

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES POR  
MEIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA E  
CONFOCAL**

**TESE DE DOUTORADO**

**Yasmine Miguel Serafini Micheletto**

**Porto Alegre, 2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

YASMINE MIGUEL SERAFINI MICHELETTO

**ESTUDO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES POR  
MEIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA E  
CONFOCAL**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. Nádyá Pesce da Silveira  
Orientador

Prof. Dr. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini  
Coorientador

Porto Alegre, setembro de 2014

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais são devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto de 2010 e setembro de 2014, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Nádyá Pesce da Silveira e Coorientação da Professora Doutora Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Rosângela Itri

USP

Prof. Dr. Maria Ismenia Zulian Lionzo

UFCSPA

Prof. Dr. Leandra Franciscato Campo

PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Hubert Karl Stassen

PPGQ/ UFRGS

Prof. Dr. Nádyá Pesce da Silveira

Orientadora-UFRGS

Prof. Dr. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Coorientadora-UFRGS

Yasmine Miguel Serafini Micheletto

*Dedico este trabalho a toda minha família. Muito obrigada por  
sempre estarem ao meu lado!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e força.

A Nádyá, pela orientação, amizade, confiança, incentivo e pelo exemplo de mulher e profissional.

A Professora Célia, pela co-orientação, confiança e incentivo.

Ao Professor Carlos Marques pela orientação, confiança e recepção e acolhida em Strasbourg.

Ao Andre pelos ensinamentos, apoio e confiança. Por sempre me auxiliar nos experimentos com muita paciência e atenção.

A Prof. Dra. Deborah Dick, Prof. Dra. Maria Lionzo e Prof. Dra. Leandra Campo pelas sugestões e contribuições no meu exame de qualificação.

A UFRGS e a Pós-graduação em Química por ter me dado a oportunidade de realizar um curso de Pós-graduação de excelente qualidade.

Aos queridos amigos que passaram pelo laboratório LINDIM: Omar, Fernando, Mateus, Maria, Rosane e Carlo.

Aos amigos queridos que estiveram comigo em Strasbourg: Pedro, Maria, Thais, Helena (minha dupla), Cris, Heveline, Aliny, Juliano, Juliana, Marina, Bruno, Patrick, Omar, Laurence e Andreas.

Ao Omar por todos os ensinamentos! Muito obrigada!

A minha querida amiga portuguesa, Alexandra, por todo companheirismo, amizade, parceria, carinho e amor! Saudadessssssssssssssssssss!!!

A Gabriela (Bibi) e ao Zé pela amizade e carinho.

Ao Alexandre pela amizade e confiança.

A Mariana Kanaan pela amizade e dedicação.

A Daiani pela amizade, parceria e apoio!!!

Ao Joelson pela amizade e discussões científicas!

Ao Felipe Kessler pela amizade, parceria nos estudos e no laboratório e pelas boas risadas!!!

As amigas queridas que amo Naty, Cris Florek e Denise.

Aos amigos queridos da URI: Paula, Hugo, Leandro, Carla, Camila, Melissa, Sandro.

A minha amiga querida Miriam, pela amizade, confiança, pela parceria de tantos anos, pelo carinho e por sempre estar ao meu lado!

Ao Rafael Guzatto pela amizade, parceria e por sempre me ajudar!!! Obrigada!

A Quelen pela amizade de sempre, parceria de tantos, pelo carinho, pelas boas risadas!!!

A Aline pela amizade, carinho e parceria de tantos anos!!!

A Gabriela Maciel pela amizade de tantos anos e por sempre estar ao meu lado! És muito importante para mim!!! Muito obrigada pelo teu carinho, por tantas conversas, pela cumplicidade, apoio, respeito e pela amizade incondicional!!!

A minha querida amiga e parceira Andresa!!! Muito obrigada por tudo!!! Tive o prazer de conviver contigo todos esses anos no laboratório e aprender muito contigo! Obrigada pelo teu carinho, amizade, cumplicidade, pela parceria, por toda ajuda que sempre me deste, pelo respeito e amor!!!

A minha amiga, mãe, parceira queridaaaa Gisele!!! Obrigada por tudo!!! Foi um prazer indescritível ter convivido contigo todos esses anos!!! Como aprendi contigo, com tua força, com teu carinho, amor, teu alto astral e tua amizade incondicional!!! Vais estar sempre no meu coração!!! Obrigada pelas palavras amigas, pelas risadas, pela confiança, pelo carinho, pela amizade, pela cumplicidade e amor!!!

Ao meu querido amigo Mauro que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, pela parceria nos estudos de tantos anos, pela amizade incondicional, pelo carinho, respeito e cumplicidade!!! Muito obrigada!!!

A todos os colegas queridos do laboratório LINDIM, pelos momentos inesquecíveis!!!

Ao Rafael, meu companheiro, parceiro de todas as horas, por sempre me apoiar!!! Muito obrigada!!! Sem você nada disso seria possível!!! Muito obrigada por todos esses anos de dedicação, carinho, amor e respeito! Não tenho palavras para descrever o quanto foi e é importante para mim! Só tenho a te agradecer por todos esses anos de cumplicidade, dedicação, amor, parceria, por estar sempre ao meu lado, me dando força, acreditando em mim, quando eu mesma acreditava já não ter mais forças, tu estavas lá, com teu amor incondicional, paciência e carinho, muito obrigada!!! Te amo!!! Essa tese é nossa conquista!!!

Ao Paulo, Marlene e Paula, pelo apoio de sempre, pelo carinho e amor!!! Muito obrigada por sempre estarem de braços abertos para me receber, pela compreensão, pela amizade e pelo amor!!!

Ao meu Pai por tudo!!! Muito obrigada pelo carinho, apoio e amor incondicional!!

Ao meu querido irmão Yamani, pelo amor e carinho!

A minha querida vó que nos deixou ano passado.

A toda minha família, muito obrigada!!! A minha Dinda querida! Ao meu Dindo, Dudu e Alana.

Ao Télbio pelo carinho, amor e ajuda em todas as horas!

E a minha mãe, que é tudo para mim! Muito obrigada por tudo!!! Pelo carinho, compreensão, amor, respeito, paciência, apoio e admiração!!!!

Esta tese é fruto da colaboração de muitas pessoas, por isso muito obrigada a todos que fizeram e fazem parte da minha vida! Tenho muita sorte por ter todos vocês comigo nesta vida!!!

# SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução .....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1.2.1 Vesículas lipídicas .....	3
1.2.2 Fases lipídicas.....	7
1.2.3 Jangadas lipídicas e separação de fases .....	8
1.2.4 Modelo de vesícula sináptica.....	12
1.3 OBJETIVOS.....	13
Capítulo 2. Metodologia e fundamentos teóricos.....	15
2.1 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVs) PELO MÉTODO DE EVAPORAÇÃO EM FASE REVERSA .....	16
2.2 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS (SUVs) PELO MÉTODO DE EXTRUSÃO .....	17
2.3 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES (GUVs) PELO MÉTODO DE ELETROFORMAÇÃO.....	17
2.4 PREPARAÇÃO DAS GUVs PELO MÉTODO GEL.....	18
2.5 ESPALHAMENTO DE LUZ.....	19
2.6 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) .....	21
2.7 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	25
2.8 POTENCIAL ZETA (PZ) .....	27
2.9 MICROSCOPIA ÓPTICA E DE FLUORESCÊNCIA .....	27
2.10 MICROSCOPIA CONFOCAL .....	28
Capítulo 3. Estudo do mecanismo de fusão de vesículas unilamelares gigantes durante a eletroformação a partir de um filme lipídico multilamelar.....	29

3.1 INTRODUÇÃO.....	30
3.1.1 Formação de GUVs pelo método de hidratação.....	30
3.1.2 Formação de GUVs pelo método de eletroformação .....	32
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.2.1 Materiais .....	37
3.2.2 Crescimento de GUVs de rodamina na presença de GUVs de NBDPE .....	37
3.2.3 Crescimento de GUVs de rodamina na presença de SUVs de NBDPE.....	39
3.2.4 Microscopia óptica .....	39
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
3.3.1 Determinação das condições de análises na microscopia confocal.....	40
3.3.2 Crescimento de GUVs de DOPC e DEPC contendo rodamina na presença de GUVs contendo NBDPE .....	43
3.3.3 Crescimento de GUVs constituídas por fosfatidilcolinas saturadas contendo rodamina na presença de GUVs contendo NBDPE.....	50
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
Capítulo 4. Estudo da resposta de vesículas unilamelares gigantes com diferentes composições lipídicas à ação de campo elétrico externo .....	58
4.1 INTRODUÇÃO.....	59
4.1.1 Exposição de membranas celulares ao campo elétrico.....	59
4.1.2 Membranas lipídicas em um campo elétrico .....	59
4.1.3 Respostas de vesículas devido à aplicação de um campo elétrico externo ....	61
4.1.4 Deformação de membranas sob ação de um campo AC .....	62
4.1.5 Dinâmica de deformação de vesículas na ausência de sal.....	63
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.2.1 Materiais .....	65
4.2.2 Preparação das amostras.....	66
4.2.3 Preparação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) .....	67

4.2.4 Microscopia .....	68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
4.3.1 LUVs e GUVs constituídas de diferentes composições de DOPC e SM .....	69
4.3.2 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DOPC e SM .....	80
4.3.3 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DOPC .....	84
4.3.4 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DMPC .....	88
4.3.5 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DLPC .....	93
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	104
Capítulo 5. Estudo da interação de vesículas unilamelares gigantes com a urease de Jack bean por meio de microscopia óptica de fluorescência .....	106
5.1 INTRODUÇÃO .....	107
5.1.1 Urease de Jack bean .....	107
5.1.2 Peptídeo Jaburetox .....	109
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	111
5.2.1 Materiais .....	111
5.2.2 Preparação das amostras .....	112
5.2.3 Microscopia óptica .....	112
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	113
5.3.1 Na concentração de 0,01 $\mu\text{M}$ de JBU .....	113
5.3.2 Na concentração de 0,1 $\mu\text{M}$ de JBU .....	117
5.3.3 Na concentração de 0,5 $\mu\text{M}$ de JBU .....	118
5.3.4 Análises das GUVs nos regimes de concentração após a variação do tempo .....	122
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	123
Capítulo 6. Conclusões .....	124
Referências .....	127

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estruturas formadas pela auto-associação dos lipídios em solução.....	5
Figura 1.2. Representação esquemática de alguns modos clássicos de deformações da bicamada lipídica.....	6
Figura 1.3. Representação esquemática da mudança de fase em uma bicamada lipídica. Em (a) a fase gel ( $P_{\beta}$ ) e em (b) a fase líquido-cristalina ( $L_{\alpha}$ ).....	8
Figura 1.4. Imagens de microscopia confocal de GUVs de SM e DOPC (1:1) contendo diferentes frações molares de colesterol. O diagrama de fases indica a composição lipídica das vesículas em que a separação de fases ocorrerá à temperatura ambiente (região sombreada). ....	10
Figura 1.5. Diferentes tipos de domínios observados em diferentes misturas de lipídios utilizados para produzir GUVs. ....	11
Figura 1.6. Modelo de uma vesícula sináptica. Modelo molecular da média de vesículas sinápticas, incluindo todos os lipídios e apenas as proteínas de membrana integrais. ....	13
Figura 2.1. Representação esquemática do método de evaporação em fase reversa para a preparação das LUVs.....	16
Figura 2.2. Fotografia digital em (a) da célula condutora com a seringa de injeção da solução de sacarose utilizada para a preparação das GUVs pelo método de eletroformação e em (b) do gerador de tensão, que fornece o campo elétrico, conectado a célula de crescimento.....	18
Figura 2.3. Fotografia digital de duas lamínulas de crescimento de GUVs pelo método gel. ....	19

Figura 2.4. Representação esquemática de uma bicamada lipídica com uma distância de repetição $d$ e um feixe de radiação incidente com comprimento de onda $\lambda$ que forma um ângulo $\theta$ entre os planos ordenados.....	25
Figura 3.1. Representação esquemática de crescimento de vesículas gigantes pelo método de eletroformação.. .....	33
Figura 3.3. Representação esquemática de dois cenários possíveis para o mecanismo de crescimento e fusão de vesículas gigantes durante a eletroformação a partir de um filme lipídico multilamelar.. .....	34
Figura 3.4. Estruturas químicas em (a) da rodamina e em (b) do NBDPE. ....	35
Figura 3.5. Estruturas químicas dos lipídios em (a) 1,2-di-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC); (b) 1,2-di-elaidoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (DEPC); (c) 1,2-dilauroil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (DLPC); (d) 1,2-ditridecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (13 PC); (e) 1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e (f) 1,2-dipentadecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (15 PC).....	36
Figura 3.6. Representação esquemática da célula condutora de crescimento por eletroformação contendo o ITO com o filme lipídico com rodamina seco e a seringa com as GUVs com NBDPE.....	38
Figura 3.7. Representação esquemática da célula de eletroformação contendo o ITO com o filme lipídico contendo rodamina e as GUVs formadas com NBDPE, a 4 °C, mantendo contato com o filme lipídico. ....	38
Figura 3.8. Representação esquemática da célula de eletroformação contendo o ITO com o filme lipídico com rodamina e as SUVs com NBDPE. ....	39
Figura 3.9. Espectro de emissão de fluorescência de SUVs de DOPC contendo rodamina, obtidos com excitação de 488 nm (linha preta) e 543 nm (linha vermelha) .	41

Figura 3.10. Espectro de emissão de fluorescência de SUVs de DOPC contendo rodamina e SUVs de DOPC contendo NDBPE obtidos com excitação de 488 nm.....	42
Figura 3.11. Espectro de emissão de fluorescência de SUVs de DOPC de contendo rodamina e SUVs de DOPC contendo NDBPE obtidos com excitação de 543 nm.....	42
Figura 3.12. Imagens de DIC e microscopia de fluorescência (a) de uma vesícula gigante de DOPC contendo NDBPE, mostrando que o NBDPE emite fluorescência nos comprimentos de onda de 515 e 585 nm quando excitado a 488 nm e (b) de uma vesícula gigante de DOPC contendo rodamina. ....	43
Figura 3.13. Imagens típicas de GUVs com rodamina crescidas na presença de uma segunda geração de GUVs com NBDPE.....	45
Figura 3.14. Imagens de microscopia confocal de GUVs contendo ambos os fluoróforos (NBDPE e rodamina). As imagens superiores são de GUVs constituídas de DOPC e as imagens inferiores são de GUVs constituídas de DEPC. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta.....	45
Figura 3.15. Intensidade de fluorescência em função do tamanho de GUVs constituídas de DOPC e NBDPE.....	48
Figura 3.16. Intensidade de fluorescência em função do tamanho de GUVs constituídas de DOPC e rodamina.....	48
Figura 3.17. Imagens de microscopia confocal de vesículas gigantes constituídas de rodamina crescidas na presença de SUVs contendo NBDPE. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta.....	49
Figura 3.18. Imagens típicas de GUVs de DMPC com rodamina crescidas na presença de uma segunda geração de GUVs de DMPC com NBDPE em (a) imagens confocal	

com exc. 488 / em. 515 nm, (b) imagens confocal com exc. 543/em. 585 nm, e (c) de imagem composta. .... 51

Figura 3.19. Imagens de microscopia confocal de vesículas gigantes constituídas de rodamina crescidas na presença de SUVs contendo NBDPE. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta. .... 52

Figura 3.20. Imagens de microscopia confocal de vesículas gigantes constituídas de DMPC contendo NBDPE crescidas na presença de SUVs de DMPC contendo rodamina. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta. .... 53

Figura 3.21. Representação esquemática do crescimento de GUVs na presença de SUVs, em que algumas vesículas conseguem se formar com SUVs encapsuladas e outras não. .... 55

Figura 4.1. Duas vesículas gigantes (microscopia de contraste de fase), em diferentes condições de condutividade, submetidas a um campo AC de  $0,2 \text{ kV cm}^{-1}$  e diferentes frequências como indicado. .... 63

Figura 4.2. Resposta de vesícula gigante, inicialmente esférica, ao pulso de campo elétrico  $E = 1 \text{ kV cm}^{-1}$ , tempo =  $250 \mu\text{s}$  ..... 64

Figura 4.3. Estrutura química da esfingomielina (SM). .... 65

Figura 4.4. Fotografia digital da célula para a aplicação de campo elétrico durante as análises de microscopia óptica e de fluorescência. .... 66

Figura 4.5. Fotografia digital da fonte de tensão para a aplicação de campo elétrico, a qual é conectada na célula da figura 5.3. .... 67

Figura 4.6. Relação linear de $\Gamma$ vs. $q^2$ .....	71
Figura 4.7. Curvas de SAXS das LUVs constituídas por diferentes composições dos lipídios DOPC e SM. ....	73
Figura 4.8. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de DOPC e 0,5% de NBDPE .....	74
Figura 4.9. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de SM (S100) e 0,5% de NBDPE .....	75
Figura 4.10. (a) Imagem de microscopia confocal (3D) de GUVs constituídas de SM e 0,5% de NBDPE. (b) Representação esquemática da célula de crescimento de GUVs de esfingomiéline a partir de um filme lipídico multilamelar pelo método de eletroformação. ....	75
Figura 4.11. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de 75% de DOPC e 25% de SM, contendo 0,5% de NBDPE. A seta indica a presença de domínios. ....	76
Figura 4.12. Imagem de microscopia confocal (3D) de uma GUV constituída de 75% de DOPC e 25% de SM, contendo 0,5% de NBDPE. A seta indica a presença de um domínio.....	76
Figura 4.13. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de 50% de DOPC e 50% de SM contendo 0,5% de NBDPE. ....	77
Figura 4.14. Imagem de microscopia confocal de uma GUV constituída de 50% de DOPC e 50% de SM contendo 0,5% de NBDPE. As setas indicam a presença de domínios. ....	77

Figura 4.15. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM contendo 0,5% de NBDPE. Nas imagens superiores: GUV que apresenta separação de fases. Nas imagens inferiores: GUV que não apresenta separação de fases.....	78
Figura 4.16. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM contendo 0,5% de NBDPE que não apresentam domínios ao lado de uma GUV que apresenta domínios. ....	79
Figura 4.17. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM contendo 0,5% de NBDPE crescidas em estufa a 50 °C.	80
Figura 4.18. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de vesículas gigantes constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM, contendo 0,5% de rodamina-DOPE, sob aplicação de 2 V e 60 Hz por 3 horas. ....	83
Figura 4.19. Imagens de microscopia de fluorescência de vesículas gigantes de DOPC constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM, contendo 0,5% de rodamina, após a aplicação de 2 V e 60 Hz por 3 horas. ....	84
Figura 4.20. Estrutura da bicamada contendo 128 moléculas do lipídio DOPC por simulação de dinâmica molecular.....	85
Figura 4.21. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de GUVs de DOPC, contendo 0,5% de rodamina, sob aplicação de campo elétrico (AC) com 2 V e 60 Hz. ....	87
Figura 4.22. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DMPC e 0,5% de rodamina, sob aplicação de campo elétrico. Em (a) 8 V e em (b) 18 V.....	89

- Figura 4.23. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DMPC e 0,5% de rodamina, após a adição de 2 gotas de solução de glicose 1 M. Em (a) na ausência de campo elétrico, em (b) com aplicação de 2V, em (c) com aplicação de 3V, em (d) com aplicação de 4 V, em (e) com aplicação de 5 V e em (f) com aplicação de 8V. A frequência foi mantida 60 Hz..... 91
- Figura 4.24. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs (na fase gel) contendo DMPC e 0,5% de rodamina. Em (a) na ausência da solução concentrada de glicose e de campo elétrico; em (b) na presença de 3 gotas de solução concentrada de glicose 1 M e na ausência de campo elétrico; em (c) na presença de uma tensão de 5 V e 60 Hz e em (d) na presença de uma tensão de 15 V e 60 Hz..... 92
- Figura 4.25. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e 0,5% de rodamina. Em (a) na ausência de campo elétrico e em (b) com aplicação de 4 V e 60 Hz. .... 93
- Figura 4.26. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e rodamina. Em (a) na presença de 18 V e 60 Hz; (b) na presença de 2 V e 60 Hz; (c) na presença e 18 V e 60 Hz e em (d) na presença de 2 V e 60 Hz. .... 95
- Figura 4.27. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e 0,5 % de rodamina. Em (a) logo após a adição de 3 gotas da solução concentrada de glicose e em (b) o retorno natural do fio a vesícula. .... 95
- Figura 4.28. Imagens de microscopia de óptica fluorescência de GUVs contendo DLPC e 0,5 % de rodamina após sucessivas adições de glicose 1 M..... 96
- Figura 4.29. Figura esquemática em (a) GUV constituída de DLPC após a adição de duas gotas de glicose (1 M) e formação de excessos de membrana e filamento externo decorrentes da diferença de concentração do interior e exterior das vesículas. Em (b) adição de mais 3 gotas de glicose concentrada e formação de excessos de membrana e vesículas menores. .... 97

Figura 4.30. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e rodamina. Em (a) na ausência de campo elétrico e após a adição de solução concentrada de glicose, em (b) com uma tensão de 15 V e 60 Hz e em (c) e (d) com uma tensão de 2 V e 60 Hz. ....	98
Figura 4.31. Comprimento total de filamentos em função do tempo total de retração para 20 GUVs de DLPC na condição experimental de 20 Hz e 10 V.....	99
Figura 4.32. Comprimento do filamento em função do tempo de retração para uma GUV de DLPC para a condição de 20 Hz e 10 V .....	100
Figura 4.33. Comprimento do filamento em função do tempo de retração para uma GUV de DLPC para a condição de 20 Hz e 10 V .....	101
Figura 4.34. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV de DLPC em (a) na ausência de campo elétrico e em (b) para a condição de 20 Hz e 10 V, após a retração do filamento. ....	102
Figura 4.35. Comprimento total de filamentos em função do tempo total de retração para GUVs de DLPC na condição de 40 Hz e 10 V.....	103
Figura 4.36. Comprimento de um filamentos em função do tempo de retração para uma vesícula gigante de DLPC na condição de 40 Hz e 10 V.....	104
Figura 5.1. Estrutura (hexâmero) da urease jack bean ( <i>Canavalia ensiformis</i> ). ....	107
Figura 5.2. Modelo estrutural do Jaburetox-2Ec (a); estrutura das neurotoxinas de escorpião, neurotoxina $\alpha$ -like BMK M1(b); $\beta$ -neurotoxina (c); BMKK 4 (d); domínios $\beta$ -grampo para o Jabutox-2Ec (e); peptídeos envolvidos na formação de poros: protegrina-1 (f), tequiplesina-1 (g) e polifemisina PV5 (h).....	110

Figura 5.3. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de uma vesícula gigante, contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,01 $\mu\text{M}$ de JBU. As setas indicam a presença de filamentos.....	114
Figura 5.4. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de uma GUV, contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,01 $\mu\text{M}$ de JBU. As setas pretas indicam a presença de filamentos.....	114
Figura 5.5. Progressão de imagens de microscopia de fluorescência de uma GUV contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,01 $\mu\text{M}$ de JBU. As setas indicam a presença de um domínio. Para a visualização de domínios o foco deve ser deslocado para o topo ou para base da vesícula, por isso as imagens (c) e (d) não estão no mesmo plano focal que as imagens (a) e (b), mesmo se tratando da mesma vesícula.....	115
Figura 5.6. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de uma GUV contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,1 $\mu\text{M}$ de JBU.....	118
Figura 5.7. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de GUVs, contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,5 $\mu\text{M}$ de JBU.....	119
Figura 5.8. Sequência de imagens de microscopia DIC de GUVs na presença de NaCl 0,5 M e 0,5 $\mu\text{M}$ de JBU. ....	120

## LISTA DE TABELAS

Tabela I. Valores para $\rho$ calculados teoricamente para partículas com topologias típicas. .....	23
Tabela II. Quantidade de fluorescência por unidade de área de membrana, em unidades arbitrárias, medida pela análise de GUVs contendo 0,5% de NBDPE, ou 0,5% de rodamina, ou uma mistura de 1:1 dos dois (0,25% mol/mol de cada fluoróforo). .....	47
Tabela III. Comprimento da cadeia de carbono e número de insaturações, temperatura de transição de fase, temperatura de crescimento das GUVs, ocorrência de fusão e ocorrência de encapsulamento nas GUVs estudadas.....	54
Tabela IV. Porcentagens molares dos lipídios DOPC e SM utilizadas para a preparação das amostras de LUVs.....	67
Tabela V. Raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), raio de giro ( $R_g$ ), parâmetro sensitivo ( $\rho$ ), dimensão fractal ( $d_f$ ) e potencial zeta (PZ) para as amostras de LUVs com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM. ....	69
Tabela VI. Valores de $D_T$ para as amostras de LUVs com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM.....	72

## PRINCIPAIS SÍMBOLOS UTILIZADOS

13PC: 1,2-ditridecanoil-*sn*-glicero-3- fosfatidilcolina

15 PC: 1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

CHOL: colesterol

$d$ : distância de repetição lamelar

DEPC:1,2-dielaidoil-*sn*-glicero-3- fosfatidilcolina

$d_f$ : dimensão fractal

DIC: microscopia de contraste diferencial de interferência

DLPC: 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3- fosfatidilcolina

DLS: espalhamento de luz dinâmico

DMPC: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3- fosfatidilcolina

DOPC: 1,2-diolieoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

GUVs: vesículas unilamelares gigantes

ITO: óxido de índio e titânio

JBU: urease de Jack bean

$L_\beta$ : fase gel

$L_\alpha$ : fase líquido-cristalina

$L_d$ : fase líquido desordenada

$L_o$ : fase líquido ordenada

LS: espalhamento de luz

LUVs: vesículas unilamelares grandes

MLVs: vesículas multilamelares

NBDPE: lipídio fluorescente verde - 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PI: fosfatidilinositol

PS: fosfatidilserina

PZ: Potencial Zeta

$R_g$ : raio de giro

$R_h$ : raio hidrodinâmico

SAXS: espalhamento de raios-x a baixo ângulo

SM: esfingomielina

SUVs: vesículas unilamelares pequenas

$T_f$ : temperatura de transição de fase

$\rho$ : parâmetro sensitivo

## RESUMO

A presente tese trata do estudo de vesículas lipídicas utilizando-se principalmente as técnicas de microscopia óptica de fluorescência e confocal. Vesículas unilamelares gigantes (GUVs) são modelos de membranas biológicas de suma importância na pesquisa científica por apresentarem tamanhos similares aos de células biológicas, permitindo a direta visualização das delas por meio de microscopia óptica e, assim, contribuindo para estudos de propriedades de membranas e mecanismo de interação com moléculas biológicas de interesse.

O primeiro estudo desta tese refere-se ao mecanismo de fusão de GUVs, durante o crescimento pelo método de eletroformação, foi investigado através da técnica de microscopia óptica e confocal. Observações mostraram que as vesículas pequenas crescem em tamanho por meio de fusão com outras vesículas, aumentando de tamanho para formar as GUVs. Os resultados obtidos indicaram que a fusão ocorre entre vesículas que estão no mesmo substrato lipídico, não ocorrendo com vesículas já formadas em solução.

Em seguida, verificou-se a resposta de GUVs constituídas por diferentes composições lipídicas em relação ao campo elétrico externo aplicado (AC), por meio de microscopia óptica de fluorescência. Os resultados obtidos sugerem que o campo elétrico (2 V e 60 Hz, por 2h) modifique alguns domínios em GUVs compostas de 25% de DOPC e 75% de SM. Além disso, observações de microscopia indicaram que GUVs constituídas de DOPC, DMPC e DLPC respondem de diferentes formas ao campo elétrico aplicado, bem como à diferença de pressão osmótica externa e interna das vesículas. As GUVs de DLPC apresentaram a maior deformação de membrana quando aplicada uma variação de tensão de 1 a 20 V. Em resposta a um meio externo mais concentrado em glicose formaram-se longos filamentos externos às GUVs que podem ser retraídos com a aplicação de um campo elétrico de 10 V e 20 Hz.

Por fim, investigou-se a interação de GUVs compostas por lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas com a urease de Jack bean (JBU), utilizando-se microscopia óptica de fluorescência. Os resultados obtidos sugerem que o efeito da JBU na membrana seja dependente da concentração, sendo capaz de se inserir na membrana das GUVs nas concentrações de 0,01 e 0,1  $\mu$ M.

## ABSTRACT

Herein, we report the study of lipid vesicles using fluorescence and confocal microscopy. Giant unilamellar vesicles (GUVs) are models of biological membranes, which are important in scientific research due to their similar size with biological cell, allowing direct visualization in optical microscopy. Thus, the use of GUVs contributes to studies of the properties of membranes and mechanism of interaction with biological molecules of interest.

Firstly, the mechanism of GUVs fusion during growth by electroformation method was investigated by confocal microscopy. Observations have shown that small vesicles grow in size by fusing with neighboring vesicles, increasing in size to form GUVs. The results indicated that fusion between vesicles that are in the same lipid substrate is by far the predominant mechanism at play during giant vesicle electroformation.

Further, we studied the response of GUVs composed of different lipid in relation to the external applied electric field (AC), by optical fluorescence microscopy. The results suggest that the electric field (2 V and 60 Hz, 2h) modify some domains in GUVs composed of 25% DOPC and 75% SM. In addition, microscopic observations indicated that GUVs of DOPC, DMPC, and DLPC respond differently to electric field applied and the difference in osmotic pressure outside and inside of the vesicles. The GUVs of DLPC showed the highest deformation of the membrane when applied to a range of 1 to 20 V. In response to an external environment more concentrated glucose were formed long filaments outside the GUVs that can be retracted by applying an electric field of 10 V and 20 Hz.

Finally, we investigated the interaction of GUVs mainly composed of lipids found in human platelets with Jack Bean urease (JBU), using optical fluorescence microscopy. The results suggest that the effect of JBU on the membrane is concentration dependent, being able to insert itself in the membrane of GUVs at concentrations of 0.01 and 0.1  $\mu\text{M}$ .

## ORGANIZAÇÃO DA TESE

Com o intuito de facilitar a compreensão desta tese, dividiu-se em 6 capítulos, conforme descrito abaixo.

**Capítulo 1:** Este primeiro capítulo destina-se a uma breve introdução sobre as vesículas lipídicas. Serão também detalhados os objetivos desta tese de doutorado.

**Capítulo 2:** Este capítulo é destinado à descrição dos fundamentos teóricos das técnicas utilizadas, e da metodologia de preparo das vesículas lipídicas estudadas ao longo dos capítulos desta tese.

**Capítulo 3:** destina-se aos resultados obtidos do estudo de mecanismo de fusão de GUVs durante o crescimento pelo método de eletroformação. Sabe-se que durante o crescimento por eletroformação, a fusão de vesículas pequenas deve ocorrer para a formação de vesículas maiores, sendo que esta fusão pode ocorrer por meio de dois cenários. O primeiro cenário refere-se à fusão de vesículas a partir do mesmo substrato lipídico e o segundo, à fusão de vesículas já formadas em solução. Assim, investigou-se qual dos cenários é mais favorável para que ocorra a fusão das vesículas, utilizando-se a técnica de microscopia confocal. Este estudo foi realizado na França, em Strasbourg, no Instituto Charles Sadron.

**Capítulo 4:** Este capítulo descreve os resultados obtidos da resposta de GUVs, constituídas por diferentes composições lipídicas, em relação ao campo elétrico externo aplicado (AC) por meio de microscopia óptica de fluorescência. Estudou-se, primeiramente, os domínios formados em GUVs e LUVs com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM. O campo elétrico foi então aplicado para avaliar a influência nos domínios de GUVs compostas com 25% de DOPC e 75% de SM. Além disso, estudou-se o comportamento de GUVs de DOPC, DMPC e DLPC expostas a diferentes

pressões osmóticas e a resposta das mesmas ao campo elétrico aplicado (AC). O estudo com as LUVs foi realizado no Brasil, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O estudo envolvendo as GUVs foi desenvolvido na França, em Strasbourg, no Instituto Charles Sadron.

**Capítulo 5:** aborda-se o estudo da interação da urease de Jack bean com GUVs compostas por lipídios que são majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas. Para tanto, utilizou-se a técnica de microscopia óptica e de fluorescência para a direta visualização do efeito da urease na membrana das vesículas. Este estudo também foi realizado na França, em Strasbourg, no Instituto Charles Sadron.

**Capítulo 6:** Este é o último capítulo da tese e sumariza os resultados obtidos.

# **Capítulo 1**

## **Introdução**

## 1.1 INTRODUÇÃO

O termo vesícula é designado a um tipo particular de compartimento formado *in vitro* e em solução aquosa. O interior dessas vesículas é formado por um pequeno volume de água e a membrana é formada por uma, ou mais, camadas compostas por moléculas anfifílicas. As moléculas anfifílicas, na membrana das vesículas, estão ordenadas de tal maneira que as partes hidrofílicas estão em contato com meio aquoso e as partes hidrofóbicas estão associadas para formar o interior de cada camada.<sup>1</sup>

Vesículas, nas quais a membrana é formada por lipídios que estão presentes em membranas biológicas, são chamadas de vesículas lipídicas ou mais frequentemente de lipossomas, e têm sido muito aplicadas como modelos de membranas biológicas. A toxicidade das vesículas lipídicas é menor para o organismo humano quando comparada a outras matrizes. Isto torna os lipossomas interessantes como sistemas de liberação controlada de fármacos.<sup>2</sup> Além disso, a composição da bicamada lipídica pode variar muito, dependendo dos lipídios que a constitui, permitindo modificações de suas características físico-químicas.<sup>3</sup>

Existe uma grande variedade de vesículas com diferentes composições lipídicas e tamanhos.<sup>4</sup> Os lipossomas são, usualmente, classificados em: (a) vesículas unilamelares pequenas (SUVs), apresentando uma única bicamada lipídica com diâmetros variando entre 20 e 100 nm; (b) vesículas unilamelares grandes (LUVs), que são formadas por uma única bicamada lipídica e tamanhos intermediários (100 nm e 1  $\mu$ m); (c) vesículas multilamelares (MLVs), apresentando várias bicamadas lipídicas dispostas de forma concêntrica e diâmetros entre 300 nm a alguns micrômetros e (d) vesículas unilamelares gigantes (GUVs), que são formadas por uma bicamada lipídica com diâmetros superiores a 1  $\mu$ m.<sup>5</sup>

As GUVs têm sido muito estudadas por representarem objetos facilmente observáveis em microscópio óptico e por serem modelos de membranas biológicas com tamanhos similares aos de células biológicas (5 - 50  $\mu$ m), contribuindo, assim, para estudos de propriedades de membranas e mecanismo de interação com moléculas biológicas de interesse.<sup>6</sup>

Devido à grande importância científica das GUVs, a presente tese trata do estudo de membranas em GUVs, utilizando as técnicas de microscopia óptica de fluorescência de confocal, em que se investigou o mecanismo de fusão de GUVs durante o crescimento de vesículas pequenas em maiores, por meio do método de eletroformação,

bem como a resposta de GUVs compostas por diferentes lipídios quanto à aplicação de campo elétrico externo. Além disso, investigou-se a interação da urease de Jack bean com GUVs constituídas por lipídios majoritariamente encontrados em plaquetas humanas.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Vesículas lipídicas

Apesar da grande variedade da composição lipídica de membranas biológicas, as principais classes lipídicas encontradas são os fosfolipídios e o colesterol (CHOL). Por exemplo, os principais lipídios encontrados nas membranas plasmáticas do sangue humano são o CHOL (0,5 mol%) e os fosfolipídios (0,5 mol%), sendo que 12% são esfingomielinas.<sup>7</sup>

Dentre os fosfolipídios, a fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidiletanolamina (PE) constituem os fosfolipídios mais comuns em membranas biológicas. Os fosfolipídios, também chamados de glicerofosfolipídios, são lipídios derivados do fosfato de glicerol, compostos por um fosfato (na cabeça polar hidrofílica) e geralmente duas cadeias laterais hidrofóbicas. Nas biomembranas, os glicerofosfolipídios são todos derivados do estereoisômero L, denominado *sn*-glicero-3-fosfato. A glicerina proporciona um átomo de oxigênio para a ligação da cabeça polar por meio de um grupo fosfato com carga negativa. Os dois outros átomos de oxigênio da glicerina se ligam a uma cadeia alquílica cada. Todos os oxigênios podem fazer ligação de hidrogênio.<sup>8</sup>

A PC possui um grupo colina e um grupo fosfato em seu grupo-cabeça polar ligado por meio de ligações ésteres com o glicerol. A PE e a fosfatidilserina (PS) são aminofosfolipídios, contendo uma amina primária no grupo-cabeça polar. Outros glicerofosfolipídios comuns em biomembranas são o fosfatidilinositol (PI) e o fosfatidilglicerol.<sup>9</sup> Esses lipídios, normalmente, contêm uma cadeia alquil esterificada saturada na posição *sn*-1 do glicerol. Os esfingolipídios são também indispensáveis para as células eucarióticas como, por exemplo, a esfingomielina (SM). SMs são esfingofosfolipídios que diferem dos glicerofosfolipídios no grupo hidrofóbico, que é

uma ceramida. A ceramida pode ser vista como o resultado da condensação de um ácido graxo com uma amina de cadeia longa alifática hidroxilada.<sup>10,11</sup> As SMs apresentam uma área molecular menor em comparação com fosfatidilcolinas.<sup>8</sup>

O colesterol é um lipídio (esterol) que difere de outras classes de lipídios, pois contém 4 anéis rígidos que se ligam a uma hidroxila (cabeça polar) e a uma cadeia carbônica curta (cauda apolar).<sup>12</sup> Na membrana celular o colesterol está orientado com seu grupo hidroxila polar junto à fase aquosa e o anel esteróide hidrofóbico está orientado paralelamente às cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios e esfingolipídios.<sup>13</sup> O CHOL incorporado em membranas regula a fluidez das cadeias hidrocarbonadas em diversas faixas de temperatura.<sup>14,15</sup>

Nas membranas naturais, as PCs são os principais componentes insaturados. As PEs existem com um teor bastante elevado de cadeias poli-insaturadas e com cadeias longas. As PCs e PEs são zwitteriônicas em pHs fisiológicos. Já os fosfolipídios como a PS e o PI são aniônicos nas mesmas condições e são os responsáveis pela carga negativa superficial das células de mamíferos.<sup>9</sup> Sob condições fisiológicas normais, a PS é encontrada apenas na camada interna da membrana plasmática.<sup>11</sup> A SM ocorre com um conteúdo mais elevado de cadeias longas com uma ou nenhuma insaturação e é zwitteriônica em pHs fisiológicos. Lipídios carregados positivamente não são, em geral, encontrados na natureza, mas podem ser sintetizados e desempenham um papel importante em aplicações biotecnológicas, como a transferência de genes mediada por lipídios.<sup>16</sup>

Para formar as membranas, os lipídios se auto-organizam em fases lamelares como pode ser visualizado na figura 1.1. A auto-associação dos lipídios é devida a interação hidrofóbica das cadeias apolares dos lipídios e a repulsão dos grupos-cabeça polar carregados e hidrofílicos. Enquanto que o primeiro tende a diminuir a área por lipídio, o segundo se opõe a esta força e tende a aumentar a área. As duas forças juntas determinam a solubilidade dos fosfolipídios em água.<sup>17</sup> A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração, a qual abaixo dela os fosfolipídios existem na forma de monômeros e acima da CMC usualmente formam fases lamelares. A maioria dos fosfolipídios encontrados nas membranas celulares apresentam duas cadeias apolares e uma solubilidade em água com uma CMC de  $10^{-7}$  a  $10^{-10}$  M.<sup>17</sup>

As vesículas formadas da auto-associação de lipídios, são geralmente consideradas, em estado de equilíbrio termodinâmico devido a energia de curvatura que fica confinada nas vesículas quando são produzidas. A energia livre de curvatura, também conhecida como energia de flexão ou energia elástica de curvatura das vesículas, é determinada pela rigidez de flexão e curvatura da membrana, sendo responsável pela grande variedade de formas que as vesículas podem adotar.<sup>18</sup>

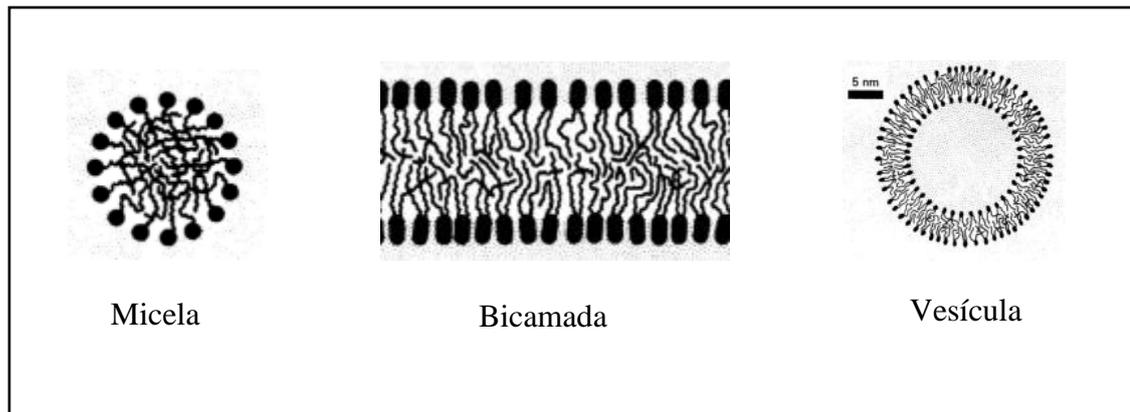


Figura 1.1. Estruturas formadas pela auto-associação dos lipídios em solução.<sup>16</sup>

A partir de observações em GUVs e suas respostas a diferentes perturbações pode-se, em princípio, deduzir as propriedades mecânicas e reológicas das membranas. Considerando a bicamada lipídica como um filme, mecanicamente esse filme pode ser curvado, comprimido, dilatado ou cisalhado.<sup>3</sup> No estado de equilíbrio, e dentro do limite linear, as respostas das membranas a várias restrições são caracterizados pelas seguintes constantes: rigidez de flexão ( $\kappa$ ), módulo de curvatura gaussiana ( $\kappa_G$ ), área de módulo de compressibilidade ( $K_a$ ) e o módulo de elasticidade de cisalhamento ( $\mu$ ) (figura 1.2).<sup>3</sup>

Na temperatura fisiológica, a maioria das membranas lipídicas encontra-se na fase líquido-cristalina e, portanto, apresentam  $\mu = 0$ . Abaixo da temperatura de transição de fase dos lipídios, na chamada fase gel, as membranas adquirem um  $\mu \neq 0$ , pois o movimento relativo das inclusões de membrana é impedido. A fluidez da membrana, em temperaturas mais elevadas, é essencial no caso de membranas celulares, uma vez que permite o deslocamento de macromoléculas ancoradas ou inclusões na membrana como, por exemplo, proteínas transmembranas.<sup>3</sup>

A resistência ao cisalhamento é caracterizada pela viscosidade de cisalhamento,  $\eta_s$ . De forma equivalente, pode-se definir  $\eta_D$  como a viscosidade relacionada à dilatação e a compressão da membrana. Entretanto, para uma descrição completa e realista da dinâmica da membrana é preciso considerar a existência das partes que constituem a membrana: duas monocamadas que podem deslizar uma em relação a outra. Para que ocorra esse movimento, a membrana se opõe com uma força de fricção, o qual é proporcional ao coeficiente de fricção entre as monocamadas,  $b$ . Geralmente, todos os parâmetros listados acima são definidos na frequência zero e limites infinitos de tamanho, ou seja, são supostos constantes no tempo e homogêneos no espaço da escala dos detalhes estruturais do sistema.<sup>3,19</sup>

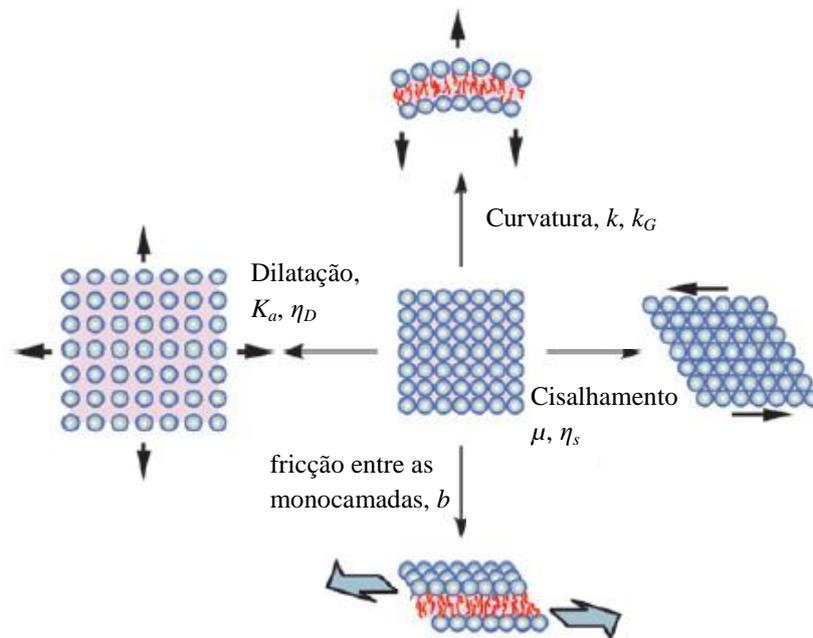


Figura 1.2. Representação esquemática de alguns modos clássicos de deformações da bicamada lipídica: dilatação ( $K_a$ ,  $\eta_D$ ), Curvatura ( $k$ ,  $k_G$ ), cisalhamento ( $\mu$ ,  $\eta_s$ ) e fricção entre as monocamadas ( $b$ ).<sup>3</sup>

Além do deslizamento entre as camadas, a natureza das membranas em bicamadas também é refletida pela curvatura espontânea. No caso em que há assimetria entre os componentes presentes nas duas monocamadas constituintes da bicamada lipídica, existe uma direção preferencial em que a membrana poderá se curvar. Essa assimetria pode ser relacionada com diferentes números ou geometria das moléculas constituintes de cada monocamada. Quando a membrana é curvada o resultado é a liberação da pressão na área do grupo-cabeça polar dos lipídios. Isso leva a uma grande

variedade de formas experimentalmente observáveis, dependendo da preparação das vesículas, como formas alongadas ou achadas nos pólos, bem como vesículas com formas mais complexas.<sup>21-25</sup> O *flip-flop* (movimento em que os lipídios passam de uma monocamada a outra) das moléculas na membrana também leva ao mesmo efeito, entretanto, o tempo do *flip-flop* lipídico é, normalmente, muito lento.<sup>20</sup>

### 1.2.2 Fases lipídicas

As fases lipídicas são caracterizadas por diferentes ordenamentos dos lipídios e diversas mobilidades individuais dessas moléculas. As fases lipídicas dependem da temperatura de transição de fase dos lipídios ( $T_f$ ), que por sua vez, depende principalmente do: i) tipo de grupo existente na cabeça polar dos lipídios; ii) comprimento das cadeias de carbonos e iii) grau de saturação.<sup>3</sup> Lipídios com longas cadeias carbônicas e saturadas apresentam temperaturas de transição de fase relativamente altas. Conforme se aumenta a temperatura do meio e a  $T_f$  do lipídio é ultrapassada, as propriedades de membrana mudam significativamente, como por exemplo, a rigidez de curvatura e a viscosidade da superfície de cisalhamento diminuem.<sup>3</sup>

Considerando as bicamadas lipídicas formadas por lipídios puros de cadeias saturadas contendo de 15 a 22 átomos de carbono submetidos ao aumento de temperatura, pode-se detectar pelo menos, as seguintes transições de fases: subtransição (transição da fase  $L_c$  para  $L_\beta$  e  $L_\beta'$ ), pré-transição (transição da fase  $L_\beta'$  para  $P_\beta'$ ) e a transição de fase principal representada na figura 1.3 (transição da fase  $P_\beta'$  para  $L_\alpha$ ).<sup>26</sup>

A fase subgel ( $L_c$ ) representa o estado, no qual as moléculas lipídicas estão organizadas de acordo com suas características. A fase gel ( $L_\beta$ ) representa o estado em que as cadeias hidrocarbonadas estão na forma mais alongada e aumentando a distância de repetição lamelar. A fase  $L_\beta'$  diferencia-se da  $L_\beta$  na inclinação das cadeias lipídicas na bicamada. Na fase gel ondulado  $P_\beta'$  as cadeias hidrocarbonadas começam um processo de desordenamento molecular dentro da bicamada, provocando ondulações na membrana como um todo. Já na fase líquido-cristalino ( $L_\alpha$ ) as cadeias hidrocarbonadas estão altamente desordenadas. Comparada com a fase  $L_\beta$ , a fase  $L_\alpha$  é caracterizada por

apresentar uma rápida difusão lateral, uma alta mobilidade das cadeias e um pequeno comprimento de correlação lateral.<sup>4,16,26</sup>

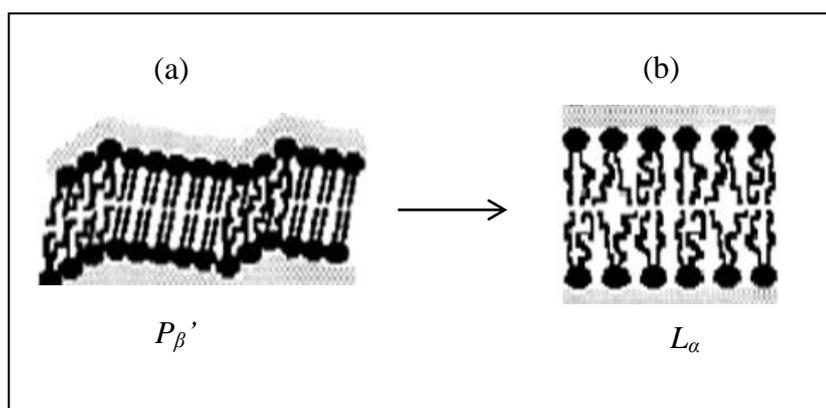


Figura 1.3. Representação esquemática da mudança de fase em uma bicamada lipídica. Em (a) a fase gel ( $P_{\beta'}$ ) e em (b) a fase líquido-cristalina ( $L_{\alpha}$ ).<sup>26</sup>

O desordenamento das cadeias pode ser induzido com altas temperaturas e os lipídios podem formar outras fases, como, por exemplo, a fase cúbica ou a fase hexagonal (cristais hexagonais bidimensionais invertidos em água).<sup>27</sup> Lipídios como as PEs são capazes de formar fases hexagonais invertidas. Eles são conhecidos por aumentarem, *in vitro*, a eficiência de fusão de membranas, resultando em um grande uso das PEs em aplicações biotecnológicas.<sup>28</sup>

### 1.2.3 Jangadas lipídicas e separação de fases

A hipótese de ocorrência de separação de fases em membranas biológicas, por meio de conjuntos de agregados de esfingolipídios e colesterol separados de fosfatidilcolinas insaturadas, são as chamadas jangadas lipídicas.<sup>6,29</sup> Esses agregados deslocam-se na bicamada lipídica como uma jangada na água. Em 1997, Simons e Ikonen<sup>30</sup> apresentaram o modelo das jangadas lipídicas, consistindo de microdomínios de membrana enriquecidos por uma fase líquido ordenada ( $L_o$ ), resultado do ordenamento das cadeias hidrocarbonadas saturadas, separadas de uma fase líquido desordenada ( $L_d$ ), composta por fosfolipídios insaturados.<sup>31-33</sup>

As jangadas lipídicas desempenham um papel fundamental no transporte e sinalização celular, proporcionando um meio favorável na membrana para a ligação das proteínas.<sup>30,32</sup> Estudos mostraram que as jangadas estão envolvidas em diversas funções biológicas importantes como, por exemplo, em células neurais, nas quais se propõem que as jangadas sejam críticas para o funcionamento normal do cérebro.<sup>32,34</sup> Outros trabalhos relataram que a ruptura de funções das jangadas tem sido relacionada com doenças como a esclerose múltipla, doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.<sup>34,35</sup>

Entretanto, o estudo das jangadas lipídicas em membranas biológicas é complexo devido ao fato dessas membranas serem compostas por diferentes tipos de moléculas, incluindo proteínas e lipídios. Assim, a formação de separação de fases tem sido muito estudada por meio de GUVs.<sup>29</sup> Haluska e colaboradores<sup>6</sup> realizaram um estudo com GUVs de composição lipídica ternária DOPC/SM/CHOL por de microscopia de fluorescência, para obter informações locais sobre a composição dos domínios (figura 1.4). GUVs preparadas a partir desse sistema ternário são creditados para serem o mais relevante sistema biomimético no entendimento da formação de jangadas lipídicas. A dimensão desses domínios é assumida como sendo na ordem de dezenas a centenas de nanômetros em células vivas, mas pode chegar a micrômetros em vesículas gigantes.<sup>29,36-39</sup>

Os domínios em GUVs podem ser visualizados utilizando-se microscopia óptica de fluorescência e moléculas fluorescentes que se ligam preferencialmente a uma das fases presentes na membrana, obtendo-se, assim, informações locais sobre o meio circundante da molécula fluorescente incorporada nas GUVs.<sup>6,40</sup>

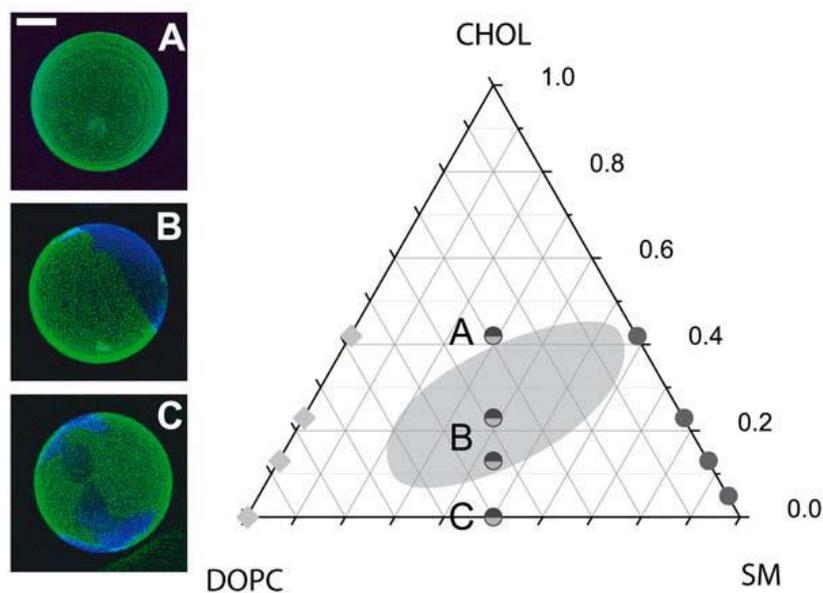


Figura 1.4. Imagens de microscopia confocal de GUVs de SM e DOPC (1:1) contendo diferentes frações molares de colesterol. O diagrama de fases indica a composição lipídica das vesículas em que a separação de fases ocorre à temperatura ambiente (região sombreada).<sup>6</sup>

A separação de fases também pode ser observada em sistemas binários de lipídios quando os componentes da mistura diferem na temperatura de transição de fase principal. Assim, haverá a coexistência na membrana de duas fases, uma fase gel e uma fase líquido-cristalina.<sup>41</sup>

A formação de domínios em GUVs foi observada em sistemas binários de lipídios com diferentes comprimentos de cadeias hidrocarbonadas, saturações e tipos de grupo na cabeça polar dos lipídios. Estudos já foram realizados avaliando-se a ocorrência de domínios em sistemas compostos por DPPC/DLPC e DPPE/DPPC, usando a técnica de microscopia de fluorescência.<sup>42-44</sup> O interessante desse estudo é que as formas dos domínios podem mudar dependendo da composição lipídica e da temperatura usada. A figura 1.5 mostra diferentes formatos dos domínios que podem ser encontrados em diferentes composições de GUVs. Domínios em forma de dentritos

também foram observados em trabalhos com misturas de DLPC/DAPC (1:1 mol/mol) e DMPE/DMPC (7:3 mol/mol), correspondendo a coexistência de diferentes fases lipídicas.<sup>44</sup>

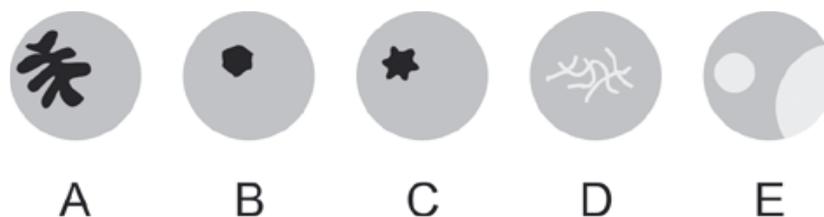


Figura 1.5. Diferentes tipos de domínios observados em diferentes misturas de lipídios utilizados para produzir GUVs. Em forma de (A) dentritos (DPPE/DPPC), (B) e (C) hexagonal (DLPC/DPPC), (D) linear (DLPC/DPPC) e (E) circular (POPC/SM/CHOL).<sup>41</sup>

O surgimento da forma de dentritos foi também demonstrado em GUVs constituídas por um único componente, a dinervonoilfosfatidilcolina (DNPC), na região de temperatura de transição de fase principal.<sup>45</sup>

Além da caracterização de domínios em GUVs com diferentes composições de lipídios, estudos relataram a interação de GUVs com moléculas de interesse. Por exemplo, Fahsel e colaboradores<sup>46</sup> estudaram a interação do polipeptídeo gramicidina D com GUVs de composição DMPC/DSPC (1:1 mol/mol).<sup>46</sup> Neste trabalho, eles verificaram que o tamanho dos domínios aumentava a medida que a temperatura diminuía e que na presença de 2% ou 5% em mol da gramicidina os domínios desapareciam.

Misturas binárias de lipídios tornam possível o estudo das propriedades de moléculas de lipídios individuais na mistura, mas as bicamadas formadas a partir de tais misturas não se assemelham às membranas de células eucarióticas em que o colesterol e esfingomielina desempenham um importante papel.<sup>41</sup> GUVs preparadas a partir de sistemas lipídicos ternários se assemelham mais a membranas biológicas, tais como misturas contendo diferentes fosfolipídios, SM e CHOL. Estudos mostraram a existência de domínios circulares em membranas de GUVs formadas de misturas ternárias de lipídios, como por exemplo, misturas equimolares de DOPC/SM/CHOL e em bicamadas planares formadas de misturas de POPC/SM/CHOL (2:1:1).<sup>47</sup>

Além disso, outros estudos relataram a presença de domínios em GUVs de composição lipídica ternária sem a presença da esfingomiéline, contendo uma mistura de DPPC/DOPC/CHOL, bem como DSPC/DOPC/CHOL.<sup>48,49</sup>

Simulações computacionais também vêm sendo cada vez mais utilizadas para o estudo dos domínios em sistemas lipídicos por meio dos métodos de Monte Carlo, dinâmica molecular e sistema de célula dinâmica (CDS).<sup>50-53</sup>

#### **1.2.4 Modelo de vesícula sináptica**

Em temperaturas fisiológicas a maioria das membranas encontra-se na fase líquido-cristalina, na qual a bicamada lipídica torna-se mais fluida.<sup>3</sup> Abaixo dessa fase, ou seja, abaixo da temperatura de transição de fase principal dos lipídios, na fase gel, o movimento relativo das macromoléculas ancoradas na membrana é prejudicado.<sup>54</sup> Entretanto, a fluidez da membrana é essencial no caso das membranas celulares, pois permite o deslocamento de macromoléculas ancoradas como, por exemplo, as proteínas transmembrana.<sup>55</sup>

Nos anos 70, Singer e Nicolson<sup>56</sup> propuseram o modelo de mosaico fluido da membrana celular, descrevendo a membrana como sendo fluida e homogênea em duas dimensões, contendo algumas proteínas imersas. Entretanto, este modelo foi questionado por observações complementares, tais como: a heterogeneidade lateral dos lipídios da membrana (hipótese das jangadas lipídicas), a quantidade muito elevada de proteínas transmembrana e pelo fato de que muitos lipídios de membrana como os PIs tornaram-se parte ativa na dinâmica da membrana como sinalizadores celulares e não só fazendo parte da matriz lipídica passiva. Haja vista que moléculas lipídicas não desempenham somente um papel estrutural, mas também apresentam um papel ativo na membrana celular.<sup>57</sup>

Contudo, sabe-se que membranas celulares, além de lipídios, são constituídas por proteínas. A superfície carregada da membrana intracelular de células eucarióticas fornece uma interface para a interação com muitas proteínas. Elas são os blocos de construção de canais de membrana ou de sinalização. As proteínas de membrana podem ser distinguidas em integrais ou periféricas. Proteínas integrais são ancoradas ao núcleo

da bicamada lipídica através de interações hidrofóbicas. Proteínas periféricas como, por exemplo, proteínas com aminoácidos carregados positivamente na sua sequência, podem se ligar eletrostaticamente com fosfolipídios de membrana carregados negativamente como o PS ou PI.<sup>57</sup>

Proteínas integrais ocupam mais de 20% em área da membrana plasmática de mamífero.<sup>58,59</sup> Assim, é provável que todas as proteínas transmembranas sejam rodeadas por algumas camadas de lipídios específicas, protegendo a proteína do contato direto com o meio da membrana, diminuindo a quantidade de lipídios de difusão livre. De acordo com uma recente análise quantitativa de GUVs sinápticas,<sup>58</sup> a superfície da membrana é adicionalmente coberta com proteínas ou domínios de proteínas periféricas que são partes das proteínas integrais, levando a quase nenhuma área de membrana sem contato com proteínas, como pode ser visualizado na figura 1.6.<sup>58</sup>

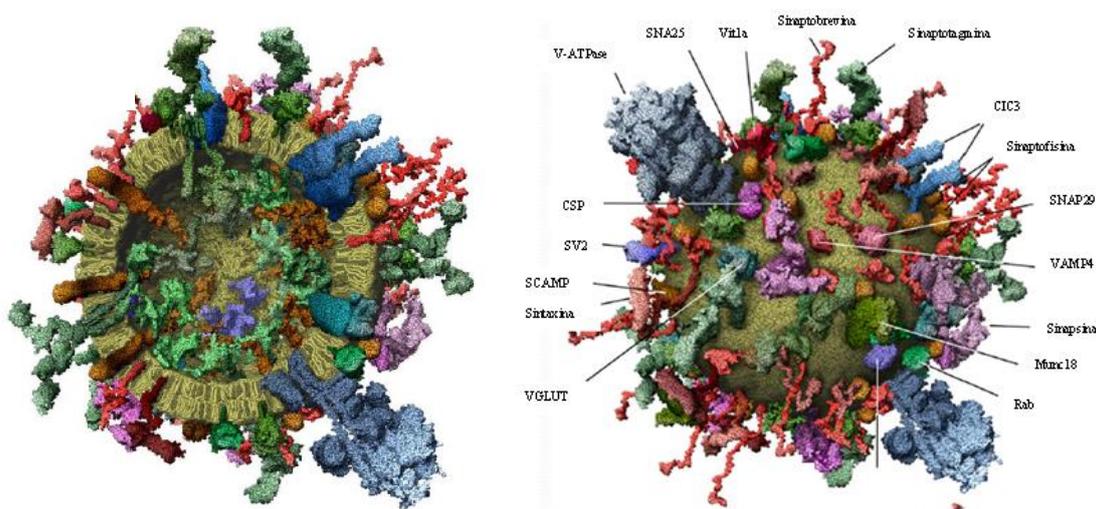


Figura 1.6. Modelo de uma vesícula sináptica. Modelo molecular da média de vesículas sinápticas, incluindo todos os lipídios e apenas as proteínas de membrana integrais.<sup>58</sup>

### 1.3 OBJETIVOS

1. Investigar o mecanismo de fusão de GUVs, durante o crescimento pelo método de eletroformação, utilizando-se diferentes fosfatidilcolinas e fluoróforos, através da técnica de microscopia confocal. Assim, propõem-se contribuir na elucidação do mecanismo de crescimento das GUVs por eletroformação, no qual

a fusão de vesículas pequenas para formar vesículas maiores pode ocorrer por meio da fusão, a partir do mesmo substrato lipídico ou com vesículas já formadas em solução.

2. Estudar a influência da aplicação de campo elétrico externo (AC) e da pressão osmótica em GUVs constituídas por diferentes composições dos lipídios DLPC, DMPC, DOPC e SM, avaliando-se também a influência de domínios formados em GUVs de DOPC e SM sob aplicação de campo elétrico externo.
3. Estudar a interação de GUVs, compostas por lipídios majoritariamente encontrados nas membranas das plaquetas humanas, com a urease de Jack bean, utilizando-se a técnica de microscopia óptica e de fluorescência.

# **Capítulo 2**

## **Metodologia e fundamentos teóricos**

## 2.1 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVs) PELO MÉTODO DE EVAPORAÇÃO EM FASE REVERSA

As vesículas unilamelares grandes foram preparadas pelo método de evaporação em fase reversa<sup>60,61</sup> como está representado na figura 2.1.

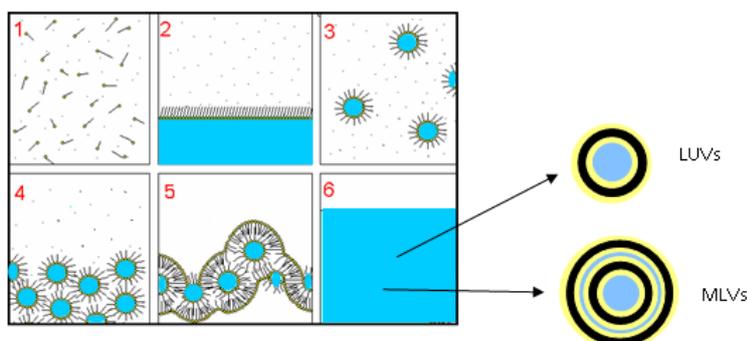


Figura 2.1. Representação esquemática do método de evaporação em fase reversa para a preparação das LUVs.<sup>60</sup>

O método de evaporação em fase reversa consiste de seis etapas (figura 2.1). Na etapa 1, os lipídios foram transferidos para um balão de fundo redondo e dissolvidos em clorofórmio. Após a dissolução, uma porção de água ultra-pura (18,2 M $\Omega$ .cm) foi adicionada (etapa 2); ocorrendo a formação de duas fases: uma aquosa e outra contém o solvente orgânico. A mistura foi então submetida à sonicação por dois minutos (etapa 3) em ultrassom, para a formação das micelas reversas. Na etapa 4, o clorofórmio foi evaporado em um rotaevaporador. Após a sua total eliminação, ocorre a formação de um organogel que se deposita junto à parede do balão (etapa 5). Na etapa 6, foi adicionada água ultra-pura ao balão contendo o organogel sob agitação para a formação das vesículas, originando uma suspensão aquosa das mesmas. A partir desse método, se obtém vesículas unilamelares grandes (LUVs) e vesículas multilamelares (MLVs) em suspensão. Por ser de interesse deste trabalho que se obtenha apenas LUVs, a suspensão de vesículas obtidas na etapa 6 foi submetida a mais uma etapa de 10 minutos em ultracentrifugação (T 25 digital ULTRA-TURRAX® da IKA®) à 16000 rpm.<sup>62</sup>

## **2.2 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS (SUVs) PELO MÉTODO DE EXTRUSÃO**

As vesículas unilamelares pequenas (SUVs) foram preparadas pelo método de extrusão.<sup>63</sup> Para tanto, as moléculas lipídicas e os fluoróforos (NBDPE e rodamina), nas proporções adequadas, foram dissolvidos em clorofórmio e secos sob fluxo de nitrogênio, formando, assim, um filme lipídico. Água MilliQ foi adicionada ao filme e a suspensão formada foi homogeneizada mecanicamente e submetida a extrusão (10x), utilizando-se um extrusor com membrana porosa de 0,1 µm (Avanti Polar Lipids).

## **2.3 PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES (GUVs) PELO MÉTODO DE ELETROFORMAÇÃO**

Para a preparação das GUVs pelo método de eletroformação,<sup>64</sup> primeiramente, os lipídios (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foram dissolvidos em clorofórmio. Para os estudos de microscopia de fluorescência e confocal, 0,5% dos fluoróforos (mol/mol) foram misturados aos lipídios para a preparação das GUVs fluorescentes.

Os lipídios, juntamente com o fluoróforo, foram espalhados em uma das lâminas da célula condutora. A célula condutora de crescimento é formada por duas lâminas de vidro (10 x 3 cm) revestidas em uma das faces com óxido de índio e titânio (ITO), proporcionando uma superfície condutora. As partes condutoras do ITO são sobrepostas, contendo as faces condutoras voltadas para o interior, e separadas por um espaçador de teflon de 2 mm, no qual contém um pequeno orifício, que permite a inserção de uma seringa de injeção (Figura 2.2a). Uma microseringa de 10 µL foi utilizada para espalhar os lipídios e os fluoróforos sobre a superfície condutora de ITO e a mesma foi mantida sob vácuo durante 30 minutos para a completa remoção do solvente. A célula foi, então, preenchida com uma solução de sacarose a 0,2 M (Sigma-Aldrich, 99 %) de pressão osmótica  $0,20 \pm 0,005$  M (medido três vezes a pressão osmótica constante em Osmômetro - Osmomat 030 Gonotec). Um gerador de tensão alternada, conectado nas extremidades de cada lâmina, foi utilizado para a geração do campo elétrico que estimula a formação das GUVs como mostra a Figura 2.2b. A tensão aplicada foi de 1 V e a frequência de 10 Hz durante 3 horas.

A solução resultante de sacarose contendo as GUVs foi, então, transferida para um frasco *Eppendorf*. Para a visualização no microscópio, foi adicionada ao *Eppendorf*, contendo as GUVs, uma solução de glicose a 0,2 M de pressão osmótica  $0,20 \text{ M} \pm 0,005$  (medida três vezes a pressão osmótica constante em Osmômetro). O emprego da glicose deve-se ao fato da diferença de densidade entre a sacarose e a glicose e, assim, as vesículas constituídas por sacarose no núcleo tendem a se depositar no fundo do *Eppendorf*, bem como no fundo da lâmina de microscópio, permitindo uma boa visualização das vesículas. Além disso, há uma diferença no índice de refração entre a glicose e a sacarose que produz uma boa definição óptica.

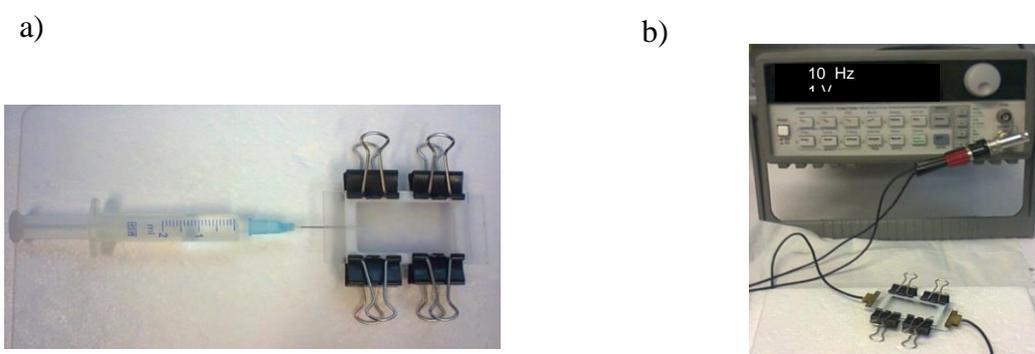


Figura 2.2. Fotografia digital em (a) da célula condutora com a seringa de injeção da solução de sacarose utilizada para a preparação das GUVs pelo método de eletroformação e em (b) do gerador de tensão, que fornece o campo elétrico, conectado a célula de crescimento.

## 2.4 PREPARAÇÃO DAS GUVs PELO MÉTODO GEL

Para formar a célula de crescimento das vesículas no método gel, primeiramente, prepara-se o gel de PVA com sacarose. Para tanto, em um béquer, contendo 20 mL de água Milli-Q, adicionou-se 0,5 g de sacarose (0,2 M) e agitou-se até a dissolução. Após a completa dissolução da sacarose, adicionou-se, sob agitação, 1 g de PVA a 90 °C por aproximadamente 1h. Após a formação do gel, o mesmo foi espalhado em uma lamínula (aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ ) e utilizou-se vitrex para o fechamento da célula. Esta lamínula foi previamente tratada com ozônio para torná-la mais hidrofílica.

A lamínula com o gel depositado foi mantida a 50 °C em estufa por 30 minutos para a formação de um filme. Após, os lipídios foram espalhados sobre o filme e o clorofórmio foi evaporado sob vácuo (30 minutos). Para o crescimento das vesículas gigantes adicionou-se uma solução de sacarose 0,2 M e esperou-se 20 minutos para o crescimento e formação das GUVs. A figura 2.3 mostra uma fotografia digital de duas lamínulas de crescimento de GUVs pelo método gel.<sup>65</sup>

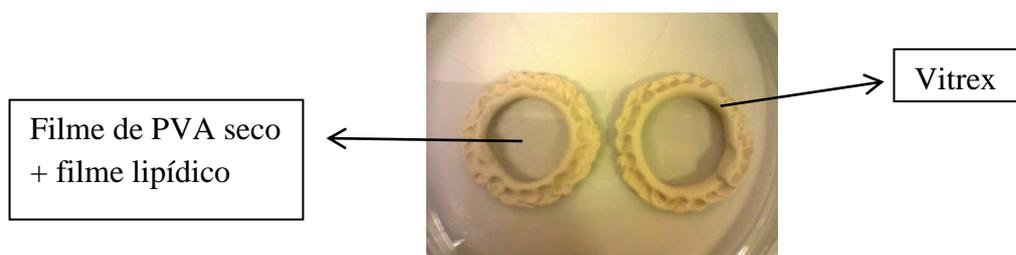


Figura 2.3. Fotografia digital de duas lamínulas de crescimento de GUVs pelo método gel.

## 2.5 ESPALHAMENTO DE LUZ

O princípio da técnica de espalhamento de luz consiste na interação da radiação visível com a matéria. A onda eletromagnética que incide sobre uma partícula pequena, quando comparada ao comprimento de onda da radiação, provoca um processo de polarização dos dipolos moleculares na direção do campo elétrico da onda incidente. Essa polarização oscila com a mesma frequência da radiação incidente, servindo, então, como uma fonte secundária que espalha pequenas quantidades de radiações em todas as direções.<sup>66</sup>

A intensidade da luz espalhada ( $I_s$ ) por uma partícula com dimensões muito menores que  $\lambda_0$  é dada por:

$$I_s = \frac{4\pi^2 M^2 (\sin^2 \phi) (dn/dc)^2 I_0}{N_A^2 \lambda_0 R^2} \quad (2.1)$$

Onde  $M$  é a massa molecular;  $dn/dc$  é o incremento no índice de refração da solução em função da concentração de partículas;  $I_0$  é a intensidade de luz incidente;  $N_A$

é o número de Avogadro;  $\lambda_0$  é o comprimento de onda da luz incidente;  $R$  é a distância entre a amostra e o detector;  $\Phi$  é o ângulo formado entre a direção de propagação da luz espalhada com a luz incidente.

A relação entre a luz espalhada e a dimensão do objeto pode ser acessada por meio do vetor de espalhamento  $q$ . O vetor de espalhamento é, portanto, a diferença vetorial entre o vetor de onda da radiação incidente ( $k_i$ ) e o vetor de onda da radiação espalhada ( $k_e$ ):

$$q = \vec{k}_e - \vec{k}_i \quad (2.2)$$

As magnitudes de  $k_i$  e  $k_e$  são respectivamente  $2\pi n / \lambda_i$  e  $2\pi n / \lambda_e$ , sendo  $n$  o índice de refração do solvente. Como se trata de um espalhamento elástico, ou seja, o comprimento de onda da radiação incidente é igual ou muito próximo ao da radiação espalhada, tem-se:

$$|\vec{k}_e| \cong |\vec{k}_i| \quad (2.3)$$

A magnitude do vetor  $q$  pode ser calculada pela lei dos cossenos:<sup>66</sup>

$$q = 2k_i \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.4)$$

O vetor de espalhamento  $q$  possui uma relação inversa com a dimensão  $L$  do objeto. Quando se tem a condição de  $qL > 1$ , a radiação espalhada contém informações sobre a estrutura interna do objeto em estudo. Nas condições de  $qL < 1$ , a radiação espalhada contém informações sobre a região do espaço maior do objeto em estudo. Já em  $qL \ll 1$ , pode-se obter informações de vários objetos, como macromoléculas e partículas, bem como agregados ou conjunto de partículas. O vetor de onda pode ser modificado pela alteração do ângulo de observação, pelo índice de refração da solução ou pelo comprimento de onda do feixe de luz utilizado. As condições experimentais utilizadas neste trabalho referem-se a condição  $qL < 1$ .<sup>67</sup>

## 2.6 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

No Espalhamento de Luz Dinâmico, são consideradas as pequenas variações de intensidade de luz espalhada, que são resultantes das flutuações do índice de refração na solução. Essas flutuações são resultantes, por sua vez, da difusão translacional das partículas em solução ou suspensão, chamado movimento Browniano. O número de fótons que entra no detector é registrado em um computador e analisado por meio de um correlador digital.<sup>66</sup> O sinal da radiação é, assim, adquirido na forma de uma função de correlação temporal  $g_{(2)}(\tau)$ :

$$g_{(2)}(\tau) = \langle I(t)J(t+\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t)J(t+\tau) dt \quad (2.5)$$

Onde  $I(t)$  e  $J(t)$  são sinais que dependem do tempo;  $2T$  é o período na qual a medida é realizada e  $\tau$  é o tempo de retardo (*delay time*). A função  $g_{(2)}(\tau)$  relaciona-se com a função de correlação do campo elétrico  $g_{(1)}(\tau)$  por meio da relação de Siegert:<sup>68</sup>

$$g_{(2)}(\tau) = 1 + \beta |g_{(1)}(\tau)|^2 \quad (2.6)$$

Onde  $\beta$  é o fator de coerência ótica que depende da ótica de detecção.

Como na maioria dos casos as soluções e dispersões de partículas são polidispersas, a  $g_{(2)}(\tau)$  é definida por uma distribuição de exponenciais, que podem ser representadas como uma integral de Laplace:

$$g_{(2)}(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma \tau} d\Gamma \quad (2.7)$$

A função de distribuição de  $G(\Gamma)$  reflete a distribuição de massa molecular das macromoléculas dispersas em um solvente.<sup>69</sup> O  $\Gamma$  corresponde a uma frequência de relaxação e, a partir dele, pode-se calcular o coeficiente de difusão translacional ( $D_T$ ) da partícula em solução:<sup>68</sup>

$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (2.8)$$

Extrapolando-se  $D_T$  para concentração ( $c$ ) zero (diluição infinita) e para ângulo ( $\theta$ ) igual a zero (onde não há interferência da luz espalhada por uma partícula sobre a luz espalhada por uma segunda partícula) obtém-se o coeficiente de difusão a diluição infinita ( $D_0$ ). O  $D_0$  possui uma relação linear com  $D_T$  a uma dada concentração  $(D_T)_c$ :<sup>66</sup>

$$(D_T)_c = D_0(1 + k_D c) \quad (2.9)$$

Onde  $k_D$  é o coeficiente virial dinâmico relacionado com as interações termodinâmicas entre as partículas e o solvente.

Quando se relaciona a equação (2.9) com a temperatura ( $T$ ) e a viscosidade ( $\eta_0$ ) do solvente torna-se possível o cálculo do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) da partícula através da relação de Stokes-Einstein, e conseqüentemente pode-se calcular o diâmetro das partículas em solução ou suspensão:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (2.10)$$

O  $R_h$  representa o raio médio da partícula dentro de sua dinâmica de difusão, considerando a camada de solvatação.

O raio hidrodinâmico foi determinado a  $90^\circ$  por meio do algoritmo REPES<sup>66,70</sup> incorporado ao programa comercial Gendist. Neste método, as funções de correlação temporal são classicamente tratadas aplicando-se a operação matemática transformada inversa de Laplace, segundo a equação:<sup>70</sup>

$$g_{(2)}(t) - 1 = \beta \left[ \int A(\tau) \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) dt \right]^2 \quad (2.11)$$

O resultado dessa transformação é uma distribuição de tempos de relaxação que pode consistir de um pico ou mais picos, referentes à presença de uma única população de partículas ou a diferentes populações de partículas em uma mesma amostra. Dessa forma, cada população de partículas apresenta um determinado diâmetro.<sup>71</sup>

O raio de giro ( $R_g$ ) foi obtido por meio do método de Guinier<sup>72</sup>, sendo esse método utilizado para o cálculo de  $R_g$  quando se tratam de estruturas grandes e globulares, dado pela equação:<sup>72</sup>

$$I_{ex}(q) = C \exp(-Rg^2 q^2 / 3) \quad (2.12)$$

Assim, um gráfico de  $\ln(I_{ex})^{-1}$  vs.  $q^2$  gera-se uma reta linear quando um gráfico de Guinier é apropriado. O  $R_g$  é determinado usando-se o valor do coeficiente angular.

O parâmetro sensitivo à forma ( $\rho$ ), partir do qual pode-se estimar a forma da partícula, é calculado combinando-se os dados de raio de giro e raio hidrodinâmico segundo a equação abaixo<sup>71</sup>:

$$\rho = \frac{R_g}{R_h} \quad (2.13)$$

O valor adimensional obtido da equação 2.13 indica a topologia da partícula espalhante. A tabela I mostra os valores para  $\rho$  calculados teoricamente

Tabela I. Valores para  $\rho$  calculados teoricamente para partículas com topologias típicas.<sup>73</sup>

Topologia	$\rho$
esfera rígida homogênea	0,774
novelo aleatório monodisperso	
<i>condição teta</i>	1,504
<i>bom solvente</i>	1,78
esfera oca	1,0
microgel	0,3 - 0,5
bastão rígido	>2

Algumas partículas coloidais resultam da agregação de subunidades menores. As estruturas obtidas podem exibir uma variedade de formas irregulares, algumas mais abertas do que outras, incluindo ramificações. A compactação dos agregados é descrita por um número não inteiro chamado de dimensão fractal,  $df$ . Assim, quanto maior for a

dimensão fractal, mais compacta é a estrutura e quanto menor for o número fractal, mais aberta é a estrutura.<sup>74</sup>

Na metodologia utilizada para a determinação da dimensão fractal de uma partícula considera-se que a massa  $M$  de uma partícula está escalonada relativamente à sua dimensão  $R$  (raio) de acordo com a equação 2.13.

$$M(R) \approx R^{df} \quad (2.14)$$

Se no regime experimental utilizado a relação  $q > R_g^{-1}$  é observada, a intensidade de luz espalhada por uma partícula fractal é dada pela equação (2.15).<sup>74</sup>

$$\log I(q) = -d_f \log q \quad (2.15)$$

Portanto, graficando-se a intensidade na forma logarítmica *vs.*  $\log q$ , pode-se assumir que a declividade desta curva, ou seu coeficiente angular, corresponde ao valor de  $d_f$ .

Todas as amostras analisadas por espalhamento de luz foram filtradas com filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade para dentro de cubetas óticas. A temperatura de análise foi de 25 °C. As amostras foram então analisadas em um espectrômetro do espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-900), com laser de He-Ne ( $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$ ) como fonte de radiação. Para os experimentos de DLS, o volume de espalhamento “observado” pelo detector foi minimizado com uma abertura de 0,4 mm, e também se utilizou um filtro de interferência entre o porta-amostras e a detecção do sinal na fotomultiplicadora. A luz espalhada foi coletada a um ângulo de 90° entre a radiação incidente na amostra e a radiação espalhada detectada (luz espalhada pelas partículas). As funções de correlação temporal foram obtidas em um modo denominado multi- $\tau$ , usando-se 224 canais.

As funções de correlação temporal foram analisadas utilizando-se o método dos cumulantes, disponibilizado pelo fabricante do equipamento (*software* Brookhaven Instruments) e por meio da transformada inversa de Laplace fornecida pelo *software* Gendist (REPES).

## 2.7 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

O experimento de SAXS consiste em um feixe de raios-X, com comprimento de onda na ordem de  $1,5 \text{ \AA}$ , que incide sobre a amostra e interage com os elétrons e o espalhamento gerado é coletado por um detector.<sup>71</sup>

As ondas espalhadas por diferentes partículas, que estão parcial ou totalmente organizadas em uma estrutura tridimensional, combinam-se resultando em interferências construtivas e destrutivas, conforme as fases relativas. Assim, os feixes refletidos por dois planos subsequentes, se a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimento de onda, haverá um espalhamento cooperativo, na qual todas as ondas espalhadas estão em fase. Dessa forma, produz-se um perfil de difração denominado de reflexões de Bragg. Caso contrário, haverá sobreposição destrutiva, não havendo qualquer sinal de raios-X.<sup>75,76</sup>

Nos lipossomas, as bicamadas lipídicas, apresentam um sistema com relativo ordenamento, no qual as unidades de repetição estão na ordem de angstroms.<sup>75</sup> A Figura 2.4 representa esquematicamente uma bicamada lipídica com certa distância de repetição  $d$  e um feixe de radiação incidente com comprimento de onda  $\lambda$  que forma um ângulo  $\theta$  entre os planos ordenados.

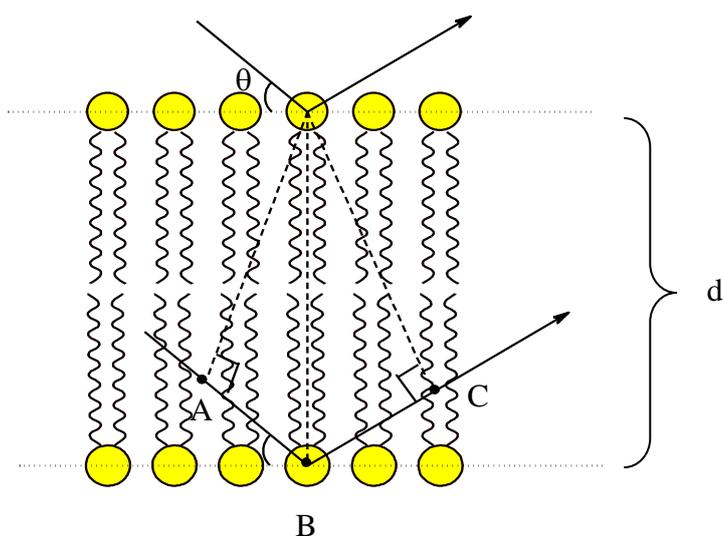


Figura 2.4. Representação esquemática de uma bicamada lipídica com uma distância de repetição  $d$  e um feixe de radiação incidente com comprimento de onda  $\lambda$  que forma um ângulo  $\theta$  entre os planos ordenados.

A diferença de percurso entre dois feixes refletidos é dada por:

$$AB + BC = 2d \sin \theta \quad (2.16)$$

Quando as ondas refletidas interferem construtivamente, o caminho  $AB + BC$  é igual a um comprimento de onda. Assim, uma reflexão deve ser observada quando o ângulo de incidência com o plano satisfizer a lei de Bragg, ou seja, quando  $2d \sin \theta$  for igual a um número inteiro vezes o comprimento de onda:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.17)$$

Para um determinado sistema, a intensidade de raios-X espalhada é resultado da multiplicação do fator forma  $F(q)$  e do fator estrutura  $S(q)$ :<sup>77</sup>

$$I(q) = NF(q)S(q) \quad (2.18)$$

Onde  $N$  é o número de partículas por unidade de volume.

O fator forma está relacionado com o espalhamento de uma partícula simples e isolada em um regime diluído, na qual o espalhamento total resulta da soma dos espalhamentos individuais de partículas que não interagem. Dessa forma, pode-se obter informações sobre a forma e o tamanho das partículas espalhadas. O fator estrutura é proveniente das interações entre as partículas. Assim, à medida que o sistema se torna mais concentrado, a intensidade de espalhamento terá as contribuições de  $F(q)$  e  $S(q)$ .<sup>77</sup>

As medidas de SAXS foram realizadas na linha de SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). O tempo de exposição foi de 5 minutos. A temperatura foi mantida em  $20 \pm 1$  °C. O comprimento de onda da radiação incidente foi de  $1,48 \text{ \AA}$  e o detector linear (*Princeton Instruments*) foi posicionado a 1028,4 mm da amostra.

## 2.8 POTENCIAL ZETA (PZ)

A presença de uma carga superficial, em partículas suspensas em um líquido, afeta a distribuição de íons que estão numa região muito próxima da partícula e o meio de suspensão, acarretando em acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula. O potencial zeta é, portanto, a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a superfície da partícula. A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade coloidal de partículas em solução.<sup>4,78</sup>

As partículas que apresentam valores altamente positivos ou altamente negativos de PZ irão se repelir umas às outras, evitando assim a agregação. Por sua vez, valores de PZ muito baixos ou próximos à zero, indicando ausência de carga superficial, podem levar a ocorrência de processos de floculação ou agregação.<sup>78</sup>

As medidas de potencial zeta foram realizadas no equipamento ZetaPALS, Zeta Potential Analyzer, (Brookhaven Instruments). A temperatura de análise foi mantida  $20 \pm 1$  °C.

## 2.9 MICROSCOPIA ÓPTICA E DE FLUORESCÊNCIA

As células de observação para a microscopia óptica e de fluorescência foram preparadas conforme descrito na seção 2.3 e foram observadas tanto utilizando-se a microscopia em modo DIC (*Differential Interference Contrast*) ou contraste de fase.

A microscopia em modo DIC consiste num feixe de luz polarizada que passa por um prisma birrefringente que divide o feixe em dois parciais, no qual incidem sobre a amostra com um deslocamento lateral um em relação ao outro. Assim, onde há vesículas, um contraste é produzido na forma de relevos.<sup>4</sup>

A microscopia em modo de contraste de fase gera um contraste entre a vesícula e o fundo devido à modificação da defasagem e da amplitude dos feixes diretos e difratados do microscópio e, dessa forma, a interferência será totalmente construtiva ou totalmente destrutiva.<sup>4</sup>

Para a microscopia óptica, as GUVs foram observadas no microscópio óptico invertido Nikon TE 2000 com objetiva de 60X em contraste diferencial de interferência (DIC). Para a microscopia óptica de fluorescência foi empregado o mesmo microscópio, que é constituído por um sistema de lâmpadas de mercúrio com caminhos ópticos de filtros para a seleção do comprimento de onda da luz incidente na amostra. Junto ao microscópio é acoplada uma câmera de vídeo (Diagnostic Instruments NDIAG 1800), a qual filma e grava as imagens no computador.

## **2.10 MICROSCOPIA CONFOCAL**

As análises de microscopia confocal foram realizadas por meio da microscopia de varredura a laser confocal (*confocal laser scanning microscopy* – CLSM) e as imagens foram coletadas com o uso do *software* EZ-C1 (Nikon, version 3.50). As GUVs contendo NBD-DOPE foram excitadas através de um laser de íon argônio (Melles-Griot) a 488 nm, enquanto GUVs contendo rodamina foram excitadas através de um laser de hélio-neônio (Melles-Griot) a 543 nm. Para a avaliação das intensidades de fluorescência das imagens utilizou-se o *software* Magneto, o qual foi desenvolvido no Instituto Charles Sadron. O Magneto permite a determinação das intensidades de fluorescência por meio da avaliação do perfil de escala cinza entre a membrana e o fundo da imagem, além de uma análise global ou parcial do perfil de fluorescência por meio da integração dos *pixels* dentro de uma área selecionada na imagem.

**Capítulo 3**  
**Estudo do mecanismo de**  
**fusão de vesículas**  
**unilamelares gigantes**  
**durante a eletroformação a**  
**partir de um filme lipídico**  
**multilamelar**

## 3.1 INTRODUÇÃO

### 3.1.1 Formação de GUVs pelo método de hidratação

O método de hidratação (*gentle hydration method*) é um dos métodos convencionais para a preparação de vesículas unilamelares grandes (GUVs) que consiste no espontâneo inchaço do filme lipídico seco em solução.<sup>79</sup> Este foi um dos primeiros métodos desenvolvidos para a preparação de vesículas gigantes, descrito por Reeves e Dowben<sup>80</sup> em 1969. Este método consiste na hidratação de um filme fino de lipídios em uma superfície sólida, normalmente de vidro, o qual o filme lipídico espontaneamente incha. Este método também é conhecido como *spontaneous swelling* ou *natural swelling*.<sup>80,81</sup>

Se a hidratação do filme seco é realizada sob agitação, haverá a formação de vesículas multilamelares (MLVs, normalmente com diâmetros acima de 1 µm). Uma vez formadas, as vesículas multilamelares não irão se converter em GUVs, pois esse processo seria energeticamente desfavorável. Se, entretanto, alguma energia externa é dada ao sistema, as MLVs irão se romper e formar vesículas menores em tamanho, normalmente menores que 0,5 µm. A sonicação, por exemplo, forma SUVs (normalmente com diâmetros de 50 nm) e LUVs (normalmente com diâmetros de 100 nm) a partir de MLVs.<sup>82,83</sup>

O método de hidratação é muito utilizado para a preparação de GUVs a partir de lipídios carregados.<sup>84</sup> Entretanto, este método é usado para a formação de bicamada com lipídios na fase líquido-cristalina, ou seja, acima da temperatura de transição de fase principal de sistemas lipídicos. Se os lipídios encontram-se na fase gel as vesículas não podem ser obtidas por este método.<sup>5</sup>

Ao longo dos anos, diversas modificações e melhoramentos no método original de hidratação foram feitos. Assim, mostrou-se que a formação de vesículas gigantes pelo método de hidratação não só é possível a partir de misturas contendo certa quantidade de lipídios carregados, mas também a partir de fosfatidilcolinas zwitteriônicas puras, como por exemplo, a DOPC, se o filme seco de lipídios contém monossacarídeos não eletrólitos (glicose, manose ou frutose).<sup>84</sup> Contudo, o encapsulamento de macromoléculas durante a formação das vesículas gigantes a partir do filme hidratado não apresenta boa eficiência.

Em 1986, Angelova e Dimitrov<sup>64</sup> publicaram um estudo a respeito do efeito da aplicação de um campo elétrico externo em filmes lipídicos hidratados depositados a

partir de uma solução orgânica sobre uma superfície de vidro condutora (vidro revestido com óxido de índio e titânio (ITO), ou em fios de platina).<sup>64</sup>

Dependendo das condições experimentais, como por exemplo, as composições e quantidades de lipídios utilizados, parâmetros de campo elétrico aplicado e meio de hidratação, GUVs homogêneas podem ser obtidas em solução aquosa ou tampão de baixa força iônica. Este método é chamado de eletroformação ou *electroswelling method*.<sup>64, 85, 86</sup>

Algumas modificações deste método já vêm sendo desenvolvidas. Pott e colaboradores<sup>87</sup> prepararam vesículas gigantes, nas quais os lipídios foram depositados em uma solução aquosa contendo SUVs e LUVs pré-formadas. Além disso, os mesmos pesquisadores mostraram que com algumas modificações no método original e com ajuste correto da tensão durante a aplicação do campo elétrico, foi possível preparar GUVs em solução aquosa contendo 250 mM de NaCl.<sup>87</sup>

Mertins e colaboradores<sup>88</sup> realizaram a deposição lipídica feita a partir de um sistema de emulsão de água/óleo, constituído por um solvente orgânico volátil imiscível em água (clorofórmio) e uma fase de óleo contínua. Usando este método modificado, de eletroformação a partir de um precursor em fase reversa, eles prepararam vesículas de fosfolipídios com quitosana, um polissacarídeo solúvel em água e com grandes potenciais para aplicações farmacológicas.<sup>88</sup>

Uma das limitações do método de eletroformação é a formação de GUVs na presença de grandes quantidades de lipídios carregados, enquanto que no método de hidratação, a presença de lipídios carregados é benéfica.<sup>79,89</sup>

Mais recentemente, Weinberger e colaboradores<sup>65</sup> mostraram que uma grande variedade de lipídios, ou misturas de lipídios, pode formar GUVs, por inchaço de filmes lipídicos depositados na superfície de um gel seco de álcool polivinílico, utilizando-se um tampão para o crescimento das vesículas, no qual pode conter diversas moléculas de interesse biológico. Este método, também chamado de método gel, permite a formação de GUVs sobre um filme de PVA de forma fácil e rápida, em que o crescimento de GUVs se dá sem a presença de polímeros na membrana das vesículas, com altos rendimentos sem a necessidade de equipamento especial. O método está bem adaptado para a encapsulação de biomoléculas, tais como actina, que podem ser encapsuladas na forma de monômeros, em baixas temperaturas, e polimerizadas por aquecimento das vesículas à temperatura ambiente. Além disso, os autores mostraram que este método

pode ser combinado com o filme precursor em fase reversa para melhorar a eficiência de encapsulação de (bio) moléculas.<sup>65</sup>

### 3.1.2 Formação de GUVs pelo método de eletroformação

O método de eletroformação, que foi desenvolvido por Angelova e Dimitrov<sup>64,90</sup> envolve a aplicação de um campo elétrico externo, o qual provoca o inchamento do filme lipídico em solução. Primeiramente, a formação de vesículas gigantes foi feita sob aplicação de um campo elétrico estático (DC). Subsequentemente, com a dificuldade de formação de GUVs com a aplicação de um campo elétrico DC, a partir da utilização de diferentes tipos de lipídios, eles verificaram que talvez um campo estático exercesse somente um efeito de ordenamento nas moléculas lipídicas.<sup>64,85</sup> Esta limitação foi contornada, utilizando-se um campo elétrico alternado (AC) para a formação das vesículas.<sup>90</sup>

Um campo AC, devido à mudança permanente (usualmente senoidal) de direção e magnitude da intensidade do campo, além do efeito de ordenamento, força as moléculas a se movimentarem, o que pode ajudar os lipídios a adotarem espontaneamente um empacotamento em bicamadas e formar estruturas unilamelares.<sup>90-92</sup> Este novo método permitiu formar vesículas gigantes usando uma variedade de misturas de lipídios e de estudar diferentes propriedades de suas membranas.

O método de eletroformação apresenta vantagens tais como bom rendimento, estreita distribuição de tamanhos,<sup>93</sup> alta taxa de vesículas unilamelares<sup>93,94</sup> e poucas vesículas defeituosas.<sup>79</sup> Contudo, o mecanismo pelo qual são formadas as vesículas unilamelares gigantes por eletroformação não está totalmente elucidado. Sabe-se que ao se expor um filme lipídico seco multilamelar, na fase líquido-cristalina, a uma solução aquosa, e com a aplicação de um campo elétrico, ocorre a desestabilização do filme, levando a formação de vesículas unilamelares e multilamelares.<sup>86</sup> A figura 3.1 mostra um esquema ilustrativo do crescimento de GUVs pelo método de eletroformação. Entretanto, a forma como o campo elétrico oscilante induz a formação de, majoritariamente, vesículas unilamelares não está elucidada.

A observação do processo de crescimento, usando microscopia óptica de contraste de fase, mostra que vesículas pequenas crescem em tamanho e, então, se

fundem com as vesículas vizinhas, como pode ser visualizado na sequência de imagens da figura 3.2.

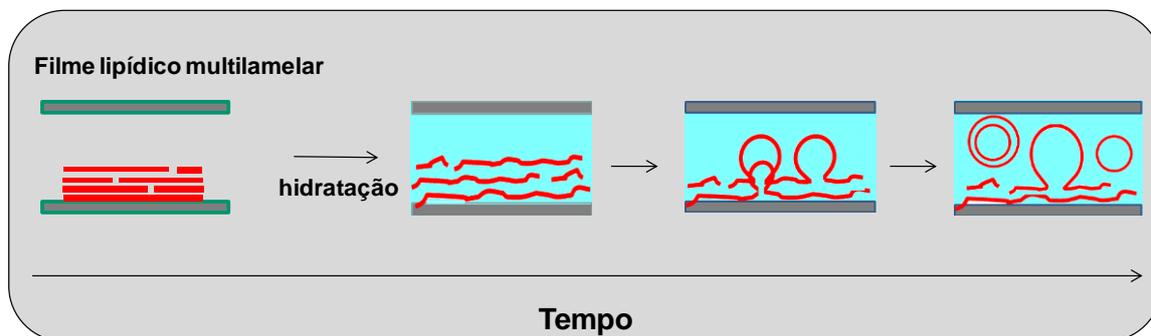


Figura 3.1. Representação esquemática de crescimento de vesículas gigantes pelo método de eletroformação. Um filme lipídico seco multilamelar, na fase líquido-cristalina, quando exposto a uma solução aquosa e a um campo elétrico, é desestabilizado, levando a formação de vesículas unilamelares e multilamelares.

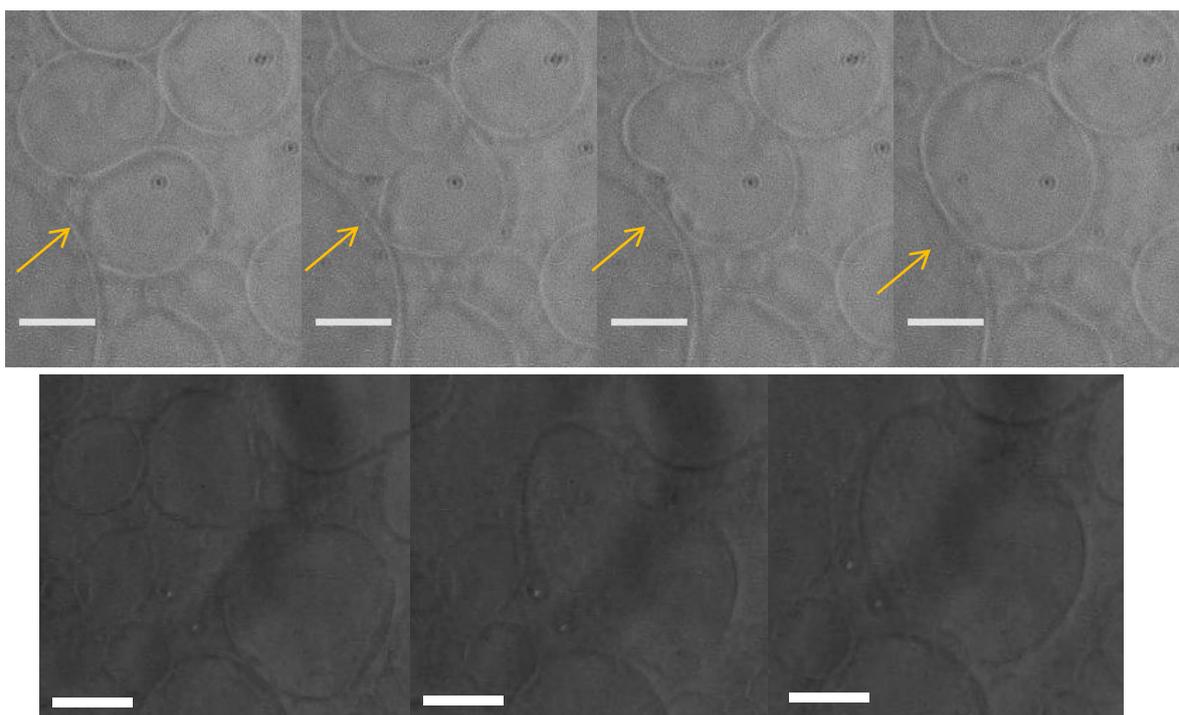


Figura 3.2. Imagens de microscopia óptica de contraste de fase da fusão de vesículas gigantes durante a eletroformação a partir de um filme lipídico multilamelar. Imagem superior, mostrando a fusão de duas vesículas e imagem inferior, mostrando a fusão de três vesículas. Barra = 10 µm.

A observação da figura 3.2 sugere que as vesículas que estão sendo formadas se fundem com uma ou mais vesículas vizinhas até que atinjam um determinado diâmetro. Entretanto, este mecanismo pode ocorrer por meio de dois cenários. Um cenário em que as vesículas se fundem ainda aderidas ao substrato, e outro cenário em que as mesmas se fundem em solução, ou seja, já desconectadas do substrato lipídico multilamelar. A figura 3.3 mostra um esquema ilustrativo dos dois cenários possíveis para a fusão das vesículas durante o crescimento pelo método de eletroformação.

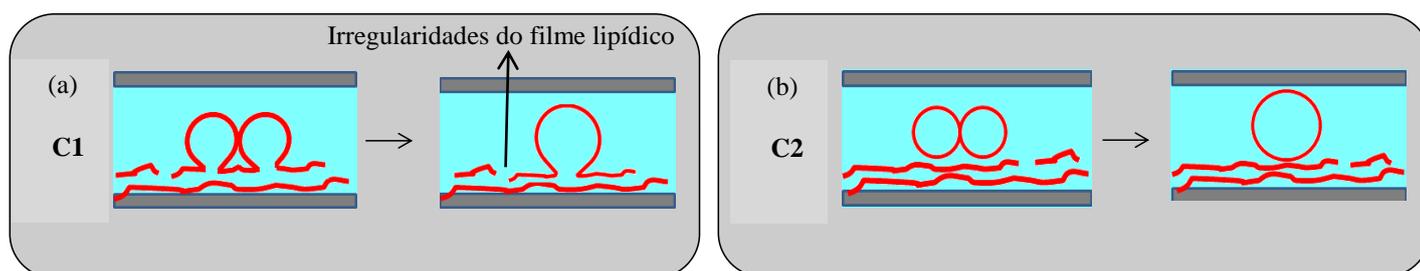


Figura 3.3. Representação esquemática de dois cenários possíveis para o mecanismo de crescimento e fusão de vesículas gigantes durante a eletroformação a partir de um filme lipídico multilamelar. Em (a) vesículas que se fundem aderidas ao mesmo substrato e em (b) vesículas que se fundem em solução.

Sabe-se que um dos requisitos necessários para a formação das vesículas gigantes pelo método de eletroformação é a separação das bicamadas lipídicas que é alcançada, principalmente, devido as forças de hidratação, eletrostática e osmótica, bem como devido ao transporte de água através do filme lipídico sob aplicação de campo elétrico.<sup>95</sup> Assim, a combinação das forças eletrostática e osmótica, que atuam no inchamento das bicamadas devem superar a atração de van der Waals que mantém as bicamadas unidas.<sup>95</sup>

A curvatura da membrana é outro fator importante na formação das vesículas gigantes. Ela é facilitada devido as irregularidades encontradas nas camadas presentes no filme lipídico (indicada pela seta na figura 3.3). Nesses defeitos, a parte hidrofóbica que se encontra no interior da bicamada lipídica é exposta ao meio aquoso, o qual induz a uma linha de tensão que a bicamada tenta aliviar. Isto leva a um abaulamento da bicamada lipídica na superfície, o qual pode levar as vesículas a incharem ainda mais.<sup>96</sup>

Assim, podem ser resumidos os efeitos impostos as bicamadas lipídicas devido a aplicação de um campo AC em:

- a) o filme lipídico vibra na mesma frequência do campo elétrico, seguindo o movimento eletro-osmótico do meio;
- b) ocorre diminuição da linha de tensão e da superfície no inchamento das bicamadas;
- c) ocorre um aumento da separação e da curvatura da bicamada;
- d) observa-se a redistribuição de contra-íons na bicamada.

Sendo assim, nesta parte do trabalho objetiva-se contribuir na elucidação do mecanismo de fusão de vesículas durante o processo de eletroformação. Para tanto, diferentes lipídios (figura 3.5), bem como lipídios fluorescentes (rodamina e NDBPE, Figura 3.4) foram utilizados na preparação das GUVs. Com o auxílio da técnica de microscopia confocal, objetiva-se distinguir entre o primeiro cenário, onde ocorre fusão com vesículas vizinhas no mesmo substrato lipídico e o segundo cenário, no qual a fusão ocorre entre vesículas já formadas em solução.

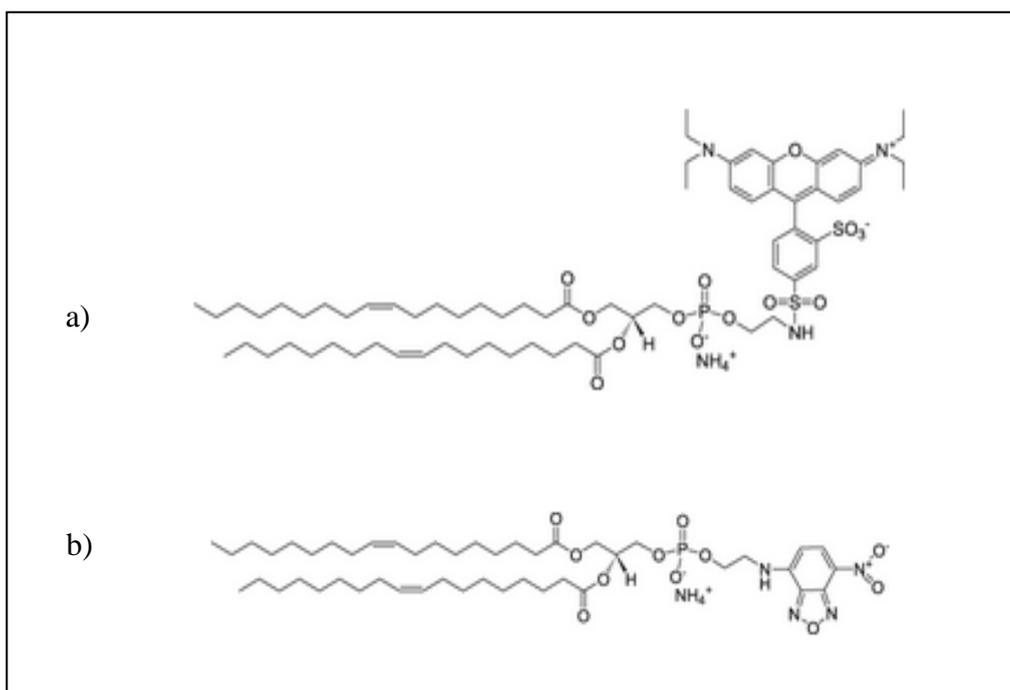


Figura 3.4. Estruturas químicas em (a) da rodamina e em (b) do NDBPE.

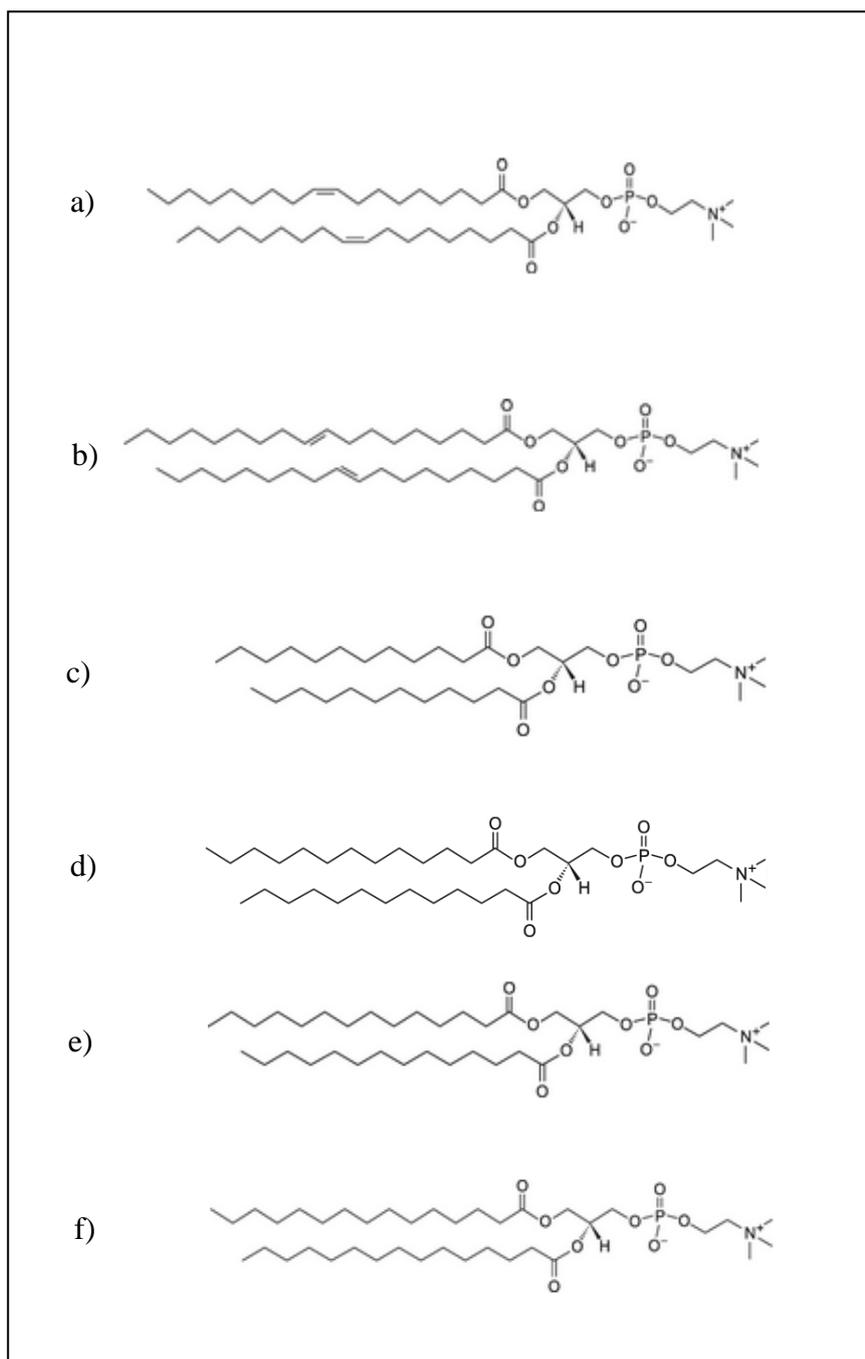


Figura 3.5. Estruturas químicas dos lipídios em (a) 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC); (b) 1,2-dielaidoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DEPC); (c) 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DLPC); (d) 1,2-ditridecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (13-PC); (e) 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) e (f) 1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (15-PC).

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Materiais

Os lipídios 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DEPC, > 99%), 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DLPC, > 99%), 1,2-ditridecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (13 PC, > 99%), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC, > 99%) e 1,2-dipentadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (15 PC, > 99%) foram obtidos da Avanti Polar Lipids, em clorofórmio. Os lipídios fluorescentes usados no trabalho: 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-(lissaminerodamina B sulfonil) (sal de amônia) – (Rodamina-DOPE, > 99%) e 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina - N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) (sal de amônia NBDPE, > 99%), também foram obtidos da Avanti Polar Lipids. A 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC, > 99%) foi obtida da Sigma-Aldrich. Soluções lipídicas foram armazenadas a -20 °C. Todos os lipídios foram utilizados sem purificação.

### 3.2.2 Crescimento de GUVs de rodamina na presença de GUVs de NBDPE

Com intuito de crescer vesículas gigantes contendo rodamina, que emite fluorescência na região do vermelho, na presença de GUVs contendo NBDPE, que emite fluorescência na região do verde, uma primeira geração de vesículas gigantes contendo o fluoróforo NBDPE foi preparada em sacarose-glicose conforme o procedimento descrito na seção 2.3 e armazenada em frascos *Eppendorf*.<sup>64</sup>

Em seguida, 10 µL do lipídio a ser estudado, contendo a rodamina em clorofórmio, foram espalhados em uma lâmina de ITO e colocados sob vácuo por 30 minutos. A célula de crescimento foi formada por meio de duas lâminas de ITO sobrepostas, contendo as faces condutoras voltadas para o interior, e separadas por um espaçador de teflon de 2 mm.

A célula condutora, contendo a lâmina de ITO e o filme lipídico seco contendo rodamina, bem como uma seringa contendo a solução de vesículas gigantes pré-preparadas com o NBDPE, foram mantidas por duas horas a 4 °C. Após, foi feita a injeção da primeira geração de GUVs e a célula foi mantida a 4 °C durante a noite,

conforme ilustra a figura 3.6. Esse procedimento foi adotado para que a primeira geração de GUVs, que contém NBDPE, decantasse até manter contato com o filme lipídico antes do crescimento por eletroformação (Figura 3.7). Após ser retirada da geladeira, a célula de eletroformação foi imediatamente conectada ao gerador de tensão alternada com uma tensão de 1 V e frequência de 10 Hz por 3 horas. As vesículas resultantes foram coletadas em *Eppendorf* e analisadas em microscópio imediatamente.

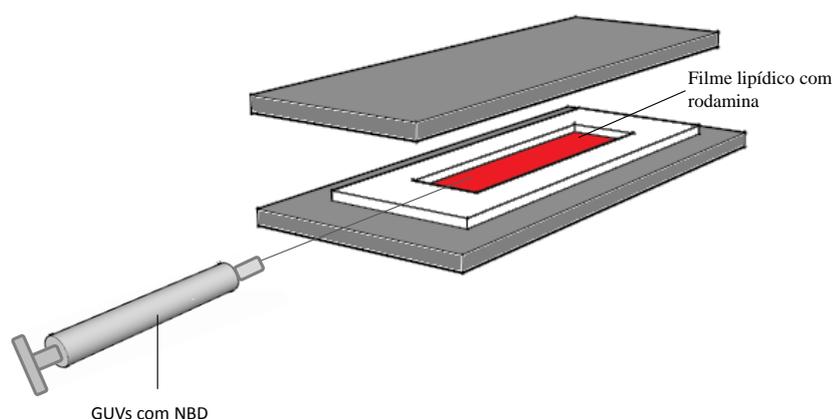


Figura 3.6. Representação esquemática da célula condutora de crescimento por eletroformação contendo o ITO com o filme lipídico com rodamina seco e a seringa com as GUVs com NBDPE.

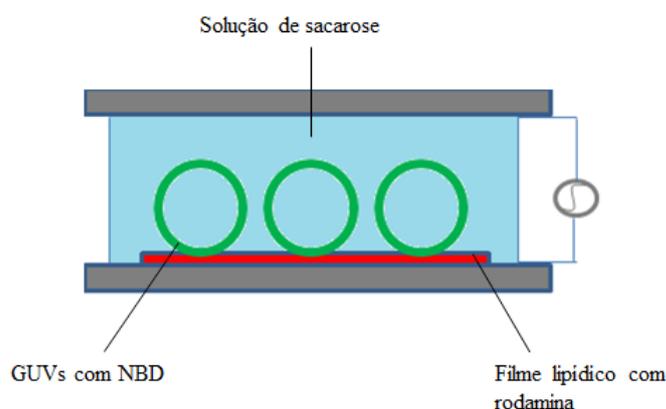


Figura 3.7. Representação esquemática da célula de eletroformação contendo o ITO com o filme lipídico contendo rodamina e as GUVs formadas com NBDPE, a 4 °C, mantendo contato com o filme lipídico.

### 3.2.3 Crescimento de GUVs de rodamina na presença de SUVs de NBDPE

Para o crescimento de vesículas gigantes contendo rodamina na presença de SUVs contendo NBDPE, primeiramente foram preparadas as SUVs contendo o fluoróforo NBDPE como descrito na seção 2.2 e colocadas em frascos *Eppendorf*.

O procedimento de formação da célula condutora foi o mesmo descrito na seção 3.3.1, a injeção da suspensão das SUVs na célula contendo o ITO com o filme lipídico seco na presença de rodamina foi realizada a temperatura ambiente. A célula foi conectada ao gerador de tensão alternada com uma tensão de 1 V e frequência de 10 Hz por 3 horas. A figura 3.8 mostra uma representação esquemática da célula condutora. As vesículas resultantes foram coletadas em *Eppendorf* e analisadas em microscópio imediatamente.

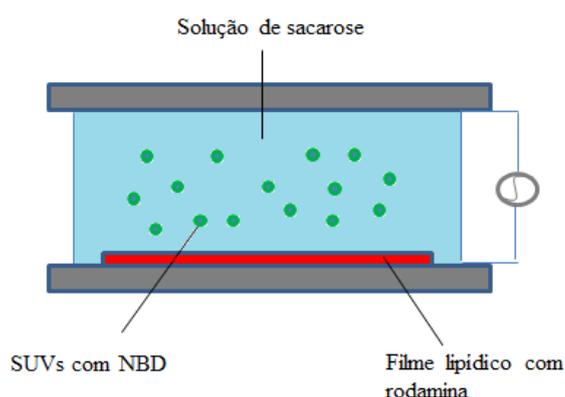


Figura 3.8. Representação esquemática da célula de eletroformação contendo o filme lipídico com rodamina e as SUVs de NBDPE.

### 3.2.4 Microscopia óptica

Para a observação das vesículas gigantes utilizou-se o microscópio invertido TE 2000 (Nikon, Japan), equipado com objetiva a 60X imersa em água (1.2 NA Plan Apo DIC objective) e uma objetiva de 40X em contraste de fase (0.60 NA Plan Fluor objective). As imagens de epi-fluorescência das GUVs foram gravadas por meio de uma câmera digital (Hamamatsu EM-CCD, Japan) com 16 bits. As imagens de fluorescência em

três dimensões (3D) foram realizadas com um laser confocal (*scanning microscopy* - CLSM) utilizando um scan Nikon C1. As imagens foram capturadas por meio do software EZ-C1 (Nikon, version 3.50). Com o intuito de detectar a fluorescência de ambos os fluoróforos na membrana, as GUVs foram fotografadas sistematicamente utilizando vários comprimentos de onda, segundo o método disponível (Nikon EZ-C1 software). Este método faz uma varredura sequencial de comprimentos de onda durante as análises, no qual a amostra é primeiramente excitada em 488 nm (laser íon argônio, Melles-Griot), e após, é excitada em 543 nm (laser hélio-neônio, Melles-Griot). Para a excitação em 488 nm, imagens de emissão compostas foram gravadas nas faixas de [500..530] e [552..617], enquanto que para a excitação em 543 nm, somente foram gravadas nas faixas de [552..617]. Assim, as condições de excitação/emissão foram: 488/515, 488/585 e 543/585 respectivamente. Todas as imagens foram realizadas seguindo os mesmos parâmetros: potência do laser (uma potência específica para cada um dos comprimentos de onda de excitação acima mencionada), amplificação do PMT (um ganho específico para cada um dos dois comprimentos de onda de emissão supramencionados), tamanho do pinhole, *pixel dwell*, tamanho da imagem e número de pixels por imagem. Por conseguinte, a comparação quantitativa, em termos de intensidade de emissão de fluorescência entre imagens, foi realizada ao longo de todo o estudo. As imagens foram analisadas através do software Magneto, desenvolvido no Instituto Charles Sadron.

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Determinação das condições de análises na microscopia confocal**

Primeiramente, foram realizadas medidas de fluorescência com SUVs contendo os lipídios fluorescentes (rodamina e NDBPE) em um espectrofluorímetro (Horiba Jobin Yvon) com o intuito de verificar as bandas de absorção e emissão desses fluoróforos para, então, selecionar-se os parâmetros adequados para a utilização da técnica de microscopia confocal. Assim, foram preparadas SUVs de DOPC contendo os fluoróforos 0,5% (mol/mol) de rodamina e 0,5% (mol/mol) NDBPE pela técnica de extrusão conforme descrito na seção 2.3. Os espectros obtidos estão apresentados nas

Figuras 3.9 - 3.11. Pode-se observar a partir da figura 3.9, que a rodamina emite fluorescência na região do vermelho ( $\lambda \sim 600$  nm) quando excitada com os comprimentos de onda de 488 nm e 543 nm.

Na Figura 3.10 observa-se que o NBDPE possui uma banda larga de emissão, compreendendo também a região de emissão de fluorescência na região vermelho quando excitado em 488 nm. Sendo assim, no comprimento de onda de excitação de 488 nm tanto a rodamina quanto o NBDPE emitem fluorescência na região do vermelho, o que interfere na detecção de ambos os fluoróforos simultaneamente na mesma vesícula através da microscopia confocal. A figura 3.11 demonstra que com um comprimento de onda de excitação de 543 nm somente a rodamina emite fluorescência na região do vermelho. Portanto, as análises de microscopia confocal com detecção dos dois lipídios fluorescente nas GUVs foi realizada com uma excitação em 543 nm e emissão em 605 nm para a rodamina e excitação em 488 nm e emissão em 515 nm para o NBDPE (Figura 3.12). Assim, utilizando o método *frame lambda* da microscopia confocal é possível a formação de imagens compostas com os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de 543 nm simultaneamente.

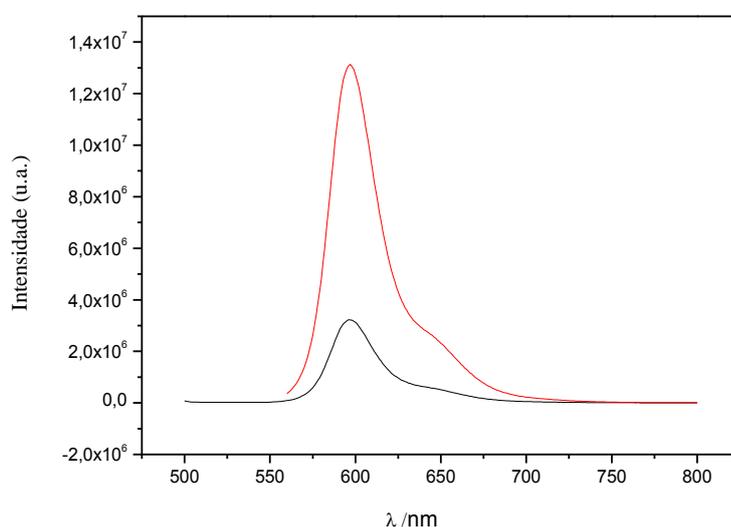


Figura 3.9. Espectro de emissão de fluorescência de SUVs de DOPC contendo rodamina obtidos com excitação de 488 nm (linha preta) e 543 nm (linha vermelha).

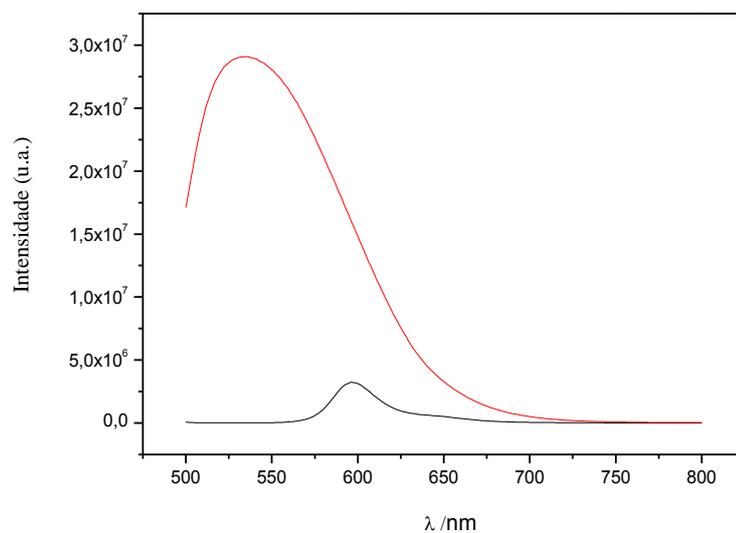


Figura 3.10. Espectro de emissão de fluorescência de SUVs de DOPC contendo rodamina (linha preta) e SUVs de DOPC contendo NDBPE (linha vermelha) obtidos com excitação de 488 nm.

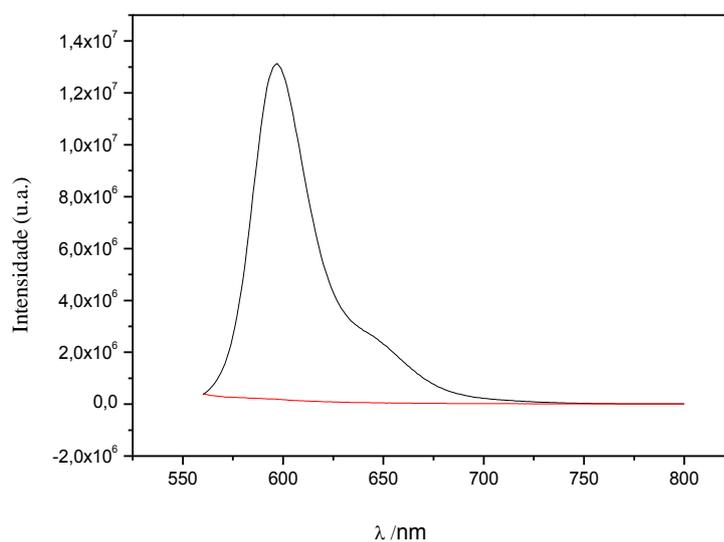


Figura 3.11. Espectro de emissão de fluorescência de SUVs de DOPC de contendo rodamina (linha preta) e SUVs de DOPC contendo NDBPE (linha vermelha) obtidos com excitação de 543 nm.

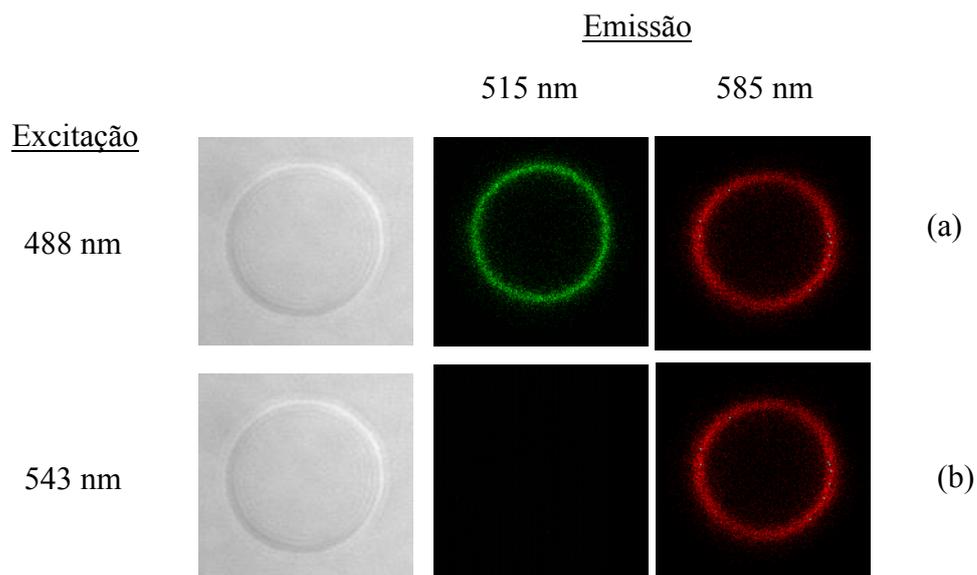


Figura 3.12. Imagens de DIC e microscopia de fluorescência (a) de uma vesícula gigante de DOPC contendo NBDPE, mostrando que o NBDPE emite fluorescência nos comprimentos de onda de 515 e 585 nm quando excitado a 488 nm e (b) de uma vesícula gigante de DOPC contendo rodamina, mostrando que a rodamina emite fluorescência comprimento de onda de 585 nm quando excitada a 543 nm. A condição ideal de detecção dos fluoróforos é em excitação/emissão do NBDPE 488/515 e a rodamina 543/585.

### 3.3.2 Crescimento de GUVs de DOPC e DEPC contendo rodamina na presença de GUVs contendo NBDPE

Após a determinação dos comprimentos de ondas adequados para a análise de microscopia confocal prosseguiu-se com o estudo de mecanismo de fusão durante a eletroformação, utilizando-se diferentes lipídios para o crescimento das GUVs.

Primeiramente, estudaram-se os lipídios DOPC e a DEPC (figura 3.5). A DOPC apresenta duas insaturações em posição *cis* enquanto que a DEPC apresenta duas insaturações em posição *trans*. Outra diferença entre os lipídios está na temperatura de transição de fase principal ( $T_f$ ). A DOPC apresenta uma  $T_f$  de - 20 °C, enquanto que a

DEPC apresenta uma  $T_f$  de + 12 °C. Com isso, pretende-se, também, comparar as fases lipídicas no processo de fusão de vesículas gigantes durante o crescimento por eletroformação.

A comparação das  $T_f$  dos diferentes lipídios foi motivada pelo fato de que as vesículas, espontaneamente, começam a crescer assim que uma solução aquosa submerge o filme lipídico, sendo que a temperatura da solução é maior do que a temperatura de transição de fase principal lipídica. Em outras palavras, deixando as GUVs da primeira geração sedimentar sobre o filme lipídico (a 4 °C), abaixo da  $T_f$  para a DEPC por exemplo, obtém-se uma sedimentação completa das GUVs no filme, antes que iniciem seu crescimento, visto que na fase gel elas não são formadas.

Esta investigação também foi motivada por experimentos que mostram que o módulo de flexão de uma membrana apresenta uma forte diminuição em uma pequena faixa de temperatura em torno de  $T_f$ , uma propriedade que pode influenciar a fusão da membrana nas GUVs.<sup>55,97</sup>

A Figura 3.13 mostra as imagens de microscopia confocal de vesículas gigantes de DOPC contendo rodamina preparadas na presença de vesículas gigantes de DOPC contendo NBDPE, as quais foram obtidas como descrito na seção 3.3.1. A partir da Figura 3.13 pode-se observar a presença de GUVs contendo somente rodamina (vesículas vermelhas) ou GUVs contendo somente o NBDPE (vesículas verdes) (o mesmo foi observado para as vesículas constituídas pelo lipídio DEPC). A grande maioria das GUVs (98%) apresentou somente um fluoróforo na membrana. Raros foram os casos em que se observou GUVs contendo ambos os lipídios fluorescentes na mesma membrana, como podem ser visualizados na Figura 3.14.

Também foram realizados experimentos com GUVs contendo NBDPE (verdes) crescidas na presença de vesículas gigantes contendo rodamina (vermelhas). Para esses experimentos o mesmo resultado mostrado na figura 4.13 foi observado. Em ambos os casos, ou seja, tanto com o lipídio DOPC quanto a DEPC, raramente foram observado vesículas contendo ambos os lipídios fluorescentes na mesma membrana, como pode ser visualizado na Figura 3.14. Neste caso, medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas para avaliar a quantidade de fluorescência de ambos os fluoróforos na membrana das GUVs.

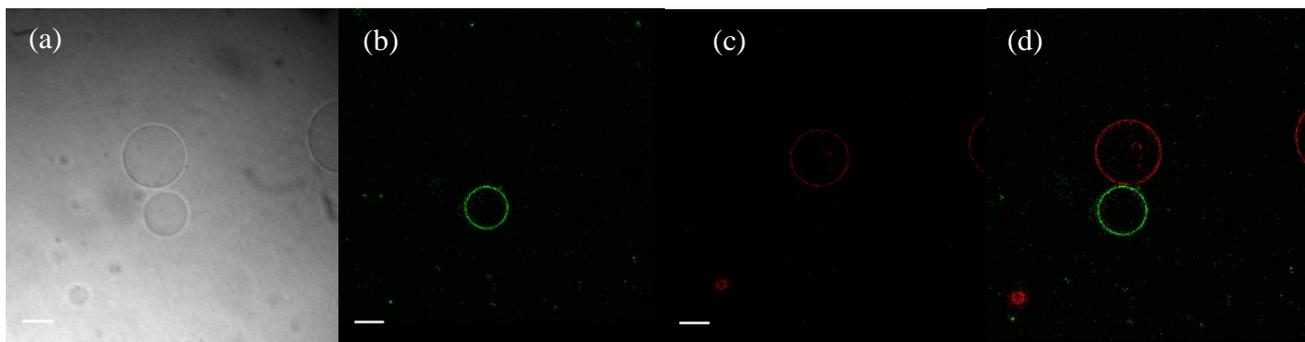


Figura 3.13. Imagens típicas de GUVs com rodamina crescidas na presença de uma segunda geração de GUVs com NBDPE em (a) contraste de fase, (b) imagens confocal com exc. 488/em. 515 nm, (c) imagens confocal com exc. 543/em. 585 nm, e (d) de imagem composta. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

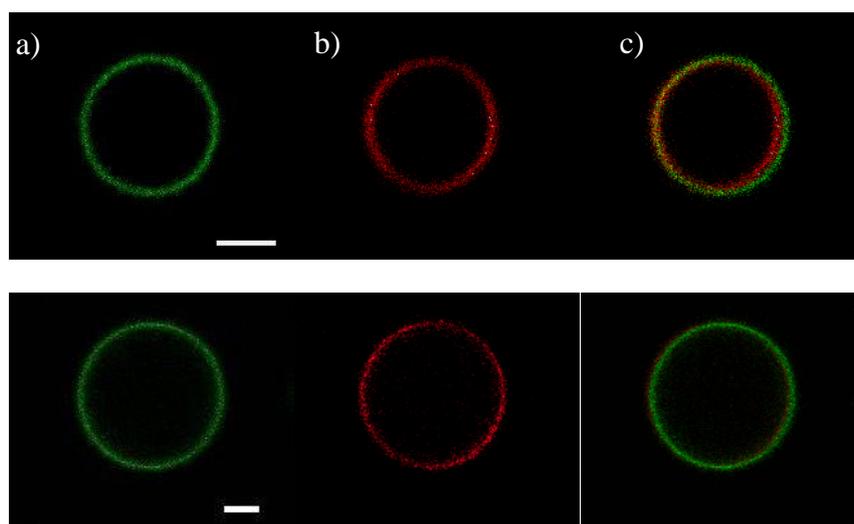


Figura 3.14. Imagens de microscopia confocal de GUVs contendo ambos os fluoróforos (NBDPE e rodamina). As imagens superiores são de GUVs constituídas de DOPC e as imagens inferiores são de GUVs constituídas de DEPC. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta. A análise de fluorescência usando o programa Magneto indicou que a vesícula gigante de DOPC contém 47% de NBDPE e 45% de rodamina, e a vesícula gigante de DEPC contém 54% de NBDPE e 45% de rodamina. Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

A quantificação de fluorescência de GUVs de DOPC ou DEPC contendo 0,5% mol/mol de NBDPE ou 0,5% mol/mol de rodamina (chamado de calibração "uma-sonda") foi realizada, determinando-se a intensidade média de fluorescência por unidade de área de membrana de cerca de vinte GUVs de vários tamanhos, para cada um dos fluoróforos, em cada uma das condições de excitação/emissão de 488/515, 488/585, e 543/585. A tabela II resume estes resultados.

Na tabela II, devido à falta de fluorescência do NBDPE no modo de 543/585, o conteúdo de rodamina de uma membrana é quantificado pela quantidade de fluorescência neste modo. Da mesma forma, o teor de NBDPE de uma membrana é quantificado pela quantidade de fluorescência no modo de 488/515. Os dados da tabela são para GUVs de DEPC. Resultados semelhantes foram obtidos para GUVs de DOPC.

Uma membrana que contém ambos os fluoróforos apresenta fluorescência tanto no modo de 488/515 quanto em 543/585, uma situação que foi verificada de um ponto de vista quantitativo. Assim, a calibração também foi feita medindo-se a fluorescência de GUVs contendo uma mistura de 1/1 de ambas as sondas, sendo 0,25% mol/mol de NBDPE e 0,25% mol/mol de rodamina (método de calibração 'duas sondas'). Os valores de intensidade obtidos para esse caso nos modos 488/515 e 543/585 correspondem à metade dos seus valores correspondentes na condição de 'uma sonda' (Tabela V), provando a linearidade entre a intensidade da fluorescência medida por unidade de área de superfície e a concentração de fluoróforo na membrana.

Sendo assim, quando dois fluoróforos foram detectados numa dada membrana, a intensidade de fluorescência por unidade de área da membrana de 488/515 e 543/585 foi medida e comparada com os valores de calibração. Cada condição foi repetida três vezes, o que levou a uma análise de fluorescência de pelo menos trezentas GUVs para cada fosfolípido.

As figuras 3.15 e 3.16 mostram as curvas de calibração de intensidade de fluorescência para as GUVs de DOPC com NBDPE e GUVs de DOPC com rodamina, respectivamente, a partir dos dados de intensidade descritos acima. As mesmas análises foram realizadas para o lipídio DEPC, porém só serão mostrados os gráficos para a DOPC. Para a construção do gráfico de calibração, 20 vesículas gigantes, contendo apenas um dos fluoróforos foram analisadas individualmente. Os valores das intensidades de fluorescência e do tamanho das vesículas foram coletados e graficados.

Para a determinação da quantidade de fluorescência de rodamina e NBDPE nas vesículas que apresentaram fusão, foi realizado um cálculo por meio da razão entre a intensidade de fluorescência obtida pelo Magneto de cada vesícula que apresenta a fusão e a intensidade obtida pelo gráfico de calibração. A partir destas análises chegou-se nas porcentagens de NBDPE e rodamina nas GUVs que apresentam ambos os fluoróforos, mostradas na figura 3.14. Assim, a vesícula gigante constituída de DOPC contém 47 % de NBDPE e 45% de rodamina, enquanto que a vesícula constituída de DEPC contém 54% de NBDPE e 45% de rodamina.

Tabela II. Quantidade de fluorescência por unidade de área de membrana, em unidades arbitrárias, medida pela análise de GUVs contendo 0,5% de NBDPE, ou 0,5% de rodamina, ou uma mistura de 1:1 dos dois (0,25% mol / mol de cada fluoróforo).

<b>Fluorescência por unidade de área de superfície da membrana (u.a.)</b>	<b>Exc. 488</b>		<b>Exc. 543</b>
	em. 515	em. 585	em. 585
0,5% de NBDPE	62600 ± 3800	80300 ± 5400	X
0,5% de rodamina	X	203100 ± 9800	226000 ± 15000
0,25% de NBDPE + 0,25% de rodamina	28800 ± 4700	120100 ± 5400	99800 ± 4800

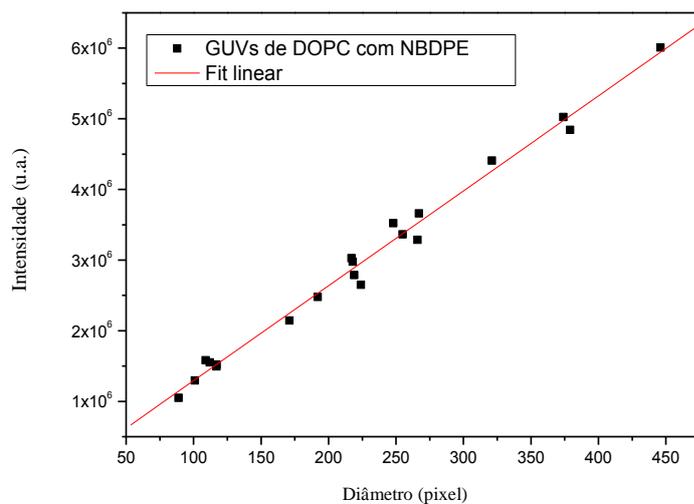


Figura 3.15. Intensidade de fluorescência em função do tamanho de GUVs constituídas de DOPC e NBDPE.

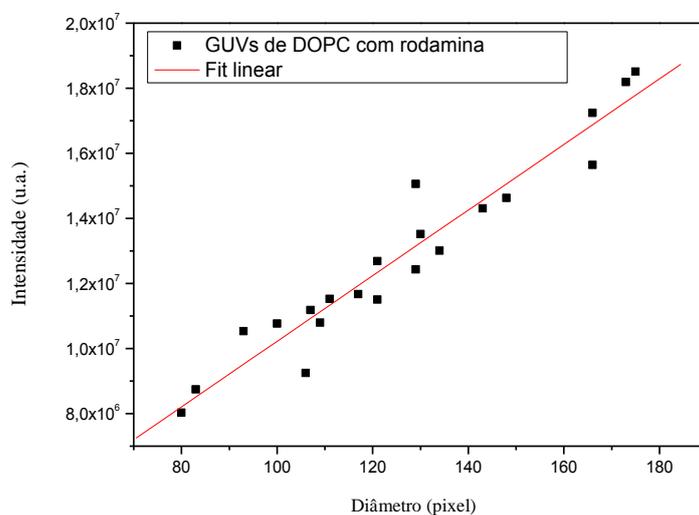


Figura 3.16. Intensidade de fluorescência em função do tamanho de GUVs constituídas de DOPC e rodamina.

Também se realizou o estudo de crescimento de GUVs de DOPC ou DEPC contendo rodamina crescidas na presença de SUVs de DOPC ou DEPC contendo NBDPE preparadas conforme a seção 3.3.2. A Figura 3.17 mostra as imagens de

microscopia confocal de GUVs com rodamina crescidas na presença de SUVs com NBDPE, sendo que as imagens superiores são de GUVs constituídas de DOPC e as imagens inferiores são GUVs constituídas de DEPC. Observa-se a presença de GUVs com e sem SUVs encapsuladas. Entretanto, não se observa a fusão dos dois fluoróforos na mesma membrana de uma determinada vesícula.

Com intuito de avaliar a influência da frequência no crescimento de GUVs na presença de SUVs, foram realizados experimentos com uma frequência de 500 Hz, sendo que os outros parâmetros de crescimento por eletroformação foram mantidos (1 V por 3 horas). Contudo, novamente observou-se a presença de GUVs com e sem SUVs encapsulados e não houve fusão de rodamina e NBDPE na mesma membrana.

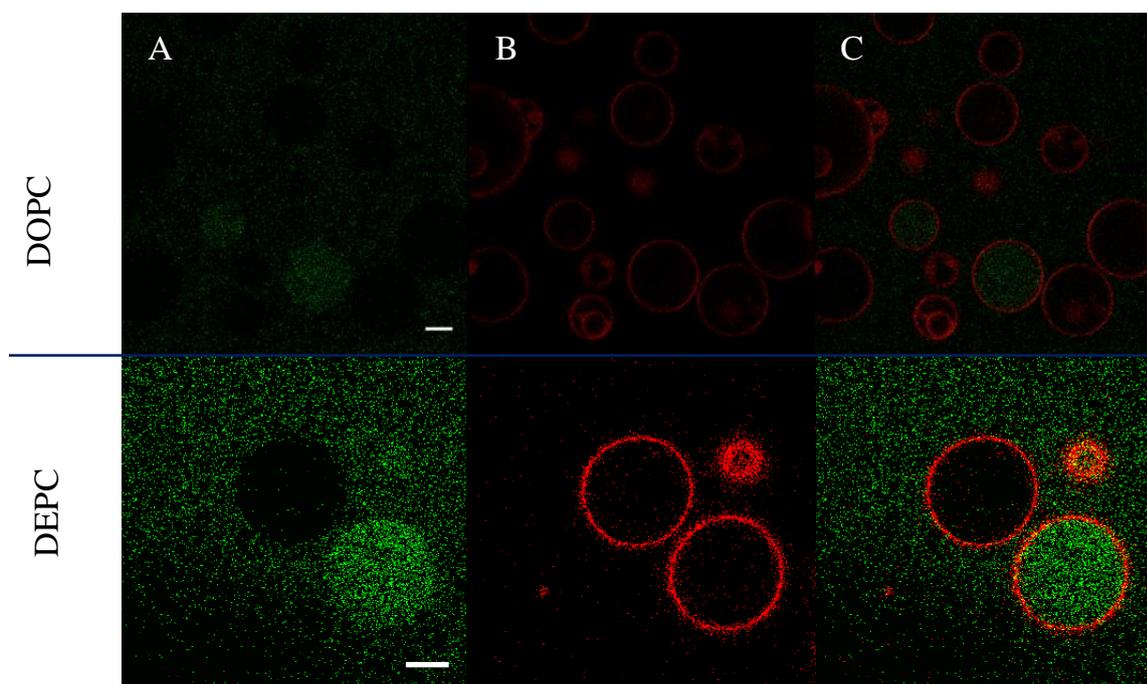


Figura 3.17 Imagens de microscopia confocal de GUVs constituídas de rodamina crescidas na presença de SUVs contendo NBDPE. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta. Barra = 10  $\mu$ m.

Assim, o estudo do mecanismo de fusão em que se utilizou de GUVs constituídas de DOPC ou DEPC mostrou que o mecanismo dominante é o descrito pelo cenário 1, no qual as vesículas se fundem com vesículas vizinhas aderidas ao mesmo substrato. Entretanto, uma minoria das vesículas é capaz de crescer por fusão por meio

do cenário 2, em que as mesmas se fundem em solução como foi observado para algumas GUVs que apresentam fusão de ambos os fluoróforos na mesma membrana.

Além disso, a diferença entre as temperaturas de transição de fases dos lipídios estudados não influenciou no processo de fusão das vesículas constituídas de DOPC ou DEPC. Com o intuito de investigar ainda mais o mecanismo de fusão durante a eletroformação, outros lipídios, agora saturados, foram estudados.

### **3.3.3 Crescimento de GUVs constituídas por fosfatidilcolinas saturadas contendo rodamina na presença de GUVs contendo NBDPE**

As fosfatidilcolinas saturadas estudadas aqui apresentam diferenças nos números de carbonos das caudas hidrocarbonadas e nas temperaturas de transição de fase principais como descrito na tabela III.

A figura 3.18 mostra as imagens de microscopia confocal de vesículas gigantes constituídas de DMPC e rodamina crescidas na presença de GUVs de DMPC e NBDPE (GUVs compostas de DLPC, 13 PC e 15 PC apresentaram o mesmo perfil de imagem). Observa-se a presença de vesículas gigantes contendo somente a rodamina (vesículas vermelhas) ou GUVs contendo somente NBDPE (vesículas verdes). Novamente, a grande maioria das vesículas gigantes apresentou somente um dos fluoróforos na membrana. Extremamente raros (< 0.2%) foram os casos em que se observou GUVs contendo ambos os lipídios fluorescentes na mesma membrana. A tabela VI sumariza os resultados obtidos para todos os lipídios estudados.

GUVs preparadas a partir do lipídio 15 PC não cresceram na temperatura ambiente pelo método de eletroformação devido a temperatura de transição de fase principal desse lipídio (33 °C), pois o mesmo se encontra na fase gel na temperatura ambiente. Portanto, as GUVs foram preparadas a 50 °C.

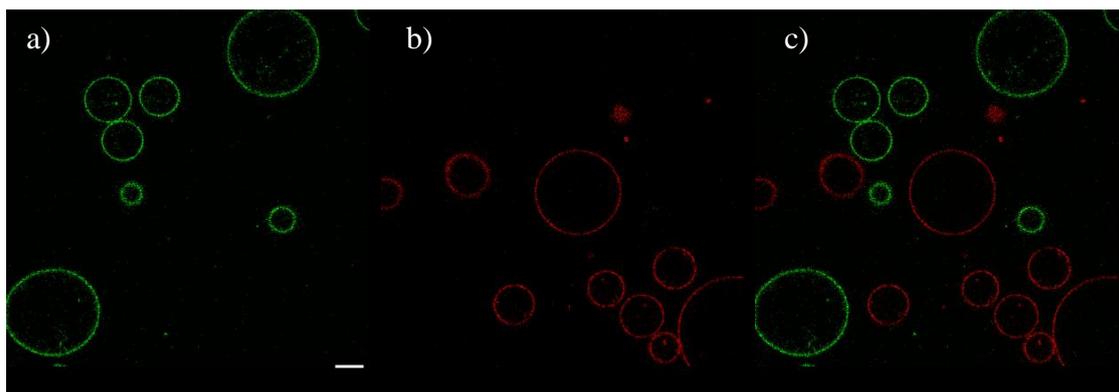


Figura 3.18. Imagens típicas de GUVs de DMPC com rodamina crescidas na presença de uma segunda geração de GUVs de DMPC com NBDPE em (a) imagens confocal com exc. 488 / em. 515 nm, (b) imagens confocal com exc. 543 / em. 585 nm, e (c) de imagem composta. Barra = 10  $\mu$ m.

A Figura 3.19 mostra as imagens de microscopia confocal de GUVs de rodamina crescidas na presença de SUVs de NBDPE. Para os lipídios DLPC, 13 PC e DMPC observou-se a ausência de GUVs com SUVs encapsuladas e não se observa a presença da fusão dos dois fluoróforos na mesma membrana de uma vesícula. Entretanto, o lipídio 15 PC apresentou GUVs com e sem SUVs encapsulados.

Para todas fosfatidilcolinas saturadas o crescimento inverso também foi testado, ou seja, GUVs contendo NBDPE (verdes) foram crescidas na presença de SUVs contendo rodamina (vermelhas). Nestes casos, observou-se o mesmo resultado descrito acima. A figura 3.20 mostra um exemplo de imagens de microscopia confocal de GUVs constituídas de DMPC contendo NBDPE crescidas na presença de SUVs de DMPC contendo rodamina. Pode-se observar apenas GUVs sem SUVs no seu interior. Além disso, novamente, em nenhum dos casos estudados constatou-se a fusão de rodamina e NBDPE na membrana de uma GUV.

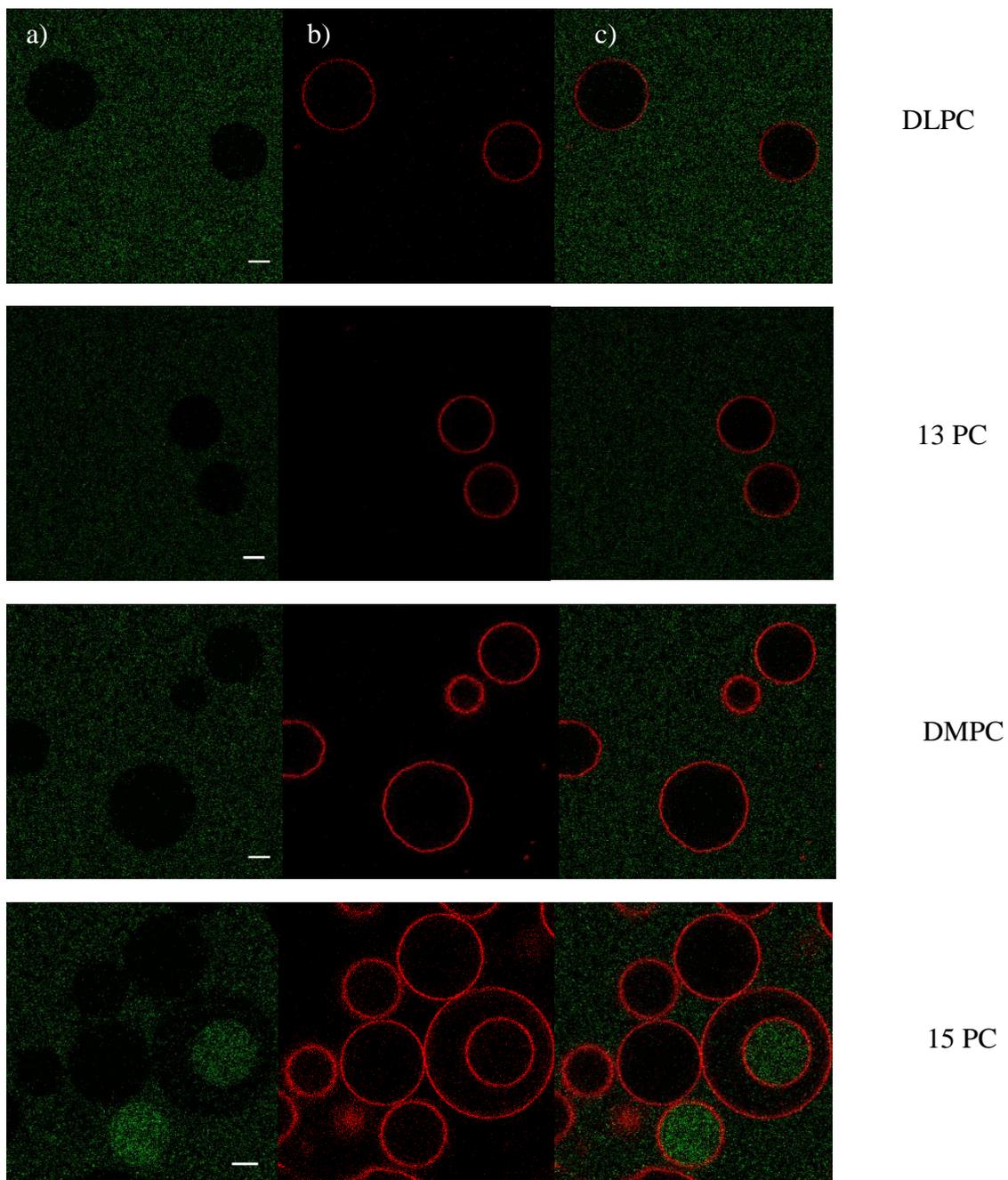


Figura 3.19. Imagens de microscopia confocal de GUVs constituídas de rodamina crescidas na presença de SUVs contendo NBDPE. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta. Barra = 10  $\mu$ m.

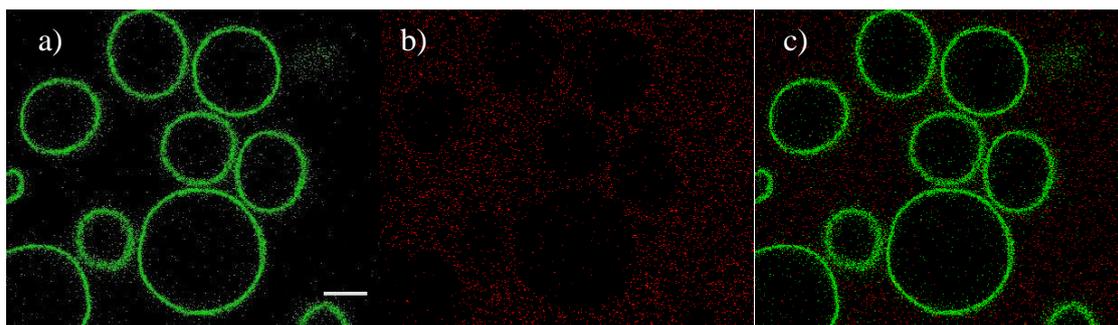


Figura 3.20. Imagens de microscopia confocal de GUVs constituídas de DMPC contendo NBDPE crescidas na presença de SUVs de DMPC contendo rodamina. Em a) exc. 488/em. 515 nm (b) exc. 543/em. 585 nm (c) imagem composta. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

A tabela III resume as análises de fluorescência das GUVs obtidas até aqui. O conjunto de lipídios explorado foi escolhido de modo a incluir tanto os lipídios insaturados quanto os saturados. A DOPC e DEPC são insaturadas, onde o primeiro lipídio apresenta uma  $T_f$  abaixo da temperatura de armazenamento das GUVs de primeira geração (4 °C), enquanto o último tem uma  $T_f$  de 12 °C, isto é, acima da temperatura de armazenamento (tal como explicado na secção experimental, em que em, primeiramente, a primeira geração GUVs ou SUVs são armazenadas a 4 °C, antes do preenchimento da célula condutora).

Os outros lípidos são saturados. A DLPC tem  $T_f$  abaixo da temperatura de armazenamento. A  $T_f$  da DMPC é muito próxima da temperatura ambiente, enquanto que a  $T_f$  da 15 PC é superior à temperatura ambiente. Como esperado as GUVs de 15 PC só puderam crescer em temperaturas elevadas, neste caso a 50 °C.

Entretanto, não se observou novamente a influência das  $T_f$  dos lipídios na fusão de vesículas. Todas as fosfatidilcolinas saturadas estudadas aqui apresentaram uma porcentagem de ocorrência de fusão menor que 0,2%.

Tabela III. Comprimento da cadeia de carbono e número de insaturações, temperatura de transição de fase, temperatura de crescimento das GUVs, ocorrência de fusão e ocorrência de encapsulamento nas GUVs estudadas.

	Comprimento da cadeia de carbono, número de insaturações	T <sub>f</sub> (°C)	Temp. de cresc. GUV (°C)	GUV/GUV ocorrência de fusão	SUV/GUV ocorrência de fusão	SUV/GUV encap.
DOPC	18: 2	-22	ambiente	< 2%	não	sim
DEPC	18: 2	12	ambiente	< 2%	não	sim
DLPC	12: 0	-1	ambiente	< 0,2%	não	não
13 PC	13: 0	14	ambiente	< 0,2%	não	não
DMPC	14: 0	23	ambiente	< 0,2%	não	não
15 PC	15: 0	33	50	< 0,2%	não	sim

Os experimentos de encapsulamento de SUVs em GUVs, como podem ser visualizados nas figuras 3.17 e 3.19, revelaram um resultado inesperado, visto que apenas as GUVs de DOPC, DEPC e 15 PC foram capazes de encapsular SUVs, enquanto que GUVs de outros lipídios (todos saturados, cadeias de carbonos mais curtas) não encapsularam qualquer SUV, como detectado dentro dos limites de sensibilidade do microscópio confocal.

Para interpretar o encapsulamento de SUVs durante o crescimento de GUVs deve-se ir além da compreensão dos mecanismos de fusão estudados neste trabalho. Na verdade, deve-se considerar como as vesículas pequenas crescem em tamanho, e eventualmente, fundem com vesículas vizinhas com subsequente fechamento da membrana no momento da liberação das vesículas a partir do substrato lipídico em bicamada. E ainda, deve-se explicar a forma que a solução aquosa penetra na região inter-bicamadas durante o inchaço da membrana no processo de crescimento das vesículas por eletroformação.

Existem duas vias de penetração das soluções aquosas para o inchamento das bicamadas no filme lipídico. A primeira via é a permeação direta através da membrana, enquanto que a segunda via é o fluxo através dos defeitos existentes nos filmes, bem como pelas bordas das bicamadas que estão empilhadas no filme (figura 3.21).<sup>65,79,94,98,</sup>

99.

As membranas fosfolipídicas exibem várias características de permeabilidade as moléculas o que representa uma barreira eficaz para muitas moléculas hidrossolúveis e íons.<sup>100-106</sup> No presente experimento, a solução aquosa é uma suspensão de lipossomas pequenos com tamanhos de aproximadamente 100 nm. Assim, pode-se esperar que uma membrana de fosfolipídios não seja permeável aos lipossomas. A penetração das SUVs seria possível se poros do tamanho certo fossem criados durante o crescimento das vesículas para que as SUVs pudessem atravessar.

Assim, a eficiência de encapsulamento de SUVs está relacionada com a competição da difusão de SUVs através dos defeitos e bordas dos filmes lipídicos e da direta permeação da solução aquosa através das bicamadas. Eventualmente, a taxa de formação de GUV também deve regular esta competição. A figura 3.21 mostra um esquema de formação de vesículas gigantes na presença de SUVs, onde pode se observar que algumas vesículas conseguem se formar com SUVs dentro e outras não.

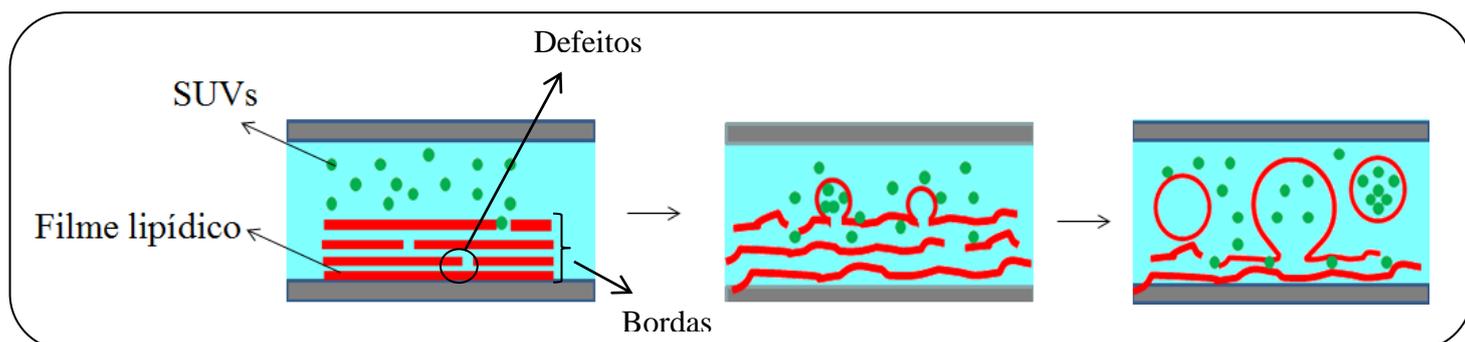


Figura 3.21. Representação esquemática do crescimento de GUVs na presença de SUVs, em que algumas vesículas conseguem se formar com SUVs encapsuladas e outras não.

O presente estudo enfatiza que os lipídios com menor comprimento de cadeia, ou seja, DLPC, 13-PC, e DMPC, não favorecem o encapsulamento, enquanto que aqueles com cadeias mais longas, ou seja, 15-PC, DOPC e DEPC, encapsulam. Surpreendentemente, há uma transição abrupta entre DMPC (14 átomos de carbono, sem encapsulamento) e 15 PC (15 átomos de carbono, com encapsulamento). Estudos revelam a dependência da permeabilidade da membrana à água e ao comprimento da cadeia de fosfolipídio,<sup>107</sup> em que pode ser visto uma diminuição da permeabilidade, pelo fator dez, quando o comprimento da cadeia varia de 12 carbonos para 18 átomos de carbono.<sup>103</sup>

Sendo assim, uma hipótese para explicar este fenômeno é que, considerando que a DLPC, 13PC e DMPC podem favorecer a penetração de água por permeação direta da membrana, as mesmas levariam a um inchaço do filme lipídico e a formação das GUVs mais rapidamente do que SUVs poderiam acessar a região inter-bicamadas para serem encapsuladas.

No entanto, outros parâmetros devem ser levados em conta na eficiência de encapsulação, como por exemplo, a elasticidade da membrana, a qual controla a amplitude de oscilação, e a frequência de fechamento da membrana, ou seja, a capacidade de formar vesículas. Assim, o presente estudo não nos permite dar uma explicação clara da tendência observada, de que GUVs de fosfolipídios mais curtos não encapsulam SUVs, enquanto GUVs de cadeias mais longas o fazem, mas certamente abre caminho para futuros experimentos sobre a capacidade de encapsulamento em GUVs durante a eletroformação.

### **3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Por meio da técnica de microscopia óptica confocal foi possível observar que durante a eletroformação de vesículas unilamelares gigantes constituídas por diferentes fosfolipídios com cabeça PC, os eventos de fusão correspondem ao majoritário mecanismo de fusão de vesículas vizinhas que se encontram no mesmo substrato lipídico.

O pequeno número de fusão de vesículas encontradas neste estudo para os lipídios DOPC e DEPC (fosfolipídios com caudas insaturados) foi mais expressiva que a encontrada para fosfolipídios com caudas saturadas. Comparando-se os fosfolipídios com diferentes temperaturas de transição de fase principal, a mesma não influenciou na fusão das vesículas. Além disso, não há nenhum efeito das diferenças de temperaturas entre a temperatura de crescimento das GUVs e as  $T_f$  dos lipídios, na proporção de ocorrência de fusão das vesículas.

A segunda tendência que apareceu neste estudo refere-se à capacidade de GUVs para encapsular SUVs submicrométricas, em que o comprimento da cadeia desempenha um papel importante neste mecanismo. Este resultado abre novas questões sobre a

forma como ocorre o fechamento da membrana em vesículas a partir de um filme lipídico multilamelar.

**Capítulo 4**

**Estudo da resposta de  
vesículas unilamelares  
gigantes com diferentes  
composições lipídicas à ação  
de campo elétrico externo**

## 4.1 INTRODUÇÃO

### 4.1.1 Exposição de membranas celulares ao campo elétrico

A exposição de membranas celulares ao campo elétrico pode levar a uma variedade de respostas. Estudos de deformação celular com aplicação de campo elétrico alternado (AC) e efeitos na mobilidade e na forma de células têm sido reportados.<sup>108-110</sup> Campos elétricos intensos (pulsos DC) podem causar um aumento significativo na condutividade elétrica e permeabilidade de membranas celulares, como também eletroporação e eletropermeabilização.<sup>111</sup>

GUVs, que são modelos de membranas biológicas, fornecem um sistema adequado para os estudos de interação de campo elétrico com bicamadas lipídicas. Neste contexto, a microscopia é uma ferramenta de suma importância para a direta visualização de respostas dessas membranas lipídicas devido à ação um campo elétrico externo.

Diferenças foram observadas quando campos elétricos AC (corrente alternada) e DC (corrente contínua) foram aplicados em vesículas. Campos elétricos AC induzem deformações estacionárias em vesículas, enquanto que pulsos elétricos curtos DC geram uma resposta muito dinâmica da vesícula e de difícil resolução por meio da gravação de vídeos padrões.<sup>3,111</sup>

### 4.1.2 Membranas lipídicas em um campo elétrico

Membranas lipídicas são essencialmente impermeáveis a íons. Dessa forma, na presença de campo elétrico externo, cargas são acumuladas em ambos os lados da membrana. Para vesículas esféricas de raio  $R$  e com um ângulo de inclinação  $\theta$  entre o campo elétrico e a superfície normal, o acúmulo de cargas na membrana aumenta o potencial transmembrana ( $V_m$ ) em função do tempo  $t$ , segundo a equação:<sup>112</sup>

$$V_m = 1,5R|\cos\theta|E \left[ 1 - e^{t \left( \frac{-1}{\tau_{car}} \right)} \right] \quad (4.1)$$

Onde  $E$  é a amplitude do campo elétrico aplicado e  $\tau_{car}$  é tempo de carga na membrana, o qual depende fortemente da condutividade da solução interna e externa à vesícula. Sendo dependente do ângulo também, o efeito do campo elétrico não é uniforme ao longo da membrana.

O termo  $\tau_{car}$  dado pela seguinte equação:<sup>112</sup>

$$\tau_{car} = RC_m \left[ \frac{1}{\lambda_{in}} + 2 \frac{1}{\lambda_{ex}} \right] \quad (4.2)$$

Nesta equação,  $\lambda_{in}$  e  $\lambda_{ex}$  são as condutividades da solução de dentro e de fora da vesícula e  $C_m$  é o capacitância da membrana. Para bicamadas lipídicas na fase líquido-cristalina,  $C_m \sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  e para membranas na fase gel,  $C_m \sim 0,45 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .<sup>113,114</sup> A diminuição da capacitância da membrana implica em pequenos  $\tau_{car}$  para vesículas na fase gel. As equações 4.1 e 4.2 são válidas apenas nos casos de membranas não condutoras, para o caso limite de soluções não salinas (baixíssima condutividade).

Para vesículas típicas com  $R = 15 \mu\text{m}$ ,  $\tau_{car}$  é de aproximadamente  $415 \mu\text{s}$ . Quanto há alta condutividade dentro e fora da vesícula o  $\tau_{car}$  adquire um valor menor. Por exemplo, na presença de um meio pouco salino, com  $5 \text{ mM}$  de solução salina o valor de  $\tau_{car}$  se torna  $50$  vezes menor. Para vesícula em condições fisiológicas ( $\sim 200 \text{ mM}$  de solução salina)  $\tau_{car}$  é aproximadamente  $0,5 \mu\text{s}$ .<sup>115,116</sup>

Quando um fraco campo elétrico alternado (AC) é aplicado em um sistema lipídico, deformações estacionárias e a migração de vesículas por dieletroforese são observadas enquanto que pulsos elétricos levam somente a curtas deformações nas vesículas. Fortes pulsos elétricos induzem a quebra ou eletroporação da membrana quando o potencial crítico transmembrana é alcançado, conforme a equação 4.1.<sup>111</sup>

Sendo as equações 4.1 e 4.2 válidas somente para membranas não condutoras, acima de um limiar de eletroporação, a membrana cria poros, tornando-se, portanto, condutora e permeável. Para além deste limiar, o potencial transmembrana não pode ser aumentado, e pode até mesmo diminuir, devido ao transporte de íons através da membrana.<sup>112,117</sup>

O acúmulo de cargas positivas, induzidas pelo campo elétrico em ambos os lados da membrana resulta em uma tensão de compressão na bicamada, dado pela

tensão de compressão de Maxwell.<sup>115,118,119</sup> Isso se deve ao fato da bicamada ser quase incompressível e, assim, o estresse é associado com um aumento na área da membrana e uma diminuição na espessura da bicamada lipídica.<sup>16</sup>

Sendo assim, o campo elétrico induz uma tensão extra,  $\sigma_{el}$ , e o alongamento da vesícula, que é dado em termos de  $V_m$  segundo a equação:<sup>111</sup>

$$\sigma_{el} = \varepsilon_m \frac{h}{2h_c^2} V_m^2 \quad (4.3)$$

Onde  $h$  é a espessura total da bicamada como, por exemplo, a DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina) que apresenta uma espessura total da bicamada de aproximadamente 5 nm a 20 °C. O termo  $h_c$  refere-se a espessura no núcleo hidrofóbico da membrana e  $\varepsilon_m$  é a constante dielétrica estática da membrana, tipicamente com um valor de 2.2  $\varepsilon_0$ , na qual  $\varepsilon_0$  é a permissividade do espaço livre.

Para vesículas com tensão inicial de  $\sigma_0$ , a tensão total alcançada durante o pulso é dada por:

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_{el} \quad (4.4)$$

A tensão de membrana total não pode exceder a tensão de ruptura. Para membranas lipídicas, a tensão de ruptura está na faixa de 5-10 dyn cm<sup>-1</sup>, que é também conhecida como a tensão de lise,  $\sigma_{lys}$ .<sup>115,120</sup>

A tensão de lise ou de ruptura pode ser alcançada quando se aplica uma tensão mecânica global na vesícula, utilizando micropipetas, ou ainda com pressão osmótica, e/ou aplicando-se localmente uma tensão elétrica. A eletroporação, por exemplo, é alcançada quando a tensão da membrana atinge a tensão de lise ( $V_m = V_c$ ).<sup>115,118,121</sup>

#### 4.1.3 Respostas de vesículas devido à aplicação de um campo elétrico externo

A forma que uma vesícula adota quando exposta a campos elétricos depende da razão de condutividade entre as soluções interna e externa da vesícula. Vesículas preenchidas com sacarose em seu núcleo e imersas em solução de glicose exibem a

forma alongada (prolate) em resposta direta a aplicação de pulsos de campo DC. Quando em presença de solução salina, as vesículas adquirem a forma cilíndrica ou de disco, dependendo da razão de condutividade. O eixo de simetria está sempre orientado paralelamente a direção do campo.<sup>122</sup>

O grau de deformação das vesículas induzidas por pulsos elétricos depende de alguns parâmetros, tais como: a força do campo, a duração do pulso, propriedades mecânicas da vesícula e a redução do volume  $v_r$  da vesícula (segunda a equação 4.5).<sup>118</sup>

$$v_r = \frac{3V/4\pi}{(A/4\pi)^{3/2}} \quad (4.5)$$

Onde  $V$  é o volume real da vesícula e  $A$  a área. Para valores fixos de  $V_m$ , membranas flexíveis devem ser mais facilmente deformadas, esticadas e rompidas.

#### 4.1.4 Deformação de membranas sob ação de um campo AC

Quando vesículas esféricas são expostas a um campo AC as mesmas assumem uma forma elipsoidal, entretanto, o tipo e o grau de deformação dependem de diversos parâmetros, tais como a força do campo elétrico  $E$ , a frequência  $\omega$  e a condutividade do meio. A tensão imposta por um campo AC é usualmente fraca ( $\leq 0.1 \text{ dyn cm}^{-1}$ ) e o principal resultado deste campo é retirar as ondulações da membrana. As ondulações dependem da rigidez da membrana e, conseqüentemente, a aplicação de campo elétrico em membranas pode ser utilizada para medir a rigidez de curvatura da membrana.<sup>123,124</sup>

A tensão que atua na membrana pode ser determinada pela equação 4.6:<sup>123</sup>

$$\sigma_{ac} = (9/8)\varepsilon\varepsilon_0 E^2 \left[ (c_1 + c_2)_{pole} - (c_1 + c_2)_{eq} \right]^{-1} \quad (4.6)$$

Onde  $\varepsilon$  é a constante dielétrica da solução aquosa,  $c_1$  e  $c_2$  são as curvaturas principais da membrana na porção equatorial da membrana (indicado por “eq”) e nos pólos da membrana (indicado por “pole”).

A deformação de vesículas, em um campo AC, é influenciada pela frequência aplicada. Em baixas frequências (poucos kHz), vesículas em água, são deformadas para a forma alongada (prolate), na qual o eixo mais longo é orientado ao longo da direção

do campo.<sup>124</sup> Em frequências intermediárias observa-se a transição da forma alongada para a forma alongada achatada nos pólos.<sup>125,126</sup> As diferentes transformações morfológicas também dependem da razão de condutividade da solução externa,  $\lambda_{ex}$ , e da condutividade da solução interna das vesículas,  $\lambda_{in}$ , como pode ser observado na figura 5.1.

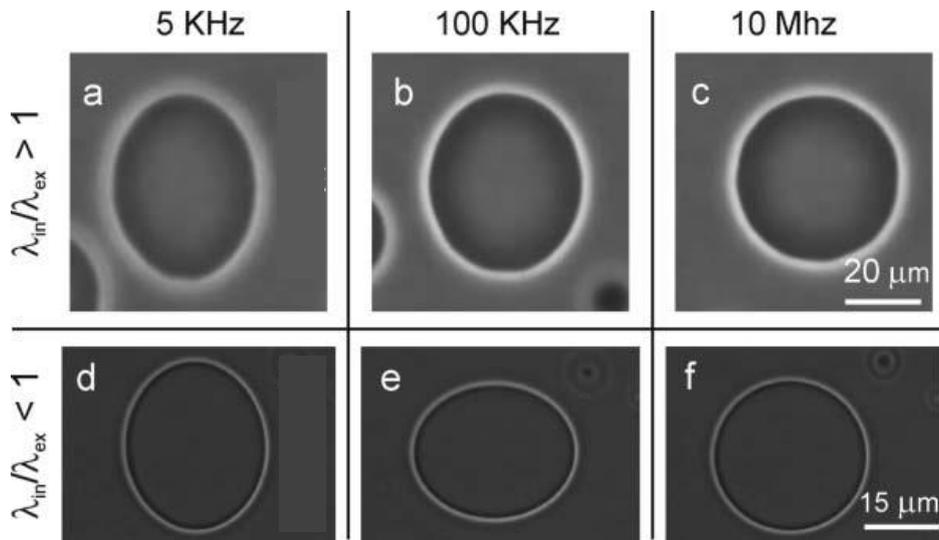


Figura 4.1. Duas vesículas gigantes (microscopia de contraste de fase), em diferentes condições de condutividade, submetidas a um campo AC de  $0,2 \text{ kV cm}^{-1}$  e diferentes frequências como indicado. A direção do campo está indicada por uma seta em (a) e (d). As condições de condutividade são  $\lambda_{in} > \lambda_{ex}$  em (a-c), onde apenas a transformação da forma alongada para a esférica é observada. Nas condições de condutividade de  $\lambda_{in} < \lambda_{ex}$  em (d-f), as transições da forma alongada para achatada nos pólos (prolate-oblate) e alongada para esférica são detectadas.<sup>111</sup>

#### 4.1.5 Dinâmica de deformação de vesículas na ausência de sal

Vesículas esféricas quando submetidas a pulsos de campo assumem forma elipsoidal, e voltam a sua forma normal após a interrupção do pulso. O grau de deformação pode ser caracterizado pela razão  $a/b$ , onde  $a$  e  $b$  são os semieixos ao longo da vesícula e perpendicular ao campo elétrico, respectivamente. Para a razão de aspecto  $a/b = 1$  a vesícula apresenta forma esférica.<sup>111</sup> A dinâmica de relaxação desta razão depende da formação ou não de poros. Na ausência de formação de poros a relaxação pode ser descrita como uma exponencial simples, com o tempo característico de

decaimento  $\tau_1$ .<sup>111</sup> A Figura 5.2 mostra um exemplo de resposta de uma vesícula gigante, inicialmente esférica.

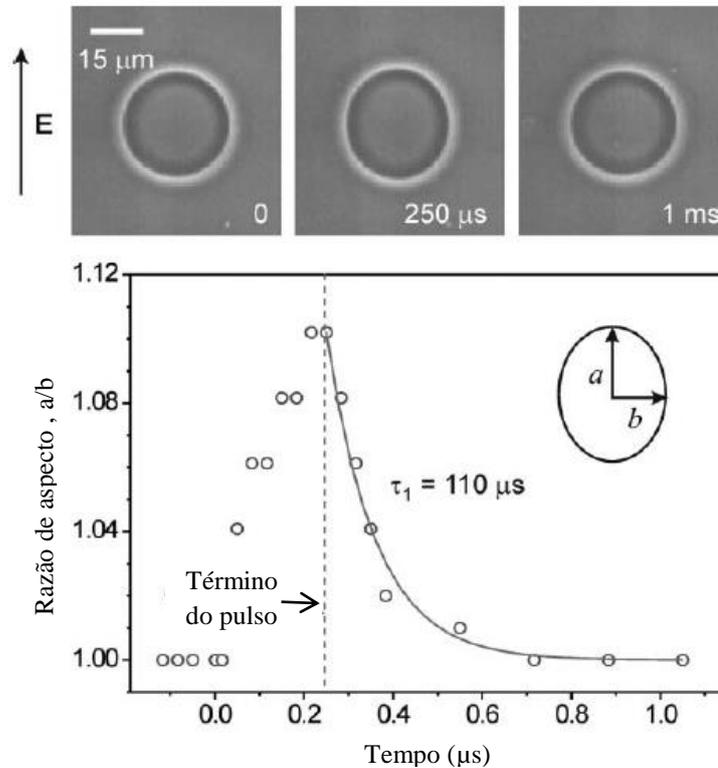


Figura 4.2. Resposta de vesícula gigante, inicialmente esférica, ao pulso de campo elétrico  $E = 1 \text{ kV cm}^{-1}$ , tempo = 250  $\mu s$ .<sup>111</sup>

A máxima deformação da vesícula corresponde em torno 10% da razão de aspecto da vesícula. O grau de deformação depende da tensão inicial da vesícula, bem como do excesso de área, o qual é definido como o excesso comparado a área da vesícula esférica de mesmo volume.

O típico decaimento do tempo de relaxação de vesículas na ausência de poros é da ordem de 100  $\mu s$ , e é definido como o relaxamento da tensão de membrana total alcançado após o término do pulso, sendo a soma da eletrotensão,  $\sigma_{el}$ , e a inicial tensão  $\sigma_0$ . Dessa forma,  $\tau_1$ , refere-se, principalmente, ao relaxamento da membrana na forma alongada,  $\tau_1 \sim \eta_m / \sigma$ , onde  $\eta_m$  é a viscosidade superficial da membrana.<sup>55,127</sup>

Portanto, perturbações em sistemas de lipídios, como vesículas, por meio da aplicação de campo elétrico, podem fornecer informações sobre as propriedades e o comportamento dinâmico de tais sistemas. Como visto a resposta de vesículas gigantes



#### 4.2.2 Preparação das amostras

As vesículas gigantes foram preparadas pelo método de eletroformação como descrito na seção 2.3 e o fluoróforo utilizado foi a rodamina (0,5% mol/mol). Para a observação e aplicação de campo elétrico nas GUVs em microscopia óptica e de fluorescência, utilizou-se uma célula, obtida da empresa Eppendorf, contendo um volume de aproximadamente 0,8 mL, como pode ser visualizada na figura 4.4.

A célula é constituída de teflon contendo uma lâmina de vidro na parte inferior, o que possibilita a visualização no microscópio óptico. Dois eletrodos de raio 0,09 mm e com distância entre eles de 0,5 mm, são fixados entre a lâmina de vidro inferior e a abertura superior da célula ilustrada pelas setas na figura 4.4. A grande distância entre os eletrodos comparados ao raio do eletrodo garante uma distribuição homogênea do campo no espaço entre os eletrodos.<sup>128</sup>

A célula de aplicação de campo elétrico foi, primeiramente, fixada ao microscópio para a visualização das vesículas e, após isso, foi conectada a fonte de tensão. A figura 4.5 mostra a fonte de tensão utilizada para a geração do campo elétrico AC. Esta fonte permitiu variar a tensão aplicada de 1 a 20 V, e uma frequência de 1 Hz a 1 MHz. O tempo de aplicação do campo variou de acordo com a resposta da vesícula.

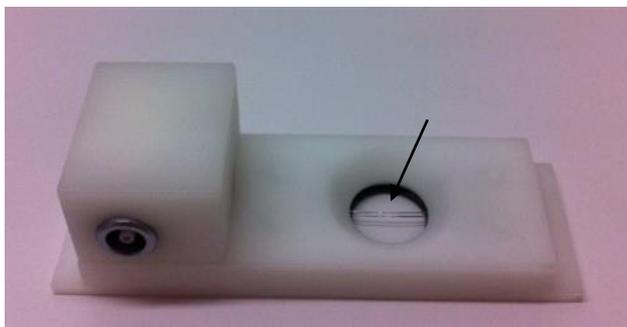


Figura 4.4. Fotografia digital da célula para a aplicação de campo elétrico durante as análises de microscopia óptica e de fluorescência. A seta indica os dois eletrodos de raio 0,09 mm e com distância entre eles de 0,5 mm.



Figura 4.5. Fotografia digital da fonte de tensão para a aplicação de campo elétrico, a qual é conectada na célula da figura 4.4.

#### 4.2.3 Preparação das vesículas unilamelares grandes (LUVs)

As LUVs foram preparadas conforme descrito na seção 2.1, utilizando-se as composições lipídicas da tabela IV.

Tabela IV. Porcentagens molares dos lipídios DOPC e SM utilizadas para a preparação das amostras de LUVs.

Amostra	Lipídios	Mol % (mol/mol)
D100	DOPC	100
D75/S25	DOPC/SM	75/25
D50/S50	DOPC/SM	50/50
D25/S75	DOPC/SM	25/75
S100	SM	100

A eficiência da etapa de cisalhamento por ultra-turrax (10 minutos 16000 rpm) foi verificada por medidas de DLS com vesículas constituídas pelo lipídio DOPC para avaliar a eficiência na obtenção de GUVs. Para tanto, foram avaliados os raios hidrodinâmicos ( $R_h$ ) das vesículas antes e depois da etapa de ultra-turrax e observou-se que antes desta etapa as vesículas apresentaram um raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) de  $\sim 200$

nm e após a etapa o  $R_h$  passa para um valor de  $\sim 80$  nm. Sendo assim, adotou-se esse procedimento para todas as amostras de LUVs estudadas.

#### 4.2.4 Microscopia

Para a observação das GUVs na ausência de campo elétrico utilizou-se o microscópio invertido TE 2000 (Nikon, Japan), equipado com objetiva a 60X imersa em água (1.2 NA Plan Apo DIC objective). As imagens em três dimensões (3D) foram realizadas, usando um laser confocal (*scanning microscopy* - CLSM) com um scan da Nikon C1. As imagens foram capturadas por meio do software EZ-C1 (Nikon, version 3.50). Com o intuito de detectar a fluorescência do fluoróforo NDBPE na membrana das GUVs no modo confocal, as mesmas foram excitadas em 488 nm (laser íon argônio, Melles-Griot). As imagens foram analisadas através do software Magneto, desenvolvido no Instituto Charles Sadron. A temperatura das análises foi  $\sim 18$  °C.

Para as imagens de fluorescência das GUVs sob aplicação de campo elétrico utilizou-se o microscópio invertido TE 2000 (Nikon, Japan), com uma objetiva de 40x devido a espessura da lâmina de vidro da célula de aplicação de campo. Para encontrar os eletrodos e as vesículas antes da aplicação do campo utilizou-se a lente objetiva de 40X em modo de contraste de fase e só depois disso é que se passou para o modo de fluorescência. O microscópio possui um sistema constituído de lâmpada fluorescente de mercúrio com o caminho óptico apresentando filtros para a seleção do comprimento de onda da luz incidente na amostra. As imagens de fluorescência foram coletadas por meio de uma câmera digital (Diagnostic Instruments NDIAG 1800) acoplada ao microscópio, o que permite que as imagens sejam gravadas na forma de um filme ou como fotografia. As imagens, após serem gravadas, foram analisadas utilizando-se o programa Magneto e as imagens foram tratadas utilizando-se o programa Image J.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 LUVs e GUVs constituídas de diferentes composições de DOPC e SM

Com o intuito de estudar as LUVs de composição de DOPC e SM e sua comparação com GUVs, foram preparadas cinco amostras de LUVs com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM conforme descrito na Tabela IV. A caracterização das LUVs foi realizada por meio das técnicas de DLS, SAXS e PZ. A tabela V resume os resultados obtidos de raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), raio de giro ( $R_g$ ), parâmetro sensitivo ( $\rho$ ), dimensão fractal ( $d_f$ ) e potencial zeta (PZ) para as amostras de LUVs.

Tabela V. Raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), raio de giro ( $R_g$ ), parâmetro sensitivo ( $\rho$ ), dimensão fractal ( $d_f$ ) e potencial zeta (PZ) para as amostras de LUVs com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM.

Amostra	$R_h$ (nm)	$R_g$ (nm)	$\rho$	$d_f$	PZ (mV)
D100	85	98	1,15	2,29	-7,96 ± 1,41
D75/S25	78	94	1,20	2,25	-15,1 ± 2,77
D50/S50	110	120	1,09	2,26	-8,41 ± 1,20
D25/S75	93	108	1,16	2,19	-13,4 ± 1,14
S100	91	104	1,14	2,06	-10,4 ± 1,23

A DOPC apresenta uma temperatura de transição de fase principal de  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , portanto as LUVs D100 se encontram na fase líquido-cristalina à temperatura ambiente. As LUVs D100 e D75/S25 apresentaram valores próximos de raio hidrodinâmico e raio de giro. Considerando que as LUVs D75/S25 apresentam pouca quantidade do lipídio SM na sua composição, pode-se esperar que as mesmas apresentassem valores similares de raio com a amostra D100 e poucos domínios (como pode ser comprovado pelas imagens de microscopia de fluorescência mostrada na figura 4.11).

Pela análise dos dados da tabela V, observou-se que a amostra D50/S50 apresentou o maior raio hidrodinâmico e maior raio de giro dentre todas as amostras. As

LUVs D50/S50 apresentam metade da composição de cada lipídio (DOPC e SM), assim, esperava-se que os domínios dessas LUVs fossem maiores ou em maior quantidade que as demais vesículas estudadas. Por meio da microscopia de fluorescência (figura 4.13) pode-se observar que os domínios estão em maior quantidade, apresentando separação da fase gel (constituída por SM) da fase líquido-cristalina (constituída por DOPC). Sendo assim, a coexistência dessas duas fases (com espessuras de bicamada diferentes) poderia proporcionar um aumento nos raios hidrodinâmico e de giro.

As LUVs D25/S75 e S100 apresentaram valores de raios muito próximos. O lipídio esfingomiéline possui uma temperatura de transição de fase principal de  $\sim 40$  °C, portanto as LUVs S100 se encontram na fase gel à temperatura ambiente. A diferença entre os raios observada entre as LUVs contendo a DOPC e SM pode estar relacionada com as deformações observadas nas vesículas que apresentaram maior quantidade de SM (D25/S75 e S100) como pode ser visualizado na figura 4.15. Estas deformações podem causar um efeito, na média, de um leve aumento de raio quando comparado com LUVs que apresentam maior quantidade de DOPC (fase líquido-cristalina).

Os valores para o parâmetro  $\rho$  encontrado para as LUVs são todos próximos do valor 1,0, indicando se tratar da topologia de esfera oca. O valor de  $\rho$  que mais se aproximou de 1,0 foi o encontrado para a amostra D50/S50.

Para vesículas, valores de dimensão fractal ( $d_f$ ) próximos a 2 referem-se a topologia de esfera oca (objetos 2D) e valores próximos a 4 são relacionados a topologia de esfera rígida.<sup>129</sup> De acordo com a tabela V todas as amostras de LUVs apresentaram valores de  $d_f$  próximos a 2. Assim, ambos os parâmetros  $\rho$  e  $d_f$  indicam que os lipossomas apresentam uma topologia de esfera oca.

O potencial zeta é um importante indicador de carga na superfície de colóides e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de sistemas coloidais. Valores elevados de potencial zeta indicam vesículas estáveis em suspensão devido a repulsão entre as partículas causada pela carga superficial, o que evita a agregação.<sup>130</sup> De acordo com a tabela V, o PZ obtido para as cinco amostras de LUVs foi negativo. O potencial elétrico superficial negativo das vesículas indica relativa estabilidade coloidal em relação aos processos de agregação, ou seja, quando uma vesícula em difusão se encontra com outra na suspensão, elas irão se repelir, devido a carga superficial.

Para a determinação do coeficiente de difusão, foram realizadas medidas de  $R_h$  variando-se os ângulos e a análise foi feita por meio do programa REPES.<sup>66</sup> Através

desse programa obtiveram-se as curvas de correlação temporal e a distribuição dos tempos de relaxação para as amostras de LUVs em diferentes ângulos.

O valor da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) pode ser calculado por meio do algoritmo REPES ( $\Gamma = \tau^{-1}$ ) e através do coeficiente angular da reta  $\Gamma$  vs.  $q^2$  pode-se obter o coeficiente de difusão translacional ( $D_T$ ).

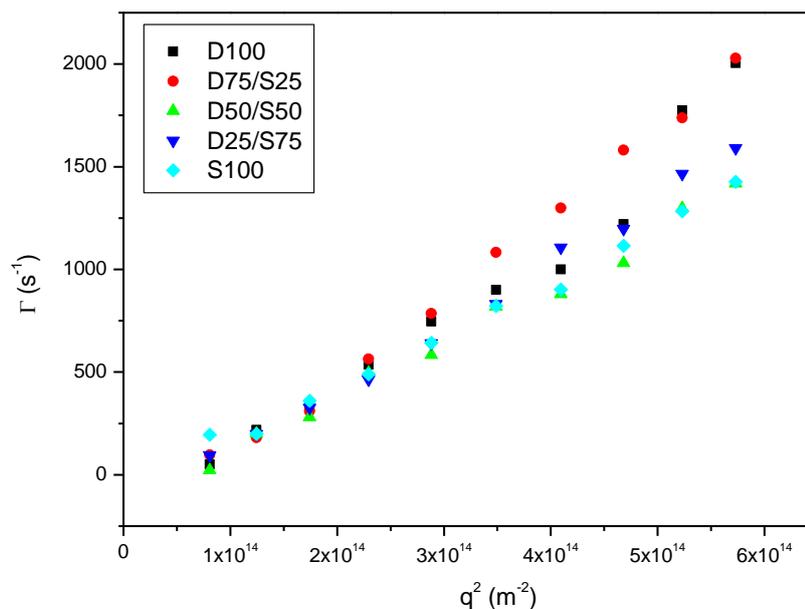


Figura 4.6. Relação linear de  $\Gamma$  vs.  $q^2$

A Figura 4.6 mostra a dependência linear de  $\Gamma$  por  $q^2$  confirmando o caráter difusivo das LUVs.<sup>131</sup> Considerando o movimento Browniano dos lipossomas em suspensão, o  $D_T$  atua de forma inversa ao  $R_h$ . Assim, com o aumento do  $R_h$  há uma diminuição de  $D_T$ . A Tabela VI mostra os valores de coeficiente de difusão obtidos para as amostras de LUVs estudadas.

Tabela VI. Valores de  $D_T$  para as amostras de LUVs com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM.

<b>Amostra</b>	<b><math>D_T \cdot 10^{-12}</math> (m/s)</b>
D100	3,70
D75/S25	4,01
D50/S50	2,73
D25/S25	3,01
S100	2,54

De um modo geral, as amostras contendo maior porcentagem molar de SM apresentaram os menores  $D_T$ , indicando  $R_h$  maiores. Entretanto, a amostra D50/S50 apresentou um valor de  $D_T$  maior que a amostra S100.

A técnica de SAXS é uma ferramenta fundamental no estudo de materiais sintetizados a partir de materiais polidispersos ou biológicos. Este método permite, por exemplo, a obtenção de informações estruturais sobre a organização de sistemas vesiculares.<sup>75</sup>

LUVs são objetos adequados para o experimento de SAXS quando o sistema é suficientemente diluído, no qual as interações entre as vesículas são minimizadas ou completamente eliminadas, resultando em um fator forma contínuo. Todavia, sistemas de LUVs diluídos produzem fracos espalhamentos. Assim, vesículas multilamelares (MLVs) são mais frequentemente usadas nos experimentos de SAXS, pois as várias bicamadas lipídicas são mais organizadas e desta forma produzem um espalhamento mais coerente que resulta em picos bem definidos. Além disso, a análise de dados de difração de MLVs, a partir do pico de Bragg, permite obter informações estruturais sobre os lipossomas multilamelares, tais como: a distância de repetição lamelar e o número médio de lamelas.<sup>75,77,132</sup>

A Figura 4.7 apresenta as curvas de SAXS obtidas para as vesículas com diferentes composições dos lipídios DOPC e SM.

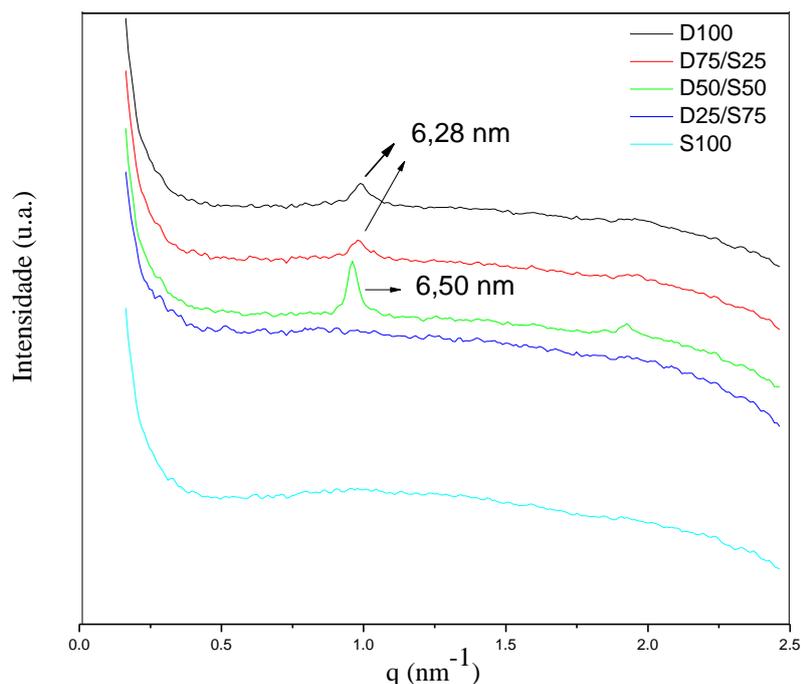


Figura 4.7. Curvas de SAXS das LUVs constituídas por diferentes composições dos lipídios DOPC e SM.

Pode-se observar na figura 4.7, que as amostras D100, D75/S25 e D50/S50 apresentaram picos de Bragg que são característicos de vesículas multilamelares, sugerindo que a etapa de ultra-turrax não foi suficiente para a homogeneização dessas suspensões. Além disso, os picos de Bragg definidos podem estar relacionados com a fase líquido-cristalina ( $L_a$ ), na qual as cadeias hidrocarbonadas se encontram num estado completamente relaxado, ocupando de forma homogênea o espaço entre planos formados pelos grupos polares.<sup>133</sup> O espaçamento entre planos adquire um ordenamento de longo alcance que é sugerido pela pequena largura do pico e pelo aparecimento de uma segunda ordem de difração, como é visto mais intensamente na curva de SAXS da amostra D50/S50.

A distância de repetição lamelar  $d$ , que consiste na espessura da bicamada lipídica mais a camada de água existente entre as lamelas, pode ser calculada a partir da posição ( $q$ ) do primeiro pico ( $d = 2\pi/q$ ) no espectro de SAXS.<sup>75</sup> As amostras D100 e D75/S25 apresentaram um valor de  $d = 6,28$  nm, enquanto a amostra D50/S50 apresenta um  $d = 6,50$  nm.

As LUVs D50/S50 apresentaram um perfil de SAXS que difere do observado para as demais amostras. Uma explicação possível para este fato observado pode ser a

composição desta membrana lipídica. As LUVs D50/S50 apresentaram domínios em grande quantidade como mostrado na figura 4.13. A presença desses domínios de forma relativamente regular, poderia ter certo ordenamento a longo alcance, assim, aparecendo um pico definido no espectro de SAXS.

As amostras D25/S75 e S100 não apresentaram picos de Bragg, sugerindo apenas a existência de vesículas unilamelares em suspensão. Os perfis de SAXS das amostras D25/S75 e S100 podem estar relacionados também com a fase gel, pois nessa fase o plano das bicamadas assume pequenas ondulações, não havendo mais um ordenamento ao longo alcance, observando-se, então, uma banda alargada no espectro de SAXS.<sup>75,133</sup>

As imagens de microscopia óptica de fluorescência indicaram que as GUVs constituídas somente de DOPC não apresentaram separação de fases como esperado, e apresentaram, em média, diâmetros superiores a 20  $\mu\text{m}$ , como pode ser observado na figura 4.8. A progressão das imagens indica os diferentes planos focais da vesícula. Este procedimento é adotado para a visualização de eventuais domínios que possam existir na membrana (que vão se apresentar nos diferentes planos focais da vesícula). Na presença de separação de fases, os domínios aparecem na forma de manchas escuras nas imagens de fluorescência das GUVs, como será verificado mais adiante neste capítulo.

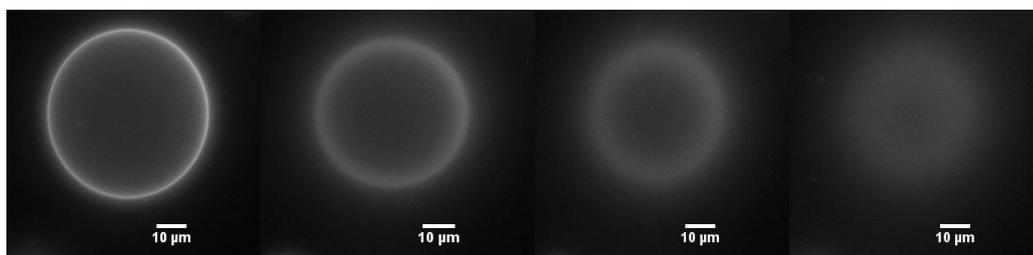


Figura 4.8. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de DOPC e 0,5% de NBDPE.

As GUVs constituídas somente de SM não cresceram na temperatura ambiente pelo método de eletroformação. Esse fato deve-se a temperatura de transição de fase desse lipídio ( $\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) que se encontra na fase gel a temperatura ambiente. Sendo assim, as GUVs constituídas de SM foram crescidas em estufa a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e não apresentaram domínios. A figura 4.9 mostra a progressão de imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma vesícula gigante constituída de SM e nela podem-se observar as

deformações de membrana. Estas deformações estão relacionadas com a  $T_f$  (40 °C) desse lipídio ser próxima da temperatura utilizada para o crescimento dessas vesículas (50 °C). Próximo a fase gel, as membranas das vesículas se tornam mais rígidas e o crescimento das mesmas, a partir de um filme lipídico, é dificultado como esquematizado na Figura 4.11. Na figura 4.10 também se pode observar deformações da membrana GUVs constituídas de SM por microscopia confocal (3 D).

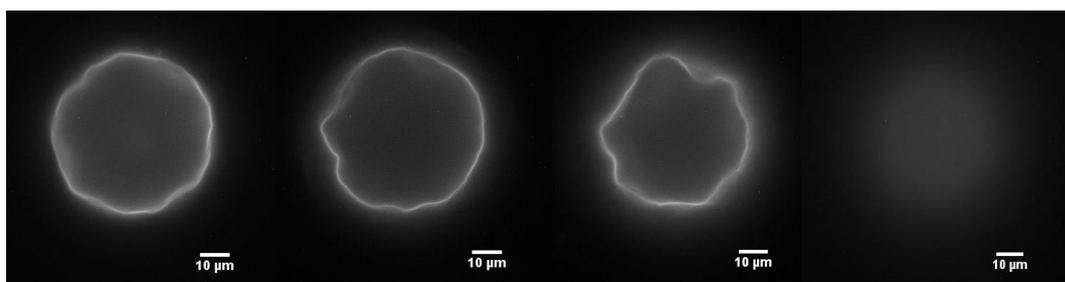


Figura 4.9. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de SM (S100) e 0,5% de NBDPE.

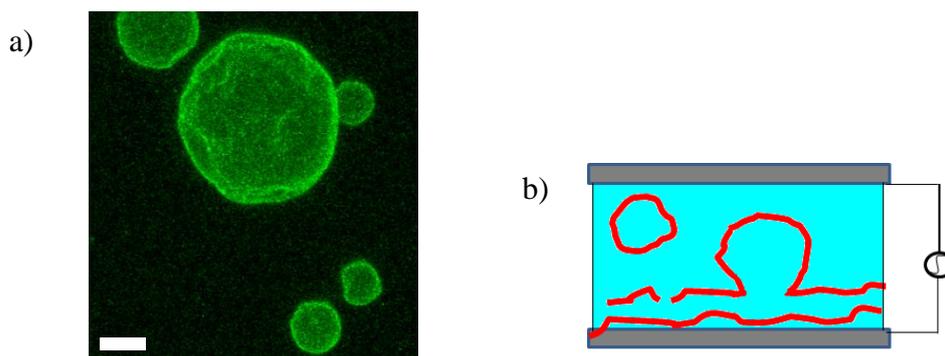


Figura 4.10. (a) Imagem de microscopia confocal (3D) de GUVs constituídas de SM e 0,5% de NBDPE. Barra = 10 µm. (b) Representação esquemática da célula de crescimento de GUVs de esfingomiéline a partir de um filme lipídico multilamelar pelo método de eletroformação.

As GUVs constituídas de 75% de DOPC e 25% de SM (D75/S25) apresentaram alguns domínios e, na média, tem diâmetros superiores a 20 µm. A figura 4.11 apresenta as imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV (D75/S25) em que se pode visualizar, na progressão das imagens, o surgimento de manchas escuras na superfície da vesícula. Essas manchas são os domínios. As diferentes fases que coexistem na membrana podem ser diretamente visualizadas com a utilização de fluoróforos que se ligam preferencialmente a uma das fases presentes na membrana,

deixando, assim, a outra fase escura pela ausência da molécula fluorescente.<sup>134</sup> O fluoróforo utilizado nos experimentos foi o NDBPE, que apresenta na sua cadeia hidrocarbonada duas insaturações, assim, ligando-se preferencialmente a fase líquido-cristalina. A presença da dupla ligação introduz uma torção na cadeia dos hidrocarbonetos impedindo-a de se empilhar adequadamente com os outros lipídios saturados, promovendo a sua partição na fase líquido-cristalina. Assim, presumi-se que a fase que se apresenta escura na GUVs seja a fase gel, formada pelo lipídio SM.

Na figura 4.12, em que se ilustra as imagens de microscopia confocal de uma vesícula gigante constituída de 75% de DOPC e 25% de SM, observa-se também a presença de domínios na superfície da vesícula (indicado por uma seta).

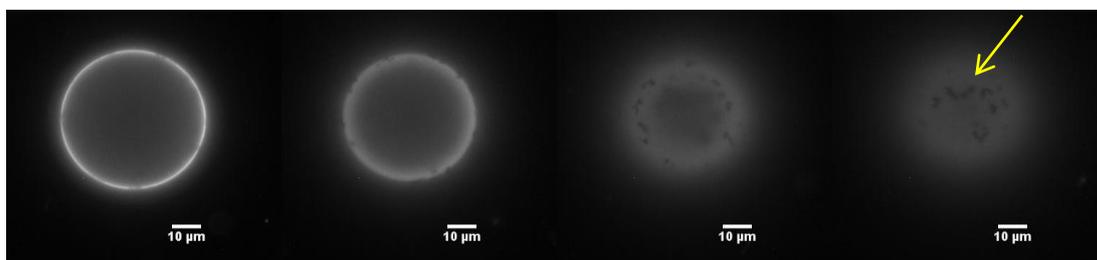


Figura 4.11. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de 75% de DOPC e 25% de SM, contendo 0,5% de NBDPE. A seta indica a presença de domínios.

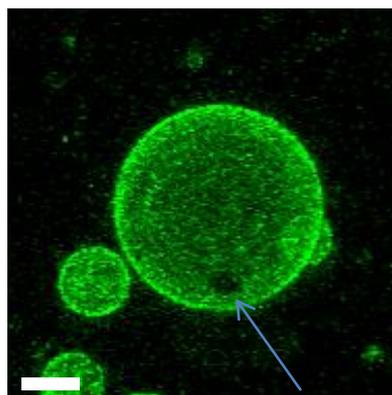


Figura 4.12. Imagem de microscopia confocal (3D) de uma GUV constituída de 75% de DOPC e 25% de SM, contendo 0,5% de NBDPE. A seta indica a presença de um domínio. Barra = 10 µm.

Já as GUVs constituídas de 50% de DOPC e 50% de SM (D50/S50) revelaram um número maior de domínios e, em geral, as membranas dessas vesículas apresentaram-se deformadas (Figuras 4.13 e 4.14). Os domínios presentes nessa composição lipídica estão bem descritos na literatura.<sup>135-139</sup> A presença de 50% de esfingomiélna na composição dessas vesículas e o crescimento por eletroformação realizado na temperatura ambiente explicam as deformações observadas nas imagens de microscopia.

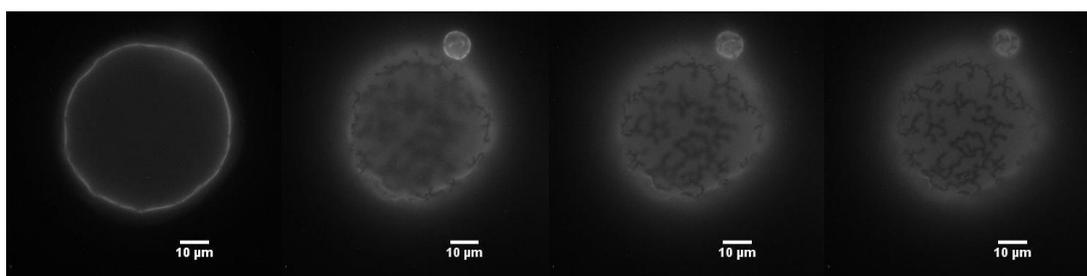


Figura 4.13. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GUV constituída de 50% de DOPC e 50% de SM contendo 0,5% de NBDPE.

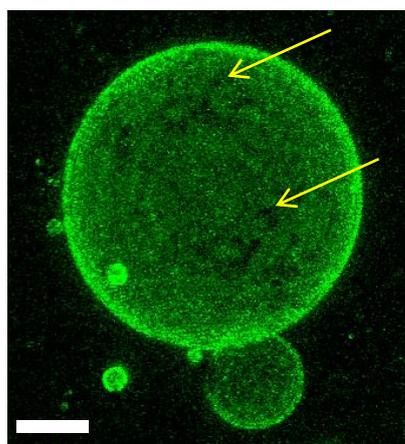


Figura 4.14. Imagem de microscopia confocal de uma GUV constituída de 50% de DOPC e 50% de SM contendo 0,5% de NBDPE. As setas indicam a presença de domínios. Barra = 10 µm.

As GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM (D25/S75), crescidas a temperatura ambiente, apresentaram um comportamento diferente. Metade das vesículas não apresentaram domínios e, em geral, são maiores do que a outra metade das vesículas que possuem domínios (Figura 4.15).

O fato do crescimento dessa composição de GUVs (D25/S75) ocorrer em temperatura ambiente pode influenciar na composição das mesmas. Logo após a injeção

da solução de sacarose na célula condutora, as vesículas que contenham grande quantidade de DOPC podem começar a crescer antes, formando vesículas com composição homogênea e sem domínios. As vesículas menores e que possuem domínios, podem ter uma formação mais lenta e sendo compostas por uma composição lipídica de DOPC e grande quantidade de SM, formando, assim, uma mistura que propicia a separação de fases.

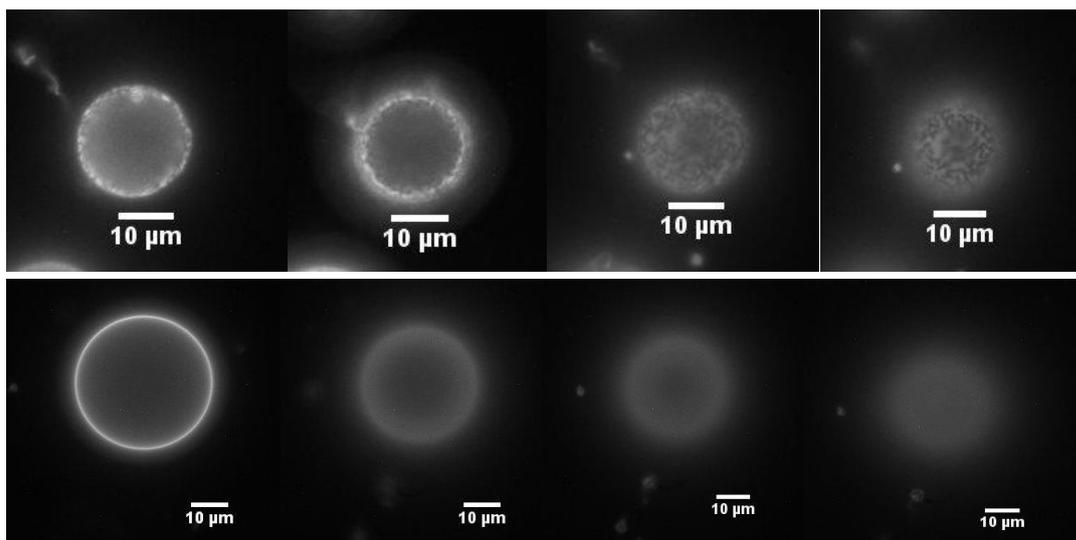


Figura 4.15. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM contendo 0,5% de NBDPE. Nas imagens superiores: GUV que apresenta separação de fases. Nas imagens inferiores: GUV que não apresenta separação de fases.

Avaliou-se a influência da temperatura no crescimento de todas as GUVs compostas por DOPC e SM estudadas. Para tanto, dois métodos foram testados. No primeiro, a injeção da solução de sacarose na célula condutora foi realizada a temperatura ambiente e depois a célula foi colocada na estufa a 50 °C, previamente aquecida, e foram, então, conectados os cabos da fonte de tensão para o crescimento das vesículas. No segundo método, tanto o filme lipídico na célula condutora, quanto a seringa contendo a solução de sacarose, foram mantidos por 30 minutos a 50 °C na estufa, antes da injeção da solução na célula. Após 30 minutos foi, então, injetada a solução de sacarose e os cabos da fonte de tensão foram conectados à célula.

O crescimento em estufa a 50 °C em comparação ao crescimento à temperatura ambiente não apresentou significativa diferença quanto aos domínios formados para as amostras de GUVs D50/S50 e D75/S25.

Entretanto, para as GUVs contendo 25% de DOPC e 75% de SM, onde o crescimento das mesmas se deu pelo primeiro método, constatou-se que a grande maioria das vesículas não apresentou domínios. Apenas um número muito reduzido de vesículas apresentou domínios e com diâmetros próximos a 20  $\mu\text{m}$ . A Figura 4.16 mostra a imagem de microscopia óptica de fluorescência de uma vesícula gigante com diâmetro superior a 20  $\mu\text{m}$  e sem domínios próximos a uma vesícula pequena que apresenta domínios de separação de fases.

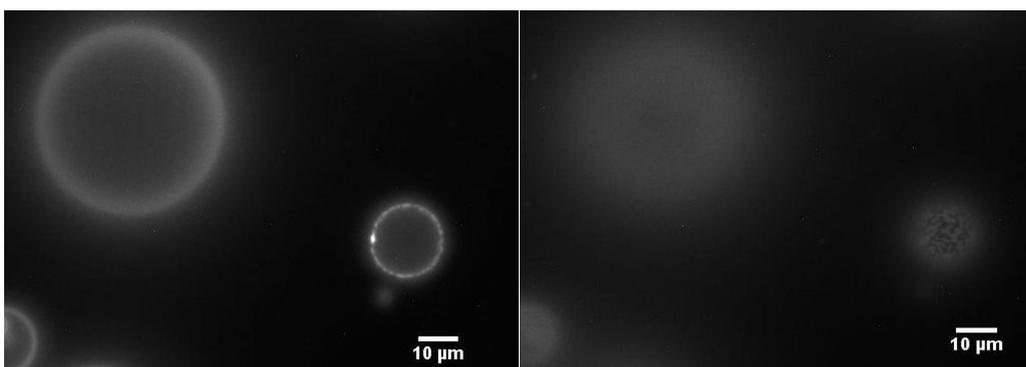


Figura 4.16. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM contendo 0,5% de NBDPE que não apresentam domínios ao lado de uma GUV que apresenta domínios.

O crescimento em estufa das GUVs D25/S75 pelo segundo método revelou que todas as vesículas apresentaram domínios, como pode ser observado na Figura 4.17. A temperatura elevada pode estar favorecendo um crescimento mais homogêneo das vesículas compostas por misturas dos dois lipídios. Pelo fato da SM apresentar uma elevada  $T_f$  o crescimento de GUVs constituídas de SM não é favorecido em temperaturas abaixo de sua  $T_f$ . Quando o crescimento se dá em forno e, portanto, na temperatura acima de sua  $T_f$ , existe uma maior probabilidade das vesículas crescerem contendo quantidades dos dois lipídios na mesma membrana (DOPC e SM).

Assim, a temperatura de crescimento pelo método de eletroformação influenciou no tamanho das GUVs e na formação dos domínios nas vesículas constituídas por 25% de DOPC e 75% de SM.

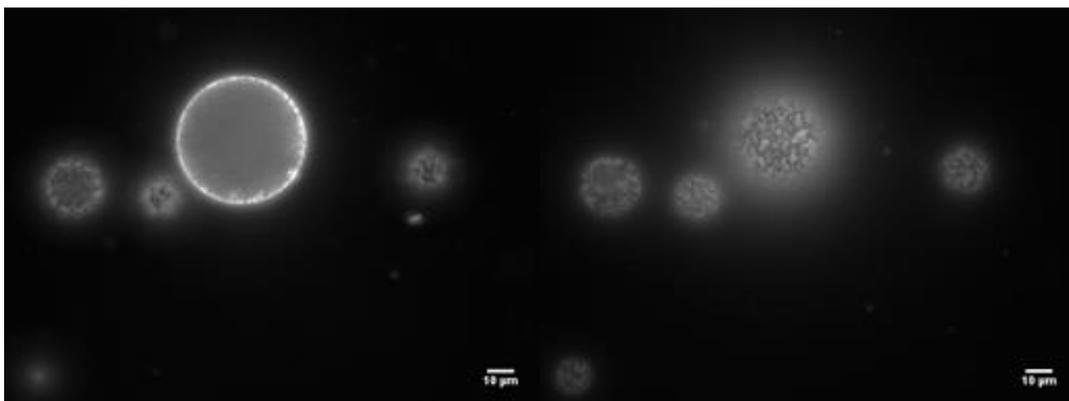


Figura 4.17. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM contendo 0,5% de NBDPE crescidas em estufa a 50 °C.

Sendo assim, as técnicas de microscopia óptica e de fluorescência são ferramentas fundamentais para o estudo de separação de fases em GUVs, pois possibilitam a direta visualização dos domínios em vesículas individuais, em função dos domínios apresentarem tamanhos de alguns micrômetros. No entanto, o estudo de domínios de separação de fases por meio de LUVs, compostas por misturas binárias de lipídios, é limitado. Técnicas indiretas isoladas, tais como: DLS e SAXS, não são capazes de avaliar com precisão a formação de domínios em vesículas com tamanhos próximos a 200 nm. Essas técnicas podem fornecer resultados satisfatórios quando aliadas ao uso de vesículas gigantes e técnicas de microscopia óptica, auxiliando, assim, na compreensão do comportamento de vesículas que apresentam domínios.

#### 4.3.2 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DOPC e SM

Nos experimentos realizados com GUVs sob aplicação de campo elétrico, dois parâmetros poderiam ser variados: a tensão (de 1 a 20 V) e a frequência (1 Hz a 1 MHz). Verificou-se que, utilizando-se frequências abaixo de 60 Hz, as GUVs se movimentavam muito em solução. O mesmo ocorreu com frequências acima de 80 Hz, com posterior aglomeração das vesículas. Sendo assim, depois de muitos testes e ajustes, a frequência, dos experimentos, foi mantida fixa em 60 Hz.

Escolheu-se estudar a respostas da aplicação de campo elétrico externo em GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM (preparadas na temperatura ambiente), pois nesta composição lipídica uma parte das vesículas não evidencia uma separação de fases visível em microscopia óptica de fluorescência, enquanto a outra

parte das vesículas apresentam muitos domínios, como discutido na seção 4.3.2. Assim, o objetivo foi verificar se o campo elétrico aplicado poderia influenciar na formação de domínios em GUVs que não apresentaram separação de fases visíveis após o preparo das mesmas por eletroformação a temperatura ambiente. Para tanto, utilizou-se as condições experimentais de 2 V e 60 Hz por um tempo de 2 horas na célula de aplicação de campo contendo as GUVs.

A figura 4.18 mostra que, após 20 minutos da aplicação do campo elétrico, ocorreu a formação de pequenos filamentos internos nas vesículas que aumentavam em tamanho com tempo. Esses filamentos internos, compostos por lipídios e a rodamina, podem ser observados na figura 4.18 por meio das setas. Cabe ressaltar que a célula foi mantida fechada, pois a evaporação também produz esses filamentos internos. Também foi possível observar que alguns filamentos internos formados (figura 4.18b) formaram esferas após uma hora e meia da aplicação do campo elétrico (figura 4.18f).

Portet e colaboradores<sup>140</sup> estudaram o efeito da permeabilização em GUVs compostas de DOPC devido à aplicação de pulsos de campo elétrico (DC) e verificaram a ocorrência de perda de lipídios da membrana e a diminuição do diâmetro. Um dos mecanismos da perda de lipídios observado por eles, por meio de microscopia confocal, foi a formação de filamentos a partir da membrana as GUVs. Esses filamentos, contendo moléculas de DOPC, eram expelidos da membrana das GUVs que se rearranjavam em forma de túbulos aumentando de tamanho com o aumento do número de pulsos aplicados. A ocorrência desses filamentos dependeu da quantidade e do tempo dos pulsos elétricos aplicados, pois existe um potencial crítico de membrana acima do qual a mesma se torna permeável ou suscetível a perda de lipídio.<sup>140</sup> Eles também observaram a formação de pequenas vesículas a partir da membrana de GUVs de DOPC sob a aplicação de pulsos elétricos (DC). Este foi o mecanismo mais frequentemente observado por eles para a perda de lipídios da membrana das GUV, seguido da formação de filamentos. O outro mecanismo (pouco observado) foi a formação de poros e eventual ruptura da membrana.<sup>140</sup>

É importante mencionar que a realização desse experimento só foi possível devido à utilização do fluoróforo rodamina que apresenta um longo tempo de emissão de fluorescência, sem sofrer foto-branqueamento (perda de fluorescência, podendo ser resultante de uma degradação química induzida pela exposição a um fluxo de fótons). Além disso, as imagens das vesículas sob ação do campo foram coletadas de tempos em

tempos para evitar a excessiva exposição da rodamina ao feixe de luz incidente, haja vista que uma mesma vesícula foi observada durante as 2 horas de experimento. Assim, para o controle da posição da vesícula escolhida utilizou-se o modo de contraste de fase, e a cada 10 minutos, ou quando algo era detectado nas GUVs, filmes foram coletados no modo fluorescência.

Tipos de filamentos lipídicos similares aos observados nos experimentos de aplicação de campo elétrico são normais de serem encontrados no interior das GUVs devido a defeitos de formação das mesmas pelo método de eletroformação.<sup>79</sup> Entretanto, o que se observou com a aplicação do campo foi que em vesículas, inicialmente sem defeitos, com o decorrer do tempo e de uma determinada tensão, filamentos surgiram no interior das GUVs.

A análise da influência do campo elétrico na formação dos domínios em GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM foi dificultada pela utilização da objetiva de 40X que não apresenta uma boa resolução. O uso deste aumento se deve a grande espessura do vidro inferior da célula, não permitindo o uso da objetiva de 60X (que apresenta boa resolução para a visualização de domínios).

Após vários experimentos com a aplicação de 2 V e 60 Hz por 2 horas, verificou-se que não houve mudança significativa nas GUVs que não apresentavam inicialmente domínios visíveis. Entretanto, após o término do experimento, as mesmas foram transferidas para um lamínula de observação no microscópio de fluorescência e, então, utilizou-se a objetiva de 60X para avaliar a amostra de GUVs. Assim, observou-se que mais de 90% das GUVs apresentavam separação de fases como mostrado na figura 4.19. É importante mencionar que antes da aplicação do campo elétrico, as GUVs foram observadas com a objetiva de 60X. Neste momento, foi constatado que 50% das GUVs apresentavam domínios, enquanto 50% não apresentavam.

Devido a limitação da resolução das imagens durante a observação da aplicação de campo na célula, é difícil afirmar que o campo elétrico induza a formação de separação de fases. Além disso, a transferência, mesmo cuidadosa, das GUVs da célula para a lamínula pode provocar a ruptura da membrana de algumas vesículas maiores que não apresentem domínios.

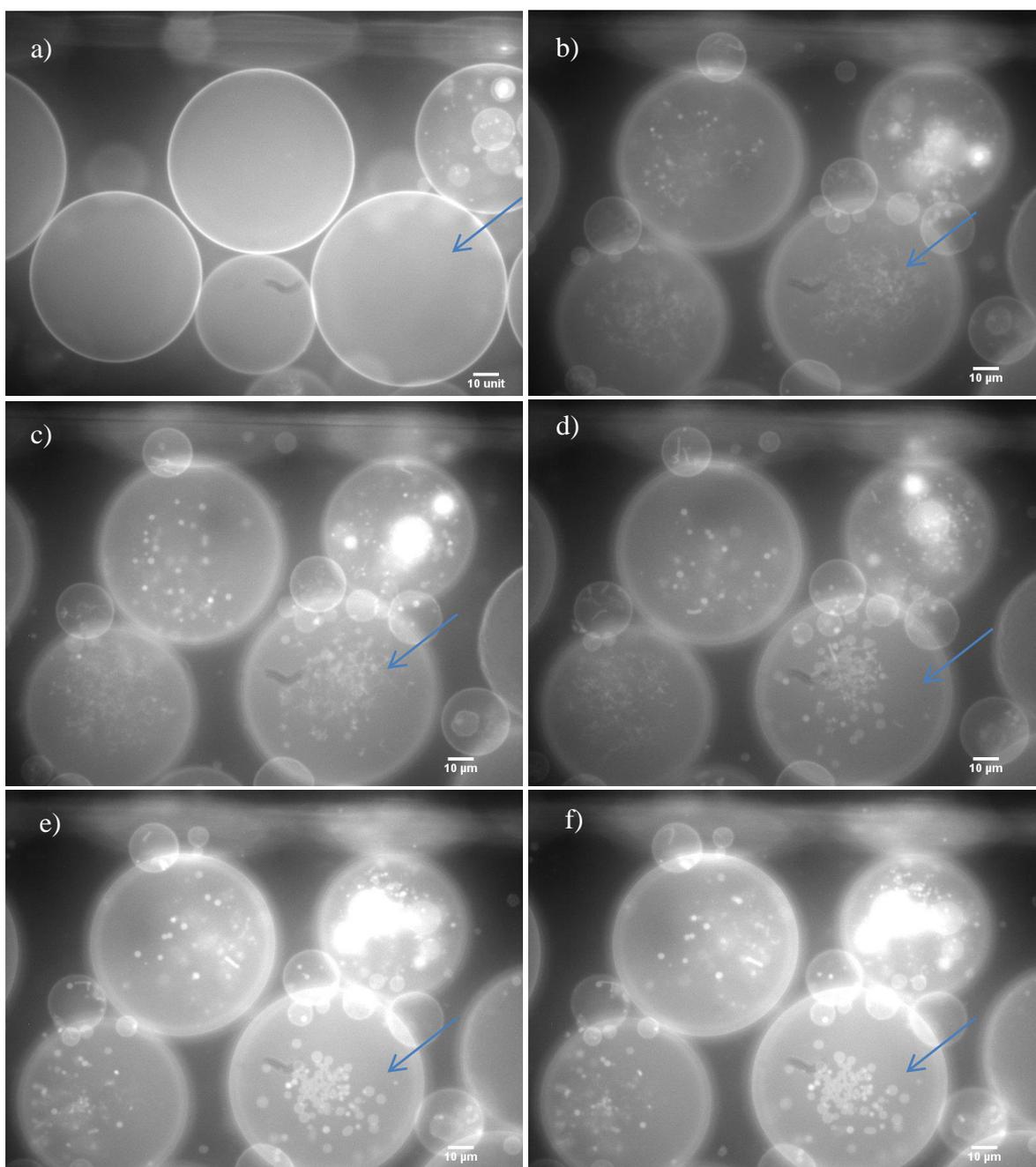


Figura 4.18. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de GUVs constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM, contendo 0,5% de rodamina, sob aplicação de 2 V e 60 Hz por 3 horas.

Contudo, estudos revelaram que o campo elétrico pode induzir uma reorganização lateral dos lipídios em membranas em bicamadas na fase líquido-cristalina. Groves e colaboradores<sup>141</sup> mostraram que, em membranas em bicamadas

planares suportadas, o campo elétrico induziu a uma separação da cardiolipina e da fosfatidilcolina.

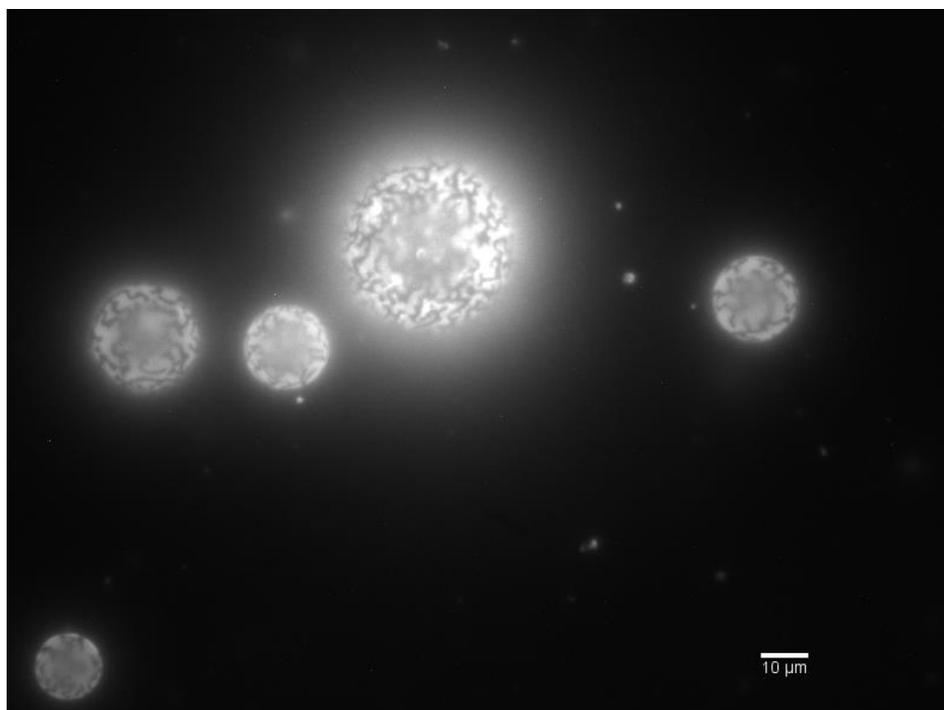


Figura 4.19. Imagens de microscopia de fluorescência de GUVs de DOPC constituídas de 25% de DOPC e 75% de SM, contendo 0,5% de rodamina, após a aplicação de 2 V e 60 Hz por 3 horas.

Assim, no presente trabalho, as GUVs que não continham domínios antes da aplicação do campo, poderiam ser constituídas de DOPC e SM, formando uma mistura homogênea ou com domínios não detectáveis pela resolução da técnica de microscopia de fluorescência. A ação do campo elétrico poderia ocasionar uma segregação de moléculas de SM, contendo cadeias hidrocarbonadas saturadas, de moléculas de DOPC, permitindo, assim, a visualização dos domínios utilizando-se a objetiva 60X.

#### 4.3.3 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DOPC

A resposta de GUVs em função do campo elétrico externo foi também avaliada utilizando-se o lipídio DOPC. A DOPC apresenta uma temperatura de transição de fase

principal de  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, portanto, encontra-se na fase líquido-cristalina na temperatura ambiente.

Quando as membranas passam da fase líquido-cristalina para a fase gel, a rigidez de curvatura da membrana aumenta drasticamente.<sup>142</sup> Dessa forma, a dinâmica de eletrodeformação das vesículas da fase gel e da fase líquido-cristalina difere significativamente. Knorr e colaboradores<sup>16</sup> estudaram o comportamento de GUVs de DPPC, na fase gel, expostas a fortes pulsos elétricos. Ele constatou que a dinâmica de deformação dessas vesículas ocorre em microssegundos e que, comparada com vesículas na fase líquido-cristalina, vesículas na fase gel são fracamente deformadas.

A DOPC apresenta duas insaturações e 18 carbonos na cauda hidrocarbonada. A figura 4.20 ilustra, por meio de simulação de dinâmica molecular, uma bicamada constituída de 128 moléculas de DOPC.<sup>143</sup> Pode-se observar na figura 4.20 a dobra existente nas cadeias hidrocarbonadas devido à ligação dupla, provocando uma torção nas cadeias apolares.

Estudos de simulação de dinâmica molecular indicaram que uma bicamada lipídica, constituída por DOPC, ao sofrer um aumento na tensão da membrana resulta em uma diminuição na espessura da bicamada lipídica, enquanto que a área por lipídio e o volume aumentam.<sup>143</sup>

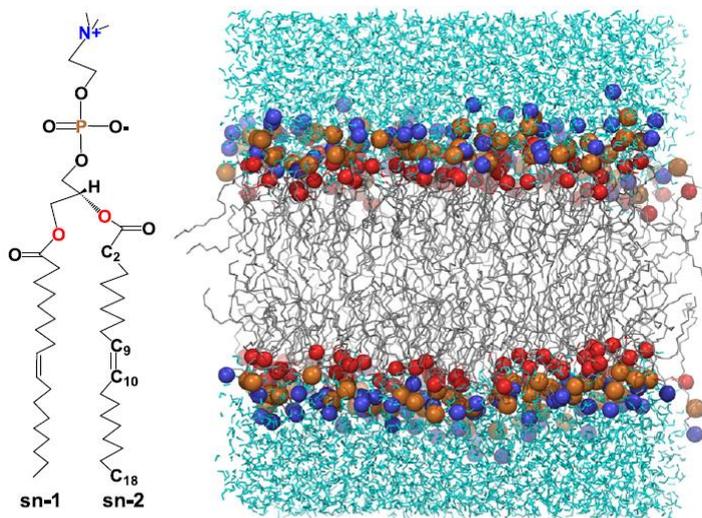


Figura 4.20. Estrutura da bicamada contendo 128 moléculas do lipídio DOPC por simulação de dinâmica molecular.<sup>143</sup>

As GUVs constituídas de DOPC não foram muito deformadas em função do campo elétrico aplicado (1 a 20 V). Além disso, não se observou mudança na forma da

vesícula. Ou seja, a vesícula encontrava-se na forma esférica e não houve alteração para a forma alongada após a aplicação do campo, o que se imaginava que pudesse ocorrer.

Mantendo a célula fechada, a aplicação de tensão com intensidade de 1 até 4 V fez com que as vesículas adquirissem um pouco de movimento. No entanto, as mesmas se estabilizaram em um determinado local entre os dois eletrodos. Acima de 5 V as vesículas se movimentaram mais rapidamente, se aproximando umas das outras, provocando fortes choques, e se afastando sem deformação de membrana. Com 8 V as vesículas se chocaram e permaneceram unidas umas às outras. Com 10 V, as vesículas começaram a girar em torno de seu eixo e com o aumento sucessivo da tensão (até 18 V) verificou-se que as GUVs giravam mais rapidamente, mas sem deformação e com constantes choques entre elas. Em 20 V observou-se que algumas vesículas migraram por dieletoforese em direção aos eletrodos e lá ficaram em contato com o mesmo até que a tensão fosse diminuída.

O tempo de espera de aplicação de cada tensão foi de 5 a 10 minutos. A partir da aplicação de 10 V ocorreu a formação de pequenos filamentos internos nas vesículas que aumentavam com o acréscimo da tensão e do tempo. Esses filamentos internos, compostos por DOPC e rodamina, podem ser observados na figura 4.21 por meio da seta. Como consequência da formação dos mesmos, uma pequena diminuição no diâmetro das GUVs foi observada.

Com o intuito de avaliar o tempo na formação dos filamentos nas GUVs, mantendo-se uma tensão e uma frequência constantes, vários testes foram realizados e observou-se que com uma tensão de 2 V e uma frequência de 60 Hz, filamentos internos foram formados após 15 minutos. Além disso, pode-se observar que em algumas vesículas os filamentos formados transformavam-se em pequenas esferas, como pode ser visualizado na sequência de imagens da figura 4.21. Esta transformação foi relativamente rápida (~ 5 minutos), entretanto, só ocorreu após uma hora e meia do início dos experimentos e nem todos os filamentos sofreram este tipo de transformação. Um fator importante que pode contribuir para a dificuldade na visualização dessa transformação é a escolha de uma vesícula ou no máximo três para se acompanhar ao longo do tempo, pois este fenômeno poderia estar ocorrendo em outras vesículas que não estavam no foco de observação.

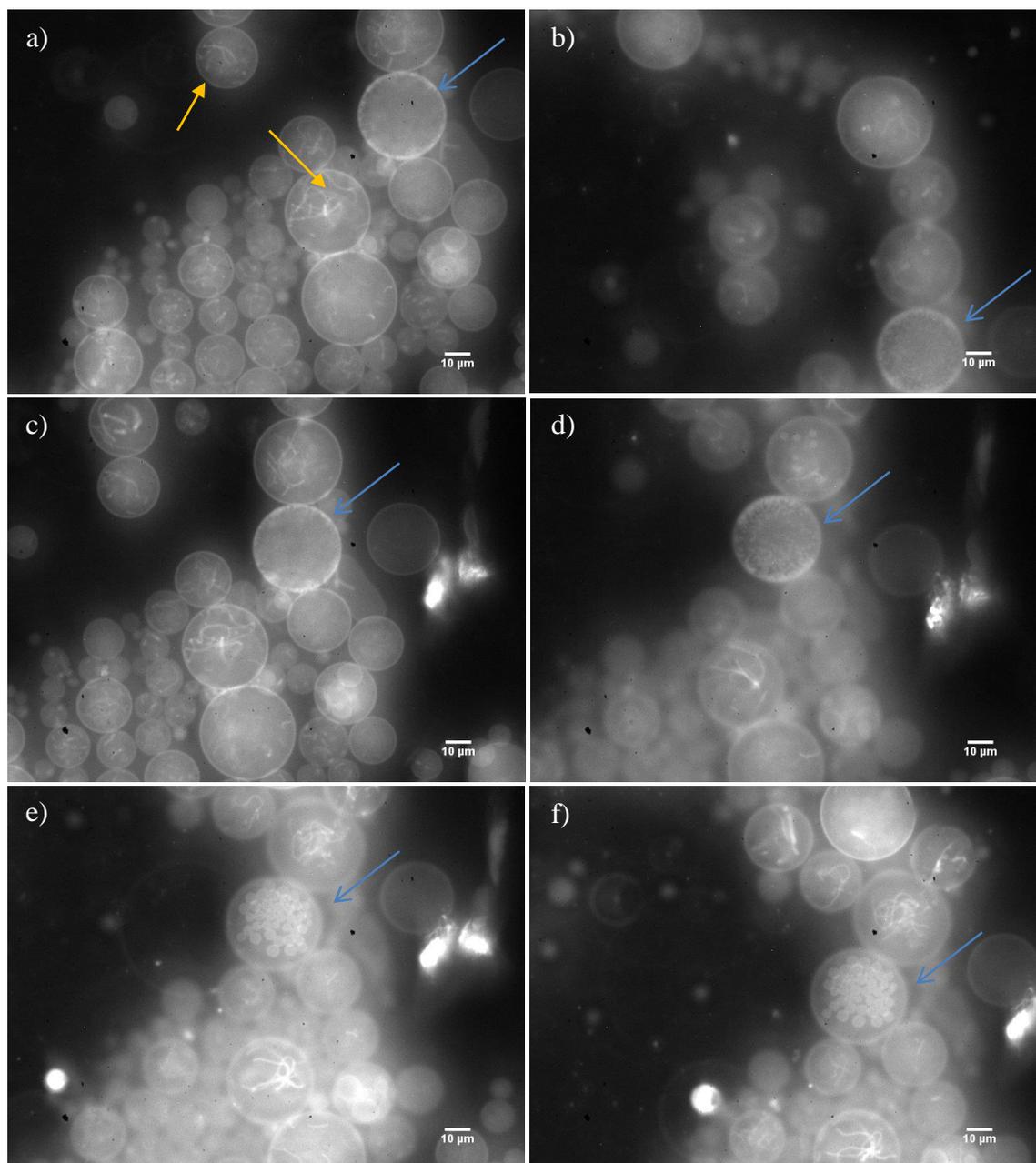


Figura 4.21. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de GUVs de DOPC, contendo 0,5% de rodamina, sob aplicação de campo elétrico (AC) com 2 V e 60 Hz. As setas amarelas indicam os filamentos internos observados nas vesículas com o tempo. As setas azuis indicam o excesso de membrana formado nas vesículas que com o tempo se transformam em pequenas esferas dentro das GUVs.

Com intuito de verificar a formação de filamentos internos nas GUVs por outros meios, realizou-se experimentos de evaporação da solução externa das vesículas. O

experimento de evaporação foi realizado com a célula de aplicação de campo aberta, contendo as vesículas e na ausência de campo elétrico, onde observou-se que após 40 minutos os filamentos internos começaram a aparecer. Esses filamentos, decorrentes da evaporação da água, são excessos de membrana formados devido a diferença de concentração do meio interno e externo das vesículas, pois o meio externo das mesmas fica mais concentrado e a vesícula passa a perder água.

Além disso, verificou-se a formação de filamentos internos por adição de uma solução de glicose concentrada (1 M) na célula de aplicação de campo, contendo as vesículas e sem a aplicação de campo elétrico. A adição de duas de glicose concentrada acarretou na imediata formação de filamentos internos nas vesículas, com diversos tamanhos. Sem a adição de glicose concentrada, a diferença de pressão osmótica é muito pequena entre o núcleo das vesículas e o meio externo, pois a solução de glicose do meio é quase iso-osmótica com a solução de sacarose do núcleo das vesículas. Isso faz com que a membrana das vesículas flutue pouco. A adição de glicose concentrada faz com que a diferença de concentração seja muito maior e, conseqüentemente, a vesícula passa a perder água, provocando, assim, um excesso de membrana.

#### **4.3.4 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DMPC**

O lipídio DMPC apresenta uma temperatura de transição de fase principal de 23 °C e, portanto, na temperatura dos experimentos (~ 18 °C) as GUVs constituídas de DMPC se encontram na fase gel.

As GUVs de DMPC apresentaram uma resposta semelhante à DOPC em relação ao aumento da tensão (de 1 a 20 V). A figura 4.22 mostra em (a) o agrupamento de vesículas quando foi aplicado um campo de 8 V e em (b) a aproximação de GUVs aos eletrodos (indicada por uma seta) quando a tensão aplicada foi de 18 V. A frequência foi mantida em 60 Hz. Pode-se observar que a aplicação de 8 e 18 V não provoca a deformação da membrana das GUVs.

A adição de duas gotas de glicose concentrada (1 M) na célula contendo as GUVs na ausência de campo elétrico, não leva à formação de filamentos internos, como no caso da DOPC. Agora, filamentos externos à membrana das vesículas são formados

e, rapidamente expelidos, como pode ser observado na figura 4.23. Além disso, após a adição da glicose, a membrana das GUVs torna-se altamente deformável com a aplicação de campo elétrico, o que não havia sido observado no caso da DOPC. A medida que aumentou-se a tensão aplicada, as vesículas respondiam a este aumento se deformando ainda mais. As setas das figuras 4.23 (e) e (f) mostram um dos filamentos solto da membrana, que com o aumento da tensão (de 5 para 8 V) adotou a forma esférica. Com voltagens mais altas como por exemplo 18 V, efeitos de dieletroforese foram observados e as vesículas migraram para os eletrodos.

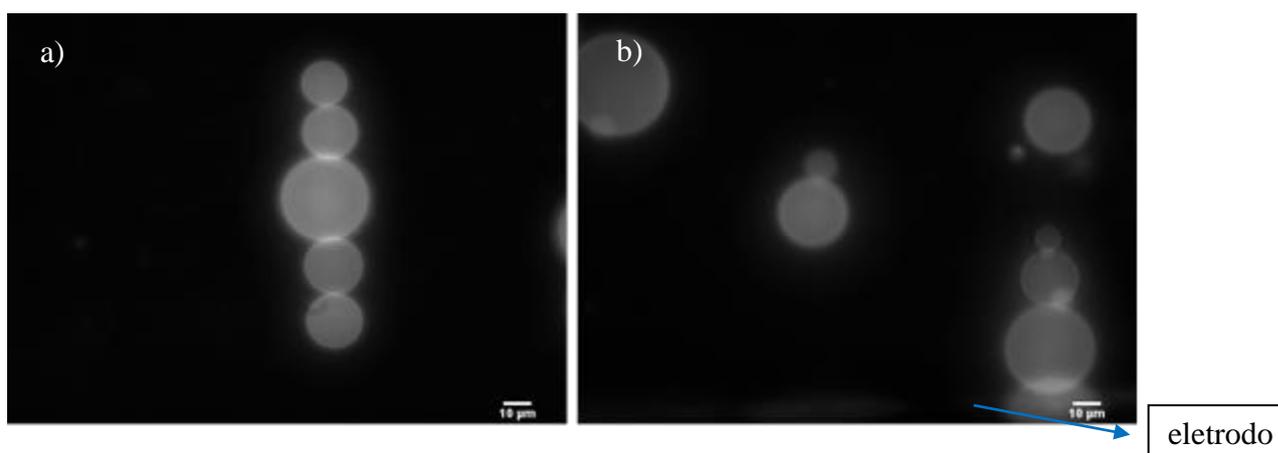


Figura 4.22. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DMPC e 0,5% de rodamina, sob aplicação de campo elétrico. Em (a) 8 V e em (b) 18 V.

Em resposta à diferença de pressão osmótica, uma membrana em bicamada lipídica pode permitir a permeabilização de moléculas de água. Assim, quando as vesículas são submetidas a alta osmolaridade, o efluxo de água através das membranas provavelmente reduz o volume interno aquoso, levando a membrana a se enrugar. Ohno e colaboradores<sup>144</sup> verificaram que diferentes pressões osmóticas impostas a lipossomas de fosfatidilcolina de ovo resultaram na formação de poros e posterior ruptura da membrana, além de efeitos como o encolhimento da vesícula e formação de filamentos externos.

A diferença de resposta encontrada para as GUVs de DOPC e de DMPC, em relação a adição de glicose, pode estar relacionada com a diferença da permeabilidade da água na membrana, pois a permeabilidade diminui modestamente com o aumento do comprimento da cadeia lipídica.<sup>106,107</sup> Assim, a DOPC, com 18 carbonos, apresentaria

menor efluxo de água da parte interna da vesícula em resposta a diferença de pressão osmótica do núcleo e do exterior da vesícula. Este fato poderia provocar ambientes muito diferentes, pois os lipídios da monocamada interna estariam expostos a um ambiente muito menos concentrado de sacarose ao passo que a monocamada externa estaria exposta a uma solução de glicose mais concentrada. Esse efluxo poderia ter efeito de enrugar a monocamada interna e provocar a formação dos filamentos internamente nas vesículas constituídas de DOPC.

A DMPC, por apresentar uma maior permeabilidade à água, poderia diminuir mais rapidamente esta diferença entre o meio externo e interno da vesícula, causando um excesso de membrana (efeito de enrugar a membrana) como um todo, expelindo os filamentos lipídicos para o meio. Entretanto, é muito difícil separar os efeitos da própria pressão osmótica e das propriedades da membrana de vesículas gerados pelo estresse osmótico.<sup>144</sup>

Um curioso comportamento das GUVs constituídas de DMPC foi observado quando estas foram retiradas da geladeira (4 °C) e, logo em seguida colocadas na célula para a aplicação de campo. A figura 4.24 (a) mostra uma vesícula de DMPC logo após ter sido retirada da geladeira, onde pode-se observar uma vesícula perfeitamente esférica. A figura 4.24 (b) mostra o que ocorre com as GUVs após a adição de uma gota da solução concentrada de glicose, onde as mesmas adotam formas bem diferentes e não formam filamentos. A figura 4.24 (c) ilustra as GUVs mostradas em (b) sob a aplicação de uma tensão de 5 V e 60 Hz e em (c) sob a aplicação de uma tensão de 15 V e 60 Hz. Observa-se que as GUVs se deformam com o aumento da tensão. Na aplicação de 15 V as vesículas migraram para os eletrodos e ficaram unidas a ele. A separação ocorreu quando baixou-se a tensão para 5 V.

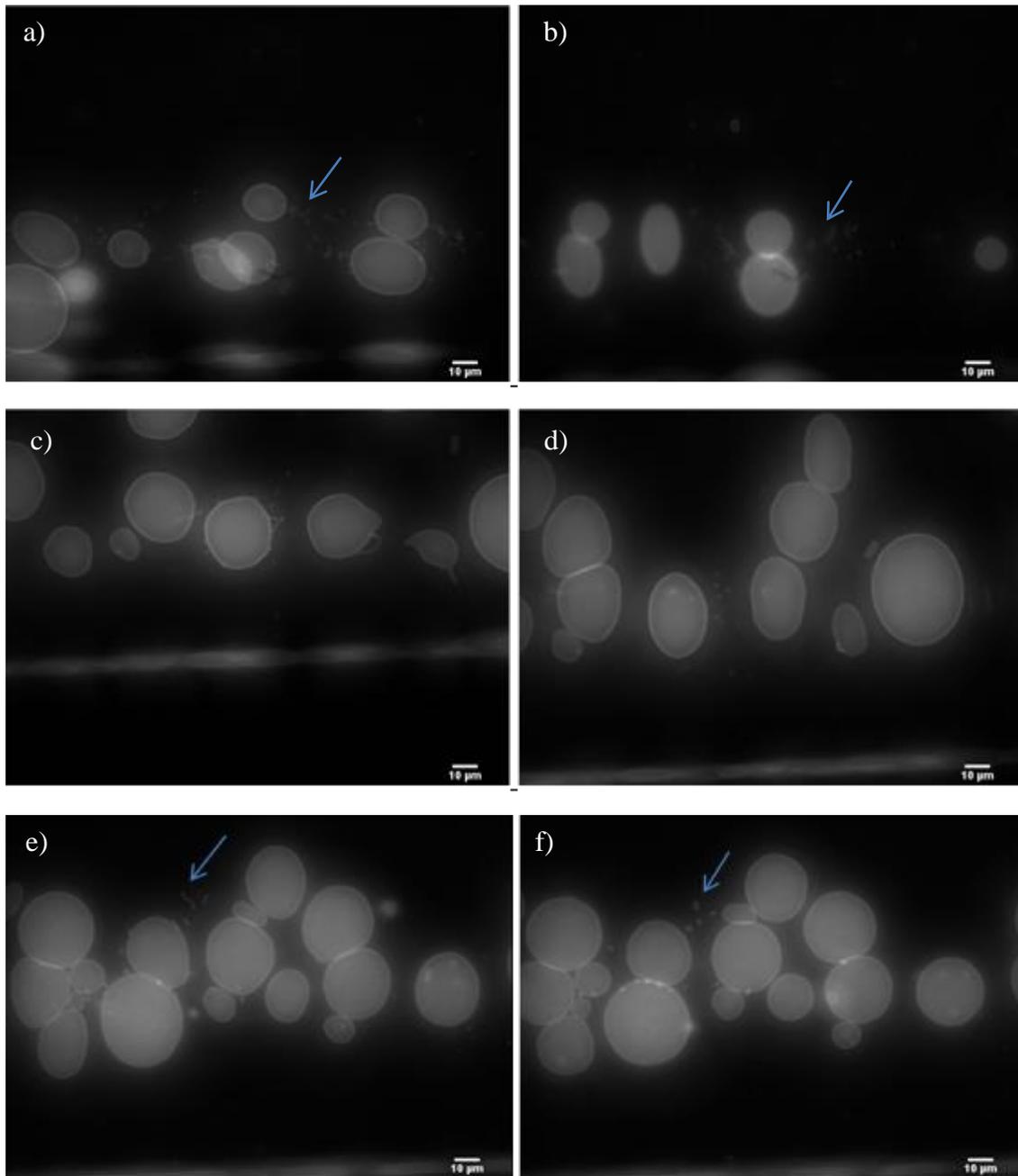


Figura 4.23. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DMPC e 0,5% de rodamina, após a adição de 2 gotas de solução de glicose 1 M. Em (a) na ausência de campo elétrico, em (b) com aplicação de 2V, em (c) com aplicação de 3V, em (d) com aplicação de 4 V, em (e) com aplicação de 5 V e em (f) com aplicação de 8V. A frequência foi mantida 60 Hz. As setas indicam os filamentos que se soltam da membrana após a adição da glicose 1 M.

Sabe-se que membranas lipídicas na fase gel tornam-se mais rígidas quando comparada com a fase líquido-cristalina. O lipídio DMPC apresenta uma fase chamada de fase ondulada (*ripple phase*) caracterizada por ondulações periódicas na

bicamada lipídica, com a coexistência de fases metaestáveis e estáveis.<sup>145</sup> A fase ondulada existe num intervalo de temperatura entre a pré-transição e a transição de fase principal. A temperatura estimada para fase ondulada da DMPC é de 15,8 °C,<sup>146,147</sup> próxima da temperatura ambiente de realização dos experimentos. Este fato pode explicar a diferença de resposta das GUVs de DMPC a ~ 18 °C e a ~ 4 °C em relação a adição de glicose concentrada e aplicação de campo elétrico.

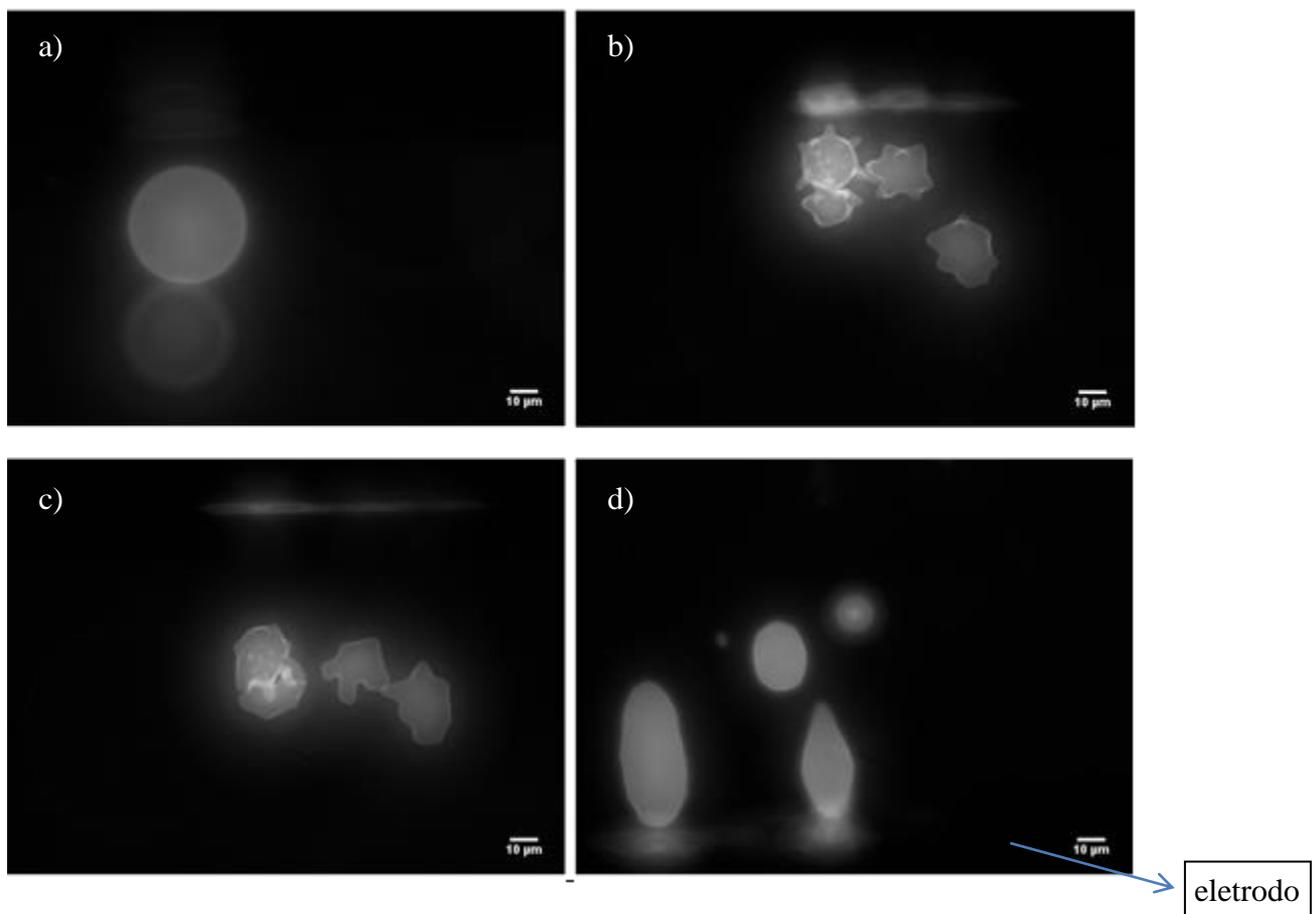


Figura 4.24. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs (na fase gel) contendo DMPC e 0,5% de rodamina. Em (a) na ausência da solução concentrada de glicose e de campo elétrico; em (b) na presença de 3 gotas de solução concentrada de glicose 1 M e na ausência de campo elétrico; em (c) na presença de uma tensão de 5 V e 60 Hz e em (d) na presença de uma tensão de 15 V e 60 Hz.

### 4.3.5 Aplicação de campo elétrico em GUVs constituídas de DLPC

O lipídio DLPC apresenta uma  $T_f$  de  $-1\text{ }^\circ\text{C}$  e, portanto, na temperatura dos experimentos, de aproximadamente  $18\text{ }^\circ\text{C}$ , as GUVs se encontram na fase líquido-cristalina.

A figura 4.25 (a) mostra GUVs de DLPC na temperatura ambiente e pode-se observar a presença de algumas GUVs com pequenos filamentos internos, que foram formados durante o processo de eletroformação das vesículas. A figura 4.25 (b) ilustra a aplicação de uma tensão de 4 V e 60 Hz, onde foi possível observar que o filamento, que antes estava na forma de bastão, adotou a forma esférica. Além disso, as vesículas constituídas de DLPC foram as que mais responderam a aplicação de baixas voltagens, passando para a forma alongada com apenas 3 V.

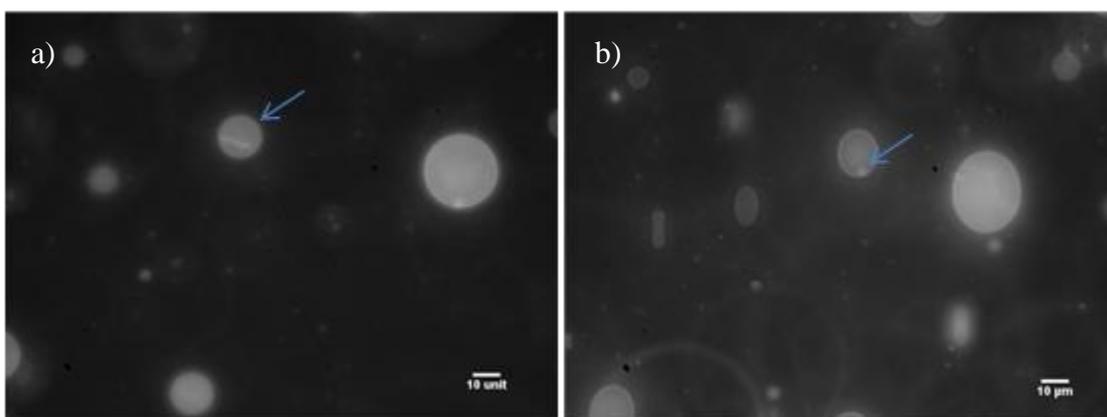


Figura 4.25. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e 0,5% de rodamina. Em (a) na ausência de campo elétrico e em (b) com aplicação de 4 V e 60 Hz.

As GUVs de DLPC são altamente deformáveis como pode ser visualizado na sequência de imagens da figura 4.13. Em (a) sob aplicação de uma tensão de 18 V as vesículas tendem a migrar para os eletrodos e permanecerem unidas a ele. Quando baixa-se novamente a tensão, as vesículas tendem a se afastar do eletrodo, perdendo parte de sua membrana e acarretando na formação filamentos, como mostra a figura 4.13 (b). Uma sucessão de ciclos, com aumento e diminuição da tensão, provocou a

diminuição no tamanho das GUVs, bem como na formação de filamentos (figuras 4.13 c e d).

Este efeito de deformação pode ser explicado pela fase líquido-cristalina em se encontra a DLPC, mas também pela característica da bicamada lipídica. Estudos realizados com vesículas unilamelares de DLPC e DMPC na fase líquido-cristalina por meio de SAXS, mostraram que, em comparação com a DOPC que possui quatro átomos de carbono a mais que a DMPC, a região da cadeia de hidrocarbonetos é apenas 2 Å mais espessa que a da DMPC.<sup>148</sup> Assim, a região hidrofóbica em uma bicamada de DOPC interage mais fortemente do que em uma de DMPC, mesmo a DOPC apresentando insaturações e estando na fase líquido-cristalina. Esta maior interação hidrofóbica poderia evitar que GUVs de DOPC se deformem muito em relação ao campo elétrico aplicado quando comparadas a GUVs de DMPC e DLPC. A DLPC, que tem apenas dois carbonos a menos por cadeia quando comparada com a DMPC, apresenta 4,5 Å a menos de espessura que DMPC (na mesma temperatura).<sup>148</sup> Há uma diferença também em relação a área por lipídio na bicamada, que é maior para a DOPC (72.1 Å<sup>2</sup>) quando comparada com 60.6 Å<sup>2</sup> para a DMPC e 63.2 Å<sup>2</sup> para a DLPC. A menor interação hidrofóbica, devido ao reduzido número de carbonos e a área por lipídio (maior que a DMPC) aliada a fase líquido-cristalina (em que a membrana se torna mais flexível) podem explicar a maior deformação da DLPC em relação ao aumento da tensão aplicada.<sup>148</sup>

A adição de 2 gotas de solução de glicose concentrada (1 M) leva a formação de filamentos que se mantêm unidos a membrana das GUVs. Há dois tipos diferentes de filamentos formados. Um deles apresenta-se mais espesso (com diâmetros médios de aproximadamente 2 µm) e com o tempo voltam a compor novamente a membrana das vesículas (figura 4.27). Contudo, caso uma tensão de 5 V seja aplicada, esses filamentos retornam instantaneamente para a vesícula.

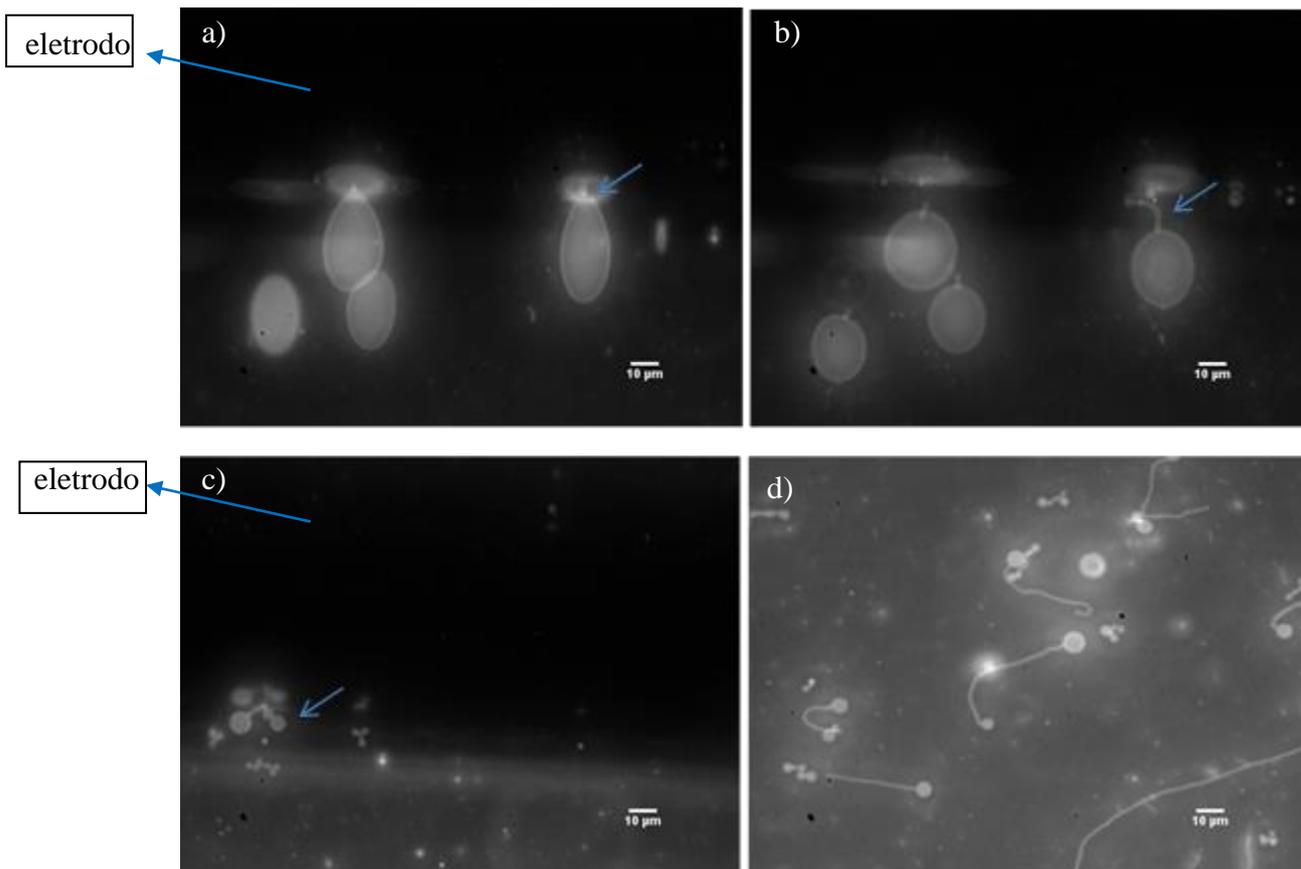


Figura 4.26. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e rodamina. Em (a) na presença de 18 V e 60 Hz; (b) na presença de 2 V e 60 Hz; (c) na presença e 18 V e 60 Hz e em (d) na presença de 2 V e 60 Hz.

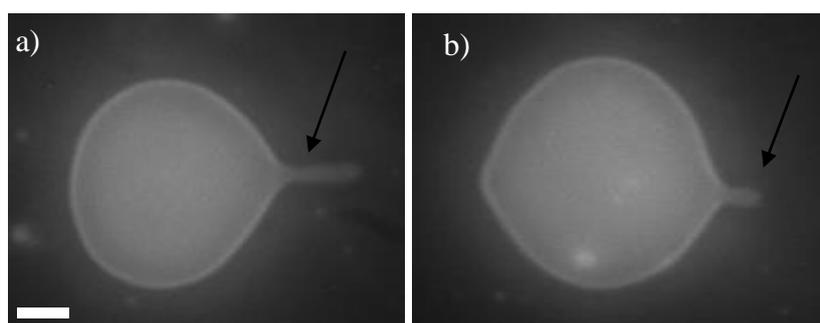


Figura 4.27. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e 0,5 % de rodamina. Em (a) logo após a adição de 3 gotas da solução concentrada de glicose e em (b) o retorno natural do fio a vesícula. Barra = 5 μm.

Conforme aumentou-se a quantidade de gotas adicionadas de glicose, as vesículas de DLPC tornaram-se cada vez menores. A figura 4.28 ilustra esse fenômeno, onde as setas indicam a formação de vesículas menores que foram formadas a partir da divisão de vesículas maiores, devido a grande diferença de concentração criada entre o meio externo e o interior das vesículas. Isso provocou um grande excesso de área nas vesículas, devido a perda de água no interior das GUVs, formando assim vesículas menores. A figura esquemática 4.29 ilustra a formação de filamentos e de vesículas menores a partir de uma GUV.

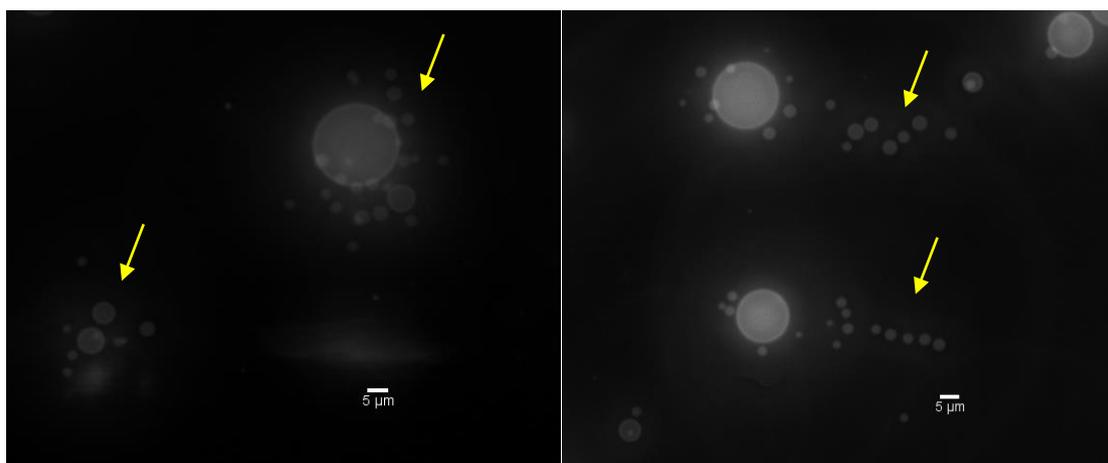


Figura 4.28. Imagens de microscopia de óptica fluorescência de GUVs contendo DLPC e 0,5 % de rodamina após sucessivas adições de glicose 1 M.

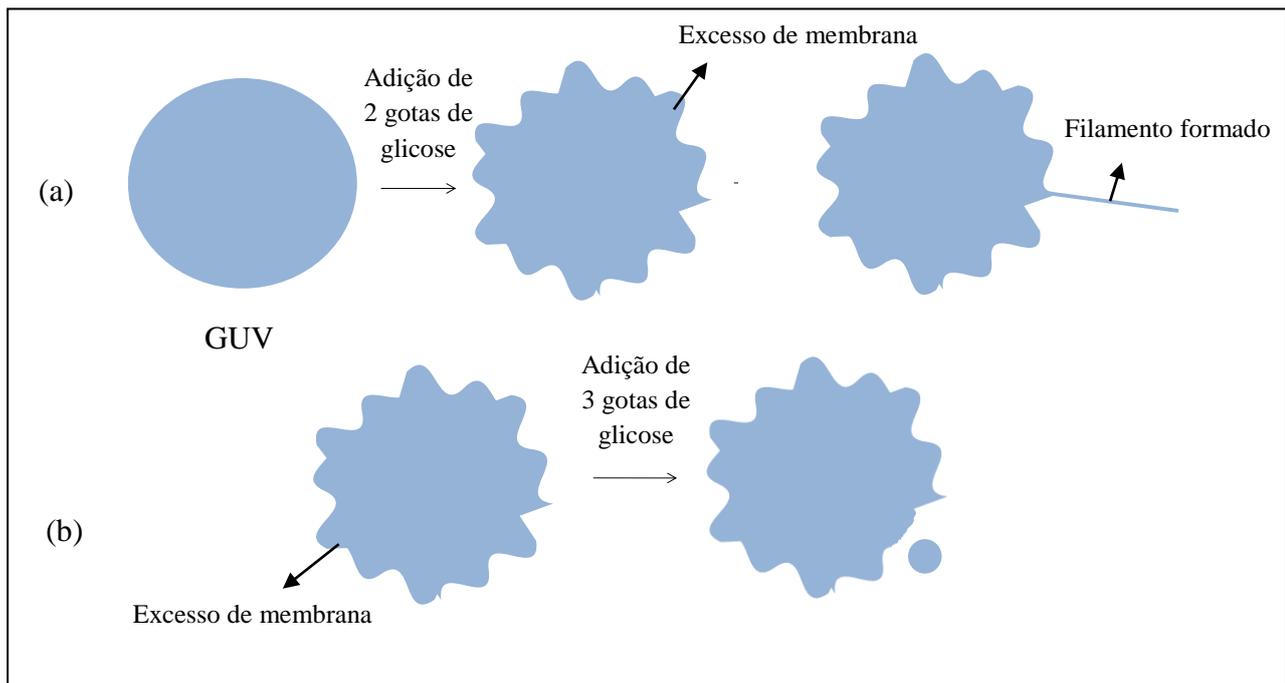


Figura 4.29. Figura esquemática em (a) GUV constituída de DLPC após a adição de duas gotas de glicose (1 M) e formação de excessos de membrana e filamento externo decorrentes da diferença de concentração do interior e exterior das vesículas. Em (b) adição de mais 3 gotas de glicose concentrada e formação de excessos de membrana e vesículas menores.

A figura 4.30 mostra que após a adição de glicose concentrada, as vesículas são facilmente deformadas em função da aplicação de campo elétrico. Na figura 4.30a pode-se observar as GUVs na ausência de campo elétrico e após a adição de solução concentrada de glicose. Em (b) aplicou-se uma tensão de 15 V, por dez segundos, até que a vesícula se alongasse devido ao campo e então a tensão foi rapidamente retornada para 2 V, observando-se a condição mostrada em (d). Neste retorno a vesícula não voltou mais para sua forma inicial.

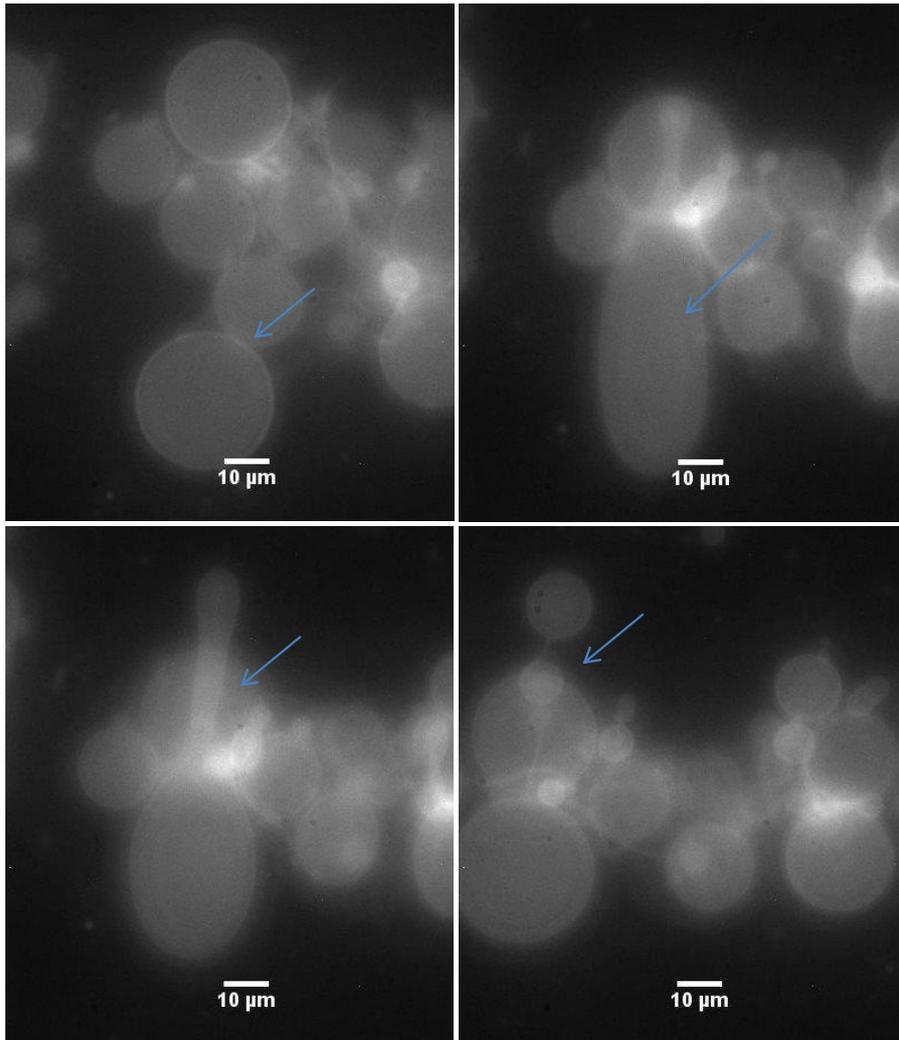


Figura 4.30. Sequência de imagens de microscopia óptica de fluorescência de GUVs contendo DLPC e rodamina. Em (a) na ausência de campo elétrico e após a adição de solução concentrada de glicose, em (b) com uma tensão de 15 V e 60 Hz e em (c) e (d) com uma tensão de 2 V e 60 Hz.

Há um outro tipo de filamento formado pela adição da solução de glicose concentrada. O mesmo é um filamento mais fino e com diâmetros inferiores a  $1\mu\text{m}$ , que não retorna mais para as vesículas naturalmente. Diversas condições de tensão e frequência foram testadas até que se estabelecesse duas condições em que estes filamentos voltassem para as vesícula em função da aplicação de um campo elétrico.

Com aplicação de 20 Hz de frequência e 10 V de tensão, os filamentos foram retraídos para as GUVs originais. Entretanto, o rápido movimento das vesículas em solução após a adição da glicose dificulta a análise, por isso a aplicação do campo foi

realizada de 2-5 minutos após a adição da glicose na célula. O experimento foi realizado com a célula de aplicação de campo fechada.

Na figura 4.31 está representado o gráfico de comprimento total do filamento ( $\mu\text{m}$ ) em relação ao tempo total de retração para 20 GUVs na condição de 20 Hz e 10 V. A partir do gráfico pode-se observar um comportamento linear do comprimento total dos filamentos formados com o tempo que os mesmos levam para se incorporarem novamente à membrana. Os filamentos menores tem um tempo de retração menor e rapidamente voltam para a vesícula.

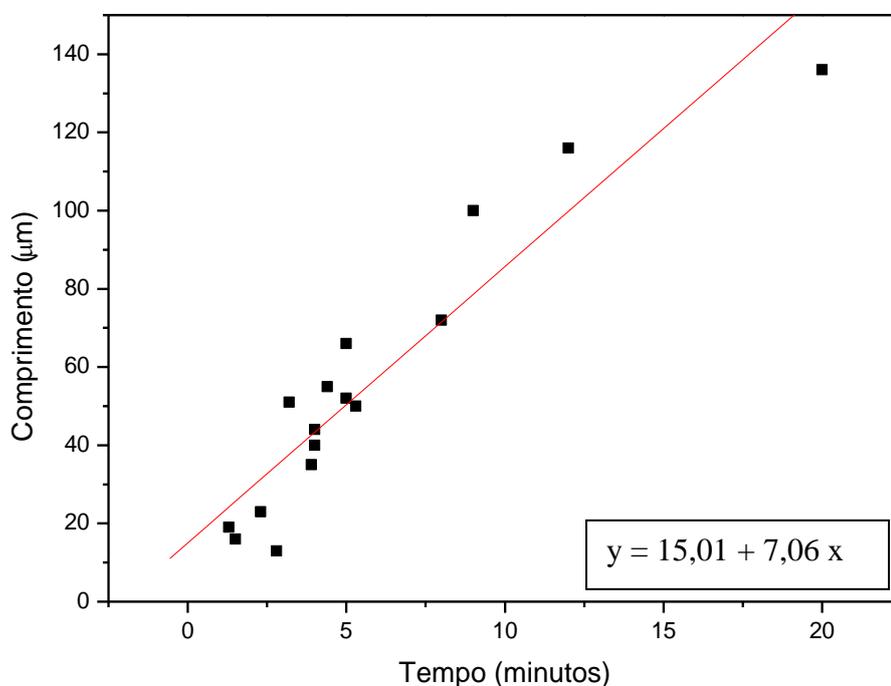


Figura 4.31. Comprimento total de filamentos em função do tempo total de retração para 20 GUVs de DLPC na condição experimental de 20 Hz e 10 V.

A figura 4.32 mostra um exemplo de gráfico do comprimento de um filamento em função do tempo que este leva para a retração total em uma GUV. A partir do ajuste feito (polinomial de primeiro grau) pode-se inferir que a velocidade de retração deste filamento é de  $0,18 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Junto ao gráfico, pode-se observar as imagens de microscopia óptica de fluorescência da vesícula em alguns pontos de tempo até a total retração do filamento. A figura 4.31 mostra outro exemplo de gráfico de comprimento

de um filamento em função do tempo de retração. A partir do ajuste feito a velocidade de retração correspondente a esta vesícula é de  $0,19 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , valor similar de velocidade encontrado para a vesícula anterior.

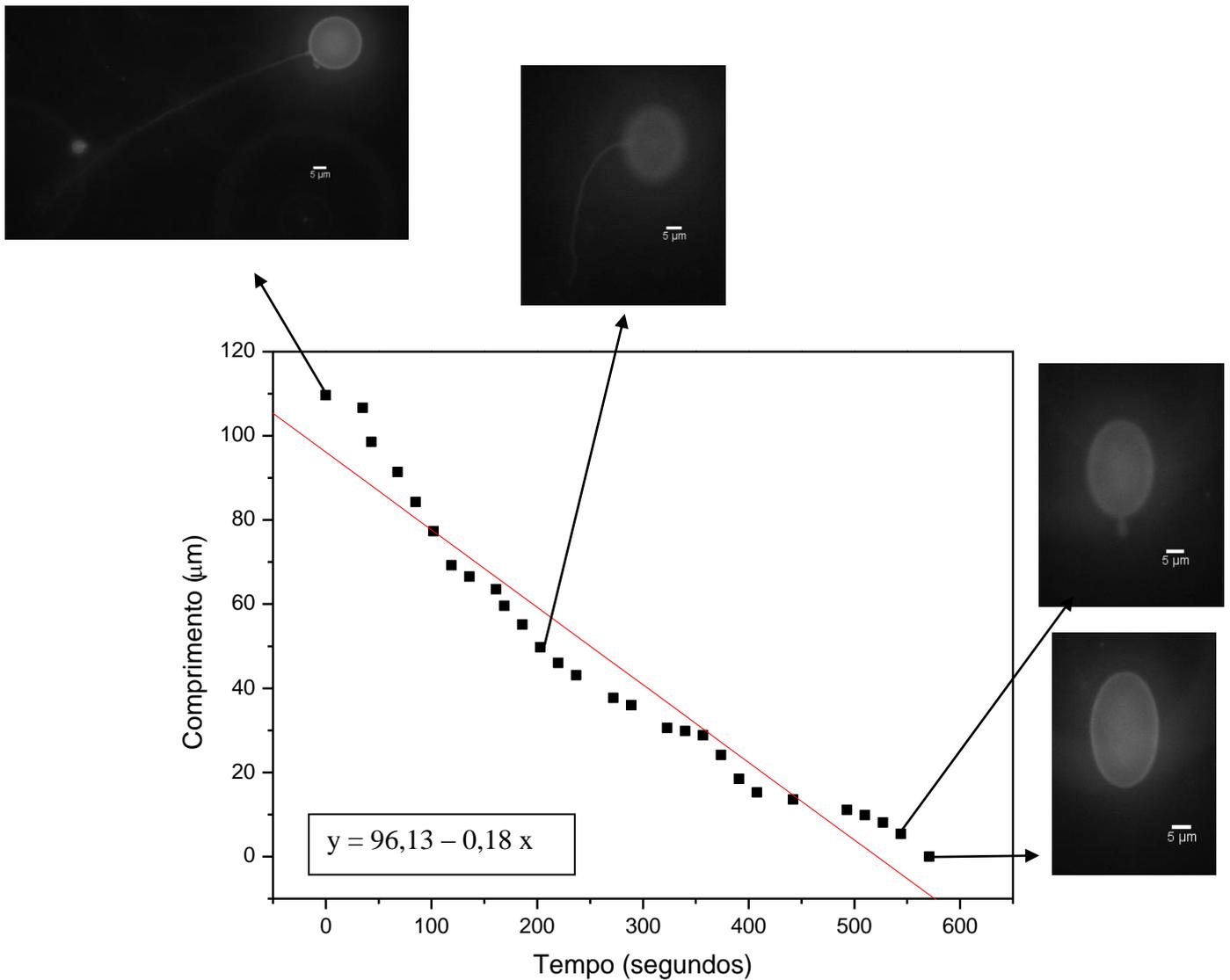


Figura 4.32. Comprimento do filamento em função do tempo de retração para uma GUV de DLPC para a condição de 20 Hz e 10 V.

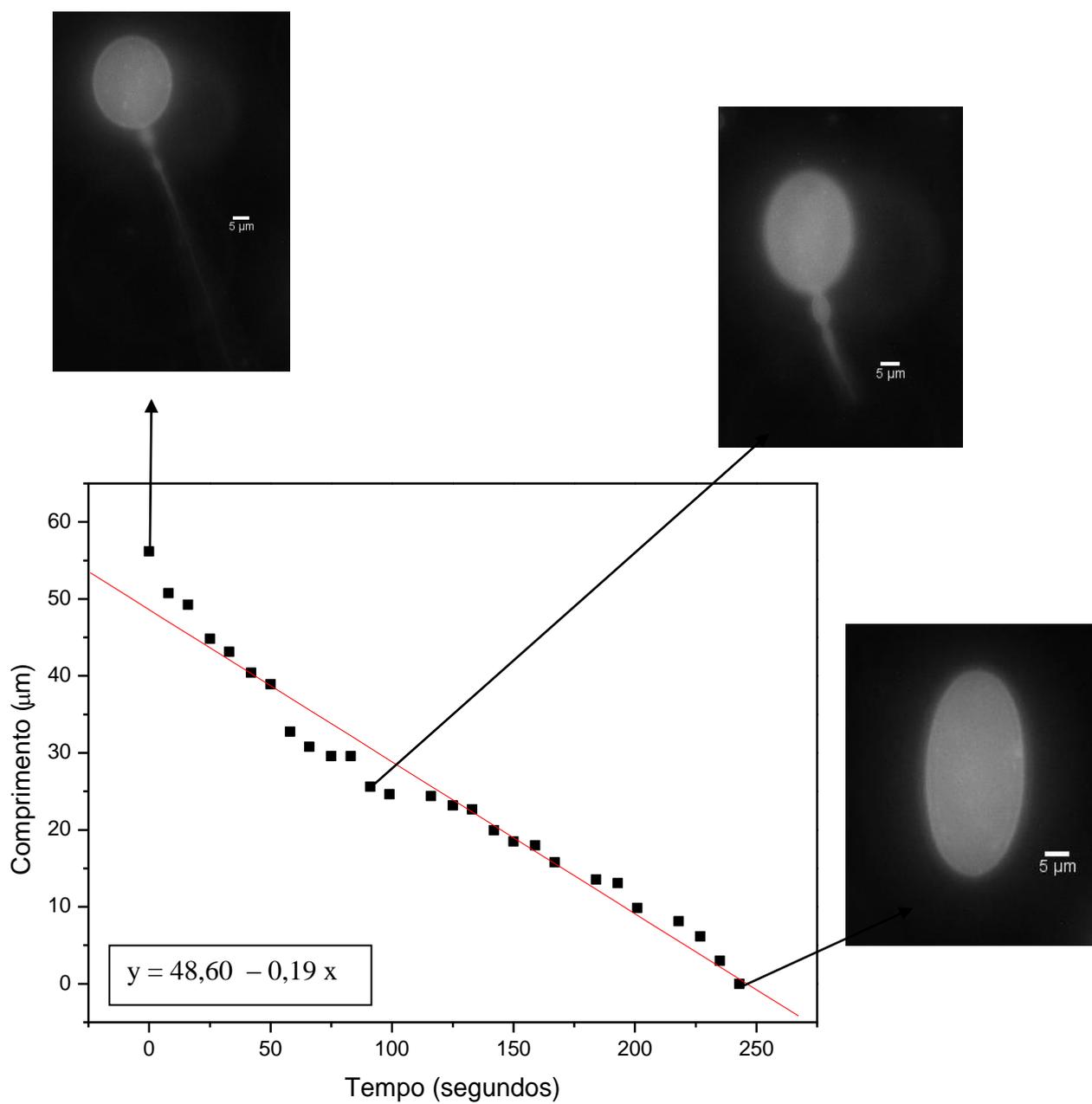


Figura 4.33. Comprimento do filamento em função do tempo de retração para uma GU de DLPC para a condição de 20 Hz e 10 V

A figura 4.34 ilustra a mesma vesícula da figura 4.32, antes e após a aplicação de campo elétrico com frequência de 20 Hz e tensão de 10 V com total retração do fio. A razão de aspecto para a esta vesícula após a retração é de 1,8, com  $a = 14,7$  e  $b = 8,15$ . A vesícula antes da aplicação de campo elétrico (a) possui uma área calculada de  $1256 \mu\text{m}^2$ , enquanto que a área calculada para a mesma vesícula após a retração do fio (b) é de  $1505 \mu\text{m}^2$ . Assim, o filamento apresenta uma área de  $249 \mu\text{m}^2$ . O aumento de área, provocado pela aplicação de um campo elétrico externo, poderia, então, estar ocasionando a retração do fio para a vesícula de origem.

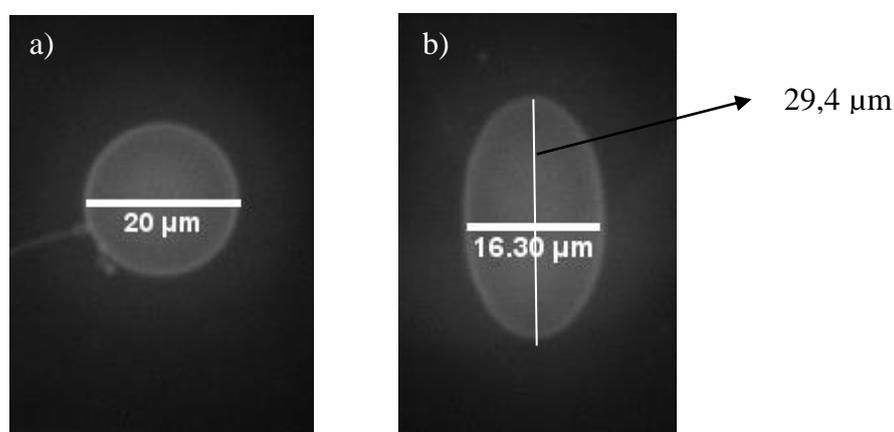


Figura 4.34. Imagens de microscopia óptica de fluorescência de uma GU de DLPC em (a) na ausência de campo elétrico e em (b) para a condição de 20 Hz e 10 V, após a retração do filamento.

A figura 4.35 exibe o gráfico de comprimento total de filamentos em função do tempo de retração total para GUVs na segunda condição experimental, a qual se verificou ocorrência de retração de fio (40 Hz e 10 V). Novamente observou-se um comportamento linear do comprimento total dos filamentos formados com o tempo que os mesmos levaram para retração na membrana.

A figura 4.36 mostra um gráfico do comprimento de um filamento em função do tempo que este leva para a retração em uma GU. A partir do ajuste feito pode-se inferir que a velocidade de retração deste fio é de  $0,06 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  e junto ao gráfico pode-se observar as imagens de microscopia de fluorescência da vesícula em alguns pontos de

tempo até a total retração do filamento. Assim, para esta condição experimental de 40 Hz e 10 V, a velocidade de retração é menor do que a encontrada para a condição experimental de 20 Hz e 10 V.

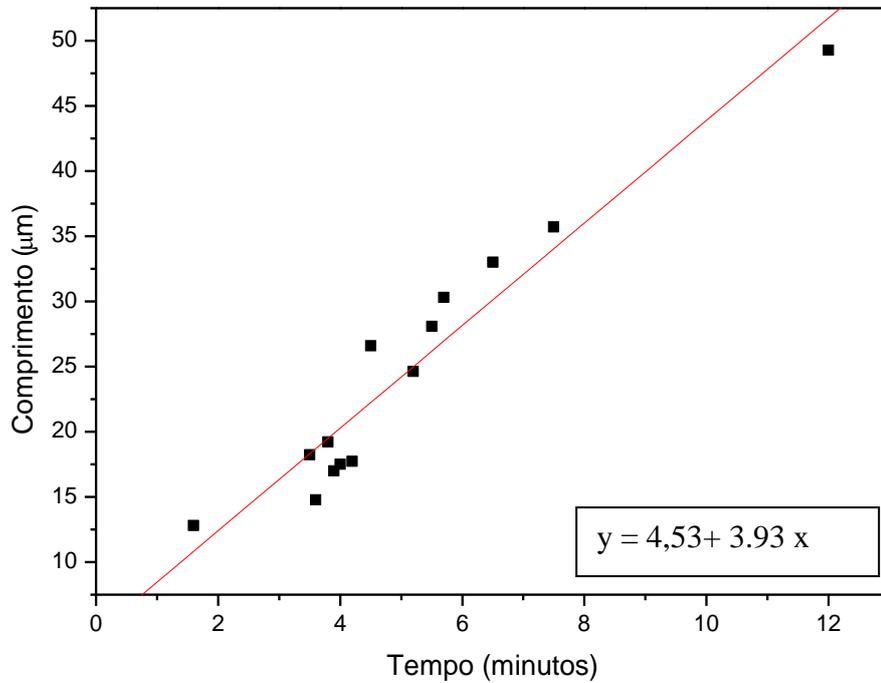


Figura 4.35. Comprimento total de filamentos em função do tempo total de retração para GUVs de DLPC na condição de 40 Hz e 10 V.

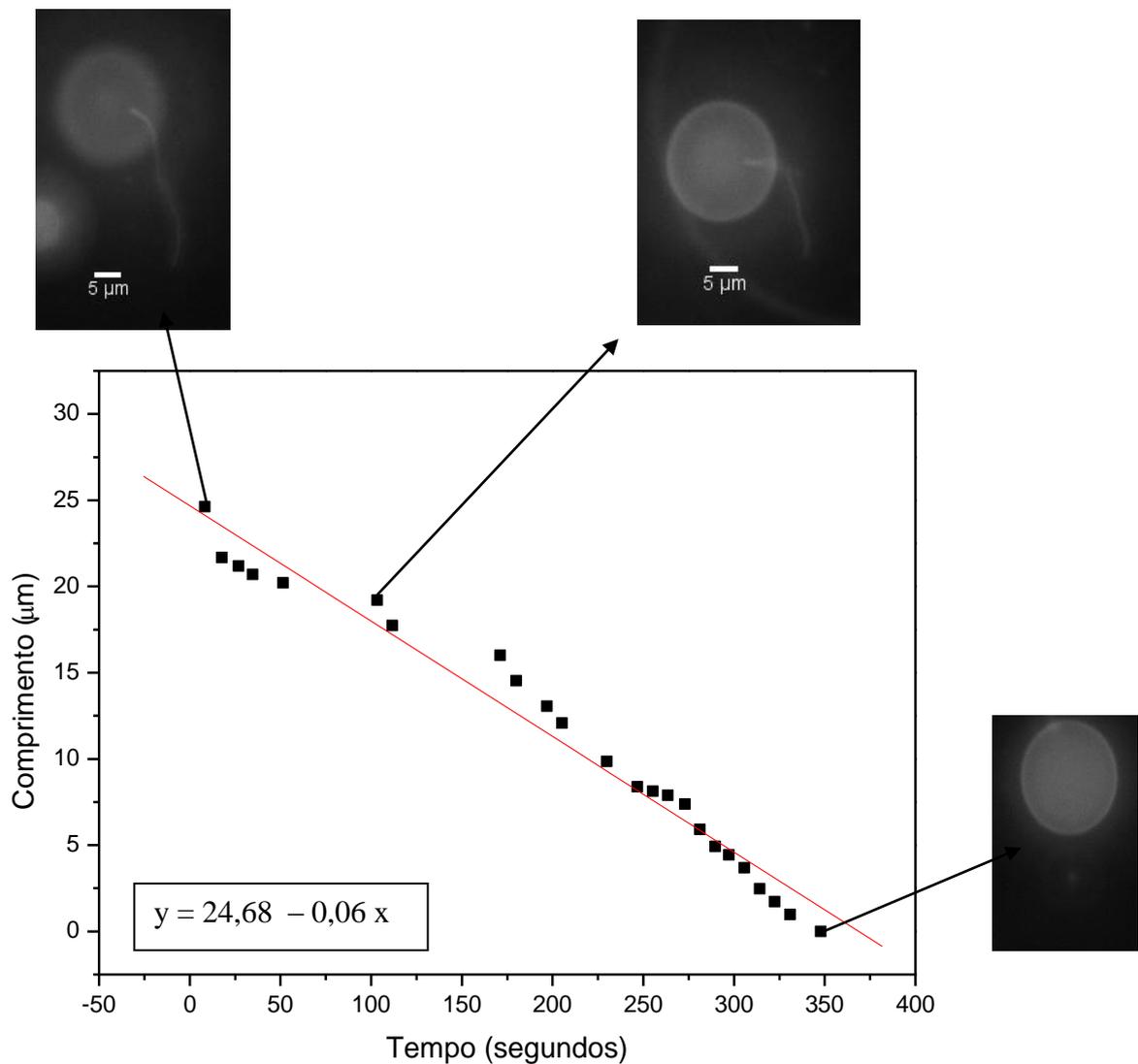


Figura 4.36. Comprimento de um filamentos em função do tempo de retração para uma vesícula gigante de DLPC na condição de 40 Hz e 10 V.

#### 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de separação de fases em LUVs e GUVs constituídas por diferentes composições dos lipídios DOPC e SM mostrou que um comparativo direto entre os domínios formados em LUVs e GUVs se torna complexo devido ao uso de técnicas indiretas como o DLS e SAXS para o estudo em LUVs. Essas técnicas sozinhas não são

eficientes na avaliação da formação de separação de fases em membranas. Contudo, a direta visualização de domínios em GUVs, por meio de microscopia óptica de fluorescência, permitiu verificar que a quantidade de domínios em GUVs depende da composição de DOPC e SM. Além disso, avaliou-se a influência da temperatura na formação de domínios, durante o crescimento de GUVs por eletroformação. Assim, observou-se que a temperatura de crescimento foi um fator importante na formação de domínios em GUVs com composição lipídica de 25% de DOPC e 75% de SM. Essa mesma composição lipídica mostrou-se influenciada pela aplicação de um campo elétrico externo, sugerindo o aparecimento de separação de fases em GUVs, as quais não apresentavam domínios visíveis antes da aplicação de campo elétrico.

O estudo das diferentes respostas da aplicação de campo elétrico externo (AC) em vesículas gigantes constituídas de DLPC, DMPC e DOPC podem ser resumidos em:

- a) GUVs de DOPC: pouco deformáveis em função da variação de uma tensão de 1-20 V. A aplicação de determinadas voltagens em um determinado tempo pode levar a formação de filamentos internos. A diferença de pressão osmótica também provoca o surgimento de filamentos internos (excesso de membrana).
- b) GUVs de DMPC: pouco deformáveis em função da variação de uma tensão de 1-20 V. A diferença de pressão osmótica provoca a formação de filamentos externos que se soltam da membrana e podem responder a aplicação de um campo elétrico externo mudando da forma em bastão para a forma esférica.
- c) GUVs de DLPC: muito deformáveis em função da variação de uma tensão de 1-20 V. A diferença de pressão osmótica provoca a formação de filamentos externos à membrana das GUVs que podem ser retraídos devido à aplicação de um campo elétrico externo.

**Capítulo 5**  
**Estudo da interação de**  
**vesículas unilamelares**  
**gigantes com a urease de**  
**Jack bean por meio de**  
**microscopia óptica de**  
**fluorescência**

## 5.1 INTRODUÇÃO

### 5.1.1 Urease de Jack bean

Ureases são enzimas níquel-dependentes, que catalisam a reação de hidrólise da ureia para formar dióxido de carbono e amônia.<sup>149</sup> Estas proteínas têm sido isoladas de uma variedade de organismos incluindo plantas, bactérias e fungos. Contudo, independente da fonte e de suas estruturas quaternárias, todas as ureases descritas até o momento apresentam um alto grau de homologia, estruturas tridimensionais e mecanismos catalíticos semelhantes, sugerindo divergência a partir um único ancestral comum.<sup>150</sup>

Nas plantas, as ureases contribuem para a biodisponibilidade do nitrogênio e no mecanismo de defesa das plantas. Bioquimicamente, a mais bem caracterizada urease de planta é de Jack bean (*Canavalia ensiformis*).<sup>151</sup> A urease de Jack bean (JBU) foi a primeira urease de planta a ter sua estrutura cristalografada (figura 5.1).<sup>152</sup> A JBU existe como homotrímeros que podem se associar para formar hexâmeros, que consiste de dois trímeros interagindo de forma frontal, com idênticas subunidades de ~ 90 kDa, contendo dois íons de níquel por subunidade.<sup>153-155</sup>

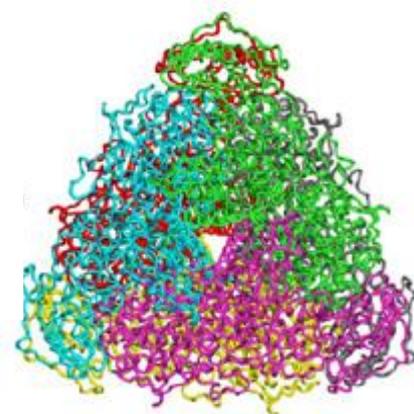


Figura 5.1. Estrutura (hexâmero) da urease Jack bean (*Canavalia ensiformis*). Três monômeros são associados no modo triangular, gerando uma superfície planar na face do triângulo, enquanto que a outra face tem uma pequena saliência formada pelo domínio  $\alpha\beta$  N-terminal.<sup>152</sup>

A *Canavalia ensiformis* é uma leguminosa muito resistente a insetos e é fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, tais como: a lectina concavalina A, inibidores de tripsina, urease, e a canatoxina.<sup>156</sup> Estudos revelaram que a urease da *Canavalia ensiformis* e da *Glycine Max* (soja) apresentam atividade inseticida e propriedade antifúngica.<sup>157,158</sup>

A *Canavalia ensiformis* apresenta três isoformas de urease: a JBU, Jack bean urease II e canatoxina. A base molecular do mecanismo de ação inseticida de ureases de plantas ainda não está completamente compreendida.<sup>157</sup> Entretanto, sabe-se que o efeito entomoxitótico da canatoxina, é parcialmente devido a um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox) que é liberado através da hidrólise da proteína por enzimas digestivas de insetos (catepsinas).<sup>156,159-164</sup>

A canatoxina, isolada da *C. ensiformis* em 1981 por Carlini e Guimarães, possui aproximadamente 85% de identidade com a JBU, e corresponde a ~ 0,5% do peso seco da semente, com cerca de 30 - 40% da atividade ureolítica.<sup>156</sup> Sua forma estrutural é um dímero de cadeias polipeptídicas de ~ 95 kDa, contendo um íon de zinco e um de níquel em cada subunidade.<sup>156,159</sup>

A canatoxina também apresenta, *in vitro*, a potencialidade de indução de agregação e secreção de plaquetas.<sup>159</sup> Assim, o grande interesse no estudo da urease se deve ao fato de que a canatoxina apresenta uma grande potencialidade para o desenvolvimento de biopesticidas ou plantas transgênicas resistentes a insetos que são pragas agrícolas.

Tanto a canatoxina quanto a JBU rompem o transporte de  $Ca^{2+}$  através das membranas, se ligam a glicoconjugados, e ativam as plaquetas do sangue e células pró-inflamatórias.<sup>162</sup> Sendo assim, esses efeitos da JBU demonstram sua interação com membranas celulares, sendo essa interação direta ou através da modulação do receptor. Além disso, a JBU apresenta atividade fungicida e inseticida.<sup>165</sup>

### 5.1.2 Peptídeo Jaburetox

O estudo com o peptídeo pepcanatox se torna limitado devido ao baixo rendimento dos métodos disponíveis para a obtenção do peptídeo.<sup>157</sup> A partir deste, foi desenvolvido um peptídeo recombinante, análogo ao pepcanatox, chamado Jaburetox-2Ec que apresentou um potente efeito inseticida contra duas pragas de cultura economicamente importantes: *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho) e *Dysdercus peruvianus* (inseto-praga da cultura de algodão).<sup>166,167</sup>

Além disso, estudos mostraram que o Jaburetox-2Ec afeta o potencial transmembrana de túbulos de Malpighi de insetos, causando a inibição de diurese.<sup>168</sup> Outros estudos ainda demonstraram que ambos o Jaburetox-2Ec e a JBU reduzem a diurese de *R. prolixus* após a alimentação, sugerindo que haja um efeito no balanço de água e íons na célula.<sup>168</sup>

Uma estrutura modelada de domínios  $\beta$ -grampo para o Jaburetox-2Ec tem sido proposta<sup>166,168</sup> e sua presença vem sendo confirmada por meio da estrutura cristalográfica da urease Jack bean<sup>152</sup> e andpigeon pea<sup>165</sup> (figura 5.2). Este domínio  $\beta$ -grampo também está presente na classe de peptídeos formadores de poros ou peptídeos neurotóxicos, como, por exemplo a charybdotoxin (do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*) ou *protegrin* (de leucócitos de suínos).<sup>169</sup>

Barros e colaboradores<sup>170</sup> verificaram que o Jaburetox-2Ec foi capaz de interagir com uma interface polar/não polar, orientando-se paralelamente ou rearranjando-se em uma configuração transmembrana. Como observado por eles, o Jaburetox-2Ec é anfipático, uma característica considerada essencial para a atividade de membrana de peptídeos formadores de poros. Além disso, Jaburetox-2Ec quando em contato com LUVs contendo carboxifluoresceína em seu núcleo, provoca a liberação da molécula fluorescente do núcleo das LUVs, sugerindo que o peptídeo interagiu com a membrana pela ruptura da bicamada lipídica ou pela formação de poros, ou até mesmo pelos dois meios.<sup>170</sup>

Estudos de interação do Jaburetox-2Ec com lipossomas foram realizados por meio da técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e revelaram uma significativa mudança estrutural na membrana dos lipossomas, mostrando-se mais intensa com uma maior concentração do peptídeo.<sup>171</sup>

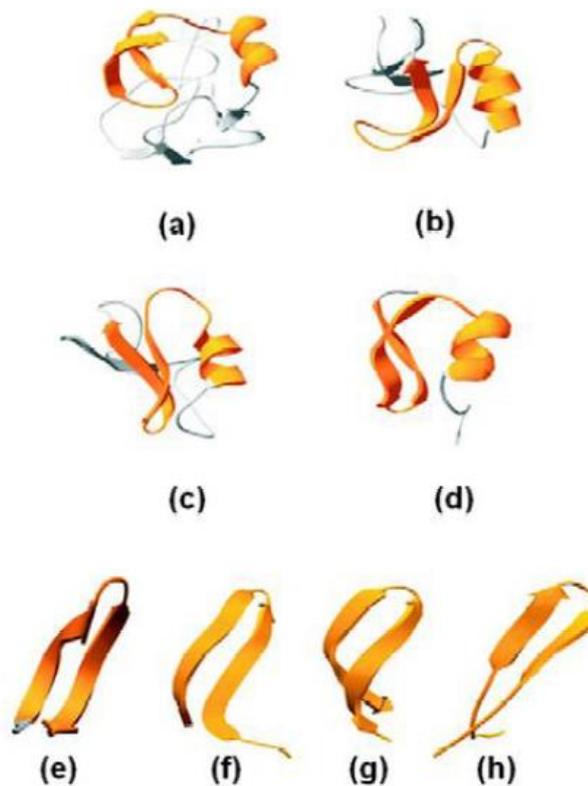


Figura 5.2. Modelo estrutural do Jaburetox-2Ec (a); estrutura das neurotoxinas de escorpião, neurotoxina  $\alpha$ -like BMK M1(b);  $\beta$ -neurotoxina (c); BMKK 4 (d); domínios  $\beta$ -grampo para o Jabutox-2Ec (e); peptídeos envolvidos na formação de poros: protegrina-1 (f), tequiplesina-1 (g) e polifemisina PV5 (h).<sup>170</sup>

Balasubramanian e colaboradores<sup>152,172</sup> propuseram que um arranjo estrutural da região  $\beta$ -grampo do Jaburetox poderia ser responsável pela formação de canal em membranas lipídicas, através de uma configuração  $\beta$ -barril, próximos a regiões  $\beta$ -grampo, cada proveniente de um único monômero.

Entretanto, estudos da relação estrutura-função realizados com versões mutantes do Jaburetox, faltando a região do  $\beta$ -grampo (Jbtx- $\beta$ ), N-terminal (Jbtx N-ter) ou domínios C-terminais (Jbtx C-ter) revelaram que somente uma parte da atividade do Jaburetox de romper membranas pode ser atribuída ao  $\beta$ -grampo e que o domínio N-terminal sozinho é responsável pela atividade inseticida do peptídeo.<sup>173</sup> Piovesan e colaboradores<sup>162</sup> obtiveram pela primeira vez uma demonstração direta da capacidade da JBU e do Jaburetox de permeabilizar membranas por meio de um mecanismo com base em canais iônicos. Além disso, os resultados por eles obtidos mostraram que a falta do domínio  $\beta$ -grampo no Jbtx- $\beta$  não afetou a capacidade de formação de canais em

membranas lipídicas, fornecendo um forte argumento de que o domínio  $\beta$ -grampo não seja crucial para a permeabilização da membrana.<sup>162</sup>

A estrutura 3-D da JBU mostra que a região que mapeia o peptídeo Jaburetox contém também duas  $\alpha$ -hélices curtas localizadas ao lado do N-terminal do  $\beta$ -grampo, uma delas presente no Jbtx N-ter.<sup>152</sup> Duas  $\alpha$ -hélices idênticas são encontradas muito próximas da superfície do hexamero da JBU.

Assim, levanta-se a possibilidade da ocorrência de um comportamento cooperativo destas hélices curtas no processo de formação de canal, juntamente com o fato de que é necessário mais do que uma destas hélices curtas para atravessar a bicamada.<sup>162</sup> Assim, é possível que um rearranjo oligomérico de tais estruturas helicoidal poderia ocorrer, resultando na formação de canais e na permeabilização da membrana pela JBU, Jbtx ou o N- e C-terminal, uma característica sem precedentes para uma proteína formadora de poros.<sup>162</sup> Contudo, existem muitos exemplos de toxinas formadoras de poros que atravessam membranas biológicas principalmente por meio de poros transmembrana de estruturas  $\beta$ -barril e  $\alpha$ -hélices, constituindo uma estratégia alternativa comum de bactérias, fungos e plantas toxinas para permeabilizar células alvo.<sup>174,175</sup>

Em estudo anterior<sup>176</sup> verificou-se que a JBU é capaz de interagir com lipossomas, constituídos por lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas, com diâmetros de  $\sim 200$  nm, revelando mudanças estruturais na membrana lipossômica. Além disso, pôde-se observar por DLS que o diâmetro dos lipossomas sofreram alteração de acordo com o tempo e à medida que a JBU é adicionada ao sistema.

Sendo assim, o presente capítulo tem por objetivo investigar a interação de GUVs, compostas por lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas, com a urease de Jack bean, por meio da direta visualização das GUVs, usando a técnica de microscopia óptica de fluorescência.

## **5.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.2.1 Materiais**

Os lipídios PC, > 99% (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina), CHOL, > 99% (cholesterol), PE, > 97% (L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina), PS, 97% (L- $\alpha$ -fosfatidil-L-serina), PI, 50% (L- $\alpha$ -fosfatidilinositol) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. A esfingomielina-SM (cérebro bovino, > 99%) e a Rodamina-DOPE, > 99% (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-lissaminerodamina B sulfonil, sal de amonia) foram adquiridas da Avanti Polar Lipids. A urease de Jack bean do tipo C-3 foi obtida da Sigma-Aldrich.

### 5.2.2 Preparação das amostras

As vesículas gigantes foram preparadas pelo método de eletroformação, descrito na seção 2.3 ou pelo método gel descrito na seção 2.4, utilizando-se a seguinte composição de lipídios (lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas<sup>177</sup>, mol/mol): 34,1% de PC, 25,8% de CHOL, 24,3% de PE, 7,7% de SM, 6,1% de PS, 2% de PI e 0,5% (mol/mol) do lipídio fluorescente rodamina.

A urease de Jack bean tipo C-3 foi dissolvida, gota a gota, em água MilliQ, sob banho de gelo e utilizada no mesmo dia ou no máximo após um dia na geladeira (4 °C).

Para a visualização no microscópio óptico de fluorescência, primeiramente a solução contendo a JBU, previamente dissolvida em água MilliQ na concentração de 0,5 mg/mL, foi transferida para uma lamínula contendo uma superfície com divisão, apresentando um volume máximo de amostra de 100  $\mu$ L. Após a transferência da JBU, foi adicionada a solução contendo as GUVs em glicose/sacarose e, então, as imagens de microscopia foram coletadas. O efeito da JBU foi testado nas GUVs em três regimes distintos, correspondendo às concentrações de 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M e 0,5  $\mu$ M. Foram realizadas mais de 10 repetições para cada regime de concentração.

### 5.2.3 Microscopia óptica

As imagens de fluorescência foram realizadas utilizando-se o microscópio invertido TE 2000 (Nikon, Japan), equipado com uma objetiva de 60X (Water

Immersion, 1.2 NA Plan Apo DIC objective). O microscópio possui um sistema constituído de lâmpada fluorescente de mercúrio com o caminho óptico apresentando filtros para a seleção do comprimento de onda da luz incidente na amostra. As imagens de fluorescência foram coletadas por meio de uma câmera digital (Diagnostic Instruments NDIAG 1800) acoplada ao microscópio, o que permite que as imagens sejam gravadas na forma de um filme.

## **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3.1 Na concentração de 0,01 $\mu\text{M}$ de JBU**

Em baixa concentração (0,01  $\mu\text{M}$ ) de JBU foram observados dois fenômenos diferentes após a adição das GUVs na solução contendo a urease. Um dos fenômenos observado foi a ocorrência de distorções na membrana das GUVs e, em seguida, a formação de filamentos (excesso de membrana), que podem ocorrer tanto no interior como no exterior das vesículas (figuras 5.3 e 5.4). Este processo dura em torno de 3 minutos e nem todas as vesículas apresentaram este fenômeno.

Cabe ressaltar que pequenas flutuações em membranas de GUVs são normais, devido as pequenas diferenças de concentrações que possam existir entre a solução de sacarose de dentro das vesículas e a solução de glicose do meio externo. Além disso, defeitos de formação de GUVs podem ocorrer com a presença de pequenos filamentos internos.<sup>79</sup> Entretanto, a ocorrência de fortes distorções de membrana com subsequente formação de filamentos que aumentam de tamanho ao longo do tempo (segundos) não foram observados em GUVs na ausência da JBU. Todas as imagens feitas das GUVs na presença da JBU foram também analisadas na ausência da JBU, com o intuito de verificar somente efeitos de membrana decorrentes da interação da JBU com as GUVs.

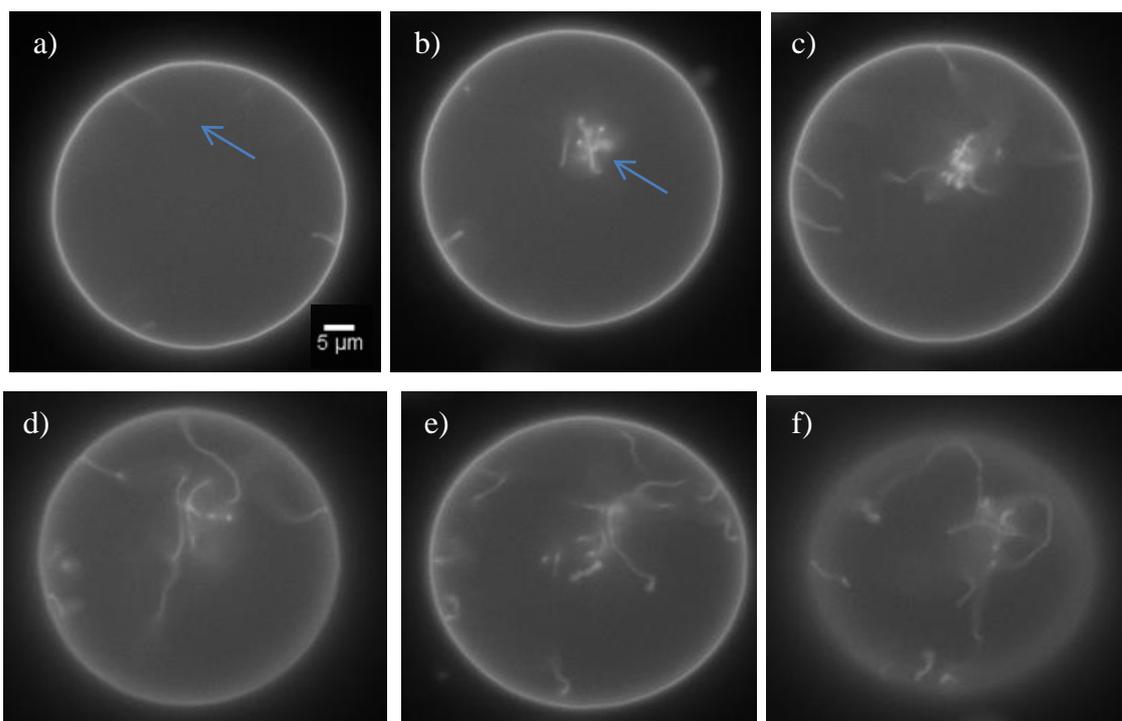


Figura 5.3. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de uma vesícula gigante, contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,01  $\mu\text{M}$  de JBU. As setas indicam a presença de filamentos.

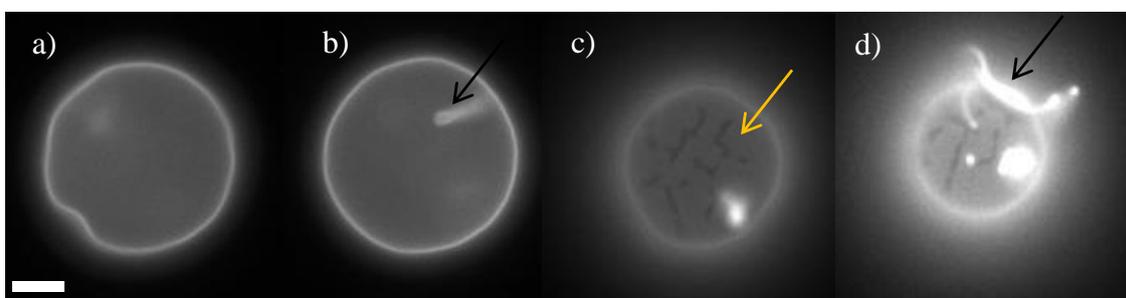


Figura 5.4. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de uma GUV, contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,01  $\mu\text{M}$  de JBU. As setas pretas indicam a presença de filamentos. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Mally e colaboradores<sup>178</sup> estudaram a interação entre o peptídeo melitina, formador de poros em membranas, e GUVs, por meio de micromanipulação e direta visualização através de microscopia óptica de contraste de fase. Eles observaram que em baixas concentrações do peptídeo, as membranas das vesículas sofreram perturbações (distorções) e que, após um curto tempo, ocorreu a formação de pequenos

filamentos dentro e fora das GUVs. Contudo, os filamentos no interior das vesículas se tornaram globulares em um tempo de 30 minutos.

Outro fenômeno observado em baixa concentração de JBU foi que, em algumas vesículas, ocorreu o surgimento de manchas escuras no interior das mesmas e que, na maioria das vezes, este fato ocorreu com a formação de filamentos dentro ou fora das GUVs. A figura 5.5 mostra um exemplo do surgimento dessas manchas, que são características de domínios em GUVs. Essas manchas escuras não haviam sido observadas na amostra de GUVs na ausência da urease, ou pelo menos o que foi possível detectar a partir da resolução do microscópio ( $0,5 \mu\text{m}$ ). A figura 5.5 mostra a imagem do surgimento de um domínio, que aumenta ao longo do tempo de 5 minutos em uma GUV.

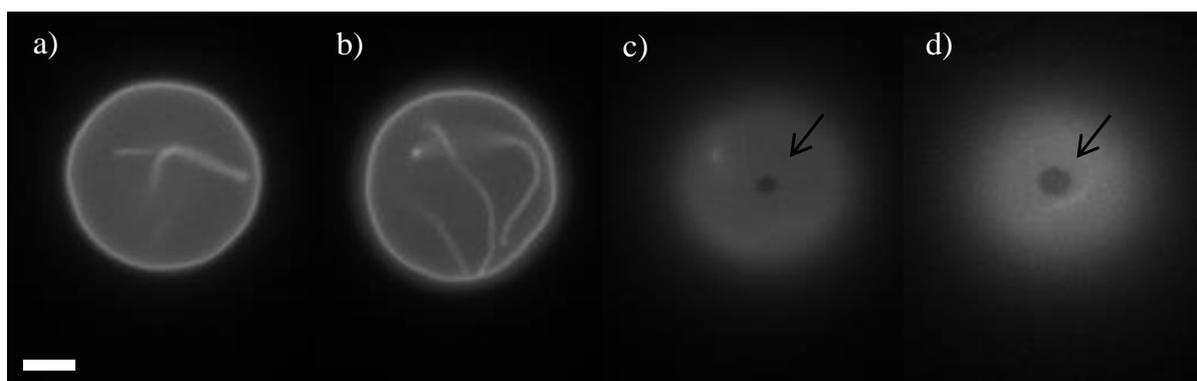


Figura 5.5. Progressão de imagens de microscopia de fluorescência de uma GUV contendo 0,5% de rodamina, na presença de  $0,01 \mu\text{M}$  de JBU. As setas indicam a presença de um domínio. Para a visualização de domínios o foco deve ser deslocado para o topo ou para base da vesícula, por isso as imagens (c) e (d) não estão no mesmo plano focal que as imagens (a) e (b), mesmo se tratando da mesma vesícula. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .

Como já mencionado, separação de fases em membranas biológicas, chamados de jangadas lipídicas, referem-se à coexistência de domínios, ou seja, duas fases diferentes na membrana, uma denominada de líquido-ordenado ( $L_o$ ), resultado do ordenamento de esfingolípídios e o colesterol, e outra fase chamada de líquido-desordenado ( $L_d$ ) composta por lipídios insaturados.<sup>6</sup> Os lipídios de membranas estão organizados e mantidos juntos por meio das interações hidrofóbicas e outras forças

como de van der Waals e ligações de hidrogênio, de tal maneira que ainda exista uma limitada quantidade de movimento lateral e rotacional, o qual dá a membrana sua fluidez descrita no modelo de membrana de Singer Nicolson.<sup>56</sup> Assim, as membranas naturais são fluidas e suas moléculas não são rígidas, o que dá a origem da existência das fases diferentes,  $L_o$  e  $L_d$ .<sup>179,180</sup>

Haluska e colaboradores<sup>6</sup> estudaram a separação de fases em GUVs de sistemas ternários de lipídios contendo colesterol, esfingomiéline e DOPC. Das doze composições que foram estudadas por eles desses lipídios nas GUVs apenas três apresentaram domínios, ou seja, a coexistência das fases  $L_o$  e  $L_d$ . As outras composições apresentaram apenas uma mistura homogênea de lipídios, ou pelo menos o que foi possível detectar a partir da resolução do microscópio (0,5  $\mu\text{m}$ ). Apesar do grande número de estudos sobre separação de fases em GUVs, a exata conexão entre a separação de fases em modelos de membranas e as jangadas lipídicas das membranas celulares não está totalmente compreendida ainda.

As temperaturas de transição de fases principais dos lipídios que compõem as GUVs estudadas no presente capítulo diferem significativamente, entretanto, por não se observar a formação de domínios antes da interação com a JBU, sugere-se que a quantidade de lipídio utilizada forme uma mistura homogênea na membrana das GUVs. Haja vista que, mesmo havendo diferença de fases entre os lipídios que formam a membrana das vesículas, o surgimento de domínios depende da quantidade de cada lipídio na composição da membrana das GUVs.

Não há relatos na literatura do surgimento de domínios em GUVs provocados pela JBU. Entretanto, algumas proteínas de membranas já foram estudadas por apresentarem preferência de fase na membrana. Por exemplo, a proteína TM  $\alpha$ -grampo (7-TM *bacteriorhodopsin*) foi estudada por sua partição entre as fases  $L_o$  e  $L_d$  em GUVs compostas por esfingomiéline, colesterol e DOPC. No estudo de simulação por dinâmica molecular, verificou-se que a proteína TM  $\alpha$ -grampo possui uma preferência de interação com a fase  $L_d$ , não se ligando na fase  $L_o$ .<sup>181-183</sup>

O estudo de interação com o peptídeo WALP e bicamadas lipídicas mostrou que o mesmo também não interage com a fase  $L_o$ , apresentando uma espontânea interação com a fase  $L_d$ . Nas simulações, o peptídeo é rapidamente expelido de domínio  $L_o$ , quando inserido. A passagem do peptídeo na fase  $L_d$ , quando inserido na fase  $L_o$ , é

facilitada pela formação de uma “ilha” transiente de lipídios insaturados que passa através do domínio  $L_o$ . Este movimento é coletivo de ambos os lipídios e peptídeos que desempenha um papel importante no processo de separação lateral.<sup>181</sup>

Fahsel e colaboradores<sup>46</sup> estudaram a interação entre GUVs constituídas de DMPC/DSPC (1:1 mol/mol), composição lipídica que apresenta domínios, e o polipeptídeo-gramicidina D. Eles observaram que na presença de 2 ou 5% em mol de gramicidina os domínios desapareciam. Os autores também verificaram que o polipeptídeo dependia de uma determinada fase e do comprimento dos lipídios da membrana. A estrutura de dupla hélice da gramicidina prevaleceu nas membranas de DSPC, na fase de gel, enquanto que foram encontradas estruturas de dímeros helicoidais nos domínios constituídos de DMPC, na fase líquido-cristalina.<sup>46</sup>

Sendo assim, a hipótese levantada para a formação de separação de fases nas GUVs na presença da JBU, é que a mesma apresente uma preferência por uma das fases na membrana. Assim, os lipídios que apresentam o comportamento de fase, o qual a JBU tenha a preferência, ficam mais próximos dela, promovendo a segregação de pequenos domínios nas GUVs.

### **5.3.2 Na concentração de 0,1 $\mu$ M de JBU**

Na concentração de 0,1  $\mu$ M de JBU também se observou perturbações na membrana das GUVs que parecem ser, visivelmente, mais pronunciadas que na concentração de 0,01  $\mu$ M. Essas perturbações provocam grandes deformações nas GUVs que chegam a adotar, temporariamente, outra forma, não mais a forma esférica. Entretanto, após alguns segundos de deformações, as vesículas começaram a tornar-se esféricas novamente, como pode ser observado na sequência de imagens da figura 5.6. Este fenômeno tem duração de aproximadamente 7 minutos. Além disso, foram observados novamente o surgimento de alguns domínios, bem como a formação de grandes filamentos internos e externos nas vesículas.

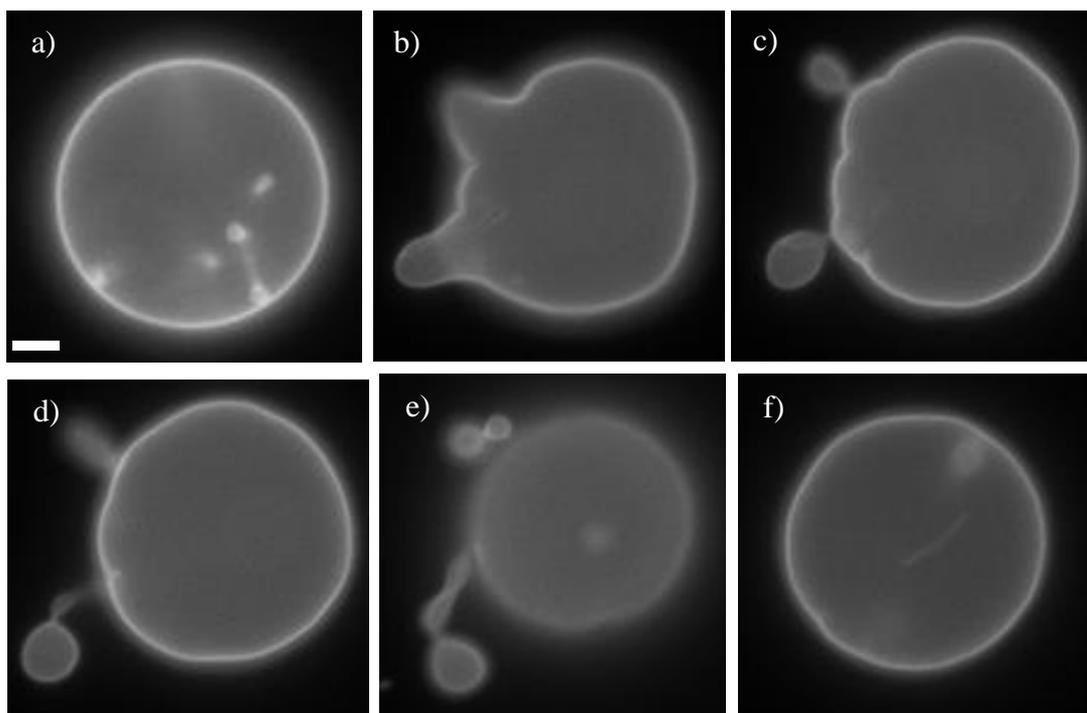


Figura 5.6. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de uma GUV contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,1  $\mu\text{M}$  de JBU. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.3 Na concentração de 0,5 $\mu\text{M}$ de JBU

Na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de JBU outros fenômenos foram observados. A figura 5.7 mostra um leve aumento de área das GUVs, com muita perturbação de membrana e com formação de um pequeno nó (excesso de membrana) que começa a se formar externamente nas GUVs. Devido a rápida movimentação das GUVs e a grande flutuação da membrana na presença de 0,5  $\mu\text{M}$  de JBU, as imagens de microscopia de fluorescência não conseguem mostrar com nitidez a ocorrência do fenômeno descrito acima. Entretanto, o mesmo foi verificado quando um filme foi gravado e analisado pelo programa Magneto.

Mally e colaboradores<sup>178</sup> também observaram que em altas concentrações do peptídeo melitina, as GUVs apresentavam um aumento de área superficial com o surgimento de excesso de membrana externamente nas GUVs.

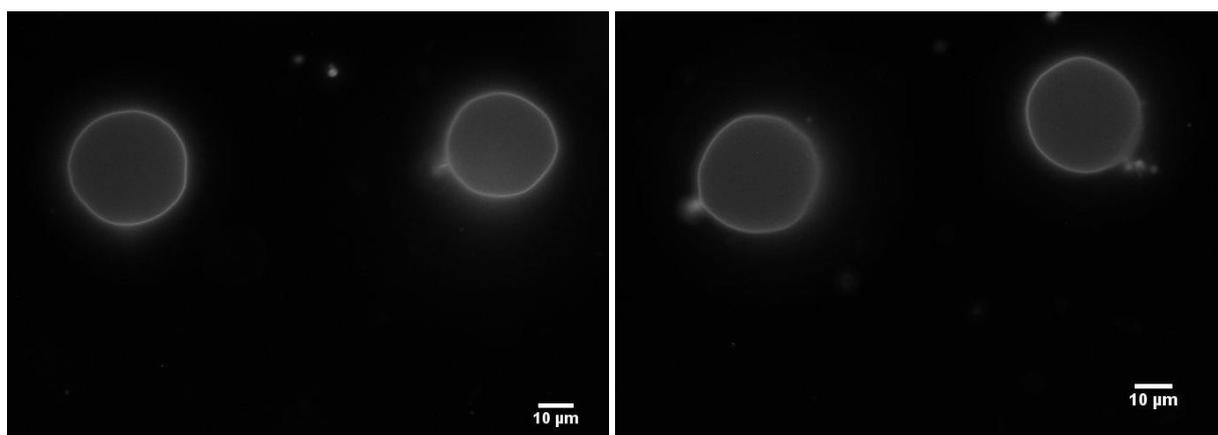


Figura 5.7. Sequência de imagens de microscopia de fluorescência de GUVs, contendo 0,5% de rodamina, na presença de 0,5  $\mu\text{M}$  de JBU.

Outro fenômeno observado na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  (também observado em trabalho semelhante por Mally e colaboradores<sup>178</sup> em altas concentrações de melitina) foi o rápido desaparecimento das GUVs com o tempo. A figura 5.8 mostra uma sequência de imagens feitas em microscopia DIC, na qual se pode observar o desaparecimento de duas vesículas no tempo total de 3 minutos após a interação com a urease 0,5  $\mu\text{M}$ . A utilização da microscopia DIC se deve ao fato da difícil visualização do desaparecimento das GUVs na microscopia de fluorescência, pois o desaparecimento das mesmas pode ser confundido com o foto-branqueamento do fluoróforo, que é a perda de fluorescência de uma molécula fluorescente. Assim, após a percepção de que algumas GUVs estavam desaparecendo repentinamente do foco na microscopia de fluorescência, utilizou-se a microscopia DIC, como uma alternativa de visualização deste fenômeno. Entretanto, este fenômeno não foi muito frequente, e com isso, foram raras as filmagens feitas do desaparecimento de vesículas.

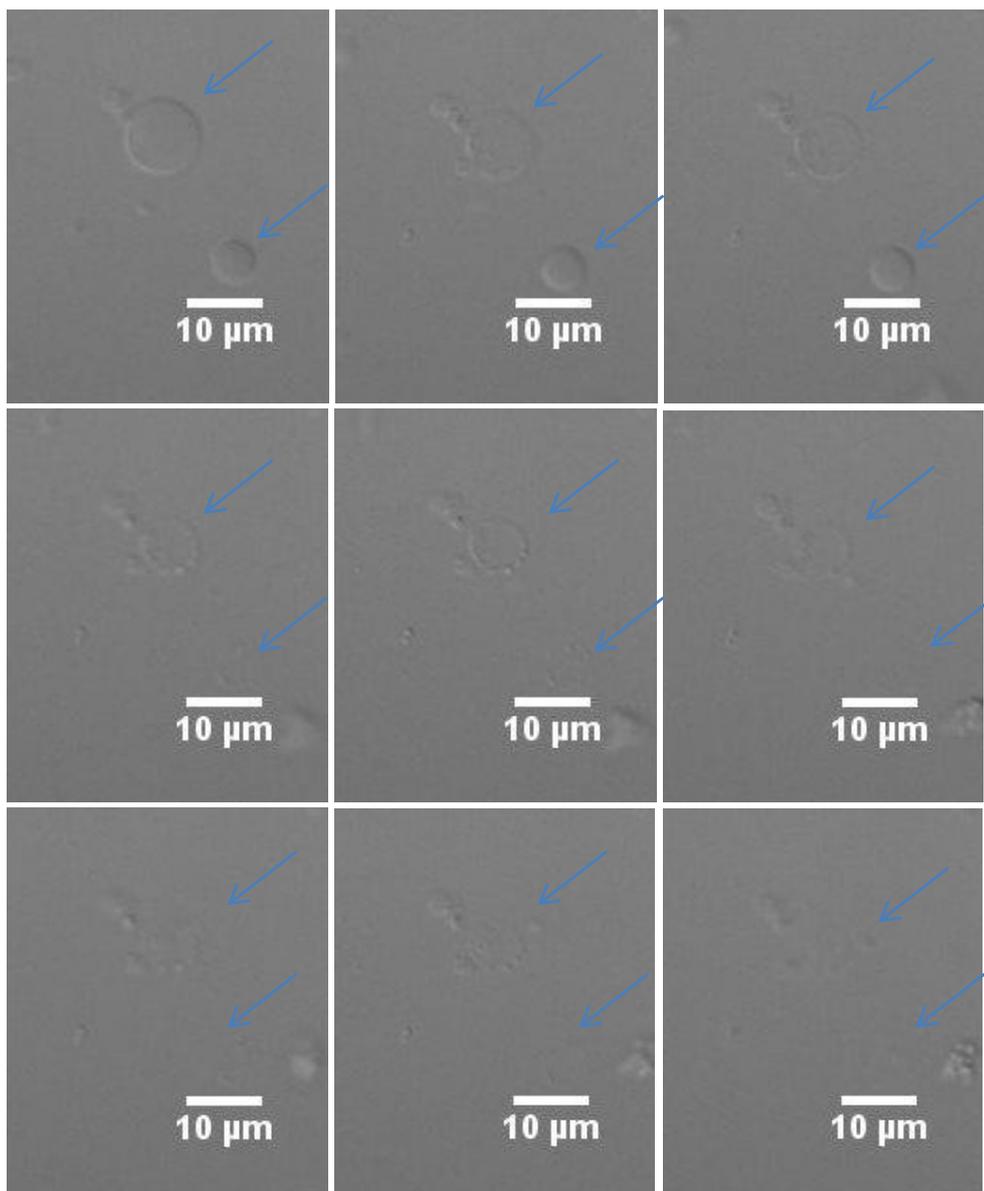


Figura 5.8. Sequência de imagens de microscopia DIC de GUVs na presença de NaCl 0,5 M e 0,5  $\mu$ M de JBU.

Nos experimentos da interação de GUVs com a JBU na concentração de 0,5  $\mu$ M, também se testou a condição de meio com NaCl 0,5 M, pois este meio já havia sido utilizado no trabalho de mestrado. Entretanto, as GUVs não crescem nesta condição de meio pelo método de eletroformação. Assim, utilizou-se o método gel para a obtenção das GUVs em NaCl 0,5 M e uma nova sequência de experimentos foram realizadas com a JBU 0,5  $\mu$ M. Resultados similares aos encontrados para a condição sem sal foram obtidos para a condição de meio salino. Contudo, as GUVs formadas pelo método gel apresentaram-se, de modo geral, menores que as produzidas pelo método de

eletroformação. Além disso, as GUVs menores movimentam-se mais rápido, impedindo uma boa visualização de fenômenos na membrana das GUVs.

Assim, os resultados obtidos, nas diferentes concentrações de JBU, sugerem que o efeito da urease na membrana das GUVs seja dependente da concentração. Podem-se resumir os efeitos da JBU nas GUVs em:

(a) baixa concentração (0,01  $\mu\text{M}$ ) com efeitos de perturbações nas membranas, mas as GUVs permanecem impermeáveis as moléculas de açúcar (glicose) e observa-se o surgimento de excessos de membrana na forma de filamentos internos e externos;

(b) na concentração intermediária de 0,1  $\mu\text{M}$  observaram-se efeitos de distorção de membrana com deformações da forma, além de excessos de membrana na forma de filamentos; e

(c) alta concentração (0,5  $\mu\text{M}$ ) observou-se o efeito de permeabilização da membrana e subsequente rompimento da GUV, além de do surgimento de excessos de membrana.

Mally e colaboradores<sup>178</sup> concluíram que em baixas concentrações, a melitina se insere na membrana das GUVs sem haver permeabilização da mesma. Entretanto, em altas concentrações, eles observaram o rompimento da membrana como consequência da inserção do peptídeo e permeabilização da membrana. Alguns monômeros de melitina inseridos na membrana poderiam formar um poro, e o tamanho desse poro induzido, bem como o número deles na membrana poderia aumentar, não só pelo aumento da concentração do peptídeo, mas também do tempo. A presença de um número significativo de poros permite o transporte de moléculas pequenas através da membrana, promovendo a permeabilização da membrana.

Sendo assim, considerando que na baixa concentração de JBU as GUVs são preservadas, não havendo rompimento da membrana, sugere-se que ocorra a inserção da JBU na membrana das GUVs. Essa inserção foi evidenciada neste trabalho pela distorção da membrana e a formação de excesso de membrana. Como relatado por Piovesan e colaboradores<sup>162</sup> a urease poderia se inserir com sua porção hidrofóbica, composta pelas duas  $\alpha$ -hélices curtas<sup>152</sup>, atravessando a bicamada lipídica das GUVs. Estas hélices curtas estão presentes na superfície na JBU e, conseqüentemente, com a

inserção destas hélices na membrana, o restante da JBU permanece em contato com o meio aquoso.

Um rearranjo oligomérico das estruturas helicoidal poderia ocorrer com a inserção da JBU na membrana<sup>162</sup>, resultando na permeabilização de moléculas de glicose e posterior rompimento da membrana das GUVs. Esta situação só seria possível, segundo os resultados encontrados até aqui, com uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de JBU. Entretanto, outros fatores poderiam estar envolvidos no rompimento da membrana de algumas vesículas nessa concentração, como, por exemplo, a diferença de concentração do meio contendo a JBU e o meio em que se encontram as GUVs.

#### **5.3.4 Análises das GUVs nos regimes de concentração após a variação do tempo**

As amostras dos três regimes de concentração estudados foram analisadas novamente após 24 horas da primeira análise, bem como um branco das GUVs na ausência da JBU. Com exceção do branco, todas as três amostras das três concentrações de JBU, apresentaram um número extremamente pequeno de vesículas e com tamanhos menores de 10  $\mu\text{m}$ . Esta observação sugere que ao longo do tempo mais moléculas de JBU possam ter se inserido na membrana das GUVs. Esta inserção pode ter levado a permeabilização de moléculas pequenas através da membrana, como a glicose, promovendo a ruptura da membrana.

Em trabalho anterior<sup>176</sup> realizou-se um estudo da interação de 0,5  $\mu\text{M}$  da JBU com lipossomas compostos por lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas. Neste estudo verificou-se, por meio da técnica de DLS, que houve uma diminuição no diâmetro dos lipossomas ao longo do tempo de trinta minutos. Esta mudança nas dimensões dos lipossomas, causada pela JBU, tornou-se mais pronunciada após um dia, corroborando com as imagens observadas de microscopia neste trabalho. Além disso, constatou-se, por meio da técnica de SAXS, que ocorreram mudanças estruturais na membrana dos lipossomas, tornando-se mais pronunciada após 12 horas.

## 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo realizou-se um estudo, por meio de microscopia óptica de fluorescência da interação da urease de Jack bean com GUVs compostas por lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas. Os resultados obtidos sugerem que a ação da JBU na membrana das GUVs seja dependente da concentração. Assim, nas concentrações de 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$  observaram-se efeitos de perturbações e distorções da membrana das vesículas, bem como o surgimento de filamentos internos e externos. Entretanto, esses efeitos não levaram a permeação de moléculas de açúcar (glicose), sugerindo apenas a inserção da JBU na membrana das GUVs. Essa inserção poderia ocorrer por meio da penetração das estruturas  $\alpha$ -hélices presentes na superfície da JBU.

Já na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ , observaram-se efeitos de formação de excessos de membrana externo às vesículas, bem como eventuais rupturas de membrana. As análises dos três regimes de concentração estudados após 24 horas da primeira observação em microscopia revelaram um número extremamente pequeno de GUVs, com tamanhos menores de 10  $\mu\text{m}$ . Essa observação sugere que ao longo do tempo mais moléculas de JBU possam ter penetrado na membrana das GUVs, acarretando no transporte de moléculas de glicose através da membrana, promovendo, assim, a permeabilização da membrana.

# **Capítulo 6**

## **Conclusões**

A presente tese objetivou o estudo com vesículas lipídicas utilizando-se principalmente as técnicas de microscopia óptica de fluorescência e confocal. Primeiramente, realizou-se um estudo de mecanismo de fusão de vesículas unilamelares gigantes durante o crescimento por eletroformação através da técnica de microscopia confocal. Imagens de microscopia óptica de contraste de fase mostraram que durante a eletroformação as vesículas crescem em tamanho por meio da fusão com outras vesículas. Os resultados obtidos por meio da técnica de microscopia confocal indicaram que majoritariamente o mecanismo de fusão de GUVs ocorre por meio do cenário em que as vesículas crescem em tamanho e se fundem com vesículas vizinhas, estando no mesmo substrato lipídico e não com vesículas já formadas em solução. Assim, conhecendo-se melhor o mecanismo pelo qual as GUVs são formadas, pode-se futuramente compreender melhor alguns processos relacionados com a formação dessas GUVs, bem como o encapsulamento de moléculas de interesse durante a eletroformação.

Estudou-se também a resposta de GUVs constituídas por diferentes composições lipídicas, em relação ao campo elétrico externo aplicado (AC), por meio de microscopia óptica de fluorescência. Primeiramente, com intuito de avaliar a influência do campo elétrico nos domínios formados em GUVs, investigou-se a separação de fases em LUVs e GUVs constituídas por diferentes composições dos lipídios DOPC e SM. Os resultados foram obtidos com base nas técnicas de SAXS e DLS para o estudo com as LUVs e na técnica de microscopia óptica de fluorescência para os estudos com as GUVs. Um comparativo direto entre os domínios formados em LUVs e GUVs se torna complexo devido ao uso de técnicas indiretas como o DLS e SAXS para o estudo em LUVs. Essas técnicas sozinhas não são eficientes na avaliação da formação de domínios em membranas. Contudo, a direta visualização de GUVs, por meio de microscopia óptica de fluorescência, permitiu se verificar que a composição da membrana das vesículas influencia na quantidade e nos tamanhos dos domínios formados. Além disso, avaliou-se a influência da temperatura na formação de domínios, durante o crescimento de GUVs por eletroformação. Assim, observou-se que a temperatura de crescimento foi um fator importante na formação de domínios em GUVs de composição lipídica de 25 % de DOPC e 75 % de SM. Com esta composição lipídica, as GUVs (crescidas na temperatura ambiente) apresentaram metade das vesículas com domínios e a outra metade sem domínios visíveis em microscopia de fluorescência. A aplicação de campo

elétrico externo nessa composição de GUVs (2 V e 60 Hz por duração de duas horas) indicou que após aplicação do campo a grande maioria das GUVs apresentou separação de fases.

Realizou-se também um estudo de resposta de GUVs constituídas de DOPC, DMPC e DLPC em relação ao campo elétrico aplicado, bem como a diferença de pressão osmótica. As GUVs de DLPC apresentaram a maior deformação de membrana quando a tensão variou de 1 a 20 V. A diferença de pressão osmótica provocada por aumento da concentração da solução de glicose externa, também se mostrou mais pronunciada nas GUVs constituídas de DLPC. Nessas vesículas pôde-se observar a formação de longos filamentos externos junto à membrana das vesículas e que voltam a compor a sua membrana com aplicação de 10 V e 20 Hz ou ainda com 10 V e 40 Hz. Entretanto, nesta última condição, a velocidade de retração dos filamentos ocorreu de forma mais lenta, quando comparada a condição de 10 V e 20 Hz.

Finalmente investigou-se a interação de GUVs compostas por lipídios majoritariamente encontrados nas plaquetas humanas com a urease de Jack bean, utilizando-se microscopia óptica de fluorescência. Os resultados obtidos sugerem que o efeito da JBU na membrana é dependente da concentração. Nas concentrações de JBU de 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$  grandes distorções das membranas das GUVs, bem como a formação de filamentos foram observados, sugerindo a inserção da JBU na membrana. Essa inserção poderia ser realizada considerando a parte hidrofóbica presente na superfície da JBU, na qual estão situadas as  $\alpha$ -hélices que são capazes de penetrar na membrana das GUVs. Já na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  observou-se eventuais rupturas de membranas. As análises dos três regimes de concentração estudados, após 24 horas da primeira observação em microscopia, revelou que as três amostras das três diferentes concentrações de JBU apresentaram um número extremamente pequeno de GUVs e com tamanhos menores de 10  $\mu\text{m}$ . Essa observação sugere que ao longo do tempo mais moléculas de JBU possam ter penetrado na membrana das GUVs, permitindo o transporte de moléculas pequenas através da membrana, como a glicose, promovendo a ruptura da mesma.

# Referências

1. Lasic, D. D. *Trends in Biotechnology*. **1998**, *16*, 307.
2. Janshoff, A.; Steinem, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2006**, *385*, 433.
3. Dimova, R.; Aranda, S.; Bezlyepkina, N.; Nikolov, V.; Riske, K.A.; Lipowsky, R. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **2006**, *18*, S1151.
4. Mertins, O. *Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
5. Walde, P.; Cosentino, K.; Engel, H.; Stano, P. *Chembioche*. **2010**, *11*, 848.
6. Haluska, C. K.; Schröder, A. P.; Didier, P.; Heissler, D.; Duportail, G.; Mély, Y.; Marques, C. M. *Biophysical journal*. **2008**, *95*, 5737.
7. Nakano, T.; Wada, Y.; Matsumura, S. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. **2001**, *24*, 85.
8. Filippov, A.; Orädd, G.; Lindblom, G. *Biophysical Journal*. **2006**, *90*, 2086.
9. Yeung, T.; Gilbert, G. E.; Shi, J.; Silvius, J.; Kapus, A.; Grinstein, S. *Science*. **2008**, *319*, 210.
10. Holopainen, J. M.; Subramanian, M.; Kinnunen, P. K. J. *Biochemistry*. **1998**, *37*, 17562.
11. Marggraf, W.-D.; Kanfer, J. N. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1987**, *897*, 57.
12. Ohvo-Rekilä, H.; Ramstedt, B.; Leppimäki, P.; Peter Slotte, J. *Progress in Lipid Research*. **2002**, *41*, 66.
13. Maulik, P. R.; Shipley, G. G. *Biophysical Journal*. **1996**, *70*, 2256.
14. Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J. *Langmuir*. **2009**, *25*, 13522.
15. Van Dijck, P. W. M.; De Kruijff, B.; Van Deenen, L. L. M.; De Gier, J.; Demel, R. A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1976**, *455*, 576.
16. Knorr, R. L. *Giant vesicles-influence of phase state, composition and electric pulses*. Dissertação de mestrado. Alemanha: Universitat Potsdam, **2010**.
17. Smith, R.; Tanford, C. *Journal of Molecular Biology*. **1972**, *67*, 75.
18. Jesorka, A.; Orwar, O. *Annual Review of Analytical Chemistry*. **2008**, *1*, 801.
19. Aranda-Espinoza, H.; Bermudez, H.; Bates, F. S.; Discher, D. E. *Physical Review Letters*. **2001**, *87*, 208.
20. Komberg, R.D.; Mc Connell, H.M. *Biochemistry*. **1971**, *10*, 1111.
21. Mutz, M.; Bensimon, D. *Physical Review A*. **1991**, *43*, 4525.
22. Wintz, W.; Döbereiner, H. G.; Seifert, U. *Europhysics Letters*. **1996**, *33*, 403.

23. Döbereiner, H. G.; Evans, E.; Kraus, M.; Seifert, U.; Wortis, M. *Physical Review E*. **1997**, *55*, 4458.
24. Haluska, C. K.; Gózdź, W. T.; Döbereiner, H.-G.; Förster, S.; Gompper, G. *Physical Review Letters*. **2002**, *89*, 238.
25. Döbereiner, H.-G. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. **2000**, *5*, 256.
26. Koynova, R.; Caffrey, M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. **1998**, *1376*, 91.
27. Lingwood, D.; Schuck, S.; Ferguson, C.; Gerl, M. J.; Simons, K. *Journal of Biological Chemistry*. **2009**, *284*, 12041.
28. Hafez, I. M.; Cullis, P. R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2000**, *1463*, 107.
29. Veatch, S.L.; Keller, S. L. *Biophysical Journal*. **2003**, *85*, 3074.
30. Simons, K.; Ikonen, E. *Nature*. **1997**, *387*, 569.
31. Korade, Z.; Kenworthy, A. K. *Neuropharmacology*. **2008**, *55*, 1265.
32. Lingwood, D.; Simons, K. *Science*. **2010**, *327*, 46.
33. Samsonov, A. V.; Mihalyov, I.; Cohen, F. S. *Biophysical Journal*. **2001**, *81*, 1486.
34. Simons, K.; Eehalt, R. *The Journal of Clinical Investigation*. **2002**, *110*, 597.
35. Cherukuri, A.; Dykstra, M.; Pierce, S. K. *Immunity*. **2001**, *14*, 657.
36. Baumgart, T.; Hammond, A. T.; Sengupta, P.; Hess, S. T.; Holowka, D. A.; Baird, B. A.; Webb, W. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2007**, *104*, 3165.
37. Lingwood, D.; Ries, J.; Schwille, P.; Simons, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2008**, *105*, 10005.
38. Sharma, P.; Varma, R.; Sarasij, R. C.; Ira; Gousset, K.; Krishnamoorthy, G.; Rao, M.; Mayor, S. *Cell*. **2004**, *116*, 577.
39. van Zanten, T. S.; Cambi, A.; Koopman, M.; Joosten, B.; Figdor, C. G.; Garcia-Parajo, M. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2009**, *106*, 18557.
40. Kim, H. M.; Choo, H.-J.; Jung, S.-Y.; Ko, Y.-G.; Park, W.-H.; Jeon, S.-J.; Kim, C. H.; Joo, T.; Cho, B. R. *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 553.
41. Wesolowska, O.; Michalak, K.; Maniewska, J.; Hendrich, A. B. *Acta Biochimica Polonica*. **2009**, *56*, 33.
42. Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophysical Journal*. **1999**, *77*, 2090.
43. Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophysical Journal*. **2000**, *78*, 290.

44. Bagatolli, L. A.; Gratton, E. *Biophysical Journal*. **2000**, *79*, 434.
45. Metso, A. J.; Zhao, H.; Tuunainen, I.; Kinnunen, P. K. J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2005**, *1713*, 83.
46. Fahsel, S.; Pospiech, E. M.; Zein, M.; Hazlet, T. L.; Gratton, E.; Winter, R. *Biophysical Journal*. **2002**, *83*, 334.
47. Dietrich, C.; Bagatolli, L. A.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. *Biophysical Journal*. **2001**, *80*, 1417.
48. Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Biophysical Journal*. **2003**, *85*, 3074.
49. Zhao, J.; Wu, J.; Heberle, F. A.; Mills, T. T.; Klawitter, P.; Huang, G.; Costanza, G.; Feigenson, G. W. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2007**, *1768*, 2764.
50. Bennett, W. F. D.; Tieleman, D. P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2013**, *1828*, 1765.
51. Kumar, P. B. S.; Rao, M. *Physical Review Letters*. **1998**, *80*, 2489.
52. Wallace, E. J.; Hooper, N. M.; Olmsted, P. D. *Biophysical Journal*. **2005**, *88*, 4072.
53. Wada, H. *Journal of the Physical Society of Japan*. **2003**, *72*, 3142.
54. Szekely, P.; Dvir, T.; Asor, R.; Resh, R.; Steiner, A.; Szekely, O.; Ginsburg, A.; Mosenkis, J.; Guralnick, V.; Dan, Y.; Wolf, T.; Tamburu, C.; Raviv, U. *The Journal of Physical Chemistry B*. **2011**, *115*, 14501.
55. Dimova, R.; Pouligny, B.; Dietrich, C. *Biophysical journal*. **2000**, *79*, 340.
56. Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science*. **1972**, *175*, 720.
57. McLaughlin, S.; Murray, D. *Nature*. **2005**, *438*, 605.
58. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brügger, B.; Ringler, P.; Müller, S. A.; Rammner, B.; Gräter, F.; Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmüller, H.; Heuser, J.; Wieland, F.; Jahn, R. *Cell*. **2006**, *127*, 831.
59. Dupuy, A. D.; Engelman, D. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2008**, *105*, 2848.
60. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann, A. R.; da Silveira, N. P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2005**, *138*, 29.
61. Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1978**, *75*, 4194.

62. Gonçalves, M. C. F. *Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas para liberação cutânea da melatonina*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
63. Olson, F.; Hunt, C. A.; Szoka, F. C.; Vail, W. J.; Papahadjopoulos, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1979**, *557*, 9.
64. Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. *Faraday Discussions of the Chemical Society*. **1986**, *81*, 303.
65. Weinberger, A.; Tsai, F. C.; Koenderink, G. H.; Schmidt, T. F.; Itri, R.; Meier, W.; Schmatko, T.; Schröder, A.; Marques, C. *Biophysical Journal*. **2013**, *105*, 154.
66. Pecora, R.; Berne, B. J. *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics*; Dover Publications: New York, **2000**.
67. Brown, W. *Light Scattering, Principles and Development*; Clarendon Press: Oxford, **1996**.
68. Stepánek, P. *In Dynamic Light scattering: The Method and Some Applications*; Brown, W., Ed.; Oxford Science Publications: Oxford, **1993**.
69. Antony, T.; Saxena, A.; Roy, K. B.; Bohidar, H. B. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **1998**, *36*, 75.
70. Jakes, J. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **1995**, *60*, 1781.
71. Giacomelli, F. C. *Estruturação e comportamento físico-químico de sistemas coloidais sob efeito de campo elétrico externo como perspectiva para a ciência macromolecular*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2009**.
72. Guinier, A.; Fournet, G. *Small angle scattering of X-rays*; Wiley: New York, **1955**.
73. Burchard, W. *Cellulose*. **2003**, *10*, 213.
74. Brookhaven Instruments Corporation. *Instruction Manual for BI-SLSW Static Light Scattering Software*; USA: Brookhaven Corporate Park, **1997**.
75. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Talsma, H. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1993**, *64*, 83.
76. Davidson, P. *In Liquid Crystals II*; Mingos, D. M. P., Ed.; Springer: Berlin **1999**.
77. Pedersen, J. S. *Advances in Colloid and Interface Science*. **1997**, *70*, 171.
78. Fatouros, D. G.; Antimisiaris, S. G. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2002**, *251*, 271.
79. Rodriguez, N.; Pincet, F.; Cribier, S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2005**, *42*, 125.

80. Reeves, J. P.; Dowben, R. M. *Journal of Cellular Physiology*. **1969**, 73, 49.
81. Tsumoto, K.; Matsuo, H.; Tomita, M.; Yoshimura, T. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. **2009**, 68, 98.
82. Huang, C.-H. *Biochemistry*. **1969**, 8, 344.
83. Sheetz, M. P.; Chan, S. I. *Biochemistry*. **1972**, 11, 4573.
84. Akashi, K.; Miyata, H.; Itoh, H.; Kinoshita Jr, K. *Biophysical Journal*. **1996**, 71, 3242.
85. Angelova, M.; Dimitrov, D. S. *Progress in Colloid & Polymer Science*. **1988**, 76, 59.
86. Shimanouchi, T.; Umakoshi, H.; Kuboi, R. *Langmuir*. **2009**, 25, 4835.
87. Pott, T.; Bouvrais, H.; Méléard, P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2008**, 154, 115.
88. Mertins, O.; da Silveira, N. P.; Pohlmann, A. R.; Schröder, A. P.; Marques, C. M. *Biophysical Journal*. **2009**, 96, 2719.
89. Hishida, M.; Seto, H.; Yamada, N. L.; Yoshikawa, K. *Chemical Physics Letters*. **2008**, 455, 297.
90. Angelova, M. I.; Soléau, S.; Méléard, P.; Faucon, F.; Bothorel, P. *Progress in Colloid & Polymer Science*. **1992**, 89, 127.
91. Needham, D.; Evans, E. *Biochemistry*. **1988**, 27, 8261.
92. Needham, D.; McIntosh, T. J.; Evans, E. *Biochemistry*. **1988**, 27, 4668.
93. Bagatolli, L. A.; Parasassi, T.; Gratton, E. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2000**, 105, 135.
94. Dimitrov, D. S.; Angelova, M. I. *Progress in Colloid & Polymer Science*. **1987**, 73, 48.
95. Taylor, P.; Xu, C.; Fletcher, P. D. I.; Paunov, V. N. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2003**, 5, 4918.
96. Politano, T. J.; Froude, V. E.; Jing, B.; Zhu, Y. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2010**, 79, 75.
97. Daillant, J.; Bellet-Amalric, E.; Braslau, A.; Charitat, T.; Fragneto, G.; Graner, F.; Mora, S.; Rieutord, F.; Stidder, B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, 102, 11639.
98. Mathai, J. C.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F.; Zeidel, M. L. *The Journal of General Physiology*. **2008**, 131, 69.

99. Kuribayashi, K.; Tresset, G.; Coquet, P.; Fujita, H.; Takeuchi, S. *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Digest of Technical Papers TRANSDUCERS '05 The 13th International Conference*. **2005**, 1152, 1159.
100. Finkelstein, A. *The Journal of General Physiology*. **1976**, 68, 127.
101. Haines, T. H. *FEBS Letters*. **1994**, 346, 115.
102. Xiang, T. X.; Anderson, B. D. *The Journal of Membrane Biology*. **1994**, 140, 111.
103. Jansen, M.; Blume, A. *Biophysical journal*. **1995**, 68, 997.
104. Lande, M. B.; Donovan, J. M.; Zeidel, M. L. *The Journal of General Physiology*. **1995**, 106, 67.
105. Xiang, T. X.; Anderson, B. D. *The Journal of Membrane Biology*. **1995**, 148, 157.
106. Paula, S.; Volkov, A. G.; Van Hoek, A. N.; Haines, T. H.; Deamer, D. W. *Biophysical journal*. **1996**, 70, 339.
107. Sugii, T.; Takagi, S.; Matsumoto, Y. *The Journal of Chemical Physics*. **2005**, 123, 184714.
108. Friend, A. W.; Finch, E. D.; Schwan, H. P. *Science*. **1975**, 187, 357.
109. Engelhardt, H.; Sackmann, E. *Biophysical Journal*. **1988**, 54, 495.
110. Engelhardt, H.; Gaub, H.; Sackmann, E. *Nature*. **1984**, 307, 378.
111. Dimova, R.; Riske, K. A.; Aranda, S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowsky, R. *Soft Matter*. **2007**, 3, 817.
112. Kinoshita Jr, K.; Ashikawa, I.; Saita, N.; Yoshimura, H.; Itoh, H.; Nagayama, K.; Ikegami, A. *Biophysical Journal*. **1988**, 53, 1015.
113. Pethig'r, R.; Kell, D.B. *Physics in Medicine and Biology*. **1987**, 32, 933.
114. Stuchly, M.A.; Stuchly, S.S.; Liburdy, R.P.; Rousseau, D.A. *Physics in Medicine and Biology*. **1988**, 33, 1309.
115. Needham, D.; Hochmuth, R. M. *Biophysical Journal*. **1989**, 55, 1001.
116. Bao, J. Z.; Davis, C. C.; Schmukler, R. E. *Biophysical Journal*. **1992**, 61, 1427.
117. Hibino, M.; Shigemori, M.; Itoh, H.; Nagayama, K.; Kinoshita Jr, K. *Biophysical Journal*. **1991**, 59, 209.
118. Riske, K. A.; Dimova, R. *Biophysical Journal*. **2005**, 88, 1143.
119. Abidor, I. G.; Arakelyan, V. B.; Chernomordik, L. V.; Chizmadzhev, Y. A.; Pastushenko, V. F.; Tarasevich, M. P. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. **1979**, 104, 37.

120. Olbrich, K.; Rawicz, W.; Needham, D.; Evans, E. *Biophysical Journal*. **2000**, 79, 321.
121. Akinlaja, J.; Sachs, F. *Biophysical Journal*. **1998**, 75, 247.
122. Riske, K. A.; Dimova, R. *Biophysical Journal*. **2006**, 91, 1778.
123. Kummrow, M.; Helfrich, W. *Physical Review A*. **1991**, 44, 8356.
124. Niggemann, G.; Kummrow, M.; Helfrich, W. *Journal de Physique II France*. **1995**, 5, 413.
125. Mitov, M. D.; Méléard, P.; Winterhalter, M.; Angelova, M. I.; Bothorel, P. *Physical Review E*. **1993**, 48, 628.
126. Peterlin, P.; Svetina, S.; Žekš, B. *Pflügers Archiv*. **2000**, 439, r139.
127. Dimova, R.; Dietrich, C.; Hadjiisky, A.; Danov, K.; Pouligny, B. *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems*. **1999**, 12, 589.
128. Staykova, M.; Lipowsky, R.; Dimova, R. *Soft Matter*. **2008**, 4, 2168.
129. Stauch, O.; Schubert, R.; Savin, G.; Burchard, W. *Biomacromolecules*. **2002**, 3, 565.
130. Guo, C.; Liu, S.; Dai, Z.; Jiang, C.; Li, W. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2010**, 76, 362.
131. Štěpánek, P.; Tuzar, Z.; Kadlec, P.; Kříž, J. *Macromolecules*. **2007**, 40, 2165.
132. Kučerka, N.; Pencer, J.; Sachs, J. N.; Nagle, J. F.; Katsaras, J. *Langmuir*. **2006**, 23, 1292.
133. Cavalcanti, L. P. *Estudo estrutural de membranas modelo utilizando radiação síncrotron*. Tese de Doutorado. Campinas: UNICAMP, **2001**.
134. Juhasz, J.; Davis, J. H.; Sharom, F. J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2012**, 1818, 19.
135. Milhiet, P.-E.; Giocondi, M.-C.; Baghdadi, O.; Ronzon, F.; Roux, B.; Le Grimellec, C. *EMBO reports*. **2002**, 3, 485.
136. Giocondi, M.-C.; Boichot, S.; Plénat, T.; Le Grimellec, C. *Ultramicroscopy*. **2004**, 100, 135.
137. Lawrence, J. C.; Saslowsky, D. E.; Michael Edwardson, J.; Henderson, R. M. *Biophysical Journal*. **2003**, 84, 1827.
138. Kahya, N.; Scherfeld, D.; Bacia, K.; Poolman, B.; Schwille, P. *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, 278, 28109.
139. Yuan, C.; Furlong, J.; Burgos, P.; Johnston, L. J. *Biophysical Journal*. **2002**, 82, 2526.

140. Portet, T.; Camps i Febrer, F.; Escoffre, J.-M.; Favard, C.; Rols, M.-P.; Dean, D. *S. Biophysical Journal*. **2009**, *96*, 4109.
141. Groves, J. T.; Boxer, S. G.; McConnell, H. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1998**, *95*, 935.
142. Evans, E.; Heinrich, V.; Rawicz, W. *Biophysical Journal*. **2003**, *85*, 2342.
143. Reddy, A. S.; Warshaviak, D. T.; Chachisvilis, M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2012**, *1818*, 2271.
144. Ohno, M.; Hamada, T.; Takiguchi, K.; Homma, M. *Langmuir*. **2009**, *25*, 11680.
145. Bernchou, U.; Midtiby, H.; Ipsen, J. H.; Simonsen, A. C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2011**, *1808*, 2849.
146. Woodward, J. T.; Zasadzinski, J. A. *Physical Review E*. **1996**, *53*, R3044.
147. Woodward, J. T.; Zasadzinski, J. A. *Biophysical Journal*. **1997**, *72*, 964.
148. Kučerka, N.; Liu, Y.; Chu, N.; Petrache, H. I.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. *Biophysical Journal*. **2005**, *88*, 2626.
149. Wang, J. H.; Tarr, D. A. *Journal of the American Chemical Society*. **1955**, *77*, 6205.
150. Jones, B. D.; Mobley, H. L. *Journal of Bacteriology*. **1989**, *171*, 6414.
151. Zerner, B. *Bioorganic Chemistry*. **1991**, *19*, 116.
152. Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K. *Journal of Molecular Biology*. **2010**, *400*, 274.
153. Follmer, C. *Phytochemistry*. **2008**, *69*, 18.
154. Dixon, N. E.; Hinds, J. A.; Fihelly, A. K.; Gazzola, C.; Winzor, D. J.; Blakeley, R. L.; Zerner, B. *Canadian Journal of Biochemistry*. **1980**, *58*, 1323.
155. Takishima, K.; Suga, T.; Mamiya, G. *European Journal of Biochemistry*. **1988**, *175*, 151.
156. Carlini, C. R.; Guimarães, J. A. *Toxicon*. **1981**, *19*, 667.
157. Stanisçuaski, F.; Carlini, C. R. *Toxins (Basel)*. **2012**, *4*, 55.
158. Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Mitidieri, S.; Feder, V.; Wassermann, G. E.; Santi, L.; Vainstein, M. H.; Oliveira, J. T. A.; Fiuza, L. M.; Pasquali, G.; Carlini, C. R. *Toxicon*. **2007**, *50*, 971.
159. Follmer, C.; Barcellos, G. B.; Zingali, R. B.; Machado, O. L.; Alves, E. W.; Barja-Fidalgo, C.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. *Biochemical Journal*. **2001**, *360*, 217.

160. Carlini, C. R.; Oliveira, A. E. A.; Azambuja, P.; Xavier-Filho, J.; Wells, M. A. *Journal of Economic Entomology*. **1997**, *90*, 340.
161. Ferreira-DaSilva, C. T.; Gombarovits, M. E. C.; Masuda, H.; Oliveira, C. M.; Carlini, C. R. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **2000**, *44*, 162.
162. Piovesan, A. R.; Martinelli, A. H. S.; Ligabue-Braun, R.; Schwartz, J.-L.; Carlini, C. R. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2014**, *547*, 6.
163. Defferrari, M. S.; Demartini, D. R.; Marcelino, T. B.; Pinto, P. M.; Carlini, C. R. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **2011**, *41*, 388.
164. Real-Guerra, R.; Carlini, C. R.; Stanisçuaski, F. *Toxicon*. **2013**, *71*, 76.
165. Balasubramanian, A.; Durairajpandian, V.; Elumalai, S.; Mathivanan, N.; Munirajan, A. K.; Ponnuraj, K. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2013**, *58*, 301.
166. Mulinari, F.; Stanisçuaski, F.; Bertholdo-Vargas, L. R.; Postal, M.; Oliveira-Neto, O. B.; Rigden, D. J.; Grossi-de-Sá, M. F.; Carlini, C. R. *Peptides*. **2007**, *28*, 2042.
167. Stanisçuaski, F.; Ferreira-DaSilva, C. T.; Mulinari, F.; Pires-Alves, M.; Carlini, C. R. *Toxicon*. **2005**, *45*, 753.
168. Stanisçuaski, F.; Te Brugge, V.; Carlini, C. R.; Orchard, I. *Journal of Insect Physiology*. **2009**, *55*, 255.
169. Ménez, A. *Toxicon*. **1998**, *36*, 1557.
170. Barros, P. R.; Stassen, H.; Freitas, M. S.; Carlini, C. R.; Nascimento, M. A. C.; Follmer, C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **2009**, *1794*, 1848.
171. Moro, C. F. *Comportamento do peptídeo entomotóxico Jaburetox-2Ec em solução e a sua interação com lipossomas miméticos de plaquetas humanas*. Dissertação de mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2010**.
172. Balasubramanian, A.; Balaji, N.; Gautham, N.; Ponnuraj, K. *Molecular Simulation*. **2012**, *39*, 357.
173. Martinelli, A. H. S.; Kappaun, K.; Ligabue-Braun, R.; Defferrari, M. S.; Piovesan, A. R.; Stanisçuaski, F.; Demartini, D. R.; Dal Belo, C. A.; Almeida, C. G. M.; Follmer, C.; Verli, H.; Carlini, C. R.; Pasquali, G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **2014**, *1840*, 935.
174. Parker, M. W.; Feil, S. C. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. **2005**, *88*, 91.

175. Rojko, N.; Kristan, K.; Viero, G.; Žerovnik, E.; Maček, P.; Dalla Serra, M.; Anderluh, G. *The Journal of Biological Chemistry*. **2013**, 288, 23704.
176. Micheletto, Y. M. S. *Estudo físico-químico da interação da urease de Jack bean com lipossomas miméticos de plaquetas humanas*. Dissertação de mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2010**.
177. Casals, E.; Galán, A. M. a.; Escolar, G.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2003**, 125, 139.
178. Mally, M.; Majhenc, J.; Svetina, S.; Žekš, B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2007**, 1768, 1179.
179. London, E. *Current Opinion in Structural Biology*. **2002**, 12, 480.
180. Dupree, J. L.; Pomicter, A. D. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. **2010**, 91, 118.
181. Domański, J.; Marrink, S. J.; Schäfer, L. V. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2012**, 1818, 984.
182. Nyholm, T. K. M.; Özdirekcan, S.; Killian, J. A. *Biochemistry*. **2007**, 46, 1457.
183. Schäfer, L. V.; de Jong, D. H.; Holt, A.; Rzepiela, A. J.; de Vries, A. H.; Poolman, B.; Killian, J. A.; Marrink, S. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2011**, 108, 1343.