

**ESTUDO ESTRUTURAL DE
MEMBRANAS MODELO
UTILIZANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON**

Leide Passos Cavalcanti

LEIDE PASSOS CAVALCANTI

**ESTUDO ESTRUTURAL DE
MEMBRANAS MODELO
UTILIZANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON**

Tese apresentada ao
Instituto de Física ‘Gleb Wataghin’,
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Física da Matéria Condensada: Caracterização de Materiais Biológicos

Orientadora: Iris L. Torriani
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

2001

*aos meus pais,
com carinho*

Agradecimentos

Um amigo se torna especial quando transforma nossa vida de maneira singular e benevolente. Que fortuna a minha ter encontrado tantos anjos assim que me ajudaram, cada um com sua especialidade, a escrever as páginas que seguem como se fossem co-autores da minha história! A participação deles em cada um dos meus dias ficou gravada eternamente na alma. Do fundo do coração, quero agradecer...

a Deus, sobretudo, porque ele é o meu melhor amigo;

à professora Iris, pela sugestão do tema, pela orientação, pela amizade e apoio que muito contribuíram para o meu crescimento e pela convivência harmoniosa de todos esses anos. Muito, muito obrigada!

ao professor Giles e aos meus *colegas* de trabalho que são, na verdade, meus queridos amigos: Armando, Cristiano, Cris e, em especial, ao Fabiano;

ao time Guinther e Tomás, especial agradecimento pelo equilibrado e produtivo entrosamento do qual tive o privilégio de participar por ocasião do meu estágio no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron;

aos técnicos do Laboratório de Cristalografia Aplicada e Raios X, aos funcionários da biblioteca, das secretarias, do centro de computação e a todos os outros funcionários deste instituto, desta universidade e também do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron que realizando seu trabalho contribuíram para que eu pudesse concluir o meu;

ao CNPq e ao IFGW pelo apoio financeiro.

Continuando...

com muito amor, à minha família que não se cansou de torcer por mim!
à minha dulce primicia Denise pelo carinho de sempre;
à Ceci que sempre esteve por perto em pensamento;
aos meus amigos do outro mundo Eloísa, Joana, Andréa ji, Anselmo e todos os
outros mahavirs pelo apoio incomum neste período tão especial dos acontecimentos;
aos anjinhos que atendem pelos nomes de Dani, Ed, Juli, Alberto e todos, meu
especial carinho pela convivência agradável enquanto crescíamos juntos;
a todos os meus amigos, que conheci nesta Universidade durante todos esses anos,
mas, em especial, à Ana Márcia e ao Álvaro Martini, que me animaram de maneira singular
nos últimos tempos.

E, por fim, como adendo à versão final,

agradeço aos membros da banca examinadora pela valiosa contribuição em forma
de comentários construtivos, sugestões e correções.

Muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	VII
LISTA DE ABREVIACÕES	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	XVI
 CONTEÚDO DO CAPÍTULO I :“ASPECTOS BIOLÓGICOS”	 2
MEMBRANAS BIOLÓGICAS: INTRODUÇÃO	4
LIPÍDEOS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES	4
Ácidos Graxos.....	4
Gorduras Neutras	6
Lipídeos Polares	7
<i>Classificação dos fosfolipídeos</i>	<i>8</i>
MODELO DE MEMBRANA E MEMBRANA MODELO	9
Modelo de Membrana Celular: Mosaico Fluido	10
Membrana Modelo.....	10
Forças de interação na formação da membrana.....	11
<i>Interação hidrofóbica: mais detalhes</i>	<i>11</i>
Formação de estruturas.....	13
POLIMORFISMO DOS SISTEMAS LIPÍDEO/ÁGUA	14
Transições de fase	15
<i>Isomeria Conformacional</i>	<i>15</i>
<i>Conformação das cadeias acíclicas.....</i>	<i>16</i>
<i>(1). Tamanho das cadeias hidrocarbonadas.....</i>	<i>17</i>
<i>(2). Grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas.....</i>	<i>17</i>
<i>(3). Natureza do grupo polar</i>	<i>17</i>
<i>(4). Hidratação da bicamada</i>	<i>18</i>
<i>(5). Composição</i>	<i>18</i>

(6). <i>Presença de Colesterol na Membrana</i>	18
Mesofases dos Sistemas Lipídeo/Água	18
<i>Conformação α</i> :	20
<i>Conformação β e β'</i> :	20
<i>Conformação c</i> :	21
POLIMORFISMO DE ALGUNS SISTEMAS DE DIACIL-PC:	21
COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE AS TRANSIÇÕES DE FASE	22
 CONTEÚDO DO CAPÍTULO II: “INC. DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MOD.”	26
INTRODUÇÃO	27
ELIPTICINA	27
Aspectos Gerais	27
Mecanismo de ação da droga	28
Interação com compostos aniônicos	29
Estrutura Cristalina da ELPT	30
HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	31
Aspectos Gerais	31
Parâmetros estudados.....	32
 CONTEÚDO DO CAPÍTULO III: “MÉT. & TÉC. EXP. DE ANÁLISE”	36
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL - ASPECTOS GERAIS	37
ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	37
Elementos da Teoria de SAXS	39
<i>Micelas esféricas</i>	40
<i>Vesículas e placas lamelares</i>	42
DIFRAÇÃO DE RAIOS X	44
Elementos da Teoria de DRX.....	45
Informações Fornecidas pelos Experimentos	48
<i>Distâncias de Repetição e Tamanho dos Domínios Cristalinos</i>	48
<i>Estruturas Lamelares</i>	49

<i>Perfil de Densidade Eletrônica das Estruturas Lamelares</i>	49
DSC (Differential Scanning Calorimetry)	50
Associação entre DSC, SAXS e WAXS	50
Cryo-TEM (Cryofracture Transmission Electron Microscopy)	51
 CONTEÚDO DO CAPÍTULO IV: “AMOSTRAS E MONTAGEM EXP”	 54
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
Materiais	55
Roteiro de Preparação	56
<i>Etapas básicas:</i>	58
<i>Formação das Vesículas Multilamelares</i>	58
<i>Formação das Vesículas Unilamelares</i>	58
<i>Formação das Multicamadas Depositadas</i>	59
MONTAGEM EXPERIMENTAL	59
SISTEMAS ESTUDADOS	61
Amostras da Série V e Parâmetros das Medidas	62
Amostras da Série R e Parâmetros das Medidas	63
Amostras das Séries de Multicamadas e Parâmetros de Medidas	65
<i>Série M e MR</i>	65
<i>Série CL</i>	66
<i>Série C</i>	66
Amostras da Série H e Parâmetros de Medida	66
CORREÇÃO DOS DADOS	67
<i>Tempo de Exposição e Intensidade do Feixe</i>	68
<i>Atenuação da Amostra</i>	69
<i>Homogeneidade do Detetor</i>	70
<i>Espalhamento Parasita</i>	71
DISCUSSÃO SOBRE ERROS:	72
<i>Calibração de temperatura</i>	74
<i>Preparação das amostras</i>	74

<i>Medidas</i>	75
<i>Estimativa do Erro</i>	75
CONTEÚDO DO CAPÍTULO V: “ANÁLISE DOS RESULTADOS”	78
PARTE I	
INTERAÇÃO DA ELPT COM A MEMBRANA DE DPPC	80
INTRODUÇÃO	81
RESULTADOS DA PARTE I	87
Transição de Fase em Sistemas de Vesículas de DPPC:ELPT	87
<i>Região de Pré-Transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$</i>	88
<i>Região de Transição Principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$</i>	94
<i>Tabela dos Resultados de Transição de Fase (Série V)</i>	101
<i>Otimização dos parâmetros: preparação da série R</i>	102
<i>Temperatura de TF em função da razão molar DPPC:ELPT</i>	104
Análise do Perfil do Primeiro Máximo de Difração	105
Compressão Térmica da Estrutura Lamelar na Fase $L\alpha$	112
Estudo da Concentração Crítica de Incorporação do Fármaco na Bicamada	116
<i>Fases cristalinas da ELPT</i>	116
<i>Amostras</i>	120
<i>Resultados</i>	120
Interação da ELPT com a Cardiolipina	123
RESUMO DOS RESULTADOS PARTE I:	127
PARTE II	
INTERAÇÃO DE HAP'S COM A MEMBRANA DE DPPC	129
INTRODUÇÃO	130
Parâmetros Caracterizados	130
Parâmetros da Literatura	130
RESULTADOS DA PARTE II	131
Comparação dos parâmetros estudados	132

Distâncias de repetição	133
Compressão Térmica da Estrutura Lamelar da Fase LC:	134
RESUMO DOS RESULTADOS PARTE II:	144
 CONTEÚDO DO CAPÍTULO VI: “CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS”	 148
CONCLUSÕES	149
Conclusões sobre os resultados da Parte I.....	150
Conclusões sobre os resultados da Parte II	152
PERSPECTIVAS	153
Utilização de Porta-Amostra para Líquidos sob Vácuo	153
Associação entre DSC, SAXS e WAXS.....	154
OBSERVAÇÕES GERAIS	155
BIBLIOGRAFIA	156

LISTA DE ABREVIÇÕES

CL	Cardiolipina
BA	2,3-benzantraceno
BP	3,4-benzopireno
DBA	1,2;5,6-dibenzantraceno
DMBA	9,10-dimetil-1,2-benzantraceno
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DRX	difração de raios X
DSC	diferencial scanning calorimetry
ELPT	Elipticina
HAP's	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
LMLV	large multilamellar vesicle
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LUV	large unilamellar vesicle
MC	20-metilcolantreno
SAXS	small angle X ray scattering
SUV	small unilamellar vesicle
TTF	temperatura de transição de fase
WAXS	wide angle X ray scattering

RESUMO

As fases lamelares formadas em sistemas lipídeo/água possuem características estruturais que servem como base para estudos de fenômenos de superfície e interface. As multicamadas de fosfolipídeos constituem-se em um eficiente modelo estrutural no estudo das propriedades das membranas biológicas. Em particular, as vesículas multilamelares ou lipossomas são atualmente motivo de intensas pesquisas em áreas tão diversas como o desenvolvimento de cosméticos e as aplicações médicas, como o encapsulamento de drogas e imunogênicos.

O presente trabalho teve como objetivo analisar, do ponto de vista estrutural, os parâmetros envolvidos no processo de incorporação de vários tipos de compostos hidrofóbicos na estrutura lamelar de lipossomas e multicamadas do fosfolipídeo zwitteriônico DPPC. Técnicas de difração e espalhamento de raios X usando radiação síncrotron foram usadas para acompanhar mudanças estruturais de diversos sistemas de bicamadas registrando as alterações nas temperaturas de transição de fase termotrópicas e na ordem do empacotamento lamelar. Dessa maneira foi possível estudar o comportamento das fases $L\beta'$ e $L\alpha$ em função do conteúdo de água em sistemas de vesículas multilamelares de DPPC com adição do alcaloide Elipticina em várias concentrações. Os resultados mostraram uma diminuição da temperatura de pré transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ assim como da transição de fase principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$. A taxa de decréscimo do espaçamento lamelar da membrana modelo na fase líquido cristalina em função da temperatura nos permitiu descrever o comportamento do coeficiente de compressão térmica da fase $L\alpha$. Foi possível provar para este sistema, que adicionando o lipídeo aniônico Cardiolipina à membrana mista DPPC/CL, consegue-se otimizar a incorporação da Elipticina.

Os métodos previamente mencionados foram também usados para o estudo das fases lamelares de DPPC com adição de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com vários graus de ação carcinogênica. Foi verificado nestas experiências que a temperatura da transição de fase principal assim como a distância de repetição da estrutura lamelar das vesículas na fase $L\alpha$ sofrem mudanças com a incorporação dos HAPs. Mostrou-se assim, que a incorporação destes compostos hidrofóbicos favorece a formação da fase líquido cristalina, causando um alargamento da região da transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$.

Os resultados obtidos neste trabalho são de importância básica no desenvolvimento de lipossomas termo-sensíveis que podem atuar como carreadores de drogas e no entendimento das perturbações que podem produzir moléculas hidrofóbicas quando interagem com as membranas celulares.

ABSTRACT

The structural features of the lamellar phases of the lipid/water systems are frequently used as a basic model for the study of surface and interface phenomena. Phospholipid bilayers represent an efficient structural model for the study of biological membranes. In particular, multilamellar vesicles or liposomes are the subject of intense research in areas so diverse as the development of cosmetics or medical applications, such as drug and antigenic material encapsulation.

The objective of this work has been to study, from the structural point of view, the process of incorporation of various types of hydrophobic compounds into the lamellar phase of liposomes and multilayers of the zwitterionic phospholipid DPPC. X-ray diffraction and scattering techniques using synchrotron radiation, have been used to monitor structural changes of several bilayer systems. Thermotropic phase transitions as well as the order of the lamellar packing were studied in *in situ* experiments. The behavior of the $L\beta'$ e $L\alpha$ phases was followed as a function of the water content in dispersions of DPPC multi lamellar vesicles with the addition of the alkaloid Ellipticine in several concentrations. The results showed a decrease in the temperature of the pre-transition as well as that of the main transition ($P\beta' \rightarrow L\alpha$). The decrease of the lamellar spacing as a function of temperature in the liquid crystalline phase leads to the description of the thermal compression coefficient in the $L\alpha$ phase. It was also proved that addition of the anionic lipid Cardiolipin to the DPPC/water system it is possible to promote the incorporation of Ellipticine.

The aforementioned methods were used in another set of experiments to study the lamellar phases of DPPC with the addition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons known to have various degrees of carcinogenic activity. It was verified that the main transition temperature as well as the lamellar spacing of the multilamellar vesicles in the $L\alpha$ phase have a change with the incorporation of these compounds. It was possible to show that the hydrophobic PAHs favor the formation of the liquid crystalline phase, causing a broadening of the $P\beta' \rightarrow L\alpha$ phase transition.

The results obtained in this work are basically important in the development of thermo sensitive liposomes, which can act as drug carriers. They also contribute to the understanding of the perturbations caused by the interaction of highly hydrophobic molecules with the cellular membranes.

Introdução e Objetivos

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As estruturas lamelares das vesículas de lipídeos polares têm sido bastante estudadas como modelo de membrana biológica e como base de aplicação em várias áreas do conhecimento¹. Um dos tópicos bastante investigados, devido à sua importância, é a utilização de membranas artificiais de fosfolipídeos como meio apropriado para o estudo da atividade de proteínas de membrana. O potencial de aplicação das estruturas formadas pelas multicamadas de lipídeos polares, mostra-se cada vez mais importante do ponto de vista industrial. Os lipossomas têm sido utilizados nas áreas de alimentos, cosméticos, agricultura e principalmente na indústria farmacêutica. A utilização das propriedades das vesículas de fosfolipídeos no microencapsulamento de fármacos para aplicação médica é uma das áreas de maior interesse atualmente segundo indica a literatura². Para alguns fármacos hidrofóbicos e em muitos outros casos, a utilização de uma microcápsula de lipídeo para sua administração é o meio mais eficiente de armazenamento, redução da toxicidade, transporte, seleção do alvo e liberação controlada.

Devido à sua grande aplicabilidade, tem-se buscado entender com mais detalhes a completa evolução dos sistemas auto organizáveis de lipídeos polares. Vem daí a relevância dos resultados de caracterização do ponto de vista estrutural das fases intermediárias que levam a formação dos lipossomas e da compreensão dos parâmetros relacionados ao controle das variáveis de interesse das membranas modelo. Dentre as variáveis de interesse, estão, a estabilidade do lipossoma, a temperatura de transição de fase, a permeabilidade e a fluidez da membrana, etc.

O trabalho de Bangham³ publicado em 1968 foi o primeiro a identificar as vesículas de fosfolipídeos, como uma importante ferramenta no estudo das propriedades das membranas celulares. Desde então, tanto a utilização quanto a sofisticação no preparo de tais vesículas têm crescido amplamente. O fosfolipídeo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o tipo mais abundante presente nas membranas biológicas, foi o lipídeo mais utilizado para estudo e aplicações nos últimos anos. Diversas técnicas experimentais foram empregadas

para caracterizar suas diferentes fases lamelares e comportamento em relação à temperatura, hidratação, pH, etc. Em 1998, com a criação do Lipidat⁴, um banco de dados com acesso disponível pela internet⁵, foi possível compilar os resultados e técnicas de caracterização não só do DPPC, mas de vários outros lipídeos, que foram publicados nas cinco últimas décadas. Esta foi uma iniciativa, entre outras, de padronizar procedimentos e divulgar informação mais rapidamente dentro da comunidade de interesse.

O principal objetivo do presente trabalho foi analisar, do ponto de vista estrutural, os parâmetros envolvidos no processo de incorporação de compostos hidrofóbicos na membrana modelo. Para compreender melhor os aspectos biológicos do tema, mostramos no capítulo I alguns conceitos básicos sobre a descrição da membrana biológica, as características gerais dos lipídeos, as forças de interação na formação da membrana modelo e as transições de fase lamelares.

O capítulo II descreve as características de dois tipos de compostos que foram incorporados na membrana modelo. O primeiro deles, a Elipticina, é um alcalóide de caráter hidrofóbico que apresenta atividade anticancerígena. O mecanismo de ação desta droga é sugerido como sendo por intercalação na dupla hélice do DNA inibindo o processo de divisão celular tumoral. Chamamos a isso uma ação antiproliferativa que ocorre também, como é mostrado em alguns trabalhos^{6,7}, contra o vírus HIV₁. A Elipticina e seus derivados têm apresentado muito bons resultados contra tumores artificiais e humanos estudados *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, uma das dificuldades encontradas na administração da Elipticina como agente quimioterápico foi a sua baixa solubilidade em água. Por isso foi bastante valorizada a alternativa de incorporação da droga nas regiões hidrofóbicas da membrana como meio de armazenamento e transporte até o sítio de ação dentro do organismo.

Os lipossomas que são utilizados como carreadores da droga, apresentam um ordenamento de dimensões nanométricas. Para essas estruturas, a difração de raios X é uma poderosa ferramenta com a qual podemos determinar o perfil de densidade eletrônica da membrana e inferir sobre a localização da droga incorporada, determinar as diferentes fases

termoliotrópicas da membrana, monitorar defeitos ou a formação de fase cristalina devido à incorporação de compostos ou ainda controlar a formação de lipossomas multilamelares. Em resumo, neste trabalho, estudamos tais mudanças que ocorrem na estrutura lamelar da membrana em função da variação da temperatura, da hidratação e da composição lipídica da membrana, da razão molar entre o lipídeo e a droga e do método de preparação.

As técnicas de espalhamento de raios X a baixo e alto ângulo descritas no capítulo III foram utilizadas para a caracterização estrutural dos sistemas em função da temperatura, e também isotermicamente em função da composição dos sistemas. Utilizamos basicamente duas montagens experimentais que apresentamos no capítulo IV: a primeira com aquisição de dados na estação de espalhamento de raios X a baixo ângulo no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron com a qual se pode realizar experimentos com geometria de transmissão em amostras de vesículas multilamelares em solução. E a segunda utilizando um gerador de raios X com anodo rotatório de cobre do Laboratório de Cristalografia Aplicada e Raios X deste Instituto com o qual realizamos experimentos com geometria de reflexão em amostras de empilhamento de multicamadas depositadas sobre vidro.

As multicamadas de lipídeo e as vesículas são somente algumas das estruturas geradas pelas propriedades anfifílicas dos lipídeos polares. Essas propriedades possibilitam a sua auto organização em meio aquoso gerando um variado polimorfismo. Entretanto, a organização espontânea não é eficiente no que diz respeito ao tempo de preparação, homogeneidade dos sistemas e aproveitamento dos materiais. Para otimizar o processo, é possível preparar cada uma das diferentes estruturas lamelares controlando as condições do meio, tais como temperatura, pH, concentração, entumescimento e agitação. Um método de preparação das amostras é apresentado no capítulo IV. O bom entendimento deste método, que foi baseado em alguns trabalhos da literatura, constituiu-se, de fundamental importância para o controle da formação das diferentes estruturas lamelares. A matriz lipídica utilizada como membrana modelo foi preparada com o lipídeo DPPC. A incorporação de outros compostos na estrutura lamelar foi feita durante a diluição dos lipídeos em solvente orgânico e todos os processos foram padronizados para controle de história prévia.

Os resultados da caracterização da incorporação de ELPT na membrana modelo preparada com DPPC, são mostrados na primeira parte do capítulo V, onde apresentamos os estudos sobre a transição de fase, análise do perfil de difração, a taxa de decrescimento da bicamada da membrana na fase líquido cristalina em função da temperatura e a influência de um lipídeo aniônico na composição da membrana.

Com esta mesma metodologia utilizada no estudo das interações da ELPT com membranas, apresentamos, na segunda parte do capítulo V, alguns resultados de interações de membranas com uma série de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que apresentam variado grau de atividade carcinogênica.

Os comentários finais, conclusões e perspectivas da continuidade do tema são apresentados no capítulo VI. Nesta parte destacamos a utilização de um novo porta amostras para líquidos otimizado para medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo em vácuo que foi desenhado e construído durante o desenvolvimento desta tese para ser utilizado na linha de SAXS do LNLS. Os primeiros testes mostraram excelente performance desta instrumentação alcançada, principalmente, com relação à eliminação do espalhamento parasita causado pelo ar, à possibilidade de medida a alto ângulo e à praticidade na realização de troca de amostras durante o experimento, dentre outras características gerais.

CAPÍTULO I

Aspectos

Biológicos

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

CONTEÚDO DO CAPÍTULO I : ``ASPECTOS BIOLÓGICOS``

MEMBRANAS BIOLÓGICAS: INTRODUÇÃO.....	4
LIPÍDEOS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES	4
Ácidos Graxos.....	4
Gorduras Neutras	6
Lipídeos Polares	7
<i>Classificação dos fosfolipídeos</i>	<i>8</i>
MODELO DE MEMBRANA E MEMBRANA MODELO	9
Modelo de Membrana Celular: Mosaico Fluido	10
Membrana Modelo.....	10
Forças de interação na formação da membrana.....	11
<i>Interação hidrofóbica: mais detalhes</i>	<i>11</i>
Formação de estruturas.....	13
POLIMORFISMO DOS SISTEMAS LIPÍDEO/ÁGUA	14
Transições de fase	15
<i>Isomeria Conformacional</i>	<i>15</i>
<i>Conformação das cadeias acíclicas.....</i>	<i>16</i>
<i>(1). Tamanho das cadeias hidrocarbonadas.....</i>	<i>17</i>
<i>(2). Grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas.....</i>	<i>17</i>
<i>(3). Natureza do grupo polar</i>	<i>17</i>
<i>(4). Hidratação da bicamada</i>	<i>18</i>
<i>(5). Composição</i>	<i>18</i>
<i>(6). Presença de Colesterol na Membrana</i>	<i>18</i>
Mesofases dos Sistemas Lipídeo/Água	18
<i>Conformação α:</i>	<i>20</i>

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

<i>Conformação β e β':</i>	20
<i>Conformação c:</i>	21
POLIMORFISMO DE ALGUNS SISTEMAS DE DIACIL-PC:	21
COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE AS TRANSIÇÕES DE FASE.....	22

* * *

MEMBRANAS BIOLÓGICAS: INTRODUÇÃO

As membranas isolam as células do ambiente e também os compartimentos das organelas intracelulares onde ocorrem muitos dos mais importantes processos biológicos. As membranas contêm proteínas que intermediam e regulam o transporte de macromoléculas e íons, sítios receptores e de reconhecimento. Hormônios e outras moléculas sinalizadoras e agentes reguladores somente cumprem suas funções via interação com membranas. Fotossíntese, transporte de elétrons, contração muscular e outras atividades metabólicas, todas dependem das membranas⁸. Muitas das propriedades das membranas celulares são reflexos do seu conteúdo de lipídeo polar.

LIPÍDEOS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES

Os **lipídeos polares** são os principais componentes das membranas celulares, determinando muitas das suas propriedades físicas e químicas⁹. A fim de entender as principais características das muitas classes de lipídeos torna-se necessário considerar algumas das propriedades e reações dos ácidos graxos que são as unidades fundamentais da maioria dos lipídeos.

Ácidos Graxos

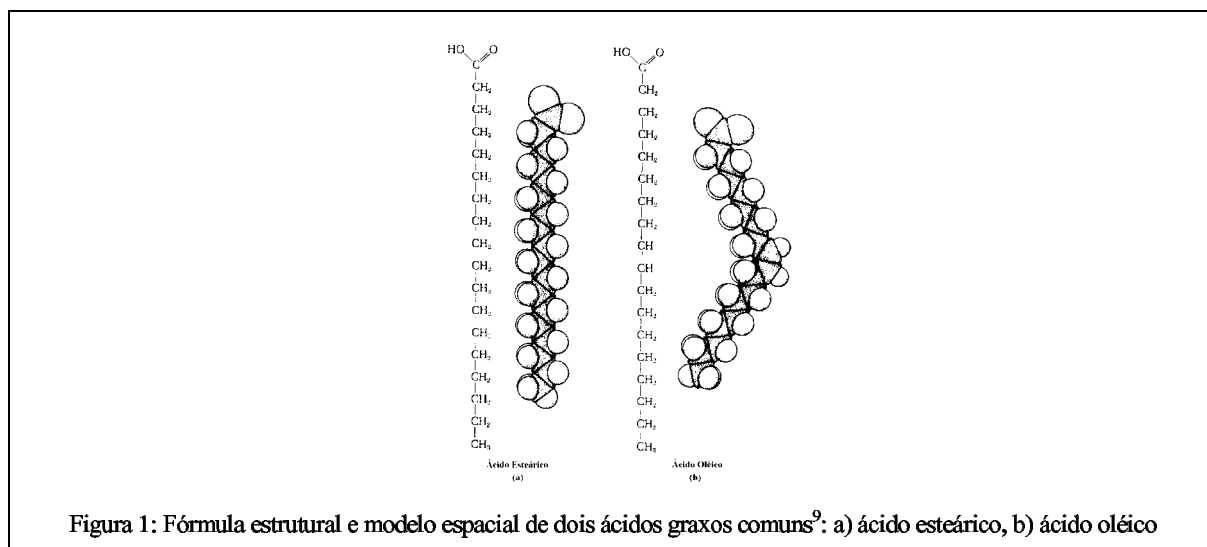
Os **ácidos graxos** são ácidos orgânicos de cadeia longa, possuindo de 4 a 24 átomos de carbono com variado número e posição de duplas ligações. Eles possuem um grupo

carboxila único ($\begin{array}{c} \text{HO} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array}$) e uma cauda hidrocarbonada não polar que confere à maioria dos lipídeos a sua natureza oleosa e gordurosa, insolúvel em água. A Figura 1a mostra o ácido esteárico na sua forma estendida, entretanto ela não é uma molécula linear; a cauda dos ácidos saturados, ou seja, que contém somente ligações simples, é flexível e pode assumir muitas conformações diferentes, porque as ligações simples permitem rotações. No ácido oléico, mostrado na Figura 1b, entretanto, a dupla ligação cis introduz uma dobra rígida na

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

cauda hidrocarbonada. Todas as outras ligações simples da mesma cauda continuam livres para rodar.



Praticamente todos os ácidos graxos na natureza possuem um número par de átomos de carbono; aqueles com 16 ou 18 são os mais abundantes. A Tabela 1 mostra alguns ácidos graxos naturais e seus pontos de fusão. Os ácidos graxos naturais de C₁₂ a C₂₄ são sólidos, apresentando uma consistência de cera; os ácidos graxos insaturados, por outro lado, são líquidos oleosos à temperatura ambiente.

Nº de carbonos	Estrutura	Nome sistemático	Nome comum	Pto de fusão (°C)
12	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	n-Dodecanóico	Láurico	44.2
14	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	n-Tetradecanóico	Mirístico	53.9
16	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	n-Hexadecanóico	Palmítico	63.1
18	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	n-Octadecanóico	Estearico	69.6
20	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	n-Eicosanóico	Araquídico	76.5
24	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	n-Tetracosanóico	Linocérico	86.0
Ácidos graxos insaturados				
16	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH		Palmitoléico	-0.5
18	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH		Oléico	13.4

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Linoléico	-5
18	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Linolênico	-11
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Araquidônico	-49.5

Tabela 1: Alguns ácidos graxos naturais.

Gorduras Neutras

Os lipídeos mais simples e abundantes que contêm os ácidos graxos como unidades fundamentais são **as gorduras neutras**: mono, di e triacilgliceróis. Eles são componentes principais de armazenamento ou depósito de gorduras nas células das plantas e animais, mas não são normalmente encontrados em membranas. São moléculas hidrofóbicas, não polares, pois não contêm grupos funcionais eletricamente carregados ou altamente polares. As gorduras neutras são ésteres de ácidos graxos. A Figura 2 mostra a estrutura da

tripalmitina: as três **hidroxilas** do álcool glicerol ($\begin{array}{ccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ | & | & | \\ \text{H}-\text{C}^1 & -\text{C}^2 & -\text{C}^3-\text{H} \\ | & | & | \\ \text{OH} & \text{OH} & \text{OH} \end{array}$) estão esterificadas com cada um dos três ácidos palmítics.

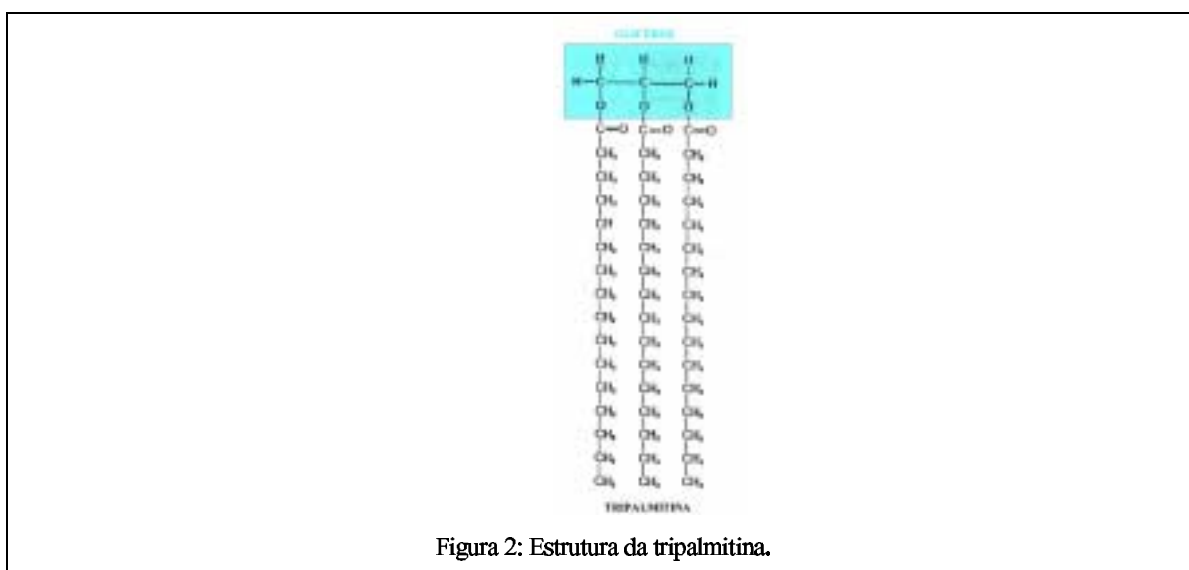


Figura 2: Estrutura da tripalmitina.

As gorduras neutras, tendo principalmente ácidos graxos insaturados, portanto líquidos à temperatura ambiente, podem ser convertidos quimicamente em gorduras sólidas por hidrogenação parcial das suas duplas ligações. Grandes quantidades de óleos vegetais líquidos, como o óleo de milho, são convertidas em manteiga sólida por um processo catalítico de hidrogenação, que força a conversão de algumas das suas duplas ligações em ligações simples. Quando expostos ao ar, as gorduras neutras que contêm ácidos graxos insaturados tendem a sofrer um processo complexo chamado de auto-oxidação. O oxigênio molecular pode atacar ácidos graxos que contenham duas ou mais ligações produzindo produtos complexos responsáveis pelo sabor das gorduras rançosas. O óleo de linhaça, um óleo vegetal usado como veículo ou base de tintas, é muito rico em ácidos graxos insaturados. Ele sofre auto-oxidação quando exposto ao ar, seguida de polimerização em uma capa resinosa dura, à medida que “endurece” ou se oxida. A auto oxidação das gorduras insaturadas usualmente não se realiza nas células pois ela é reprimida pela ação inibidora da vitamina E, por várias enzimas e possivelmente também pelo ácido ascórbico. Entretanto, ela pode ocorrer em algumas doenças, levando à formação de depósitos anormais de lipídeos em certos tecidos.

Lipídeos Polares

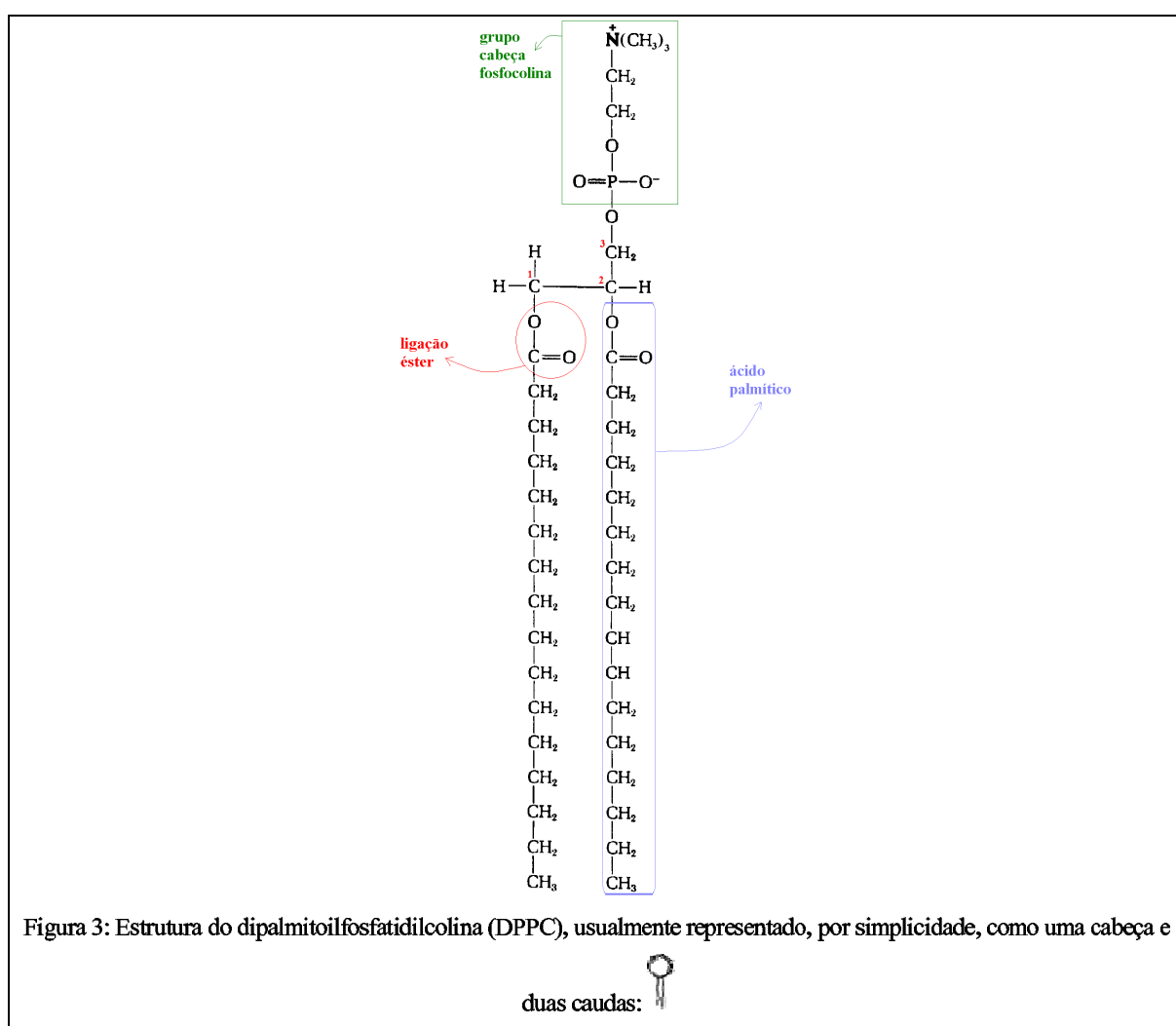
Os **lipídeos de membrana** diferem das gorduras neutras por possuírem um ou mais grupamentos altamente polares (“cabeças”) além das suas caudas hidrocarbonadas. Por isso são chamados de lipídeos polares. Os lipídeos de membrana mais abundantes são os fosfolipídeos que servem, sobretudo, como elementos estruturais. Os principais fosfolipídeos encontrados nas membranas são os fosfoglicerídeos que contêm duas moléculas de ácido graxo esterificadas ao primeiro e ao segundo grupo hidroxila do

glicerol. O terceiro grupo hidroxila do glicerol forma uma ligação éster ($\text{C}=\text{O}$) com o ácido fosfórico. Os fosfoglicerídeos ainda contêm um segundo álcool que é esterificado àquele ácido fosfórico e localizado, portanto, na cabeça polar da molécula. A Figura 3 mostra a

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

estrutura do dipalmitoilfosfatidilcolina. A cabeça polar é formada pelo grupo alcoólico colina ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) e as caudas hidrocarbonadas por dois ácidos palmíticos (cadeia acíclica de 16 carbonos, conforme Tabela 1).



Classificação dos fosfolipídeos

Os fosfolipídeos podem ser classificados de acordo com os aspectos estruturais dos *grupos polares* e das *cadeias acíclicas*:

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

(i) Os grupos polares podem ser zwitteriônicos ou carregados. A fosfatidilcolina é um fosfolípido zwitteriônico: o grupo fosfato tem carga negativa em pH=7 e o grupo colina está carregado positivamente. A cardiolipina, mostrada na Figura 4, é um fosfolípido carregado: os grupos fosfato tem carga negativa e não existem outros grupos para contrabalecear a carga total.

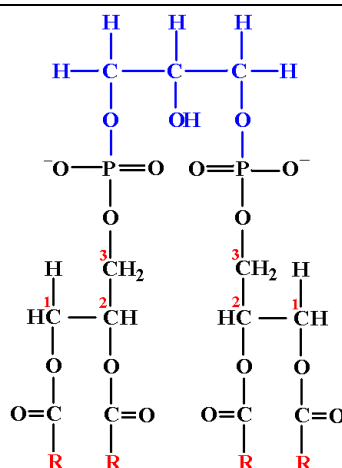


Figura 4: Estrutura da cardiolipina (difosfatidilglicerol). Em azul está representada a ponte glicerol. **R** são os radicais ácidos graxos.

Membranas de lipídeos carregados são de especial interesse por duas razões: 1) mudanças conformacionais podem ser induzidas por cargas externas como H^+ ou Ca^{++} ou ainda fármacos ou polipeptídeos carregados. 2) compostos carregados tais como fármacos ou polipeptídeos, se ligam mais fortemente à interface carregada lipídeo/água.

(ii) As cadeias hidrocarbonadas são caracterizadas pelo número de carbonos e pelo seu grau de saturação. Variando-se esses parâmetros podemos preparar fases lipídicas idênticas ainda que em diferentes temperaturas. É dessa forma que a natureza ajusta a fluidez das membranas biológicas às temperaturas correspondentes às suas funções.

MODELO DE MEMBRANA E MEMBRANA MODELO

Modelo de Membrana Celular: Mosaico Fluido

A Figura 5 mostra o modelo de membrana celular segundo a teoria unificadora da estrutura da membrana chamada de modelo do mosaico fluido proposta por Singer e Nicolson¹⁰ em 1972. O modelo constitui-se de uma bicamada fluida de lipídeos polares, que é o que forma a estrutura da membrana, e os grupos funcionais, que são principalmente as proteínas. A quantidade e o tipo de proteína é o que vai definir a função específica de cada membrana. A proposta do modelo, que é aceito atualmente, foi baseada em resultados químico-analíticos, nas evidências da microscopia eletrônica e na semelhança das propriedades naturais com as bicamadas de fosfolipídeos sintéticos.

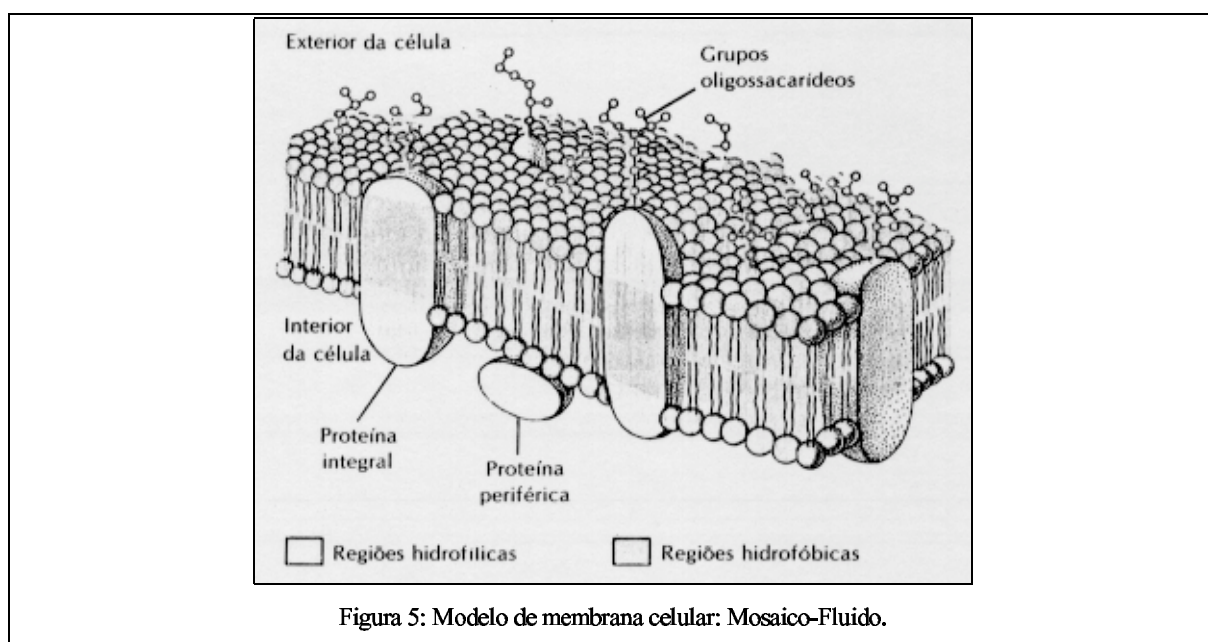


Figura 5: Modelo de membrana celular: Mosaico-Fluido.

Membrana Modelo

No presente trabalho, chamamos ‘membrana modelo’, a estrutura básica da bicamada formada somente pelos lipídeos polares, sem a presença dos grupos funcionais existentes na membrana celular. A membrana modelo é útil não somente para estudo e

caracterização de aspectos da membrana biológica mas também como base de estudos teóricos, aplicações químicas de catálise e estudos de superfícies¹¹.

Forças de interação na formação da membrana

Os lipídeos polares, como já foi dito, são constituídos de dois grupos: o grupo cauda, que é neutro, e o grupo cabeça que pode ser carregado ou zwitteriônico. Esta característica especial de possuir os dois grupos dá ao composto a propriedade da *anfifilia* ou seja, dois tipos diferentes de afinidade do ponto de vista da interação eletrostática com outras moléculas. Por causa dessa propriedade, quando os fosfolipídeos são colocados em solução aquosa, acima de uma concentração crítica, eles podem se auto organizar em bicamadas como resultado de um balanço energético de interações. É explicado que a formação das bicamadas representa um ganho na liberdade de movimento para as moléculas de água¹².

Principalmente quatro tipos de interações estão envolvidas na auto organização. A mais importante é a *interação hidrofóbica*, que é o fenômeno que guia a formação das bicamadas empurrando as caudas hidrocarbonadas de maneira que fiquem todas juntas. O segundo tipo de interação são as *forças de van der Waals* entre as caudas hidrocarbonadas, que, embora sejam fracas individualmente, contribuem de maneira significativa devido ao grande número de interações que se formam no sistema. Os outros dois efeitos estão relacionados aos grupos polares, que podem formar pontes de hidrogênio com a água (*interação hidrofílica*) e ainda interagir entre si através de *atração eletrostática* e pontes de hidrogênio estabilizando a estrutura da membrana¹³.

Interação hidrofóbica: mais detalhes

Quando os fosfolipídeos são colocados na água, a atração entre os grupos não polares, ou forças de van der Waals, tem um papel pequeno no fenômeno de formação das estruturas. O fenômeno acontece principalmente por causa do vigor das forças de atração entre as moléculas de água, pontes de hidrogênio, que, estando isotropicamente arranjadas, devem ser rompidas ou distorcidas quando algum soluto é aí dissolvido. Se o soluto é

iônico ou fortemente polar, ele pode formar ligações fortes com as moléculas de água, o que compensa as rupturas ou distorções das ligações existentes na água pura. Por isso substâncias polares ou iônicas tendem, então, a ser facilmente solúveis em água. Nenhuma compensação deste tipo ocorre com grupos não polares e é por isso que eles apresentam baixa solubilidade em água. A origem da interação hidrofóbica e, por consequência, da formação da estrutura das membranas de fosfolipídeos, é encontrada na ausência de afinidade entre as cadeias acílicas e a água¹⁴. Não se trata exatamente de uma força de repulsão (literalmente hidrofóbica). A questão é que a melhor solução energética envolve obrigar que os grupos não polares permaneçam juntos de maneira a diminuir a superfície de contato que quebraria a matriz de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água^{15,16}.

Os fatores termodinâmicos da interação hidrofóbica, são complexos e ainda não completamente entendidos. A energia livre de transferência, ΔG_{tr} de um composto não polar desde um estado de referência, tal como uma solução orgânica, para a água, é composta de um termo de entalpia, ΔH e de um termo de entropia, $-T\Delta S$.

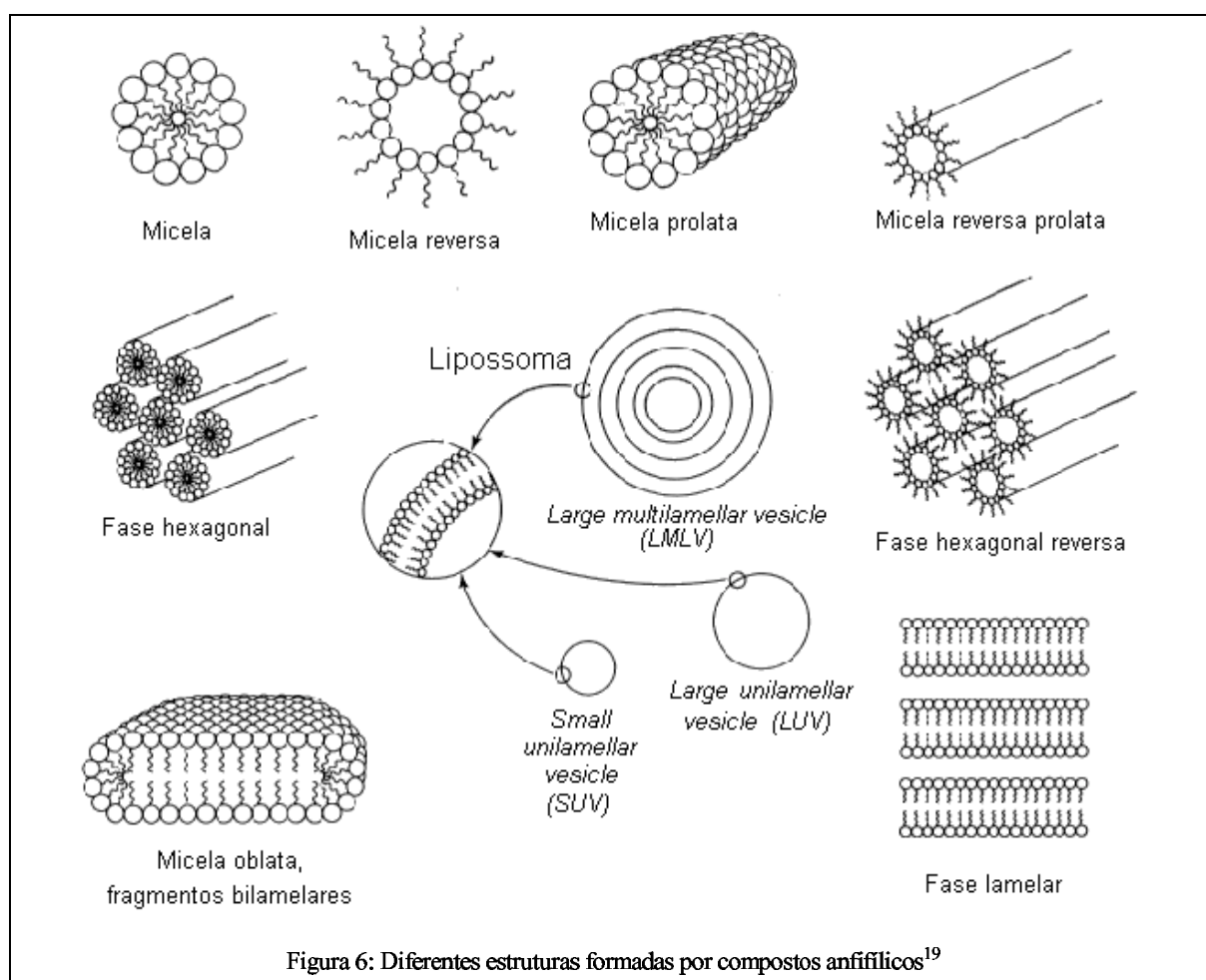
$$\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T\Delta S_{tr}$$

À temperatura ambiente, a entalpia de transferência é desprezável porque a entalpia de interação é a mesma na solução orgânica e na solução aquosa. A entropia, entretanto, é negativa. A água tende a isolar os grupos não polares em compartimentos ordenados e isto leva a uma diminuição da entropia. À alta temperatura (~110°C) estes compartimentos podem ser rompidos porque a matriz formada pelas pontes de hidrogênio não é mais estável e então a contribuição da entropia tende a zero. A entalpia de transferência, entretanto, é agora positiva (desfavorável)¹⁷.

No trabalho de Wilfried Blokzijl & Jan Engberts¹⁸ encontramos um estudo mais aprofundado a respeito da interação hidrofóbica, as referências históricas e um levantamento dos últimos *insights* sobre o assunto.

Formação de estruturas

Quando o fosfolípido é colocado em solução aquosa, diferentes tipos de estruturas são observadas dependendo das muitas variáveis envolvidas tais como o tipo de solvente (orgânico, aquoso), carga do lipídeo, número e tamanho da cauda e a relação entre as áreas das seções transversais cabeça-cauda.



A Figura 6 mostra algumas estruturas formadas por compostos anfífilos que podem ser explicadas a partir das variáveis envolvidas e principalmente pela curvatura

natural que os compostos possuem devido à razão entre as áreas das seções transversais cabeça/cauda como é mostrado na Figura 7.

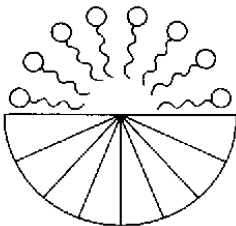
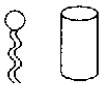
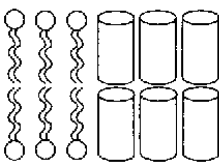
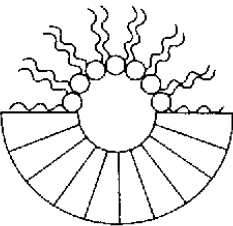
Espécies	Forma	Organização	Fase
Sabões Detergentes Lisofosfolídeos	 Cone invertido	 Micela	Isotrópica Hexagonal 1
Fosfatidilcolina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Esfingomielina Dicetilfosfato DODAC	 Cilindro	 Bicamada	Lamelar (Cúbica)
Fosfatidiletanolamina Ácido fosfatídico Colesterol Cardiolipina Lípido A	 Cone	 Micela reversa	Hexagonal 2

Figura 7: Formato dos compostos anfífilos devido à razão entre as áreas das seções transversais cabeça/cauda

POLIMORFISMO DOS SISTEMAS LIPÍDEO/ÁGUA

Transições de fase

A transição de fase das membranas de lipídeo é caracterizada pela mudança na conformação das cadeias acílicas, formadas pelos ácidos graxos²⁰. Os grupos metilenos podem assumir conformações diferentes devido à rotações em torno das ligações C-C como consequência da influência de fatores externos no sistema como, por exemplo, o aumento da temperatura ou da pressão.

Isomeria Conformacional

Os isômeros conformacionais são arranjos espaciais ligeiramente distintos em que a transformação de um isômero em outro se faz sem quebra de ligações²¹. A representação tridimensional dos grupos metileno na Figura 8 mostram sua conformação de mais baixa energia: trans.

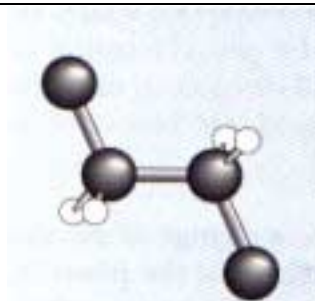


Figura 8 Conformação trans dos grupos metilenos

Se fizermos girar um dos grupos CH₂ em torno de uma ligação C-C, a energia da molécula irá se alterar devido a interações independentes de ligação (*non bonded interactions*) entre hidrogênios ou grupos substituintes ligados aos átomos de C. Essas interações podem ser maiores do que as energias térmicas das moléculas à temperatura ambiente. Neste caso, as conformações de mais baixa energia (trans) prevalecem em relação às conformações de alta energia (gauche). Na Figura 9 são ilustradas as conformações de mais alta energia para os grupos metileno.

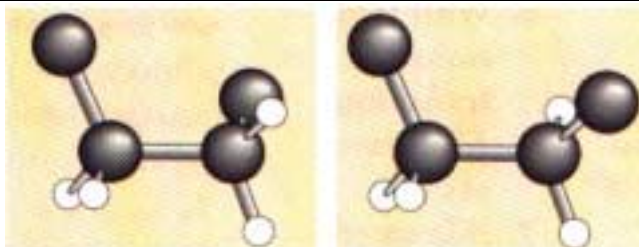


Figura 9: Conformação gauche dos grupos metileno.

Para os grupos metilenos há duas conformações de estrutura não eclipsada em torno da ligação C-C. Observemos que todas as outras representações de conformações são, na verdade, apenas variações dessas duas. A conformação gauche tem energia apenas ligeiramente mais alta, devido à maior repulsão entre os dois grupos CH_3 do que entre um grupo CH_3 e os átomos de H.

Ao contrário dos isômeros estruturais, podemos considerar que esses isômeros conformacionais estão em equilíbrio entre si porque as energias de ativação necessárias para a alteração deles são suficientemente baixas para permitir altas velocidades de conversão. As energias de ativação para os isômeros estruturais envolvem a quebra de ligações, o que pode tornar as velocidades de conversão extremamente baixas.

Conformação das cadeias acílicas

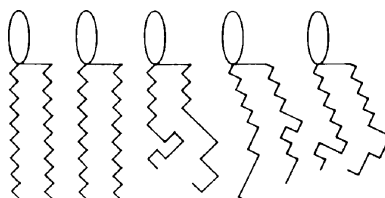


Figura 10: Esquema da metade da bicamada da estrutura lamelar formada por lipídeos polares²². Os elipsóides representam os grupos cabeça polar e as linhas em zigue zague representam as cadeias hidrocarbonadas de grupos metilenos terminando com um grupo metil.

A Figura 10 mostra esquematicamente a conformação das cadeias acílicas da estrutura lamelar formada por lipídeos polares. As cadeias da esquerda estão todas na

conformação *trans*. Nas cadeias do meio observamos algumas rotações *gauche*. Vemos que o tamanho médio da cadeia é menor quando existem rotações *gauche*.

A baixas temperaturas existe maior probabilidade de encontrar as cadeias inteiramente na conformação de menor energia: *trans*. A medida que a temperatura aumenta, vai aumentando também a probabilidade da ocorrência de rotações *gauche* em torno das ligações C-C. Entretanto, as interações hidrofóbicas entre cadeias impedirão a maioria das mudanças *trans-gauche* até uma temperatura suficientemente alta para que ocorra uma transição de fase cooperativa. A temperatura para essa transição de fase depende de alguns fatores tais como: 1) o tamanho e 2) o grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas, 3) a natureza do grupo polar, 4) a hidratação da bicamada, 5) a presença de possíveis compostos misturados ao sistema e ainda (6) a incorporação de colesterol como comentado a seguir:

(1). Tamanho das cadeias hidrocarbonadas

As cadeias mais longas interagem mais fortemente entre si oferecendo maior resistência a uma mudança de estado.

(2). Grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas

Cadeias hidrocarbonadas insaturadas não permitem um ordenamento muito compacto devido a presença das dobras nas cadeias e, neste caso, a membrana se torna mais fluida, a interação das cadeias acíclicas é mais fraca oferecendo menor resistência à transição.

(3). Natureza do grupo polar

Os grupos polares apresentam maior ou menor interação dependendo da geometria do grupo e da natureza das cargas; quanto maior a interação cabeça-cabeça, no caso dos grupos zwitteriônicos, maior a temperatura de transição.

(4). Hidratação da bicamada

Moléculas de água entre as moléculas de lipídeos concorrem na interação com os grupos polares diminuindo a interação cabeça-cabeça e, portanto, diminuindo a resistência às mudanças de fase.

(5). Composição

Quando outros compostos são misturados à membrana, eles interagem com os lipídeos e podem favorecer as transições de fase devido à blindagem que se forma entre os grupos polares. Por outro lado, essa interação com os novos grupos que foram misturados pode resultar mais forte que aquela que existia entre os lipídeos puros. Neste caso, a mistura pode promover um aumento na temperatura transição de fase.

(6). Presença de Colesterol na Membrana

A incorporação do colesterol entre as cadeias hidrocarbonadas blinda as interações de Van der Waals entre elas e reestrutura o empacotamento da matriz lipídica. A presença de colesterol nas membranas induz uma desordem parcial na estrutura cristalina das cadeias hidrocarbonadas, mas também, por outro lado, uma ordem parcial na estrutura líquido cristalina da membrana a alta temperatura. Um estado intermediário é então produzido mantendo um grau moderado de mobilidade em um intervalo grande de temperatura. Regular o nível de colesterol na membrana celular é uma maneira de estabilizar sua fluidez em função da temperatura^{23,24}.

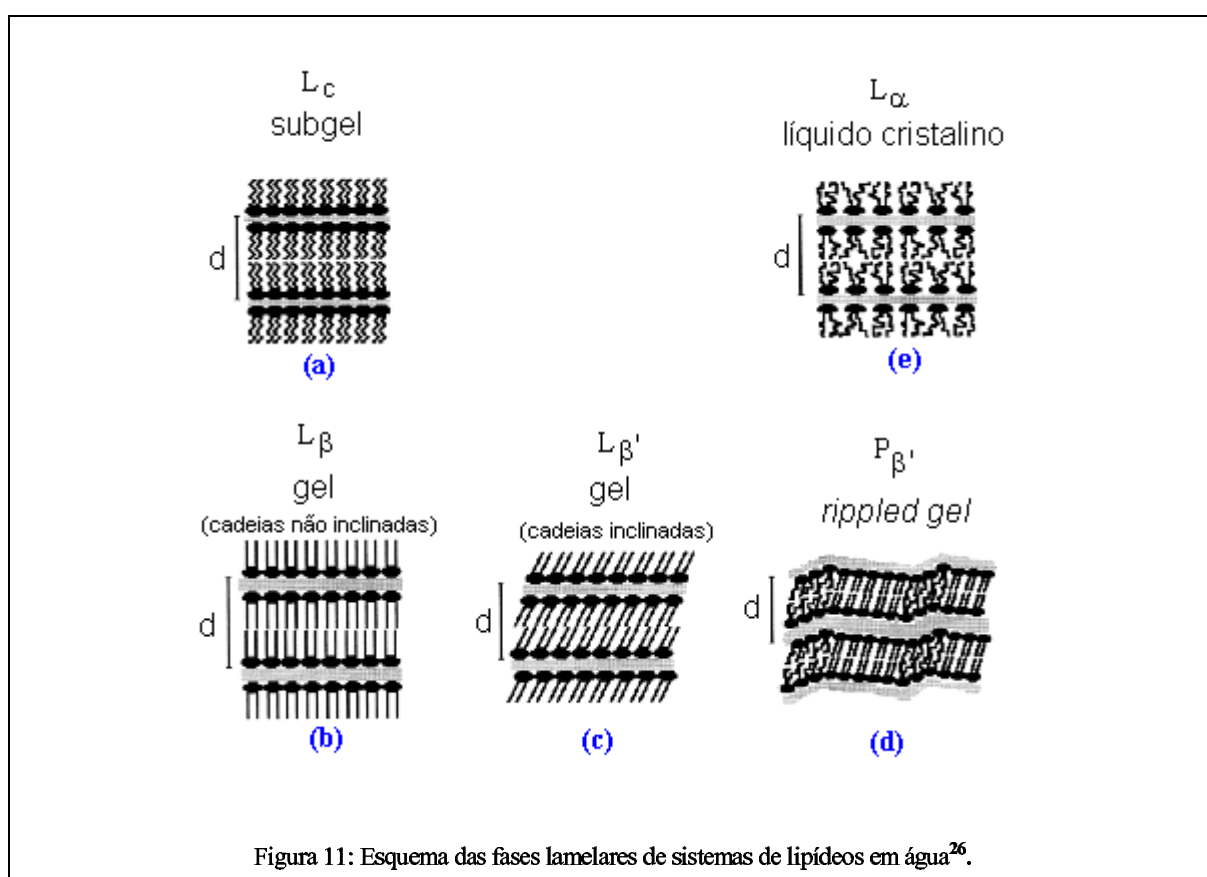
Mesofases dos Sistemas Lipídeo/Água

O trabalho de Annete Tardieu²⁵ estabeleceu a nomenclatura que é utilizada para distinguir as diferentes fases lamelares formadas pelos lipídeos polares. As letras maiúsculas caracterizam o tipo de ordem a longo alcance, ou seja, a estrutura a baixo ângulo com dimensões de algumas dezenas de angstrom formada pelos planos que contém as cabeças polares:

L, lamelar (uma dimensão);

P, oblíquo ou centrado (duas dimensões).

As letras gregas caracterizam o estado conformacional das cadeias hidrocarbonadas:
 α , líquido-cristalino ou altamente desordenados;
 β , β' e c, parcialmente ordenados.



A Figura 11 mostra esquematicamente as características mais relevantes das mesofases dos sistemas lipídeo/água. As diferentes estruturas são formadas, principalmente, em função da temperatura, da composição do sistema e do pH do meio. A conformação das cadeias acílicas em cada estrutura é o aspecto mais influente sobre as transições.

Conformação α :

Na conformação do tipo α , as cadeias se encontram altamente desordenadas. Esta é a conformação de maior isotropia. Por esta razão, as propriedades da fase não são muito sensíveis às heterogeneidades químicas das cadeias nem mesmo à presença de outros compostos misturados ao sistema. Ao contrário do que acontece com as fases nas quais a conformação das cadeias é mais ordenada.

As fases que apresentam as cadeias hidrocarbonadas na conformação α , possuem um efeito térmico peculiar: a espessura da bicamada diminui à medida que a temperatura aumenta. Este fenômeno, bem conhecido em borrachas, é típico de polímeros que apresentam conformações altamente desordenadas: o aumento da temperatura aumenta a desordem e diminui a elongação^{27,28}. Um mecanismo similar explica o efeito observado nos lipídeos: a temperaturas moderadas, a tensão interfacial tende a diminuir a área por grupo polar na interface lipídeo-água e, portanto, esticar as cadeias. Ao contrário, a conformação desordenada das cadeias tende a reduzir a elongação. Aumentar a temperatura significa aumentar a desordem e, então, diminuir a anisotropia das cadeias²⁵.

Considerações geométricas indicam que, nesta conformação desordenada, as cadeias devem se dobrar da melhor forma possível buscando preencher, uniformemente, os espaços oferecidos a elas não apresentando resistência ao ordenamento a longo alcance, ou seja, a periodicidade no espaçamento entre as camadas que contém os grupos polares.

Conformação β e β' :

A conformação β' difere da conformação do tipo β somente na inclinação das cadeias em relação ao plano das bicamadas. Esta conformação é caracterizada por uma distância de correlação bem definida de 4.2 Å. Os grupos metilenos estão todos na conformação trans e, por isso, as cadeias acíclicas estão na sua posição mais alongada com distâncias bastante regulares entre elas.

Nestas conformações, β e β' , as propriedades das fases são bastante sensíveis às variações que ocorrem nas regiões hidrofóbicas, ou seja, a presença de novos ligantes ou

impurezas influenciam diretamente o ordenamento das cadeias. Em contrapartida, o ordenamento entre as camadas lamelares é pouco evidente.

Conformação c:

A conformação do tipo c é intermediária nos dois aspectos do ordenamento: entre as cadeias acílicas e entre as camadas lamelares.

POLIMORFISMO DE ALGUNS SISTEMAS DE DIACIL-PC:

Os sistemas lamelares formados por diacil-fosfatidilcolinas de cadeias saturadas contendo de 15 a 22 átomos de carbono apresentam pelo menos três fases diferentes no intervalo de temperatura de 10 a 80°C²⁹, como ilustra a Tabela 2. No equilíbrio, à baixa temperatura, observamos a formação da fase subgel L_c com cadeias hidrocarbonadas regularmente dobradas e o eixo longitudinal dos grupos polares orientado paralelamente ao plano das bicamadas como é mostrado na Figura 11a. A fase L_c, submetida ao aquecimento, se transforma na fase Lβ' com reduzida inclinação das cadeias acílicas, como pode ser observado na Figura 11c, e aumento da hidratação entre os grupos polares. Esta transição a baixa temperatura é denominada 'subtransição'.

A temperaturas intermediárias, ocorre a transformação da fase Lβ' em Pβ'. Esta nova fase possui a mesma conformação das cadeias acílicas que a fase anterior, entretanto apresenta uma ondulação no plano das bicamadas, como mostrado na Figura 11d, correspondente à simetria da rede monoclinica bidimensional. Esta modulação das lamelas depende do tamanho das cadeias hidrocarbonadas apresentando, entretanto, pequenas amplitudes e garantindo, então, que as cadeias permaneçam afastadas do meio aquoso.

A altas temperaturas, a fase Pβ' se transforma na fase Lα, que é mostrada na Figura 11e. A conformação das cadeias acílicas torna-se altamente desordenada e os planos das bicamadas perdem a ondulação.

Número de	Sub transição (°C)	Pré transição (°C)	Transição principal
-----------	--------------------	--------------------	---------------------

CAPÍTULO I

ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse

carbonos			(ordem-desordem das cadeias acílicas) (°C)
15	20,2±3,0	22,0±2,5	33,7±0,8
16	18,8±3,1	34,4±2,5	41,3±1,8
17	21,6±3,8	42,7±1,1	48,6±0,6
18	26,3±5,2	49,1±2,9	54,5±1,5
19	30,0±4,3	57,2±1,1	60,2±1,1
20	36,9±1,3	63,2±0,8	65,3±1,5
21	28,0	69,4±0,9	70,7±1,6
22	32,1		73,6±2,1

Tabela 2: Valores das transições de fase de sistemas formados por diacil fosfatidilcolinas em água. Os valores dos erros são o resultado da propagação devida ao cálculo da média dos valores encontrados nos vários artigos desse review²⁹. Ver discussão sobre erros no capítulo Materiais e Métodos.

COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE AS TRANSIÇÕES DE FASE

O trabalho de Peter Laggner & Manfred Kriechbaum³⁰ expõe alguns tópicos muito importantes de serem entendidos pelos estudiosos do comportamento das fases de sistemas de fosfolípidos. Em primeiro lugar, sobre as transições de fase, os autores discutem sobre o que chamaríamos em geral de parâmetro de ordem, ou seja, o parâmetro que muda numa transição de fase. Para chegarmos em uma resposta precisa, seria necessário conhecer a descrição dos estados antes e depois da transição no que diz respeito às diferenças na termodinâmica, dinâmica e nos parâmetros de estrutura. Entretanto, na maioria das vezes, é muito mais fácil analisar somente a estrutura ou somente a dinâmica dos sistemas do que ambas ao mesmo tempo. Os trabalhos que foram citados nesta tese consideram, tacitamente, os parâmetros de estrutura como sendo os parâmetros de ordem das transições. Não existe, todavia, uma teoria definitiva sobre o comportamento das transições de fase dos

fosfolipídeos. Como dizem os autores Laggner & Kriechbaum muitos dos conceitos teóricos sobre transições que foram publicados até então na área de física do estado sólido não se encontravam adequados aos sistemas de fosfolipídeos onde um número muito grande de moléculas estão envolvidas de maneira cooperativa em um núcleo estável de uma determinada fase. Para eles, a teoria estrutural das dinâmicas de transição de fase está ainda na sua infância e o progresso dela depende de um montante suficiente de resultados experimentais. Em sistemas diacil-PC, a *transição principal*, entre a fase $P\beta'$ e a fase $L\alpha$, foi extensivamente estudada ao longo dos últimos 50 anos, entretanto, os componentes rápidos destas transições envolvendo isomerização local das cadeias acílicas e a formação de kinks, de maneira alguma foi detalhada similarmente. Outros aspectos menos observados foram a ordem lateral dos planos das membranas, a reversibilidade das transições e a subentendida classificação de transição de primeira ordem para os sistemas de fosfolipídeos. Dois outros artigos citados no trabalho de Laggner & Kriechbaum poderiam ser tomados como referência adicional. São eles Chan & Webb³¹ e Biltonen³².

* * *

CAPÍTULO I**ASPECTOS BIOLÓGICOS – Conhecendo o Sistema e os Parâmetros de Interesse**

CAPÍTULO II

Incorporação de Compostos na Membrana Modelo

CAPÍTULO II

INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO

CONTEÚDO DO CAPÍTULO II: ``INC. DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MOD.``

INTRODUÇÃO	27
ELIPTICINA.....	27
Aspectos Gerais	27
Mecanismo de ação da droga	28
Interação com compostos aniônicos	29
Estrutura Cristalina da ELPT	30
HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	31
Aspectos Gerais	31
Parâmetros estudados.....	32

INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta de maneira geral os dois tipos de compostos cuja incorporação na membrana modelo é estudada: (1) a Elipticina, um agente anticancerígeno e (2) alguns Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos de uma série homóloga que apresenta variado grau de atividade carcinogênica. O objetivo do estudo foi basicamente caracterizar a incorporação de compostos que apresentam baixa solubilidade em água nas regiões hidrofóbicas da membrana modelo. Os dois tópicos têm sido bastante estudados do ponto de vista da física e bioquímica aplicadas à medicina. A mudança na permeabilidade da membrana tem se mostrado como fator determinante na ação dos dois tipos de agentes.

ELIPTICINA

Aspectos Gerais

A Elipticina é um alcalóide originalmente extraído da planta *Ochrosia elliptica* nativa da Austrália e algumas ilhas do Pacífico. Este composto foi isolado pela primeira vez em 1959 mas somente depois de 1967 é que suas propriedades antitumorais foram descobertas³³. A partir de 1980, vários novos derivados da elipticina e também algumas elipticinas modificadas foram sintetizados e bastante estudados.

Uma classe de compostos deste tipo desenvolvida por Honda et al³⁴ são os glicosídeos de elipticina. Muitos desses compostos apresentaram uma excelente atividade antitumoral contra tumores experimentais e humanos estudados *in vitro*. Alguns deles, que foram selecionados para estudos pré-clínicos, curaram graves processos de metástase causados por diferentes tipos de leucemias, carcinomas, melanomas e sarcomas³⁵.

Mais recentemente, outros estudos revelaram suas propriedades de atividade antiproliferativa contra o vírus HIV₁^{36,37}. A manutenção do vírus na sua forma latente (ação virostática) e também o mesmo com relação à células residuais de tumores malignos (ação

CAPÍTULO II

INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO

oncostática) tem sido apontado na literatura como um assunto de grande interesse na área de imunoterapia.

Mecanismo de ação da droga

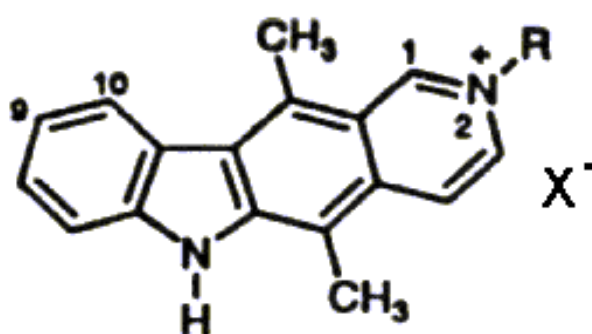


Figura 12: Esquema da estrutura molecular da Elipticina (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) $C_{17}H_{14}N_2$ - FW 246.3. Os diferentes derivados são constituídos por substituições dos radicais (R) ligados ao N da posição 2 e os glicosídeos de Elipticina são sintetizados a partir de ligações deste sítio carregado positivamente com compostos aniônicos (X^-).

A molécula de Elipticina consiste de um heterocíclico nitrogenado de caráter hidrofóbico com estrutura planar como mostra a Figura 12. Este tipo de estrutura sugere intercalação na dupla hélice do DNA como possível modo de ação anticancerígena³⁸. Substâncias hidrofóbicas tais como hidrocarbonetos, podem atravessar a membrana celular obedecendo uma lei de difusão passiva. O aumento da potência de algumas drogas pode ser promovido justamente pelo aumento da difusão através da membrana celular. Esse processo de difusão é também o que acontece com muitos compostos hidrofóbicos de ação virostática ou oncostática que atravessam a hélice do DNA e interagem fortemente com as regiões hidrofóbicas destes sistemas provocando anormalidades cromossômicas, e consequente inibição da mitose no ciclo da célula hospedeira.

O caráter hidrofóbico da elipticina, entretanto, é também o que dificulta sua administração nos organismos vivos. Alguns testes clínicos foram descontinuados pela dificuldade de veicular o fármaco até o sítio de ação desejado³⁹. Essa dificuldade foi

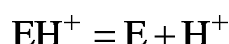
CAPÍTULO II

INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO

atribuída ao fato da droga ser fracamente solúvel em meio aquoso. Para contornar este fato, duas alternativas foram apresentadas pela literatura: (1) a utilização dos glicosídeos de Elipticinas, que são moléculas dipolares mais solúveis que os compostos mãe e (2) a incorporação da Elipticina ou mesmo dos seus derivados nas regiões hidrofóbicas das vesículas de lipídeo, que tornou-se, neste caso, um importante mecanismo de transporte do fármaco até o sítio de ação da droga. Esta última alternativa apresenta, como vimos anteriormente, soluções também para outros aspectos da administração da droga, como redução da toxicidade, mecanismos de liberação controlada e seletividade do alvo entre outros.

Interação com compostos aniônicos

A Elipticina pode se apresentar na forma neutra ou na forma protonada. O Nitrogênio da posição 2 pode se apresentar carregado positivamente (forma protonada) em pH ácido. Neste caso, alguns compostos aniônicos podem interagir eletrostaticamente com a forma protonada da droga. Alguns estudos mostraram que membranas sintetizadas com lipídeos aniônicos favorecem à incorporação da droga⁴⁰. Considerando a equação que indica a reação de dissociação da ELPT (E) como segue:



onde [E] é a concentração de ELPT neutra e [EH⁺], a concentração de ELPT protonada. Quando adicionando um lipídeo aniônico que interage com EH⁺, a reação se desloca para a esquerda para que o equilíbrio seja restaurado e a constante de equilíbrio K' seja satisfeita:

$$K' = \frac{[E][H^+]}{[EH^+]}$$

Satisfazer a constante de equilíbrio, neste caso, significa também diminuir a [H⁺], ou seja, aumentar o pH. É comum definirmos um pK aparente da droga, ou seja, o pH em água onde existe 50% de cada uma das formas. Isso significaria que [E]=[EH⁺]. Voltando à equação da constante de equilíbrio, podemos determinar o pK aparente da droga = -logK':

$$K' = \frac{[E][H^+]}{[EH^+]}$$

$$-\log K' = -\log \frac{[E]}{[EH^+]} - \log [H^+]$$

$$pK' = -\log \frac{[E]}{[EH^+]} + pH$$

$$pH = pK' + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

(equação de Henderson-Hasselbach⁴¹)

onde $\alpha = [E]/[C]$, $[E]$ é a concentração de ELPT neutra e $[EH^+]$, a concentração de ELPT protonada e $[C] = [E] + [EH^+]$, é a concentração total de ELPT. Segundo os trabalhos de Terce e colaboradores⁴², o pK aparente da elipticina na presença de DPPC é 7,2 enquanto que na presença de DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) um lipídeo aniônico, é 8,5. Isto indica que a carga líquida da membrana também é assunto de interesse na caracterização da incorporação da droga.

Estrutura Cristalina da ELPT

A Elipticina cristaliza-se em meio aquoso no sistema monoclinico com os parâmetros descritos na Tabela 3⁴³.

Elipticina (C ₁₇ H ₁₄ N ₂)				
Reflexões principais				Outros parâmetros
#	d(Å)	I _{relativa}	hkl	Densidade = 1.29g/cm ³
1	11.10	50	011	Z=4
4	7.79	20	020	

CAPÍTULO II

INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO

5	7.10	100	012	a=5.105Å
6	5.61	50	022	b=15.588Å
8	4.80	20	-110	c=16.161Å
13	3.61	65	-131	$\beta=97.03^\circ$

Tabela 3: Dados cristalográficos da fase cristalina da Elipticina: espaçamento interplanar (d), intensidade relativa (I), índices de Miller (hkl), densidade, número de átomos por cela unitária (Z), parâmetros de rede (a, b, c, β).

Sabendo que a elipticina na forma coloidal prefere as regiões hidrofóbicas dos sistemas anfifílicos e que em meio aquoso encontra-se na fase cristalina, podemos monitorar a fase cristalina através da difração de raios X para estudar a incorporação da droga em membranas modelo. Os resultados de monitoramento da fase cristalina são mostrados no capítulo de análise dos dados e foram úteis para determinar a concentração crítica de incorporação da droga em membranas modelo de DPPC.

HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Aspectos Gerais

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's) são uma classe de moléculas muito interessante no contexto da carcinogênese. Dentre os fatores que podem estar associados à indução do câncer, os componentes químicos são indicados como os mais importantes. Estudos feitos para caracterizar as mais de 4000 substâncias ativas encontradas na fumaça do cigarro de tabaco, sugerem fortemente uma relação entre algumas dessas substâncias, dentre elas os HAP's, e graves tipos de doenças oculares⁴⁴. Vários tipos de HAP's são utilizados para induzir tumores em cobaias com a finalidade de caracterizar os processos de metástase mais comuns^{45,46,47}. O estudo da atividade carcinogênica induzida por HAP's teve seu início a partir de 1930 com o trabalho de Cook et al⁴⁸ que sugere uma relação entre o grau de atividade carcinogênica e a estrutura molecular dos HAP's. Desde

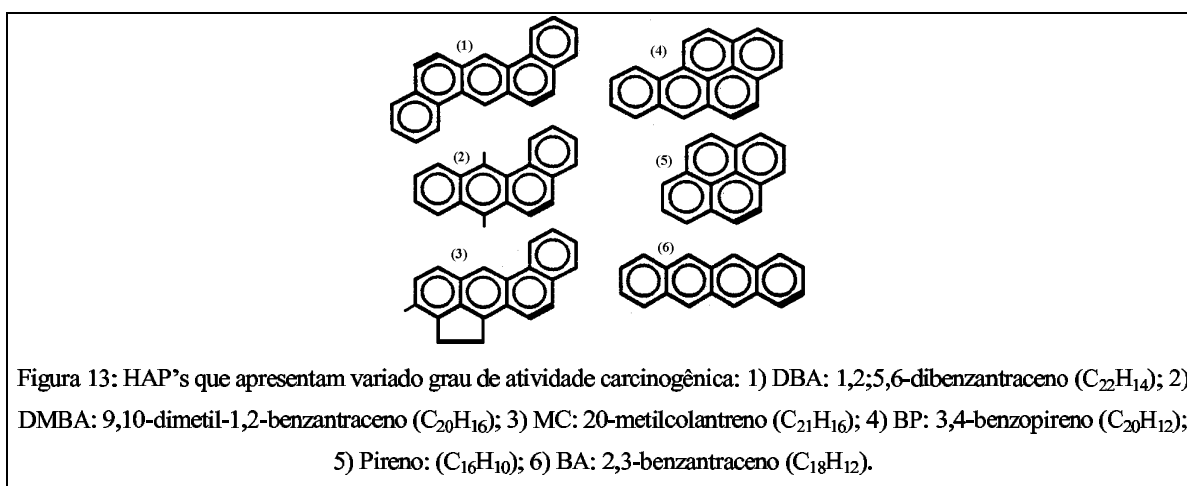
CAPÍTULO II

INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO

então, muitos mecanismos de ação foram propostos para explicar a atividade carcinogênica desta classe de moléculas⁴⁹. Entretanto o problema ainda permanece aberto.

Parâmetros estudados

Muitos trabalhos citados na literatura estudaram HAP's com técnicas variadas tentando correlacionar a atividade carcinogênica destes compostos a outros parâmetros importantes, tais como, a solubilidade, ou a estrutura eletrônica. A permeabilidade destes compostos através da membrana celular pode constituir uma das características da potência carcinogênica. Neste trabalho apresentamos um estudo sobre possíveis alterações na cinética de transição de fase termotrópica de membranas modelo de DPPC em função da incorporação de alguns PAH's de uma série homóloga que apresenta variado grau de atividade carcinogênica. A estrutura dos compostos utilizados neste trabalho é mostrada na Figura 13.



Dentre os índices de atividade carcinogênica conhecidos, citamos o índice IBALL⁵⁰ que é definido como sendo a porcentagem de câncer de pele, desenvolvido em ratos, dividido pelo período latente em dias, por animal afetado, multiplicado por 100. O índice IBALL é conhecido para 26 HAP's dos quais quatro foram assunto de estudo deste trabalho.

CAPÍTULO II

INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO

A solubilidade de 31 HAP's foi estudada por Davis et al⁵¹ na tentativa de correlacionar esta grandeza com a atividade carcinogênica. A solubilidade do composto é uma medida do seu grau de hidrofília e, portanto, é considerada como um parâmetro importante para prever a ordem da estrutura lamelar dos sistemas lipídeo/água/HAP estudados e a possível localização dos HAP's na membrana lipídica.

A interação de uma série homóloga de HAP's com a membrana lipídica de DPPC foi caracterizada por ESR (Electron Spin Resonance) no trabalho de Sanioto & Schreier⁵². Neste trabalho, os autores buscam correlacionar a anisotropia do espectro de ESR da sonda CSL⁵³ adicionada em membranas lipídicas ao tamanho do HAP estudado bem como a sua atividade carcinogênica. Os resultados obtidos mostram que quanto maior o tamanho da molécula incorporada, maior é o grau de anisotropia sugerindo que os HAP's causariam uma diminuição na interação fosfolipídeo-fosfolipídeo. Estes resultados foram também considerados no presente estudo.

* * *

CAPÍTULO II**INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS NA MEMBRANA MODELO**

CAPÍTULO III

Métodos e Técnicas

Experimentais de Análise

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

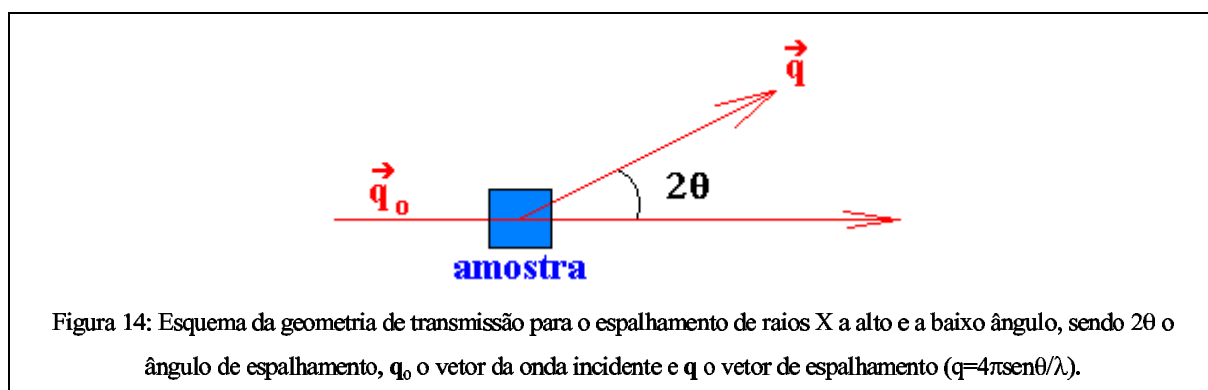
CONTEÚDO DO CAPÍTULO III: ``MÉT. & TÉC. EXP. DE ANÁLISE``

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL - ASPECTOS GERAIS.....	37
ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	37
Elementos da Teoria de SAXS	39
<i>Micelas esféricas.....</i>	<i>40</i>
<i>Vesículas e placas lamelares.....</i>	<i>42</i>
DIFRAÇÃO DE RAIOS X	44
Elementos da Teoria de DRX.....	45
Informações Fornecidas pelos Experimentos	48
<i>Distâncias de Repetição e Tamanho dos Domínios Cristalinos</i>	<i>48</i>
<i>Estruturas Lamelares</i>	<i>49</i>
<i>Perfil de Densidade Eletrônica das Estruturas Lamelares.....</i>	<i>49</i>
DSC (Differential Scanning Calorimetry)	50
Associação entre DSC, SAXS e WAXS.....	50
Cryo-TEM (Cryofracture Transmission Electron Microscopy)	51

* * *

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL - ASPECTOS GERAIS

As fases lamelares dos sistemas lipídeo/água são caracterizadas através da determinação de alguns parâmetros tais como o tamanho do agregado, periodicidade da estrutura lamelar, incorporação e localização de outras moléculas ou grupos moleculares. As dimensões características destes sistemas estão todas dentro do intervalo de alguns Angstroms (a ordem do comprimento de onda dos raios X) até algumas centenas de Angstroms. Uma das técnicas mais adequadas para este estudo estrutural é o espalhamento de raios X a alto e a baixo ângulo. Todo processo de espalhamento é caracterizado pela lei de reciprocidade que fornece uma relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento 2θ (Ver Figura 14). Os termos *alto* e *baixo ângulo* referem-se, portanto, à caracterização das estruturas com dimensões da ordem de alguns Angstroms e de algumas centenas de Angstroms respectivamente.



Outras técnicas usualmente empregadas na caracterização dos sistemas lipídeo/água são a microscopia eletrônica para avaliar parâmetros de forma e a calorimetria diferencial de varredura na caracterização das transições de fase termotrópicas.

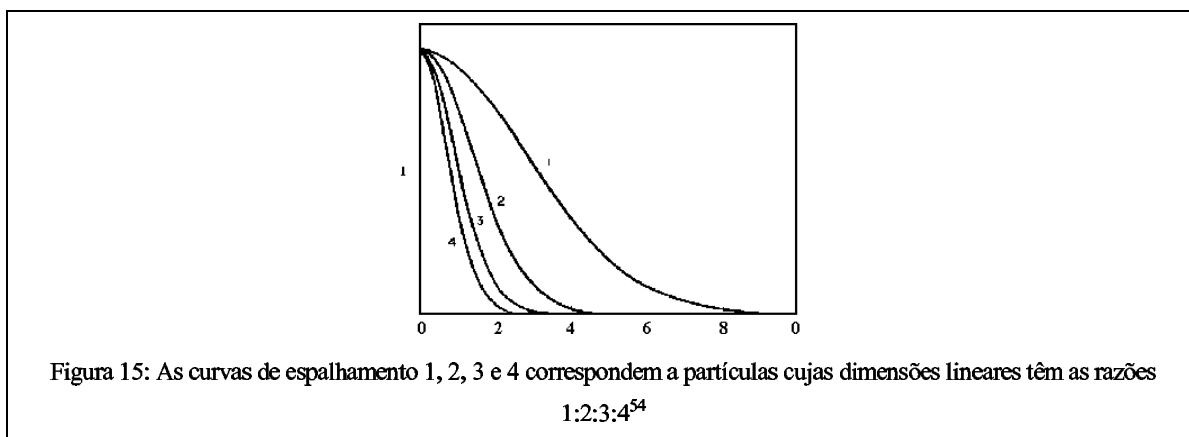
ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXO ÂNGULO (SAXS*)

* Small Angle X Ray Scattering

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

O espalhamento de raios X a baixo ângulo é um processo de espalhamento elástico que ocorre quando o feixe de raios X atravessa a amostra e interage com os elétrons do material. A radiação reemitida pelos elétrons de cada átomo é espalhada isotropicamente e as ondas espalhadas interferem umas com as outras se cancelando totalmente em algumas direções. A curva de espalhamento em função do ângulo tem um máximo em zero, onde todas as ondas estão exatamente em fase, e decresce suavemente à medida que o ângulo aumenta como mostra a Figura 15.



Supondo que os centros espalhadores estão no vácuo, a amplitude de espalhamento é proporcional ao número de moles de elétrons por unidade de volume, ou seja, à densidade eletrônica. Se os centros espalhadores estão imersos em outro meio, apenas a diferença de densidade eletrônica será relevante no espalhamento de raios X. Neste caso, os centros espalhadores são vistos como inomogeneidades, ou seja, flutuações na densidade eletrônica da amostra. A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo fornece informações estruturais sobre inomogeneidades de densidade eletrônica com dimensões características de dez a algumas centenas de Ångström. Exemplos de tais inomogeneidades são poros de um sólido, nanocristais de uma matriz amorfa, micelas e vesículas em solução. No caso de partículas em suspensão em um solvente, o espalhamento surge do contraste de densidade eletrônica entre a partícula e o solvente. Este contraste pode ser muito fraco para alguns sistemas como, por exemplo, as soluções aquosas de macromoléculas biológicas, sendo

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

essas essencialmente compostas de átomos leves, tais como H, C, N, O e P. A utilização da radiação síncrotron para os experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo torna possível registrar esses casos de contraste fraco com maior eficiência devido ao alto fluxo do feixe que incide sobre a amostra.

Elementos da Teoria de SAXS

A amplitude $A(\mathbf{q})$ de uma onda espalhada elasticamente na direção do vetor de espalhamento $\mathbf{q}$ por um átomo localizado na posição $\mathbf{r}$ pode ser expressa por*:

$$A(\vec{q}) = \rho(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}$$

sendo $\rho(r)$ a densidade eletrônica média do sistema.

A amplitude total espalhada $F(\mathbf{q})$ na direção do vetor $\mathbf{q}$ é a integração das ondas espalhadas por todos os átomos da amostra. Então,

$$F(\vec{q}) = \int \rho(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r}$$

ou seja, a amplitude total espalhada, ou o fator de forma, $F(\mathbf{q})$, é a transformada de Fourier da distribuição eletrônica da amostra. Na prática, os experimentos de SAXS nos fornecem a intensidade da onda, ou seja, o módulo ao quadrado de $F(\mathbf{q})$:

$$I(\vec{q}) = |F(\vec{q})|^2 = FF^*$$

$$I(\vec{q}) = \int \rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)e^{-i\vec{q}\cdot(\vec{r}_1-\vec{r}_2)} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2$$

Introduzindo a função $\Delta\rho^2(\mathbf{r})$ como sendo a seguinte integral de convolução

$\Delta\rho^2(\mathbf{r}) = \int \rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_1 - \vec{r})d\vec{r}_1$, transformamos a expressão acima em:

$$I(\vec{q}) = \int \Delta\rho^2(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r}$$

E calculando a média do fator de fase para um sistema com simetria esférica, temos:

*A expressão que relaciona o vetor $\mathbf{q}$, o ângulo de espalhamento 2θ e o comprimento de onda λ incidente é:
 $q=|\mathbf{q}|=(4\pi/\lambda)\sin\theta$

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

$$I(q) = \int 4\pi r^2 \Delta \bar{\rho}^2(r) \frac{\sin qr}{qr} dr$$

que pode ser escrito como:

$$I(q) = \int 4\pi p(r) \frac{\sin qr}{qr} dr$$

sendo $p(r) = r^2 \Delta \bar{\rho}^2(r)$ a função de autocorrelação ou PDDF (pair distance distribution function) que expressa a probabilidade de encontrar um par de elétrons separados pela distância r .

Quando introduzimos a integral de convolução, $\Delta \bar{\rho}^2(r)$, estamos embutindo no cálculo uma *diferença* de densidade eletrônica que expressa exatamente o significado de *inhomogeneidades* comentado anteriormente. O espalhamento vai ser mais intenso quanto maior for o contraste entre as inhomogeneidades e o meio.

O tratamento dos dados de SAXS consiste, então, em determinar $p(r)$ a partir da transformada de Fourier da intensidade $I(q)$ medida e, através da deconvolução de $\Delta \bar{\rho}^2(r)$, inferir sobre a distribuição de densidade eletrônica do sistema. Programas de computação com rotinas numéricas especiais como a transformação de Fourier indireta (ITP) e a técnica de convolução da raiz quadrada (DECON)⁵⁵ são normalmente utilizados para este propósito.

Micelas esféricas

Para sistemas monodispersos, tais como micelas em solução, é possível determinar o tamanho dos centros espalhadores diretamente através da intensidade $I(q)$ medida. Para tanto utilizamos a aproximação de Guinier⁵⁶ para regiões do espectro a mais baixo ângulo ($q \sim 0.01 \text{ \AA}^{-1}$),

$$I(\vec{q}) \propto e^{-q^2 R_g^2 / 3}$$

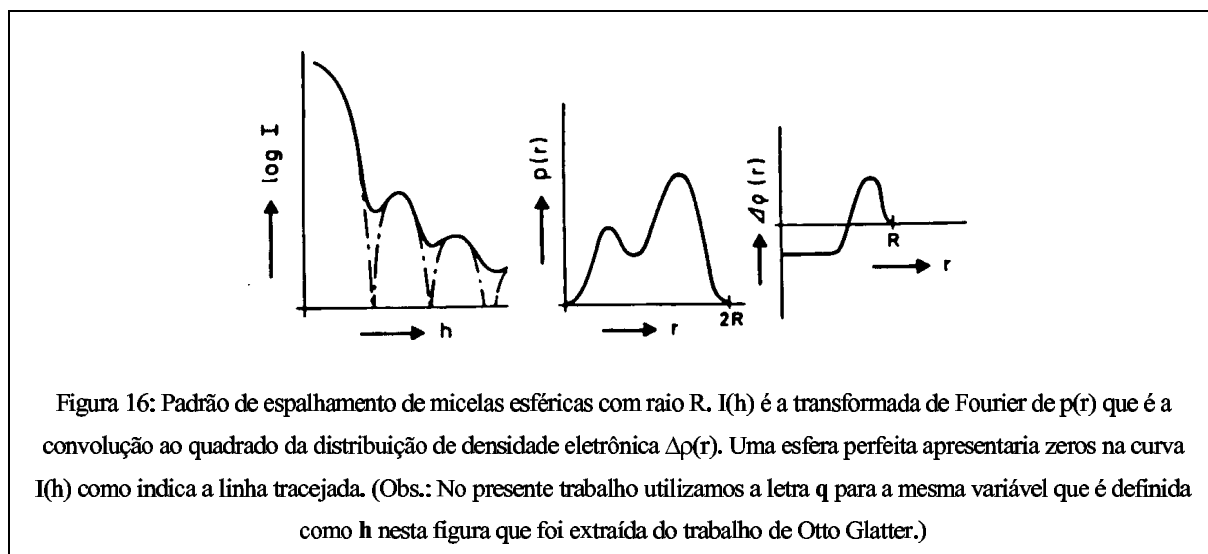
CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

a partir da qual é possível determinar o raio de giro, R_g , das partículas, ou seja, a raiz quadrática média das distâncias de todos os elétrons em relação ao seu centro de gravidade. Em primeira aproximação, podemos supor simetria esférica para as micelas. Neste caso, a relação entre o raio de giro e o raio da partícula é expresso da seguinte forma:

$$R_g^2 = \frac{3}{5} r^2$$

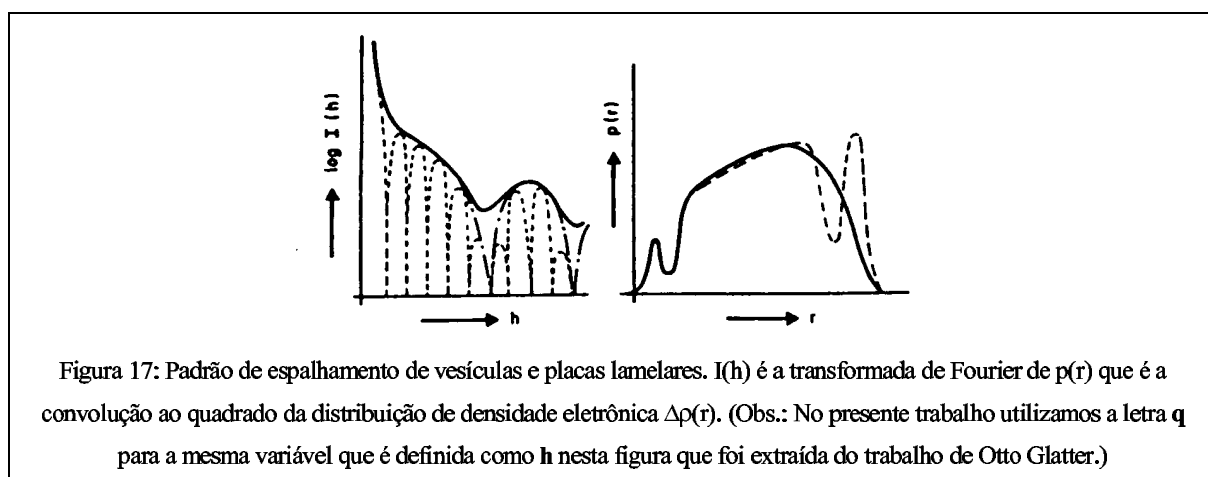
A curva de espalhamento de tal micela esférica se constitui de uma série de máximos como esquematizado na Figura 16. A figura indica não exatamente uma curva teórica, mas uma tendência geral como mostrado no trabalho de Otto Glatter⁵⁷ sobre sistemas anfifílicos.



Em sistemas reais, a condição esférica nunca é perfeitamente cumprida. Isso se reflete nos pontos de mínimo da curva $I(q)$ que deveriam ser zeros na condição ideal. Notamos que $\Delta\rho(r)=0$ para $r>R$, limite da partícula, e $p(r)=0$ para $r>2R$, separação entre duas partículas.

Vesículas e placas lamelares

A função de espalhamento $I(q)$ e a distribuição $p(r)$ para vesículas e placas lamelares é mostrada na Figura 17. Um sistema monodisperso de vesículas apresentaria alta frequência de oscilações, como indica a linha tracejada na curva $I(q)$. A frequência de oscilações estaria associada ao raio da vesícula. A linha envelope das oscilações, mostrada na figura com ponto e traço, indica um sistema ideal de placas lamelares apresentando zeros na curva $I(h)$.



A partir dos resultados do espalhamento de sistemas não ideais, foi observado que são muito sutis as diferenças entre as curvas de espalhamento devidas a partículas cilíndricas e a placas lamelares ou vesículas. Neste caso, utilizamos a ‘aproximação de Guinier para o espalhamento devido à espessura t ’. Para um sistema de vesículas unilamelares, supomos que a função $\Delta\rho_t(r)$ depende somente da distância x do plano central das lamelas. Dessa forma, utilizamos a seguinte expressão da distribuição de espessura,

$$p_t(x) = \Delta\bar{\rho}_t^2(x)$$

que está relacionada à intensidade espalhada devido à distribuição de espessura $I_t(q)$:

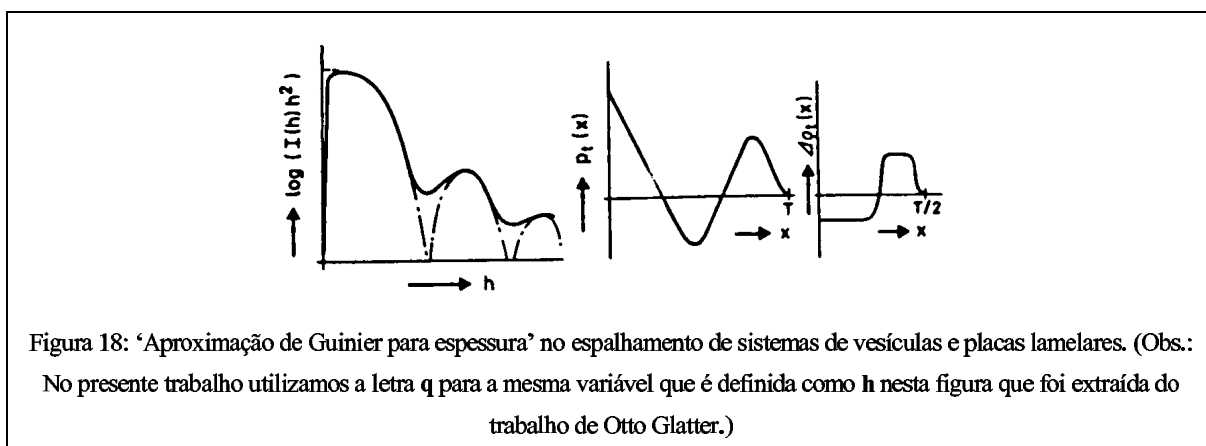
CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

$$I(q)q^2 = \text{cte } I_t(q)$$

$$= 2 \int_0^{\infty} p_t(x) \cos(qx) dx$$

A Figura 18 mostra o gráfico da função $I(q)q^2 \times q$ que é usualmente chamado de ‘*thickness Guinier plot*’, para sistemas de vesículas e placas lamelares. Através desta aproximação, é possível determinar as funções $p_t(x)$ e $\Delta\rho_t(x)$ aproveitando os programas de computação mencionados anteriormente. A determinação da distribuição $\Delta\rho_t(x)$ dá informação da estrutura interna das lamelas bastante relevante para os estudos de membrana.



Nem sempre as dimensões médias dos sistemas de partículas lamelares estão dentro do domínio dos experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo. Em caso de vesículas muito grandes, os mesmos parâmetros poderiam ser estimados por experimentos de espalhamento de luz visível. Para as LUV’s (vesículas unilamelares), podemos utilizar a ‘aproximação de Guinier para a espessura’. Entretanto, para vesículas multilamelares (LMLV’s), não podemos fazer a mesma aproximação devido à estrutura periódica intrínseca do sistema. Na literatura encontramos alguns trabalhos que propuseram aproximações mais adequadas para o estudo de LMLV’s^{58,59,60,61}. A caracterização da estrutura periódica das lamelas que compõem as vesículas multilamelares é feita

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

normalmente através da difração de raios X a baixo ângulo e as dimensões destes sistemas podem ser estimadas através da microscopia eletrônica de criofratura ou ainda através da determinação do raio de giro pelo espalhamento de luz visível.

DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Materiais que apresentam ordenamento a nível atômico com unidades de repetição da ordem de alguns Angstroms, apresentam um padrão de difração de raios X (DRX). A base dos fenômenos de interferência e difração está na **periodicidade** do ordenamento dos sistemas. Mas para que o fenômeno de interferência e difração seja observado, as dimensões do ordenamento devem ser da ordem do comprimento de onda incidente. A Figura 19 mostra uma estrutura ordenada com períodos iguais a d , e um feixe de radiação de comprimento de onda λ que incide sobre a estrutura em uma direção que forma um ângulo θ com os planos do ordenamento. Neste caso, haverá interferência construtiva de duas ou mais frentes de onda que tenham a mesma fase, se todos os parâmetros satisfazem a condição de Bragg, $h\lambda = 2d\sin\theta$, com $h=1,2,3...$

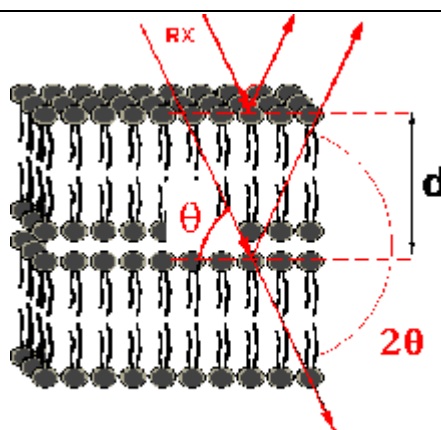


Figura 19: Esquema de uma estrutura lamelar com distância de repetição igual a d . θ é o ângulo de incidência e 2θ é o ângulo de espalhamento.

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

Para os sistemas de vesículas multilamelares ou sistemas de multicamadas com espaçamento interlamelar da ordem de 60Å, observamos a primeira ordem de difração ($n=1$) em torno de $2\theta=1.5^\circ$ quando trabalhamos com a radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda=1.54\text{\AA}$).

A matriz dos grupos metilenos das cadeias hidrocarbonadas também se constitui em uma estrutura ordenada dentro dos sistemas de vesículas. O espaçamento entre as cadeias hidrocarbonadas, menor do que o espaçamento interlamelar, é da ordem de 5Å. Nas mesmas condições anteriores, a primeira ordem de difração das cadeias hidrocarbonadas só é observada em torno de $2\theta=22^\circ$, que não é mais considerado baixo ângulo. A literatura denomina WAXS (Wide Angle X ray Scattering) os experimentos de difração de raios X a altos ângulos nos quais existe geometria de transmissão (condições de medida de algumas amostras deste trabalho).

Elementos da Teoria de DRX

A informação dos experimentos de difração de raios X a baixo ângulo também é tratada com base nos métodos usados normalmente na determinação de estruturas cristalinas⁶². O fator de espalhamento atômico f_j , é descrito como a eficiência de espalhamento de cada átomo, em uma determinada direção, devido ao espalhamento elástico (Thomson) de todos os seus elétrons. Sendo $\rho(r)$ a densidade eletrônica do material, expressamos f_j da seguinte maneira:

$$f_j(\vec{q}) = \int 4\pi r^2 \rho(r) \frac{\sin qr}{qr} dr.$$

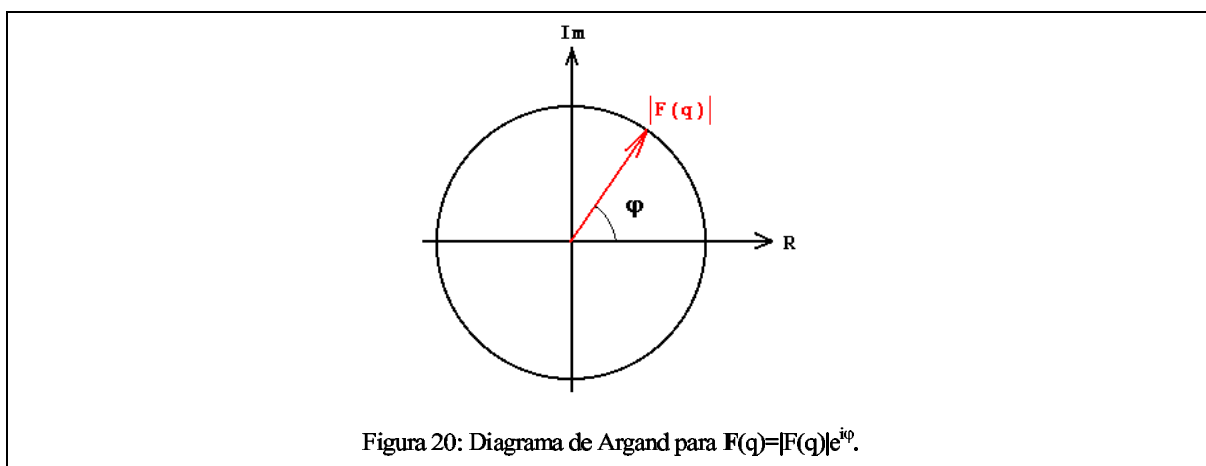
Para o caso de materiais com ordenamento periódico, o fator de estrutura $F(q)$ é o resultado da interferência de todas as ondas espalhadas pelos átomos da unidade de repetição e depende da diferença de fase entre elas, do fator de espalhamento, f_j , e das coordenadas de cada átomo dentro da cela unitária, conforme a expressão abaixo:

$$F(\vec{q}) = \sum_j f_j(\vec{q}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_j}$$

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

O resultado do experimento, ou seja, a curva da intensidade I do feixe difratado, é proporcional ao quadrado do módulo da amplitude da onda espalhada, $I \propto |F(q)|^2$, e, portanto, a informação da fase φ da onda é perdida. A Figura 20 mostra o diagrama de fase para $F(q)=|F(q)|e^{i\varphi}$.



A determinação da fase associada ao Fator de Estrutura é o que se constitui o chamado *Problema da Fase*. Muitas técnicas são utilizadas para solucionar o problema da fase. Análises químicas ou bioquímicas podem determinar se uma cela unitária do arranjo da amostra é composta por alguma região de densidade eletrônica constante, como uma cadeia hidrocarbonada $-(CH_2)_n-$ de um ácido graxo ou de alguma região com alta densidade eletrônica. Essas informações permitem, por exemplo, determinar se um sistema possui uma estrutura centro-simétrica.

Se uma estrutura é centro-simétrica, então, para cada átomo localizado em (x_j, y_j, z_j) , existe um átomo idêntico em $(-x_j, -y_j, -z_j)$ e, portanto, $F(q)$ é real:

$$F(q) = F_{hkl} = \sum_j^N f_j \exp(2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j))$$

$$F(q) = F_{hkl} = 2 \sum_j^{N/2} f_j \cos(2\pi(hx_j + ky_j + lz_j))$$

CAPÍTULO III

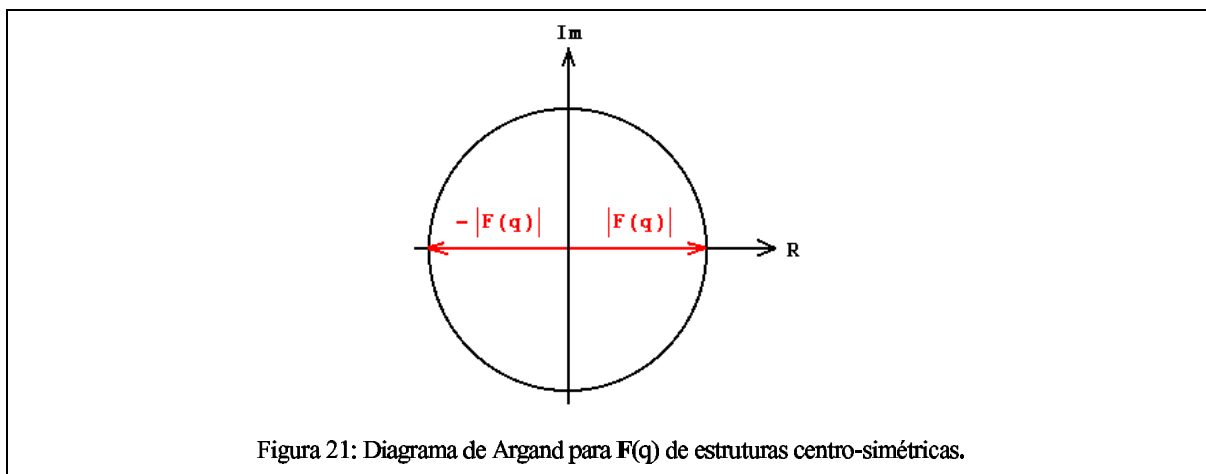
MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

e, para o caso unidimensional da estrutura lamelar das membranas, temos:

$$F(q) = F_{00l} = 2 \sum_j^{N/2} f_j \cos(2\pi(lz_j))$$

$$F(q) = |F(q)| e^{i\varphi}, \text{ com } \varphi = 0 \text{ ou } \pi.$$

Sendo a função $F(q)$ real, aquele problema de muitas possibilidades foi reduzido a um problema de somente duas possibilidades para cada reflexão, como vemos no diagrama de Argand da Figura 21. Ainda assim, ficamos com um conjunto de 2^n possibilidades (n , o número de reflexões). Este conjunto pode ser usado para calcular perfis de densidade eletrônica tentativos que poderão ser comparados com o perfil esperado a partir da composição química das lamelas. Além deste método de tentativa e erro, existe, dentre outros, um método que é baseado na variação do fator de estrutura com o inchamento da membrana (swelling method)⁶³.



Encontradas as fases, através de algum dos métodos disponíveis, recuperamos a função $F(q)$, módulo e fase, a partir das intensidades das ordens de difração ($n=1,2,3\dots$) e a aplicação do teorema da amostragem^{64,65}, desenvolvido por Shannon. O teorema afirma que:

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

Se uma função $d(x)$ é nula fora do intervalo $|x| \leq d/2$, então a sua transformada de Fourier $F(q)$ pode ser determinada de maneira contínua através dos valores discretos, módulo e fase, que ela assume nos pontos de uma determinada amostragem.

A análise de Shannon indica ainda que existe uma e somente uma função $F(q)$ que contém os pontos da amostragem e cuja transformada de Fourier, $d(x)$ é limitada ao intervalo $|x| \leq d/2$. Os pontos da amostragem são as intensidades das várias ordens de difração, $(|F(q)|)$ com os respectivos sinais das fases (1 ou -1 já que as fases de sistemas centro-simétricos seriam $\varphi = 0$ ou π). Como os espaçamentos da estrutura lamelar das vesículas são grandes (30 a 50 Å), é possível observar várias ordens de difração em um mesmo espectro. Quanto mais ordens observadas, maior precisão é alcançada na reconstrução da função densidade eletrônica.

Definida a amostragem, o caminho usual da reconstrução da função $F(q)$ é utilizar uma soma de funções sinc ponderadas pelos valores daquele conjunto. E, por fim, a transformada de Fourier da função $F(q)$ determina o perfil de densidade eletrônica do sistema estudado.

Informações Fornecidas pelos Experimentos

Os resultados de difração de raios X dos experimentos fornecem principalmente quatro tipos de informação sobre os sistemas estudados: 1) as distâncias de repetição, ou parâmetros de rede, dos materiais ordenados, 2) o tamanho dos domínios cristalinos, 3) a presença de estruturas lamelares e 4) o perfil de densidade eletrônica na direção perpendicular aos planos lamelares.

Distâncias de Repetição e Tamanho dos Domínios Cristalinos

Esses dois primeiros itens são determinados de forma direta a partir do perfil de intensidade medido. A posição do pico, ou seja, o valor de 2θ colocado na lei de Bragg, permite determinar os valores das distâncias de repetição da estrutura lamelar das vesículas

multilamelares ou das multicamadas depositadas, o valor do espaçamento entre as cadeias hidrocarbonadas e também os parâmetros de rede de compostos cristalinos incorporados aos sistemas de vesículas em solução. Para determinar o tamanho t dos domínios cristalinos de tais compostos, podemos utilizar a aproximação de Scherrer⁶⁶ que relaciona a largura do pico (B) ao tamanho do domínio cristalino na direção θ da reflexão estudada.

$$t = \frac{0.9\lambda}{B \cos \theta_B}$$

Essas informações são importantes para caracterizar as diferentes fases existentes no material bem como as suas transições. O ordenamento entre as cadeias acílicas é fundamental para a estabilidade da estrutura. O reconhecimento de variações nessa estrutura é bastante importante para detectar o momento em que uma mudança de fase ocorre, ou seja, as distâncias entre as cadeias apresentam variações e o pico de difração sofre deslocamentos. No caso das fases cristalinas formadas no sistema, é possível acompanhar a nucleação e o crescimento de tais domínios.

Estruturas Lamelares

É possível obter a terceira informação, ou seja, verificar a existência de estruturas lamelares, através da observação dos picos de difração a baixo ângulo. A presença ou não destes picos é um importante parâmetro que caracteriza, por exemplo, os sistemas mistos micelas-vesículas por atuar como indicador do surgimento de vesículas multilamelares formadas nos sistemas em solução. A posição do pico determina ainda, o espaçamento entre as camadas com precisão de centésimos de Angstroms.

Perfil de Densidade Eletrônica das Estruturas Lamelares

As multicamadas de lipídeos depositadas sobre substrato de vidro têm espaçamentos da ordem de algumas dezenas de Angstroms, portanto podemos observar algumas ordens de difração de raios X a baixo ângulo. As multicamadas depositadas são um importante modelo de estudo sobre as interações das moléculas anfifílicas com outros compostos e a sua localização dentro da estrutura lamelar. A incorporação de compostos nas membranas

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

alteram o perfil de densidade eletrônica da cela unitária que pode ser caracterizado através da transformada de Fourier da amplitude espalhada $F(\mathbf{q})$ reconstruída através do teorema da amostragem mencionado anteriormente.

DSC (Differential Scanning Calorimetry)

Nos processos de aquecimento ou resfriamento das substâncias, podem ocorrer transições de fase termotrópicas. Durante a transição, a temperatura permanece constante e a energia é absorvida para a separação das moléculas, vibração, etc, ou, no sentido inverso, liberada pelo reagrupamento. Uma maneira de estudar esses processos é monitorar o valor da temperatura da amostra T_a em função do tempo e comparar com a de uma referência inerte T_r submetida à mesma taxa de aquecimento ou resfriamento. Na região de transição de fase da amostra ocorrerá uma diferença entre as temperaturas T_a e T_r . Integrando esse resultado é possível obter o valor do calor absorvido ou liberado na transição. A diferença entre os resultados da amostra e da referência determina de forma bastante precisa a temperatura e a entalpia de transição.

Como foi mencionado anteriormente, as temperaturas de transição de fase das membranas de lipídeos são alteradas sob influência de parâmetros tais como o tamanho e o grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas, a natureza do grupo polar, a hidratação da bicamada e ainda a presença de colesterol ou outros compostos misturados à membrana. A técnica de DSC mede o calor de entalpia e as temperaturas das transições permitindo uma caracterização rigorosa do sistema estudado, bem como uma inferência cuidadosa das influências por ele sofridas, complementando a análise estrutural obtida por meio de outras técnicas.

Associação entre DSC, SAXS e WAXS.

Uma nova técnica que permite obter resultados simultâneos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS - Small Angle X Ray Scattering) e a alto ângulo (WAXS - Wide Angle X Ray Scattering) com resolução temporal em função da temperatura

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

juntamente com microcalorimetria diferencial de varredura (DSC – Differential Scanning Calorimetry) de alta sensibilidade, foi desenvolvida em um mesmo aparato relatado no trabalho de Keller et al⁶⁷. As três técnicas podem ser realizadas dentro do intervalo de 0,01 e 10°C/min com uma resolução de 0.01°C no intervalo de temperatura de 30 a 130°C e, a mais baixas taxas de resfriamento e mesma taxa de aquecimento, de –30 a +30°C. A utilização de uma única amostra encerrada em um fino capilar de vidro, com bem pouco volume (1 a 2 µl) para as medidas com as três técnicas e simultânea aquisição de dados evita que aconteça qualquer variação de temperatura entre os resultados e também qualquer possível diferença relativa ao histórico térmico das amostras.

A célula do calorímetro é simétrica para garantir o resultado diferencial. A utilização simultânea de dois detetores lineares permite observar os resultados de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e a alto ângulo (WAXS) juntamente com a microcalorimetria (DSC) para uma mesma amostra. Este aparato está disponível tanto na linha D22 (alta resolução) quanto na linha D24 (alto fluxo) de SAXS do DCI no laboratório síncrotron de Orsay na França (LURE). A alta intensidade da radiação síncrotron permite que os experimentos com SAXS e WAXS sejam realizados com as mesmas taxas de varredura em temperatura normalmente utilizadas para as medidas de DSC sem prejuízo do monitoramento das transições de fase rápidas. A automatização dos experimentos é feita através de um software originalmente escrito em Visual Basic para Microsoft Windows. Os dados são visualizados em tempo real em duas janelas separadamente.

Cryo-TEM (Cryofracture Transmission Electron Microscopy)

As imagens de microscopia eletrônica das membranas artificiais são bastante úteis para a caracterização das fases, principalmente nas regiões do diagrama de transições de fases onde várias estruturas coexistem e os sistemas são polidispersos⁶⁸. A microscopia eletrônica de criofratura permite identificar diferentes estruturas existentes nos sistemas tais como poros nas vesículas e placas lamelares. O método permite ainda monitorar a formação

CAPÍTULO III

MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

de vesículas multilamelares, bem como acompanhar o processo de transformação vesícula – micela a partir dos sistemas mistos de lipídeos e surfactantes⁶⁹.

A observação dos sistemas biológicos pela microscopia eletrônica só se torna possível através de uma rigorosa preparação das amostras para que as regiões aquosas possam ser preservadas na coluna de alto vácuo dos microscópios. As vantagens da técnica de criofratura estão principalmente no fato de evitar as distorções ou reações provocadas pelos procedimentos de coramento ou desidratação.

Primeiramente, as amostras são transferidas para um dispositivo de resfriamento rápido. Em seguida, a temperatura da amostra diminui ainda mais através do contato com uma placa de cobre resfriada por hélio líquido (4K) e mantida sob vácuo. O bloco congelado resultante é então fraturado e a superfície aberta pela fratura é utilizada para moldar um negativo de resina para construir a réplica de carbono/platina. O carbono funciona como substrato e a platina é utilizada como sombreamento reproduzindo fielmente as características topográficas da amostra. A réplica é então lavada, para que a resina que funcionou como negativo seja dissolvida, e posicionada na grade suporte para medidas de microscopia eletrônica de transmissão⁷⁰.

* * *

CAPÍTULO IV

Amostras e

Montagem Experimental

CAPÍTULO IV

AMOSTRAS E MONTAGEM EXPERIMENTAL

CONTEÚDO DO CAPÍTULO IV: ``AMOSTRAS E MONTAGEM EXP``

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	55
Materiais	55
Roteiro de Preparação	56
<i>Etapas básicas:</i>	<i>58</i>
<i>Formação das Vesículas Multilamelares.....</i>	<i>58</i>
<i>Formação das Vesículas Unilamelares.....</i>	<i>58</i>
<i>Formação das Multicamadas Depositadas.....</i>	<i>59</i>
MONTAGEM EXPERIMENTAL	59
SISTEMAS ESTUDADOS	61
Amostras da Série V e Parâmetros das Medidas	62
Amostras da Série R e Parâmetros das Medidas	63
Amostras das Séries de Multicamadas e Parâmetros de Medidas	65
<i>Série M e MR.....</i>	<i>65</i>
<i>Série CL.....</i>	<i>66</i>
<i>Série C.....</i>	<i>66</i>
Amostras da Série H e Parâmetros de Medida	66
CORREÇÃO DOS DADOS	67
<i>Tempo de Exposição e Intensidade do Feixe</i>	<i>68</i>
<i>Atenuação da Amostra</i>	<i>69</i>
<i>Homogeneidade do Detetor</i>	<i>70</i>
<i>Espalhamento Parasita</i>	<i>71</i>
DISCUSSÃO SOBRE ERROS:.....	72
<i>Calibração de temperatura</i>	<i>74</i>
<i>Preparação das amostras</i>	<i>74</i>
<i>Medidas</i>	<i>75</i>
<i>Estimativa do Erro</i>	<i>75</i>

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste trabalho, utilizamos principalmente dois tipos de estruturas como modelo de membrana celular: vesículas multilamelares (LMLV's - Large Multilamellar Vesicle) e multicamadas depositadas sobre vidro.

As amostras de vesículas multilamelares em solução simulam de maneira bastante eficiente a membrana celular e por isso são importantes para o estudo da interação com outros compostos, em particular, fármacos e carcinogênicos que são o tema deste trabalho. As LMLV's são também objeto de estudo na vetorização de antígeno⁷¹ porque as várias camadas proporcionam maior eficiência no carregamento de imunogênicos para sensibilização do organismo do que proporcionaria a única camada das vesículas unilamelares ou (SUV's - small unilamellar vesicles).

As SUV's são mais utilizadas na vetorização de medicamentos⁷⁵. Carreadores de longa circulação necessitam de boa mobilidade e facilidade para extravasar tecidos. Neste caso, as dimensões das SUV's são as mais adequadas.

As multicamadas depositadas de lipídeos são também estruturas utilizadas como modelo de membrana. Elas são preparadas através da deposição das soluções aquosas de SUV's em substrato de vidro e lenta evaporação em ambiente com umidade controlada. Estas amostras permitem um estudo particular da concentração crítica e localização de compostos misturados às membranas bem como a influência destes compostos sobre a estrutura lamelar dos lipídeos.

Materiais

L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) e Ellipticine (ELPT) foram compradas da Sigma e utilizadas sem purificação adicional. O clorofórmio foi o solvente orgânico utilizado para diluir a DPPC e metanol para ELPT. A hidratação foi feita com solução tampão BIS-TRIS 0.01M de pH 7.4.

Roteiro de Preparação

A formação espontânea dos lipossomas em meio aquoso não é eficiente. De fato, para produzir essas estruturas, é necessário introduzir alguma energia de agitação no sistema. Métodos diferentes induzem a formação de estruturas diferentes. Para produzir os dois tipos de estruturas necessários para este estudo (vesículas multilamelares e multicamadas depositadas), utilizamos um roteiro de preparação de amostras baseado nos trabalhos de Briggs & Caffrey^{72,73}, Wack & Webb⁷⁴ e Lasic⁷⁵. Em resumo, existem 4 passos fundamentais na preparação:

- (1) diluição de controle,
- (2) secagem,
- (3) hidratação do filme e
- (4) agitação.

A Figura 22 mostra esquematicamente algumas diferentes técnicas e as principais etapas do roteiro de preparação.

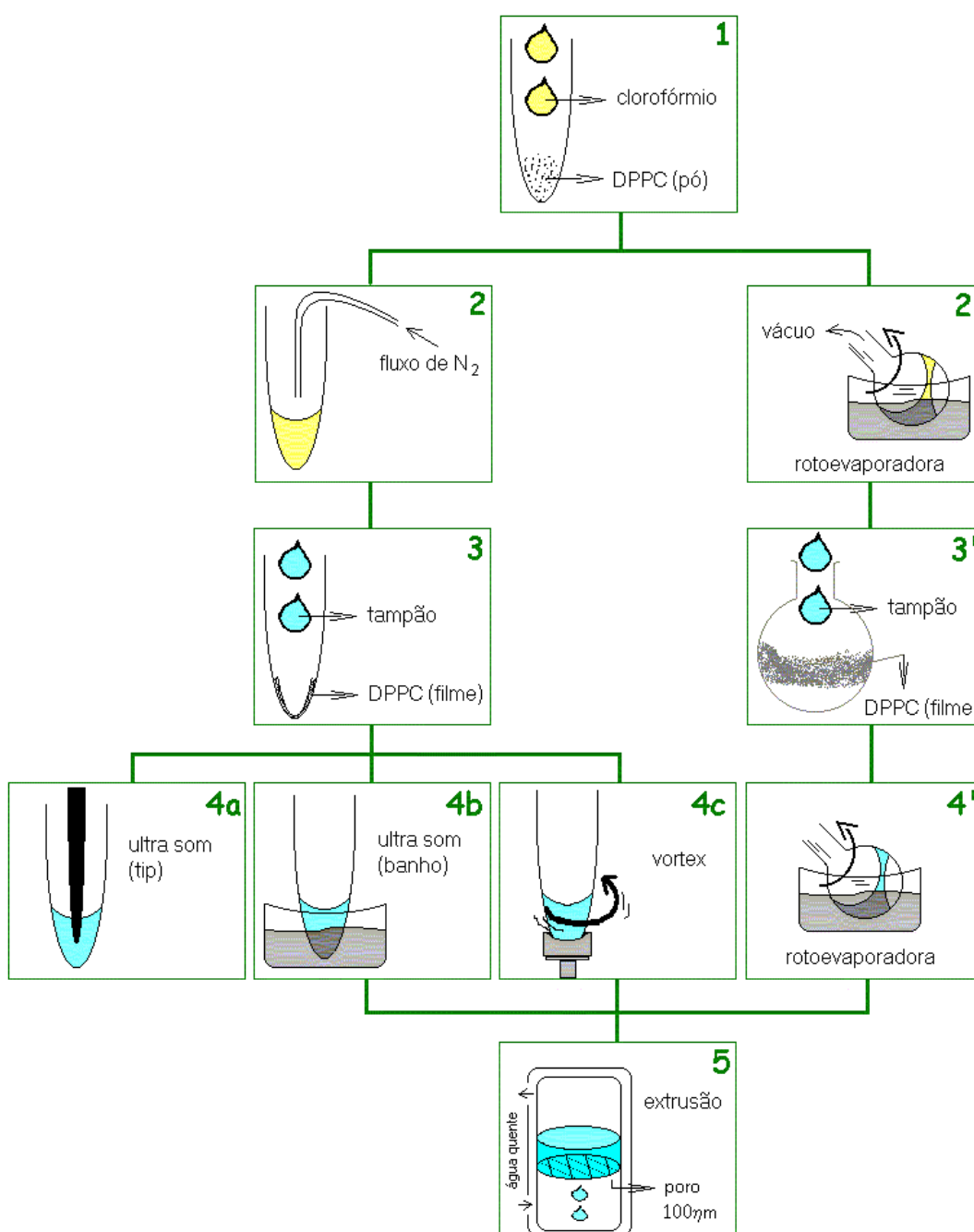


Figura 22: Roteiro para preparação de amostras (Ver texto).

Etapas básicas:

Depois da pesagem do lipídio é feita a *diluição de controle* em solvente orgânico (clorofórmio para o DPPC) o que permite manejar mais habilmente o material e ainda acrescentar e misturar compostos com maior precisão (Figura 22.1). Neste momento da preparação, acrescentamos a ELPT diluída em metanol ou os HAP's diluídos em outros solventes orgânicos. Depois desta etapa, os solventes devem ser separados do sistema. A *secagem* pode ser feita com fluxo de N₂ (Figura 22.2) ou com rotoevaporadora (Figura 22.2'). O resultado da secagem é um filme lipídico na parede do recipiente de vidro (como vemos na Figura 22.3 e Figura 22.3') que é ressuspensão em solução tampão na etapa de *hidratação*.

Formação das Vesículas Multilamelares

Depois das etapas básicas descritas acima, o recipiente que contém o filme ressuspensão em solução tampão é aquecido acima de 50°C e homogeneizado no agitador de tubos (vortex) ou na rotoevaporadora (Figura 22.4b e 4'). O aquecimento (acima da temperatura de transição principal do DPPC) é importante para quebrar grandes agregados (sistemas multivesiculares) e inibir defeitos no ordenamento.

A incubação do sistema a 4°C pode ser utilizada para promover o entumescimento do filme antes da agitação.

O procedimento de incubação a longo prazo (1 mês) com frequente homogeneização favorece a formação de LMLV's.

Formação das Vesículas Unilamelares

Para que haja formação de vesículas unilamelares, o sistema deve receber maior quantidade de energia de agitação. Depois das etapas básicas, o filme ressuspensão pode ser submetido à agitação por ultra som proveniente de banho (Figura 22.4c) ou *tip* (Figura 22.4A), ou ainda à extrusão por membrana porosa (Figura 22.5). Esse procedimento é necessário para promover o rompimento de estruturas lamelares maiores. A extrusão é

aceita pela literatura como o processo mais eficiente de produção de sistemas monodispersos de SUV's, comprovados por espalhamento de luz.

Formação das Multicamadas Depositadas

Para a preparação das multicamadas depositadas seguimos primeiramente o roteiro de preparação de vesículas unilamelares. A solução de SUV's é então gotejada em substrato de vidro (cerca de 50µl em uma área de $\sim 4\text{cm}^2$) e colocada em ambiente com umidade controlada para que a evaporação se faça lentamente e, deste modo, a estrutura lamelar se forme sem defeitos.

MONTAGEM EXPERIMENTAL

Para as medidas realizadas no presente trabalho, utilizamos basicamente duas montagens experimentais:

A primeira com aquisição de dados na linha de SAXS⁷⁶ do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP. Os parâmetros da máquina na ocasião das medidas, eram: energia do anel de 1.37 GeV com uma corrente de operação típica de 100mA. A energia utilizada na linha de SAXS esteve em torno de ~ 8 keV selecionada por um monocromador focalizante de cristal de Si (111) cortado assimetricamente (11 graus) e com curvatura elástica⁷⁷. Os experimentos foram realizados com geometria de transmissão como vemos na Figura 23 que mostra um esquema da linha de SAXS. As amostras líquidas foram colocadas em uma cela de acrílico selada com mylar e envoltas por um porta amostra de cobre acoplado a um banho térmico com temperaturas que variavam de 20 a 80°C. As rampas de aquecimento variaram de 0.3 a 1°C/min para diferentes experimentos e, com isso, padrões de difração sucessivos foram registrados com acumulação de 1 minuto de exposição em média. Além de experimentos com aquecimento *in situ*, foram também realizadas medidas com temperatura constante com tempo de exposição mais longo. A

aquisição dos dados foi feita com detetor a gás sensível a posição para alguns experimentos e com *image plate* para outros. As distâncias amostra-detetor estiveram em torno de 1500mm para os diferentes sistemas. A Figura 24 mostra uma foto do anel com a linha de SAXS em primeiro plano.

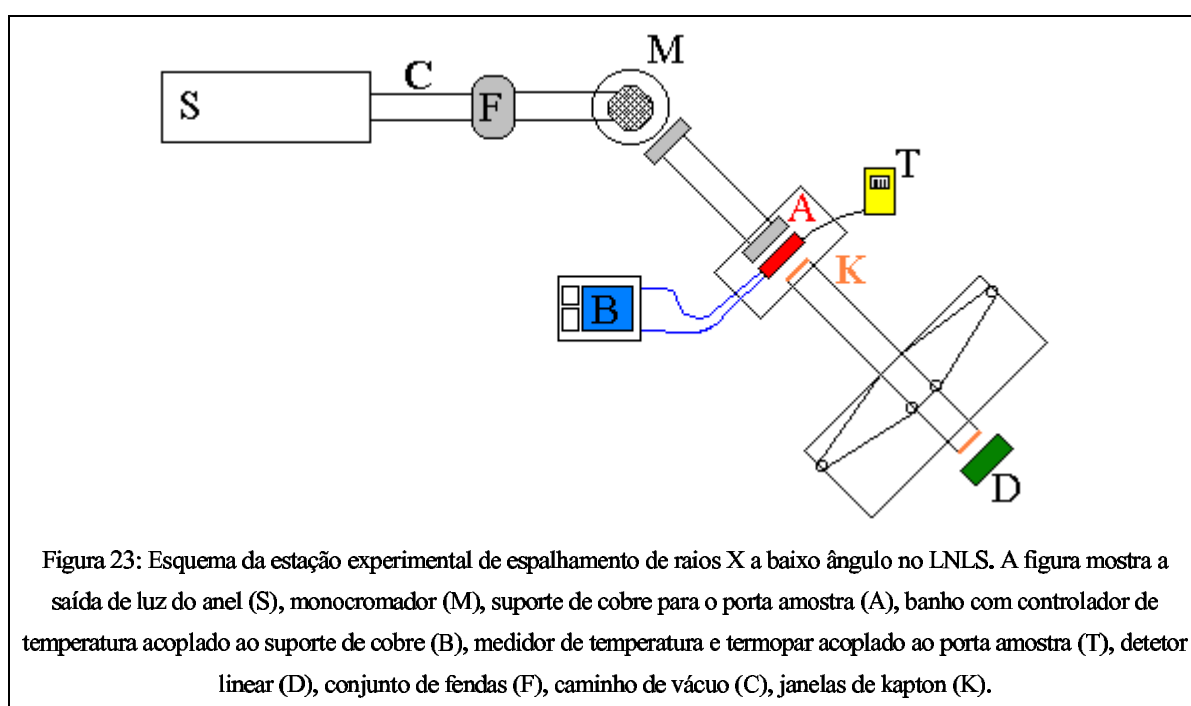




Figura 24: Foto do anel no LNLS com linha de SAXS em primeiro plano

A segunda montagem experimental utilizada foi um gerador de raios X Rigaku com anodo rotatório de cobre do Laboratório de Cristalografia Aplicada e Raios X deste Instituto. As amostras de multicamadas depositadas sobre vidro foram medidas com geometria de reflexão (Bragg-Brentano). A energia foi selecionada por um filtro de Ni e o feixe foi definido com fendas lineares: fenda de divergência = fenda de espalhamento = $1/6^\circ$ e fenda receptora = 0.15mm. A aquisição de dados foi feita através de um detetor de cintilação.

SISTEMAS ESTUDADOS

Cinco séries de amostras de multicamadas de DPPC depositadas sobre vidro, duas séries de amostras de vesículas de DPPC com incorporação de ELPT e uma série de vesículas de DPPC com incorporação de carcinogênicos foram preparadas para esse estudo.

Amostras da Série V e Parâmetros das Medidas

A série V foi preparada com o objetivo de observar o comportamento geral das mesofases lamelares com respeito a dois parâmetros de fundamental importância sobre as estruturas lamelares: (1) a razão molar do sistema DPPC/ELPT e a (2) concentração do lipídeo DPPC em relação à água. As amostras da série V, relacionadas na Tabela 4, foram preparadas, segundo o roteiro descrito anteriormente para produção de **vesículas multilamelares** com secagem por fluxo de nitrogênio e agitação em Vortex. No caso dos sistemas mistos DPPC/ELPT, os dois compostos foram misturados na etapa 1 do roteiro, ou seja, depois da diluição em solvente orgânico (DPPC em clorofórmio e ELPT em metanol).

Amostras		Razão molar do sistema DPPC:ELPT		
		DPPC pura	30:1	20:1
Concentração do lipídeo DPPC em mg/ml de água nos sistemas puros e mistos.	19	DP1	DPE1	DPEN1
	10	DP2	DPE2	DPEN2
	3	DP3	DPE3	DPEN3

Tabela 4: Descrição das amostras da série V.

A caracterização estrutural dos sistemas foi feita através da técnica de difração de raios X. As medidas para a série V, foram realizadas na estação experimental de espalhamento de raios X a baixo ângulo do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP. Para estes experimentos, utilizamos raios X com comprimento de onda de 1.48 Å e distância amostra-detetor de 1570.8 mm. O registro do espalhamento foi feito através de detetor a gás linear sensível à posição. Os experimentos foram realizados com geometria de transmissão com aquecimento *in situ* através de um banho térmico com temperaturas que variavam de 25 a 80°C. O intervalo do vetor de espalhamento (q) acessível nesta configuração foi de ~ 0.009 a 0.306 Å^{-1} . O porta-amostras utilizado para sustentação das amostras líquidas era de acrílico selado com mylar.

Primeiramente observamos a cinética de transição através das medidas da difração de raios X com aquecimento *in situ* para todas as amostras da série V. Utilizamos rampas de aquecimento de aproximadamente 0.7°C/min no banho térmico e o espalhamento foi registrado a cada 60 segundos com tempo total médio de 30 minutos. Um resultado típico da experiência é mostrado na Figura 25.

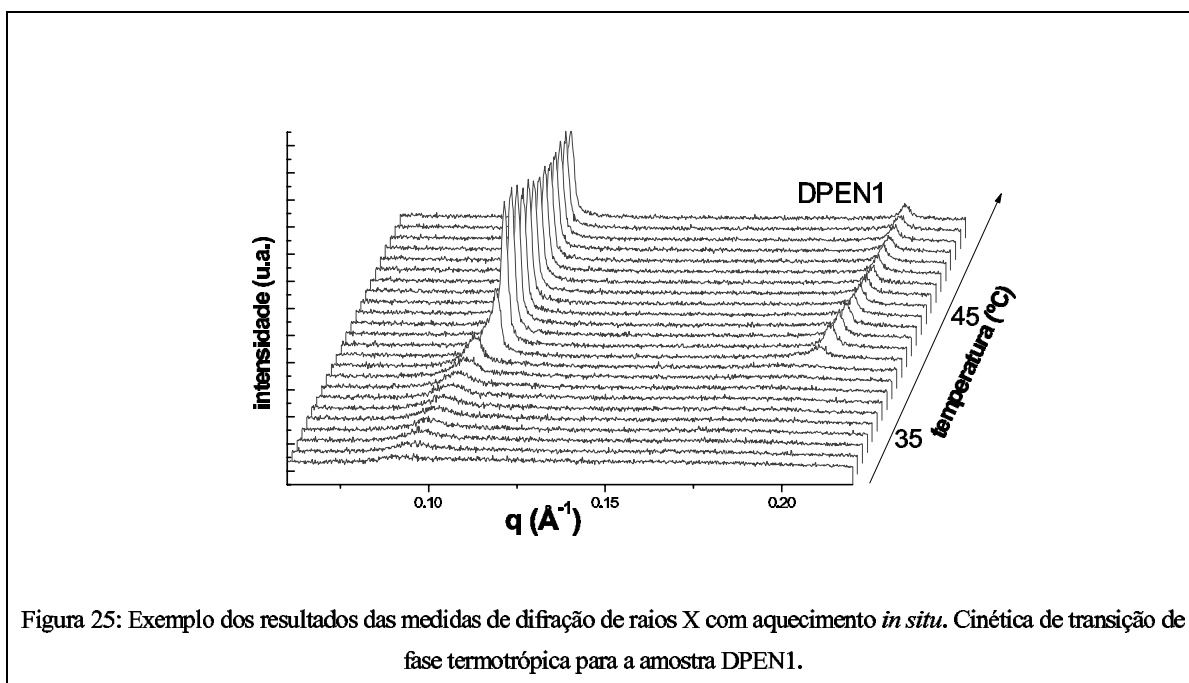


Figura 25: Exemplo dos resultados das medidas de difração de raios X com aquecimento *in situ*. Cinética de transição de fase termotrópica para a amostra DPEN1.

Em um outro conjunto de medidas foram feitas exposições de ~20 minutos com temperaturas fixa para toda a série V. Esta etapa tinha o objetivo de verificar se houve influência do tempo de relaxação em cada fase na comparação com os resultados das medidas com aquecimento *in situ*.

Amostras da Série R e Parâmetros das Medidas

A série R foi preparada com o objetivo de refinar alguns aspectos que já tinham sido vistos com a série V. Com relação à preparação, utilizamos uma só concentração lipídeo/água (10mg/ml) e um espectro maior na variação da razão molar DPPC/ELPT com o objetivo de obter maior precisão na caracterização da concentração crítica de

incorporação do fármaco dentro da membrana. Com relação às medidas em função da temperatura, utilizamos uma rampa de aquecimento mais suave com o objetivo de obter maior precisão na determinação da temperatura de transição de fase. As amostras da série **R**, relacionadas na Tabela 5, foram preparadas, segundo o roteiro descrito anteriormente para produção de **vesículas multilamelares** com secagem e agitação em rotoevaporadora.

Amostras	Razão molar do sistema DPPC:ELPT
R3	DPPC pura
R4	70:1
R5	60:1
R6	50:1
R7	40:1
R8	30:1
R9	20:1
R10	10:1

Tabela 5: Descrição das amostras da série R

A caracterização estrutural dos sistemas para a série **R** foi feita através da técnica de difração de raios X na linha de SAXS do LNLS bem como para a série **V**. Entretanto, para estes experimentos com a série **R**, utilizamos raios X com comprimento de onda de 1.608 Å e distância amostra-detetor de 1650.3 mm. O registro do espalhamento foi feito através de detetor linear sensível à posição com resolução de 0.1139 mm/canal e também com detetor bidimensional construído com placa de imagem.

Para as amostras da série **R** observamos a cinética de transição através das medidas de difração de raios X com aquecimento *in situ* com rampas de 0.3°C/min no banho térmico e o espalhamento foi registrado com nova acumulação a cada 60 segundos. Em uma outra

etapa foram feitas exposições mais longas com registro em placa de imagem para 5 temperaturas fixas: 4, 14, 28, 38 e 48°C.

Amostras das Séries de Multicamadas e Parâmetros de Medidas

As 4 séries de multicamadas sobre substrato de vidro, **M**, **MR**, **CL** e **C** foram preparadas para estudar a concentração crítica da ELPT na membrana e também a influência de um lipídio aniônico no favorecimento da incorporação de ELPT. As 4 séries foram preparadas, segundo o roteiro descrito anteriormente para produção de **Multicamadas Depositadas**, concentração do lipídeo DPPC em relação à água constante e igual a 10mg/ml e variação de composição da membrana ou da razão molar do sistema DPPC/ELPT.

Série M e MR

Essas séries foram preparadas com o objetivo de determinara a concentração crítica de ELPT na membrana de DPPC. As razões molares entre DPPC e ELPT amostras da série **M** variam de 40:1 a 10:1 para a série M e de 50:1 a 40:1 para a série MR.

Amostra		DPPC:ELPT (razão molar)
M1	MRØ	DPPC pura
	MR1	50:1
	MR2	45:1
M2	MR3	40:1
M3		35:1
M4		30:1
M5		25:1
M6		20:1
M7		10:1

Tabela 6: Descrição das amostras das séries M e MR.

Série CL

As amostras da série CL foram preparadas com o objetivo de estudar a influência da cardiolipina (CL) na estrutura da membrana de DPPC. As razões molares DPPC:CL variam como mostra a Tabela 7.

Amostras Série CL	DPPC:CL (razão molar)
CL1	4:1
CL2	4.7:1
CL3	6.5:1
CL4	8.6:1

Tabela 7: Descrição das amostras da série CL.

Série C

As amostras da série C foram preparadas com o objetivo de testar o poder de incorporação da ELPT com a concentração ideal de CL na composição da membrana.

Amostras Série C	Composição (razão molar)
C2	DPPC(6.6):CL(0.8):ELPT(1)
C1	DPPC(6.6):ELPT(1)
C0	DPPC pura

Tabela 8: Descrição das amostras da série C.

A caracterização estrutural dos sistemas de multicamadas das séries acima foi feita através da técnica de difração de raios X a alto ângulo com geometria Bragg-Brentano em anodo rotatório de cobre e filtro de Ni e o espalhamento foi registrado em detetor de cintilação no Laboratório de Cristalografia Aplicada e Raios X deste Instituto.

Amostras da Série H e Parâmetros de Medida

A série H de LMLV's foi preparada com incorporação de alguns Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's) de uma série homóloga que apresenta variado grau de

CAPÍTULO IV

AMOSTRAS E MONTAGEM EXPERIMENTAL

atividade carcinogênica. As amostras da série **H** foram preparadas, segundo o roteiro descrito anteriormente para produção de **vesículas multilamelares** com secagem por fluxo de nitrogênio e agitação em vortex. A razão molar do sistema DPPC:HAP é constante e igual a 30:1 e a concentração do lipídeo DPPC em relação à água varia conforme é descrito na **Tabela 9**.

Identificação das Amostras	Concentração do lipídeo DPPC em mg/ml de água nos sistemas puros e mistos.			
HAP's	19mg/ml	10mg/ml	7mg/ml	4mg/ml
Pireno	118	119	120	121
DMBA	122	123	124	125
BP	126	127	128	129
MC	-	130	131	132
DBA	-	134	-	136
BA	-	138	139	140

Tabela 9: Descrição das amostras da série H.

A caracterização estrutural dos sistemas para a série H foi feita através da técnica de difração de raios X na linha de SAXS do LNLS utilizando raios X com comprimento de onda de 1.608 Å e distância amostra-detetor de 1650.3mm. O registro do espalhamento foi feito através de detetor a gás linear sensível à posição.

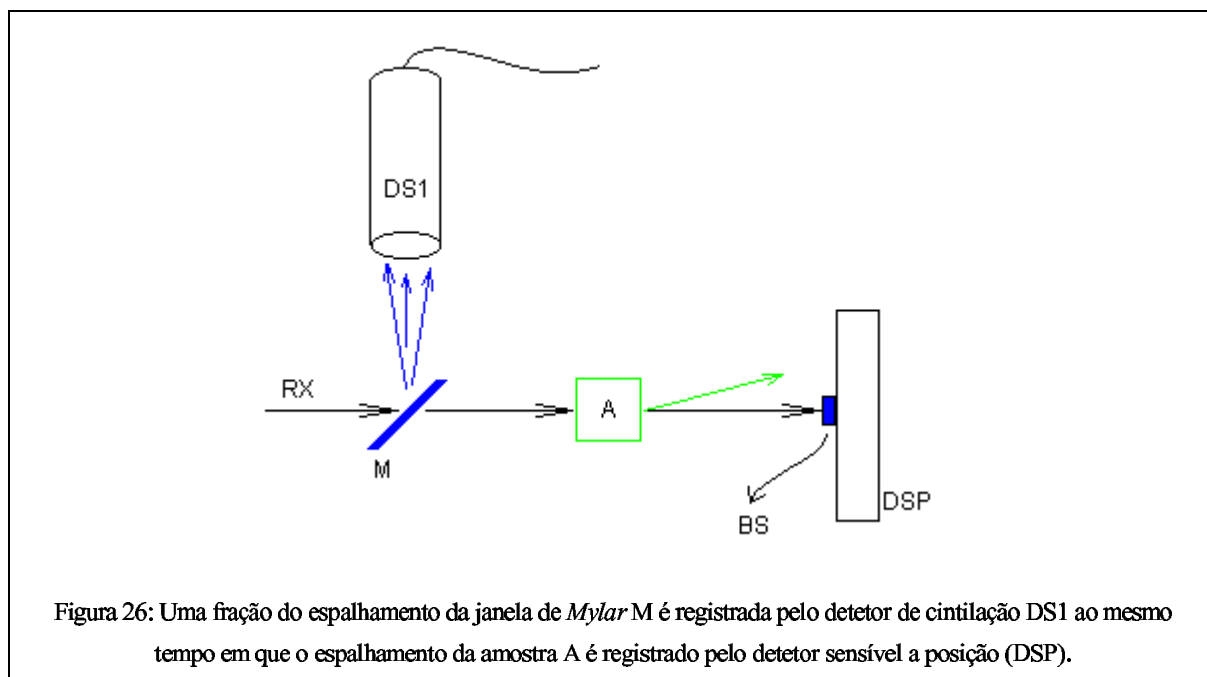
Para as amostras da série H observamos a cinética de transição de fase através das medidas de difração de raios X com aquecimento *in situ* com rampas de 0.3°C/min no banho térmico e o espalhamento foi registrado com nova acumulação a cada 60 segundos. Em uma outra etapa foram feitas exposições mais longas a 45°C a fim de caracterizar a fase $L\alpha$.

CORREÇÃO DOS DADOS

A correção dos dados obtidos nos experimentos mencionados montados na estação experimental de SAXS do LNLS envolveu principalmente cinco aspectos: correção com relação (1) ao tempo t de exposição da amostra; (2) à variação da intensidade do feixe $I_o(t)$ na estação experimental; (3) à atenuação A da amostra; (4) à homogeneidade do detetor e (5) subtração do *background* produzido pelo espalhamento da solução *buffer* juntamente com qualquer outro espalhamento parasita.

Tempo de Exposição e Intensidade do Feixe

A corrente no anel de armazenamento do LNLS decresce a uma taxa de alguns mA/hora durante um *run* de experiência. Para que os dados das diferentes amostras medidas durante o dia possam ser comparados entre si, as respectivas curvas de intensidade devem ser normalizadas por um fator que seja proporcional à variação da intensidade do feixe proveniente do anel. Na linha de SAXS do LNLS, este fator é determinado utilizando a montagem descrita na Figura 26. Através desta montagem é possível registrar uma fração do espalhamento I_M produzido por uma janela de *Mylar* colocada no caminho do feixe antes da amostra. O valor da intensidade I_M integrada no tempo (NI_M), é proporcional à intensidade total do feixe incidente sobre a amostra durante o experimento. Este valor registrado pelo detetor de cintilação, é armazenado pelo software de aquisição de dados para cada nova medida e pode ser utilizado para normalizar o espalhamento da amostra que foi medida simultaneamente com mesmo tempo de exposição.



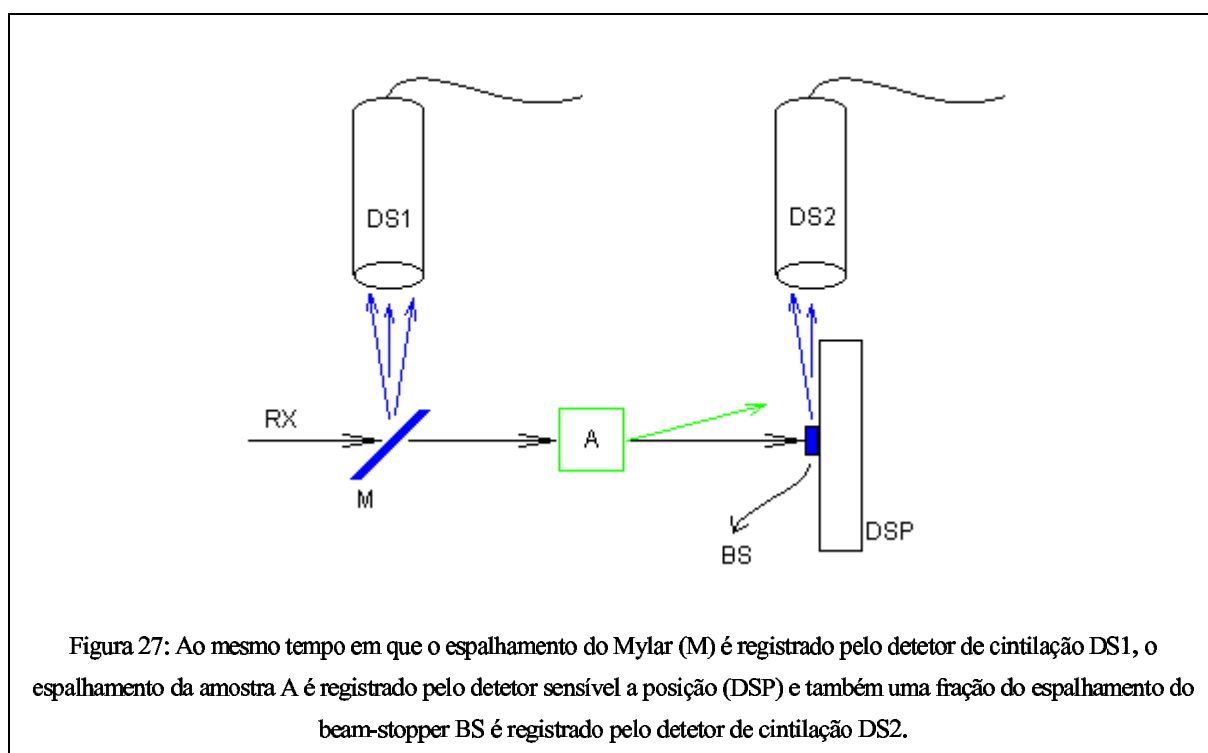
Atenuação da Amostra

Na montagem experimental utilizada, o feixe de raios X atravessa a amostra e pode ser parcialmente atenuado por absorção. A atenuação A é definida como a razão entre o feixe incidente sobre a amostra (I_0) e o feixe transmitido por ela (I_x). Este fator depende do coeficiente de absorção do material (μ) e da espessura x de amostra atravessada pelo feixe como expresso abaixo:

$$A = \frac{I_0}{I_x} = e^{\mu x}$$

Para determinar o fator de atenuação e corrigir esse efeito nas medidas de espalhamento, utilizamos a mesma montagem descrita anteriormente para caracterizar a intensidade do feixe incidente acrescida de um sistema de caracterização da intensidade do feixe transmitido. Para isso comparamos I_M com uma fração da intensidade espalhada pelo *beam stopper* (I_{BS}) como mostrado na Figura 27. Assim como I_M é proporcional à intensidade incidente, I_{BS} é proporcional à intensidade transmitida pela amostra. Os dois sistemas de caracterização das intensidades incidente e transmitida são normalizados entre si com

relação à diferença na eficiência dos detetores DS1 e DS2 e também com relação à diferença entre o espalhamento do *Mylar* e do *beam stopper*. Este valor é armazenado pelo *software* de aquisição de dados para cada nova medida e pode ser utilizado para normalizar o espalhamento da amostra que foi medida simultaneamente com mesmo tempo de exposição.



Homogeneidade do Detetor

Nos experimentos deste trabalho utilizamos detetores a gás sensíveis à posição com resolução de $300\mu\text{m}$ e configuração de $64\mu\text{m}/\text{canal}$. A homogeneidade do detetor é caracterizada pela eficiência relativa entre os canais de detecção e pode ser determinada através da exposição da região sensível do detetor a uma fonte de radiação homogênea. O gráfico da Figura 28 mostra um exemplo da resposta do detetor a este tipo de experimento. A intensidade espalhada pela amostra é, então, dividida por esta curva de homogeneidade, como é chamada, para ser normalizada com respeito à eficiência relativa do detetor. A

curva de homogeneidade é medida a cada troca de *set up* na linha de SAXS do LNLS e fica disponível ao usuário ao final dos experimentos.

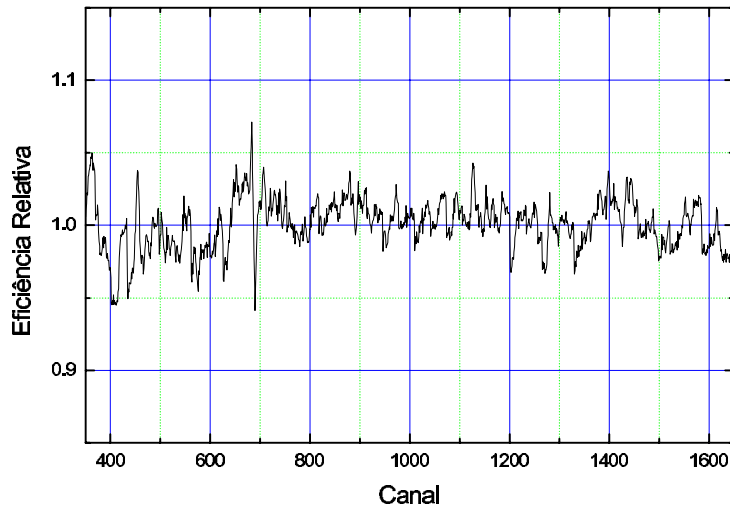


Figura 28: Resposta do detector a gás sensível a posição quando exposto a uma fonte de radiação homogênea.

Até agora, vimos que para normalizar a intensidade espalhada da amostra, I_e , com relação aos itens (1), (2), (3) e (4) descritos acima, podemos utilizar a seguinte expressão:

$$I_n = A \frac{I_e}{NI_M \times homo}$$

onde NI_M é um fator proporcional à intensidade integrada no tempo que incidiu sobre a amostra, $A = I_M/I_{BS}$ é a atenuação da amostra, e *homo* é a curva de homogeneidade do detector. A intensidade normalizada I_n precisa ainda ser corrigida com relação ao espalhamento parasita.

Espalhamento Parasita

Juntamente com o espalhamento da amostra em si, também são registrados efeitos diversos que devem ser subtraídos. Esses efeitos são, por exemplo, o espalhamento do ar que o feixe encontra pelo caminho caso o sistema não seja fechado, das fendas, do porta

amostras e também da solução *buffer* na qual a amostra está dispersa. Para que os dados sejam corrigidos com relação a esses aspectos, utilizamos a curva de espalhamento medida com a solução *buffer* pura e todos os outros parâmetros fixos (mesmo porta amostras, fendas, etc.) como base para subtração do *background*. A Figura 29 mostra um exemplo dos resultados das medidas de difração de raios X para uma amostra de lipossomas dispersos em solução *buffer* (I_{lip}) e também para a solução *buffer* pura (I_{buf}). Essas intensidades já foram normalizadas pelos 4 primeiros efeitos mencionados: tempo de exposição, variação da intensidade do feixe em função do tempo, atenuação da amostra e também pela homogeneidade do detector. O gráfico da Figura 29 mostra, então, o resultado final da correção com relação ao espalhamento parasita, ou seja, o resultado da subtração $I_{lip} - I_{buf}$. Supondo que todos os demais fatores de influência sobre a intensidade de espalhamento da amostra (espessura do material, tamanho do feixe, etc.) tenham sido controlados, podemos tomar a intensidade corrigida como absoluta para efeito de comparação com outras medidas em um mesmo *set up*.

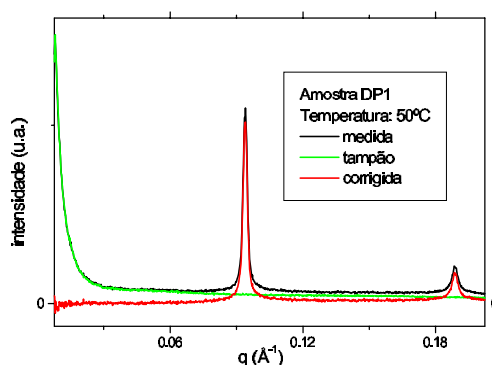


Figura 29: Exemplo dos resultados das medidas de difração de raios X com temperatura fixa. Fase $L\alpha$ da amostra DP1 a 50°C . A curva de espalhamento da solução tampão (em verde) foi subtraída da intensidade espalhada pela amostra em solução (em preto). O resultado corrigido é mostrado com a curva vermelha. (Detalhes no capítulo ‘Análise dos Resultados’).

DISCUSSÃO SOBRE ERROS:

Todos os parâmetros de preparação e incubação da amostra são variáveis importantes que influenciam na estabilidade dos sistemas lipídeo/água. Um exemplo bastante significativo neste sentido é mostrado no trabalho de Átila Bóta⁷⁸ sobre os efeitos de história prévia em função da temperatura de incubação sobre a região de pré transição do DPPC. Para obter resultados absolutos é necessário conhecer com bastante acurácia todos os processos envolvidos e suas implicações no comportamento geral dos sistemas.

O crescente interesse pelo estudo destes sistemas ocorrido nos últimos anos contribuiu para diversificar a fim de aperfeiçoar os procedimentos gerais de preparação de amostras e técnicas de caracterização. Em contraposição a esta evolução, tornou-se bastante difícil obter resultados absolutos, já que os resultados diferentes eram justificados por serem obtidos por métodos diferentes. Em 1998, o trabalho de Koynova & Caffrey⁷⁹ propôs um banco de dados acessível pela internet⁸⁰ reunindo todos os resultados e técnicas já publicadas desde 1955 como uma iniciativa, entre outras, de padronizar procedimentos. No banco de dados de Koynova & Caffrey vemos claramente as discrepâncias entre resultados de parâmetros idênticos gerados por procedimentos diferentes relatados em diferentes trabalhos. Um exemplo deste fato foi transcrito na **Tabela 10** onde vemos o resultado médio dos valores da TTF para alguns sistemas formados por diacil fosfatidilcolinas em água. O intervalo de variação de 4 a 20%, é o desvio padrão dos valores encontrados nos vários artigos consultados.

Número de carbonos	Sub transição (°C)	Pré transição (°C)	Transição principal (ordem-desordem das cadeias acílicas) (°C)
15	20,2±3,0	22,0±2,5	33,7±0,8
16	18,8±3,1	34,4±2,5	41,3±1,8
17	21,6±3,8	42,7±1,1	48,6±0,6
18	26,3±5,2	49,1±2,9	54,5±1,5
19	30,0±4,3	57,2±1,1	60,2±1,1

CAPÍTULO IV

AMOSTRAS E MONTAGEM EXPERIMENTAL

20	36,9±1,3	63,2±0,8	65,3±1,5
21	28,0	69,4±0,9	70,7±1,6
22	32,1		73,6±2,1

Tabela 10: Valores das transições de fase de sistemas formados por diacil fosfatidilcolinas em água compilados por Koynova e Cafrey⁷⁹.

O objetivo principal do trabalho apresentado nesta tese não foi o de determinar com precisão as posições das transições de fase ou mesmo de conhecer outros parâmetros com acurácia, mas sim, identificar que tipo de influência pode ocorrer na estrutura das fases lamelares quando, por exemplo, adicionamos um fármaco ao sistema. Neste caso, toda a atenção foi voltada para o estudo dos resultados relativos dentro de cada série preparada, através da prática de uniformizar os procedimentos de preparação de amostra (secagem, agitação, incubação), medida e tratamento dos dados.

Dentre os procedimentos gerais adotados, faz-se necessário citar os seguintes:

Calibração de temperatura

A diferença máxima de temperatura entre a posição da amostra e a posição do termopar no suporte de cobre que sustenta o porta amostra foi de 0.5°C. A exemplo de outros trabalhos da literatura, consideramos os valores medidos com o termopar no suporte de cobre em todas as análises para efeito de comparação relativa dentro de cada série.

Preparação das amostras

Protocolos diferentes foram empregados na preparação das quatro séries de amostras apresentadas neste trabalho para verificação de diferentes aspectos. Contudo, os resultados de cada série em particular não foram confrontados senão de maneira qualitativa devidamente justificada. Dentro de cada série, entretanto, existiu sempre a preocupação severa de uniformizar as práticas de secagem, agitação, incubação e utilização de materiais.

Medidas

Para as medidas com aquecimento *in situ*, utilizamos uma única sequência de rampas com mesmos valores de temperatura inicial e final no sentido de padronizar os efeitos de história prévia sobre todos os sistemas de uma mesma série. Procedimento similar foi adotado para as medidas com temperatura fixa.

Estimativa do Erro

Em quase todos os resultados, procuramos apresentar um valor estimado para o erro da medida considerando todos os fatores acima. O erro, por exemplo, dos valores da distância de repetição na estrutura lamelar das amostras, que é determinada a partir das posições das reflexões lamelares, depende da resolução da montagem, ou seja, do comprimento útil do detetor, da distância amostra-detetor e da posição das reflexões. Entretanto, a fim de comparar os resultados de uma mesma série, consideramos o erro do ajuste da curva como suficiente para apresentar os aspectos de interesse.

O erro para os valores das medidas das TTF's deve ser estimado de acordo com a resolução da cinética, ou seja, depende da taxa de aquecimento das amostras, tempo de acumulação do detetor e da precisão no valor lido para a temperatura da amostra durante a cinética. Entretanto, neste estudo, somente os resultados relativos foram considerados, independentes do erro, com o único propósito de comparar aspectos relevantes dentro de uma mesma série, já que todas as amostras apresentaram cinéticas bem comportadas e os procedimentos foram criteriosamente padronizados como comentado anteriormente.

CAPÍTULO IV**AMOSTRAS E MONTAGEM EXPERIMENTAL**

CAPÍTULO V

Análise dos Resultados

CAPÍTULO V

ANÁLISE DOS RESULTADOS

CONTEÚDO DO CAPÍTULO V: ``ANÁLISE DOS RESULTADOS``

PARTE I

INTERAÇÃO DA ELPT COM A MEMBRANA DE DPPC.....	80
INTRODUÇÃO	81
RESULTADOS DA PARTE I	87
Transição de Fase em Sistemas de Vesículas de DPPC:ELPT	87
<i>Região de Pré-Transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$.....</i>	<i>88</i>
<i>Região de Transição Principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabela dos Resultados de Transição de Fase (Série V).....</i>	<i>101</i>
<i>Otimização dos parâmetros: preparação da série R.....</i>	<i>102</i>
<i>Temperatura de TF em função da razão molar DPPC:ELPT.....</i>	<i>104</i>
Análise do Perfil do Primeiro Máximo de Difração.....	105
Compressão Térmica da Estrutura Lamelar na Fase $L\alpha$:	112
Estudo da Concentração Crítica de Incorporação do Fármaco na Bicamada....	116
<i>Fases cristalinas da ELPT</i>	<i>116</i>
<i>Amostras.....</i>	<i>120</i>
<i>Resultados</i>	<i>120</i>
Interação da ELPT com a Cardiolipina.....	123
RESUMO DOS RESULTADOS PARTE I:	127

PARTE II

INTERAÇÃO DE HAP'S COM A MEMBRANA DE DPPC.....	129
INTRODUÇÃO	130
Parâmetros Caracterizados.....	130
Parâmetros da Literatura	130
RESULTADOS DA PARTE II	131

CAPÍTULO V
ANÁLISE DOS RESULTADOS

Comparação dos parâmetros estudados	132
Distâncias de repetição	133
Compressão Térmica da Estrutura Lamelar da Fase Lα:	134
RESUMO DOS RESULTADOS PARTE II:	144

Parte I

INTERAÇÃO DA ELPT COM A MEMBRANA DE DPPC.

INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta todos os resultados de interação de compostos hidrofóbicos na membrana modelo de DPPC que foram observados neste trabalho de tese. O capítulo foi dividido em duas partes: a primeira, mostra os resultados do estudo estrutural realizado com amostras de vesículas multilamelares com incorporação do fármaco Elipticina (ELPT) em amostras de Multicamadas depositadas sobre vidro (série M), LMLV's preparadas em Vortex (série V) e LMLV's preparadas em Rotoevaporadora (série R) que serão descritos aqui. A segunda parte do capítulo apresenta os resultados da incorporação de uma série de HAP's na membrana modelo de DPPC que serão descritos posteriormente.

As experiências, relativas à primeira parte, foram feitas com aquecimento *in situ* usando as amostras de LMLV's preparadas em Vortex (série V). Primeiramente analisamos os resultados das medidas realizadas para verificar possíveis alterações na cinética de transição de fase termotrópica em função dos dois parâmetros mais importantes: a razão molar DPPC/ELPT e o grau de hidratação da membrana. Um exemplo deste tipo de medida é mostrado na Figura 30 para uma amostra da série V. Cada espectro da sequência mostrada, foi registrado com acumulação de um minuto, através de detetor linear sensível a posição, e aquecimento do sistema através de rampas de aproximadamente 0.7°C/min. No intervalo útil* medido (~ 0.009 a $\sim 0.306 \text{ \AA}^{-1}$) foi possível registrar até duas ordens de difração da estrutura lamelar da membrana lipídica. A estatística nas medidas é baixa devido ao pouco tempo de medida, mas permite a interpretação adequada dos resultados.

* Sem considerar os canais do detetor que foram obstruídos pelo beam-stop.

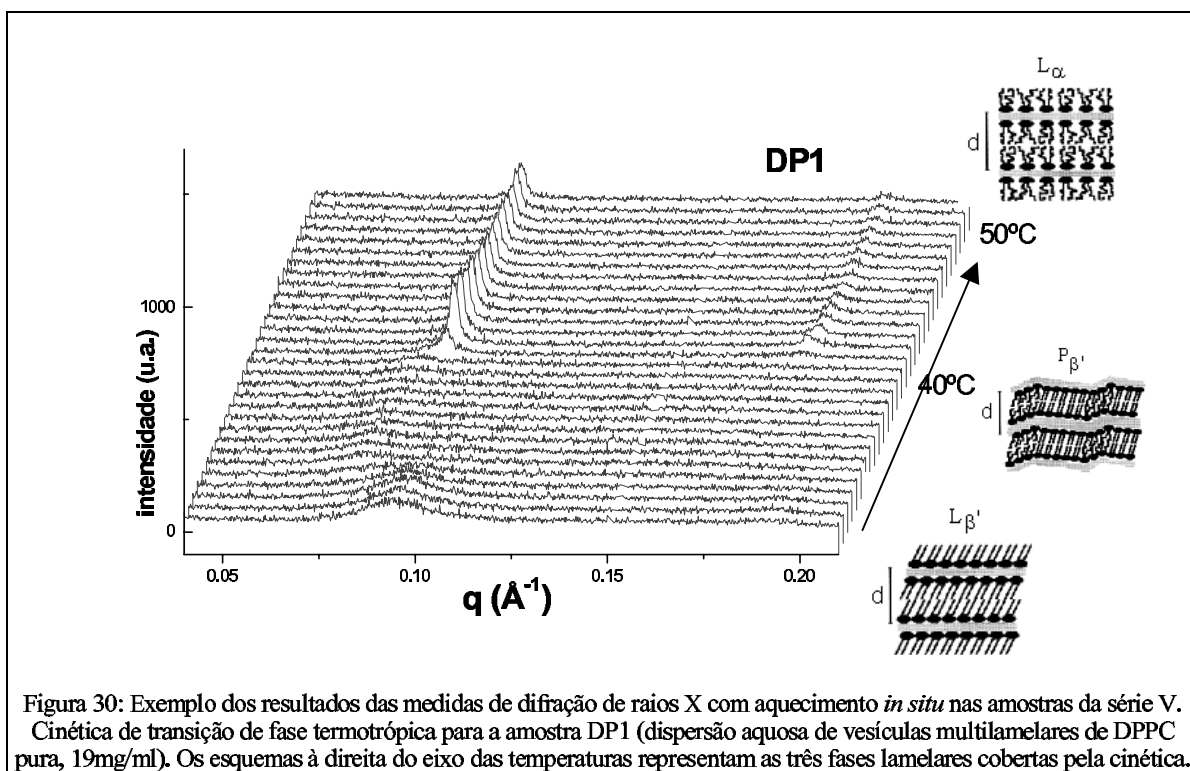


Figura 30: Exemplo dos resultados das medidas de difração de raios X com aquecimento *in situ* nas amostras da série V. Cinética de transição de fase termotrópica para a amostra DP1 (dispersão aquosa de vesículas multilamelares de DPPC pura, 19mg/ml). Os esquemas à direita do eixo das temperaturas representam as três fases lamelares cobertas pela cinética.

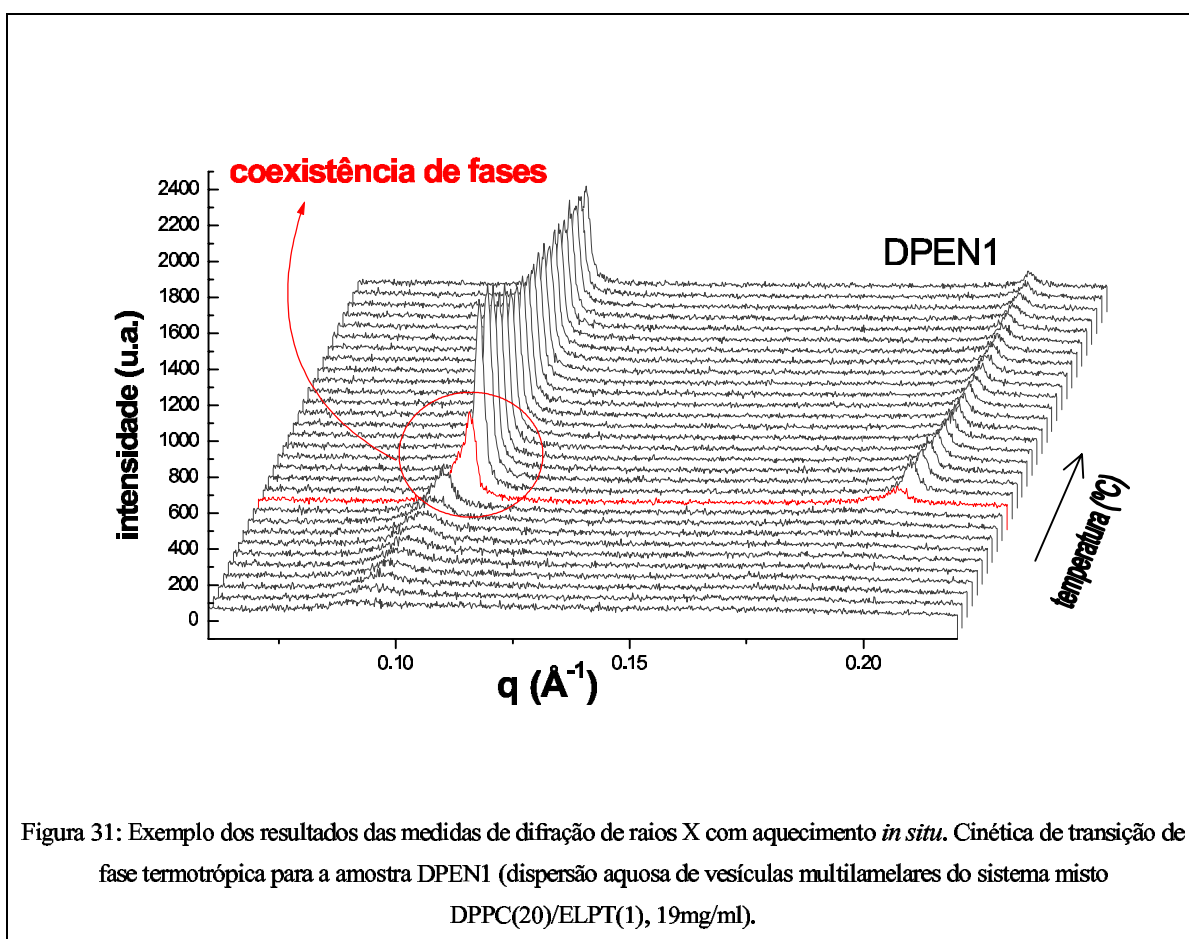
Vamos utilizar o gráfico da Figura 30 como exemplo para delinear o comportamento geral das membranas das vesículas multilamelares de DPPC no que diz respeito às diferentes fases termotrópicas no intervalo de temperatura de ~ 30 a $\sim 50^\circ\text{C}$. Este gráfico mostra um mapeamento da região de pré-transição ($\sim 35^\circ\text{C}$) e da região de transição principal ($\sim 42^\circ\text{C}$) para a amostra de DPPC pura, 19mg/ml (DP1). Próximo à temperatura ambiente, observamos uma banda larga em torno da posição $q=0.09\text{\AA}^{-1}$. Esta é uma característica da fase $L\beta'$, ou seja, as cadeias acíclicas são rígidas e os grupos polares estão em um plano lamelar conforme é descrito no capítulo I. À medida que a temperatura aumenta e passamos da região de pré-transição em torno dos 35°C para o lipídeo DPPC, o plano das bicamadas assume pequenas ondulações. Aquela banda observada no difratograma se desloca para valores menores de q e fica mais larga caracterizando a fase $P\beta'$. Depois da região de transição principal, o pico fica mais intenso e se desloca para valores maiores de q caracterizando a compressão térmica da membrana na transição de

CAPÍTULO V

ANÁLISE DOS RESULTADOS

fase $P\beta' \rightarrow L\alpha$. A transição principal é também chamada de transição ordem/desordem das cadeias acíclicas quando elas mudam seu estado de rígido (inteiramente trans) para completamente relaxado ocupando de forma homogênea o espaço entre os planos formados pelos grupos polares. Desta maneira, o espaçamento dos planos adquire um ordenamento a longo alcance, como é sugerido pela diminuição da largura do pico e pelo aparecimento de uma segunda ordem de difração mostrado na cinética da Figura 30.

A Figura 31 mostra outro exemplo dos resultados da cinética de transição de fase para uma amostra de vesículas multilamelares de DPPC chamando a atenção para a região de coexistência das fases $P\beta'$ e $L\alpha$.



CAPÍTULO V

ANÁLISE DOS RESULTADOS

É bastante importante localizar essa região para determinar com maior precisão possível a temperatura de transição de fase. O critério de escolha da velocidade da rampa de aquecimento e o tempo de acumulação no registro com detetor sensível à posição é baseado no compromisso de equilibrar alguns fatores: (1) oferecer boas condições de termalização do sistema e (2) definição do espectro (boa estatística), (3) obter maior resolução na caracterização da transição de fase e (4) evitar longa exposição da amostra.

Dentro das condições de medida que foram oferecidas, encontramos bons resultados com a resolução obtida através de rampas de aquecimento de $\sim 0.7^\circ\text{C}/\text{min}$ e acumulação a cada minuto para varreduras longas com registro da pré-transição e transição principal. Nas medidas que foram feitas para otimizar parâmetros constituídas de varreduras mais curtas em torno da região de transição, pudemos utilizar rampas de aquecimento mais suaves de $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ e acumulação a cada minuto. Utilizando esses parâmetros, o tempo de exposição das amostras não ultrapassou o período crítico observado para agregação do material ($\sim 30\text{min}$) e também não houve, em primeira aproximação, problemas de termalização segundo os resultados da comparação com medidas que foram feitas a temperaturas fixas para confirmação da estrutura mostradas no gráfico da Figura 32. No gráfico, vemos a distância de repetição da estrutura lamelar de LMLV's em função da temperatura mostrando as transições de fase $L\beta' \rightarrow P\beta'$, em torno de 35°C e $P\beta' \rightarrow L\alpha$, em torno de 42°C para as amostras da série V (pontos pretos). Os pontos em vermelho foram medidos em temperatura fixa e coincidem razoavelmente bem com os pontos pretos principalmente na fase $L\alpha$, pois, como mostram a Figura 30 e a Figura 31, nesta fase a posição dos picos de difração é mais definida e, por isso, mais precisa é a determinação das distâncias de repetição.

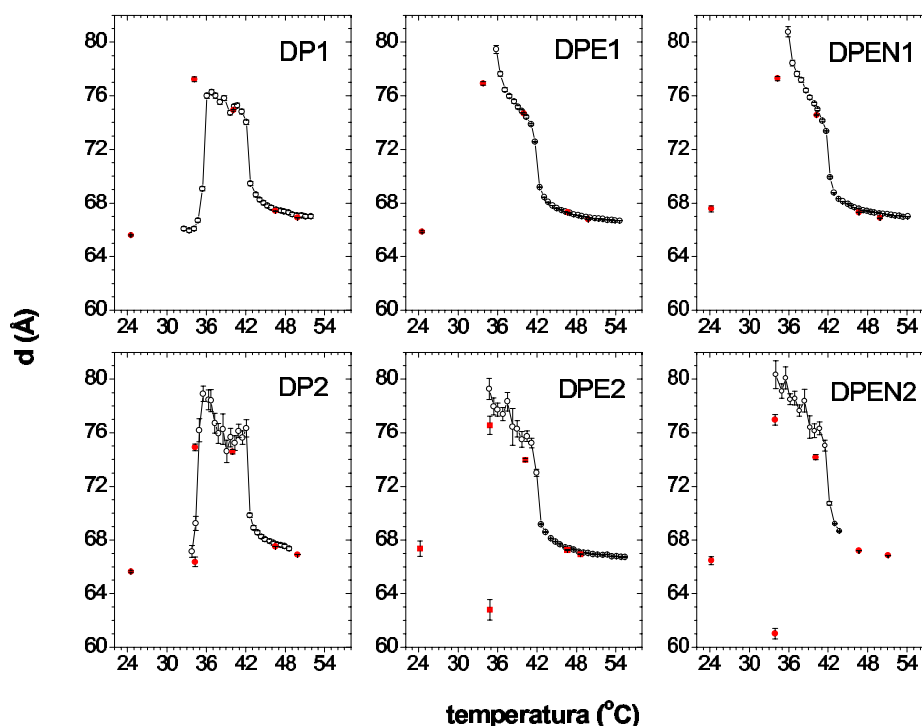


Figura 32: Distância de repetição da estrutura lamelar de LMLV's em função da temperatura para as amostras da série V (pontos pretos). Os pontos em vermelho foram medidos em temperatura fixa.

⇒ Alguns trabalhos consideram a Temperatura de Transição de Fase (TTF) como sendo a temperatura em que o ajuste do perfil de difração é uma superposição das reflexões características das duas fases com 50%, em área, para cada fase⁸¹. No presente estudo, vamos considerar a temperatura de Coexistência de Fase (CF) como sendo a própria TTF para efeito de comparação dos resultados obtidos dentro da mesma série. Quando utilizamos a rampa de aquecimento de 0.7°C/min e o registro de cada espectro minuto a minuto, temos uma diferença de aproximadamenteⁱ 0.7°C entre um espectro e outro nas

ⁱ Dizemos 'aproximadamente' porque o registro foi feito com uma diferença de alguns segundos a mais que um minuto considerando o tempo de espera do programa de aquisição de dados.

CAPÍTULO V

ANÁLISE DOS RESULTADOS

cinéticas mostradas, por exemplo, na Figura 30 ou na Figura 31. Neste caso o erroⁱⁱ na determinação da TTF seria de 0.3 a 0.4°C se conseguimos caracterizar bem a CF e as fases anterior e posterior assim como vimos para o caso da amostra DP1 comentada acima.

ⁱⁱ Ver discussão de erros do capítulo IV para maiores detalhes.

RESULTADOS DA PARTE I

Transição de Fase em Sistemas de Vesículas de DPPC:ELPT

A cinética de transição de fase foi registrada no intervalo de temperatura entre ~30 e ~50°C para as amostras de LMLV's da série V (preparadas em Vortex). Para melhor analisar os resultados, apresentamos este intervalo dividido nas suas duas regiões de interesse: pré-transição e transição principal. Abaixo, transcrevemos a tabela que descreve a série V para facilitar a identificação das amostras referidas nos resultados.

Amostras (série V) LMLV's preparadas em Vortex		Razão molar do sistema DPPC:ELPT		
		DPPC pura	30:1	20:1
Concentração do lipídeo DPPC em mg/ml de água nos sistemas puros e mistos.	19	DP1	DPE1	DPEN1
	10	DP2	DPE2	DPEN2
	3	DP3	DPE3	DPEN3

Tabela 11: Descrição das amostras da série V.

Região de Pré-Transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$

A Figura 33 mostra o resultado das medidas de difração de raios X com a amostra DP1 na região de pré-transição. Vemos que o pico característico da fase $L\beta'$ se desloca para valores menores de q à medida que a temperatura aumenta. A transição de fase acontece entre os registros a 34.7 e 36.1°C. Ainda podemos notar que o difratograma a 35.4°C descreve um perfil que é uma superposição de dois picos indicando coexistência de fase.

Em DP2, a temperatura de transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ é menor do que em DP1 como vemos na comparação entre os gráficos da Figura 34 e da Figura 33. O gráfico da Figura 34 mostra que a região de pré transição para a amostra DP2 (mais hidratada que a DP1) acontece entre 33.8 e 34.9°C, com coexistência de fase em 34.4°C. Esses valores estão um pouco abaixo daqueles para DP1.

CAPÍTULO V
ANÁLISE DOS RESULTADOS

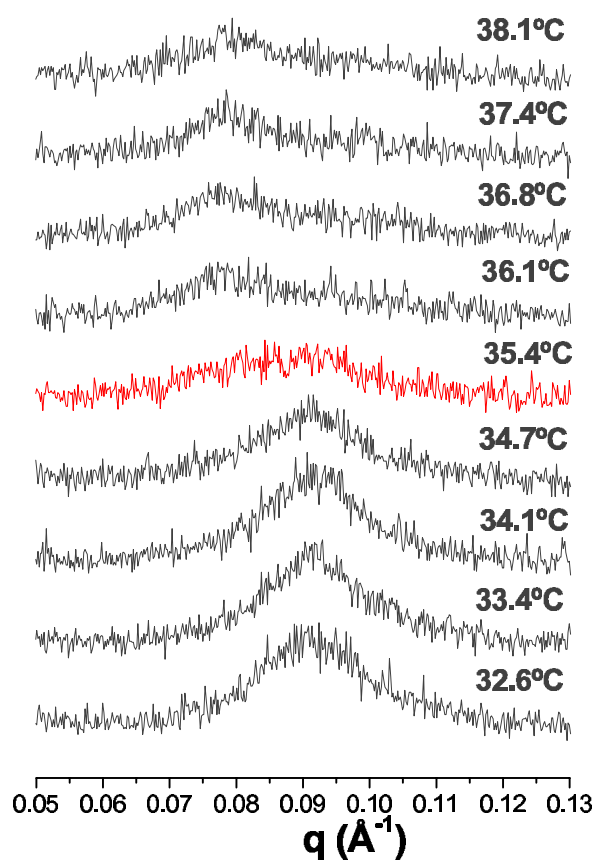


Figura 33: Transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ em DP1

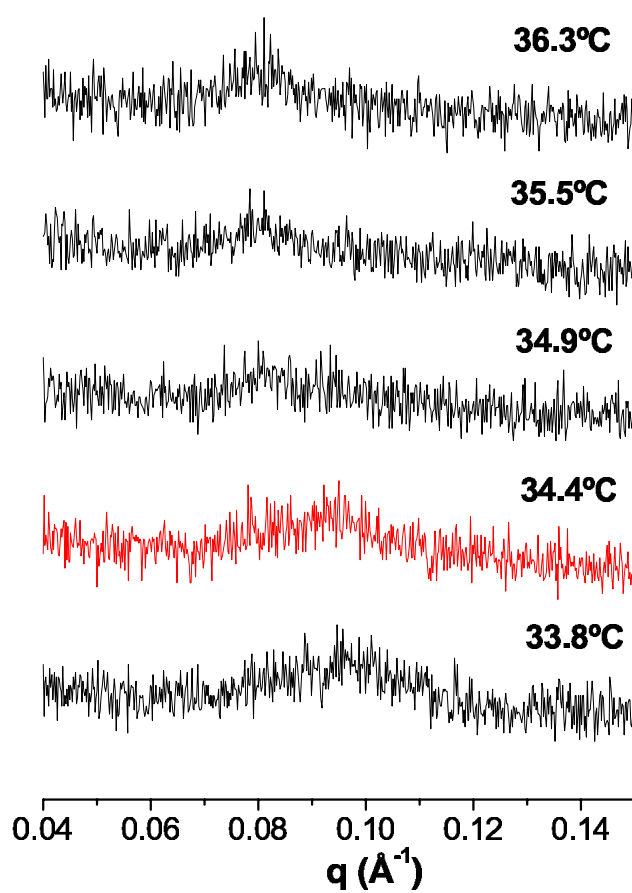


Figura 34: Transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ em DP2

Na Figura 35 observamos os resultados obtidos para a amostra DPE1. Vemos que a região de coexistência das fases $L\beta'$ / $P\beta'$ é bastante larga, muito maior que todos os outros casos, atingindo a temperatura de 37.8°C.

Na Figura 36 Em DPE2 a varredura foi iniciada depois da transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$. Embora não tendo a informação precisa da temperatura de transição, vemos na que a 34.7°C já observamos a reflexão característica da fase $P\beta'$ podemos deduzir que aquela transição deve ocorrer a uma temperatura inferior a 34.7°C e, portanto, mais baixa que em DPE1.

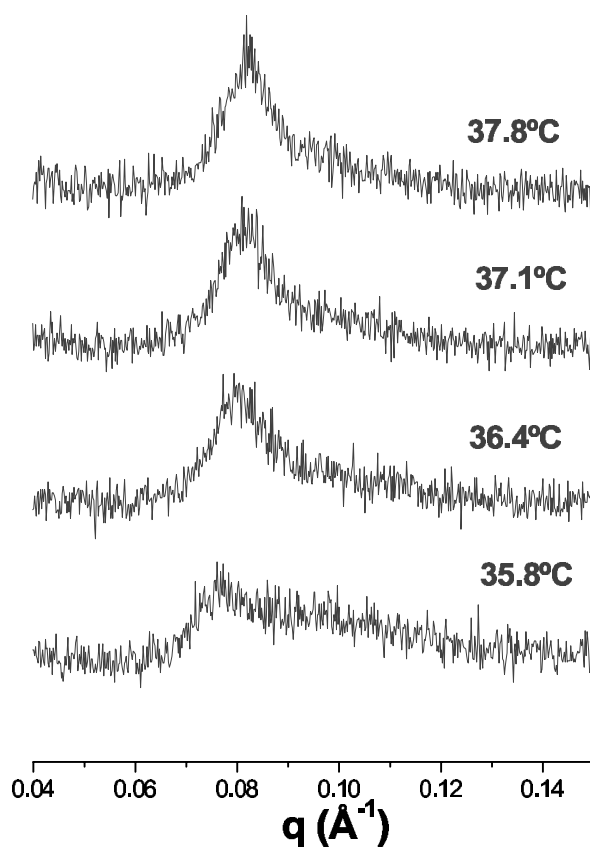
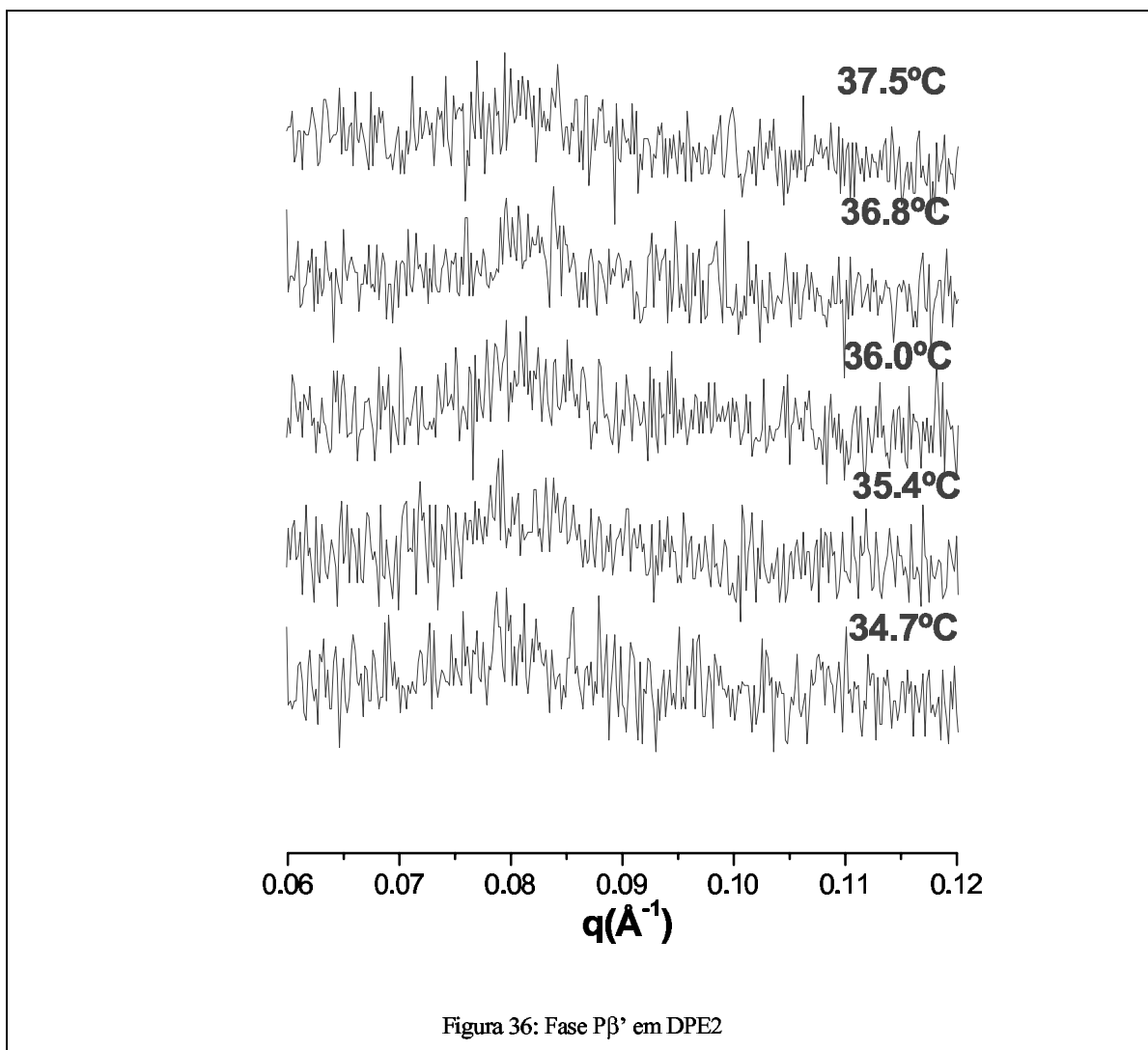
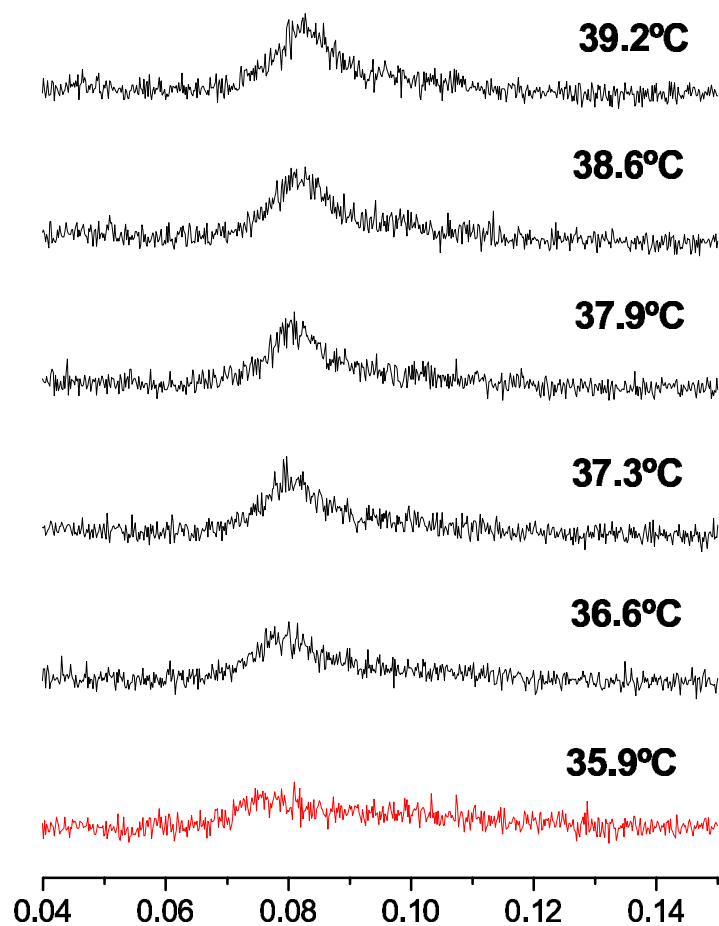


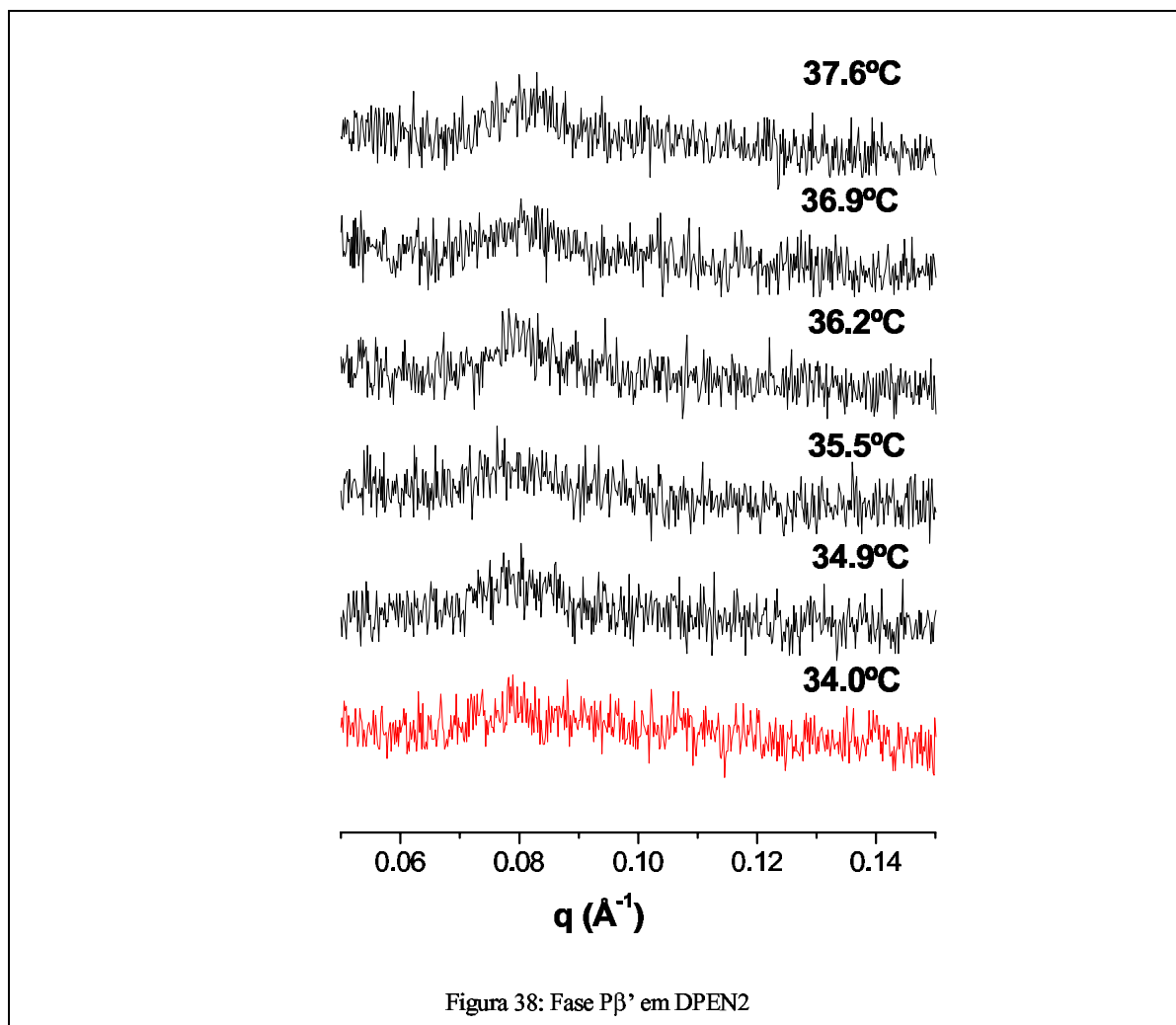
Figura 35: Coexistência das fase $L\beta'$ e $P\beta'$ em DPE1



Na Figura 37 e na Figura 38 as varreduras foram iniciadas depois da transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ já sugere a coexistência de fase.

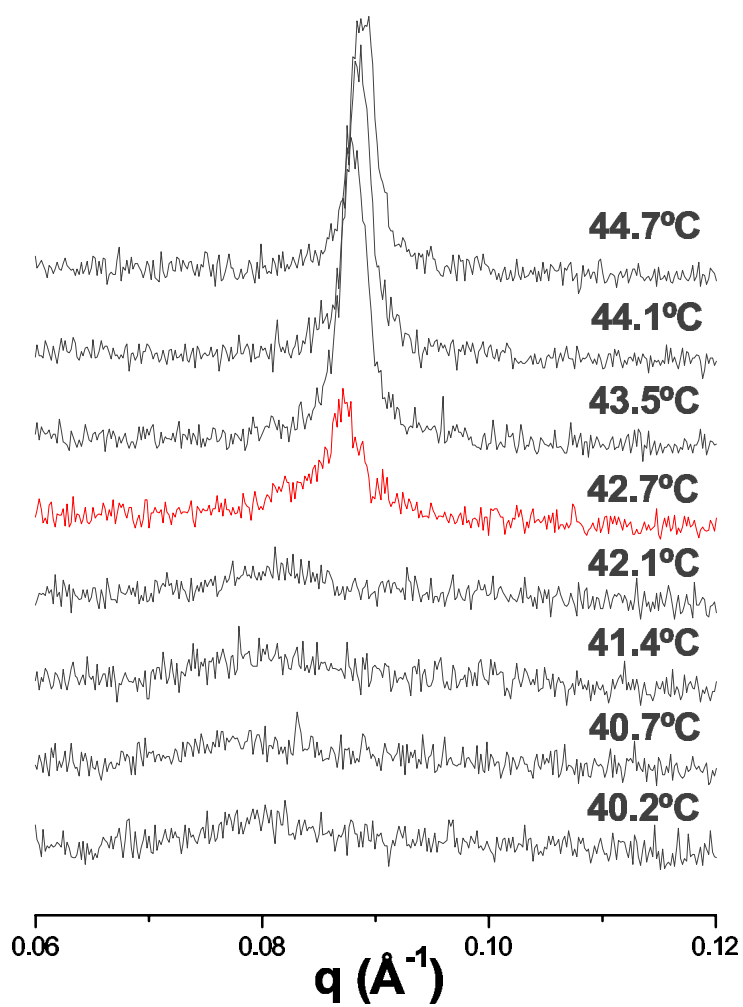
Os resultados obtidos com as amostras DP2, DPE2 e DPEN2 que são mostrados na Figura 34, Figura 36 e na Figura 38 respectivamente, não tem muito boa estatística. Essas amostras têm maior quantidade de água e portanto, menos material difratante. Por isso, a razão sinal/ruído é menor quando comparada aos resultados das amostras DP1, DPE1 e DPEN1, mostradas na Figura 33, Figura 35 e na Figura 37, medidas com mesmo tempo de exposição.

Figura 37: Fase P β ' em DPEN1



Região de Transição Principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$

A Figura 39 mostra o resultado das medidas de difração de raios X, nesta segunda região, para a amostra DP1. A transição de fase principal acontece entre os registros a 42.1 e 43.5°C. Aqui também podemos notar que o difratograma a 42.7°C descreve um perfil que é uma superposição de dois picos indicando coexistência de fase.

Figura 39: Transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em DP1

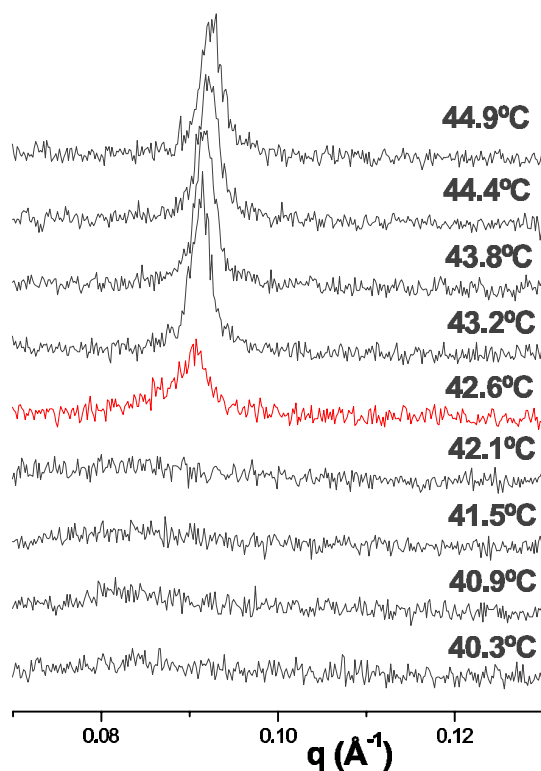
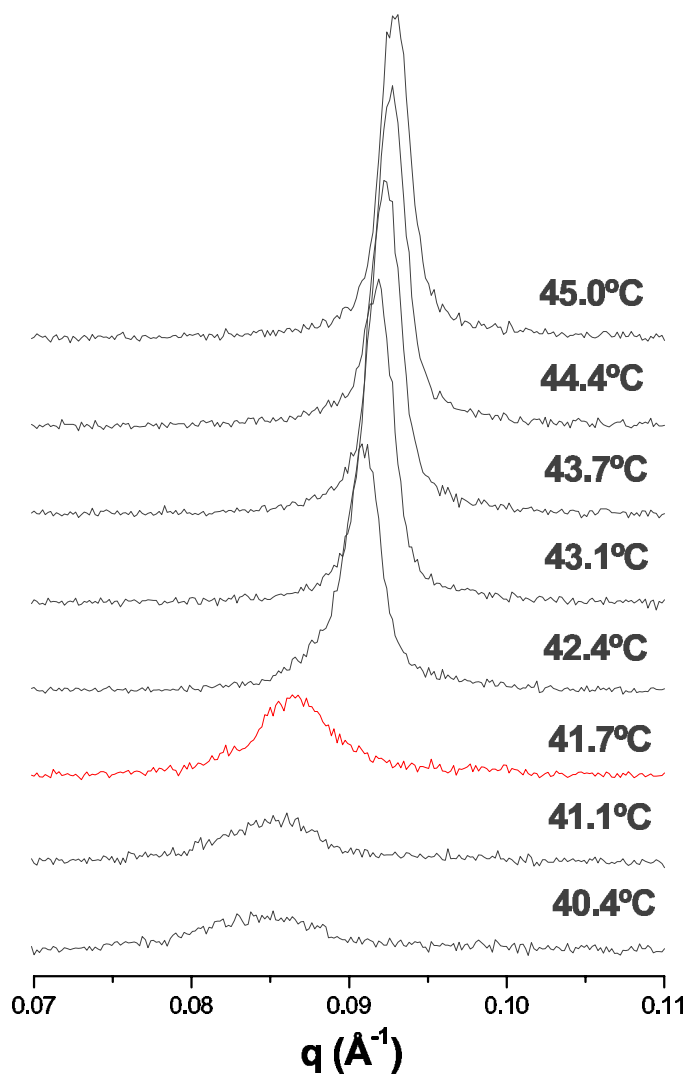
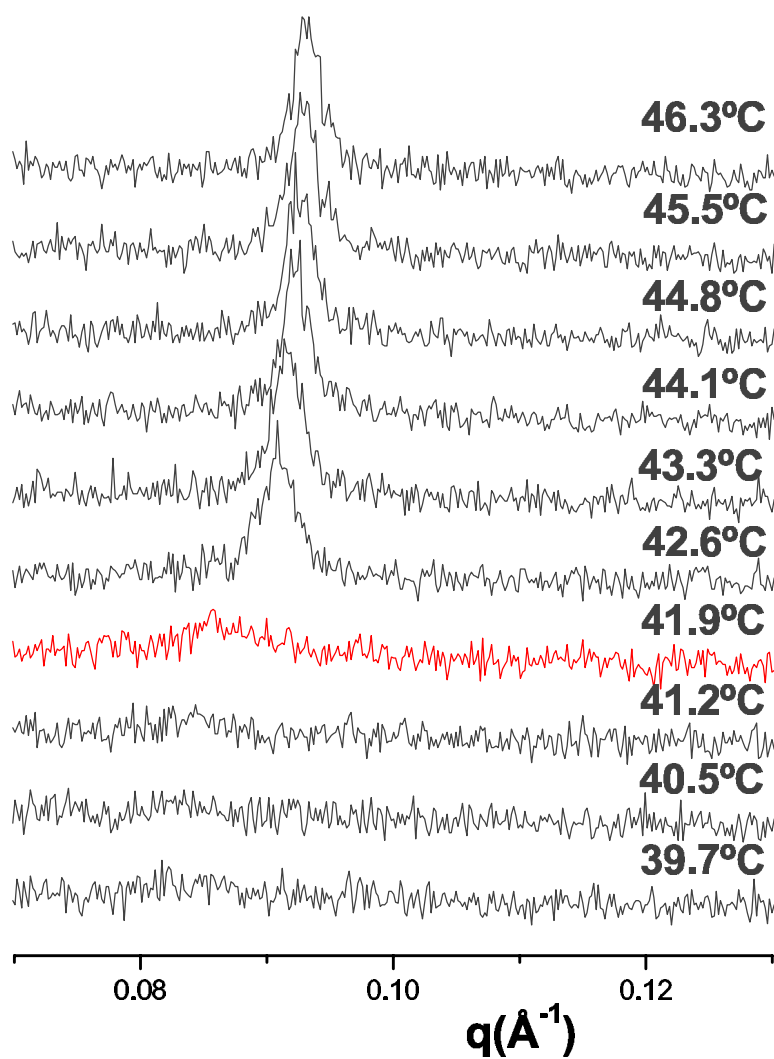


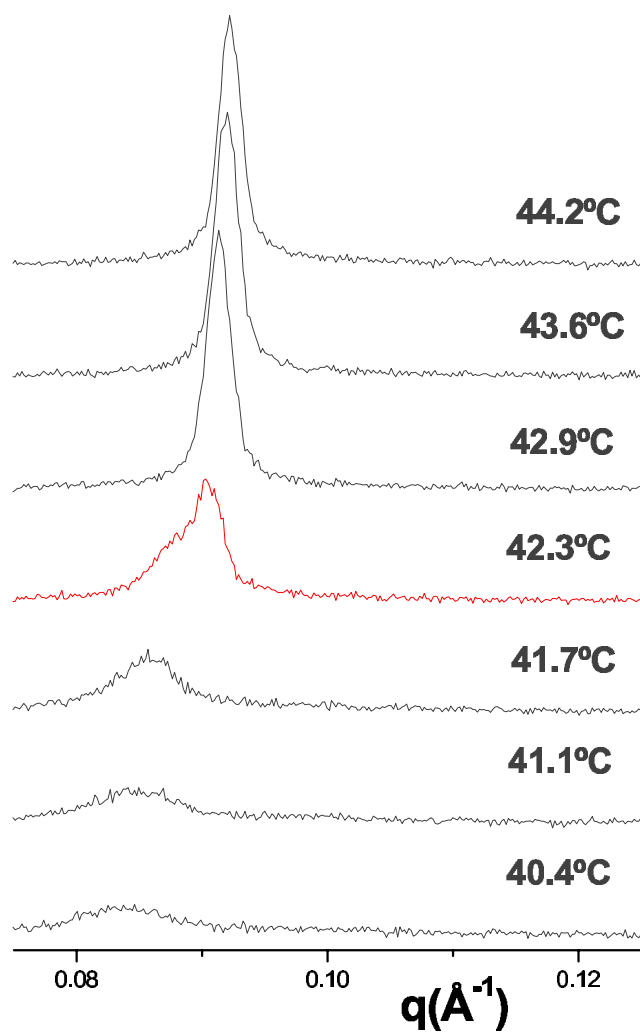
Figura 40: Transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em DP2

Em DPE1, a temperatura de transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ é menor do que em DP1 como vemos na comparação entre os gráficos da Figura 41 e da Figura 39. Observe que a região de transição de fase acontece entre 42.1 e 43.5°C para DP1 (com coexistência de fase em 42.7°C) e entre 41.1 e 42.4 para DPE1 (com coexistência de fase em 41.7°C).

Em DPE2, a temperatura de transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ é menor do que em DP2 como vemos na comparação entre os gráficos da Figura 42 e da Figura 40. Observe que a região de transição de fase acontece entre 41.2 e 42.6°C para DPE2 (com coexistência de fase em 41.9°C) e entre 42.1 e 43.2 para DP2 (com coexistência de fase em 42.6°C).

Figura 41: Transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em DPE1

Figura 42: Transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em DPE2

Figura 43: Transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em DPEN1

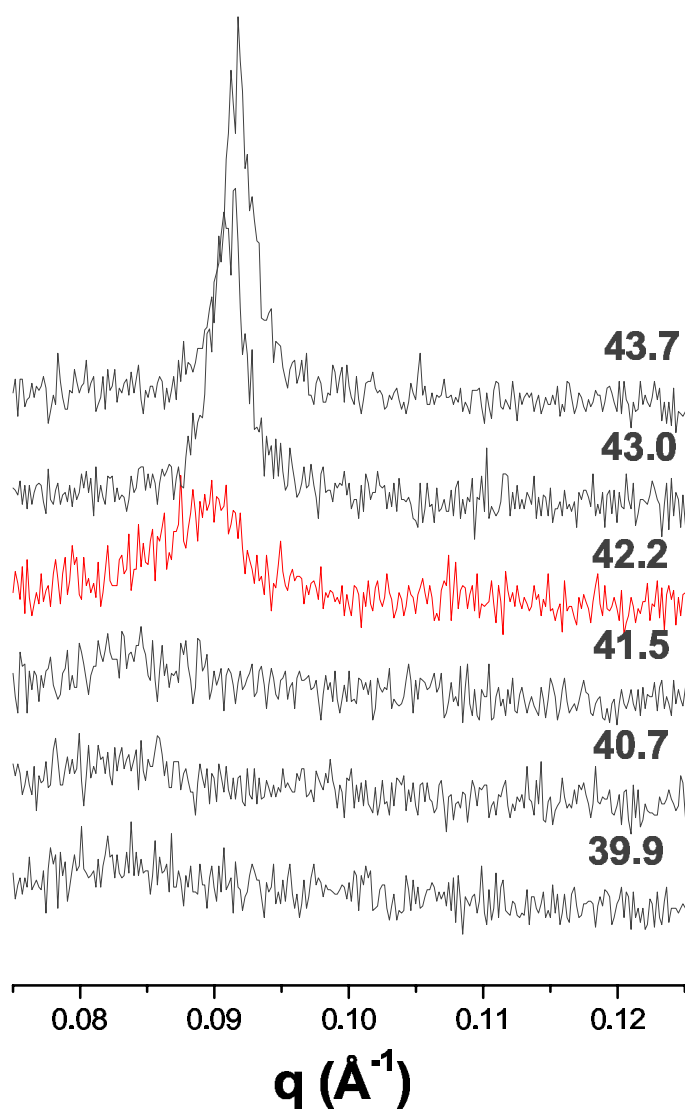
Figura 44: Transição $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em DPEN2

Tabela dos Resultados de Transição de Fase (Série V)

Transição de Fase	DP1	DP2	DPE1	DPE2	DPEN1	DPEN2
Lβ'→Pβ'						
Região inicial TF (°C)	34.7	33.8	-	-	-	-
CF (°C)	35.4	34.4	35.8 a 37.8	-	35.9	34.0
Região final TF (°C)	36.1	34.9	-	<34.7	36.6	34.9
Pβ'→Lα						
Região inicial TF (°C)	42.1	42.1	41.1	41.2	41.7	41.5
CF (°C)	42.7	42.6	41.7	41.9	42.3	42.2
Região final TF (°C)	43.5	43.2	42.4	42.6	42.9	43.0

Tabela 12: Resumo dos resultados obtidos com as medidas de difração de raios X com relação à transição de fase das amostras da série V.

Otimização dos parâmetros: preparação da série R

Observando os resultados da Tabela 12, medidas realizadas com aquecimento *in situ* sobre as amostras das LMLV's preparadas em Vortex (série V), concluímos que seria importante otimizar alguns aspectos para obter maior resolução na determinação dos parâmetros. Para isso, a série R foi preparada com três procedimentos diferenciados: (1) a preparação das amostras foi feita através de rotoevaporadora a fim de obter LMLV's maiores e, conseqüentemente, reflexões mais definidas na fase $L\alpha$; (2) no planejamento da preparação, escolhemos uma única concentração lipídeo/água e um espectro maior na variação da razão molar DPPC/ELPT o que permitiria alcançar maior precisão na caracterização da concentração crítica de incorporação do fármaco dentro da membrana e, por fim, (3) as medidas foram realizadas com diminuição na taxa de aquecimento tendo em vista diminuir o erro na determinação da temperatura de transição de fase. Cada espectro então, foi registrado com acumulação de um minuto, através de detetor linear sensível a posição. O aquecimento do sistema foi feito através de rampas de $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e as medidas foram realizadas em torno das duas regiões de transição mais importantes: de 28 a 38°C para registrar a pré transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ e de 38 a 48°C para registrar a transição principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$. Assim como para a série V, no intervalo útil medido (~ 0.009 a $\sim 0.306 \text{ \AA}^{-1}$) foi possível registrar até duas ordens de difração da fase lamelar $L\alpha$ da membrana lipídica. No exemplo mostrado no gráfico da Figura 45, vemos em vermelho o perfil formado pelo aparecimento da reflexão característica da fase $L\alpha$.

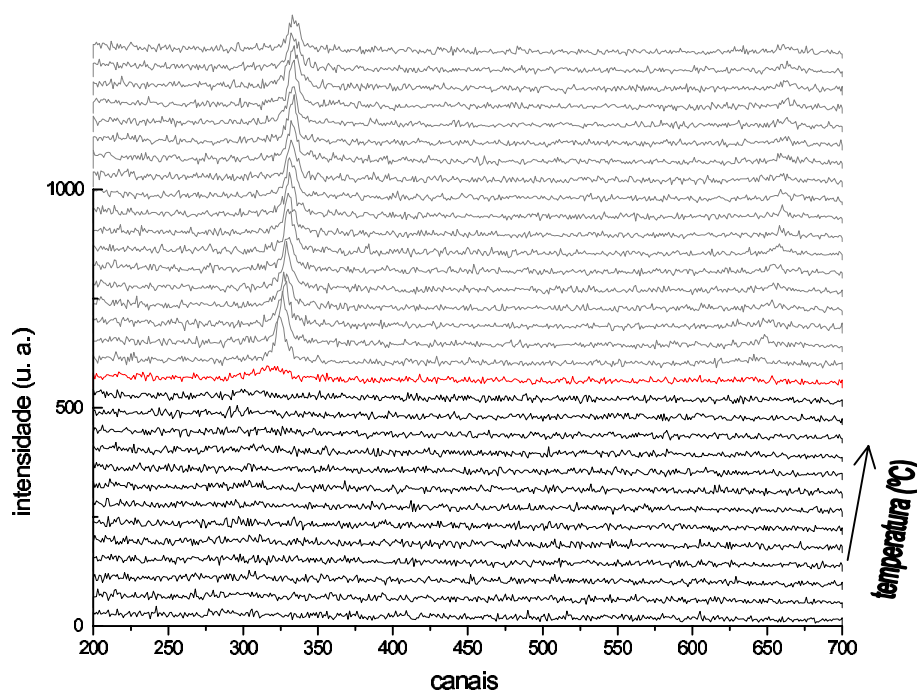


Figura 45: Resultados das medidas de difração de raios X com aquecimento in situ. Cinética de transição de fase termotrópica para a amostra R10 (dispersão aquosa de vesículas multilamelares do sistema misto DPPC(10)/ELPT(1), 10mg/ml) O espectro em vermelho apresenta coexistência de fases.

Temperatura de TF em função da razão molar DPPC:ELPT

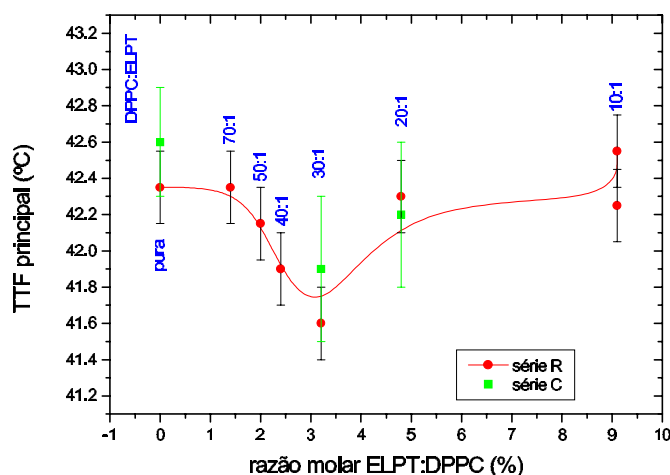


Figura 46: Temperatura de transição de fase para as amostras de LMLV's da série R (preparadas em Rotoevaporadora) e e também para aquelas amostras da série V (preparadas em Vortex) que têm concentração 10mg/ml. A linha contínua é somente um guia para os olhos.

O gráfico da Figura 46 mostra os valores das temperaturas de transição de fase em função da razão molar DPPC:ELPT para todas as amostras da série R e para algumas amostras da série V (as que têm concentração lipídeo/água igual às da série R: 10mg/ml). Embora as séries V e R não possam ser comparadas em valor absoluto por terem sido preparadas sob diferentes condições de secagem, agitação, incubação, etc, podemos observar um comportamento bastante semelhante apontando para o fato de que a temperatura de transição de fase principal apresenta um mínimo em torno da concentração de 3.5% de ELPT, o que corresponde à razão molar DPPC:ELPT de 30:1*. Este comportamento sugere que esta seja uma região crítica para a concentração de fármaco

* No gráfico da Figura 46, a razão molar expressa em termos de porcentagem de ELPT em relação a DPPC é conveniente para a comparação entre as amostras da série V com a amostra pura de DPPC indicada como 0% de ELPT. Entretanto, a outra notação (a razão inversa DPPC:ELPT) também será utilizada porque expressa de maneira mais clara a relação entre o número de cadeias acílicas de lipídeos para cada molécula de fármaco no sistema.

dentro da membrana. Depois dessa região crítica observada, a temperatura de transição de fase volta a ficar próxima a da amostra de DPPC pura. Poderíamos sugerir uma espécie de saturação e difusão da droga para fora das regiões hidrofóbicas da membrana. Outros estudos sobre a incorporação de pireno em membranas de lipídeo sugerem o mesmo efeitoⁱⁱⁱ.

Análise do Perfil do Primeiro Máximo de Difração

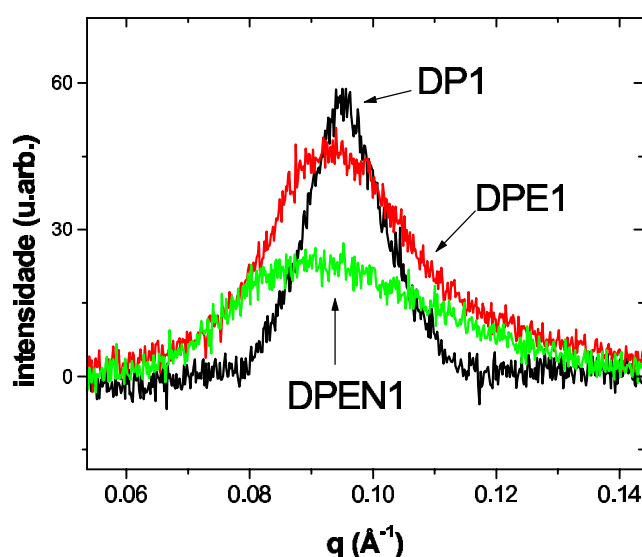


Figura 47: Exemplo dos resultados das medidas de difração de raios X com temperatura fixa, 25°C. Variação da largura do pico com a adição de ELPT no sistema.

A largura do pico, no caso das LMLV's, está relacionada ao número de camadas e a ordem a longo alcance da estrutura lamelar. Quanto mais perfeita é a estrutura lamelar, menor a largura do pico. O gráfico da Figura 47 mostra um exemplo da variação da largura do pico em função do acréscimo de ELPT a uma temperatura constante. A reflexão 001 da estrutura lamelar das amostras da série V foi, então, analisada em duas temperaturas

ⁱⁱⁱ Souza, C. F., Tese de Mestrado, Instituto de Física Gleb Wataghin - UNICAMP, 1984

diferentes: 25 e 50°C a fim de caracterizar as duas fases lamelares: $L\beta'$ e $L\alpha$ respectivamente.

O gráfico da Figura 48 mostra o perfil da reflexão 001 da estrutura lamelar a 50°C para todas as amostras da série V.

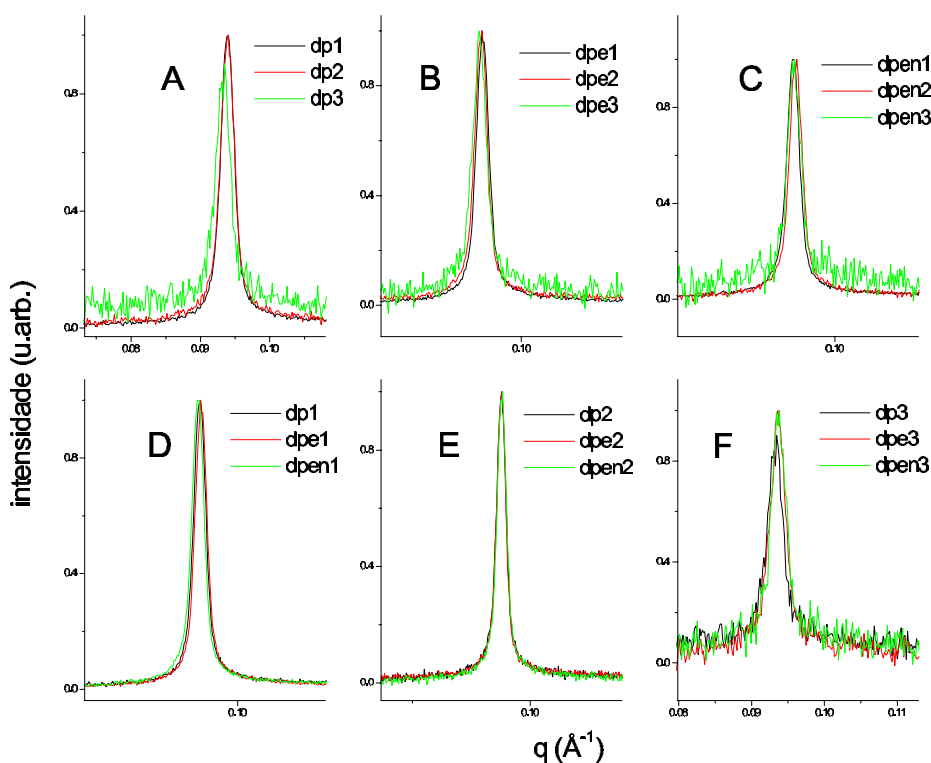


Figura 48: Primeira reflexão lamelar a temperatura de 50°C. Comparação pela variação dos dois parâmetros em separado: A, B, C: variação da quantidade de água; D, E, F: variação da quantidade de ELPT. Tomemos os exemplos A e D: em A, variamos a concentração de água para o mesmo sistema (DPPC pura). Os índices 1, 2 e 3 referem-se às três concentrações de lipídeo em água 19, 10 e 3mg/ml. Em D, variamos a razão molar DPPC:ELPT dos sistemas (DPPC pura, 30:1 e 20:1) para uma única concentração lipídeo/água (19mg/ml).

A 50°C, como vemos na Figura 48, não existe variação significativa da posição ou da largura do pico para a série inteira.

Já à temperatura ambiente, observamos uma variação significativa na largura do pico como mostra a Figura 49. Esta influência é mais sentida nos sistemas com menor quantidade de água. Quanto mais água ou quanto mais ELPT, maior a largura do pico até um certo limiar como vemos na Figura 49E, onde para DPE2 e DPEN2 não vemos mais variação. No gráfico da Figura 49F, para DP3, DPE3 e DPEN3 não há mais variação significativa na largura.

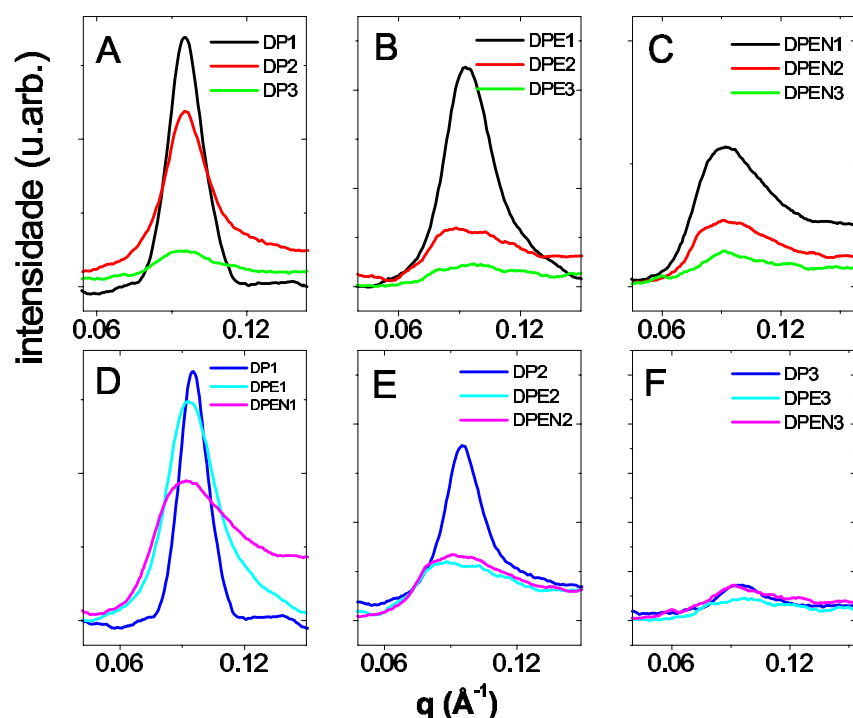


Figura 49: Resultados das medidas de difração de raios X com temperatura fixa, 25°C. Variação da largura do pico com a adição de ELPT no sistema. Comparação pela variação dos dois parâmetros em separado (A, B, C: variação da quantidade de água; D, E, F: variação da quantidade de ELPT). Tomemos os exemplos A e D: em A, variamos a concentração de água para o mesmo sistema (DPPC pura). Os índices 1, 2 e 3 referem-se às três concentrações de lipídeo em água 19, 10 e 3mg/ml. Em D, variamos a razão molar DPPC:ELPT dos sistemas (DPPC pura, 30:1 e 20:1) para uma única concentração lipídeo/água (19mg/ml).

Utilizando um detetor bidimensional, medimos o perfil do primeiro máximo de difração para duas amostras da série R: r3 (DPPC pura) e r6 (DPPC:ELPT = 50:1). Os resultados das medidas podem ser vistos na Figura 50 onde apresentamos o registro bidimensional em *image plate* e também um corte transversal comparando as duas amostras no gráfico do centro da figura. Uma análise qualitativa do gráfico sugere, assim como nos resultados da série V, um alargamento do pico de difração com a incorporação do fármaco. Entretanto, como a razão molar DPPC:ELPT é bastante menor para a amostra R6 em comparação com as da série V, o efeito observado é também mais atenuado. Os resultados confirmaram as medidas realizadas com detetor unidimensional.

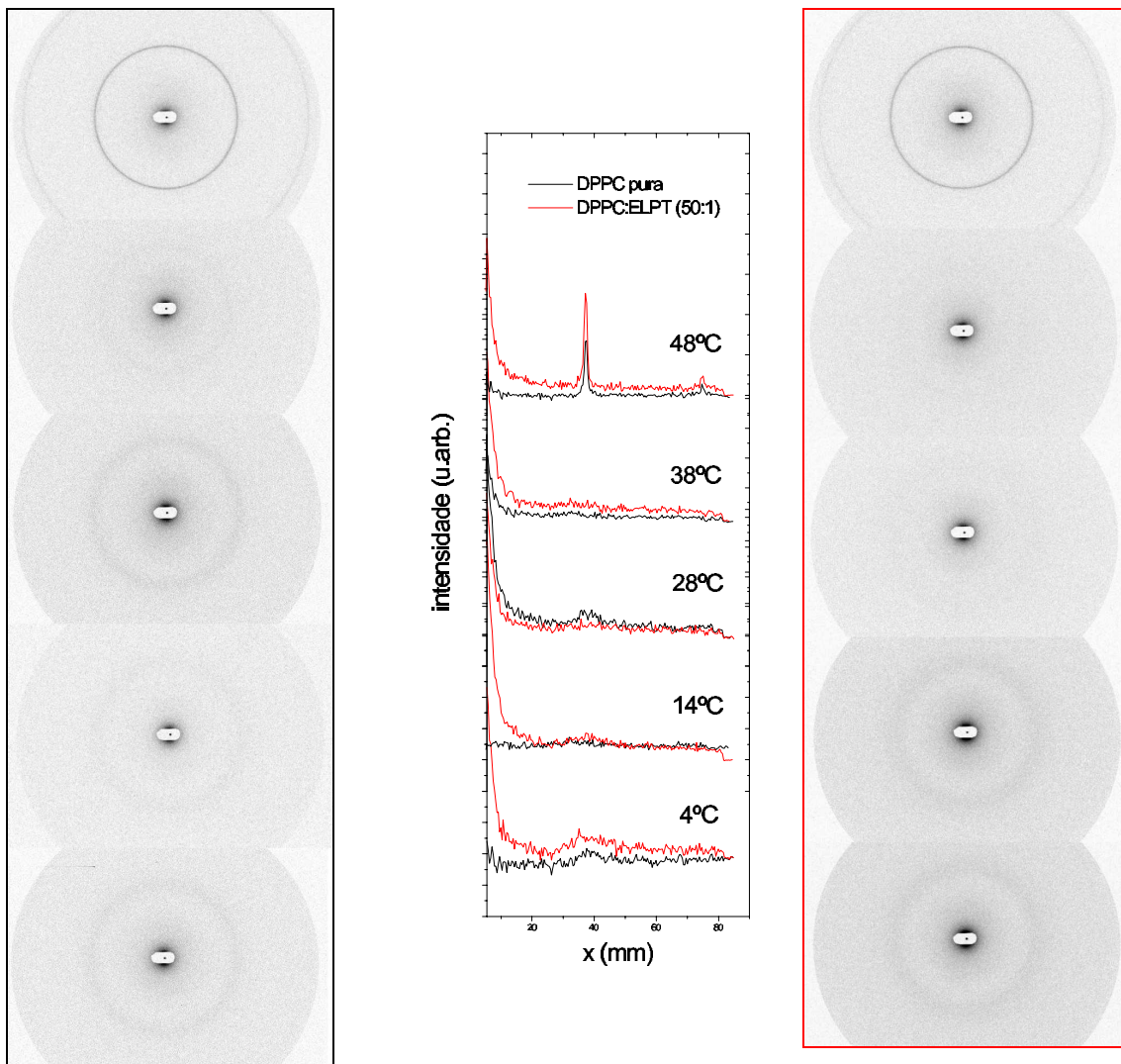


Figura 50:

Resultado da difração de raios X para as amostras r3 (preto) e r6 (vermelho) registrados em image plate e vistos em corte transversal no gráfico do centro.

Compressão Térmica da Estrutura Lamelar na Fase $L\alpha$:

Para as amostras da série V foi feito um estudo do comportamento do decrescimento do tamanho da bicamada, ao qual chamamos ‘compressão térmica da estrutura lamelar’, na fase $L\alpha$. A Figura 51 mostra a compressão térmica da estrutura lamelar do DPPC em função do aquecimento para todas as amostras da série V.

Em primeira aproximação, determinamos um valor para o coeficiente térmico linear das bicamadas no intervalo de temperatura de $\sim 45^\circ\text{C}$ a $\sim 50^\circ\text{C}$. O ajuste linear é mostrado na Figura 51 e os valores determinados são mostrados na Tabela 13.

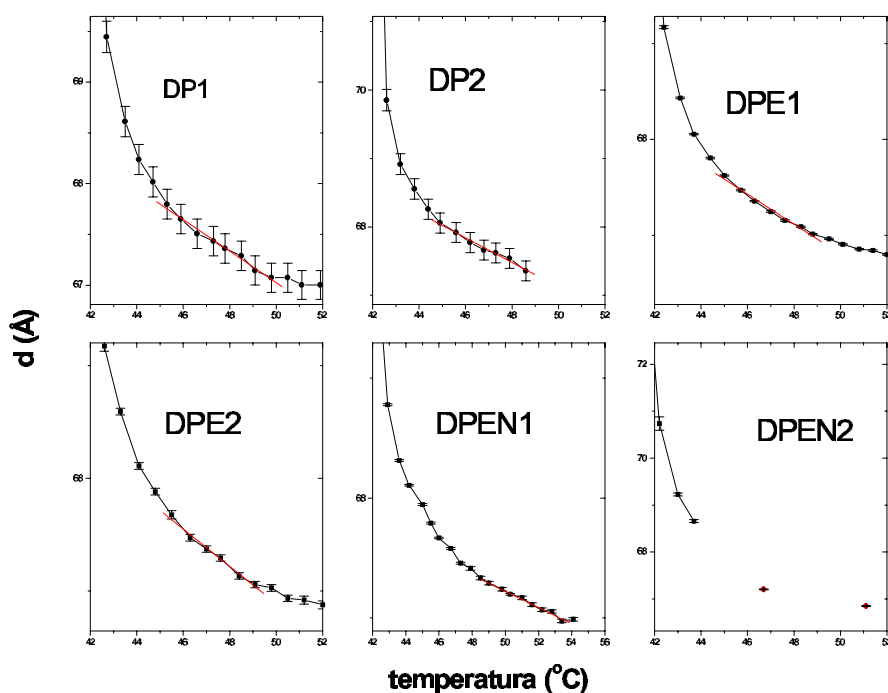


Figura 51: Ajuste linear para o decaimento do tamanho da bicamada: primeira aproximação.

Os resultados indicam que o coeficiente térmico linear no intervalo de temperatura citado é da ordem de $10^{-3}/^{\circ}\text{C}$, ou seja, quando a temperatura varia de 1°C o espaçamento decresce da ordem de 0.1%.

	DP1	DP2	DPE1	DPE2	DPEN1	DPEN2
Taxa de Decrescimento ($\text{\AA}/^{\circ}\text{C}$)	0.15	0.18	0.15	0.17	0.18	-
Coeficiente Térmico Linear ($10^{-3} / ^{\circ}\text{C}$)	2.0	2.4	2.0	2.3	2.3	-

Tabela 13: Parâmetros de ajuste linear para a taxa de decrescimento da bicamada.

Este resultado aproximado para o decréscimo linear do tamanho da bicamada está de acordo com a literatura⁸².

Entretanto observamos que a curva que melhor se ajusta a este decaimento é a exponencial decrescente de primeira ordem. Os gráficos da Figura 52 mostram os ajustes que foram realizados no intervalo de temperatura logo após a região da transição principal.

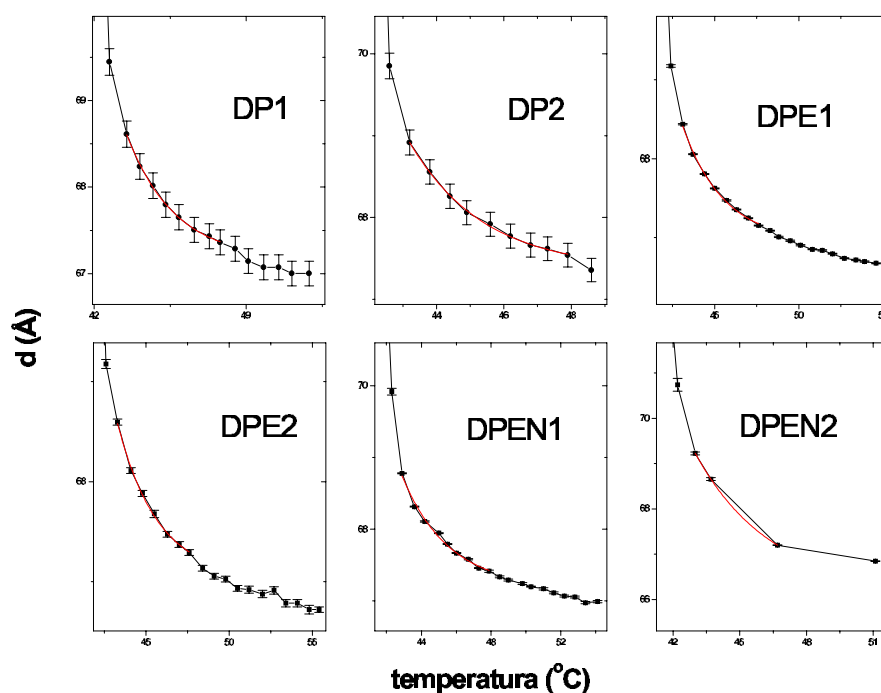


Figura 52: Ajuste do decaimento exponencial do tamanho da bicamada. A Tabela 14 mostra o intervalo de temperatura para cada ajuste.

Os valores apresentados na Tabela 14 e o gráfico da Figura 53 mostram que existe uma inclinação da curva para as amostras mais concentradas de ELPT. O parâmetro k diminui à medida que mais ELPT é adicionada ao sistema, ou seja, a taxa de decrescimento dos espaçamentos da bicamada é mais atenuada quanto maior for a concentração de ELPT.

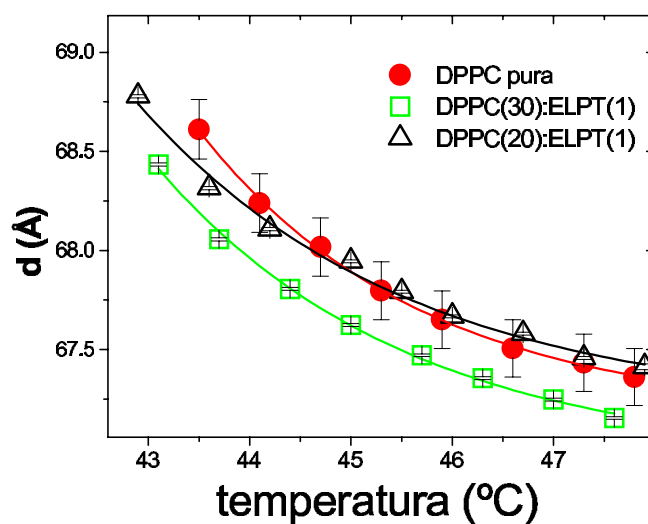


Figura 53: Ajuste do decaimento exponencial para o sistema com concentração 19mg/ml.

		DP1 ●	DP2	DPE1	DPE2	DPEN1 Δ	DPEN2
Parâmetros da exponencial de ajuste: $d_o + A e^{-k(t-t_o)}$	k	0,45±0,02	0,45±0,02	0,40±0,03	0,42±0,03	0,38±0,06	*
	t_o	43,5	43,2	43,1	43,3	42,9	43,0
	A	1,44±0,03	1,55±0,03	1,47±0,06	1,54±0,06	1,55±0,09	*
	d_o	67,2	67,4	66,9	67,0	67,2	66,2
Intervalo de temperatura p/ ajuste:	T_i	43,5	43,2	43,1	43,3	42,9	43,0
	T_f	47,8	47,9	47,6	47,6	47,9	46,7

Tabela 14: Parâmetros do ajuste. O intervalo de temperatura estudado neste ajuste é aquele que se encontra logo após a transição principal (de ~43°C a 48°C). *A amostra DPEN2 não tem pontos suficientes para um ajuste nesta região.

Estudo da Concentração Crítica de Incorporação do Fármaco na Bicamada

Quando aumentamos a concentração da ELPT nos sistemas de membranas artificiais, o excesso da droga não incorporada nas regiões hidrofóbicas da membrana permanece em meio aquoso e cristaliza. Supõe-se que a ELPT incorporada se encontra dispersa na fase hidrofóbica e não contribui para a formação de cristais.

Uma maneira de determinar a concentração crítica de ELPT nos sistemas de membranas artificiais, ou seja, o valor da máxima concentração de incorporação dentro das regiões hidrofóbicas, é estudar sistemas de empilhamento de multicamadas sobre substrato de vidro com várias concentrações diferentes de ELPT e monitorar, através da técnica de difração de raios X, a formação da fase cristalina. A presença de pelo menos um pico de difração de uma fase cristalina de ELPT indica que deve haver alguma quantidade da droga em meio aquoso fora da membrana e que, portanto, a concentração da droga no sistema é superior ao valor crítico de incorporação. Abaixo desta concentração, quando a amostra não apresenta picos de difração da fase cristalina da ELPT, é evidente a ausência de nucleação e podemos inferir que a droga está dispersa nas regiões hidrofóbicas da membrana.

Fases cristalinas da ELPT

Em todos os experimentos, utilizamos ELPT em pó comprada da Sigma e dissolvida em metanol (0.5mg/ml). Primeiramente, foram realizadas medidas de difração de raios X para determinar as reflexões cristalinas deste material. Duas amostras foram preparadas para este fim: 1) o material em pó retirado da embalagem e 2) o material dissolvido em metanol e evaporado lentamente. Os resultados das medidas de difração de raios X são apresentados no difratograma da Figura 54. Estes resultados sugerem a existência de duas fases distintas. A primeira, que chamamos fase 1, é encontrada no material em pó retirado da embalagem e está indexada no banco de dados da JCPDS⁸³ de acordo com o trabalho de Courseille et al⁸⁴. Uma outra fase não

indexada, que chamamos fase 2, foi encontrada na amostra que foi dissolvida em metanol e evaporada lentamente. Esta fase 2, a qual supomos que seja formada pela captura de metanol do sistema, também foi encontrada nos sistemas lipídicos menos concentrados e no trabalho de Zacharias et al⁸⁵, como é mostrado a seguir.

O gráfico da Figura 54 mostra os difratogramas das fases 1 e 2 mencionadas. A fase 1 apresenta uma orientação preferencial na direção 020 (reflexão em $2\theta=11,3^\circ$).

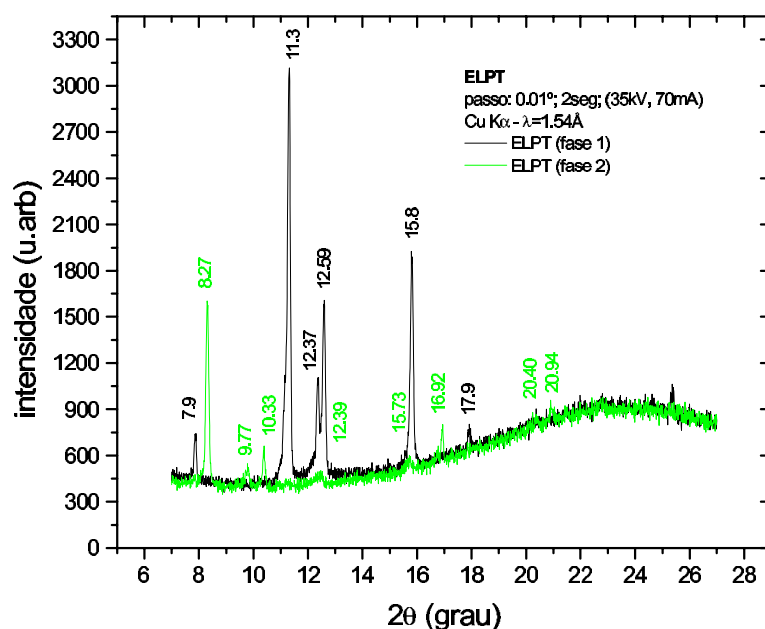


Figura 54: Resultados da difração de raios X para amostras de ELPT em pó (fase 1) e solução de ELPT em metanol depositada sobre vidro e evaporada lentamente (fase 2).

CAPÍTULO V
ANÁLISE DOS RESULTADOS

Fase 1 - ELPT

Banco de dados da JCPDS

(file 27-1925)

2θ	d (Å)	I/I₀	hkl
7,96	11,1	50	011
9,22	9,59	3	n.i.
10,75	8,23	3	n.i.
11,36	7,79	20	020
12,47	7,1	100	012
15,80	5,61	50	022
17,53	5,06	13	013
18,48	4,8	20	110
19,82	4,48	7	111
20,90	4,25	25	120
22,11	4,02	7	004
22,86	3,89	7	040,014
24,66	3,61	65	13-1
26,05	3,42	50	13-2
28,99	3,08	7	12-4,14-1
32,08	2,79	3	044
35,34	2,54	3	14-4,155
39,71	2,27	3	161,017
40,45	2,23	3	116
46,22	1,964	3	250

Fase2 - ELPT

Reflexões observadas

2θ	d (Å)	I/I₀	hkl
8,27	10,7	100	
9,77	9,1	10	
10,33	8,6	20	
12,39	7,1	5	
15,73	5,6	10	
16,92	5,2	30	
20,4	4,4	?	
20,94	4,2	?	

Amostras

Para a preparação das multicamadas de sistemas DPPC/ELPT utilizamos os métodos descritos no capítulo IV e preparamos as duas séries, que são mostradas na Tabela 15, variando a razão molar DPPC:ELPT. As razões molares entre DPPC e ELPT variam de 40:1 a 10:1 para a série M e de 50:1 a 40:1 para a série MR.

Amostra		DPPC:ELPT (razão molar)
M1	MRØ	DPPC pura
	MR1	50:1
	MR2	45:1
M2	MR3	40:1
M3		35:1
M4		30:1
M5		25:1
M6		20:1
M7		10:1

Tabela 15: Duas séries M e MR foram preparadas variando a razão molar DPPC:ELPT.

Resultados

No trabalho de Zacharias et al⁸⁵ foi estimado que o valor da concentração crítica da ELPT dentro de membranas de DPPC estaria na região coberta pela série MR. Os resultados das medidas de difração de raios X para a série MR são mostrados na Figura 55.

O gráfico mostra um pico de difração da fase 2 da ELPT em $\sim 8,4^\circ$ de 2θ para as amostras MR2 e MR3. À medida que a concentração de ELPT diminui, a intensidade desta reflexão também diminui. Esta reflexão é a única que aparece nestas amostras. O intervalo de medida cobriu a região principal do espectro (7° a 27° de 2θ) e não foi observada nenhuma outra reflexão. A amostra MR1 não apresenta a reflexão citada. Estes resultados sugerem, portanto, que, quando a ELPT cristaliza na fase 2, a concentração crítica se encontra entre as concentrações das amostras MR2 e MR3, ou seja, entre as razões molares 45:1 e 40:1.

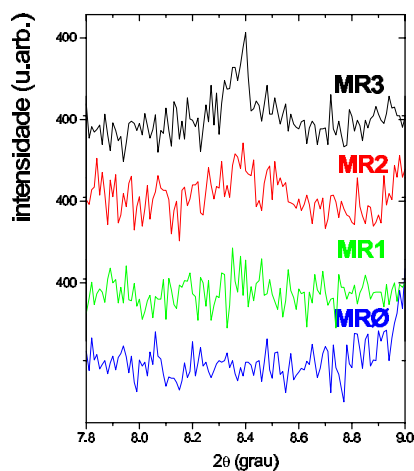


Figura 55: Resultados das medidas de difração de raios X para os sistemas mistos DPPC:ELPT com as seguintes razões molares: MR0 (DPPC pura), MR1 (50:1), MR2 (45:1), MR3 (40:1).

A série M foi preparada para estender o intervalo de razões DPPC:ELPT estudados e para a possível observação das reflexões da fase 1. Os resultados de difração de raios X para a série M são mostrados no gráfico da Figura 56. A amostra M1 não contém ELPT, mas somente multicamadas de DPPC. A partir do gráfico, vemos que a amostra M2, que contém a menor concentração de ELPT da série M, já apresenta um pico da fase 2 em $\sim 8,4^\circ$ de 2θ . Essa região de concentrações entre as amostras M1 e M2 é a mesma da série MR.

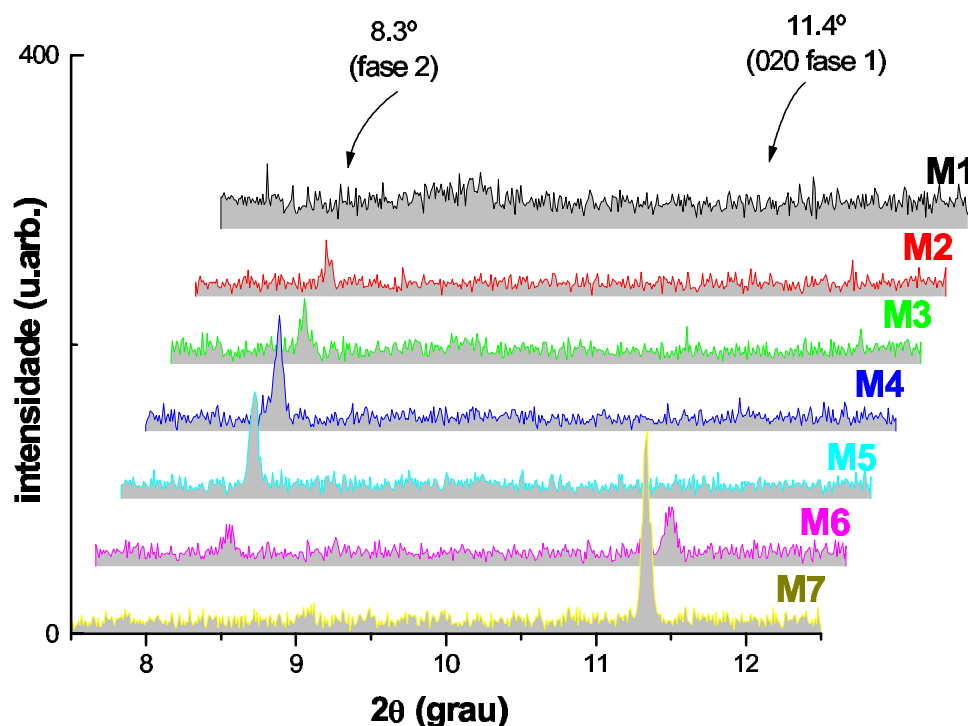


Figura 56: Resultados das medidas de difração de raios X para os sistemas mistos DPPC:ELPT com seguintes razões molares: M1 (DPPC pura), M2 (40:1), M3 (35:1), M4 (30:1), M5 (25:1), M6 (20:1), M7 (10:1).

Observando a região entre as amostras M2 a M6 vemos que existe um aumento progressivo de intensidade de uma das reflexões da fase 2, em $\sim 8,4^\circ$ de 2θ , até a amostra M4, sugerindo um aumento do volume parcial desta fase cristalina no sistema. O espectro M6 apresenta uma diminuição da intensidade daquela reflexão ao mesmo tempo em que começa a ser observado um pico de difração da fase 1 em $\sim 11,3^\circ$ de 2θ mostrando a coexistência das duas fases. O difratograma da amostra M7 já não apresenta reflexões da fase 2. Aparecem dois picos de difração da fase 1, em de $2\theta \sim 11,3^\circ$ e $15,8^\circ$, não mostrado no gráfico da Figura 56, mas listado na Tabela 16. As amostras M6 e M7, para as quais observamos as reflexões da fase 1, são as mais concentradas da série M. Para essas amostras, as razões molares entre DPPC:ELPT são de 20:1 e 10:1 respectivamente. Estes

resultados sugerem que a formação das duas fases cristalinas identificadas para a Elipticina depende de sua concentração na membrana. A Tabela 16 mostra mais claramente estes limites de concentração de saturação e sugere que uma razão molar adequada para considerar a ausência de espécies cristalinas na bicamada seria 50:1.

amostra	DPPC:ELPT	Picos ELPT (2 θ (grau))			
M1 / MRØ	DPPC pura				
MR1	50:1				
MR2	45:1	8,4			← formação da fase 2
M2 / MR3	40:1	8,4			
M3	35:1	8,39			
M4	30:1	8,39			
M5	25:1	8,39			
M6	20:1	8,38	11,3		← formação da fase 1
M7	10:1		11,3	15,8	

Tabela 16: Reflexões mostradas no gráfico da Figura 56. Estão assinaladas em amarelo e verde as reflexões das fases 1 e 2 da ELPT respectivamente.

Interação da ELPT com a Cardiolipina

Como mencionamos anteriormente, é possível aumentar a concentração crítica de ELPT no sistema através da introdução de um lipídeo aniônico na composição da membrana. O trabalho de El Mashak et al⁸⁶ mostra alguns resultados da caracterização de monocamadas de Langmuir com variada composição de fosfolípidos e incorporação de ELPT. Dentre os fosfolípidos ali estudados, a cardiolipina (CL) foi o que apresentou maior interação com a ELPT, juntamente com o ácido fosfatídico.

No presente trabalho estudamos o comportamento estrutural de multicamadas mistas DPPC/CL depositadas sobre vidro e observamos, como era de esperar, que a introdução de CL pode trazer algum desordenamento na matriz lipídica formada pela

DPPC. As moléculas de cardiolipina com quatro cadeias hidrocarbonadas causam um desarranjo quando intercaladas com as cadeias duplas do DPPC. O resultado da difração de raios X para as diferentes razões molares DPPC/CL na composição da membranas modelo relacionadas na Tabela 17 é mostrado na Figura 57.

Amostra	DPPC:CL
CL1	4:1
CL2	4,7:1
CL3	6,5:1
CL4	8,6:1

Tabela 17: Razão molar das amostras de multicamadas de membrana mista DPPC:CL.

Os difratogramas mostram a ocorrência de uma segunda fase lamelar para as amostras mais concentradas em CL. A última amostra, CL4, com razão molar DPPC(8,6):CL(1), teria uma concentração próxima da ideal, pois mostra que as reflexões daquela segunda fase desaparecem, sugerindo uma estrutura lamelar única com a CL incorporada.

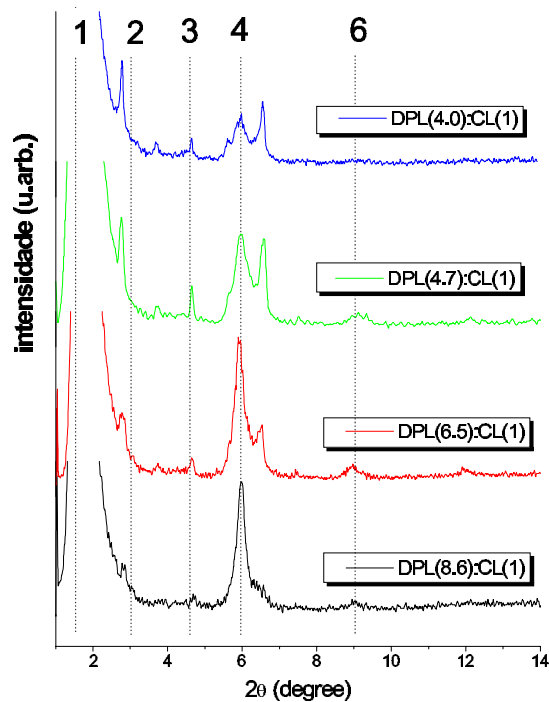


Figura 57: Resultados de DRX para diferentes composições da membrana mista DPPC/CL. As linhas indicadas com os números de 1 a 6 marcam as posições das primeiras ordens de difração da estrutura lamelar da membrana de DPPC pura. Os difratogramas mostram a ocorrência de uma segunda fase para as amostras mais concentradas em CL.

Consideramos a razão molar DPPC:CL da amostra CL4 como sendo a adequada para a nova matriz mista e com ela preparamos a amostra C2 da série C para testar a sua capacidade de incorporação de ELPT.

Amostras Série C	Composição (razão molar)
C2	DPPC(6,6):CL(0,8):ELPT(1)
C1	DPPC(6,6):ELPT(1)
C0	DPPC pura

Tabela 18: Descrição das amostras da série C.

Os difratogramas da Figura 58 mostram que para C2, a amostra de membrana mista com razão molar DPPC(6,6):CL(0,8):ELPT(1), não encontramos picos da fase cristalina da ELPT. Note que a razão DPPC:ELPT da amostra C1 é exatamente a mesma de C2.

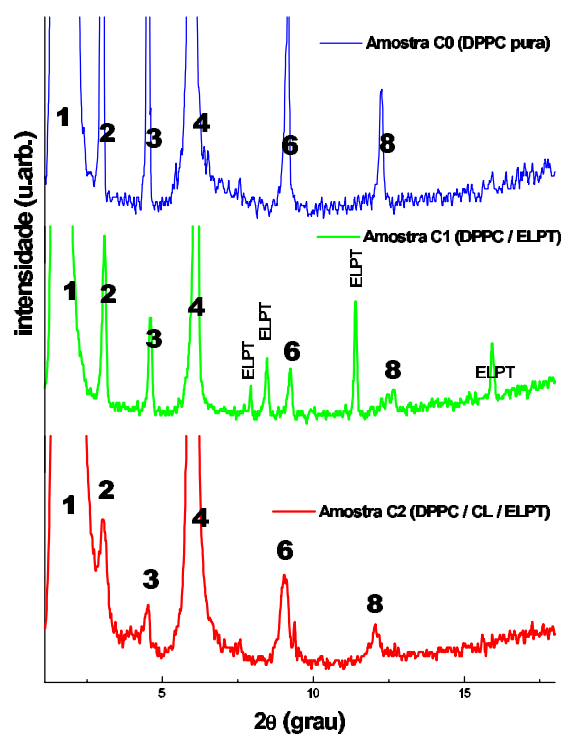


Figura 58: Resultados da difração de raios X para a amostra C2 de membrana mista com razão molar DPPC(6,6):CL(0,8):ELPT(1), em vermelho, comparados aos resultados da amostra C1 de membrana simples com razão molar DPPC(6,6):ELPT(1), em verde, e da amostra C0, membrana de DPPC pura, em azul. A curva vermelha, C2, não mostra picos da fase cristalina da ELPT.

RESUMO DOS RESULTADOS PARTE I:

De maneira geral, observamos que a estrutura lamelar das LMLV's e das multicamadas de lipídeo são alteradas pela incorporação de Elipticina e pela concentração lipídeo/água. A análise dos resultados desta parte do estudo permitiu verificar que:

O comportamento liotrópico das membranas modelo foi estudado com amostras contendo duas relações lipídeo:água (19mg/ml e 10mg/ml). Tanto a temperatura de pré-transição como a temperatura de transição principal mostraram uma tendência à diminuição para as amostras mais diluídas.

O efeito da incorporação de ELPT na membrana foi estudado em duas séries de amostras com variação da razão molar DPPC:ELPT e com a mesma concentração lipídeo/água 10mg/ml. Nota-se que a incorporação de ELPT causa uma diminuição na temperatura de transição principal que logo volta a aumentar, ou seja, existe um mínimo na curva de transição de fase principal em função da concentração que corresponde à razão molar DPPC:ELPT de 30:1. Este comportamento sugere que esta seja uma região de concentração crítica para a incorporação de fármaco dentro da membrana.

A ordem na estrutura lamelar, evidenciada pelas alterações na largura da reflexão 001 dos espectros, não mostra variação significativa em função da quantidade de água ou da concentração de ELPT na membrana a 50°C. Já à temperatura ambiente, observamos uma variação significativa na largura do pico mais marcada nos sistemas com maior quantidade de água.

A mudança nos espaçamentos lamelares da membrana na fase $L\alpha$ apresenta um comportamento exponencial decrescente no intervalo de temperatura de ~45°C a ~50°C. A curva de ajuste para cada sistema, mostra que o coeficiente de compressão térmica é menor quanto maior for a concentração de ELPT.

A cristalização do composto ELPT nas multicamadas foi estudada a partir de amostras de multicamadas depositadas sobre vidro para as diferentes composições DPPC:ELPT. Uma fase cristalina não reportada na literatura foi identificada e variando-se a razão molar DPPC:ELPT determinamos as concentrações de saturação das multicamadas para as duas fases cristalinas da ELPT.

A introdução de um fosfolípido aniônico na membrana de DPPC favorece a incorporação de ELPT. Vimos que a razão molar DPPC(6.6):CL(0.8):ELPT(1) satisfaz o compromisso de favorecer a incorporação de ELPT gerando uma única fase lamelar.

Parte II

INTERAÇÃO DE HAP'S COM A MEMBRANA DE DPPC.

INTRODUÇÃO

Esta segunda parte do capítulo mostra os resultados do estudo estrutural realizado com amostras de vesículas multilamelares com incorporação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HAP's) da série H descrita no capítulo IV.

Para verificar possíveis alterações na cinética de transição de fase termotrópica em função dos diferentes PAH's adicionados foram realizadas medidas com aquecimento *in situ* para a série H. Cada espectro, foi registrado com acumulação de um minuto, através de detetor linear sensível a posição, e aquecimento do sistema através de rampas de aproximadamente 0,7°C/min. No intervalo útil* medido ($\sim 0,009$ a $\sim 0,306 \text{ \AA}^{-1}$) foi possível registrar apenas uma ordem de difração da estrutura lamelar da membrana lipídica.

A série H também foi medida com temperatura constante e igual a 45°C a fim de que a compressão térmica da fase lamelar $L\alpha$ das vesículas fosse caracterizada em função dos diferentes PAH's adicionados, com uma só concentração em solução tampão que ficou em torno de 10mg/ml.

Parâmetros Caracterizados

Como resultado dessas medidas, foi possível caracterizar as seguintes grandezas: (1) a distância de repetição da estrutura lamelar da DPPC, importante para determinar o tamanho da bicamada e caracterizar o efeito de compressão térmica lamelar, (2) a ordem a longo alcance monitorada através da largura da reflexão 001 e (3) a temperatura de transição de fase principal em função da hidratação e do tipo de composto incorporado.

Parâmetros da Literatura

A fim de comparar as grandezas por nós determinadas com outros parâmetros importantes dos HAP's, organizamos os resultados de alguns trabalhos, dentre os citados na

* Sem considerar os canais do detetor que foram obstruídos pelo beam-stop.

literatura, que são o índice IBALL⁸⁷ de atividade carcinogênica, e o tamanho dos HAP's segundo a ordem citada no trabalho de Sanioto & Schreier⁸⁸.

RESULTADOS DA PARTE II

Abaixo, transcrevemos a Tabela 9 com a descrição da série H e a Figura 13 com as respectivas estruturas para facilitar a identificação das amostras referidas nos resultados.

Identificação das Amostras	Concentração do lipídeo DPPC em mg/ml de água nos sistemas puros e mistos.			
HAP's	19mg/ml	10mg/ml	7mg/ml	4mg/ml
Pireno	118	119	120	121
DMBA	122	123	124	125
BP	126	127	128	129
MC	-	130	131	132
DBA	-	134	-	136
BA	-	138	139	140

Tabela 19: Descrição das amostras da série H.

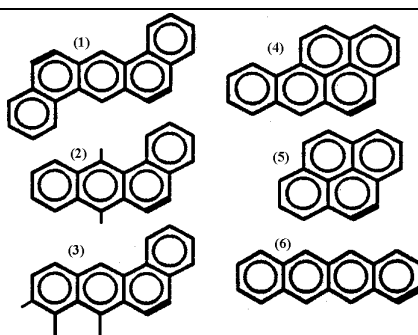


Figura 59: Estrutura dos HAP's da série H: 1) DBA: 1,2,5,6-dibenzantraceno ($C_{22}H_{14}$); 2) DMBA: 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ($C_{20}H_{16}$); 3) MC: 20-metilcolantreno ($C_{21}H_{16}$); 4) BP: 3,4-benzopireno ($C_{20}H_{12}$); 5) Pireno: ($C_{16}H_{10}$); 6) BA: 2,3-benzantraceno ($C_{18}H_{12}$).

Comparação dos parâmetros estudados

A Tabela 20 mostra os resultados da comparação entre as grandezas por nós determinadas, que são os espaçamentos interlamelares das vesículas (d_v), os valores das Temperaturas de Transição de Fase principal (TTF principal) e a largura da reflexão 001 (FWHM) e os valores encontrados na literatura para o índice IBALL de atividade carcinogênica⁸⁷ e o peso molecular e tamanho dos HAP's estudados.

HAP's	peso molecular	$d_v(\text{\AA})$ erro ≤ 0.03	TTF(°C) erro ≤ 0.4	$w(\text{\AA}^{-1})$ erro $\leq 2 \times 10^{-4}$	IBALL	Tamanho
DPPC		67,518	42,35	0,00240		
PYR	202,3	67,11	41,4	0,00173	0	1
BA	228,3	66,71	42,6	0,00228	0	2
BP	252,3	66,39	41,6	0,00178	72	5
DMBA	256,3	67,34	41,55	0,00199		3
MC	268,4	66,36	39,0	0,00163		6
DBA	278,4	66,31	40,9	0,00224	26	4

Tabela 20: Comparação dos valores dos espaçamentos interlamelares das vesículas (d_v), das TTF principal e das FWHM da reflexão 001 da estrutura lamelar com o peso molecular, tamanho e índice IBALL para cada um dos HAP's estudados.

Podemos observar, através da Tabela 20, que os valores das distâncias de repetição da estrutura lamelar das vesículas de DPPC diminuem com a incorporação dos compostos estudados. Comparando esses valores com os outros parâmetros da literatura, vemos que, para alguns dos HAP's estudados, existe uma correlação entre a diminuição da distância de repetição da estrutura lamelar e o aumento do peso molecular e do tamanho do composto.

Com relação à transição de fase principal, vemos que existe uma diminuição do valor da TTF com a incorporação dos HAP's com exceção do BA. Essa diminuição também está correlacionada ao aumento do peso molecular dos compostos incorporados.

A largura da reflexão 001 da estrutura lamelar das vesículas de DPPC diminui com a incorporação dos compostos estudados. Comparando esses valores com os outros parâmetros da literatura, vemos que, para alguns dos HAP's estudados, existe uma

correlação entre a diminuição da largura do pico e a diminuição do peso molecular. A tabela mostra também que existe uma correlação entre a diminuição da largura do pico e o aumento da atividade carcinogênica e do tamanho do composto.

Distâncias de repetição

HAP's	$d_v(\text{\AA})$	$d_m(\text{\AA})$	Razão d_v/d_m
DBA	$66,31 \pm 0,02$	58,8	1,13
MC	$66,36 \pm 0,01$	--	--
BP	$66,39 \pm 0,02$	59,1	1,12
BA	$66,71 \pm 0,02$	--	--
PYRENE	$67,11 \pm 0,02$	59,4	1,13
ELPT	$67,250 \pm 0,007$	--	--
DMBA	$67,34 \pm 0,03$	--	--
DPPC	$67,5176 \pm 7E-4$	60,6	1,11

Tabela 21: Valores das distâncias de repetição das vesículas com incorporação dos HAP's estudados comparados com multicamadas depositadas sobre vidro.

As distâncias de repetição da estrutura lamelar da DPPC foram medidas para as amostras de vesículas da série H (d_v) e comparadas com valores da literatura⁸⁹ obtidos para amostras de multicamadas depositadas em vidro (d_m). A **Tabela 21** mostra os resultados que obtivemos para a série H e também para a DPPC pura juntamente com os valores encontrados para quatro amostras de sistemas idênticos, porém, depositadas sobre vidro. As distâncias de repetição das vesículas são maiores como já sabido na literatura, entretanto, observamos que a diferença é de um fator constante nestes quatro casos como apresentado na última coluna da **Tabela 21** e ilustrado no gráfico da **Figura 60**.

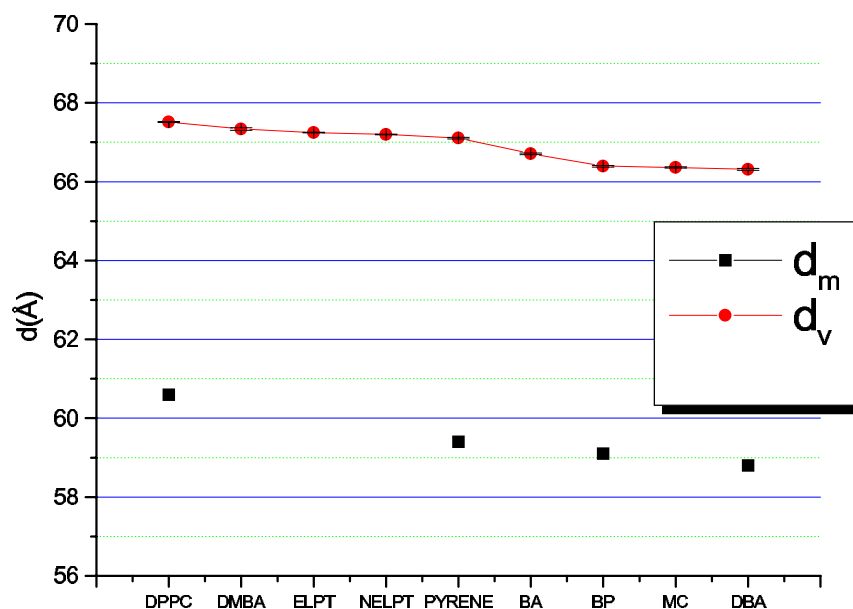


Figura 60: Valores das distâncias de repetição das vesículas com incorporação dos HAP's estudados comparados com multicamadas depositadas sobre vidro.

Compressão Térmica da Estrutura Lamelar da Fase $L\alpha$:

O comportamento de compressão térmica das membranas de DPPC na fase $L\alpha$ foi estudada em função da incorporação de HAP's. As figuras que seguem abaixo apresentam a cinética de transição de fase da estrutura lamelar da DPPC para as amostras da série H onde podemos observar o deslocamento da reflexão 001 em função da temperatura e da hidratação para todos os HAP's estudados.

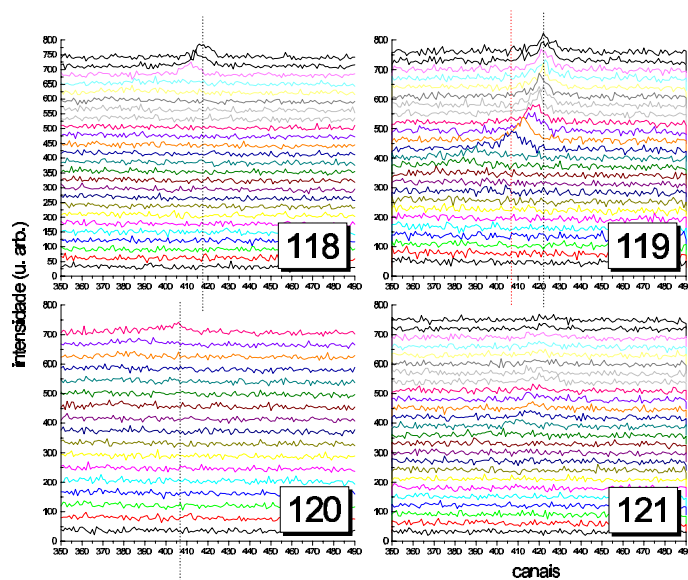


Figura 61: Resultados de difração de raios X em função da temperatura para diferentes concentrações de pireno em solução tampão: 118: 19mg/ml; 119: 10mg/ml; 120: 7mg/ml; 121: 4mg/ml.

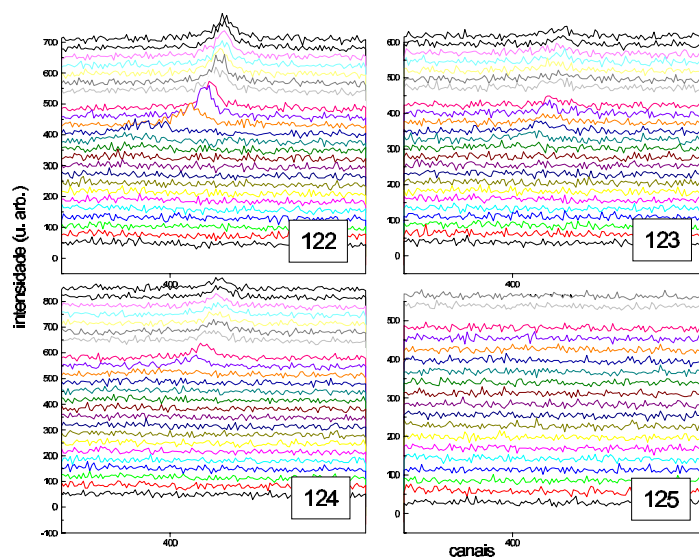


Figura 62: Resultados de difração de raios X em função da temperatura para diferentes concentrações de DMBA em solução tampão: 122: 19mg/ml; 123: 10mg/ml; 124: 7mg/ml; 125: 4mg/ml.

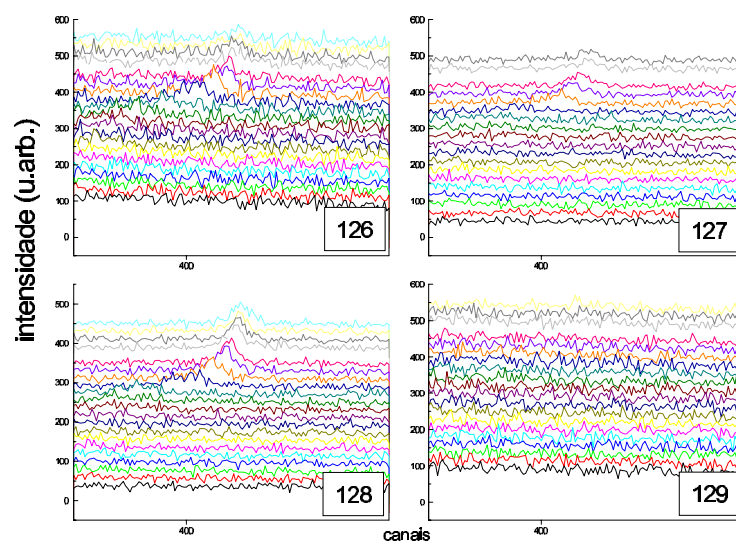


Figura 63: Resultados de difração de raios X em função da temperatura para diferentes concentrações de BP em solução tampão: 126: 19mg/ml; 127: 10mg/ml; 128: 7mg/ml; 129: 4mg/ml.

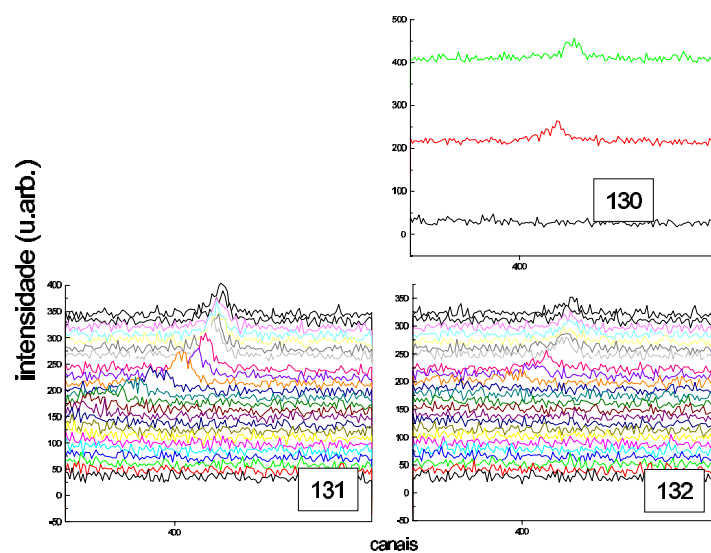


Figura 64: Resultados de difração de raios X em função da temperatura para diferentes concentrações de MC em solução tampão: 130: 10mg/ml; 131: 7mg/ml; 132: 4mg/ml.

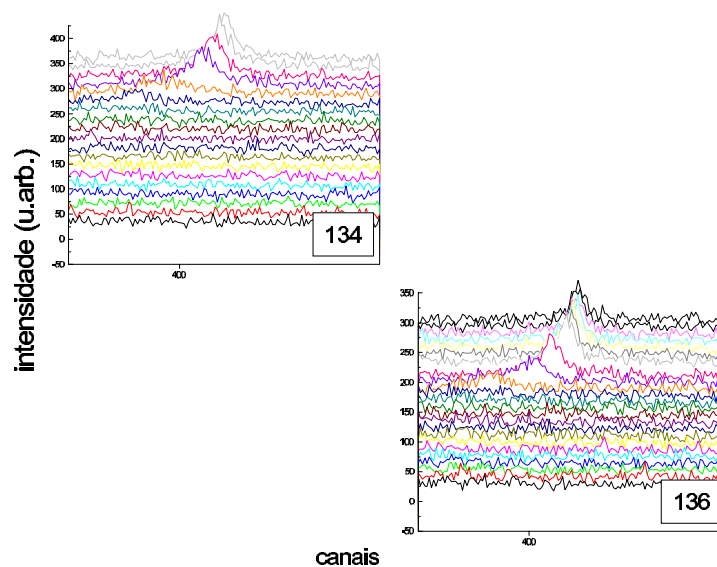


Figura 65: Resultados de difração de raios X em função da temperatura para diferentes concentrações de DBA em solução tampão: 134: 10mg/ml; 136: 4mg/ml.

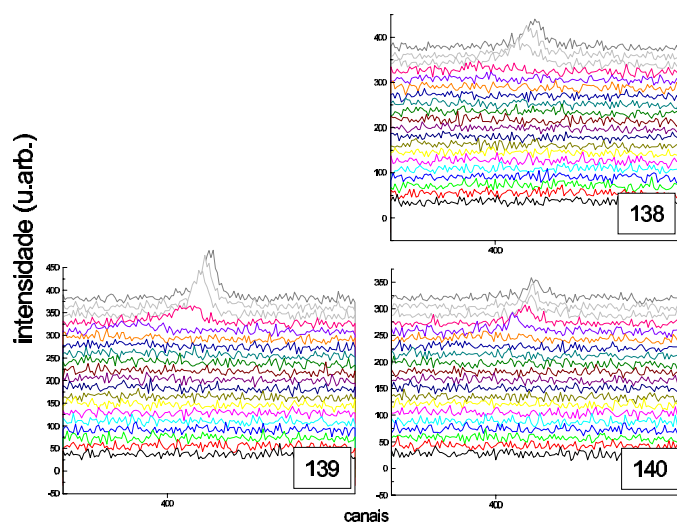


Figura 66: Resultados de difração de raios X em função da temperatura para diferentes concentrações de BA em solução tampão: **138:** 10mg/ml; **139:** 7mg/ml; **140:** 4mg/ml.

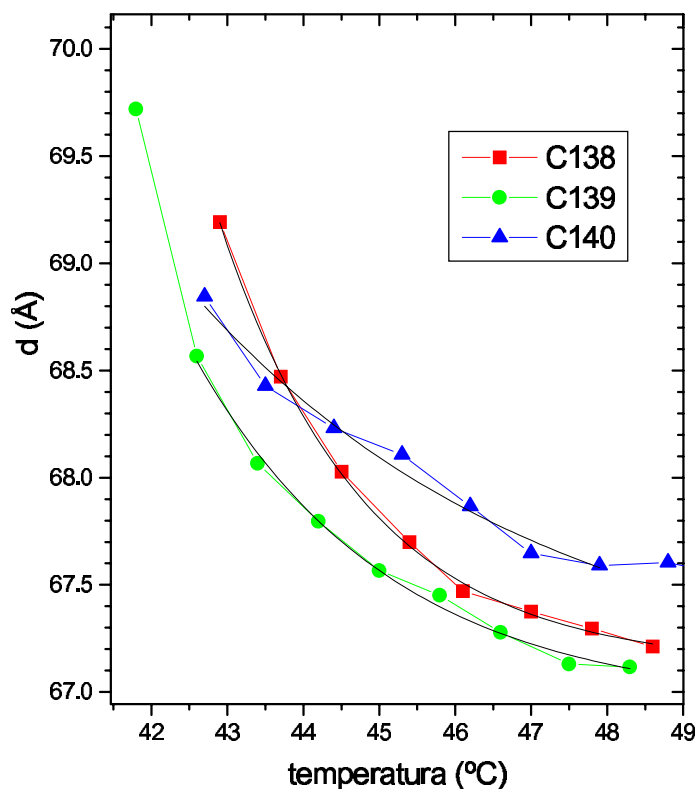


Figura 67: Distância de repetição em função da temperatura para três diluições diferentes de LMLV's de DPPC com incorporação de BA.

A **Figura 67** mostra o decaimento do tamanho da bicamada na estrutura lamelar do DPPC em função do aquecimento para três diluições diferentes de BA. Assim como foi feito na primeira parte deste capítulo, com relação ao estudo da ELPT, vemos que as curvas da **Figura 67** podem ser ajustadas por uma exponencial decrescente de primeiro grau. Para as curvas de espalhamento das diferentes diluições da amostra de BA, a taxa de decrescimento da bicamada é mais atenuada, ou seja, o parâmetro k diminui, quanto maior for a concentração da amostra, como vemos na Tabela 22. Entretanto, de maneira geral, podemos observar através da **Figura 68**, que não existe um comportamento uniforme com

relação à hidratação na caracterização da compressão térmica da estrutura lamelar do DPPC com a incorporação dos outros HAP's estudados.

BA com diferentes diluições em solução tampão		10mg/ml	7mg/ml	4mg/ml
Parâmetros da exponencial de ajuste: $d_o + A e^{-k(t-t_o)}$	k	1,92±0,07	2,6±0,3	4,7±2,1
	t _o	42,9	42,6	42,7
	A	2,07±0,03	1,61±0,07	1,8±0,5
	d _o	67,12±0,03	66,93±0,07	67,0±0,5
Intervalo de temperatura p/ ajuste:	T _i	42,9	42,6	42,7
	T _f	48,6	48,3	47,9

Tabela 22: Ajuste dos parâmetros de uma exponencial decrescente de primeira ordem à variação dos espaçamentos interlamelares da membrana de DPPC na fase *L_α* com incorporação de BA em três diluições diferentes.

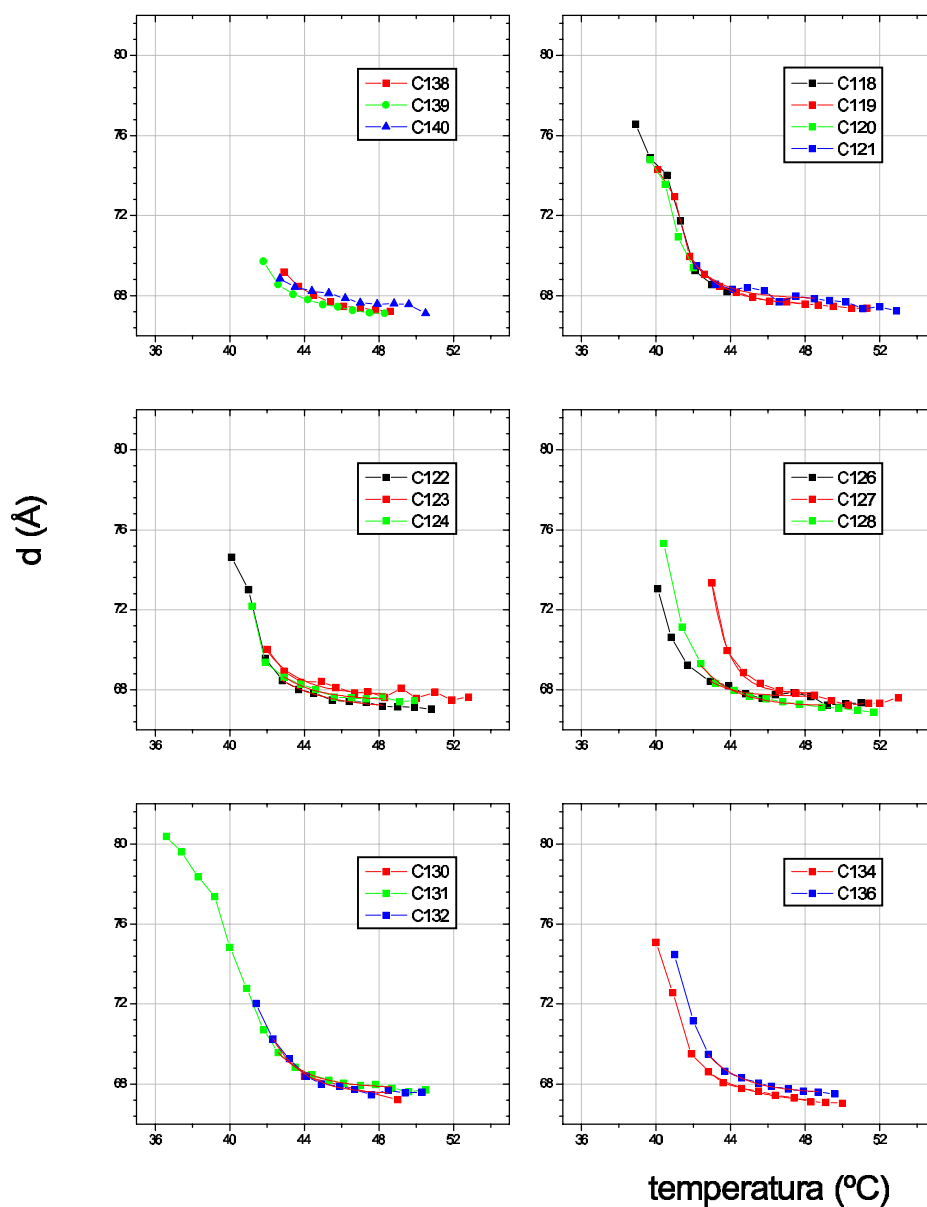


Figura 68: Distância de repetição em função da temperatura para as amostras da série H.

Analisando separadamente, os resultados das amostras de HAP's com concentração em torno de 10mg/ml, observamos que a taxa de decrescimento da espessura

da bicamada, representada pelo índice **k** na **Tabela 23**, diminui com o aumento do valor da TTF principal como vemos na **Tabela 24**. Os resultados mostram ainda que o índice **k** é bem menor para a amostra de DPPC pura do que para as amostras com incorporação dos HAP's.

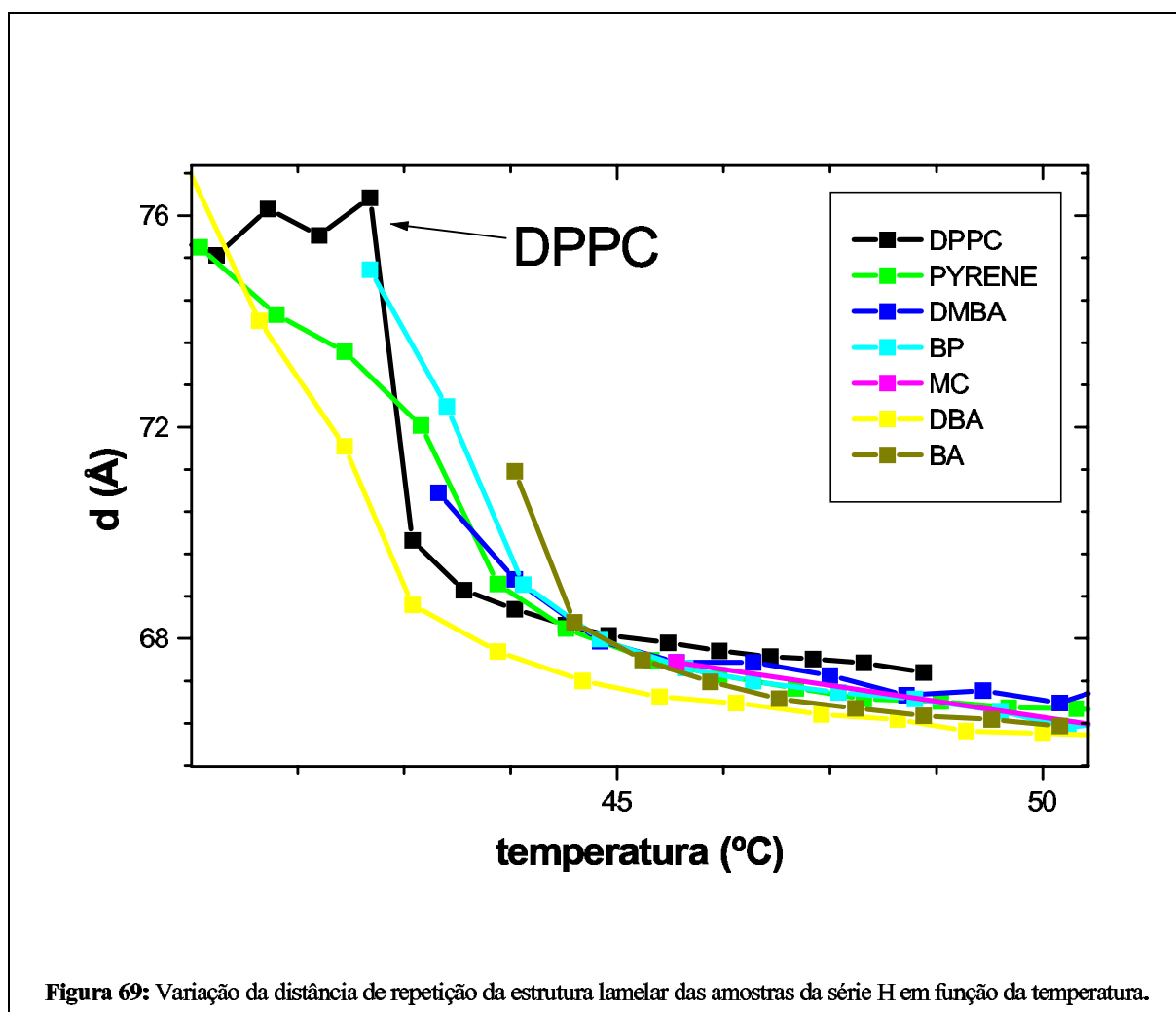
		Pyr 9.5mg/ml (amostra 119)	DMBA 9.8mg/ml (amostra 123)	BP 9.7mg/ml (amostra 127)	MC 10.3mg/ml (amostra 130)	DBA 10.2mg/ml (amostra 134)	BA 10.4mg/ml (amostra 138)	DPPC 10mg/ml (amost. DP2)
Parâmetros da exponencial de ajuste: $d_o + A e^{-k(t-t_o)}$	k	1,8±0,1	1,8±0,4	0,93±0,08	-	2,7±0,7	1,92±0,07	0,45±0,02
	t_o	41,8	42	43	-	42,8	42,9	43,2
	A	2,43±0,05	2,2±0,2	5,5±0,2	-	1,6±0,2	2,07±0,03	1,55±0,03
	d_o	67,53±0,04	67,7±0,2	67,8±0,1	-	67,0±0,2	67,12±0,03	67,4
Intervalo de temperatura p/ ajuste (°C)	T_i	41,8	42,0	43,0	-	42,8	42,9	43,2
	T_f	48,0	48,3	48,5	-	48,3	48,6	47,9

Tabela 23: Ajuste dos parâmetros de uma exponencial decrescente de primeira ordem à variação dos espaçamentos interlamelares da membrana de DPPC na fase L α em função dos diferentes HAP's incorporados.

HAP's	TTF(°C) erro≤	IBALL	FW	k
MC	39,0		268,4	
DBA	40,9	26	278,4	2,7±0,7
PYR	41,4	0	202,3	1,8±0,1
DMBA	41,55		256,3	1,8±0,4
BP	41,6	72	252,3	0,93±0,08
DPPC	42,35			0,45±0,02
BA	42,6	0	228,3	1,92±0,07

Tabela 24: Valores das TTF principal para as vesículas com incorporação dos HAP's estudados comparados com outros parâmetros da literatura.

Comparando as curvas da **Figura 68** num mesmo gráfico como é visto na **Figura 69**, podemos observar que a transição de fase para a DPPC pura é mais abrupta do que para as outras amostras. Como o decaimento da curva depois da TTF é mais suave para a DPPC, isso causa um efeito que é visto no gráfico como um ponto de inversão próximo à 45°C.



RESUMO DOS RESULTADOS PARTE II:

De maneira geral, observamos que a estrutura lamelar das vesículas de lipídeo acomodam os compostos carcinogênicos nas regiões hidrofóbicas e são sensíveis às suas características físico-químicas. A análise dos nossos resultados comparados com os resultados de outros parâmetros encontrados na literatura permitiu verificar que:

Os valores das distâncias de repetição da estrutura lamelar das vesículas de DPPC diminuem com a incorporação dos compostos estudados sem exceção. A distância de repetição diminui também com o aumento do peso molecular do composto incorporado (com exceção do DMBA) e do tamanho do composto (com exceção do DBA e do DMBA).

Também vimos que a largura da reflexão 001 da estrutura lamelar das vesículas de DPPC diminui com a incorporação dos compostos estudados sem exceção, indicando que os HAP's promovem a ordenação dos planos das lamelas na fase $L\alpha$. A largura do pico diminui também com a diminuição do peso molecular (com exceção do BA e MC). Existe também uma correlação parcial entre a diminuição da largura de pico e o aumento da atividade carcinogênica (com exceção do DMBA, Pyreno e MC) e do tamanho da molécula (com exceção do Pyreno).

Foi verificado nas medidas com aquecimento *in situ* que a transição de fase principal para a DPPC pura é mais abrupta do que para as amostras com incorporação de HAP's. e vimos também que existe uma diminuição do valor da TTF com a incorporação dos HAP's (com exceção do BA). A TTF diminui ainda com o aumento do peso molecular dos compostos incorporados, (exceção feita ao MC e Pyreno).

A análise dos resultados de compressão térmica da estrutura lamelar desta série H, com incorporação de HAP's, permitiu verificar que:

Para as curvas de espalhamento das diferentes diluições da amostra de BA, a taxa de decrescimento da bicamada é mais atenuada, ou seja, o parâmetro de compressão térmica k diminui, quanto maior for a concentração lipídeo/água. Entretanto, de maneira geral, para as outras amostras da série H, vimos que não existe um comportamento uniforme com relação à hidratação na caracterização da compressão térmica da estrutura lamelar do DPPC.

Analisando separadamente os resultados das amostras de HAP's com concentração em torno de 10mg/ml, vemos que o parâmetro k diminui com o aumento do valor da TTF principal com exceção do MC e do BA. Os resultados mostram ainda que o índice k é bem menor para a amostra de DPPC pura do que para as amostras com incorporação dos HAP's.

* * *

CAPÍTULO V
ANÁLISE DOS RESULTADOS

CAPÍTULO VI

Conclusões e Perspectivas

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONTEÚDO DO CAPÍTULO VI: ``CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS``

CONCLUSÕES	149
Conclusões sobre os resultados da Parte I.....	150
Conclusões sobre os resultados da Parte II	152
PERSPECTIVAS	153
Utilização de Porta-Amostra para Líquidos sob Vácuo	153
Associação entre DSC, SAXS e WAXS.....	154
OBSERVAÇÕES GERAIS	155
BIBLIOGRAFIA	156

CONCLUSÕES

Os métodos de análise estrutural com radiação síncrotron descritos anteriormente foram aplicados no estudo de sistemas de vesículas multilamelares e multicamadas de lipídeo depositadas sobre vidro. Dessa maneira foi possível acompanhar as mudanças estruturais dos sistemas através da observação das alterações nas temperaturas de pré-transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ e de transição de fase principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$ das membranas modelo de DPPC e na ordem do empacotamento lamelar em função da incorporação de compostos hidrofóbicos.

O estudo foi dividido em duas partes: a primeira constituída pela caracterização de sistemas lipídeo/água com incorporação de Elipticina, um alcalóide de caráter hidrofóbico e propriedades de ação virostática e oncostática; a segunda constituída pela caracterização de sistemas lipídeo/água com incorporação de uma série de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, também de caráter hidrofóbico, de variado grau de atividade carcinogênica.

Conclusões sobre os resultados da Parte I

Os resultados do estudo do sistema DPPC:ELPT nos permitiram identificar comportamentos interessantes relacionando os parâmetros estruturais e o comportamento das fases termoliotrópicas estudadas. A seguir, listamos as conclusões deste estudo:

Um mínimo na curva da temperatura de transição de fase principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$ em função da razão molar DPPC:ELPT sugere um valor para a concentração crítica de incorporação da ELPT na membrana; o aparecimento da fase cristalina da ELPT na mesma região de mínimo, corrobora esta hipótese. Ainda para estes sistemas, parece evidente a saturação das multicamadas, acima da razão molar 50:1, ponto localizado no começo daquela região de mínimo.

Devido ao aumento da largura do primeiro máximo de difração da membrana na fase $L\beta'$ (à temperatura ambiente) e à ausência de alteração significativa com relação à fase $L\alpha$ (a 50°C) podemos supor que existe uma maior facilidade de incorporação de compostos hidrofóbicos na fase $L\alpha$ quando as cadeias acílicas estão na conformação fluida.

Foi verificado um aumento do coeficiente de compressão térmica dos espaçamentos interlamelares da membrana na fase $L\alpha$ e, também, um aumento do coeficiente de partição na membrana mista de DPPC/CL com razão molar otimizada de DPPC(6.6):CL(0.8):ELPT(1).

Nos sistemas mais diluídos foi observada uma tendência a diminuição da temperatura de pré-transição $L\beta' \rightarrow P\beta'$ e de transição de fase principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$ sugerindo que a diluição causa uma diminuição na interação entre os grupos polares,

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

assim como um aumento na largura do primeiro máximo de difração da membrana na fase $L\beta'$ sugerindo uma diminuição do tamanho dos domínios ordenados.

Conclusões sobre os resultados da Parte II

Enunciamos, a seguir, os resultados das experiências com o sistema DPPC:HAP's que consideramos mais relevantes nesta parte da pesquisa.

A transição de fase principal é mais abrupta para a amostra de DPPC pura do que para as amostras com incorporação dos HAP's. A temperatura de transição diminui com a incorporação dos HAP's por ordem de peso molecular com algumas exceções.

A distância de repetição da estrutura lamelar das vesículas na fase $L\alpha$ diminui com a incorporação dos HAP's estudados, sem exceção, indicando maior fluidez na região hidrofóbica das bicamadas. A largura da reflexão 001 da estrutura lamelar das vesículas diminui com a incorporação de HAP's estudados, sem exceção, o que sugere um ordenamento dos planos lamelares.

A taxa de decréscimo da espessura da bicamada, é bem menor para a amostra de DPPC pura do que para as amostras com incorporação dos HAP's com visível alargamento da região de transição.

As conclusões anteriores sugerem que a incorporação dos HAP's favorece a formação da fase líquido cristalina $L\alpha$ da membrana, causando um alargamento da região de transição, ou seja, formação de fases intermediárias mais duradouras.

PERSPECTIVAS

Utilização de Porta-Amostra para Líquidos sob Vácuo

A construção de um novo porta amostras para líquidos otimizado para medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo em vácuo foi desenhado e construído durante o desenvolvimento desta tese para ser utilizado na linha de SAXS do LNLS. Neste porta amostras, o líquido é sustentado por um capilar de boro-silicato que é atravessado pelos raios X. A montagem é adequada para medidas de SAXS e WAXS em temperatura ambiente ou com aquecimento *in situ* no intervalo de 5 a 90°C. Este aparato tem a sigla PALCA (Porta Amostras para Líquidos sustentado por CApilar). A idéia original de construção de um porta amostras para líquidos sustentado por capilar, descrita no artigo de Dubuisson et al^{iv}, foi o que deu motivação e base ao projeto.

O PALCA foi projetado visando corrigir principalmente três efeitos observados nos porta amostras para líquidos utilizados anteriormente: (1) a eliminação do espalhamento parasita causado pelo ar e (2) os efeitos de atenuação da espessura variável das amostras medidas com o porta amostras com janelas de mylar e (3) solucionar o problema de vedação propondo um sistema rigorosamente selado. Somados a estes, outros aspectos não menos significativos, como por exemplo, o espalhamento parasita bastante grande das janelas de polímero no caminho do feixe quando a montagem não é feita totalmente em vácuo, foram também corrigidos.

Os resultados dos testes mostraram excelente performance alcançada com relação ao nível de background, reprodutibilidade das medidas, efeitos da espessura da amostra atravessada pelo feixe, praticidade na realização de troca de amostras durante o experimento, e outras características gerais.

^{iv} Dubuisson, J. M., Decamps, T., Vachette, P., *J. Appl. Cryst.* (1997) **30**, 49-54

A idéia original de construção de um porta amostras para líquidos sustentado por capilar descrita no artigo de Dubuisson et al, foi incrementada e adequada às necessidades e condições de uso da linha de SAXS do LNLS. Podemos ressaltar como principais melhorias (1) a possibilidade de medida a alto ângulo e (2) o projeto inovador do núcleo que sustenta o capilar. No trabalho de Dubuisson, o capilar é colado a uma peça de metal e no PALCA, o capilar é vedado com tubos flexíveis de silicone e o’rings. Deste modo, todo o conjunto torna-se facilmente desmontável para eventuais substituições dos tubos e do próprio capilar garantindo esterilidade ao sistema.

As condições altamente favoráveis para os experimentos com amostras líquidas agora oferecidas com a utilização do PALCA, permitirão um estudo mais aprofundado dos sistemas lipídeo/água caracterizados nesta tese. A continuidade do tema já está em andamento, tendo sido realizadas novas medidas com a série P a fim de caracterizar a região das cadeias acílicas destas amostras.

Associação entre DSC, SAXS e WAXS.

A técnica de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC – Differential Scanning Calorimetry) aliada às técnicas de caracterização estrutural das fases lamelares traz maior clareza para a análise dos resultados. Pretendemos dar continuidade a este projeto utilizando uma nova técnica que permite obter resultados simultâneos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e a alto ângulo (WAXS) com resolução temporal em função da temperatura juntamente com microcalorimetria diferencial de alta sensibilidade, que foi desenvolvida em um mesmo aparato relatado no trabalho de Keller et al^v e descrita no capítulo III.

A colaboração estabelecida com os autores do aparato que mede simultaneamente DSC, SAXS e WAXS, é a origem de um projeto para a implantação de uma réplica desta

^v KELLER, G., ‘DSC and X Ray Diffraction Coupling: Specifications and Applications’, *Journal of Thermal Analysis*, **51** (1998) 783-791

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

montagem na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP viabilizando a continuidade do tema desta tese nestes aspectos.

OBSERVAÇÕES GERAIS

Tendo em vista todos os aspectos caracterizados na presente tese, apresentamos, como contribuição essencial do trabalho, não somente as informações obtidas através da caracterização dos sistemas lipídeo/água estudados, mas também a proposta de um protocolo de procedimentos de preparação, medida e análise dos resultados, a proposta de um parâmetro relevante pouco utilizado pela literatura (compressão térmica) e a implementação de um importante instrumental de medidas (PALCA).

* * *

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Lasic, D. D., *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, 1993
 - ² Lasic, Dan D., 'Novel Applications of Liposomes', *TIBTECH (Trends in Biotechnology, Elsevier Trends Journal)*, **16** (1998) 307-321
 - ³ BANGHAM, A. D., 'Membrane model with fosfolipids', *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18** (1968) 29-95
 - ⁴ Koynova R. & Caffrey M., 'Phases and phase transition of the phosphatidylcholines', *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376** (1998) 91-145
 - ⁵ <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu/>
 - ⁶ Shimamoto, T. et al, 'Structure-Activity relationship study on N-Glycosyl Moieties through model building of DNA and Ellipticine N-Glycosides Complex', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **6** (1996) 1331-1334
 - ⁷ Mathé, G., 'The kinetics of Cancer Cells and of HIV₁: the problem of cell and virus rebounds and of latency', *Biomed. & Pharmacother.*, **52** (1998) 413-420.
 - ⁸ Garrett & Grisham, 'Biochemistry', Saunders College Publishing, USA, 1995 (2ªed.)
 - ⁹ LEHNINGER, A., 'Princípios de Bioquímica', Ed. Sarvier, São Paulo, 7ª edição, 1991
 - ¹⁰ Singer & Nicolson, 'The Fluid Mosaic Model of the Structure of Membranes', *Science*, **175** (1972) 720-731
 - ¹¹ Lasic, D. D., *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier, 1993
 - ¹² The Biology Project, The University of Arizona, 1997, http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/membranes/03b.html
 - ¹³ The Biology Project, The University of Arizona, 1997, http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/membranes/main.html
 - ¹⁴ Tanford, C., 'The Hydrophobic Effect', John Willey and Sons, NY, 1979
 - ¹⁵ Shane Crotty (ed.), MIT Biology Hypertextbook, 1996, <http://www.botany.uwc.ac.za/mirrors/MIT-bio/bio/chem/review.html#Hydrophob>
 - ¹⁶ Hartley, G. S., 'Aqueous Solution of Paraffin-Chain Salts', Hermann & Cie., Paris, 1936
 - ¹⁷ Day, A., 'The Principles of Protein Structure', 1996, <http://www.biochemtech.uni-halle.de/PPS2/projects/day/TDayDiss/HydrophobicEffect.html>
 - ¹⁸ Blokzijl, W. & Engberts, J., 'Hidrophobic Effects. Opinions and Facts', *Angewandte Chemie - International Edition in English* **32** (1993) 1545-1579
 - ¹⁹ LASIC, Dan D., 'Novel Applications of Liposomes', *TIBTECH (Trends in Biotechnology, Elsevier Trends Journal)*, **16** (1998) 307-321
 - ²⁰ TARDIEU, A., 'Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases', *J. Mol. Biol.*, **75** (1973) 711-733
 - ²¹ Mahan, B. H., *Química Um Curso Universitário*, Editora Edgar Blucher LTDA, SP, 1972 (2ªed)

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ²² NAGLE, J. F., 'Theory of Biomembrane Phase Transitions', *The Journal of Chemical Physics*, **58** (1973) 252-264
- ²³ Warren, R. C., 'Physics and the Architecture of Cell Membranes', Adam Hilger, USA, 1987
- ²⁴ Vance, D. E., *Biochemistry of Lipids and Membranes*, Benjamin/Cummings, USA, 1985
- ²⁵ TARDIEU, A., 'Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases', *J. Mol. Biol.*, **75** (1973) 711-733
- ²⁶ figura extraída de Koynova R. & Caffrey M., 'Phases and phase transition of the phosphatidylcholines', *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376** (1998) 91-145
- ²⁷ ELIAS, H. G., *Macromolecules 1, Structure and Properties*, Plenum Press, NY, 1977
- ²⁸ FLORY, P. J., *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, NY, 1983
- ²⁹ KOYNOVA, R., CAFFREY, M., 'Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines', *Biochimica et Biophysica Acta* **1376** (1998) 91-145
- ³⁰ Laggner, P. & Kriechbaum, M., 'Phospholipid Phase Transitions: Kinetic and Structural Mechanisms', *Chemistry and Physics of Lipids*, **57** (1991) 121-145
- ³¹ Chan, W. K. & Webb, W. W., *Phys. Rev. Lett.* **46** (1981) 39-42
- ³² Biltonen, R. L., *J. Chem Thermodynamics*, **22** (1990) 1-19
- ³³ Sainsbury, M., in 'The Chemistry of Antitumour Agents', Derry Wilman (ed), Blackie, Glasgow and London, 1990
- ³⁴ Honda, T et al, 'Stereoselective Synthesis of 9-hydroxyellipticine glycosides, novel and highly active antitumor agents', *Chem. Pharm. Bull.*, **35** (1987) 3975-3978.
- ³⁵ The Alkaloids, vol 39, 1990, cap7, pag 309
- ³⁶ Shimamoto, T. et al, 'Structure-Activity relationship study on N-Glycosyl Moieties through model building of DNA and Ellipticine N-Glycosides Complex', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **6** (1996) 1331-1334
- ³⁷ Mathé, G., 'The kinetics of Cancer Cells and of HIV₁: the problem of cell and virus rebounds and of latency', *Biomed. & Pharmacother.*, **52** (1998) 413-420.
- ³⁸ KOHN, K., (1975) *Cancer Research*, **35**, 71-76
- ³⁹ SAINSBURY, M., 'Ellipticines' in WILMAN, D., (ed), 'The Chemistry of Antitumour Agents', NY
- ⁴⁰ Zacharias, C. R., Tese de Mestrado – IFGW – UNICAMP (1990)
- ⁴¹ Terce, F. et al, 'Interactions of Ellipticine with Model or Natural Membranes: A Spectrophotometric Study', *Eur. J. Biochem.*, **125** (1982) 203-207.
- ⁴² Terce, F. et al, 'Interactions of Ellipticine with Model or Natural Membranes: A Spectrophotometric Study', *Eur. J. Biochem.*, **125** (1982) 203-207.
- ⁴³ Courseille, C. et al, *Acta Crystallogr.*, **30B** (1974) 2628
- ⁴⁴ Solberg, Y., *Survey of ophthalmology*, **42** (1998) 535-547
- ⁴⁵ Cook, J. W., *Proc. Roy. Soc. B*, **111** (1932) 455-498
- ⁴⁶ Brandt, H. C. A., *Archives of Toxicology*, **73** (1999) 180-188
- ⁴⁷ Baldwin, R. W., 'Cell Membrane Associated Antigens in chemical Carcinogenesis', in Manson, L. A. (ed.), *Biomembranes*, Plenum, NY (1971).
- ⁴⁸ Cook, J. W., *J. Chem. Phys.*, (1930) 1087
- ⁴⁹ BARONE, P., (1996) *Physical Review Letters*, **77**, 1186-1189
- ⁵⁰ Herndon, W. C. et al, *J. Mol. Struct. Theochem*, **148** (1986) 141

- ⁵¹ Davis, W. W. et al, Solubility of Carcinogenic and Related Hydrocarbons in Water', *J. Am. Chem. Soc.*, **64** (1942) 108
- ⁵² Sanioto, L. D. & Schreier, S., 'Phase Transitions in Lipid Membranes Induced by Carcinogenic Aromatic Hydrocarbons. A Spin Label Study', *Bioch. And Biophys. Research Communications*, **67** (1975) 530
- ⁵³ CSL: 4',4'-dimetil-N-oxyl oxazolidina derivada de 3-colestanona.
- ⁵⁴ Kratky, O., 'The World of Neglected Dimensions, SAS of X Ray and Neutrons of Biological Macromolecules', *Nova Acta Leopoldina* NF**55**, nº 256 (1983)
- ⁵⁵ GLATTER, O., 'Scattering Studies on Colloids of Biological Interest (Amphiphilic Systems)', *Progress in Colloid & Polymer Science* **84** (1991) 46-54.
- ⁵⁶ GLATTER, O., 'Small Angle X Ray Scattering', Academic Press, London, 1982
- ⁵⁷ Glatter, O., 'Scattering Studies on Colloids of Biological Interest', *Progress in Colloid and Polymer Science* **84** (1991) 46-54
- ⁵⁸ Zhang, R., 'Theory of the structure factor of lipid bilayers', *Physical Review E*, **50** (1994) 5047-5060
- ⁵⁹ Zhang, R., 'SAXS from lipid bilayers is well described by Modified Caillé Theory but not by Paracrystalline Theory', *Biophysical Journal*, **70** (1996) 349-357
- ⁶⁰ Nagle, J. F., 'X-ray structure determination of fully hydrated L α phase DPPC bilayers', *Biophysical Journal*, **70** (1996) 1419-1431
- ⁶¹ Ciccariello, S., *J. Appl. Cryst.*, **32** (1999) 892-901
- ⁶² AZÁROFF, L. V., *Elements of X-Ray Crystallography*, McGraw – Hill Book, 1968, New York
- ⁶³ Torbet, J., *J. Theor. Biol.*, **62** (1976) 447
- ⁶⁴ Shannon, Claude E., 'Communication in the presence of noise', *Proceedings of the IRE*, **37** (1949) 10-21
- ⁶⁵ Lesslauer, W., 'X ray diffraction studies of lecithin bimolecular leaflets with incorporated fluorescent probes', *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69** (1972) 1499-1503
- ⁶⁶ Cullity, B. D., 'Elements of X Ray Diffraction', Addison Wesley, USA, 1978 (2^{ed.})
- ⁶⁷ KELLER, G., 'DSC and X Ray Diffraction Coupling: Specifications and Applications', *Journal of Thermal Analysis*, **51** (1998) 783-791
- ⁶⁸ Seras, M., 'Solubilization of nonionic monoalkyl amphiphile-cholesterol vesicle by octyl glucoside: cryo TEM of the intermediate structures', *Langmuir*, **12** (1996) 330-336.
- ⁶⁹ Vinson, P. K., 'Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-TEM', *Biophysical Journal*, **56** (1989) 669-681.
- ⁷⁰ Nota técnica: Leo EM912, Centre Interuniversitaire de Microscopie Electronique, Paris.
- ⁷¹ Alving, C. R., 'Liposomes as Carriers of Antigens and Adjuvants', *Journal of Immunological Methods*, **140** (1991) 1-13
- ⁷² BRIGGS & CAFFREY, 'The Temperature-Composition Phase Diagram and Mesophase Structure Characterization of Monopentadecenoin in Water', *Biophysical Journal*, **67** (1994) 1594-1602
- ⁷³ BRIGGS & CAFFREY, 'The Temperature-Composition Phase Diagram of Monomyristolein in Water: Equilibrium and Metaestability Aspects', *Biophysical Journal*, **66** (1994) 573-587
- ⁷⁴ WACK & WEBB, 'Synchrotron X Ray Study of the Modulated Lamellar P β ' in the Lecithin-Water System', *Physical Review A*, **40** (1989) 2712-2730

- ⁷⁵ LASIC, Dan D., 'Novel Applications of Liposomes', *TIBTECH (Trends in Biotechnology, Elsevier Trends Journal)*, **16** (1998) 307-321
- ⁷⁶ G. Kellerman, F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. F. Craievich and I. Torriani - *J. Appl. Cryst.* **30** (1997) 880-883
- ⁷⁷ L. A. Bernardes, H. Tolentino, A. R. Rodrigues, A. F. Craievich and I. Torriani, *Rev. Sci. Instr.* **63** (1992) 1065-7
- ⁷⁸ Bóta, A., 'Prehistory in the pretransition range of dipalmitoylphosphatidylcholine/water system', *Colloids and Surfaces A*, **141** (1998) 441-448
- ⁷⁹ Koynova R. & Caffrey M., 'Phases and phase transition of the phosphatidylcholines', *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376** (1998) 91-145
- ⁸⁰ <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu/>
- ⁸¹ Bóta, A., 'Prehistory in the pretransition range of dipalmitoylphosphatidylcholine/water system', *Colloids and Surfaces A*, **141** (1998) 441-448
- ⁸² TARDIEU, A., 'Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases', *J. Mol. Biol.*, **75** (1973) 711-733
- ⁸³ Powder Diffraction File compiled by the JCPDS International Centre for Diffraction Data, 1601 Park Lne, Swarthmore, PA 19081-2389, USA
- ⁸⁴ COURSEILLE, C., 'Structure Cristalline et Moléculaire du Diméthyl-5,11 6H-Pyrido[4,3-b]carbazole (Ellipticine)', *Acta Cryst.* **B30** (1974) 2628-2631
- ⁸⁵ Zacharias, C. R., Tese de Mestrado, Instituto de Física, UNICAMP, 1991
- ⁸⁶ ELMASHAK E. M., 'Interactions Between Ellipticine and Some Derivatives and Phospholipids in Model Membranes', *FEBS Letters*, **107** (1979) 155-159
- ⁸⁷ Herndon, W. C. et al, *J. Mol. Struct. Theochem*, **148** (1986) 141
- ⁸⁸ Sanioto, L. D. & Schreier, S., 'Phase Transitions in Lipid Membranes Induced by Carcinogenic Aromatic Hydrocarbons. A Spin Label Study', *Bioch. And Biophys. Research Communications*, **67** (1975) 530
- ⁸⁹ Santos, M. R. Z., Tese de Mestrado, Unicamp, 1981

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Fim