



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Análise por anisotropia de fluorescência em estado estacionário, de misturas lipídicas canónicas envolvidas na heterogeneidade de membranas modelo

Candidato: Joana Isabel Guerreiro Cristo

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professor Doutor Jorge Martins

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas

2012

*Análise por anisotropia de fluorescência em estado estacionário, de misturas lipídicas
canónicas envolvidas na heterogeneidade de membranas modelo*

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito.

Joana Isabel Guerreiro Cristo

Copyright: Joana Cristo. A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Vontade

*Coroa-te do sol de fé e esp'rança,
Sê, de vontade indómita, provido;
E, armado desse facho, dessa lança,
Parte para o país desconhecido.*

*Quer seja na tormenta ou na bonança,
Dispende todo o ardor enobrecido...
- O Repouso profundo também cansa
E até deixa o mais forte ressentido!*

*Para ao barro flexível, à areia
Se dar forma, cor, som ou ideia,
Não basta só a chama do talento!*

*É preciso verter-te, com aprumo,
O sangue, a energia. É este o rumo
De toda a nossa vida e pensamento!*

Adolfo C. Gago

(in "Lágrimas de luz", edição do autor, 1953)

Aos meus pais, que fizeram de mim o que sou hoje.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Martins, a quem agradeço todos os ensinamentos e a oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por toda a amizade e imensa paciência em todas as etapas deste trabalho. Agradeço também a compreensão e apoio quando qualquer coisa corria menos bem. O professor tem o dom de ensinar, é bom professor e um excelente orientador, apesar da vida dar muitas voltas, tenho muita sorte e muito orgulho em ter ido parar ao seu laboratório. Obrigada pelo voto de confiança e por acreditar em mim.

Aos meus colegas de laboratório Dalila Arrais e Miguel Manuel. Obrigada por todos os ensinamentos, pela gigantesca paciência e por me ajudarem a dar os primeiros passos. Um agradecimento especial à Dalila, pela ajuda e preocupação nos dias mais vertiginosos. Sei que vamos ficar amigas e sei que vais ter saudades minhas quando eu não estiver.

À minha mãe Alzira Cristo. Obrigada por estares sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigada por todo o apoio e palavras sábias tão bem ouvidas e empregues e por todos os puxões de orelhas que me ajudaram a crescer. És a minha força sempre e um grande exemplo de vida. Tenho muito orgulho em ti e um dia gostava de ser como tu.

Ao meu pai Faustino Cristo. Obrigada por seres o meu maior amigo, por estares sempre comigo e por me apoiares incondicionalmente, mesmo quando nada faz sentido e está tudo contra. Obrigada por me ensinares as cores e os sons da vida e por seres o meu herói. Tenho muito orgulho em ti.

Ao meu namorado Luís Miguel. Tens sido um grande companheiro nesta jornada, tens estado nos momentos bons e tens sido o meu maior apoio nos momentos maus. Obrigada por toda amizade, carinho, extrema paciência e amor incondicionais. Tenho muito orgulho em ser tua namorada, porque "The greatest thing you'll ever learn is just to love and be loved in return".

Ao meu cão Íris. Mesmo que eu vivesse eternamente, nunca teria tempo suficiente para te agradecer tudo o que fizeste por mim. Contigo aprendi a nunca desistir, o valor da verdadeira amizade e o que é o amor incondicional. Foste o meu melhor amigo e um verdadeiro companheiro e sinto a tua falta a cada instante. Apesar de já não estares aqui, estarás sempre na minha memória e no meu coração, porque amaste e foste muito amado. Espero voltar a ver-te um dia.

À minha cadela Luna, obrigada por me ensinares o que é a paciência e a tolerância. Agradeço-te toda a amizade, carinho e todos os momentos que passamos juntas. Contigo aprendi a dar mais valor a coisas que parecem insignificantes, mas que na realidade não o são. És uma menina muito especial e um grande exemplo de força.

Ao meu cão Kyro, com quem aprendi o que é a humildade. És uma fonte de inspiração e contigo aprendi a ser uma pessoa melhor. Obrigada por todo o apoio que me deste nos momentos menos bons, por toda a preocupação, dedicação, carinho e por todos os sorrisos que me arrancas todos os dias. És um verdadeiro amigo e surpreendes-me a cada dia.

À Anabela Rodrigues, a minha irmã do coração. Obrigada por toda a ajuda e amizade. Por todos os momentos bons e os menos bons em que estiveste sempre ao meu lado. És um grande pilar na minha vida e sei que posso contar contigo sempre.

A todos os meus amigos, com especial atenção à Denise Schrama e Ana Jesus. Que estão sempre ao meu lado e nunca me deixam cair e quando isso acontece ajudam-se sempre a levantar. Obrigada por todas as gargalhadas e todo o apoio de sempre. Obrigada por me darem um ponto de vista diferente sempre que é preciso e por tudo o que há de vir. São o meu ponto de abrigo.

Resumo

O funcionamento/sobrevivência das células depende do colesterol (Chol), presente nas membranas biológicas. A interação colesterol-lípidos das membranas biológicas é fundamental em processos como: sinalização celular; resposta ao stress e reprodução. Existe um elevado controlo dos níveis de colesterol nas células, havendo um equilíbrio biossíntese/obtenção e armazenamento/efluxo de colesterol. Um desequilíbrio nestes controlos, conduz a situações patológicas como: obesidade; diabetes e doenças cardiovasculares, como a aterosclerose.

O colesterol constitui cerca de 30-50% da massa lipídica da membrana plasmática, modulando as suas propriedades físico-químicas, nomeadamente: aumento da espessura da zona hidrofóbica; alteração nas temperaturas de transição de fase; ordenação e diminuição da fluidez nas bicamadas lipídicas.

Na literatura encontram-se diagramas de fases para misturas de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina)/Chol e esfingomielina (SM)/Chol, mas estes não estão definitivamente estabelecidos. Clarificar como a adição de colesterol afecta a fluidez de bicamadas lipídicas é muito importante, possibilitando elucidar aspetos físico-químicos que modulam as membranas biológicas entre os estados normal/patológico, sendo este o objetivo principal deste trabalho.

O efeito da adição de colesterol, na fluidez de bicamadas lipídicas em misturas lipídicas binárias: POPC + Chol; egg-SM (esfingomielina de ovo) + Chol; e em misturas lipídicas ternárias: POPC + egg-SM + Chol, foi determinado por anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, utilizando DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), como sonda fluorescente.

De forma geral, o aumento da temperatura faz diminuir os valores de anisotropia de fluorescência do DPH, sugerindo uma diminuição na ordenação das bicamadas lipídicas e o aumento na sua fluidez. Por outro lado, a adição de colesterol faz aumentar os valores de anisotropia de fluorescência do DPH, reportando que o meio que rodeia o DPH está mais ordenado, logo a fluidez da bicamada lipídica é menor.

Os resultados obtidos neste trabalho, estão de acordo com o diagrama de fases existente para a mistura lipídica DMPC (1,2-dimiristóil-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina)/DPPC (1,2-dipalmitóil-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina), no entanto, discordam significativamente com os diagramas de fase POPC/Chol e SM/Chol existentes na literatura.

Palavras-chave: Colesterol; egg-SM; POPC; DPH; anisotropia de fluorescência, em estado estacionário; fluidez de bicamadas lipídicas.

Abstract

The function/survival of cells depends on cholesterol (Chol), present in biological membranes. The interaction cholesterol-lipids of biological membrane is fundamental in diverse processes such as: cellular signaling; stress response and reproduction. There is a tight control of cholesterol levels in cells, through cholesterol biosynthesis/uptake and storage/efflux balance. An imbalance in these controls leads to pathological cases such: obesity, diabetes and cardiovascular diseases such atherosclerosis.

Cholesterol constitutes about 30-50% of lipid mass on plasmatic membranes and modulate their physicochemical properties, such: increasing the thickness of the hydrophobic region; change the phase transition temperatures; ordering and decrease of acyl chain region in lipid bilayers.

Although there are some POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)/Chol and SM (sphingomyelin)/Chol thermal phase diagrams available in literature, they are not definitely established. Clarifying how addition of cholesterol affects the lipid bilayers fluidity, is of utmost importance to evaluate physicochemical properties that modulate biological membranes, varying between normal/pathological states, is the main goal of this work.

The effect of addition of cholesterol in fluidity of bilayers composed of binary mixtures consisting of POPC + Chol and egg-SM + Chol; and ternary mixtures consisting of POPC + egg-SM + Chol, was determined by steady-state fluorescence anisotropy, using DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) as fluorescent probe.

In general, the increasing of temperature decreases DPH fluorescence anisotropy, suggesting that there is a reduction in the order of lipid bilayers and fluidity increases. On the other hand, the cholesterol addition increases the DPH fluorescence anisotropy, reporting that surrounding environment of DPH is more ordered, and therefore the fluidity of lipid bilayer is smaller.

The results obtain in this work are consistent with the existing phase diagrams for the lipid mixture DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)/DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), however somewhat disagree with POPC/Chol and SM/Chol phase diagrams available in literature.

Keywords: Cholesterol; egg-SM; POPC; DPH; steady-state fluorescence anisotropy; lipid bilayers fluidity.

Abreviaturas

ACAT - Acil-CoA colesterol aciltransferase

Chol - Colesterol

DMPC - 1,2-dimiristoíl-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina

DPPC - 1,2-dipalmitoíl-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina

DPH - 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

DPHPC - 2-(3-difenil-hexatrieno)-propanoíl-1-hexadecanoíl-glicero-*sn*-3-fosfocolina

egg-SM - Esfingomielina de ovo

E_a - Energia de ativação

(\vec{E}) - Vetor da componente elétrica da radiação eletromagnética

GUV - Vesículas unilamelares gigantes

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HDL - Lipoproteínas de elevada densidade

I_⊥ - Intensidade da luz emitida, perpendicular à intensidade da luz incidente

I_∥ - Intensidade da luz emitida, paralela à intensidade da luz incidente

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LUV - Vesículas unilamelares grandes

L_α - Fase líquido-cristalino

L_β - Fase gel

I_o - Estado líquido-ordenado

I_d - Estado líquido-desordenado

MLV - Vesículas multilamelares

$\vec{\mu}_{exc}$ - Momento dipolar de excitação (ou **$\vec{\mu}_{abs}$**)

$\vec{\mu}_{em}$ - Momento dipolar de emissão

POPC - 1-palmitoíl-2-oleiloíl-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

PC - Fosfatidilcolina

PE - Fosfatidiletanolamina

PS - Fosfatidilserina

PI - Fosfatidilinositol

PG - Fosfatidilglicerol

PSM - Palmitoíl-esfingomielina

r_{ss} - Anisotropia de fluorescência em estado estacionário

r(t) - Anisotropia de fluorescência resolvida no tempo

r_0 - Anisotropia de fluorescência fundamental (ou anisotropia limite)

R - Constante dos gases ideais ($8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

R^* - Coeficiente de correlação linear

SUV - Vesículas unilamelares pequenas

SM - Esfingomielina

s_0 - Fase sólido-ordenado

S_0 - Estado eletrônico fundamental

S_1 - Primeiro estado eletrônico excitado

S_2 - Segundo estado eletrônico excitado

Transportadores ABC - Transportadores "ATP binding cassette"

TMA-DPH - Trimetilamônio-difenil-hexatrieno

T - Temperatura absoluta

T_m - Temperatura de transição de fase

τ - Tempo de vida do fluoróforo

τ_2 - Tempo de vida mais curto

τ_1 - Tempo de vida mais longo

V_m - Volume molar

η - Viscosidade

Índice

Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	9
Abreviaturas	11
1. Objetivo	17
2. Introdução	18
2.1. Sistemas de membranas modelo	18
2.1.1. Membranas biológicas: Membrana do retículo endoplasmático.....	18
2.1.2. Membranas modelo: Lipossomas.....	22
2.1.3. Lípidos representativos usados em sistemas de membranas modelo.....	25
2.1.3.1. 1,2-dimiristoíl-glicero- <i>sn</i> -3-fosfatidilcolina (DMPC).....	26
2.1.3.2. 1,2-dipalmitoíl-glicero- <i>sn</i> -3-fosfatidilcolina (DPPC).....	26
2.1.3.3. 1-palmitoíl-2-oleiloíl- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (POPC).....	26
2.1.3.4. Esfingomielina (SM).....	27
2.1.3.5. Colesterol.....	27
2.1.4. Interação Colesterol - Fosfatidilcolina/Esfingomielina.....	28
2.1.4.1. Interação Colesterol-Fosfatidilcolina/Esfingomielina - Diagramas de fase.....	30
2.1.5. Interação Colesterol - Membranas biológicas.....	33
2.2. Fluorescência	35
2.2.1. O que é a fluorescência?.....	35
2.2.2. O que é a anisotropia de fluorescência?.....	36
2.2.3. Como medir a anisotropia de fluorescência.....	38
2.2.4. Compreender a anisotropia de fluorescência.....	41
2.2.5. Fenómenos despolarizantes.....	44
2.2.5.1. Efeito despolarizante da difusão rotacional de sondas fluorescentes em medidas de anisotropia de fluorescência.....	45
2.2.5.2. Efeito despolarizante da dispersão da luz em medidas de anisotropia de fluorescência.....	45
2.3. Sonda de fluorescência DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno)	47
2.4. Anisotropia de fluorescência do DPH	52

2.4.1. Anisotropia de fluorescência do DPH em parafina líquida.....	52
2.4.2. Características da anisotropia de fluorescência do DPH.....	56
2.5. Anisotropia de fluorescência em membranas.....	58
3. Trabalho experimental.....	61
3.1. Preparação de soluções de: POPC; egg-SM; colesterol; DPH; DMPC e DPPC.....	61
3.2. Preparação de MLV.....	61
3.3. Leituras das medidas de anisotropia de fluorescência.....	62
4. Resultados e Discussão.....	64
4.1. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por DMPC.....	64
4.2. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por DMPC e DPPC.....	65
4.3. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por egg-SM.....	70
4.4. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por egg-SM e Colesterol.....	73
4.5. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por POPC e Colesterol.....	76
4.6. Análise quantitativa de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura para MLV compostos por 100% DMPC (35 °C - 53 °C) e MLV compostos por 100% egg-SM (47°C - 63°C).....	86
4.7. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por POPC, egg-SM e Colesterol.....	89
5. Conclusões.....	93
6. Perspetivas futuras.....	97
7. Referências bibliográficas.....	99
8. Anexos.....	103
8.1. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por várias concentrações de DMPC.....	103
8.2. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por DMPC e DPPC.....	104
8.3. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por egg-SM.....	108
8.4. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, <i>versus</i> Temperatura, para MLV compostos por egg-SM e Colesterol.....	111

8.5. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por POPC e Colesterol.....	113
8.6. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por POPC, egg-SM e Colesterol.....	116

1. Objetivo

Este trabalho de dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas tem como objetivo clarificar como a adição de colesterol afeta as propriedades de fluidez de bicamadas lipídicas compostas por misturas de fosfatidilcolina e esfingomiéline, utilizando técnicas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário.

2. Introdução

2.1. Sistemas de membranas modelo

2.1.1. Membranas biológicas: Membrana do retículo endoplasmático

O colesterol desempenha um papel fundamental na organização, no bom funcionamento das membranas biológicas, assim como no bom funcionamento de proteínas de membrana, sendo essencial à sobrevivência das células. Além disso, o colesterol é precursor metabólico de várias hormonas como a progesterona, testosterona, cortisol, entre outros, sendo essencial na reprodução. O colesterol também desempenha um papel importante na resposta ao stress e na absorção de nutrientes [1].

A percentagem de colesterol presente nas membranas depende do tipo e função de cada membrana, por exemplo, 30-50% da massa lipídica da membrana plasmática das células de vários organismos superiores é composta por colesterol, no entanto, na membrana do retículo endoplasmático, existe apenas cerca de 6% de colesterol [2, 3].

A membrana do retículo endoplasmático apresenta uma percentagem muito baixa de colesterol e é composta por uma grande fração de lípidos insaturados, sendo assim uma membrana bastante fluida. É nesta membrana que o colesterol é sintetizado, e depois é enviado para outros organelos através de uma combinação de transportes vesicular e não-vesicular, tal como mostra a figura 2.1 [4].

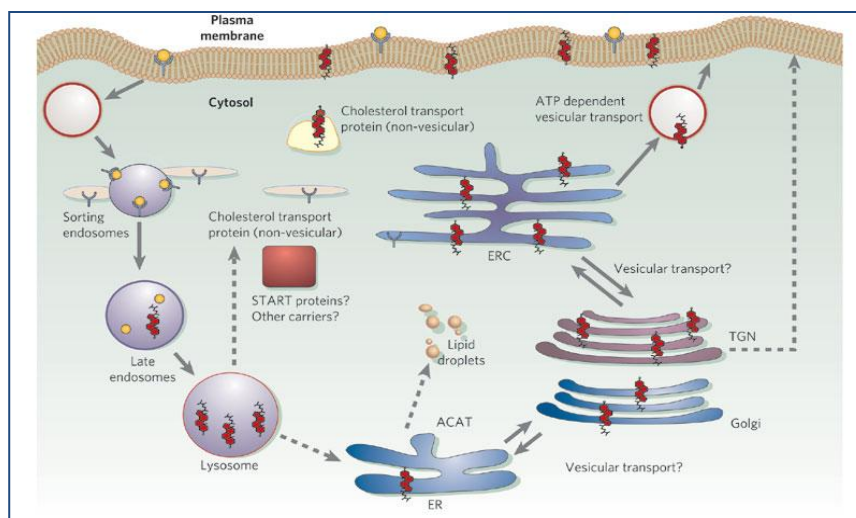


Figura 2.1 - Representação esquemática do transporte intracelular do colesterol. Estão assinalados a tracejado processos que ainda não são bem conhecidos (adaptado de [4]).

Devido ao fato de o colesterol ser essencialmente insolúvel em água e apesar de os mecanismos de transporte de colesterol intracelular ainda não estarem completamente estabelecidos, pensa-se que o colesterol é transportado maioritariamente através de mecanismos não-vesiculares [4].

O colesterol obtido através da dieta, é transportado no sangue através de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), do fígado para os tecidos, sendo que estas lipoproteínas entram para o interior da célula e são transportadas para endossomas, que após alguns processos de amadurecimento, se tornam em lisossomas, onde o colesterol pode ser hidrolisado. Entretanto, pode ocorrer um efluxo do colesterol diretamente para a membrana plasmática ou a partir do retículo endoplasmático, mas este efluxo ainda não está bem caracterizado [4].

Além de poder ser obtido na dieta, o colesterol também é sintetizado no retículo endoplasmático sendo que a maior parte deste colesterol é transportado diretamente para a membrana plasmática sem passar pelo complexo de Golgi e uma minoria segue a via secretora do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. Entretanto o colesterol em excesso no retículo endoplasmático, é esterificado pelo enzima ACAT (acil-CoA colesterol aciltransferase), que está presente na membrana deste organelo, sendo posteriormente armazenado em gotas lipídicas citoplasmáticas. Desta forma, o ACAT é um bom sensor da homeostasia do colesterol, uma vez que é regulada pelos níveis de colesterol [4, 5].

Devido ao fato de o colesterol ser tão importante nas membranas biológicas, existe um elevado controlo dos níveis de colesterol presente nas células, havendo um equilíbrio entre a biossíntese do colesterol e aquele que é obtido na alimentação e entre o armazenamento de colesterol e o seu efluxo, sendo que um desequilíbrio neste controlo, poderá conduzir a casos de doença [1, 5, 6].

Um dos exemplos dos processos que controlam os níveis de colesterol é o seu processo de armazenamento. Quando os níveis de colesterol são bastante elevados, o enzima ACAT esterifica este colesterol em excesso, o qual é armazenado na forma de ésteres de colesteril em gotas lipídicas citoplasmáticas. Quando há uma diminuição dos níveis de determinadas hormonas esteróides, os ésteres de colesteril armazenados nas gotas lipídicas citoplasmáticas são hidrolisados por hidrolases de ésteres de colesteril, sendo que quando são libertados destas gotas lipídicas citoplasmáticas, podem ser utilizados na síntese de determinadas hormonas esteróides [4, 5].

Outro processo que controla os níveis de colesterol, é por exemplo, o mecanismo de efluxo do colesterol, no entanto, este mecanismo de efluxo ainda não está completamente estabelecido. Todavia sabe-se que o efluxo de colesterol depende de transportadores ABC, os

quais têm como função entregar colesterol e lípidos às apolipoproteínas ApoA-I associadas às lipoproteínas de elevada densidade (HDL), sendo que se existirem falhas neste tipo de transportadores, o colesterol não é entregue às HDL. Então poderá ocorrer um aumento da quantidade de ésteres de colesteril presentes nos macrófagos, conduzindo a doenças bastante graves como a doença de Tangier, que está associada a deficiências nas HDL, uma vez que estas não conseguem transportar o colesterol dos tecidos ao fígado. As pessoas que têm esta doença, têm problemas de acumulação de colesterol em determinados tecidos, ficando mais suscetíveis a desenvolver aterosclerose. No entanto quando os transportadores ABC funcionam devidamente, e as HDL conseguem transportar o colesterol dos tecidos para o fígado, então o colesterol é excretado na bÍlis como colesterol livre, ou através de sais biliares [4, 5].

Como foi visto anteriormente, a membrana do retículo endoplasmático é bastante importante na síntese de colesterol, assim como em receber o colesterol que provém da dieta, mas também em processos de efluxo do colesterol, sendo que quando o colesterol está em excesso no retículo endoplasmático, é convertido em ésteres de colesteril pela ação do ACAT, no entanto, se houver uma acumulação de colesterol livre no retículo endoplasmático, ocorre uma perturbação no processo de esterificação do colesterol, pelo ACAT, então o colesterol não é esterificado, ocorrendo uma acumulação de colesterol livre na membrana do retículo endoplasmático, que vai desencadear processos patológicos, uma vez que esta membrana, normalmente apresenta uma baixa percentagem de colesterol (~ 6%), sendo uma membrana bastante fluida. No entanto, um aumento do colesterol livre na membrana do retículo endoplasmático, conduz a uma diminuição da fluidez desta membrana, a qual faz alterar a função da membrana e das proteínas associadas como o ACAT. Assim, a membrana do retículo endoplasmático é bastante importante na homeostasia celular do colesterol [4, 5].

Níveis muito elevados de colesterol em circulação podem originar efeitos negativos para a saúde. Alguns destes efeitos negativos são, por exemplo: obesidade; desenvolvimento de resistência à insulina; desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão, aterosclerose, entre outros. A aterosclerose talvez seja a doença mais conhecida associada ao metabolismo dos lípidos e de colesterol [1, 4, 6].

Como representa a figura 2.2, o passo inicial desta doença (aterogénese), ocorre quando se que acumulam LDL, modificadas por oxidação, em determinadas zonas do subendotélio (ou íntima), nas paredes das artérias. Esta acumulação desencadeia uma resposta inflamatória fazendo com que monócitos e células T acorram ao local da lesão aterosclerótica. Entretanto, uma vez no íntima, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, e iniciam a ingestão destas

LDL oxidadas acumuladas no íntima, através de endocitose e fagocitose, acabando por ficar com uma grande quantidade de colesterol no seu interior, em forma de ésteres de colesterol, por esse motivo estes macrófagos começam a ter uma aparência espumosa, designando-se como células espuma.

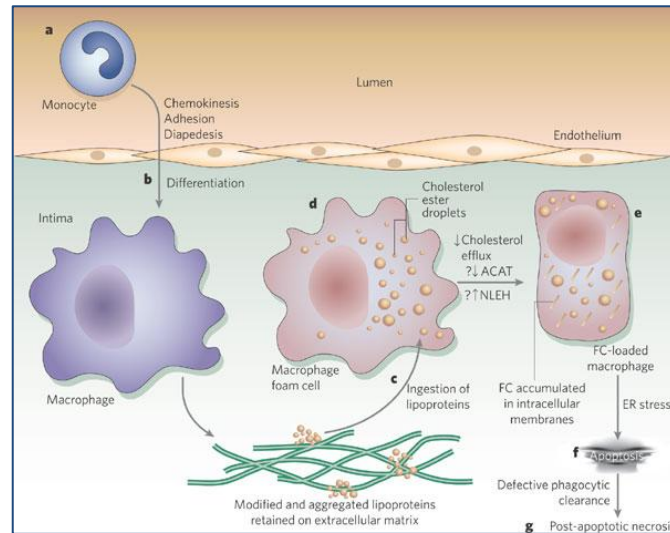


Figura 2.2 - Representação esquemática da resposta inflamatória à aterosclerose (adaptado de [4]).

A acumulação destas células espuma forma o ateroma, como se pode observar na figura 2.3 [4].

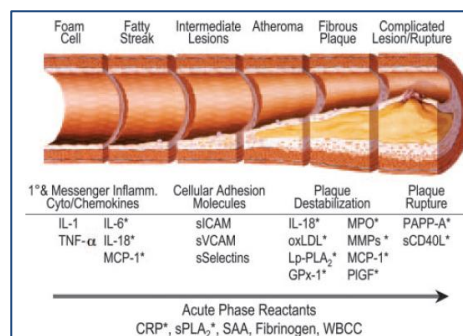


Figura 2.3 - Representação esquemática do desenvolvimento da aterosclerose, desde os estádios iniciais até aos estádios finais (adaptado de [7]).

Como se pode observar na figura 2.3, ocorre um desenvolvimento progressivo desta lesão aterosclerótica, em que as células espuma, que formam o ateroma, são cobertas por células do músculo liso e por matriz extracelular, as quais formam uma capa fibrosa, que protege esta lesão, sendo que normalmente esta doença é assintomática em estádios iniciais, no entanto, em estádios mais avançados, podem ocorrer sintomas de problemas vasculares,

dificuldade de passagem do sangue nas artérias e nos casos mais graves, pode ocorrer a disrupção desta capa fibrosa, que conduz a uma trombose, devido ao fato de o sangue estar em contato com a placa que estava por baixo da capa fibrosa, que contém proteases celulares, citocinas inflamatórias e moléculas protrombóticas, levando à coagulação do sangue e por conseguinte a casos de trombose [4, 5].

Uma das causas para que ocorra a disrupção da capa fibrosa é a apoptose dos macrófagos, que pode ser provocada pela acumulação intracelular de colesterol livre (colesterol não-esterificado). Desta forma, parece que os macrófagos têm um papel bastante importante nos estádios iniciais e finais da aterosclerose [4].

2.1.2. Membranas modelo: Lipossomas

Os lipossomas são utilizados como membranas modelo, para mimetizar parcialmente as membranas biológicas, na sua componente lipídica.

Lipossomas, também designados por vesículas lipídicas, são estruturas anfifílicas fechadas, compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas e têm um compartimento aquoso no seu interior, tal como se pode observar na figura 2.4. São bastante utilizados em vários estudos *in vitro*, como modelos de biomembranas e podem ser formados a partir de lípidos naturais (com origem biológica), ou sintéticos, sendo que se forem formados a partir de lípidos naturais, poderão conter alguns componentes das membranas celulares [8, 9].

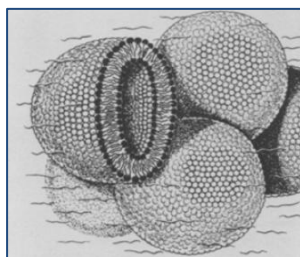


Figura 2.4 – Representação esquemática de lipossomas LUV (adaptado de [8]).

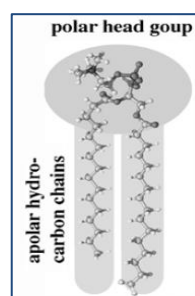


Figura 2.5 - Representação esquemática da estrutura de um lípido (adaptado de [3]).

Os lipossomas têm uma grande importância a nível da medicina, pois podem ser utilizados como veículo para transportar fármacos tais como anticancerígenos e antimicrobianos, podendo transportar substâncias hidrofílicas no compartimento aquoso, ou substâncias anfifílicas e lipofílicas, adsorvidas e inseridas na membrana, respetivamente [2].

Como se pode observar na figura 2.5, os lípidos utilizados na formação de lipossomas, são compostos por uma zona hidrofílica (cabeça polar ou iónica), que interage com a água e uma zona hidrofóbica (duas cadeias de hidrocarboneto ou cadeias metilénicas), que não interage facilmente com a água. É devido ao fato de existir esta zona hidrofóbica nos lípidos, que se formam agregados lipídicos aquando da dispersão de lípidos em meio aquoso, uma vez que há a necessidade termodinâmica de limitar a interação destas cadeias metilénicas com a água [3].

Assim, os lipossomas formam-se espontaneamente, após a dispersão de lípidos num meio aquoso, havendo uma variedade de métodos de preparação. A preparação clássica de lipossomas está representada na figura 2.6 e consiste em dissolver lípidos num solvente orgânico (A), para que se forme uma mistura homogénea de lípidos e depois é necessário remover esse solvente por evaporação, para que se forme um filme lipídico nas paredes do balão (B). Este filme lipídico deve ser bem seco para que não haja vestígios do solvente orgânico. Em seguida, basta hidratar este filme lipídico com uma solução aquosa (C) e agitar (D), sendo que desta forma são obtidas preparações de vesículas multilamelares (MLV - *multilamellar vesicles*), as quais são bastante heterogéneas, visto que têm tamanho (diâmetro entre 400 e 3500 nm) e número de bicamadas lipídicas variados [2, 10, 11].

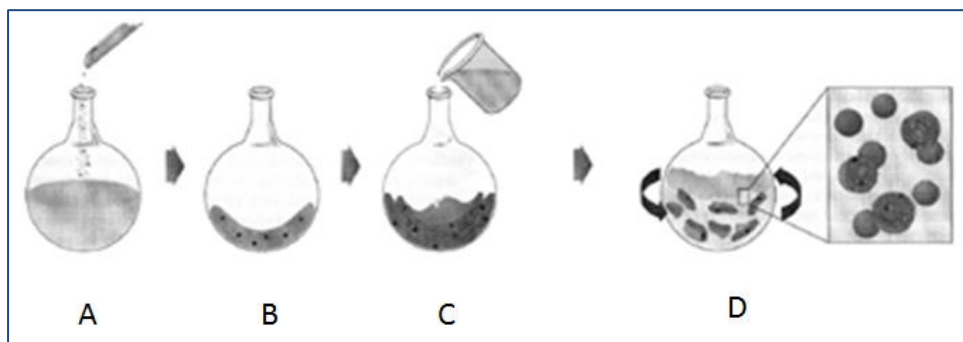


Figura 2.6 - Representação esquemática da preparação de lipossomas (adaptado de [10]).

Para que se obtenham vesículas homogêneas e de tamanhos definidos, é necessário recorrer a técnicas como a sonificação e a extrusão, tal como mostra a figura 2.7 [2, 10, 11].

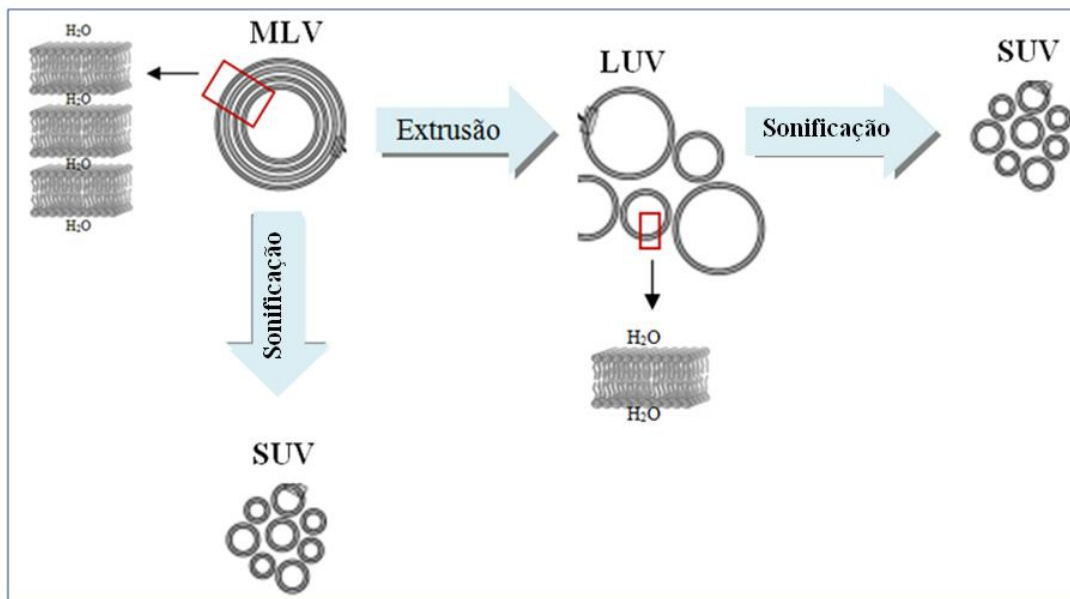


Figura 2.7 - Representação esquemática da preparação de lipossomas de vários tamanhos (adaptado de [10]).

A sonificação permite obter vesículas unilamelares pequenas (SUV - *small unilamellar vesicles*), de diâmetro entre 25 e 50 nm, a partir das MLV, ou das vesículas unilamelares grandes (LUV - *large unilamellar vesicles*). Esta técnica consiste em transferir energia para a suspensão lipídica, através de uma sonda ultrassónica de alta energia [10].

A extrusão permite obter LUV de diâmetro entre 50 e 500 nm, a partir das MLV. Esta técnica consiste em passar as MLV através de membranas de policarbonato ou celulose, as quais têm diâmetros bem definidos, sendo que esta passagem é feita sob pressão moderada, podendo ser combinada com ciclos prévios de congelação e descongelação, de forma a ocorrer a redução do número de lamelas [10].

Além das vesículas referidas anteriormente, também é possível preparar vesículas unilamelares gigantes, designadas por GUV (*giant unilamellar vesicles*), as quais podem ter dimensões superiores a 1 μ m, podendo chegar às dezenas de μ m, sendo que o seu tamanho pode ser comparável ao tamanho de uma célula eucariótica. As GUV são preparadas através de uma simples hidratação suave de lípidos, a forças iónicas baixas [2, 11].

2.1.3. Lípidos representativos usados em sistemas de membranas modelo

As membranas biológicas são compostas por vários tipos de lípidos e proteínas, sendo que os lípidos mais abundantes nas membranas biológicas são a fosfatidilcolina, a esfingomiéline e o colesterol [12].

Apesar de cerca de 50% das membranas biológicas serem compostas maioritariamente por fosfatidilcolina e esfingomiéline, a percentagem destes lípidos pode variar dependendo do tipo de membrana. Por exemplo, os lípidos principais que compõem a membrana do eritrócito humano são: 20% de fosfatidilcolina (PC); 18% de fosfatidiletanolamina (PE); 7% de fosfatidilserina (PS); 3% de fosfatidilinositol (PI); 18% de esfingomiéline (SM) e 20% de colesterol (Chol), enquanto os lípidos principais que compõem a membrana do retículo endoplasmático já estão presentes noutras quantidades: 48% (PC); 19% (PE); 4% (PS); 8% (PI); 5% (SM) e 6% (Chol). Além disso, a percentagem lipídica pode variar na mesma membrana, dependendo da monocamada lipídica em questão, sendo que por exemplo, para a membrana do eritrócito humano, a monocamada exterior é composta principalmente por fosfatidilcolina e esfingomiéline, e a monocamada interior é composta principalmente por fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina [3, 12].

Como os lípidos são estruturalmente diferentes, então membranas diferentes possuem composições lipídicas diferentes, uma vez que as composições lipídicas diferentes estão relacionadas com as características específicas de cada membrana em particular [3; 12].

Os lípidos mais utilizados na preparação de lipossomas são: PC, PS, fosfatidilglicerol (PG) e SM, pois estes formam bicamadas estáveis em solução aquosa, sendo que a fosfatidilcolina é mais utilizada em relação aos outros lípidos, porque apresenta uma grande estabilidade relativamente à força iónica e à variação do pH do meio. A pH fisiológico, a fosfatidilcolina tem o grupo fosfato carregado negativamente e o grupo trimetilamónio carregado positivamente, sendo uma espécie zwitteriónica [13].

Os lípidos utilizados neste trabalho experimental estão apresentados a seguir.

2.1.3.1. 1,2-dimiristoíl-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina (DMPC)

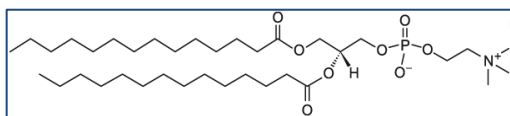


Figura 2.8 - Representação esquemática da estrutura molecular do DMPC (adaptado de [10]).

O DMPC é um glicerofosfolípido, composto por uma região hidrofílica, que contém um grupo trimetilamónio catiónico, um grupo fosfato aniónico e uma molécula de glicerol à qual estão ligadas duas cadeias metilénicas saturadas de ácido mirístico (C14:0), que constituem a região hidrofóbica, tal

como se pode observar na figura 2.8 [10].

Este lípido é zwitteriónico a pH fisiológico [2].

A sua temperatura de transição de fase ocorre aos 24 °C [10].

2.1.3.2. 1,2-dipalmitoíl-glicero-*sn*-3-fosfatidilcolina (DPPC)

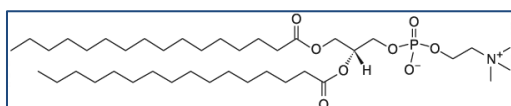


Figura 2.9 - Representação esquemática da estrutura molecular do DPPC (adaptado de [10]).

O DPPC é um glicerofosfolípido, composto por uma região hidrofílica, que contém um grupo trimetilamónio catiónico, um grupo fosfato aniónico e uma molécula de glicerol à qual estão ligadas duas cadeias metilénicas saturadas de ácido palmítico

(C16:0), que constituem a região hidrofóbica, tal como se pode observar na figura 2.9 [10].

Este lípido é zwitteriónico a pH fisiológico [2].

A sua temperatura de transição de fase ocorre aos 41 °C [10].

2.1.3.3. 1-palmitoíl-2-oleiloíl-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC)

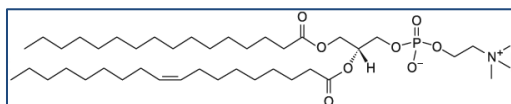


Figura 2.10 - Representação esquemática da estrutura molecular do POPC (adaptado de [10]).

O POPC é um glicerofosfolípido, composto por uma região hidrofílica, que contém um grupo trimetilamónio catiónico, um grupo fosfato aniónico e uma molécula de glicerol à qual estão ligadas duas cadeias metilénicas, sendo que uma dela é saturada composta por ácido palmítico

(C16:0) e a outra é monoinsaturada composta por ácido oleico (C18:1). Estas duas cadeias metilénicas constituem a região hidrofóbica, tal como se pode observar na figura 2.10 [10].

Este lípido é zwitteriónico a pH fisiológico [2].

A sua temperatura de transição de fase ocorre aos $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ [10].

2.1.3.4. Esfingomielina (SM)

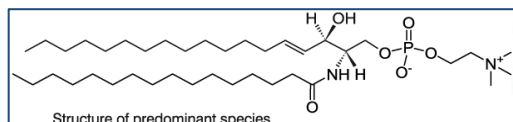


Figura 2.11 - Representação esquemática da estrutura molecular da SM (adaptado de [10]).

Como se pode observar na figura 2.11 a SM é um esfingofosfolípido, composto por uma região hidrofílica, que contém um grupo trimetilamónio catiónico, um grupo fosfato aniónico, um grupo amida e um grupo hidroxilo.

Além disso possui uma região hidrofóbica composta por duas cadeias metilénicas heterogéneas, sendo que uma delas é uma cadeia monoinsaturada de esfingosina que não varia e a outra pode variar dependendo do tipo de SM em questão. A SM utilizada neste trabalho em questão, foi a egg-SM (esfingomielina de ovo), a qual possui uma cadeia metilénica que pode variar bastante, existindo 86% de ácido palmítico (C16:0); 6% de ácido esteárico (C18:0); 3% de ácido behénico (C22:0); 3% de ácido nervónico (C24:1) e ainda 2% de lípidos desconhecidos [10].

Este lípido é zwitteriónico a pH fisiológico [2].

A sua temperatura de transição de fase depende da composição das cadeias metilénicas, por exemplo, se a esfingomielina for do tipo palmitoil-esfingomielina (PSM), vai possuir duas cadeias metilénicas, uma de esfingosina e outra de ácido palmítico, logo a tua temperatura de transição de fase é aproximadamente $41\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3.5. Colesterol

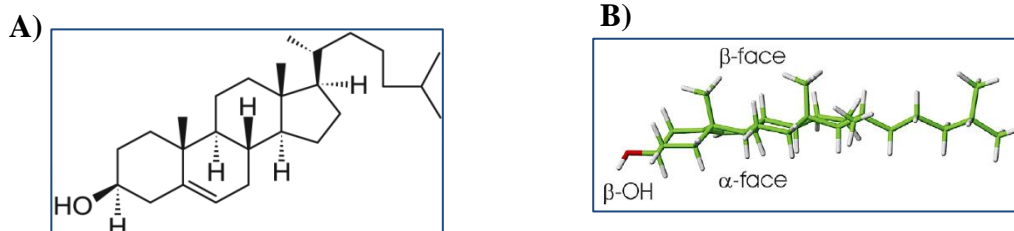


Figura 2.12 - A) Representação esquemática da estrutura molecular do colesterol (adaptado de [11]). B) Representação esquemática da assimetria da molécula de colesterol (adaptado de [14]).

O colesterol é um esteroide composto uma região hidrofílica, que contém um grupo hidroxilo, sendo que o resto da molécula é hidrofóbica, tal como se pode observar na figura 2.12 A) [11].

Como se pode observar na figura 2.12 B), a molécula de colesterol é composta por um sistema planar de anéis tetracíclicos assimétricos, em que uma das faces não possui substituintes e por esse motivo é designada por face plana (face α), sendo que a outra face possui dois grupos metilo e por esse motivo é designada por face rugosa (face β). Além deste sistema de anéis, a molécula de colesterol também possui uma cadeia isoctilo (cadeia de hidrocarboneto ou cadeia metilénica) [14].

2.1.4. Interação Colesterol - Fosfatidilcolina / Esfingomielina

Existem alguns modelos, como: modelo sombrinha (*umbrella model*); modelo dos complexos condensados (*condensed-complexes model*); modelo da super-rede (*superlattice model*), e o modelo mesoscópico (*mesoscopic model of a lipid-cholesterol-water system*), que explicam a interação do colesterol com determinados lípidos de membranas biológicas. Estes modelos procuram explicar a interação dos lípidos de membrana com o colesterol, ao nível molecular, sendo que de uma forma geral, concluem que o colesterol adicionado a bicamadas lipídicas, promove a ordenação das cadeias metilénicas dos lípidos, induzindo uma série de alterações nestas bicamadas lipídicas [15].

Por exemplo, o modelo sombrinha (*umbrella model*), propõe que, uma vez inserido em bicamadas lipídicas, o colesterol exerce um efeito de ordenação nas cadeias metilénicas dos lípidos, diminuindo a sua razão área/volume e aumentando a sua espessura, uma vez que a adição de colesterol às bicamadas lipídicas, faz com que haja uma distensão das cadeias metilénicas dos lípidos que as compõem. Além disso, a zona hidrofílica do colesterol é muito pequena em relação à estrutura da zona hidrofóbica, sendo que aquando da sua adição às bicamadas lipídicas, há a possibilidade de entrar água na bicamada lipídica, então as cabeças polares dos lípidos que compõem as bicamadas lipídicas têm tendência a sofrer uma ligeira torção de maneira a prevenir esta entrada de água [15, 16].

No entanto, a interação molecular entre o colesterol e os lípidos que compõem as bicamadas lipídicas não é igual para todos os lípidos, uma vez que o colesterol interage mais favoravelmente com lípidos saturados, do que com lípidos insaturados. Por este motivo, interage mais facilmente com domínios lipídicos ordenados, formados por lípidos saturados, do que com domínios lipídicos menos ordenados, formados por lípidos insaturados [17].

Como o colesterol interage preferencialmente com lípidos saturados, então é de esperar que estes lípidos sintam a influência da adição de colesterol em maior escala, comparativamente ao efeito do colesterol em lípidos insaturados, sendo que se for feita uma comparação da adição de colesterol a bicamadas lipídicas compostas por POPC e a adição de colesterol a bicamadas lipídicas compostas por SM, irá observar-se uma interação preferencial entre o colesterol e as bicamadas lipídicas compostas por SM, uma vez que as esfingomielinas formam domínios lipídicos mais ordenados que aqueles formados por fosfatidilcolinas [17].

Devido ao fato de possuir duas faces distintas (face α - plana e face β - rugosa), o colesterol pode interagir de forma diferente com lípidos que possuem cadeias metilénicas heterogéneas, como o POPC que tem uma cadeia metilénica saturada e uma cadeia metilénica monoinsaturada. Neste tipo de interação, a face α do colesterol parece interagir preferencialmente com as cadeias metilénicas saturadas, enquanto que a face β parece interagir preferencialmente com as cadeias metilénicas insaturadas. Além disso, quando ocorrem interações entre lípidos como o POPC e o colesterol, o grupo hidroxilo (-OH), do colesterol, vai formar ligações por pontes de hidrogénio, com os grupos carbonilo ligados aos grupos éster (RCOOR'), do POPC. No entanto, estes dois grupos carbonilo ligados aos grupos éster (RCOOR'), são apenas aceitadores de pontes de hidrogénio, uma vez que não possuem grupos funcionais para fazer ligações por pontes de hidrogénio entre si, logo só fazem este tipo de ligações com outras moléculas que não sejam fosfatidilcolinas e que possuam grupos funcionais disponíveis para fazer este tipo específico de ligações, como o colesterol. Desta forma, as interações entre fosfatidilcolinas são mais fracas que as interações entre esfingomielinas, uma vez que entre fosfatidilcolinas não ocorrem ligações por pontes de hidrogénio [17, 18, 19, 20].

Por outro lado, as esfingomielinas têm grupos funcionais disponíveis para fazer ligações de hidrogénio, uma vez que podem doar ou aceitar prótons (H^+), logo podem fazer ligações de hidrogénio entre si, e com outras moléculas que possuam grupos funcionais para este tipo de ligações, como o colesterol. O fato de haver ligações de hidrogénio entre esfingomielinas, faz com que as interações globais entre esfingomielinas sejam mais fortes e estáveis que as interações entre fosfatidilcolinas, permitindo que as esfingomielinas formem domínios lipídicos mais ordenados que aqueles formados por fosfatidilcolinas [17, 20].

Quando há interação entre esfingomielinas, os grupos amida ((R-CO)NH₂), das esfingosinas de umas esfingomielinas podem interagir com os grupos hidroxilo (-OH), de esfingomielinas vizinhas, dando origem a associações bastante estáveis entre estes esfingolípido, proporcionando domínios lipídicos mais ordenados. Entretanto o colesterol

introduz-se nos espaços entre estas esfingomielinas e vai interagir fortemente com elas, sendo que esta interação é estabilizada pelas pontes de hidrogénio que se formam quando o grupo hidroxilo do colesterol interage com o grupo amida da esfingosina. Assim, as esfingomielinas possuem um grupo amida e um grupo hidroxilo que funcionam como doadores e aceptadores de pontes de hidrogénio, possuindo também um grupo carbonilo ligado ao grupo amida (RCONR'R"), que é apenas um aceptador de pontes de hidrogénio [20, 21].

Além das ligações por pontes de hidrogénio que o colesterol pode fazer tanto com as esfingomielinas como com as fosfatidilcolinas, uma vez adicionado às bicamadas lipídicas, o colesterol também induz interações de van der Waals que ocorrem entre os anéis do colesterol e as cadeias metilénicas saturadas, por esse motivo observa-se um maior empacotamento em domínios lipídicos compostos por SM e colesterol do que em POPC e colesterol [14, 20, 21].

2.1.4.1. Interação Colesterol - Fosfatidilcolina / Esfingomielina - Diagramas de fase

Dos estudos realizados relativamente à interação entre fosfatidilcolinas, esfingomielinas e entre estas e o colesterol, resultaram alguns diagramas de fase, que são diagramas onde estão representadas as fases estáveis resultantes da interação dos lípidos, e a sua variação com a temperatura e com o teor de colesterol [2].

O diagrama de fases mais simples que existe e que está completamente estabelecido, é o diagrama de fases para misturas lipídicas binárias compostas por DMPC e DPPC, apresentado na figura 2.13.

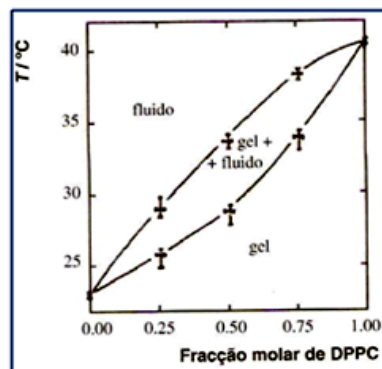


Figura 2.13 - Representação esquemática de um diagrama de fases para a mistura lipídica binária DMPC/DPPC (adaptado de [2]).

Outros diagramas de fase bastante conhecidos e que já estão completamente estabelecidos são os diagramas de misturas lipídicas compostas por DMPC e colesterol, figura 2.14, e misturas lipídicas binárias compostas por DPPC e colesterol, figura 2.15 [22, 23].

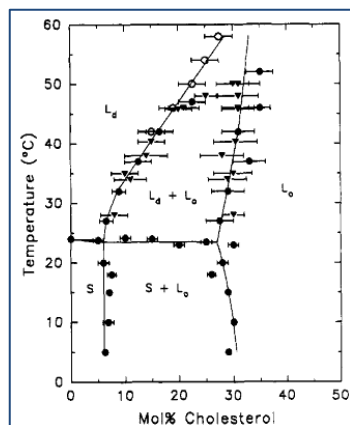


Figura 2.14 - Representação esquemática de um diagrama de fases para a mistura lipídica binária DMPC/colesterol (adaptado de [22]).

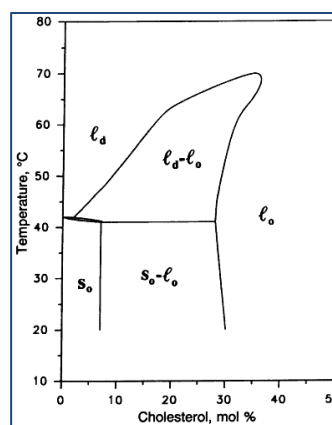


Figura 2.15 - Representação esquemática de um diagrama de fases para a mistura lipídica binária DPPC/colesterol (adaptado de [23]).

Nestes diagramas, L_{α} corresponde à fase líquido-cristalino, ou líquido-desordenado (l_d). A fase líquido-cristalino é caracterizada por ser uma fase em que as cadeias metilénicas dos fosfolípidos são mais flexíveis, devido ao fato de possuírem grande liberdade conformacional, logo as bicamadas lipídicas, que se encontram nesta fase, são mais fluidas e o empacotamento é menor. Em misturas PC/Chol, surge uma nova fase, designada por líquido-ordenado (l_o), em que as cadeias metilénicas exibem menor liberdade conformacional que na fase l_d . L_{β} corresponde à fase gel. A fase gel é caracterizada por ser uma fase em que os fosfolípidos têm as cadeias metilénicas bastante ordenadas, encontrando-se distendidas e bastante empacotadas e por esse motivo é uma fase que apresenta menor fluidez. Os lípidos que se encontram nesta fase, estão num estado sólido-ordenado (s_o) [4, 24, 25].

Determinar o tipo de interações lipídicas que ocorrem entre lípidos, como a fosfatidilcolina, especialmente o POPC, a esfingomiéline e o colesterol, torna-se bastante importante, dada a necessidade de perceber como é que estas interações ocorrem e perceber como ocorrem nas membranas biológicas. Assim torna-se necessário estabelecer diagramas de fase para misturas binárias compostas por POPC e colesterol, SM e colesterol. Como se pode observar na figura 2.16, este tipo de diagramas já existe, no entanto ainda não estão estabelecidos completamente [25].

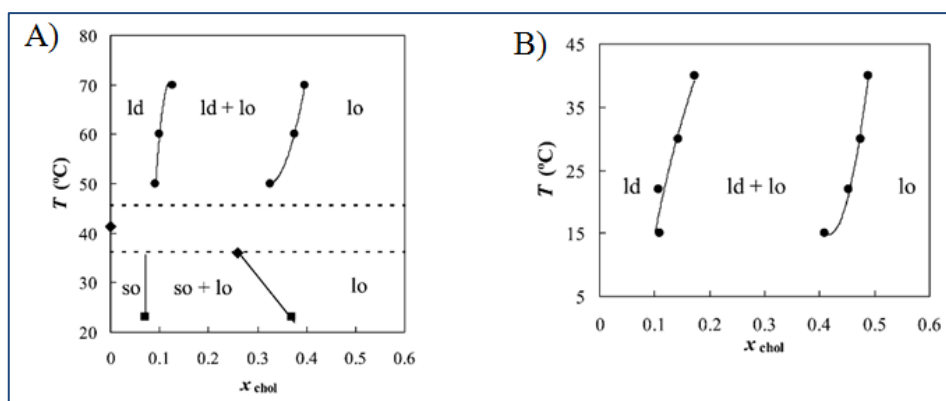


Figura 2.16 - A) Representação esquemática de um diagrama de fases parcial para uma mistura lipídica binária de PSM/colesterol. B) Representação esquemática de um diagrama de fases parcial para uma mistura lipídica binária de POPC/colesterol (adaptado de [25]).

Apesar da intenção deste tipo de estudos, ser determinar o tipo de interações lipídicas que ocorrem em membranas biológicas, esta tarefa torna-se bastante difícil, uma vez que as membranas biológicas são compostas por vários tipos de lípidos diferentes, logo é bastante improvável que alguma vez seja possível mimetizar uma membrana biológica completamente, de forma a determinar um diagrama de fases para esta mistura complexa de lípidos. Ainda assim, existem diagramas de fases para misturas lipídicas ternárias, que são os diagramas mais complexos existentes na literatura até a atualidade, os quais estão apresentados na figura 2.17 [25].

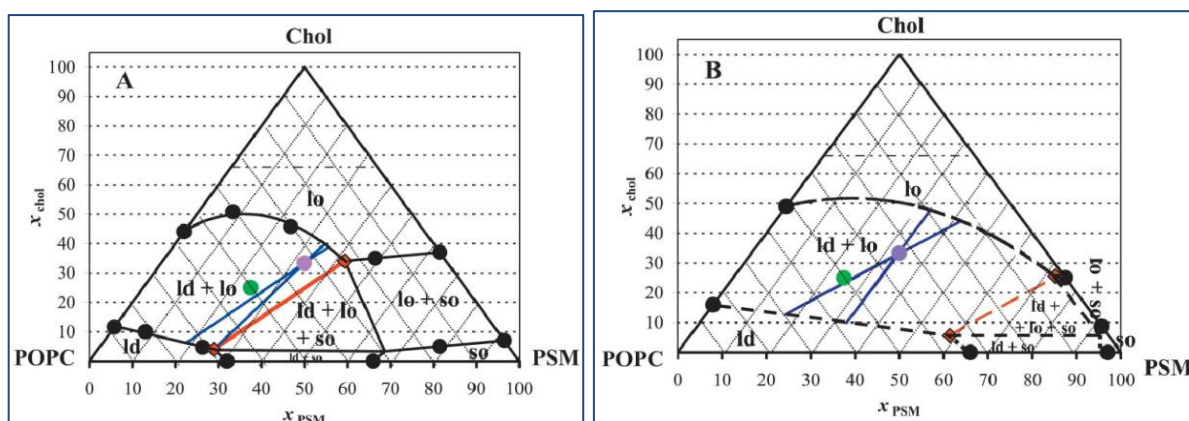


Figura 2.17 - A) Representação esquemática de um diagrama de fases para uma mistura lipídica ternária de PSM/POPC/colesterol, a 23 °C. B) Representação esquemática de um diagrama de fases para uma mistura lipídica ternária de PSM/POPC/colesterol, a 37 °C (adaptado de [25]).

Estes diagramas relacionam a interação dos lípidos mais comuns presentes nas membranas biológicas que são o POPC a esfingomiéline e o colesterol.

2.1.5. Interação Colesterol-Membranas biológicas

As membranas biológicas são fundamentais no funcionamento e sobrevivência das células, tendo funções essenciais como a função de barreira que define o limite entre o meio interior e exterior das células ou dos seus organelos, ou seja, têm funções de compartimentalização. Esta barreira, além de definir a dimensão das células e organelos celulares, é uma barreira seletiva e permeável a determinadas substâncias e íons, assim as membranas também têm uma função de transporte, tendo ainda a capacidade de funcionar como um suporte para determinadas proteínas, estando envolvidas em processos enzimáticos e de sinalização [2, 4, 5].

O colesterol está presente na membrana plasmática das células de vários organismos superiores, representando cerca de 30-50% da massa lipídica da membrana plasmática das células, podendo estar presente noutras percentagens, dependendo do tipo de membrana, no entanto a sua função nas membranas ainda não é totalmente conhecida, ainda assim, é de notar que o colesterol pode afetar as propriedades físico-químicas das membranas, nomeadamente: ordenar as cadeias metilénicas dos lípidos que compõem as bicamadas lipídicas, fazendo aumentar a espessura da zona hidrofóbica destas bicamadas lipídicas; alterar a temperatura de transição de fase dos lípidos; diminuir a razão área/volume das bicamadas lipídicas; diminuir a fluidez e a permeabilidade passiva nas membranas, entre outros [14, 24].

Geralmente, os lípidos têm maior afinidade com determinados lípidos, sendo que as interações que ocorrem entre si, são diferentes dependendo dos tipos de lípidos que interagem. Na secção 2.1.4.), explicou-se que a interação molecular entre o colesterol e os lípidos que compõem as bicamadas lipídicas não é igual para todos os lípidos, uma vez que o colesterol interage mais facilmente com lípidos saturados, do que com lípidos insaturados, visto que os lípidos saturados formam domínios lipídicos mais ordenados que aqueles formados por lípidos insaturados. Como se pode observar na figura 2.18 A) e B), estes domínios lipídicos contribuem para uma maior heterogeneidade das membranas, uma vez que as membranas biológicas podem apresentar uma coexistência de domínios lipídicos mais ordenados (l_o) e domínios lipídicos menos ordenados (l_d), sendo que a existência e a abundância destes domínios dependem da composição lipídica destas membranas biológicas. Assim, o colesterol

tem uma maior preferência de interação com a esfingomiéline, do que com a fosfatidilcolina, uma vez que a esfingomiéline forma domínios lipídicos mais ordenados que aqueles formados por fosfatidilcolinas [4, 17].

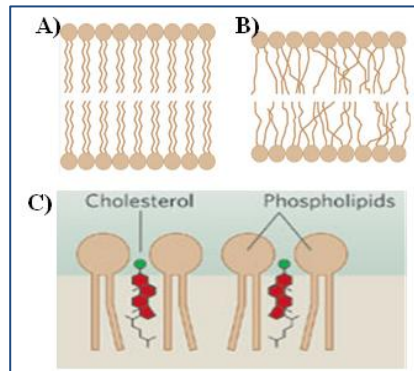


Figura 2.18 - **A)** Representação esquemática de domínios lipídicos ordenados (fase L_o). **B)** Representação esquemática de domínios lipídicos desordenados (fase L_d). **C)** Representação esquemática da interação do colesterol com bicamadas lipídicas (adaptado de [4]).

O fato de o colesterol ter maior preferência de interação com a esfingomiéline, faz com que se formem domínios lipídicos mais ordenados (fase líquido-ordenado), que a restante membrana, a qual se encontra numa fase mais desordenada (fase líquido-desordenado), além disso, se a membrana for composta apenas por esfingomiéline e fosfatidilcolina, e sabendo que a esfingomiéline tem uma temperatura de transição de fase muito mais elevada (~ 41 °C), que a fosfatidilcolina como o POPC (~ -2 °C), é normal que se formem domínios lipídicos mais ordenados para a esfingomiéline, relativamente à fosfatidilcolina, mesmo sem que haja interferência de colesterol, uma vez que, por exemplo, à temperatura ambiente, a esfingomiéline forma domínios em fase gel, enquanto que as fosfatidilcolinas estão numa fase líquido-cristalino [6, 21, 26, 27].

Alguns domínios lipídicos são designados por jangadas lipídicas, ou *rafts*. Estes domínios lipídicos podem difundir lateralmente na membrana biológica e possuem propriedades físico-químicas diferentes do resto da membrana, sendo que determinados lípidos interagem preferencialmente, por apresentarem maior afinidade entre si, havendo também uma maior concentração de colesterol. O fato de haver diferentes organizações lipídicas nas membranas biológicas, faz com que estes domínios lipídicos sejam essenciais para a integração e interação de determinadas proteínas nas membranas biológicas, uma vez que existem proteínas de membrana que interagem preferencialmente com estes domínios lipídicos [6, 21, 26].

A formação de *rafts* é essencial para o bom funcionamento e sobrevivência das células, uma vez que existem vários processos celulares que dependem destes *rafts*, como por exemplo, a transdução de sinal e a entrada/saída de substâncias das células, através das membranas. Mas por outro lado, parece existir uma preferência de interação entre determinados vírus e este tipo de domínios lipídicos, como é o caso do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Para que ocorra a infecção das células animais por este vírus, é necessário que ocorra a interação deste vírus com *rafts* presentes nessas células. [2, 6, 26, 27].

A mistura canónica entre fosfatidilcolinas, como o POPC, esfingomielinas e colesterol é a mistura que contém 33% de cada um destes lípidos, uma vez que nestas percentagens existe uma coexistência de fases líquido-cristalino ordenado e líquido-cristalino desordenado, tanto aos 23 °C, como aos 37 °C, como se pode observar na figura 2.17, que representa esquematicamente um diagrama de fases para uma mistura lipídica ternária de PSM/POPC/colesterol [25, 27].

2.2. Fluorescência

2.2.1. O que é a fluorescência?

O processo de fluorescência consiste na emissão de radiação por moléculas previamente excitadas com radiação eletromagnética. A figura 2.19 representa esquematicamente o processo de fluorescência [28].

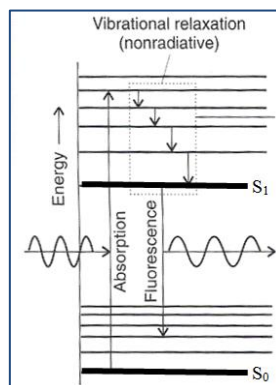


Figura 2.19 - Representação esquemática do processo de fluorescência. (Diagrama de Jablonski. Adaptado de [28]).

Neste processo de fluorescência, as moléculas encontram-se no estado eletrônico fundamental (S_0), no entanto, quando há incidência de radiação, as moléculas que estavam no estado fundamental, absorvem radiação eletromagnética e transitam para níveis de energia mais elevados (estados eletrônicos excitados), ficando num estado excitado. Entretanto, estas moléculas, que se encontram no estado excitado, começam a sofrer um processo de relaxação vibracional, uma vez que colidem com moléculas de solvente que se encontram na vizinhança e vão cedendo energia de forma não-radiativa, através dos vários níveis vibracionais, do estado eletrônico excitado (S_1), até que chegam ao nível vibracional mais baixo desse estado eletrônico excitado. Neste nível, pode ocorrer a transição eletrônica radiativa para o estado eletrônico fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), sendo que esta transição ocorre de uma forma espontânea, em que o excesso de energia das moléculas é emitido como uma radiação [28, 29].

Assim, a fluorescência é um modo de decaimento radiativo, o qual ocorre após uma molécula ter sido excitada eletronicamente, sendo que este decaimento radiativo é resultante da libertação do excesso de energia da molécula excitada, quando esta volta para o estado fundamental. Neste processo há a emissão de fótons, permitindo que a amostra se torne fluorescente [28].

As técnicas de fluorescência são bastante utilizadas em vários tipos de estudos, uma vez que as sondas utilizadas neste tipo de técnicas, permitem obter informações relativas a parâmetros como a estrutura e dinâmica do microambiente que rodeiam as sondas fluorescentes, polaridade, fluidez/viscosidade, além disso, permitem determinar como é que a variação da temperatura altera este tipo de parâmetros, entre outros [29].

Uma grande vantagem em utilizar técnicas de fluorescência é a sua elevada sensibilidade, além disso, estas técnicas permitem estudar determinados processos que ocorrem durante um período de tempo muito curto (desde 10^{-10} s até 10^4 s) [30].

2.2.2. O que é a anisotropia de fluorescência?

A anisotropia de fluorescência (r), diz respeito a propriedades de fluorescência, que dependem da orientação relativa dos momentos dipolares de excitação ($\vec{\mu}_{exc}$) e de emissão ($\vec{\mu}_{em}$), do fluoróforo.

Os fluoróforos possuem momentos dipolares de transição orientados em determinadas direções específicas em eixos moleculares, sendo que as orientações destes momentos

dipolares de transição são específicas para cada fluoróforo, dependendo da sua estrutura. A título de exemplo, na figura 2.20, apresentam-se os momentos dipolares de excitação, específicos para a molécula de antraceno. A capacidade de absorção de luz desta molécula depende da orientação dos momentos dipolares de excitação e da orientação do vetor elétrico (\vec{E}), da luz polarizada incidente, ou seja, para que ocorra a transição do estado fundamental (S_0), para o primeiro estado excitado (S_1), a molécula de antraceno deverá ter o momento dipolar de excitação orientado preferencialmente com a direção do vetor elétrico da luz polarizada incidente, que neste caso, deverá estar verticalmente polarizada. Assim, a anisotropia desta molécula vai depender se a transição ocorre de $S_0 \rightarrow S_1$, ou se ocorre de $S_0 \rightarrow S_2$ [29, 31].

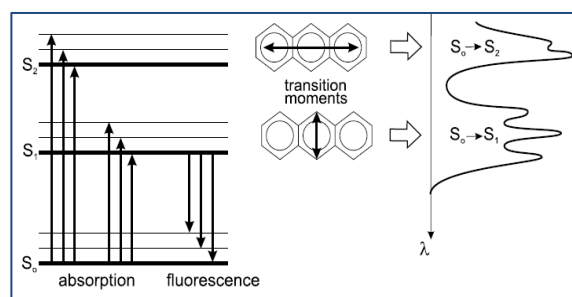


Figura 2.20 - Representação esquemática dos momentos dipolares de absorção específicos para a molécula de antraceno (adaptado de [29]).

Para que a luz tenha uma orientação preferencial relativamente a uma direção específica, tem de estar polarizada linearmente. A figura 2.21 mostra a diferença entre luz natural, luz polarizada linearmente na vertical, luz polarizada linearmente na horizontal e luz parcialmente polarizada [29].

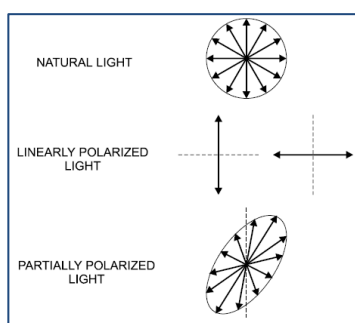


Figura 2.21 - Representação esquemática da luz natural, luz polarizada linearmente na vertical/horizontal e luz polarizada parcialmente (adaptado de [29]).

Numa solução homogénea, os fluoróforos estão no estado fundamental, estando orientados aleatoriamente. Quando incide um feixe de luz polarizada com uma determinada orientação, os fluoróforos que possuem momentos dipolares de excitação orientados paralelamente ao vetor elétrico da luz polarizada incidente ($\vec{\mu}_{exc} \parallel \vec{E}$), vão ser excitados preferencialmente, ou seja, têm maior probabilidade de serem excitados, relativamente a outros fluoróforos que possuem momentos dipolares de excitação que não estão orientados paralelamente ao vetor elétrico da luz polarizada incidente. Desta forma ocorre uma excitação foto-selectiva, em que a população de fluoróforos excitados é orientada parcialmente, levando a uma emissão de fluorescência parcialmente polarizada [31].

Assim, a excitação foto-selectiva, também designada por foto-selecção, ocorre quando uma amostra que possui fluoróforos com momentos dipolares de absorção alinhados paralelamente ao vetor elétrico da luz polarizada incidente, têm maior probabilidade de serem excitados, pela absorção desta luz polarizada incidente [31].

Como se pode observar na figura 2.22, os fluoróforos com momentos dipolares de excitação alinhados paralelamente ao eixo z, têm maior probabilidade de absorver luz polarizada orientada ao longo desse eixo, assim, no estado excitado haverá uma maior população de fluoróforos distribuída simetricamente em torno do eixo z [31].

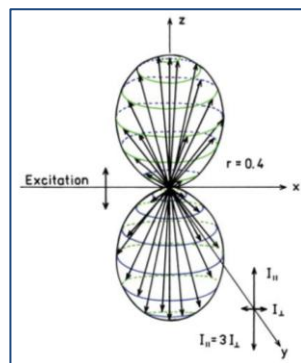


Figura 2.22 - Distribuição de fluoróforos imóveis no seu estado excitado, após a absorção de luz polarizada (adaptado de [31]).

2.2.3. Como medir a anisotropia de fluorescência

As medidas de anisotropia de fluorescência podem ser classificadas em medidas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário (r_{ss}), ou medidas de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo ($r(t)$). Para efetuar medidas de anisotropia de fluorescência

em estado estacionário, é necessário fazer incidir uma luz contínua na amostra em estudo, sendo possível recolher valores de intensidade de luz emitida pela amostra. No entanto, nas medidas de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo, as amostras são expostas a um curto pulso de luz incidente, sendo possível observar o decaimento de intensidade ou decaimento de anisotropia de fluorescência ao longo do tempo [31].

Para fazer medidas de anisotropia de fluorescência, podem ser utilizados dois tipos de métodos: método de formato-L, que utiliza apenas um canal para a luz polarizada emitida e o método de formato-T, que utiliza dois canais separados para a luz polarizada emitida, um dos canais para a componente paralela e o outro para a componente perpendicular. No entanto, geralmente o método de formato-L, apresentado na figura 2.23 B), é o método mais utilizado para fazer medidas de anisotropia de fluorescência tanto no estado estacionário, como resolvida no tempo, devido ao facto de a maioria dos fluorímetros possuírem apenas um canal de emissão [31].

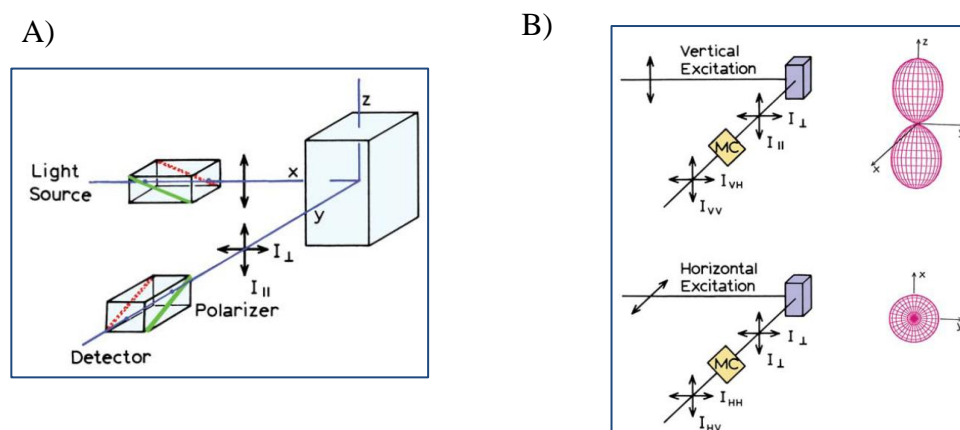


Figura 2.23 - A) Representação esquemática das medidas de anisotropia de fluorescência. **B)** Representação esquemática da determinação das medidas de anisotropia de fluorescência pelo método de formato-L. Os gráficos do lado direito representam as distribuições no estado excitado. MC - Monocromador (adaptado de [31]).

Numa experiência em que se façam medidas de anisotropia, a amostra é irradiada com uma luz polarizada verticalmente, sendo que o vetor de campo elétrico (\vec{E}), da luz polarizada que incide na amostra, é orientado paralelamente em relação ao eixo z da amostra, como se pode observar na figura 2.23 A). Os comprimentos de onda de absorção e emissão são escolhidos por monocromadores de absorção e emissão, sendo que desta forma, os monocromadores polarizam parcialmente a luz incidente e emitida pela amostra, fazendo com que os polarizadores de absorção e emissão sofram uma rotação para as posições vertical (V) e horizontal (H). Assim, tanto a luz incidente, como a luz emitida são polarizadas

parcialmente, sendo que se o polarizador de emissão estiver orientado de forma paralela (\parallel), à direção da luz polarizada incidente, a intensidade da luz polarizada emitida designa-se por I_{\parallel} . Por outro lado, se o polarizador de emissão estiver orientado de forma perpendicular (\perp), à direção da luz polarizada incidente, a intensidade da luz polarizada emitida designa-se por I_{\perp} . No final, o importante é conseguir determinar os valores reais de I_{\parallel} e I_{\perp} [31].

A anisotropia de fluorescência (r), é definida pela equação (1) [31]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

Para determinar os valores reais de I_{\parallel} e I_{\perp} , é necessário ter em conta um fator designado por fator G , o qual corresponde à razão das sensibilidades vertical (S_V), e horizontal (S_H), de deteção do sistema para a luz polarizada vertical e horizontalmente. Se este fator G não for levado em conta, aquando da determinação dos valores reais de I_{\parallel} e I_{\perp} , os valores de anisotropias de fluorescência podem ser considerados incorretos [31].

Este fator G define-se pela equação (2) [31]:

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (2)$$

Considerando que a luz incidente na amostra é polarizada verticalmente, significa que a amostra é excitada verticalmente, sendo que as intensidades de luzes polarizadas observadas são definidas pelas equações (3) e (4) [31]:

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad (3)$$

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp} \quad (4)$$

Onde os índices indicam a orientação da excitação e da emissão dos polarizadores, ou seja, I_{VV} significa que a excitação é polarizada verticalmente e que a emissão é polarizada verticalmente, enquanto que I_{VH} significa que a excitação é polarizada verticalmente e que a emissão é polarizada horizontalmente. k corresponde ao fator de proporcionalidade relacionado com o rendimento quântico do fluoróforo, assim como outros fatores instrumentais [31].

Para determinar a razão de intensidade real (I_{\parallel}/I_{\perp}), procede-se à divisão das equações (3) e (4), levando em consideração o fator G , definido pela equação (2), obtendo-se a equação (5):

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{kS_V I_{\parallel}}{kS_H I_{\perp}} \quad \leftrightarrow \quad \frac{I_{VV}}{I_{VH}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad \leftrightarrow \quad \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{I_{VV}}{GI_{VH}} \quad (5)$$

A anisotropia de fluorescência é definida pela equação (1), então substituindo (5) em (1), obtém-se a anisotropia e fluorescência correta (6), uma vez que se consideram os valores reais de I_{\parallel} e I_{\perp} .

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (6)$$

2.2.4. Compreender a anisotropia de fluorescência

A probabilidade de ocorrer absorção de luz linearmente polarizada pelos fluoróforos, em solução homogênea, é proporcional a $\cos^2\theta$, em que θ corresponde ao ângulo que \vec{E} , faz com o $\vec{\mu}_{exc}$ dos fluoróforos. Assim, apesar de existir uma maior população de fluoróforos alinhados com o eixo z, no estado excitado existem também outros fluoróforos orientados de forma diferente, que podem sofrer excitação pela incidência da luz polarizada, mas estes têm menor probabilidade de se encontrar em torno do eixo z, tendo momentos dipolares de excitação orientados para outros eixos, como os eixos x e y [31].

Como a probabilidade de ocorrer absorção de luz polarizada, pelos fluoróforos é proporcional a $\cos^2\theta$, então a anisotropia é uma função de $\cos^2\theta$ [31].

Tendo em conta a figura 2.24, se for considerado apenas um único fluoróforo, alinhado paralelamente ao eixo z, o ângulo $\theta = 0^\circ$, significa que a probabilidade de absorção de luz linearmente polarizada pelo fluoróforo é máxima ($\cos^2 \theta = 1$), indicando que o momento dipolar de excitação deste fluoróforo está orientado paralelamente ao vetor elétrico da luz polarizada incidente ($\vec{\mu}_{exc} \parallel \vec{E}$). Por outro lado, se $\theta = 90^\circ$, a probabilidade de absorção de luz linearmente polarizada pelo fluoróforo é mínima ($\cos^2 \theta = 0$), indicando que o

momento dipolar de excitação do fluoróforo está orientado perpendicularmente ao vetor elétrico da luz polarizada incidente ($\vec{\mu}_{exc} \perp \vec{E}$) [29].

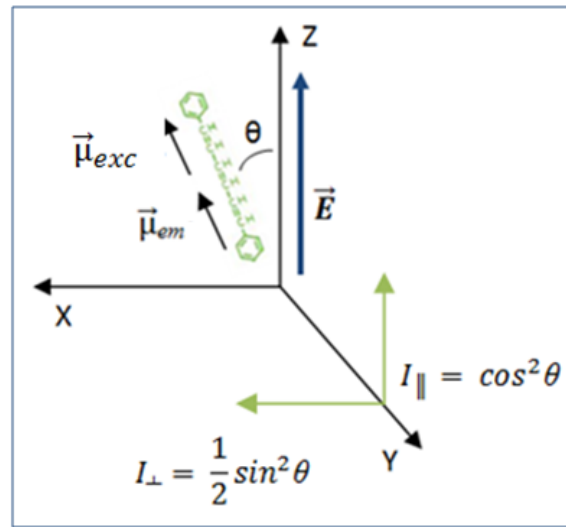


Figura 2.24 - Fluoróforo DPH num sistema coordenado. Como $\vec{\mu}_{exc} \parallel \vec{\mu}_{em}$, $\beta = 0^\circ$ (ângulo entre $\vec{\mu}_{exc}$ e $\vec{\mu}_{em}$) (adaptado de [31]).

Substituindo as intensidades I_{\parallel} e I_{\perp} , apresentadas na figura 2.24, na equação que define a anisotropia de fluorescência (1) e sabendo da trigonometria que: $\cos^2\theta + \sin^2\theta = 1$, obtém-se a equação (7), que define a relação entre a anisotropia de fluorescência e o ângulo que o vetor elétrico da luz polarizada incidente faz com o momento dipolar de excitação do fluoróforo [32].

$$r = \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \quad (7)$$

Onde θ corresponde ao ângulo entre o \vec{E} e o $\vec{\mu}_{exc}$ do fluoróforo [31].

Assim, para um único fluoróforo que esteja orientado ao longo do eixo z e que tenha momentos dipolares de excitação e emissão colineares ($\vec{\mu}_{exc} \parallel \vec{\mu}_{em}$, logo $\beta = 0^\circ$), o ângulo que o momento dipolar de excitação faz com o vetor elétrico da luz polarizada, é $\theta = 0^\circ$, substituindo este valor na equação (7), obtém-se o valor da anisotropia de fluorescência deste fluoróforo que é $r = 1,0$. Mas numa solução homogênea, é bastante difícil que todos os fluoróforos tenham os seus momentos dipolares de excitação orientados de forma paralela ao vetor elétrico da luz polarizada incidente, assim para estas soluções, $\theta \neq 0^\circ$, fazendo com que o valor de anisotropia de fluorescência seja sempre menor que 1 [31].

Para fluoróforos, em solução homogénea, que possuam momentos dipolares de excitação e emissão colineares e ainda não tenham sofrido processos de despolarização, durante o seu estado excitado, a probabilidade de ocorrer absorção de luz polarizada é $3/5$, ou seja $\cos^2\theta = 3/5$, uma vez que se considera que, sob estas condições, ocorre o processo de foto-selecção, em que existe uma população de fluoróforos excitada preferencialmente ao longo de uma direção (direção da luz polarizada incidente), mas existem outros fluoróforos que estão excitados e se encontram orientados em outras direções. Nestas condições, substituindo o valor de $\cos^2\theta = 3/5$ na equação (7), obtém-se o valor máximo de anisotropia de fluorescência que é $r = 0,4$ (é mais correto representar este valor como $r_0 = 0,4$ uma vez que a anisotropia de fluorescência máxima é medida sem que ocorram fenómenos despolarizantes) [31].

Na realidade, a maioria dos fluoróforos em solução homogénea, apresenta uma anisotropia menor que 0,4, porque os momentos dipolares de excitação e emissão não são perfeitamente colineares, ou seja, ocorre um deslocamento no ângulo β que é o ângulo que $\vec{\mu}_{exc}$ faz com $\vec{\mu}_{em}$ do fluoróforo, assim como os momentos dipolares de excitação e emissão não são perfeitamente colineares, $\beta \neq 0$, o qual vai provocar uma diminuição no valor de anisotropia, sendo que além deste deslocamento do ângulo β , a foto-selecção dada pelo fator $2/5$, também é responsável pela diminuição da anisotropia observada que passa a apresentar valores inferiores a 0,4 [31].

A anisotropia fundamental de um fluoróforo também pode depender do comprimento de onda utilizado para excitar esse fluoróforo, devido ao fato de a orientação do momento dipolar de excitação variar para cada banda de absorção, desta forma, o comprimento de onda utilizado para excitar o fluoróforo faz variar o ângulo entre os momentos dipolares de excitação e de emissão deste fluoróforo [31].

Assim, considerando o processo de foto-selecção e considerando que momentos dipolares de excitação e emissão não são colineares, a anisotropia fundamental de um fluoróforo, em solução homogénea é definida pela equação (8):

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (8)$$

Onde β corresponde ao ângulo entre $\vec{\mu}_{exc}$ e $\vec{\mu}_{em}$ do fluoróforo [31].

Alguns estudos realizados com o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), indicam que este fluoróforo apresenta $r_0 = 0,39$, no entanto, existem registros de valores de r_0 ligeiramente inferiores a 0,39 para este fluoróforo [31].

O valor de anisotropia fundamental $r_0 = 0,39$ indica que o ângulo entre $\vec{\mu}_{exc}$ e $\vec{\mu}_{em}$ do fluoróforo é $\beta = 7,4^\circ$, sendo que para momentos dipolares de excitação e emissão colineares, $r_0 = 0,4$ e $\beta = 0^\circ$. Alguns estudos também indicam que a anisotropia fundamental apresenta valores nulos ($r_0 = 0$), quando $\beta = 54,7^\circ$. Se $\beta > 54,7^\circ$, a anisotropia fundamental deverá atingir valores negativos, sendo que $r_0 = -0,20$ é o valor negativo máximo que se pode considerar, o qual corresponde a um ângulo entre $\vec{\mu}_{exc}$ e $\vec{\mu}_{em}$ de 90° [31].

A r_0 , de uma solução homogênea de fluoróforos, corresponde a uma medida de anisotropia que leva em consideração o ângulo entre $\vec{\mu}_{exc}$ e $\vec{\mu}_{em}$, na ausência de fenômenos despolarizantes.

2.2.5. Fenómenos despolarizantes

Durante o tempo em que um fluoróforo se encontra no estado excitado, podem ocorrer mudanças na direção dos momentos dipolares de transição, ou seja, nos momentos dipolares de emissão, sendo que estas mudanças podem levar a uma diminuição dos valores de anisotropia, relativamente aos valores esperados teoricamente. Então, a despolarização é um fenômeno que acontece quando o $\vec{\mu}_{em}$ sofre alterações durante o tempo em que o fluoróforo se encontra no estado excitado, sendo que esta despolarização vai provocar uma diminuição nas medidas de anisotropia. Estas mudanças na direção dos $\vec{\mu}_{exc}$ e $\vec{\mu}_{em}$, são provocadas por fenômenos despolarizantes como: transferência de energia de excitação para outra molécula que tenha uma orientação diferente; reabsorção/emissão radiactivas, difusão rotacional, dispersão da luz devido à turbidez da amostra, desalinhamento dos polarizadores, entre outros [29, 31].

Assim, a anisotropia de fluorescência, é uma medida adimensional que determina o deslocamento angular entre os momentos dipolares de excitação e emissão de luz, que ocorre quando um fluoróforo, no seu estado excitado, sofre um processo despolarizante [31].

2.2.5.1. Efeito despolarizante da difusão rotacional de sondas fluorescentes em medidas de anisotropia de fluorescência

A difusão rotacional é responsável pelo deslocamento angular do fluoróforo, uma vez que a difusão rotacional provoca uma alteração na direção dos momentos de transição do fluoróforo, conduzindo a uma despolarização. Assim, o deslocamento angular depende da extensão e da velocidade da difusão rotacional, enquanto o fluoróforo se encontra no estado excitado, sendo que a difusão rotacional depende do tamanho e forma do fluoróforo, assim como da fluidez do meio em que este fluoróforo se encontra. Se o solvente que rodeia o fluoróforo for mais fluido, este fluoróforo vai ter uma maior difusão rotacional, então a anisotropia vai diminuir, porque a despolarização pela difusão rotacional é maior; por outro lado, se o solvente for mais viscoso, o fluoróforo vai apresentar menor difusão rotacional e por esse motivo, os valores de anisotropia vão ser mais elevados. O tamanho do fluoróforo também é bastante importante, sendo que se o fluoróforo for pequeno e se se encontrar num meio fluido, a difusão rotacional vai ser mais elevada, então a anisotropia diminui bastante e vice-versa [31, 32].

É possível fazer diminuir o processo de difusão rotacional ao ligar o fluoróforo a uma macromolécula, mas também existem outras formas de diminuir este processo, que são por exemplo, o aumento da viscosidade do meio em que o fluoróforo se encontra, ou ainda diminuir a temperatura [31].

2.2.5.2. Efeito despolarizante da dispersão da luz em medidas de anisotropia de fluorescência

Amostras como suspensões aquosas de membranas podem apresentar alguma turbidez, sendo que esta turbidez depende do estado físico das membranas, do seu tamanho, da quantidade de colesterol e de proteínas presentes nestas membranas, entre outros. A turbidez de suspensões aquosas de membranas pode diminuir com o aumento da concentração de colesterol e aumentar com o aumento da concentração de proteínas presentes nestas membranas [31, 33].

Amostras que sejam mais turvas, apresentam um maior índice de refração da luz, o que faz com que possa ocorrer a dispersão da luz incidente e da luz emitida pela amostra [31].

Existe uma dependência entre o índice de refração e a temperatura, sendo que com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição no índice de refração, uma vez que as amostras se tornam menos turvas quando a temperatura aumenta, assim a diminuição do índice de refração com o aumento da temperatura, conduz a uma diminuição da dispersão de luz nas amostras [34].

O índice de refração de uma suspensão lipídica aumenta linearmente com a concentração lipídica, sendo que este índice de refração é dado pela equação (9) [34]:

$$n = n_w + W \frac{dn}{dW} \quad (9)$$

Onde n_w corresponde ao índice de refração da água; W corresponde à fração mássica lipídica e dn/dW corresponde ao incremento do índice de refração, aquando de alterações na fração mássica lipídica.

A dispersão de luz, devido à turbidez das amostras, é outro exemplo de fenómeno despolarizante que conduz a alterações nas medidas de anisotropia de fluorescência, fazendo com que as medidas de anisotropia de fluorescência observadas, sejam inferiores, comparativamente com as medidas de anisotropia de fluorescência reais, que seriam obtidas se as amostras não apresentassem turbidez. Assim, quanto maior for a turbidez da amostra, maior será o índice de refração, que resulta numa maior dispersão de luz que faz aumentar o erro associado às medidas de anisotropia de fluorescência observadas [31, 33, 34].

Quando se fazem estudos relativamente à fluidez das membranas, através de medidas de anisotropia de fluorescência, devem fazer-se correções de despolarização para evitar a ocorrência de determinados erros, como os erros associados à dispersão da luz provocada pela turbidez da amostra. Desta forma, devem ser analisados os efeitos da turbidez em amostras que sejam visivelmente turvas, além disso também é recomendado fazer uma diluição deste tipo de amostra, assim como utilizar cuvettes de menores dimensões, sendo estas algumas medidas experimentais tomadas para reduzir a turbidez de amostras, reduzindo os erros associados às medidas de anisotropia de fluorescência observadas [31, 33].

2.3. Sonda de fluorescência 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)

As sondas fluorescentes, são compostas por fluoróforos que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos e são largamente utilizadas na espectroscopia de fluorescência, sendo que existe uma grande variedade de sondas fluorescentes que são utilizadas dependendo das suas características específicas, do tipo de experiência e do tipo de informação que se quer obter, além disso, há que ter em conta que estas sondas são bastante sensíveis às condições do meio envolvente, visto que as suas propriedades espectroscópicas podem ser alteradas dependendo desse meio, assim estas sondas fluorescentes vão reportar determinadas propriedades do meio que as rodeia [31].

Por exemplo, para determinar valores de difusão rotacional de determinadas sondas é necessário utilizar sondas fluorescentes que possuam anisotropias de fluorescência diferentes de zero, como o DPH. Sabendo que a difusão rotacional das sondas condiciona os valores de anisotropia de fluorescência e que a fluidez do meio condiciona a difusão rotacional das sondas fluorescentes, então é possível utilizar sondas fluorescentes, como o DPH, para determinar valores de anisotropia de fluorescência, que poderão variar consoante a fluidez do meio [31, 35].

Os fluoróforos podem ser intrínsecos ou extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos ocorrem de forma natural, sendo que os fluoróforos extrínsecos são adicionados a uma amostra que não possui fluorescência própria, ou adicionados a uma amostra que possui fluorescência própria, mas em que se pretende alterar as propriedades espectroscópicas [31].

O DPH é um fluoróforo extrínseco, sendo uma das sondas mais utilizadas em estudos de membranas, devido ao fato de ter uma baixa solubilidade em água e possuir uma estrutura apolar (ver figura 2.26 (a)), e por esse motivo particiona para a região apolar das membranas, estando livre no interior hidrofóbico destas membranas [31, 36].

No entanto, existem derivados de DPH, como é o caso do trimetilamónio-difenilhexatrieno (TMA-DPH), que se localiza na região superior da zona hidrofóbica das bicamadas lipídicas, uma vez que tem uma carga positiva, sendo que as suas cadeias se estendem paralelamente ao longo das cadeias metilénicas dos fosfolípidos das bicamadas lipídicas; ou o caso do 2-(3difenil-hexatrieno)-propanoíl-1-hexadecanoíl-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPH-PC), que se localiza no interior profundo da zona hidrofóbica das bicamadas lipídicas, uma vez que o DPH substitui o carbono 13 de uma das cadeias do ácido palmítico [18].

Genz *et al.* (1986), realizaram um trabalho experimental, no qual fizeram medidas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, do DPH e seus derivados (TMA-DPH e DPH-PC), em vesículas compostas por apenas por DPPC e vesículas compostas por 85% de DPPC e 15% de Chol, com o objetivo de determinar as alterações na ordenação das cadeias metilénicas destas vesículas, durante a transição de fase. Os resultados estão apresentados na figura 2.25 [18].

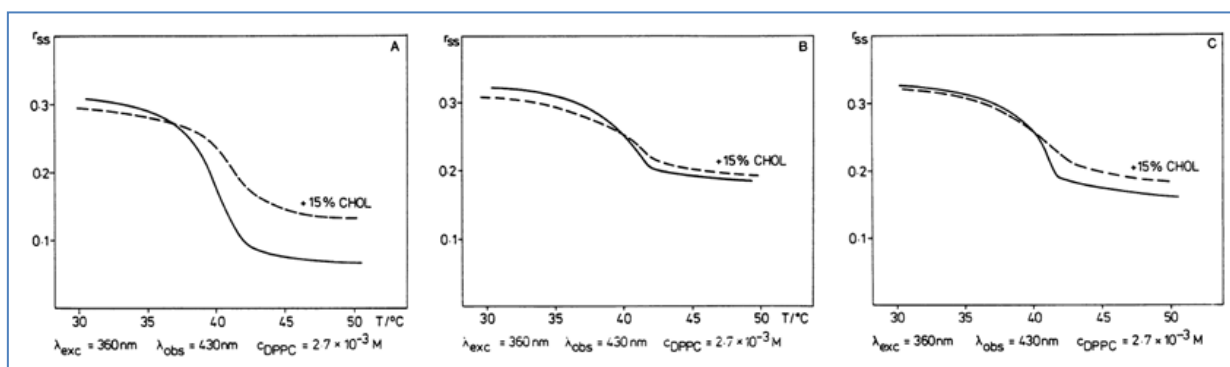


Figura 2.25 - Representação esquemática da variação da anisotropia de fluorescência em estado estacionário com a temperatura, para vesículas compostas por 100% DPPC e 85% DPPC + 15% Chol. Proporção DPH:DPPC = 1:400. **A)** Anisotropia de fluorescência do DPH; **B)** Anisotropia de fluorescência do TMA-DPH; **C)** Anisotropia de fluorescência do DPH-PC (adaptado de [18]).

Como estas três sondas de fluorescência têm localizações diferentes no interior das bicamadas lipídicas, têm sensibilidades diferentes relativamente à ordem das cadeias metilénicas, dependendo da região em que se localizam. Comparando os resultados, observa-se que abaixo da transição de fase, a sonda TMA-DPH é a sonda mais sensível à adição de colesterol, devido ao fato de se localizar na região superior da zona hidrofóbica das bicamadas lipídicas, onde o colesterol também se localiza. Por outro lado, nota-se que, nas mesmas condições, a sonda DPH-PC é a sonda menos sensível à adição de colesterol, uma vez que se localiza no interior profundo da zona hidrofóbica das bicamadas lipídicas, onde o colesterol exerce menor efeito. Acima da temperatura de transição de fase, nota-se que a adição de colesterol às vesículas provoca maiores alterações na anisotropia de fluorescência do DPH, uma vez que esta sonda é a que tem maior mobilidade dentro da bicamada lipídica [18].

Assim, é preferível a utilização do DPH à utilização dos seus derivados, uma vez que o DPH particiona para a região hidrofóbica das bicamadas lipídicas e se encontra livre nessa região, logo vai reportar a ordenação do meio que o rodeia, sem estar restrito a nenhuma zona específica, como é o caso dos seus derivados. Alguns estudos mostram que acima da temperatura de transição de fase, a adição de colesterol afeta mais os resultados obtidos com a

sonda DPH, do que com os seus derivados, o que leva a concluir que a sonda com maior mobilidade é aquela que é mais afetada [18].

Estruturalmente, o DPH é uma molécula *all-trans* rígida e linear, apresentando uma forma parecida a um bastonete [31, 37].

Apesar de não apresentar emissão de fluorescência significativa em meio aquoso, no interior das membranas, o DPH possui emissão de fluorescência bem caracterizada. Assumindo que as propriedades de fluorescência do DPH são alteradas consoante o meio que o rodeia, então quando o DPH se encontra no interior de membranas, o seu comportamento vai depender do comportamento dos lípidos que o rodeiam, desta forma é possível utilizar esta sonda para realizar vários estudos em membranas, como por exemplo, determinar medidas de anisotropia de fluorescência de modo a avaliar a fluidez da região hidrofóbica destas membranas, sendo que esta fluidez depende da ordenação das cadeias metilénicas dos lípidos que compõem estas membranas. A ordem das cadeias metilénicas dos lípidos depende de fatores como a temperatura e a composição das próprias membranas. Ao avaliar a fluidez das membranas, é possível avaliar parâmetros como as transições de fase que ocorrem nestas membranas [31, 38, 39].

Na figura 2.26, observa-se uma representação esquemática da estrutura do DPH (a), a sua localização em bicamadas lipídicas (b), assim como dos seus espectros de absorção e emissão característicos (c) [31, 38; 39].

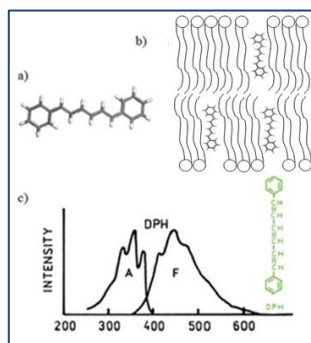


Figura 2.26 - Representação esquemática da estrutura do DPH (a); localização do DPH numa bicamada lipídica (b); Espectro característico de absorção e emissão do DPH em membranas (c) (adaptado de [30, 31, 37, 38, 40]).

O DPH particiona para a zona apolar das membranas, ficando alinhado paralelamente às cadeias metilénicas dos lípidos que compõem estas membranas (Figura 2.26 (b)). Desta forma, esta sonda permite determinar a fluidez, a ordem das cadeias metilénicas dos lípidos, assim como a formação de domínios e a heterogeneidade das membranas [30, 31, 37, 38, 40].

Normalmente, o valor máximo de absorção ocorre aos 360 nm e o valor máximo de emissão ocorre aos 430 nm, sendo que estes valores são determinados aquando da localização

do DPH em membranas, no entanto estes valores podem apresentar algumas variações dependendo da composição e da ordem destas membranas [36].

O decaimento de fluorescência das sondas fluorescentes pode depender de fatores como: tamanho, forma e flexibilidade das sondas fluorescentes, assim como da ordenação das bicamadas lipídicas ou o meio químico que rodeia as sondas. Quando as sondas são esféricas, o decaimento de fluorescência é exponencial simples, no entanto, quando as sondas não são esféricas, o decaimento de fluorescência é biexponencial [31, 41].

Em membranas, o DPH exibe um decaimento de fluorescência biexponencial, devido ao fato de ser uma sonda não-esférica, apresentando um tempo de vida mais longo (τ_1), que ocorre aos 10 ± 1 ns e um tempo de vida mais curto (τ_2), que ocorre aos 4 ± 1 ns, como se pode observar na figura 2.27. Todavia, o decaimento de fluorescência biexponencial pode estar relacionado com a localização do DPH nas bicamadas lipídicas, como demonstra o estudo realizado por Konopásek *et al.* (2004). Nesse estudo demonstraram que o τ_2 ocorre quando existe uma população de DPH localizada mais perto da interface membrana/água e que τ_1 ocorre quando o DPH se encontra no interior hidrofóbico das bicamadas lipídicas [31, 41].

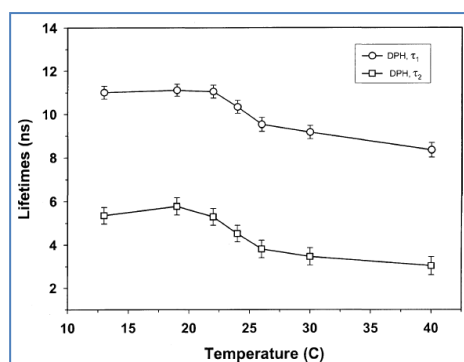


Figura 2.27 - Representação esquemática da dependência dos tempos de vida do DPH, com a temperatura, em LUV compostos por DMPC (adaptado de [41]).

O tempo de vida (τ_0), do DPH, em bicamadas lipídicas, pode apresentar valores diferentes, dependendo da fase em que estas bicamadas lipídicas se encontram, uma vez que se estiverem numa fase gel pura, o τ_0 do DPH é mais longo, por outro lado, se estiverem numa fase líquido-cristalino, o τ_0 é mais curto. Assim, o τ_0 do DPH depende da composição das bicamadas lipídicas, dependendo também da temperatura. Todavia, o τ_0 do DPH pode depender da temperatura, se este se encontrar mais perto da interface membrana/água, no entanto, existem estudos que sugerem que o tempo de vida dos fluoróforos seja independente

da temperatura, quando estes fluoróforos se encontram no interior hidrofóbico das bicamadas lipídicas [31, 41, 42, 43].

Como foi referido anteriormente, o decaimento de fluorescência das sondas fluorescentes também pode depender da sua flexibilidade. Quando o DPH se encontra no S_0 e no S_1 , apresenta uma simetria A_g , sendo que a transição $S_0 \rightarrow S_1$ é proibida, logo quando absorve energia e passa para o estado excitado, ocorre a transição $S_0 \rightarrow S_2$, em que este S_2 , apresenta uma simetria B_u , que é diferente, logo esta transição já é permitida, como se pode observar na figura 2.28. No entanto, quando ocorre o decaimento de fluorescência, para τ_1 , não se observa a transição $S_2 \rightarrow S_0$, devido ao fato de S_2 ser um estado excitado menos estável que o estado S_1 , para este tipo de sondas fluorescentes, logo para τ_1 observa-se a transição $S_1 \rightarrow S_0$. Esta transição passa a ser permitida ao haver um acoplamento entre os estados S_1 e S_2 , devido à pouca diferença energética entre estes dois estados eletrónicos, a qual provoca alterações na simetria A_g . Um aumento deste acoplamento faz com que a fluorescência aumente e que ocorra uma diminuição na isomerização *cis-trans* do DPH. Então quando menor for a isomerização *cis-trans* do DPH, ou seja, quando menor for a sua flexibilidade, maior é o aumento no τ_1 [44].

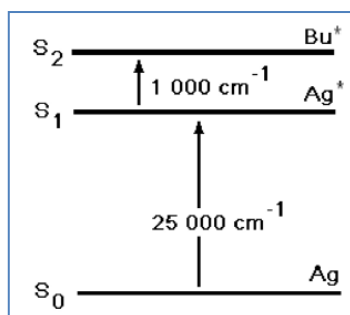


Figura 2.28 - Representação esquemática do diagrama de Jablonski, para o DPH em hexano (adaptado de [44]).

Apesar de ser a sonda de fluorescência mais utilizada para determinar certas propriedades de membranas, existem evidências que indicam que o DPH pode perturbar a ordem das bicamadas lipídicas, uma vez que influencia a ordenação das cadeias metilénicas dos lípidos que as compõem. No entanto, estas perturbações afetam apenas os lípidos que se encontram na vizinhança da sonda, tratando-se de perturbações locais, ainda assim, as perturbações provocadas pela inserção de sondas em bicamadas lipídicas, ocorrem inevitavelmente, até mesmo quando a concentração de sonda é baixa, uma vez que estas sondas são consideradas corpos estranhos à composição normal das bicamadas lipídicas, desta

forma, a adição de sondas em bicamadas lipídicas pode provocar perturbações na estrutura destas bicamadas lipídicas, na dinâmica dos seus componentes, perturbações a nível termotrópico, como por exemplo, a alteração da temperatura da transição de fase, entre outros [30, 38, 40].

Existem evidências experimentais que apontam para a ocorrência de perturbações em bicamadas lipídicas compostas por DPPC e colesterol, aquando da adição de DPH, sendo que estas perturbações dependem da concentração de colesterol. Quanto maior for a concentração de colesterol presente nas bicamadas lipídicas, menos significativas são as perturbações provocadas pelo DPH, uma vez que o efeito de ordenação do colesterol é dominante [30, 38].

2.4. Anisotropia de fluorescência do DPH

2.4.1. Anisotropia de fluorescência do DPH em parafina líquida

Em 1977, Kawato e seus colaboradores realizaram um estudo onde foram utilizadas técnicas de fluorescência resolvida no tempo, como anisotropia de fluorescência resolvida no tempo e intensidade de fluorescência resolvida no tempo, para descrever os movimentos moleculares do DPH em vários meios, nomeadamente na parafina líquida e obtiveram os valores apresentados na figura 2.29 [43].

Solvent	T (°C)	η (P)	τ (ns)	r_1	ϕ_1 (ns)	D (ns ⁻¹)	$\langle r \rangle$	V_{df} (cm ³)
Glycerin	-5		5.6	0.395	448.1	4×10^{-4}	0.390	
	20	12	3.9	0.392	95.5	2×10^{-3}	0.376	3.2×10^{-23}
Liquid paraffin	9.2	4	9.8	0.365	18.0	0.009	0.237	18×10^{-23}
	19.8	2.0	9.7	0.359	7.5	0.022	0.154	15×10^{-23}
	30.0	1.0	9.8	0.346	4.3	0.039	0.106	18×10^{-23}
	39.5	0.6	9.9	0.355	2.4	0.069	0.068	17×10^{-23}

^a D is the rotational diffusion constant in isotropic media, $D = \frac{1}{6}\phi_1$.

Figura 2.29 - Representação dos valores da dinâmica do DPH em glicerina e parafina líquida, obtidos experimentalmente por Kawato e seus colaboradores (adaptado de [43]).

Estes valores são bastante importantes, uma vez que, atualmente, o comportamento do DPH em parafina líquida é bem conhecido e tido como referência na comparação de estudos em que a dinâmica do DPH, em determinados meios, não é tão bem conhecida.

Pode considerar-se que a parafina líquida tenha uma natureza molecular semelhante à natureza molecular das bicamadas lipídicas, uma vez que, tal como as bicamadas lipídicas, a parafina líquida é um líquido polimérico composto por cadeias de hidrocarboneto, que podem estar distendidas ou enroladas (*entanglement*), devido à restrição imposta por outras cadeias de hidrocarboneto, sendo que desta forma e à semelhança do que acontece nas bicamadas lipídicas, existem zonas mais ordenadas e outras zonas menos ordenadas, havendo reptação, que significa que as propriedades de mobilidade das cadeias de hidrocarboneto não são sempre iguais em todo o líquido. Desta forma, é possível assumir que o comportamento do DPH em parafina líquida, seja comparável ao comportamento do DPH em bicamadas lipídicas, o qual não apresenta uma difusão rotacional equivalente e homogênea por todo o meio, tal como acontece com o DPH na parafina líquida [45, 46].

Considerando os valores da dinâmica do DPH em parafina líquida, apresentados na figura 2.29 é possível determinar a dependência da anisotropia de fluorescência com o inverso da temperatura, que está apresentada na figura 2.30.

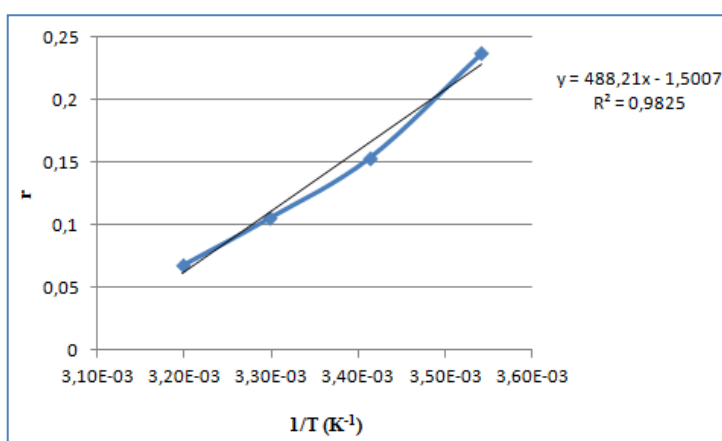


Figura 2.30 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência *versus* inverso da temperatura, para o DPH em parafina líquida.

Como se pode notar, existe uma dependência não-linear entre a anisotropia de fluorescência, com o inverso da temperatura para o DPH em parafina líquida. Este resultado é utilizado como referência para analisar os resultados obtidos para o DPH em MLV compostos por POPC e Colesterol, na seção 4.5.

Se considerar uma solução de viscosidade conhecida como referência, como é o caso deste estudo realizado por Kawato e seus colaboradores, e tendo as medidas de anisotropia de fluorescência média do DPH, num meio com viscosidade desconhecida, é possível determinar

os valores de energia de ativação (E_a), da solução de viscosidade conhecida e compará-los com a E_a da solução de viscosidade desconhecida, de maneira a ter uma noção se a solução de viscosidade desconhecida é mais ou menos viscosa que a solução de referência, uma vez que se a energia de ativação for maior significa que a viscosidade da solução é maior, por outro lado se a energia de ativação for menor, a viscosidade da solução é menor [45, 43].

Assim, considerando os valores da dinâmica do DPH em parafina líquida, apresentados na figura 2.29, é possível determinar a E_a , através do declive do gráfico $\ln(\eta)$ versus $\frac{1}{T}$, apresentado na figura 2.31.

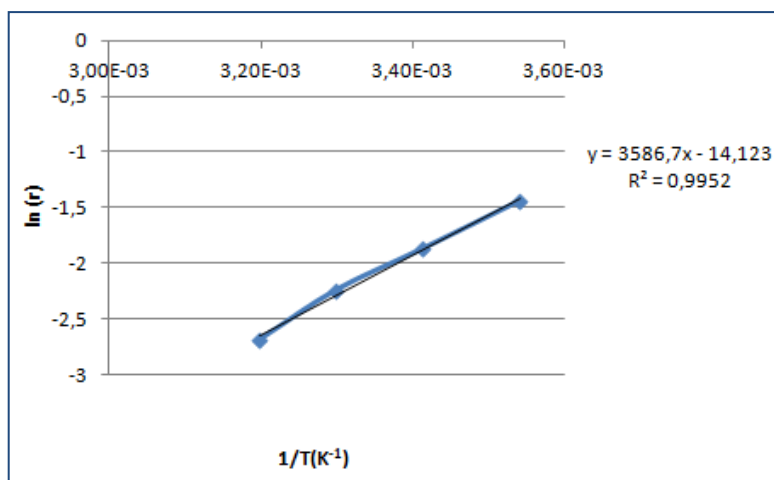


Figura 2.31 - Representação gráfica da variação do logaritmo neperiano da anisotropia de fluorescência versus inverso da temperatura, para o DPH em parafina líquida.

Sabendo que para este tipo de gráficos, o declive é igual a:

$$m = \frac{E_a}{R} \quad (10)$$

Onde R representa a constante dos gases ideais.

Através da linearização: $\ln(r)$ versus $\frac{1}{T}$, para os valores de anisotropia de fluorescência do DPH em parafina líquida, obtém-se a equação:

$$y = 3586,7 x - 14,123; R^2 = 0,9952 \quad (11)$$

Então fazendo os cálculos para determinar a energia de ativação, obtém-se $E_a = 29,82$ kJ mol⁻¹. Esta é a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em parafina líquida.

Além disso, recorrendo ao trabalho de Kawato e colaboradores, é possível determinar um valor de volume molar (V_m), que é o volume que o DPH ocupa na parafina líquida, assumindo que a difusão rotacional é esférica, através do declive do gráfico $\frac{1}{r}$ versus $\frac{T}{\eta}$, apresentado na figura 2.32.

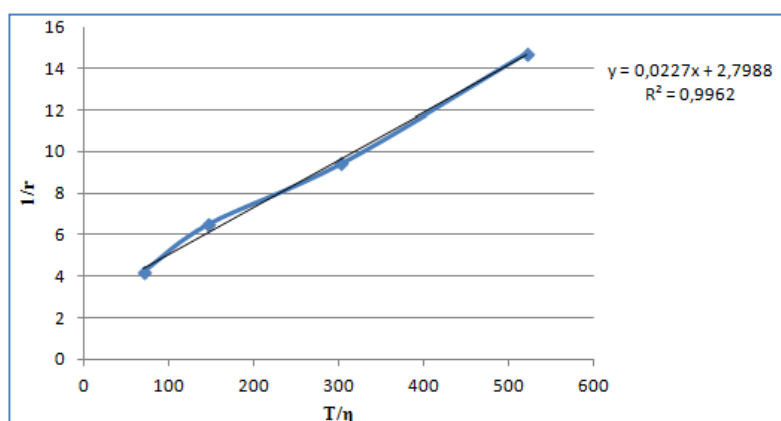


Figura 2.32 - Representação gráfica da variação do inverso da anisotropia de fluorescência versus o quociente da temperatura com a viscosidade, para o DPH em parafina líquida.

Sabendo que para este tipo de gráficos, o declive é igual a:

$$m = \frac{\tau R}{r_0 V_m} \quad (12)$$

Onde: τ representa o tempo de vida da sonda fluorescente (9,8 ns); R representa a constante dos gases ideais; r_0 representa a anisotropia fundamental e V_m representa o volume molar da sonda fluorescente.

Então através do declive do gráfico apresentado na figura 2.32, determina-se um volume de 100,409 cm³ mol⁻¹, que é o volume que o DPH ocupa na parafina líquida, assumindo que a difusão rotacional é esférica.

Estes valores são valores de referência bastante importantes para discutir os resultados obtidos neste trabalho experimental, apresentados na seção 4.5.

2.4.2. Características da anisotropia de fluorescência do DPH

A difusão rotacional é um dos fenômenos despolarizantes que podem influenciar as medidas de anisotropia de fluorescência de determinadas sondas fluorescentes, sendo que a despolarização por difusão rotacional, para rotores esféricos, é descrita pela equação de Perrin (13). Esta equação permite interpretar a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, de fluoróforos esféricos em determinados solventes [31; 32]:

$$\frac{r_0}{r_{ss}} = 1 + \frac{\tau}{\theta} \quad (13)$$

sendo:

$$\theta = \frac{\eta(T)V_m}{RT} \quad (14)$$

Rearranjando, obtém-se a equação de Perrin:

$$\frac{1}{r_{ss}} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau RT}{\eta(T)V_m} \right) \quad (15)$$

Onde: r_0 representa a anisotropia de fluorescência fundamental; r_{ss} representa a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário; τ representa o tempo de vida do fluoróforo; θ corresponde ao tempo de correlação rotacional para o processo de difusão; $\eta(T)$ representa a viscosidade do meio, dependente da temperatura; V_m representa o volume molar do fluoróforo; T corresponde à temperatura absoluta e R corresponde à constante dos gases [31, 32].

A sonda de fluorescência DPH, pode ser considerada um rotor isotrópico esférico, devido ao fato de apresentar simetria ao longo do eixo molecular maior e também por ser uma molécula rígida e possuir a forma de um bastonete. Desta forma, quando se encontra no estado excitado, realiza movimentos de rotação, descrevendo a forma de uma esfera, sendo que quanto mais fluído for o meio que rodeia esta sonda, maior será a sua liberdade rotacional. Além disso, o DPH possui o momento dipolar de emissão orientado paralelamente ao longo do eixo maior da molécula e geralmente assume-se que os momentos dipolares de excitação e emissão são paralelos para esta sonda de fluorescência. Desta forma, é possível garantir que a

despolarização da fluorescência do DPH, devido à difusão rotacional, é sempre igual, qualquer que seja o ângulo de rotação do DPH. Desta forma, é possível aplicar a equação de Perrin (13), para esta sonda de fluorescência [31].

Para líquidos homogêneos normais, existe uma relação exponencial entre a viscosidade desses líquidos e a temperatura a que eles se encontram, sendo que o gráfico $\ln(\eta)$ versus $\frac{1}{T}$, fornece uma linearização desta relação. Assim, um gráfico $\ln(\eta)$ versus $\frac{1}{T}$, resulta sempre numa reta, e todos os líquidos homogêneos normais obedecem a esta relação. Quando se observam desvios a esta relação, significa que ocorreram alterações no estado molecular das amostras e que estas amostras deixaram de apresentar propriedades típicas de líquidos homogêneos normais [45].

A equação de Eyring (16), é uma equação do tipo da equação de Arrhenius, que relaciona a viscosidade de um meio, com a temperatura e com a energia de ativação, permitindo determinar quantitativamente, a dependência da viscosidade de um meio, com a temperatura a que esse meio se encontra, permitindo determinar a energia de ativação, que é a energia necessária para que uma molécula possa atingir um novo estado de equilíbrio, após ultrapassar uma barreira potencial [44, 47].

$$\eta(T) = \eta_0 e^{\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (16)$$

Onde: $\eta(T)$ representa a viscosidade do meio, dependente da temperatura; η_0 corresponde ao fator pré-exponencial; E_a corresponde à energia de ativação; T corresponde à temperatura absoluta e R corresponde à constante dos gases [45, 47].

Por exemplo, em bicamadas lipídicas, a sonda de fluorescência DPH irá necessitar de maior energia de ativação, se estas bicamadas lipídicas estiverem mais ordenadas e por conseguinte, a sua viscosidade é maior, então o DPH necessitará de maior energia de ativação para que ocorra a difusão rotacional. Por outro lado, se a viscosidade das bicamadas lipídicas for menor, significa que estas bicamadas lipídicas estão menos ordenadas, logo o DPH necessitará de menor energia de ativação para que ocorra a difusão rotacional [47].

Considerando a equação de Eyring (16), que relaciona a viscosidade com a temperatura e a equação de Perrin (13), que descreve a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, de fluoróforos esféricos, é possível obter a expressão (17), que relaciona a

anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, com a viscosidade do meio, a temperatura e a energia de ativação:

$$\ln (r_{ss}) = \ln \left(\frac{r_0 V_m \eta_0}{\eta(T) V_m + \tau RT} \right) + \frac{Ea}{RT} \quad (17)$$

A partir desta equação e sabendo que para os líquidos homogêneos normais, existe uma relação exponencial entre a viscosidade e a temperatura, então de uma forma análoga, para líquidos homogêneos normais, também deverá existir uma relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, e a temperatura, sendo que se se observar uma dependência linear para um gráfico do tipo: $\ln (\eta)$ versus $\frac{1}{T}$, então, de uma forma análoga, também existirá uma dependência linear para um gráfico do tipo: $\ln (r_{ss})$ versus $\frac{1}{T}$, para líquidos homogêneos normais.

2.5. Anisotropia de fluorescência em membranas

A anisotropia de fluorescência pode ter várias aplicações bioquímicas, uma vez que permite obter informações como a rigidez dos vários ambientes moleculares, assim como o tamanho e a forma de várias proteínas, permitindo determinar a fluidez de membranas, mobilidade molecular, associações entre proteínas, entre outros [31].

A anisotropia de fluorescência é sensível à composição das membranas, assim como à fase em que estas membranas se encontram, sendo que em membranas celulares, a rotação dos das sondas fluorescentes ocorre na escala dos ns [31].

A fluidez das membranas pode ser caracterizada utilizando medidas de anisotropia de fluorescência, sendo que para realizar estas medidas, são utilizadas sondas fluorescentes que possuem grande afinidade com as membranas, como por exemplo o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que tem como característica principal ser uma sonda hidrofóbica e por esse motivo particiona facilmente para o interior das membranas [31].

As medidas de anisotropia de fluorescência e a utilização de sondas de fluorescência adequadas, permitem determinar a fluidez de membranas, a qual pode ser alterada quando se fazem variar fatores inerentes a estas membranas como: concentração de lípidos; composição lipídica e temperatura, sendo que desta forma é possível determinar o efeito que a adição de moléculas, como o colesterol, tem nas membranas, além disso, também é possível determinar

parâmetros relacionados com a ordenação das membranas, permitindo determinar temperaturas de transição de fase, entre outros [31].

As medidas de anisotropia de fluorescência de sondas fluorescentes presentes no interior de determinadas membranas, dependem da fluidez destas membranas, sendo que se a sonda de fluorescência se encontrar numa zona mais fluida das membranas, vai ter uma maior difusão rotacional. Neste caso, este processo de difusão rotacional é mais rápido que a emissão da radiação, então a radiação emitida vai ser despolarizada, fazendo com que o valor de anisotropia de fluorescência seja mais baixo. Por outro lado, se a sonda de fluorescência se encontrar numa zona mais viscosa das membranas, a sua difusão rotacional vai ser muito baixa, o que faz com que os valores de anisotropia de fluorescência sejam mais elevados [31].

Quanto maior for a concentração de proteína ou a percentagem de ácidos gordos saturados presentes nas membranas, menor é a taxa de difusão rotacional dos fluoróforos, logo maior será o valor da anisotropia. Note-se pela figura 2.33, que em membranas compostas por lípidos com cadeias metilénicas saturadas, o empacotamento destas cadeias metilénicas é maior, fazendo com que a fluidez das membranas seja menor, ou seja, estas membranas apresentam uma maior viscosidade, logo a difusão rotacional das sondas fluorescentes é menor, por conseguinte, a despolarização da radiação emitida pela sonda, devido à difusão rotacional, também é menor e por esse motivo a anisotropia de fluorescência é maior [31].

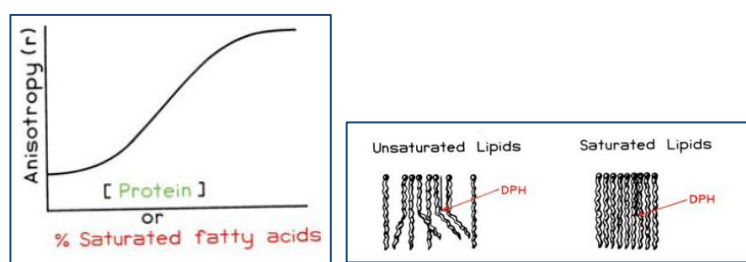


Figura 2.33 - Efeitos da associação de proteínas e da fluidez das membranas, na anisotropia de fluorescência (adaptado de) [31].

A viscosidade das membranas diminui na presença de lípidos com cadeias metilénicas insaturadas, logo a fluidez destas membranas é maior, uma vez que o empacotamento é menor, desta forma um aumento da quantidade de ácidos gordos insaturados, faz aumentar a difusão rotacional das sondas fluorescentes, promovendo a despolarização da radiação emitida pela sonda e fazendo diminuir os valores de anisotropia de fluorescência [31].

A adição de substâncias às membranas, pode fazer com que a fluidez destas membranas seja alterada, fazendo alterar as medidas de anisotropia de fluorescência. Tenha-se

como exemplo, a adição de colesterol a bicamadas lipídicas. De um modo geral: se as cadeias metilénicas dos lípidos estiverem mais ordenadas, então a adição de colesterol vai desordenar estas bicamadas lipídicas, levando a que elas se tornem menos viscosas. Se por outro lado, as cadeias metilénicas dos lípidos estiverem mais desordenadas, então a adição de colesterol vai promover a ordenação destas bicamadas lipídicas, levando a que elas se tornem mais viscosas [31].

Assim, a viscosidade da membranas pode depender do tipo de lípidos que compõem as membranas, da concentração destes lípidos, assim como da concentração de proteínas, da adição de moléculas como o colesterol, podendo depender também da temperatura a que estas membranas se encontram [31].

As membranas podem sofrer grandes alterações aquando da adição de lípidos como o colesterol, assim como na variação da concentração de lípidos saturados e insaturados, sendo que a temperatura também pode provocar alterações drásticas ao nível da fluidez destas membranas, levando a alterações nas medidas de anisotropia de fluorescência.

Na figura 2.34, apresenta-se um exemplo da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, com a variação da temperatura, em vesículas compostas por 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e em vesículas compostas por DPPC e 45 mol % colesterol (45% de colesterol e 55% de DPPC), utilizando o DPH como sonda fluorescente. Neste exemplo, observa-se a diminuição drástica nos valores de anisotropia de fluorescência do DPH, aproximadamente aos 41 °C, que corresponde à temperatura de transição de fase do DPPC, em vesículas compostas apenas por DPPC (linha contínua). Observa-se também, que os valores de anisotropia de fluorescência do DPH são sensíveis à presença de colesterol nestas vesículas, uma vez que as vesículas compostas por DPPC e colesterol (linha tracejada), não apresentam uma diminuição drástica de anisotropia de fluorescência, à temperatura de 41°C, indicando que a adição de colesterol torna a membrana mais ordenada e provoca alterações na temperatura de transição de fase [31].

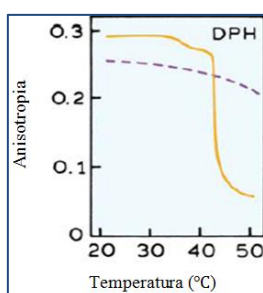


Figura 2.34 - Medidas de anisotropia de fluorescência (do DPH) dependentes da temperatura. DPH em vesículas de DPPC (linha contínua); DPH em vesículas de DPPC + 45 mol % colesterol (linha tracejada) (adaptado de [31]).

3. Trabalho experimental

3.1. Preparação de soluções de: POPC; egg-SM; Colesterol; DPH; DMPC e DPPC

Os lípidos POPC, egg-SM, DMPC e DPPC (pureza superior a 99%), e o colesterol (pureza superior a 98%), foram comprados à empresa *Avanti Polar Lipids Inc.* (Alabaster, AL, USA), sendo que o colesterol foi utilizado, sem que se procedesse a qualquer método de purificação prévio. O DPH foi comprado à empresa *Invitrogen Life Technologies S.A.* A água MilliQ foi produzida a partir de água duplamente destilada, num sistema *Millipore Simplicity 185* (à temperatura ambiente). O solvente clorofórmio (pureza superior a 99%), foi comprado a *Carlo Erba reagents* e o solvente metanol (pureza superior a 99,8%), foi comprado a *Panreac*.

As soluções de trabalho de POPC, egg-SM, DMPC e DPPC, foram feitas a partir de soluções-mãe, existentes no laboratório e foram preparadas através de diluições dessas soluções-mãe, com uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (V/V), de maneira a ter uma concentração final de 1mM para cada uma destas soluções de trabalho.

A solução de trabalho de colesterol, foi feita a partir de uma solução-mãe, existente no laboratório, sendo preparada através de uma diluição com clorofórmio, de maneira a ter uma solução final de 1 mM.

A solução de trabalho de DPH, com uma concentração de $3,375 \times 10^{-6}$ M ($\epsilon=8,8 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹, a 350 nm), foi feita a partir de uma diluição de DPH em 10 mL de metanol [48].

Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C.

3.2. Preparação de MLV

A preparação dos MLV, neste trabalho experimental, foi feita através da preparação de lipossomas clássica descrita na seção 2.1.2.), assim, para preparar os MLV, numa ampola Pear-shape (*Aldrich*), adicionaram-se os volumes necessários de lípido e DPH de maneira a ter uma concentração de lípido total de 5×10^{-3} M e uma concentração de DPH de 5×10^{-8} M, havendo uma proporção de sonda:lípido de 1:1000, entretanto adicionou-se um volume de 2 ml da mistura clorofórmio:metanol 2:1 (V/V), de maneira a dissolver os lípidos.

Colocou-se esta ampola num microevaporador rotativo (*Heidolph VV-Micro*), acoplado a um controlador de pressão (*Büchi V-850*), e uma bomba de vácuo (*Büchi V-700*), a uma pressão de 150 mbar, de maneira a remover o solvente, sendo que após esta remoção, colocou-se a pressão a 12 mbar, de forma a secar o filme lipídico, para remover qualquer vestígio do solvente. A secagem deste filme lipídico ocorreu durante uma hora sob a pressão de 5 mbar, sendo que após esse tempo, procedeu-se à hidratação desse filme lipídico com um volume de 4 mL de água MilliQ, a qual também ocorreu durante uma hora, num banho de água, acima da transição de fase dos lípidos utilizados na mistura lipídica. Durante esta hora de hidratação, a amostra foi agitada frequentemente e colocada de novo no banho de água acima da temperatura de transição de fase. Esta agitação ajudou à formação dos MLV.

Entretanto a solução de MLV foi armazenada no frio, a 6 °C, durante a noite, sendo que as medidas de anisotropia foram feitas no dia seguinte.

Todas as soluções de MLV, foram preparadas desta forma, independentemente dos lípidos misturados e da sua concentração, havendo ajustes nos volumes de lípidos adicionados, de acordo com percentagens lipídicas pretendidas, sendo que a concentração total lipídica era de 5×10^{-3} M e uma concentração de DPH de 5×10^{-8} M, havendo uma proporção de sonda:lípido de 1:1000, para todas as preparações de MLV utilizadas neste trabalho experimental.

3.3. Leituras das medidas de anisotropia de fluorescência

Antes de proceder às medidas de anisotropia de fluorescência, para as diversas soluções de MLV, foram feitas, em todas as soluções de MLV preparadas, diluições de maneira a ter uma concentração total de lípido de 3×10^{-5} M e uma concentração de DPH de 3×10^{-8} M, de modo a ter uma proporção sonda:lípido de 1:1000, e de forma a minimizar os efeitos da dispersão da luz, devido à turbidez da amostra, visto esta concentração de lípido total ser a adequada para que se façam estas leituras de anisotropia de fluorescência, como está indicado na seção 4.1.

As leituras de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, foram realizadas através do método de formato-L, descrito na seção 2.2.3.), e foram feitas num espectralfluorímetro (*FluroMax-4 Horiba Scientific*), acoplado a um criostato/termostato (*Julabo*), que permitiu o controlo das temperaturas às quais se fizeram as medidas. O

espectrofluorímetro fornece diretamente os valores de anisotropia de fluorescência corrigidos para o fator G , referido na seção 2.2.3.

Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram de 360 nm e 430 nm, respectivamente.

Os tratamento estatístico dos resultados obtidos foi feito utilizando os programas *Microsoft Excel 2007* e *OriginPro 8.5*.

4. Resultados e Discussão

4.1. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por várias concentrações de DMPC

A dispersão de luz, devido à turbidez das amostras, é um exemplo de fenômeno despolarizante que conduz a alterações nas medidas de anisotropia de fluorescência, fazendo com que as medidas de anisotropia de fluorescência observadas sejam inferiores, comparativamente com as medidas de anisotropia de fluorescência reais, que seriam obtidas se as amostras não apresentassem turbidez.

Antes de fazer medidas de anisotropia de fluorescência, do DPH em MLV compostos por lípidos como POPC ou egg-SM, foi necessário otimizar a concentração total de lípido a utilizar para produzir os lipossomas, de maneira a minimizar o efeito de dispersão de luz nas amostras, causada pela turbidez, e assim diminuir erros associados às leituras de anisotropia de fluorescência.

Então, produziram-se MLV compostos por várias concentrações de DMPC, que é um lípido que já está bem caracterizado, de modo a determinar qual a concentração de lípido total ideal para realizar as medidas de anisotropia de fluorescência em lípidos que não estão tão bem caracterizados, sendo que os resultados estão apresentados na figura 4.1. Esta figura representa o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por várias concentrações de DMPC.

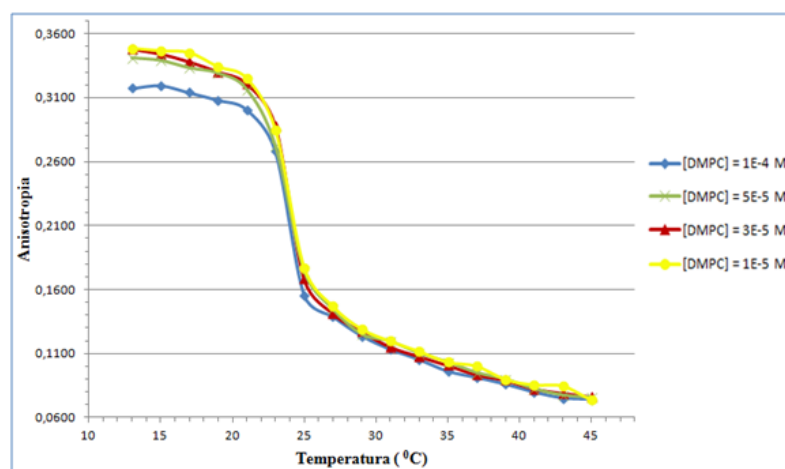


Figura 4.1 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus temperatura, do DPH em MLV compostos por DMPC.

Pela figura 4.1, observa-se que a concentração de lípido total, para fazer as medidas de anisotropia de fluorescência é a concentração de 3×10^{-5} M, uma vez que é aquela que apresenta melhores valores de anisotropia de fluorescência relacionados com uma boa relação concentração/sinal, e que apresenta uma temperatura de transição de fase muito bem definida. Esta solução é diluída o suficiente, para que seja minimizada a dispersão de luz devido à turbidez e tem uma concentração ótima para que seja possível obter um sinal de anisotropia de fluorescência bem definido. Então foi esta a concentração total de lípido utilizada em todas as medidas de anisotropia de fluorescência de DPH em cada um dos lípidos utilizados neste trabalho experimental. As outras soluções de concentrações diferentes foram descartadas, uma vez que soluções mais diluídas não têm tão bom sinal de anisotropia de fluorescência e as mais concentradas apresentam maior turbidez.

4.2. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por DMPC e DPPC

O DPH pode ser utilizado para determinar transições de fase gel e líquido-cristalino, assumindo que existe uma coexistência destas duas fases e que a sonda se distribui igualmente nesta zona de coexistência de fases. Neste caso, o valor de anisotropia de fluorescência do DPH corresponde a uma média de anisotropias da sonda, em cada uma das fases. No entanto, se o DPH tiver uma preferência por uma das fases, deixa de estar distribuído igualmente na zona de coexistência de fases, passando a emitir um sinal de fluorescência mais forte a partir da zona que tem maior preferência [49].

Como os lípidos DMPC (1,2-dimiristoíl-3-*sn*-fosfatidilcolina) e DPPC (1,2-dipalmitoíl-3-*sn*-fosfatidilcolina), são bastante parecidos, então as suas misturas em bicamadas lipídicas multilamelares, originam uma mistura lipídica quase ideal de fases gel e líquido-cristalino, sendo que como o DMPC apresenta uma temperatura de transição aproximadamente igual a 24 °C e o DPPC apresenta uma temperatura de transição aproximadamente igual a 41 °C, então significa que por exemplo a 37 °C, existe uma coexistência de fases, uma vez que o DMPC se encontra numa fase líquido-cristalino e o DPPC de encontra numa fase gel, como se pode observar na figura 2.13. [10, 49].

Para determinar a preferência de partição do DPH, para uma fase gel, ou para uma fase líquido-cristalino, realizaram-se medidas de anisotropia de fluorescência, em estado

estacionário, do DPH em MLV compostos por DPPC e DMPC a várias concentrações. Os resultados estão apresentados na figura 4.2. Esta figura representa o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por várias percentagens de DMPC e DPPC.

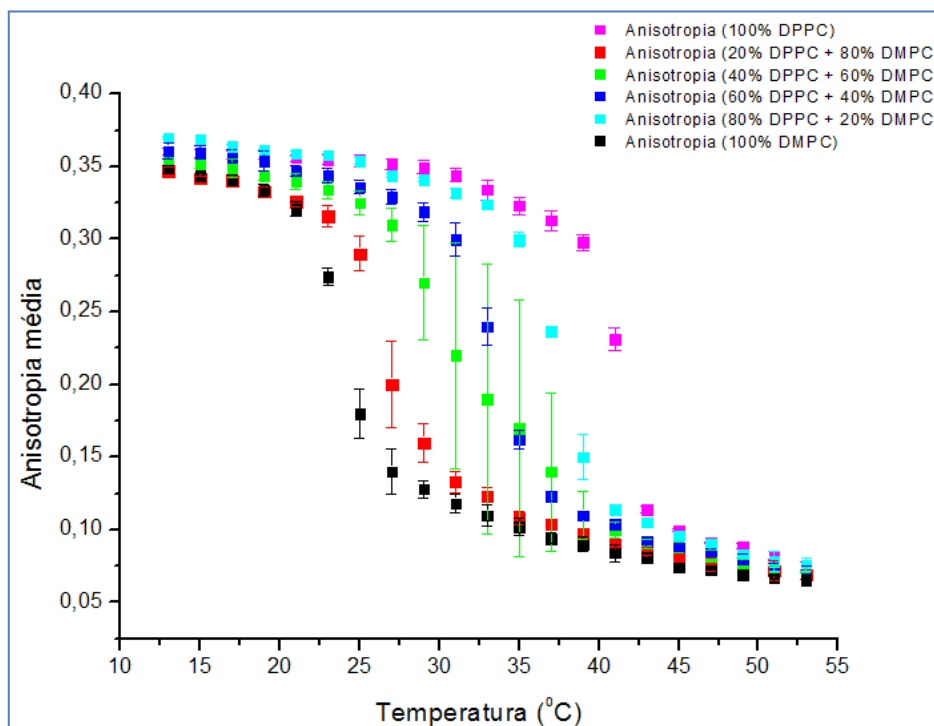


Figura 4.2 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura, do DPH em MLV compostos por DMPC e DPPC.

Ao observar a figura 4.2, nota-se que de uma forma geral, à medida que a temperatura aumenta, os valores de anisotropia de fluorescência diminuem, havendo intervalos de temperatura em que ocorre uma diminuição brusca dos valores de anisotropia de fluorescência, que corresponde ao intervalo em que ocorre a temperatura de transição de fase, da fase gel, para a fase líquido-cristalino.

A diminuição dos valores de anisotropia de fluorescência com o aumento da temperatura, está relacionada com o fato de o aumento da temperatura fazer com que haja um aumento na liberdade conformacional das cadeias metilénicas que compõem as bicamadas lipídicas e por esse motivo a difusão rotacional do DPH é maior, levando a que a despolarização da radiação emitida seja maior, provocando uma diminuição nos valores de anisotropia de fluorescência.

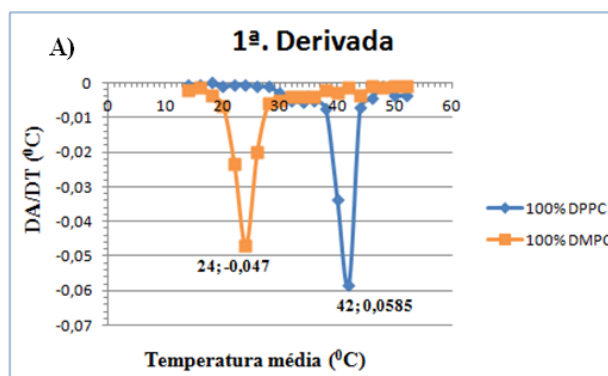
É de salientar que abaixo da temperatura de transição de fase, entre os 13 °C e os 19 °C, a anisotropia de fluorescência é praticamente igual, dentro do erro experimental,

independentemente das concentrações de DMPC e DPPC nos MLV, tendo um valor de $0,36 \pm 0,01$. Estes valores elevados de anisotropia correspondem a uma fase lamelar gel extremamente organizada, que é monitorizada através de valores de anisotropia próximos do valor de anisotropia limite (0,4). O mesmo acontece acima da temperatura de transição de fase, entre os 41 °C e os 53 °C, em que a anisotropia de fluorescência apresenta valores de $0,08 \pm 0,02$, dentro do erro experimental e independentemente da concentração de DMPC e DPPC. Estes valores correspondem a uma fase lamelar com baixa ordenação, sendo uma fase líquido-cristalino. Estes valores estão de acordo com o diagrama de fases existente na literatura e que está apresentado na figura 2.13.

Nota-se que à medida que se aumenta a concentração de DPPC às bicamadas lipídicas compostas por DMPC, a temperatura de transição deixa de ocorrer aproximadamente aos 24 °C, que seria a temperatura de transição para MLV compostos por 100% de DMPC, e vai aumentando.

Através destes resultados, não é possível determinar se o DPH tem uma preferência por uma fase gel, ou uma fase líquido-cristalino, apenas é possível observar como a temperatura de transição de fase é alterada à medida que se alteram as concentrações de cada tipo de lípido.

No entanto, é possível determinar as temperaturas de transição de fase exatas, para cada composição de MLV, sendo que para tal, é necessário determinar a primeira derivada da anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário, em função da temperatura média, que está apresentada na figura 4.3. Esta figura representa o gráfico da variação da primeira derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura média, do DPH em MLV compostos por várias percentagens de DMPC e DPPC.



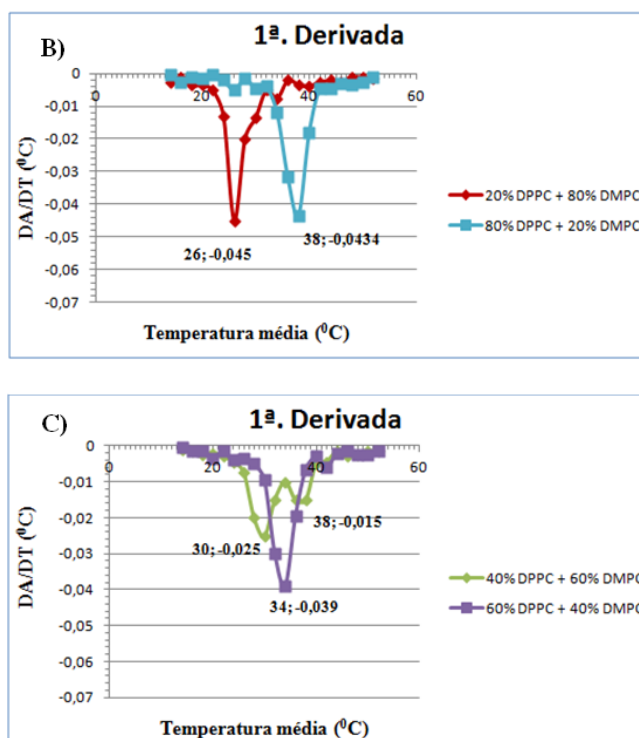


Figura 4.3 - Representação gráfica da variação da 1ª. derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura média, do DPH em MLV compostos por: **A)** 100% DMPC; 100% DPPC. **B)** 20% DPPC + 80% DMPC; 80% DPPC + 20% DMPC. **C)** 40% DPPC + 60% DMPC; 60% DPPC + 40% DMPC.

Ao observar a figura 4.3 A), B) e C), nota-se que a temperatura de transição de fase para MLV compostos por 100% de DMPC é de 24 °C, sendo que à medida que se aumenta a percentagem de DPPC, a temperatura de transição dos MLV vai aumentando também, chegando à temperatura de transição de fase de 42 °C, que é a temperatura de transição de fase observada para MLV compostos por 100% de DPPC.

Também é possível notar, que o pico correspondente à primeira derivada em função da temperatura é tanto mais fino e definido, quanto mais puros forem os MLV analisados, sendo que quando se têm MLV compostos por misturas de DMPC e DPPC, observam-se picos correspondentes à primeira derivada, em função da temperatura, mais largos e com menor definição. Em adição, nos MLV compostos por 40% de DPPC + 60% de DMPC, apresentados na figura 4.3 C), observa-se uma transição aos 30 °C e outra aos 38 °C, sugerindo que já existe uma coexistência de fases em função da temperatura, estando de acordo com o diagrama de fases existente para misturas lipídicas binárias compostas por DMPC e DPPC, representado na figura 2.13. Então, quanto maior for a pureza do lípido em estudo, maior é a definição da temperatura de transição de fase.

Além da determinação das temperaturas de transição de fase, também se torna bastante importante determinar os pontos de inflexão dos gráficos apresentados na figura 4.3, uma vez

que os pontos de inflexão são os pontos em que o gráfico cruza a linha do zero, correspondendo à temperatura de transição de fase (T_m).

Para determinar o pontos de inflexão do gráfico apresentado na figura 4.3, é necessário determinar a segunda derivada deste gráfico, a qual está apresentada na figura 4.4, que representa o gráfico da variação da segunda derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos apenas por DMPC e DPPC.

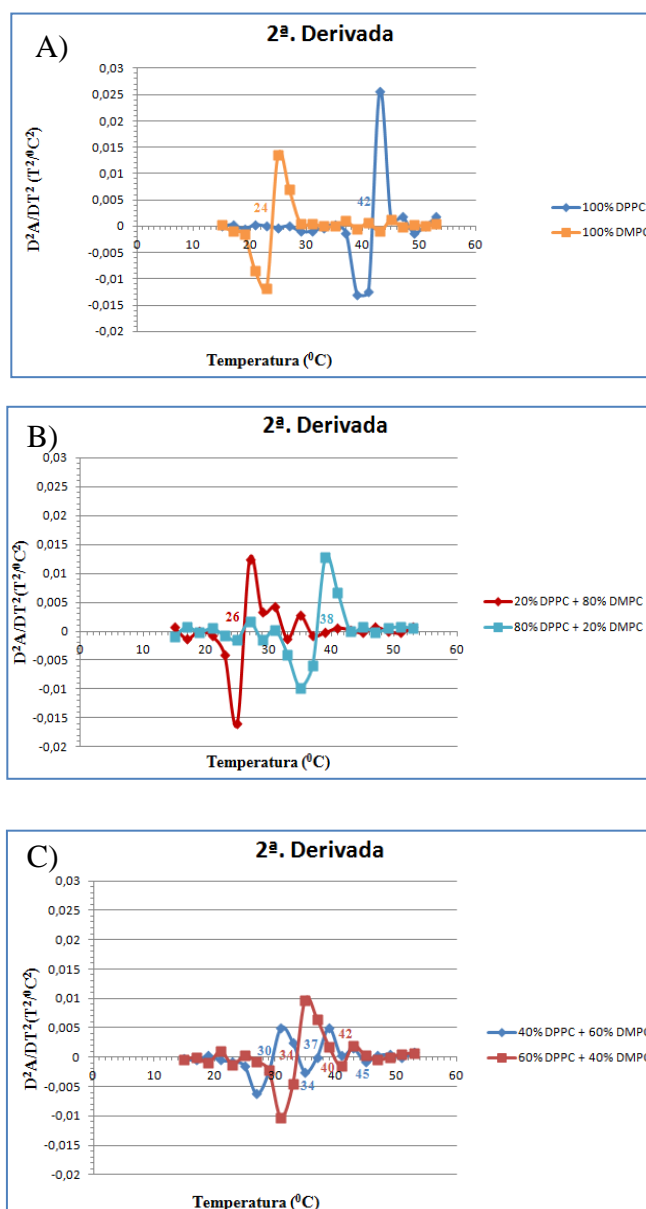


Figura 4.4 - Representação gráfica da variação da 2ª. derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura, do DPH em MLV compostos por: **A)** 100% DMPC; 100% DPPC. **B)** 20% DPPC + 80% DMPC; 80% DPPC + 20% DMPC. **C)** 40% DPPC + 60% DMPC; 60% DPPC + 40% DMPC.

Tal como no gráfico da figura 4.3, para os casos em que se têm MLV compostos por um lípido puro, como 100% de DMPC ou 100% de DPPC, na figura 4.4 A) observam-se pontos de inflexão bem definidos, sendo que quando se têm MLV compostos por misturas de DMPC e DPPC, também é possível obter uma definição razoável nos pontos de inflexão se a mistura não tiver concentrações elevadas de cada um dos lípidos, como se observa na figura 4.4 B). No entanto, quando as concentrações de cada um destes lípidos é elevada, como no caso de 40% DPPC + 60% DMPC e 60% DMPC + 40% DPPC, nota-se que há uma maior dificuldade na determinação da temperatura de transição, o que sugere que esta análise é bastante sensível à pureza dos lípidos, à coexistência de fases e é possível determinar valores de temperatura de transição de fase corretos através desta análise, devido precisamente à sua sensibilidade.

4.3. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por egg-SM

A figura 4.5, representa o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos apenas por egg-SM.

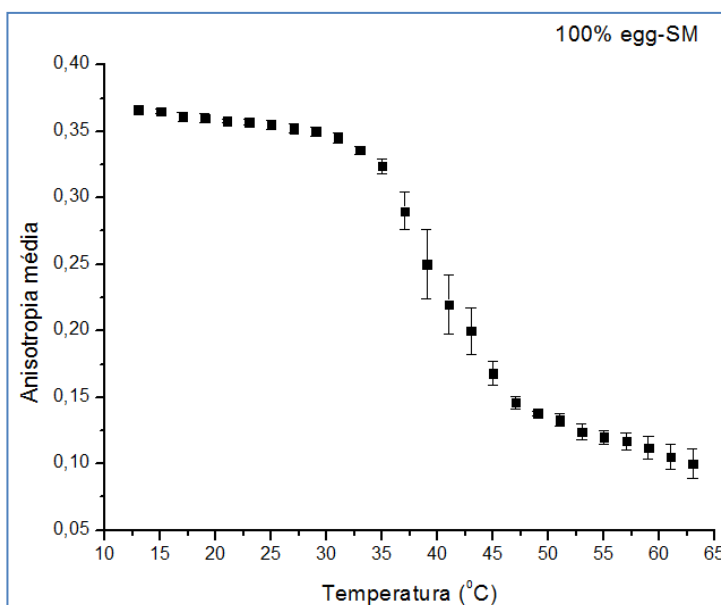


Figura 4.5 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus temperatura, do DPH em MLV compostos por 100% de egg-SM.

Neste trabalho experimental utilizou-se a egg-SM, devido ao fato de ser um lípido natural e por esse motivo mimetizar mais facilmente uma membrana biológica e além disso, é o tipo de esfingomiélinea mais utilizado em estudos de misturas lipídicas canônicas.

É de notar que os valores de anisotropia de fluorescência média do DPH diminuem lentamente com o aumento da temperatura entre os 13 °C ($r = 0,37$) e os 33 °C ($r = 0,34$), sendo que entre os 33 °C ($r = 0,34$) e os 47 °C ($r = 0,15$), ocorre uma diminuição brusca dos valores de anisotropia de fluorescência, indicando que deverá ocorrer uma transição de fase neste intervalo de temperaturas, que faz com que as bicamadas lipídicas transitem de uma fase gel (L_{β}), para uma fase líquido-cristalino (L_{α}).

Entretanto, após a transição de fase, entre 47 °C ($r = 0,15$) e 63 °C ($r = 0,10$), já é possível observar uma diminuição mais lenta dos valores de anisotropia de fluorescência com o aumento da temperatura, uma vez que este aumento de temperatura continua a provocar uma maior liberdade conformacional das cadeias metilénicas dos lípidos que compõem as bicamadas lipídicas, fazendo aumentar a desordem das bicamadas lipídicas, no entanto este aumento de desordem já é mais lento, pois acontece apenas numa fase (fase L_{α}).

Para determinar a temperatura de transição de fase, é necessário fazer a primeira derivada do gráfico apresentado na figura 4.5. Esta primeira derivada está apresentada na figura 4.6, que representa o gráfico da variação da primeira derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura média, do DPH em MLV compostos apenas por egg-SM.

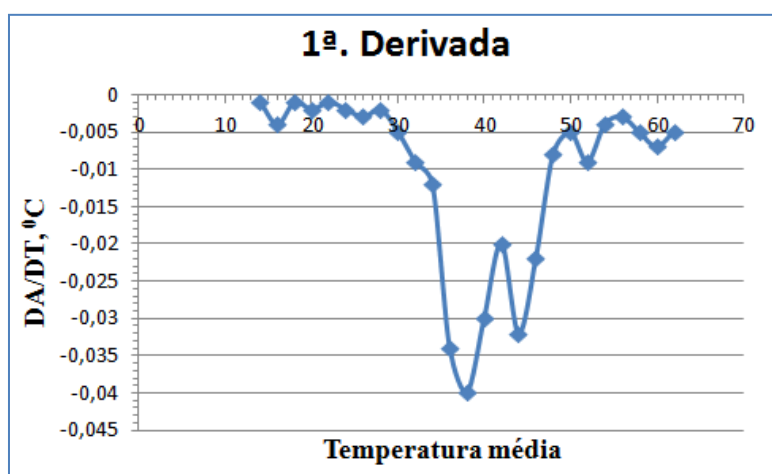


Figura 4.6 - Representação gráfica da variação da 1ª. derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura média, do DPH em MLV compostos por 100% de egg-SM.

O gráfico da primeira derivada em função da temperatura média deveria dar um pico bem definido a uma determinada temperatura, que é o que se observa na figura 4.3 A), para os

casos em que se têm MLV compostos por um lípido puro, como 100% de DMPC ou 100% de DPPC. No entanto ao observar a figura 4.6, nota-se que não existe definição da temperatura exata para MLV compostos por 100% de egg-SM. Todavia podem ser identificados dois picos mais salientes, correspondentes a duas temperaturas de transição de fase, os quais ocorre aos 38 °C e 44 °C.

Esta falta de definição na determinação da temperatura de transição de fase da egg-SM, poderá estar relacionada com a impureza deste lípido, uma vez que se trata de um lípido natural. Apesar de apresentar uma pureza de 99%, a egg-SM é composta por duas cadeias metilénicas que são heterogêneas, em que a cadeia de esfingosina não varia, mas a outra cadeia metilénica pode ser variar bastante, existindo 86% de C16:0; 6% de C18:0; 3% de C22:0; 3% de C24:1 e ainda 2% de lípido desconhecido [10].

Para provar que a falta de definição da temperatura de fase está relacionada com a impureza do lípido utilizado nas bicamadas lipídicas, seria bastante interessante utilizar um lípido puro como a PSM, para produzir MLV e depois determinar valores de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário.

Além da determinação da temperatura de transição de fase, também se torna bastante importante determinar o ponto de inflexão do gráfico apresentado na figura 4.5.

Para determinar o ponto de inflexão do gráfico apresentado na figura 4.5, é necessário determinar a segunda derivada deste gráfico, a qual está apresentada na figura 4.7, que representa o gráfico da variação da segunda derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos apenas por egg-SM.

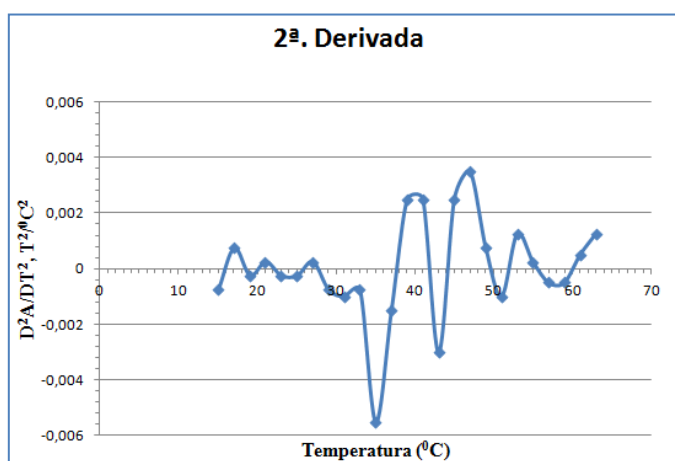


Figura 4.7 - Representação gráfica da variação da 2ª. derivada da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura, do DPH em MLV compostos por 100% de egg-SM.

Tal como no gráfico da figura 4.4 A), para os casos em que se têm MLV compostos por um lípido puro, como 100% de DMPC ou 100% de DPPC, seria de esperar que o gráfico

da figura 4.7, tivesse a temperatura, correspondente ao ponto de inflexão, bem definida, no entanto, mais uma vez e tal como acontece para o gráfico da primeira derivada, apresentado na figura 4.6, nota-se que não existe definição da temperatura exata, correspondente ao ponto de inflexão apresentado no gráfico da figura 4.5. Esta falta de definição poderá estar relacionada com a impureza das cadeias metilénicas da egg-SM, utilizada nos MLV.

À semelhança do que acontece para o gráfico apresentado na figura 4.6, para provar que a falta de definição da temperatura, correspondente ao ponto de inflexão, está relacionada com a impureza do lípido utilizado nas bicamadas lipídicas, seria bastante interessante utilizar um lípido puro como a PSM para produzir MLV e depois determinar valores de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário.

4.4. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por egg-SM e Colesterol

A figura 4.8, representa o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por várias percentagens de egg-SM e colesterol.

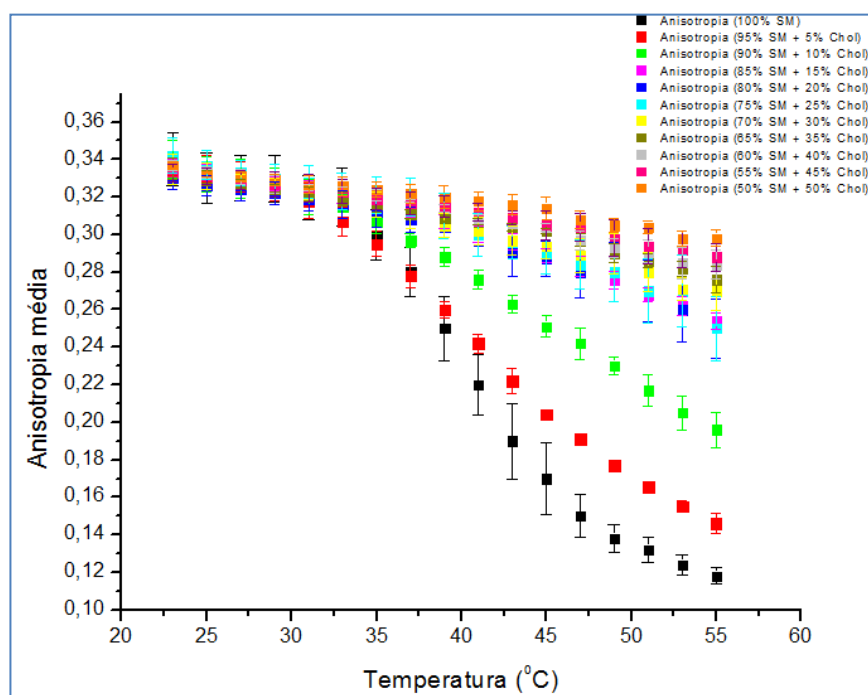


Figura 4.8 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus temperatura, do DPH em MLV compostos por egg-SM e colesterol.

Pela figura 4.8, nota-se que, de uma forma geral, à medida que a temperatura aumenta, os valores da anisotropia de fluorescência média do DPH vão diminuindo, indicando que o aumento da temperatura faz aumentar a liberdade conformacional das cadeias metilénicas dos lípidos que compõem as bicamadas lipídicas e por conseguinte, ocorre um aumento da fluidez destas bicamadas lipídicas, que permite que o DPH possua maior liberdade rotacional e por esse motivo há uma maior despolarização da radiação emitida pelo DPH, devido à difusão rotacional, conduzindo a uma diminuição dos valores de anisotropia de fluorescência média. Além disso nota-se que para os MLV compostos por 100% de egg-SM, existe um intervalo de temperaturas entre os 33 °C e os 47 °C, em que ocorre uma transição da fase gel, para a fase líquido-cristalino, sendo que esta transição de fase é bastante evidente, para os MLV compostos apenas por 100% egg-SM. No entanto, à medida que aumenta a percentagem de colesterol adicionado aos MLV, esta transição de fase vai desaparecendo, sugerindo que a adição de colesterol promove a ordenação das bicamadas lipídicas.

Abaixo da temperatura de transição de fase (entre os 23 °C e os 33 °C), os valores de anisotropia de fluorescência média, são praticamente iguais, dentro do erro experimental, independentemente da percentagem de colesterol adicionada, tendo um valor de $0,32 \pm 0,02$, significando que a adição de qualquer percentagem de colesterol não afeta as propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas compostas por egg-SM, na sua fase gel.

Após a temperatura de transição de fase, nota-se que a adição de 5% de colesterol faz aumentar bastante os valores de anisotropia de fluorescência média, uma vez que com MLV compostos por 100% egg-SM, a 55 °C, $r = 0,12$, enquanto que MLV compostos por 95% egg-SM + 5% Chol, à mesma temperatura, apresentam $r = 0,15$, indicando que a adição de 5% de colesterol faz alterar as propriedades físico-químicas destas bicamadas lipídicas, sendo que há uma restrição das cadeias metilénicas dos lípidos que compõem as bicamadas lipídicas e por esse motivo, o DPH tem menor liberdade rotacional que aquela apresentada para as bicamadas lipídicas sem colesterol. Então como a liberdade rotacional é menor, a despolarização da radiação emitida também será menor, fazendo com que os valores de anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário, sejam mais elevados, que aqueles observados para bicamadas lipídicas compostas apenas por 100% de egg-SM. A adição de 5% de colesterol provoca alterações físico-químicas de tal ordem, que as bicamadas lipídicas compostas por 5% de colesterol e 95% de egg-SM, deixam de apresentar características próprias de líquido-desordenado, apresentando-se bastante mais ordenadas.

Comparando a adição de 5% de colesterol com a adição de 10% de colesterol, nota-se que a adição de 10% de colesterol faz aumentar mais os valores de anisotropia de

fluorescência média, para $r = 0,20$, à temperatura de 55 °C, o que significa que 10% de colesterol provoca maiores restrições às bicamadas lipídicas, levando a uma limitação maior da difusão rotacional do DPH, que aquela observada para a adição de 5% de colesterol.

Entretanto, a adição de 15% de colesterol ainda provoca um aumento maior dos valores de anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário, em comparação com a adição de 5% e 10% de colesterol, no entanto, a adição de percentagens acima dos 15% de colesterol, às bicamadas lipídicas, deixa de alterar significativamente as propriedades físico-químicas destas bicamadas lipídicas, uma vez que os valores de anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário, para os MLV compostos por egg-SM a percentagens acima de 15% de colesterol, são praticamente iguais, dentro do erro experimental, significando que as restrições que o DPH sente com a adição de 15% de colesterol, são praticamente iguais às aquelas sentidas com a adição de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% e 50% de colesterol. Note-se que a anisotropia de fluorescência não varia dentro do intervalo de temperaturas entre os 13 °C e os 55 °C, para MLV compostos por 55% egg-SM + 45% Chol ($r = 0,31 \pm 0,02$) e para MLV compostos por 50% egg-SM + 50% Chol ($r = 0,32 \pm 0,02$), dentro do erro experimental.

Comparando os resultados obtidos, com aqueles existentes na literatura e que estão apresentados na figura 2.16 A), nota-se pelos resultados apresentados na literatura, que acima da temperatura de transição de fase, existe uma fase líquido-desordenado que ocorre até a adição de 15% de colesterol a bicamadas lipídicas compostas por PSM, sendo que pelos resultados obtidos e apresentados na figura 4.8, apenas se observa uma fase líquido-desordenado aos 100% de egg-SM, uma vez que a adição de 5% de colesterol já faz alterar bastante os valores de anisotropia de fluorescência média, indicando que a adição de 5% de colesterol faz alterar as propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas, as quais deixam de apresentar características próprias de uma fase líquido-desordenado [25].

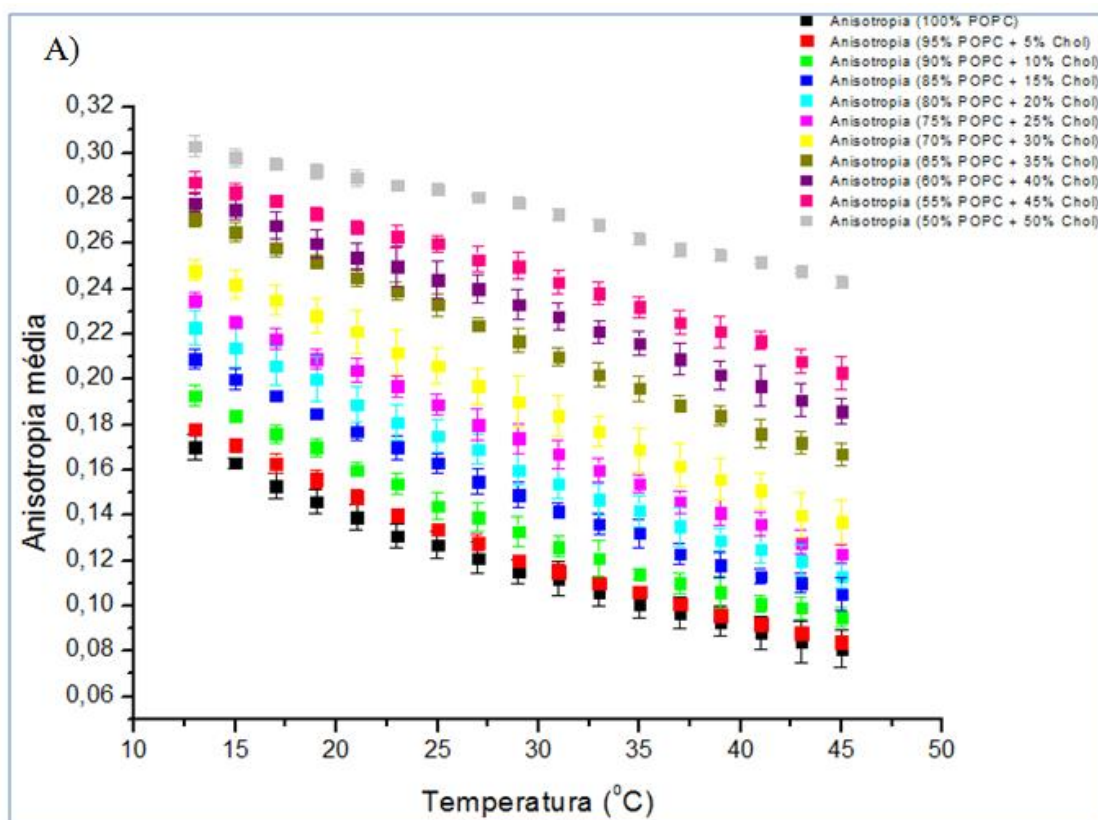
Entretanto, pelos dados da literatura, apresentados na figura 2.16 A), nota-se que existe, antes da temperatura de transição de fase e até aos 25% de colesterol, uma coexistência de uma fase gel e uma fase líquido-ordenado, mas os dados obtidos experimentalmente, apresentados na figura 4.8, mostram que abaixo da temperatura de transição de fase e até aos 25% de colesterol, apenas existe uma fase, que corresponde à fase gel, qualquer que seja a percentagem de colesterol adicionado, uma vez que os valores de anisotropia de fluorescência média são praticamente iguais, dentro do erro experimental [25].

Além disso, através dos dados obtidos na literatura, parece haver uma coexistência de fases líquido-desordenado e líquido-ordenado, acima da temperatura de transição de fase e

entre aproximadamente 13% e os 40% de colesterol, sendo que pelos dados experimentais apresentados na figura 4.1, nota-se que não é possível afirmar esta coexistência de fases, uma vez que entre os 15% e os 40% de colesterol, os valores de anisotropia de fluorescência média são praticamente iguais, dentro do erro experimental, sugerindo que se trata apenas de uma única fase, no entanto, através da abordagem experimental usada neste trabalho, não é possível afirmar inequivocamente se há, ou não, coexistência de fases entre 15% e 50% de colesterol. Põe-se a hipótese de não haver resolução suficiente para distinguir fases a partir da adição de 15% de colesterol com esta técnica de anisotropia de fluorescência do DPH aplicada a estes MLV [25].

4.5. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por POPC e Colesterol

A figura 4.9 A), representa o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por várias percentagens de POPC e colesterol. A figura 4.9 B), representa o gráfico da variação do logaritmo neperiano da anisotropia de fluorescência, em função do inverso da temperatura absoluta, do DPH em MLV compostos por várias percentagens de POPC e colesterol.



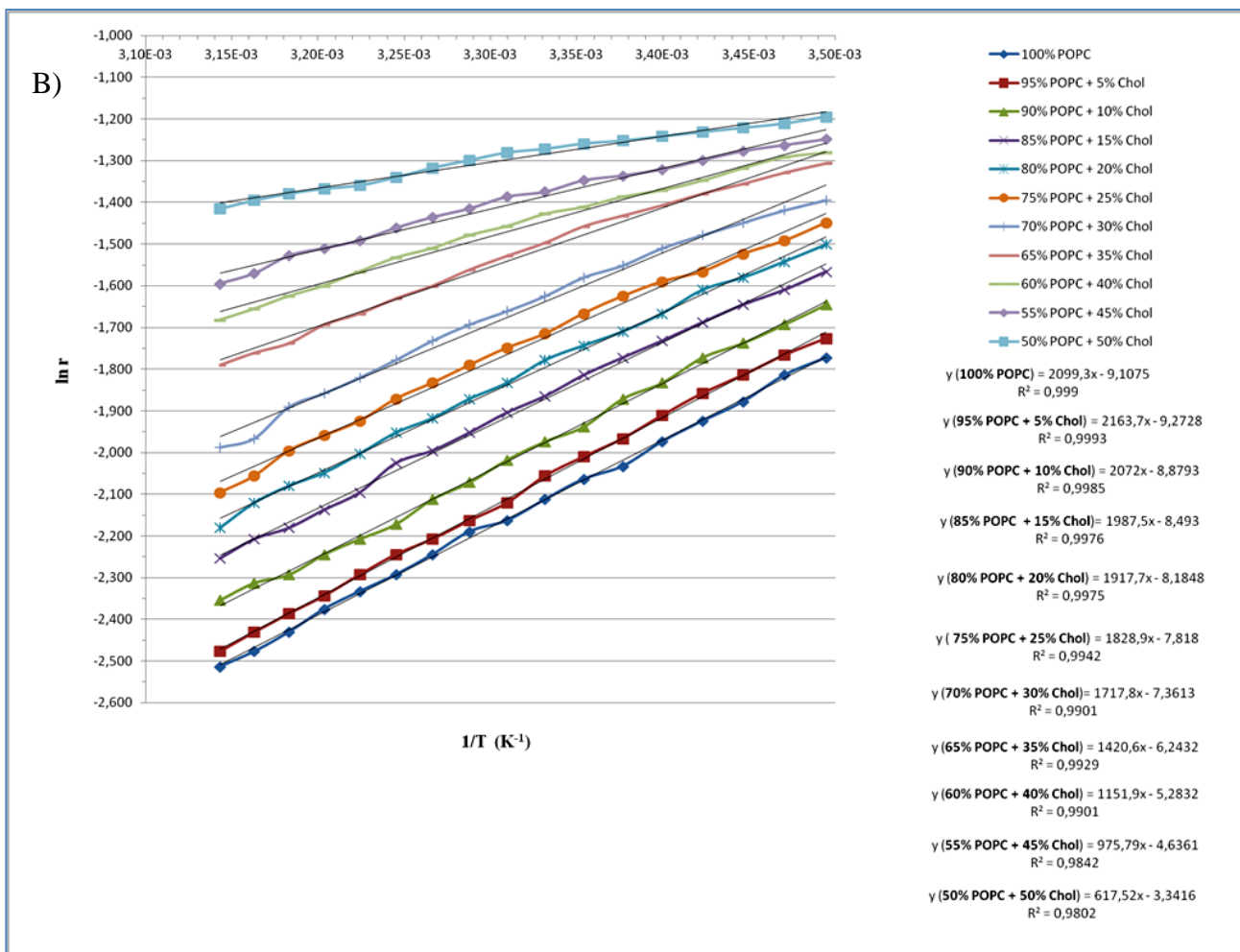


Figura - 4.9 A) Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, do DPH em MLV compostos por POPC e colesterol. B) Representação gráfica da variação do logaritmo neperiano da anisotropia de fluorescência *versus* inverso da temperatura absoluta, do DPH em MLV compostos por POPC e colesterol.

Nota-se que, de uma forma geral, a adição de colesterol às bicamadas lipídicas, faz com que os valores de anisotropia de fluorescência média aumentem, sendo que quanto maior for a concentração de colesterol adicionado, mais elevados são os valores de anisotropia de fluorescência média, indicando que o colesterol poderá exercer um efeito de ordenação nas bicamadas lipídicas, restringindo a liberdade conformacional das cadeias metilénicas do POPC e por conseguinte, as bicamadas lipídicas tornam-se menos fluidas, acabando por condicionar a liberdade rotacional do DPH. Este efeito de ordenação que o colesterol exerce nas cadeias metilénicas das bicamadas lipídicas, deve-se ao fato de a molécula de colesterol possuir um conjunto de anéis que lhe confere uma grande rigidez, o que faz ordenar as cadeias metilénicas das bicamadas lipídicas, proporcionando um meio mais ordenado em torno do DPH.

Na figura 4.9 A), é possível observar quatro tendências diferentes de variação da anisotropia de fluorescência com a temperatura, para misturas de colesterol com POPC. A primeira, corresponde à variação de anisotropia de fluorescência média com a temperatura, para MLV compostos por: 100% POPC e para MLV compostos por 95% POPC + 5% Chol, em que se pode considerar, dentro do erro experimental, que os valores de anisotropia de fluorescência média são iguais. A segunda, corresponde à variação de anisotropia de fluorescência média com a temperatura, para MLV compostos por: 15% Chol; 20% Chol; 25% Chol e 30% Chol, em que se observam maiores desvios-padrão, associados às medidas de anisotropia, do que aqueles observados na tendência anterior. A terceira, corresponde à variação de anisotropia de fluorescência média com a temperatura, para MLV compostos por: 35% Chol; 40% Chol e 45% Chol, em que se observa um comportamento igual para as medidas de anisotropia de fluorescência média para cada percentagem de POPC e colesterol, apesar de os valores de anisotropia de fluorescência média serem diferentes, uma vez que não há interpenetração dos desvios-padrão. A quarta, corresponde à variação de anisotropia de fluorescência média com a temperatura, para MLV compostos por: 50% POPC + 50% Chol, em que se observa claramente, que os valores de anisotropia de fluorescência média são mais elevados que aqueles observados na terceira.

Não foram analisadas proporções maiores de colesterol, pois é conhecido que acima de 50% de colesterol, o colesterol não tem uma solubilidade linear nas bicamadas lipídicas [50].

As membranas podem ser consideradas como sendo líquidos bidimensionais, sendo que existe uma relação exponencial entre a viscosidade de líquidos homogêneos normais e a temperatura. O gráfico $\ln(\eta)$ versus $\frac{1}{T}$, fornece uma linearização desta relação. Considerando a equação de Eyring (16), que relaciona a viscosidade com a temperatura e a equação de Perrin (13), que descreve a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, de fluoróforos esféricos, é possível obter a equação (17), que relaciona a anisotropia de fluorescência, com a viscosidade do meio, a temperatura e a energia de ativação. Então, de uma forma análoga à relação exponencial da viscosidade de líquidos homogêneos normais com a temperatura, também se pode inferir uma relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, e a temperatura, que é dada pela equação (17), havendo uma dependência linear para um gráfico do tipo: $\ln(r_{ss})$ versus $\frac{1}{T}$, para líquidos homogêneos normais [45, 47].

Ao observar a figura 4.9 A), nota-se que existe uma relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência média e a temperatura, para MLV compostos por 100% de POPC

e para MLV compostos por 95% de POPC e 5% de colesterol, o que pode ser provado pela relação linear que existe no gráfico $\ln(r_{ss})$ versus $\frac{1}{T}$, apresentado na figura 4.9 B), onde se observam bons coeficientes de correlação linear tanto para MLV compostos por 100% de POPC ($R^* = 0,999$), como para MLV compostos por 95% de POPC e 5% de colesterol ($R^* = 0,999$).

Neste trabalho experimental, não foi possível determinar valores de viscosidade dos MLV compostos por várias concentrações de POPC e colesterol diretamente, no entanto, se considerar uma solução de viscosidade conhecida como referência, e tendo as medidas de anisotropia de fluorescência média do DPH em MLV compostos por várias concentrações de POPC e colesterol, é possível comparar a viscosidade destes MLV, com a viscosidade da solução de referência, através dos valores de energia de ativação que são obtidos no gráfico do tipo $\ln(r_{ss})$ versus $\frac{1}{T}$.

Esta análise só é possível, uma vez que o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário versus $\frac{1}{T}$, do DPH em MLV compostos por 100% POPC e 95% POPC + 5% Chol representados na figura 4.10, têm o mesmo comportamento que o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário versus $\frac{1}{T}$, para o DHP em parafina líquida, que está representado na figura 2.30 da seção 2.4.1., que também apresenta uma variação não-linear de r_{ss} versus $\frac{1}{T}$.

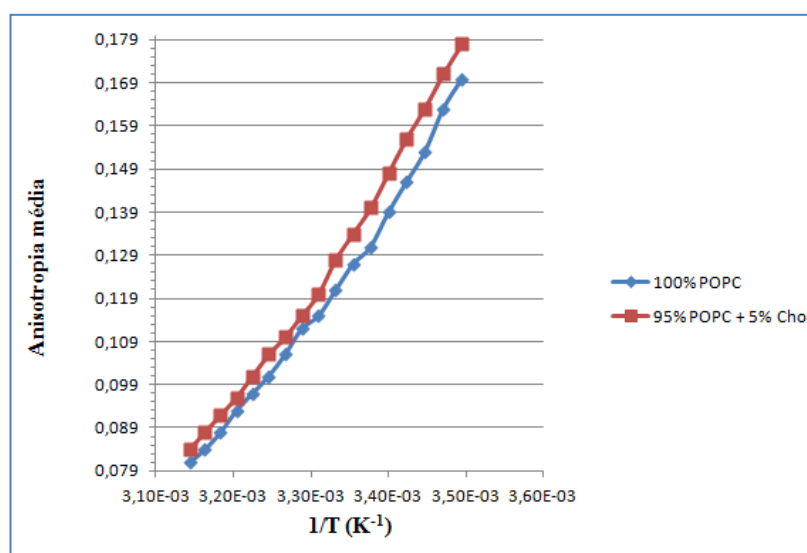


Figura 4.10 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência versus inverso da temperatura, para o DPH em MLV compostos por 100% POPC e 95% POPC + 5% Chol.

Então, tomando como exemplo o trabalho realizado por Kawato e colaboradores (1977), descrito na seção 2.4.1., é possível comparar a viscosidade desta solução conhecida e a viscosidade dos MLV compostos por 100% de POPC e por 95% de POPC e 5% de colesterol, através da determinação da E_a do DPH em cada meio [43].

Através da linearização: $\ln(r)$ versus $\frac{1}{T}$, para os valores de anisotropia de fluorescência do DPH em parafina líquida, obtém-se a equação:

$$y = 3586,7 x - 14,123; R^2 = 0,9952 \quad (11)$$

Então fazendo os cálculos para determinar a energia de ativação, obtém-se $E_a = 29,82$ kJ mol⁻¹. Esta é a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em parafina líquida, como já tinha referido na seção 2.4.1.

De uma forma análoga, considerando as equações obtidas da linearização de $\ln(r_{ss})$ versus $\frac{1}{T}$, para MLV compostos por 100% de POPC e por 95% de POPC e 5% de colesterol, é possível determinar a energia de ativação para que ocorra a difusão rotacional do DPH nestes MLV.

Para MLV compostos por 100% POPC:

$$y = 2099,3 x - 9,1075; R^2 = 0,999 \quad (18)$$

Aplicando a expressão (10), obtém-se $E_a = 17,45$ kJ mol⁻¹, que é a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% de POPC.

Para MLV compostos por 95% POPC + 5% Colesterol:

$$y = 2163,7 x - 9,2728; R^2 = 0,9993 \quad (19)$$

Aplicando a expressão (10), obtém-se $E_a = 17,98$ kJ mol⁻¹, que é a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 95% de POPC e 5% de colesterol.

Pela análise dos valores de energia de ativação para MLV compostos por 100% POPC e com 5% Chol, nota-se que a diferença entre estes valores não é significativa, sugerindo que a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos apenas por POPC, é praticamente a mesma energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do

DPH em MLV compostos por 95% POPC e 5% de colesterol, indicando que a adição de 5% de colesterol aos MLV não altera significativamente a ordenação das cadeias metilénicas e que por esse motivo a viscosidade das bicamadas lipídicas compostas por 100% POPC é praticamente igual à viscosidade das bicamadas lipídicas contendo 5% de colesterol.

Apesar de o valor de E_a para o DPH, em parafina líquida, ser diferente dos valores de energia de ativação para o DPH em MLV compostos por 100% POPC e 95% POPC + 5% Chol, este procedimento de tomar como exemplo uma solução de parafina líquida de viscosidade conhecida, para determinar a viscosidade em bicamadas lipídicas, pressupõe que os movimentos rotacionais do DPH na parafina líquida são semelhantes aos movimentos rotacionais do DPH nas bicamadas lipídicas, uma vez que os dois solventes possuem uma natureza molecular análoga.

Pelos valores de energia de ativação determinados para o DPH, em parafina líquida e em MLV compostos por 100% POPC e 95% POPC + 5% Chol, é possível concluir que a viscosidade da parafina líquida, sentida pelo DPH, é maior que a viscosidade nos MLV compostos por 100% POPC e 95% POPC + 5% Chol, uma vez que a energia de ativação, para o DPH em parafina líquida é maior, indicando que é necessária mais energia para que o DPH possa rodar em parafina líquida. Como foi referido na seção 2.4.1., a parafina líquida possui uma natureza molecular análoga à natureza das bicamadas lipídicas, devido ao fato de ser um líquido polimérico composto por cadeias de hidrocarboneto que podem estar distendidas ou enroladas (*entanglement*), levando a que haja zonas mais ordenadas e zonas menos ordenadas, tal como acontece com as bicamadas lipídicas, desta forma as propriedades de mobilidade das cadeias de hidrocarboneto não são iguais em todo o líquido, logo o DPH não apresenta uma difusão rotacional equivalente e homogénea em todo o meio, tal como acontece com o DPH em bicamadas lipídicas.

Recorrendo ao trabalho realizado por Kawato e colaboradores (1977), foi determinar um valor de volume molar de $100,409 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, que é o volume que o DPH ocupa na parafina líquida, assumindo que a difusão rotacional é esférica, determinado na seção 2.4.1.

No trabalho de Cascales e colaboradores (1997); fazem estudos de simulação de dinâmica molecular, com DPH em bicamadas lipídicas compostas por DPPC, na fase líquido-cristalino. E utilizam a equação de Einstein (20), para determinar a viscosidade no interior das bicamadas lipídicas, assumindo que a difusão rotacional é idealmente esférica [51].

Equação de Einstein:

$$\eta = \frac{k_B T}{6D_{\perp} V} \quad (20)$$

Onde: k_B corresponde à constante de Boltzman; T corresponde à temperatura; D_{\perp} corresponde ao coeficiente de difusão rotacional para a rotação perpendicular e V corresponde ao volume efetivo do fluoróforo.

Neste trabalho obtêm um volume molar de $140,313 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ do DPH em bicamadas lipídicas compostas por DPPC [51].

Comparando o volume molar do DPH em parafina líquida, com o volume molar do DPH em bicamadas lipídicas compostas por DPPC, nota-se que os volumes possuem a mesma ordem de grandeza, sendo bastante parecidos, o que vem mostrar, mais uma vez, que o comportamento do DPH em parafina líquida é comparável ao comportamento do DPH em bicamadas lipídicas [43, 51].

Assim, apesar de existirem restrições à difusão rotacional, quer na parafina líquida, quer nas bicamadas lipídicas, é possível comparar resultados obtidos a partir da aplicação da equação de Perrin para a parafina líquida, com resultados teóricos obtidos por métodos de simulação de dinâmica molecular.

Pela figura 4.9 A) e também pelos coeficientes de correlação linear associados na figura 4.9 B), nota-se que se vai perdendo a relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência média e a temperatura, à medida que as concentrações de colesterol vão aumentando, o que acontece a partir da adição de 10% de colesterol. Estes desvios à relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência média e a temperatura, indicam que a adição de colesterol acima de 10% de colesterol, fazem alterar o estado molecular dos MLV, sendo que estas bicamadas lipídicas deixam de apresentar propriedades típicas de líquidos homogêneos normais, logo deixam de estar numa fase líquido-desordenado.

Quando o DPH se encontra em bicamadas lipídicas, encontra-se num meio anisotrópico, no entanto, se o meio for suficientemente fluido, o DPH pode descrever uma esfera, através dos seus movimentos de rotação, devido ao fato de ser considerado um rotor isotrópico, por possuir os momentos dipolares de excitação e emissão paralelos e por possuir uma simetria ao longo do eixo molecular maior. No entanto, a adição de colesterol às bicamadas lipídicas vai restringir a liberdade conformacional das cadeias metilénicas,

diminuindo a fluidez das bicamadas lipídicas, o que faz com que a difusão rotacional do DPH seja condicionada [31].

Quando o meio que envolve o DPH restringe a sua difusão rotacional, o DPH começa a comportar-se como uma molécula não-esférica, descrevendo um elipsoide prolato de revolução, como apresenta a figura 4.11. Este elipsoide prolato de revolução é caracterizado por apresentar um eixo de rotação mais comprido que os outros dois eixos de rotação que apresentam a mesma dimensão ($a > b$), sendo que o eixo de rotação mais comprido corresponde ao eixo de simetria da molécula [31].

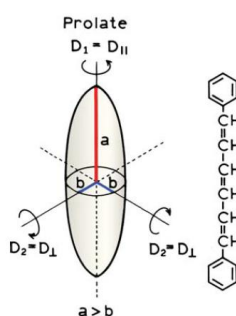


Figura 4.11 - Representação esquemática da forma de um elipsoide prolato de revolução descrito pelo DPH (adaptado de [31]).

É pelo fato de deixar de descrever uma esfera, para começar a descrever um elipsoide prolato de revolução, que a adição de colesterol acima dos 10%, deixa de ser possível aplicar a equação de Perrin (13), para rotores esféricos. Por este motivo, para se determinar o efeito do colesterol em bicamadas lipídicas acima dos 10% de colesterol, normalmente fazem-se estudos de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo, em vez de estudos de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, uma vez que a anisotropia de fluorescência resolvida no tempo permite que a amostra seja excitada com um pulso de radiação incidente, sendo que o decaimento de anisotropia de fluorescência, dependente do tempo, reflete os movimentos moleculares do meio que rodeia o DPH, uma vez que quanto mais ordenado for o meio que rodeia o DPH, maior será o tempo de decaimento da anisotropia de fluorescência. Assim, a técnica de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo permite determinar, com maior precisão, a orientação angular das cadeias metilénicas das bicamadas lipídicas em torno de uma sonda fluorescente [31, 36].

É de notar que pela figura 4.9 A), existem quatro tendências diferentes de interação do colesterol com o POPC, sendo que a adição de colesterol abaixo dos 10% permite que as bicamadas lipídicas estejam numa fase líquido-cristalino desordenado, o que está de acordo com o diagrama de fases parcial apresentado na figura 2.16 B), no entanto, apesar da

anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, não permitir determinar o efeito do colesterol em bicamadas lipídicas compostas por POPC e colesterol, acima de 10% de colesterol, os dados obtidos neste trabalho não permitem confirmar a existência de apenas três zonas distintas como apresenta o diagrama de fases parcial da figura 2.16 B), pelo contrário, indicam que existem quatro tendências diferentes de variação de anisotropia de fluorescência com o inverso da temperatura, em função da proporção de colesterol presente nas bicamadas lipídicas.

Este estudo da variação de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, do DPH em MLV compostos por POPC e colesterol já tinha sido realizado anteriormente, por Halling e seus colaboradores em 2008, sendo que os valores de anisotropia obtidos neste trabalho experimental estão de acordo com os resultados de anisotropia de fluorescência obtidos nesse estudo e que estão apresentados na figura 4.12 [52].

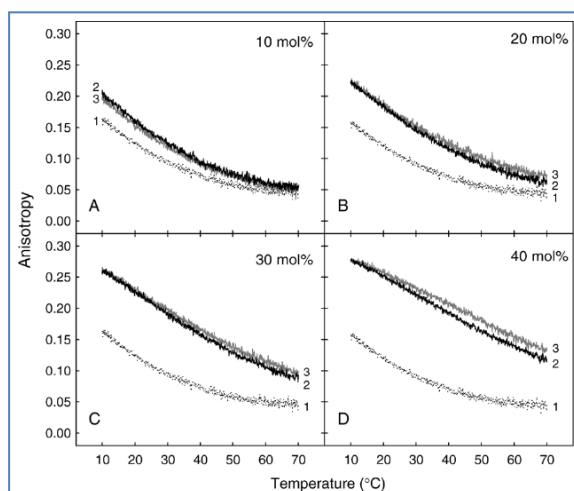


Figura 4.12 - Representação esquemática dos resultados de anisotropia de fluorescência do DPH em vesículas de POPC e colesterol, obtidos por Halling e seus colaboradores em 2008. (1) POPC; (2) POPC + glicosídeo de colesterol; (3) POPC + colesterol (adaptado de [52]).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho experimental, com os resultados obtidos por Halling e seus colaboradores, nota-se que aos 13 °C, para vesículas compostas apenas por POPC, $r = 0,17$ e na figura 4.12, $r = 0,15$. Aos 45 °C obtém-se $r = 0,08$ e na figura 4.12, observa-se $r = 0,07$, mostrando que os valores são aproximadamente iguais. Além disso, quando a concentração de colesterol aumenta, nota-se um aumento dos valores de anisotropia de fluorescência nos resultados obtidos por Halling e seus colaboradores, sendo que o mesmo é observado neste trabalho experimental, apresentado na figura 4.9 A). Por exemplo, a adição de 10% de colesterol neste trabalho experimental mostra que a anisotropia

de fluorescência passa de $r = 0,17$ para $r = 0,193$, aos 13 °C, e na figura 4.12, para a mesma temperatura, a anisotropia de fluorescência passa de $r = 0,15$ para $r = 0,19$. Entretanto à temperatura de 45 °C, este trabalho experimental mostra que a anisotropia de fluorescência passa de $r = 0,08$ para $r = 0,095$, e na figura 4.12, para a mesma temperatura, a anisotropia de fluorescência passa de $r = 0,07$ para $r = 0,09$, mostrando, mais uma vez, que os resultados obtidos neste trabalho experimental estão de acordo com os estudos semelhantes encontrados na literatura [52].

Todavia, neste trabalho experimental foi possível fazer uma análise quantitativa do efeito do colesterol nas bicamadas lipídicas compostas por POPC, a qual não foi realizada no trabalho efetuado por Halling e seus colaboradores, sendo que esta análise quantitativa é bastante importante, uma vez que existem estudos que demonstram que a hidrofobicidade existente entre resíduos de aminoácidos de determinadas proteínas e bicamadas lipídicas compostas por POPC é semelhante à hidrofobicidade que existe entre determinadas proteínas e a membrana do retículo endoplasmático [53].

A utilização de POPC nos estudos de interação de colesterol com bicamadas lipídicas é bastante importante devido ao fato de o POPC ser um dos lípidos mais abundantes nas membranas biológicas, além de que a membrana do retículo endoplasmático é composta principalmente por 48% PC; 19% PE; 4% PS; 8% PI; 5% SM e 6% Chol. Ora se a hidrofobicidade existente entre resíduos de aminoácidos de determinadas proteínas e bicamadas lipídicas compostas por POPC é semelhante à hidrofobicidade que existe entre determinadas proteínas e a membrana do retículo endoplasmático, então significa que os 48% PC que compõem a membrana do retículo endoplasmático são maioritariamente POPC. Assim sendo, é possível assumir que bicamadas lipídicas compostas por POPC e colesterol mimetizam parcialmente as membranas do retículo endoplasmático. Desta forma, a determinação quantitativa do efeito do colesterol em bicamadas lipídicas compostas por POPC é da máxima importância para perceber, parcialmente, o efeito do colesterol na membrana do retículo endoplasmático, a qual é bastante importante na homeostasia do colesterol nas células. Como referido na secção 2.1.1., quando ocorre um desequilíbrio na homeostasia do colesterol nas células, esse desequilíbrio está associado a uma acumulação de colesterol na membrana do retículo endoplasmático, que normalmente apresentam cerca de 6% de colesterol, sendo uma membrana bastante fluida. A acumulação de colesterol nesta membrana pode desencadear processos patológicos, uma vez que a membrana perde a sua fluidez, assim, tanto a membrana como as proteínas existentes nela, deixam de possuir as suas funções normais [1, 3, 4, 5, 6, 53].

Neste trabalho experimental, é possível fornecer uma ferramenta quantitativa que determina a percentagem de colesterol, a partir da qual, as membranas compostas por POPC começam a perder a sua fluidez, sendo que através da análise quantitativa foi possível determinar que as membranas compostas por POPC e 5% de colesterol são membranas fluidas, mas que a partir de 10% de colesterol esta fluidez começa a diminuir, não sendo possível determiná-la quantitativamente. Ainda assim, é possível afirmar que as membranas do retículo endoplasmático estão num estado fluido com 5% de colesterol, sendo que a presença de maiores percentagens de colesterol podem conduzir a estados patológicos.

4.6. Análise quantitativa de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, *versus* Temperatura para MLV compostos por 100% DMPC (35 °C - 53 °C) e MLV compostos por 100% egg-SM (47 °C - 63 °C)

Numa tentativa de entender o comportamento do DPH e lípidos essencialmente saturados como o DMPC e egg-SM, procedeu-se a um estudo idêntico ao que se fez para determinar o comportamento do DPH em lípidos com uma cadeia metilénica monoinsaturada como o POPC, descrito na seção 4.5.

Tal como para o estudo de anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por POPC e colesterol, não é possível determinar valores de viscosidade dos MLV compostos por de DMPC e MLV compostos por egg-SM, no entanto, tal como se fez para o estudo de anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por POPC e colesterol, é possível considerar uma solução de viscosidade conhecida como referência, e tendo as medidas de anisotropia de fluorescência média do DPH em MLV compostos por DMPC e MLV compostos por egg-SM, é possível comparar a viscosidade destes MLV, com a viscosidade da solução de referência através dos valores de energia de ativação que são obtidos no gráfico do tipo $\ln(r_{ss})$ *versus* $\frac{1}{T}$.

Esta análise só é possível, uma vez que o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência *versus* $\frac{1}{T}$, do DPH em MLV compostos por DMPC e MLV compostos por egg-SM representado na figura 4.13, tem o mesmo comportamento que o gráfico da variação da

anisotropia de fluorescência média *versus* $\frac{1}{T}$, para o DPH em parafina líquida, que está representado na figura 2.30 da seção 2.4.1, que também apresenta uma variação não-linear de r_{ss} *versus* $\frac{1}{T}$.

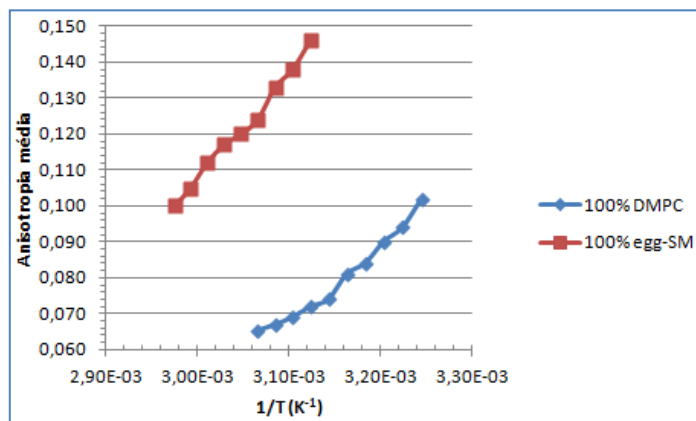


Figura 4.13 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência *versus* inverso da temperatura, para o DPH em MLV compostos por 100% DMPC e MLV compostos por 100% egg-SM.

Tendo as medidas de anisotropia de fluorescência média do DPH em MLV compostos por DMPC e MLV compostos por egg-SM, é possível comparar a viscosidade destes MLV, com a viscosidade da solução de referência através dos valores de energia de ativação que são obtidos no gráfico do tipo $\ln(r_{ss})$ *versus* $\frac{1}{T}$.

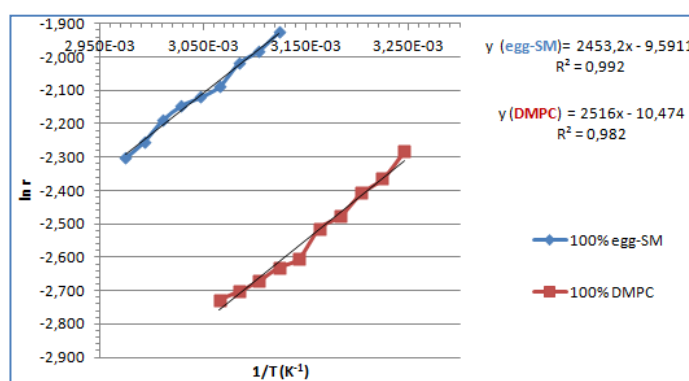


Figura 4.14 - Representação gráfica da variação do logaritmo neperiano da anisotropia de fluorescência *versus* inverso da temperatura absoluta, do DPH em MLV compostos por 100% DMPC e MLV compostos por 100% egg-SM.

Pela figura 4.14, nota-se que os coeficientes de correlação para os MLV compostos por 100% DMPC ($R^* = 0,991$) e para os MLV compostos por 100% egg-SM ($R^* = 0,996$), não são tão bons como para os MLV compostos por 100% de POPC ($R^* = 0,999$), o que mostra que não há uma dependência exponencial da anisotropia de fluorescência com a

temperatura do DPH em MLV compostos por 100% DMPC e para os MLV compostos por 100% egg-SM, tão boa como a que se observa para MLV compostos por 100% de POPC, ainda assim, tomando como exemplo o trabalho realizado por Kawato e seus colaboradores (1977), descrito na seção 2.4.1., é possível comparar a viscosidade desta solução com a viscosidade dos MLV compostos por 100% DMPC e para os MLV compostos por 100% egg-SM e a viscosidade destes com a viscosidade de MLV compostos por 100% de POPC, através da determinação da E_a do DPH em cada meio [43].

Assim, considerando as equações obtidas da linearização de $\ln(r_{ss})$ versus $\frac{1}{T}$, para:

MLV compostos por 100% DMPC:

$$y = 2516 x - 10,474; R^2 = 0,98 \quad (21)$$

Aplicando a expressão (10), obtém-se a $E_a = 20,92 \text{ kJ mol}^{-1}$, que é a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% de DMPC.

MLV compostos por 100% egg-SM:

$$y = 2453,2 x - 9,5911; R^2 = 0,992 \quad (22)$$

Aplicando a expressão (10), obtém-se a $E_a = 20,40 \text{ kJ mol}^{-1}$, que é a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% de egg-SM.

Pela análise dos valores de energia de ativação para MLV compostos por 100% DMPC e para os MLV compostos por 100% egg-SM, nota-se que a diferença entre estes valores não é significativa, sugerindo que a energia necessária para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% DMPC é praticamente a mesma energia para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% de egg-SM.

Comparando estes valores com aquele obtido para a parafina líquida ($E_a = 29,82 \text{ kJ mol}^{-1}$), determinado na seção 2.4.1., nota-se que o DPH necessita de maior energia para que ocorra a difusão rotacional em parafina líquida do que em MLV compostos por 100% de DMPC ou 100% de egg-SM, sugerindo que a viscosidade da parafina líquida é maior que a viscosidade dos MLV compostos por 100% DMPC e MLV compostos por 100% de egg-SM.

Além disso, ao comparar os valores de E_a para MLV compostos por 100% DMPC e MLV compostos por 100% de egg-SM e para MLV compostos por 100% POPC ($E_a = 17,45 \text{ kJ mol}^{-1}$, determinado na seção 4.5), nota-se que a energia de ativação para que ocorra a

difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% DMPC e MLV compostos por 100% de egg-SM é maior que a energia de ativação para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% de POPC, sugerindo que a viscosidade dos MLV compostos por cadeias metilénicas essencialmente saturadas (DMPC e egg-SM), é maior que aquela encontrada para os MLV compostos por 100% de POPC. Este fato pode estar relacionado com o empacotamento em cada tipo de MLV, sendo que lípidos que possuem cadeias metilénicas saturadas, apresentam um maior empacotamento que aquele observado para lípidos com cadeias metilénicas insaturadas. Ora o POPC é composto por uma cadeia metilénica saturada (cadeia metilénica palmitoil), e uma cadeia metilénica monoinsaturada (cadeia metilénica oleiloil). Esta cadeia metilénica monoinsaturada, com uma ligação *cis*, faz com que o empacotamento nestas bicamadas lipídicas seja menor que aquele observado para cadeias metilénicas saturadas, logo as bicamadas lipídicas compostas por POPC são naturalmente mais fluidas que as bicamadas lipídicas compostas por DMPC ou egg-SM.

4.7. Anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus Temperatura, para MLV compostos por POPC, egg-SM e Colesterol

A figura 4.15, representa o gráfico da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por uma mistura lipídica ternária equimolar de 33% egg-SM + 33% POPC + 33% colesterol.

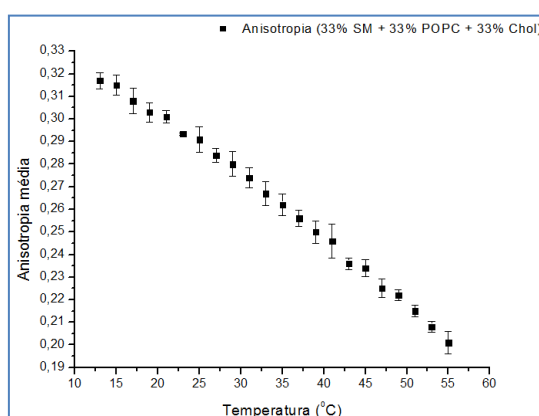


Figura 4.15 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, versus temperatura, do DPH em MLV compostos por 33% egg-SM + 33% POPC + 33% colesterol.

Esta mistura lipídica ternária equimolar é considerada a mistura canónica entre fosfatidilcolinas, como o POPC, esfingomielinas e colesterol, uma vez que nestas

percentagens existe uma coexistência de fases líquido-cristalino ordenado e líquido-cristalino desordenado, como se pode observar na figura 2.17, que representa esquematicamente um diagrama de fases para uma mistura lipídica ternária de PSM/POPC/colesterol, além disso é tida como uma mistura canônica para a observação de heterogeneidade lateral em misturas lipídicas ternárias [25, 27, 54].

Devido ao fato de ser esperado haver uma coexistência de fases líquido-ordenado e líquido-desordenado, era de esperar que houvesse uma variação nos valores de anisotropia de fluorescência, ou seja, deveria ser possível observar um aumento nos valores de anisotropia de fluorescência, quando o DPH estivesse num meio lipídico que apresentasse uma fase líquido-ordenado, e deveria ser possível observar uma diminuição nos valores de anisotropia de fluorescência quando o DPH estivesse num meio lipídico que apresentasse uma fase líquido-desordenado, no entanto, pela figura 4.15, observa-se uma diminuição de fluorescência progressivamente contínua, parecendo que não existe nenhuma coexistência de fases, mas sim que as bicamadas estejam apenas numa única fase.

A partir destes resultados surge uma dúvida: será que os dados apresentados na literatura estão errados e não existe uma coexistência de fases líquido-ordenado e líquido-desordenado, para esta mistura lipídica ternária equimolar?

Para tentar dar uma resposta a esta questão, é necessário perceber se a sonda fluorescente utilizada tem alguma preferência de partição para algumas destas fases, apesar de na literatura existirem dados que indicam que o DPH não tem preferência de partição nem para a fase líquido-ordenado, nem para a fase líquido-desordenado [49, 55].

Para tal, foram feitas misturas lipídicas binárias quase equimolares e misturas lipídicas binárias equimolares de POPC + colesterol e egg-SM + colesterol e foi necessário comparar os valores de anisotropia de fluorescência obtidos com aqueles obtidos para a mistura lipídica ternária equimolar. Os resultados estão apresentados na figura 4.16 A) e B).

A figura 4.16 A), representa o gráfico das variações das anisotropias de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por uma mistura lipídica binária quase equimolar de 55% egg-SM + 45% colesterol; mistura lipídica binária quase equimolar de 55% POPC + 45% colesterol e mistura lipídica ternária equimolar de 33% POPC + 33% egg-SM + 33% colesterol. A figura 4.16 B), representa o gráfico das variações das anisotropias de fluorescência, em estado estacionário, em função da temperatura, do DPH em MLV compostos por uma mistura lipídica binária equimolar de 50% egg-SM + 50% colesterol; mistura lipídica binária equimolar de 50% POPC + 50% colesterol e mistura lipídica ternária equimolar de 33% POPC + 33% egg-SM + 33% colesterol.

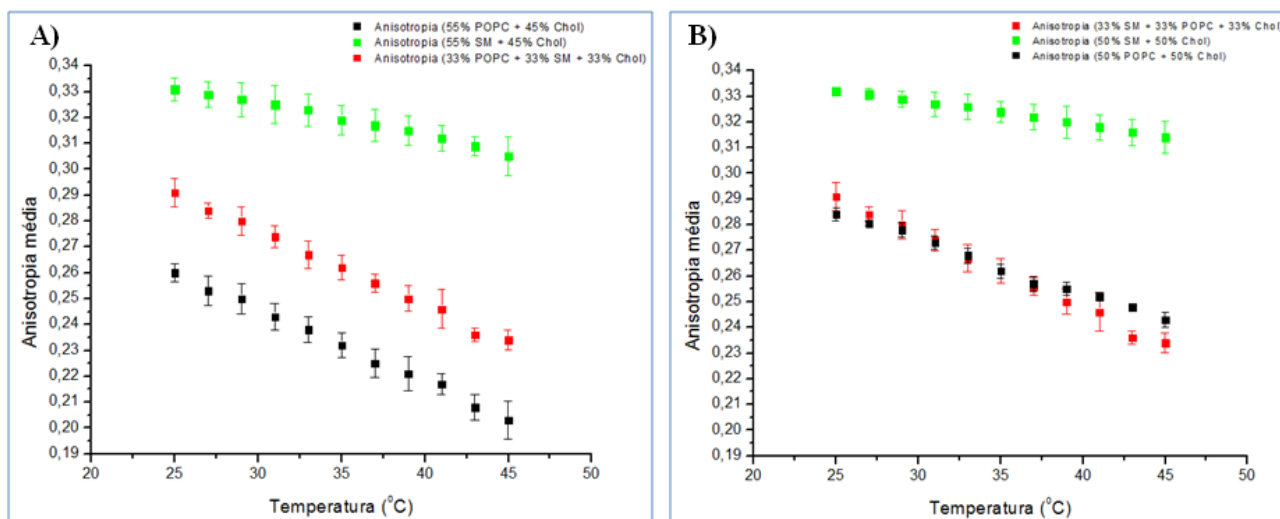


Figura 4.16 - Representação gráfica da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura, do DPH em MLV compostos por: **A)** 55% egg-SM + 45% colesterol; 55% POPC + 45% colesterol e 33% POPC + 33% egg-SM + 33% colesterol. **B)** 50% egg-SM + 50% colesterol; 50% POPC + 50% colesterol e 33% POPC + 33% egg-SM + 33% colesterol.

Ao observar a figura 4.16 A), nota-se que os valores de anisotropia de fluorescência média do DPH presente nos MLV compostos por 55% egg-SM + 45% Chol, são substancialmente mais elevados que aqueles observados para o DPH em MLV compostos por 55% POPC + 45% Chol, mostrando que as bicamadas lipídicas compostas por 55% egg-SM + 45% Chol são muito mais ordenadas que as bicamadas lipídicas compostas por 55% POPC + 45% Chol, sendo que os valores da anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário, do DPH para os MLV compostos por 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol, são intermédios aos observados para os MLV compostos por 55% egg-SM + 45% Chol e para os MLV compostos por 55% POPC + 45% Chol, mostrando que as bicamadas compostas por esta mistura ternária equimolar, possuem uma ordenação menor que a existente em MLV compostos por 55% egg-SM + 45% Chol e maior que a ordenação existente em MLV compostos por 55% POPC + 45% Chol.

Todavia, nota-se que o comportamento obtido com os valores da anisotropia média, do DPH em MLV compostos por 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol, é mais parecido com o comportamento obtido para MLV compostos por 55% POPC + 45% Chol, sugerindo que poderá haver uma preferência de partição do DPH para meios menos ordenados.

Então, houve a necessidade de fazer a comparação do comportamento do DPH em MLV compostos por misturas lipídicas binárias equimolares e misturas lipídicas ternárias equimolares. Para tal foram feitas medidas de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, para o DPH em MLV compostos por 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol,

MLV compostos por 50% POPC + 50% Chol e MLV compostos por 50% egg-SM + 50% Chol, sendo que os resultados estão apresentados na figura 4.16 B).

Ao observar a figura 4.16 B), nota-se que os valores de anisotropia média, do DPH presente nos MLV compostos por 50% egg-SM + 50% Chol, são substancialmente mais elevados que aqueles observados para o DPH em MLV compostos por 50% POPC + 50% Chol, sendo que MLV compostos por 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol são praticamente iguais, dentro do erro experimental, àqueles observados para o DPH em MLV compostos por 50% POPC + 50% Chol, fato que vem provar, inequivocamente, que o DPH tem uma preferência de partição para meios lipídicos menos ordenados, como o meio lipídico proporcionado pela mistura lipídica binária equimolar composta por 50% POPC + % Chol.

A partir deste estudo, é possível perceber que a diminuição de fluorescência continuamente progressiva, parecendo que não existe nenhuma coexistência de fases, observada na figura 4.3, não se deve a que não exista coexistência de fases, mas sim à preferência de partição que o DPH tem para com meios lipídicos menos ordenados, indicando que aquelas medidas de anisotropia de fluorescência, reportam a difusão rotacional do DPH nos domínios lipídicos menos ordenados onde existe mais POPC.

Seria bastante interessante fazer leituras de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário para uma sonda que particionasse para domínios lipídicos mais ordenados, de maneira a comprovar estes resultados.

Neste trabalho experimental considera-se que quando se adiciona 50% de colesterol, a totalidade desse colesterol é inserida nas bicamadas lipídicas, uma vez que há referência na literatura de que o colesterol é solúvel em bicamadas lipídicas até 66% (com recurso a abordagens experimentais específicas), sendo que acima desta percentagem, o colesterol tem tendência a cristalizar fora da bicamada lipídica [2, 25].

5. Conclusões

É possível concluir que, de uma forma geral, o aumento da temperatura faz alterar as propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas, uma vez que se observa uma diminuição dos valores de anisotropia de fluorescência média do DPH, levando a concluir que o aumento da temperatura faz aumentar a liberdade conformacional das cadeias metilénicas dos lípidos, diminuindo a ordenação das bicamadas lipídicas. A diminuição da ordenação das bicamadas lipídicas traduz-se num aumento da difusão rotacional do DPH, que faz aumentar a despolarização da radiação emitida pelo DPH e por conseguinte, ocorre uma diminuição dos valores de anisotropia de fluorescência. Além disso, conclui-se que a adição de colesterol altera bastante as propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas, aumentando a sua ordenação, uma vez que há um aumento nos valores de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, indicando que a difusão rotacional do DPH é menor, o que reporta que o meio que o rodeia está mais ordenado.

Pelos resultados obtidos para a anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por DMPC e DPPC, conclui-se que não é possível determinar se o DPH tem uma preferência por uma fase gel, ou uma fase líquido-cristalino, apenas é possível observar como a temperatura de transição de fase é alterada à medida que se alteram as concentrações de cada tipo de lípido. Por exemplo, à medida que a concentração de DPPC aumenta, a temperatura de transição de fase também vai aumentando relativamente à temperatura de transição de fase observada, para MLV compostos apenas por DMPC, sendo que para MLV compostos por 100% de DMPC, $T_m = 24\text{ °C}$ e para MLV compostos por 100% DPPC, $T_m = 42\text{ °C}$. Abaixo da T_m , entre os 13 °C e os 19 °C , a anisotropia de fluorescência é praticamente igual ($r = 0,36 \pm 0,01$), dentro do erro experimental, independentemente das concentrações de DMPC e DPPC nos MLV, que é o mesmo que acontece acima da temperatura de transição de fase, entre os 41 °C e os 53 °C , em que a anisotropia de fluorescência apresenta valores praticamente iguais a $0,08 \pm 0,02$ independentemente da concentração dos lípidos. Nos MLV compostos por 40% de DPPC + 60% de DMPC, observa-se uma transição aos 30 °C e outra aos 38 °C , sugerindo que existe uma coexistência de fases em função da temperatura. Quando as concentrações, de cada um dos lípidos que compõem a mistura, são mais elevadas, como no caso de 40% DPPC + 60% DMPC e 60% DMPC + 40% DPPC, é mais difícil determinar a temperatura de transição de fase, o que sugere que esta análise é bastante sensível à pureza dos lípidos, à coexistência de fases e é possível determinar valores de temperatura de transição de fase corretos através desta análise, devido precisamente à sua sensibilidade.

No estudo da anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por egg-SM, os valores de anisotropia são medidos no intervalo de temperaturas entre os 13 °C ($r = 0,37$) e os 63 °C ($r = 0,10$), sendo que entre os 33 °C e os 47 °C, ocorre a transição de fase que faz com que as bicamadas lipídicas transitem de uma fase gel (L_β), para uma fase líquido-cristalino (L_α), ocorrendo uma diminuição brusca nos valores de anisotropia de fluorescência, que passam de 0,34 para 0,15. No entanto, pela primeira derivada não é possível determinar a temperatura de transição com exatidão para MLV compostos por 100% egg-SM, uma vez que se observam dois picos às temperaturas de 38 °C e 44 °C, levando a concluir que a egg-SM utilizada na preparação destes MLV não é pura o suficiente para que haja uma temperatura de transição exata e bem definida. O mesmo se pode concluir para a tentativa de determinar o ponto de inflexão, aplicando a segunda derivada. Tais resultados levam a questões acerca do uso generalizado de egg-SM e misturas lipídicas que apresentam heterogeneidade lateral.

Os resultados para a anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por egg-SM e colesterol, mostram que a adição de colesterol em percentagens cada vez maiores, faz desaparecer a fase de transição que se observa claramente para os MLV compostos por 100% egg-SM e que vai desaparecendo com o aumento da percentagem de colesterol adicionado. Também é possível concluir que abaixo da temperatura de transição de fase, a egg-SM está numa fase gel, cujas propriedades físico-químicas não são alteradas, independentemente da percentagem de colesterol adicionada, uma vez que o valor de anisotropia é de $0,32 \pm 0,02$, mantendo-se praticamente constante, independentemente da percentagem de colesterol adicionada. Acima da temperatura de transição de fase, a adição de colesterol entre 5% e 15%, faz alterar significativamente as propriedades físico-químicas da egg-SM, uma vez que os valores de anisotropia de fluorescência média do DPH vão aumentando progressivamente. Por exemplo, para a temperatura de 55 °C, e 5% Chol apresenta uma $r = 0,15$; quando $t = 55$ °C e existe 10% Chol, $r = 0,20$ e quando $t = 55$ °C e existe 15% Chol, $r = 0,25$, havendo uma ordenação cada vez maior das cadeias metilénicas das bicamadas lipídicas, quanto maior for a concentração de colesterol. A adição de colesterol acima dos 15%, após a temperatura de transição de fase, não parece influenciar significativamente as propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas, uma vez que qualquer que seja a percentagem de colesterol adicionado: 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45% e 50%, os valores de anisotropia de fluorescência média do DPH são praticamente iguais, dentro do erro experimental. Além disso, é de notar que para as percentagens de colesterol mais elevadas (45 e 50%), a anisotropia de fluorescência não varia dentro do intervalo de

temperaturas entre os 13 °C e os 55 °C, para estes MLV, havendo $r = 0,31 \pm 0,02$ e $r = 0,32 \pm 0,02$, respectivamente.

Os resultados obtidos para a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, *versus* temperatura, para MLV compostos por POPC e colesterol, conclui-se que o colesterol interage de forma diferente com as bicamadas lipídicas compostas por POPC, dependendo da quantidade de colesterol adicionado a estas bicamadas lipídicas, sendo possível distinguir quatro tendências diferentes de interação do colesterol com o POPC. Nota-se que existe uma relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência média e a temperatura para MLV compostos por 100% POPC ($R^* = 0,999$), e 95% POPC + 5% Chol ($R^* = 0,999$), indicando que ambos apresentam características moleculares análogas, estando numa fase líquido-cristalino, (fase líquido-desordenado), o que pode ser provado pelos valores de energia de ativação. Para MLV compostos por 100% POPC, a $E_a = 17,45 \text{ kJ mol}^{-1}$, sendo que para MLV compostos por 95% POPC + 5% Chol, a $E_a = 17,98 \text{ kJ mol}^{-1}$, o que significa que estes MLV apresentam praticamente a mesma viscosidade, logo o DPH necessita da mesma energia para que ocorra a sua difusão rotacional tanto em MLV compostos por 100% POPC, como MLV compostos por 95% POPC+5% Chol, levando a concluir que a adição de 5% de colesterol não altera significativamente as propriedades físico-químicas destas bicamadas lipídicas. A adição de colesterol acima de 10% faz com que se deixe de observar a relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência média e a temperatura, levando a concluir que a adição de colesterol acima de 10% faz alterar o estado molecular dos MLV, os quais deixam de apresentar propriedades típicas de líquidos homogêneos normais, deixando de estar numa fase líquido-cristalino, num estado líquido-desordenado.

Pelos resultados obtidos para a análise quantitativa de anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por 100% DMPC (35 °C - 53 °C) e MLV compostos por 100% egg-SM (47 °C - 63 °C), conclui-se que o DPH necessita de maior energia para que ocorra a difusão rotacional em parafina líquida ($E_a = 29,82 \text{ kJ mol}^{-1}$), do que em MLV compostos por 100% de DMPC ($E_a = 20,92 \text{ kJ mol}^{-1}$) ou 100% de egg-SM ($E_a = 20,40 \text{ kJ mol}^{-1}$), levando a concluir que a viscosidade da parafina líquida é maior que a viscosidade dos MLV compostos por 100% DMPC e MLV compostos por 100% de egg-SM. Além disso, comparando os valores de E_a para MLV compostos por 100% DMPC e 100% de egg-SM, com o valor de E_a para MLV compostos por 100% POPC ($E_a = 17,45 \text{ kJ mol}^{-1}$), nota-se que a energia de ativação para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% DMPC e 100% de egg-SM é maior que a energia de ativação para que ocorra a difusão rotacional do DPH em MLV compostos por 100% de POPC, levando a

concluir que a viscosidade dos MLV compostos por cadeias metilénicas essencialmente saturadas (DMPC e egg-SM), é maior que aquela encontrada para os MLV compostos por 100% de POPC, uma vez que o POPC é composto por uma cadeia metilénica saturada (cadeia metilénica palmitoil), e uma cadeia metilénica monoinsaturada (cadeia metilénica oleiloil). Esta cadeia metilénica monoinsaturada, com uma ligação *cis*, faz com que o empacotamento nestas bicamadas lipídicas seja menor que aquele observado para cadeias metilénicas saturadas, logo as bicamadas lipídicas compostas por POPC são naturalmente mais fluidas que as bicamadas lipídicas compostas por DMPC ou egg-SM.

Nos resultados obtidos para a anisotropia de fluorescência *versus* temperatura, para MLV compostos por POPC, egg-SM e colesterol, conclui-se que há uma diminuição de anisotropia de fluorescência média, à medida que a temperatura aumenta. Esta diminuição de anisotropia de fluorescência é também contínua, não estando de acordo com o fato de, para a mistura lipídica equimolar 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol, estar prevista a ocorrência de coexistência de fases líquido-ordenado e líquido-desordenado. Entretanto, comparando os valores de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, do DPH em MLV compostos por 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol, MLV compostos por 50% egg-SM + 50% Chol e MLV compostos por 50% POPC + 50% Chol, conclui-se que as bicamadas lipídicas compostas por 50% egg-SM + 50% Chol são muito mais ordenadas que as bicamadas lipídicas compostas por 50% POPC + 50% Chol, pois os valores de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário para MLV compostos por 50% egg-SM + 50% Chol são muito mais elevados. Além disso, os valores de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, para o DPH em MLV compostos por 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol são praticamente iguais, dentro do erro experimental, àqueles observados para o DPH em MLV compostos por 50% POPC + 50% Chol, permitindo concluir que o DPH tem uma preferência de partição para meios lipídicos menos ordenados, como o meio lipídico proporcionado pela mistura lipídica binária equimolar composta por 50% POPC + 50% Chol. Então, é possível concluir que a diminuição de fluorescência continuamente progressiva, para a mistura lipídica ternária equimolar 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol se deve à preferência de partição que o DPH tem para com meios lipídicos menos ordenados, indicando que aquelas medidas de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, reportam a difusão rotacional do DPH nos domínios lipídicos menos ordenados onde existe mais POPC.

6. Perspetivas futuras

- ♣ Os gráficos que relacionam a variação da anisotropia de fluorescência média, com a temperatura, para MLV compostos por lípidos puros como 100% de DMPC e 100% de DPPC, permitem observar claramente uma transição de fase, sendo que a aplicação matemática da primeira derivada permite determinar, com exatidão, a temperatura de transição de fase e a aplicação matemática da segunda derivada permite determinar, com exatidão as temperaturas em que ocorre o ponto de inflexão. No entanto, para MLV compostos por 100% de egg-SM, não é possível determinar, com exatidão, a temperatura de transição de fase, nem as temperaturas em que esta mudança de fase começa e acaba, o que poderá estar relacionado com a pureza do lípido que compõe os MLV.

Para provar este pressuposto, poderiam ser realizados MLV compostos por um tipo de esfingolípido mais puro, como a PSM e determinar a temperatura de transição de fase e as temperaturas em que esta mudança de fase começa e acaba, através da aplicação matemática da 1ª e 2ª derivadas e comparar estes valores com aqueles obtidos com os MLV compostos por egg-SM.

- ♣ A adição de percentagens de colesterol superiores a 10%, faz com que deixe de se observar uma relação exponencial entre a anisotropia de fluorescência média, em estado estacionário, com a temperatura. Portanto, acima de 10% de colesterol, as bicamadas lipídicas deixam de se comportar como líquidos homogêneos normais, passando a ter interações moleculares diferentes, desta forma o DPH deixa de descrever uma esfera, através dos seus movimentos de rotação, passando a ter a sua difusão rotacional condicionada pelo meio envolvente.

A aplicação da equação de Perrin, para estudar a anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, para a adição de colesterol acima dos 10%, deixa de ser válida, sendo que para estudar a organização do meio que envolve o DPH, é necessário utilizar técnicas resolvidas no tempo, como a técnica de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo, a qual permite determinar a orientação angular das cadeias metilénicas das bicamadas lipídicas em torno do DPH, uma vez que permite observar

o decaimento de anisotropia de fluorescência ao longo do tempo, após a amostra ter sido excitada com um pulso de radiação.

- ♣ Os resultados obtidos da variação da anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, do DPH, em misturas lipídicas ternárias equimolares, mostram que o DPH tem uma preferência por domínios lipídicos menos ordenados, sendo que aquando da mistura lipídica ternária de 33% POPC + 33% egg-SM + 33% Chol, deveria haver uma coexistência de fases líquido-ordenado e líquido-desordenado, desta forma seria bastante interessante comparar os resultados obtidos com resultados obtidos de anisotropia de fluorescência, em estado estacionário, para uma sonda que particione especificamente para domínios lipídicos ordenados.

7. Referências bibliográficas

- [1] I. Tabas (2002) "Cholesterol in health and disease" *J. Clin. Invest.* **110**: 583-590.
- [2] L. Loura; R. Almeida, *Tópicos de Biofísica de Membranas*, LIDEL - Edições Técnicas Lda., 2004, pp. 7-25; 40; 49-64.
- [3] T. Heimburg, *Thermal biophysics of membranes*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, pp. 15-18; 29-40.
- [4] F. R. Maxfield, *et al.* (2005) "Role of cholesterol and lipid organization in disease" *Nature* **438**: 36-45.
- [5] I. Tabas (2002) "Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications" *J. Clin. Invest.* **110**: 905-911.
- [6] K. Simons, *et al.* (2002) "Cholesterol, lipid rafts, and disease" *J. Clin. Invest.* **110**: 597-603.
- [7] W. Koenig, *et al.* (2007) "Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture" *Arterioscler Thromb Vasc Biol. - J. Am. Heart Ass.* **27**: 15-26.
- [8] H. Bader, *et al.* (2006) "Polymeric monolayers and liposomes as models for biomembranes: How to bridge the gap between polymer science and membrane biology?" *SpringerLink* 1-62.
- [9] D. Voet; J. G. Voet, *Bioquímica*, 3ª. ed., Artmed, 2006, pp. 389-394.
- [10] <http://www.avantilipids.com> (13/8/2012).
- [11] N. C. Santos, M. A. R. B. Castanho (2002) "Lipossomas: A bala mágica acertou?" *Quim. Nova* **25**: 1181-1185.
- [12] M. Shinitzky, *et al.* (1974) "Dynamics of the Hydrocarbon Layer in Liposomes of Lecithin and Sphingomyelin Containing Dicetylphosphate" *J. Biol. Chem.* **249**: 2652-2657.
- [13] C. M. Batista, *et al.* (2007) "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte" *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **43**: 167-179.
- [14] T. Róg, *et al.* (2006) "Cholesterol effects on a mixed-chain phosphatidylcholine bilayer: a molecular dynamics simulation study" *Biochimie* **88**: 449-460.
- [15] F. Meyer, *et al.* (2009) "Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 3654-3658.
- [16] J. Joannis, *et al.* (2011) "Atomistic Simulation of Cholesterol Effects on Miscibility of Saturated and Unsaturated Phospholipids: Implications for Liquid-Ordered/Liquid Disordered Phase Coexistence" *J. Am. Chem. Soc.* 3625-3634.

- [17] M. Lönnfors, *et al.* (2011) "Sterols Have Higher Affinity for Sphingomyelin than for Phosphatidylcholine Bilayers even at Equal Acyl-Chain Order" *Biophys. J.* **100**: 2633–2641.
- [18] A. Genz, *et al.* (1986) "The influence of cholesterol on the main phase transition of unilamellar dipalmytoylphosphatidylcholine vesicles - A differential scanning calorimetry and iodine laser T-Jump study" *Biophys. J.* **50**: 1043-1051.
- [19] S. A. Pandit, *et al.* (2008) "Cholesterol Packing around Lipids with Saturated and Unsaturated Chains: A Simulation Study" *Langmuir* **24**: 6858-6865.
- [20] B. Ramstedt, *et al.* (2002) "Membrane properties of sphingomyelins" *FEBS Letters* 33-37.
- [21] A. V. Samsonov, *et al.* (2001) "Characterization of Cholesterol Sphingomyelin Domains and Their Dynamics in Bilayer Membranes" *Biophys. J.* **81**: 1486-1500.
- [22] P. F. F. Almeida, *et al.* (1992) "Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: A free volume analysis" *Biochemistry* **3**: 6739-6747.
- [23] M. B. Sankaram, *et al.* (1991) "Cholesterol induced fluid-phase immiscibility in membranes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8686-8690.
- [24] M. R. Vist, *et al.* (1990) "Phase Equilibria of cholesterol/ dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry" *Biochemistry* **29**: 451-464.
- [25] R. F. M. Almeida, *et al.* (2003) "Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts" *Biophys. J.* **85**: 2406–2416.
- [26] S. Mukherjee, *et al.* (2004) "Membrane Domains" *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 839-866.
- [27] S. N. Ahmed, *et al.* (1997) "On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes" *Biochemistry* **36**: 10944-10953.
- [28] P. Atkins; J. Paula, *Physical Chemistry for the Life Sciences*, Freeman, Oxford University Press, 2006, pp. 567-569, 581-584.
- [29] B. Valeur, *Molecular fluorescence: Principles and applications*, Wiley-VCH, 2001, pp. 8-11; 29; 37; 38; 125-139; 151-154.
- [30] L. M. S. Loura, *et al.* (2011) "Recent developments in molecular dynamics simulations of fluorescent membrane probes" *Molecules* 5437-5452.
- [31] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, 2006, pp. 10; 12-13, 15-18, 27-29; 34-37; 63, 72, 353-375; 391-392; 399-401; 418-438.

- [32] L. A. Chen, *et al.* (1971) "Nanosecond Time-dependent Fluorescence Depolarization of Diphenylhexatriene in Dimyristoyllecithin Vesicles and the Determination of 'Microviscosity'" *J. Biol. Chem.* **252**: 2163-2169.
- [33] B. R. Lentz, *et al.* (1979) "Light-Scattering effects in the measurement of membrane microviscosity with diphenylhexatriene" *Biophys. J.* **25**: 489-494.
- [34] C. S. Chong, *et al.* (1976) "Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles" *Biochim. Biophys. Acta* 260-282.
- [35] J. R. Lakowicz, *et al.* (1979) "Differential Polarized Phase Fluorometric Investigations of Diphenylhexatriene in Lipid Bilayers. Quantitation of Hindered Depolarizing Rotations" *Biochemistry* **18**: 508-519.
- [36] I. Johnson, *et al.* *Molecular probes handbook, A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 11th ed., Invitrogen, 2010, pp. 514; 535.
- [37] J. Repáková, *et al.* (2004) "Distribution, Orientation, and Dynamics of DPH Probes in DPPC Bilayer" *J. Phys. Chem. B* **108**: 13438-13448.
- [38] M. Fraňová, *et al.* (2010) "Effects of DPH on DPPC-Cholesterol membranes with varying concentrations of cholesterol: From local perturbations to limitations in fluorescence anisotropy experiments" *J. Phys. Chem. B* **114**: 2704-2711.
- [39] B. R. Lentz, *et al.* (1976) "Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers. I. Single Component Phosphatidylcholine Liposomes" *Biochemistry* **15**: 4521-4528.
- [40] L. M. S. Loura, *et al.* (2009) "Fluorescent membrane probes' behavior in lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations" *Biophys. Rev.* 141-148.
- [41] I. Konopásek, *et al.* (2004) "Short-lived fluorescence component of DPH reports on lipid-water interface of biological membranes" *Chem. Phys. Lipids* **130**: 135-144.
- [42] T. Parasassi, *et al.* (1991) "A photophysical model for diphenylhexatriene fluorescence decay in solvents and in phospholipid vesicles" *Biophys. J.* **59**: 466-475.
- [43] S. Kawato, *et al.* (1977) "Dynamic Structure of Lipid Bilayers Studied by Nanosecond Fluorescence Techniques" *Biochemistry* **16**: 2319-2324.
- [44] A. C. Gracetto, *et al.* (2010) "Unusual 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) Spectrophotometric Behavior in Water/Ethanol and Water/DMSO Mixtures" *J. Braz. Chem. Soc.* **21**: 1497-1502.
- [45] R. H. Ewell, (1938) "The reaction rate theory of viscosity and some of its applications" *J. Applied Phys.* 252-269.
- [46] P.G. Gennes, (1971) "Reptation of a Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles" *J. Chem. Phys.* **55**: 572-579.

- [47] H. Eyring, (1936) "Viscosity, Plasticity, and Diffusion as Examples of Absolute Reaction Rates" *J. Chem. Phys.* **4**: 283-291.
- [48] <http://www.invitrogen.com> (25/11/2011).
- [49] B. R. Lentz, *et al.* (1976) "Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers. 2. Two-Component Phosphatidylcholine Liposomes" *Biochemistry* **15**: 4529-4537.
- [50] J. Huang, *et al.* (1999) "A Microscopic Interaction Model of Maximum Solubility of Cholesterol in Lipid Bilayers" *Biophys. J.* **76**: 2142–2157.
- [51] J. J. L. Cascales, *et al.* (1997) "Molecular dynamics simulation of a dye molecule in the interior of a bilayer: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in dipalmitoylphosphatidylcholine" *Biophys. Chem.* 1-8.
- [52] K. K. Halling, *et al.* (2008) "Glycosylation induces shifts in the lateral distribution of cholesterol from ordered towards less ordered domains" *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1100–1111.
- [53] J. T. McIntosh, *et al.* (2007) "Bilayers as Protein Solvents: Role of Bilayer Structure and Elastic Properties" *J. Gen. Physiol.* **130**: 225–227.
- [54] D. Marsh, (2009) "Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams" *Biochim. Biophys. Acta* 2114–2123.
- [55] T. Parasassi, *et al.* (1984) "Detection of Phospholipid Phase Separation - A Multifrequency phase fluorometry study of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence" *J. Biol. Chem.* **259**: 14011-14017.