (5) TARDIEU, A., LUZZATI, V. e REMAN, F.C. J. Mol. Biol. 75 : 711, 1973
- (6) GALLA, H.J. e SACKMANN, E. Biochem. Bioph. Acta, 339 : 103, 1974
- (7) WYCKOFF, R.W.G. Crystal Structure New York, Interscience/ 1969/ vol. 6 part II
- (8) BIRKS, J.B. Photophysics of Aromatic Molecules London, Wiley Interscience/ 1970/ cap.7
- (9) VANDERKOOI, J.M. et al The J. Chem. Phys., 63 : 3661, 1975
- (10) VANDERKOOI, J.M. e CALLIS, J.B. Biochem., 13 : 4000, 1974
- (11) GLUSHKO, V.; THALER, M.S.R. e KARP, C.D. Arch. Biochem. Bioph., 210 : 33, 1981
- (12) BADLEY, R.A.; MARTIN, W.G. e SCHNEIDER, H. Biochem., 12 : 268, 1973
- (13) SANIOTO, D.L. e SCHREIER, S. Biochem. Biophys. Res. Comm., 67 : 530, 1975
- (14) SANTOS, R.M.Z. Cálculo da distribuição de densidade eletrônica de membranas modelo com hidrocarbonetos aromáticos cancerígenos incorporados, Tese de Mestrado, Campinas, UNI CAMP, 1981

- (15) GUINIER, A. Theorie et technique de la radiocristallographie  
3 ed. Paris, Dunod/ 1964
- (16) CATICHA-ELLIS, S. Apostila de Cristalografia Campinas,  
UNICAMP /1982 / Publicação interna
- (17) SAYRE, D. Acta Cryst., 5 : 843, 1952
- (18) LESSLAUER, W.; CAIN, J.E. e BLASIE, J.K. Proc. Nat. Acad.  
Sci. USA, 69 : 1499, 1972
- (19) ZACCAI, G.; BLASIE, J.K. e SCHOENBORN, B.P. Proc. Nat. Acad.  
Sci. USA, 72 : 376, 1975
- (20) LEVINE, Y.K. Progress in Bioph. Molec. Biol., 24 : 1. 1972
- (21) TORBET, J. e WILKINS, M.H.F. J. Theor. Biol., 62 : 447, 1976
- (22) WORTHINGTON, C.R. e KHARE, R.S. Bioph. J., 23 : 407, 1978
- (23) PERUTZ, M.F. Proc. Roy. Soc. Lond. A., 225 : 264, 1954
- (24) WORTHINGTON, C.R. e BLAUROCK, A.E. Bioph. J., 9 : 970, 1969
- (25) Powder Diffraction File Search Manual - Organic ed. Joint  
Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), USA /1973/