



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**BICAMADAS LIPÍDICAS EM SUPORTES SÓLIDOS: PREPARAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)**

Dissertação

Submetida à Universidade Federal de
Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM QUÍMICA

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Nildete Fatima de Mello

Florianópolis - Santa Catarina - Brasil

Abril de 2004

**BICAMADAS LIPÍDICAS EM SUPORTES SÓLIDOS: PREPARAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)**

Nildete Fatima de Mello

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de

MESTRE EM QUÍMICA

E aprovada em sua forma final no Programa de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Tânia B. Creczynski-Pasa
(Orientadora)

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
(Co-orientadora)

Banca examinadora

Profa. Dra Vera L. A. F. Bascuñan

Prof. Dr. Valdir Soldi

Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Dedico este trabalho especialmente para as pessoas mais importantes da minha vida:

Ao Thomas, meus pais, meus irmãos, minha irmã e meus sobrinhos.

**Façamos da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte,
e da procura um encontro..."**

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a minha família que sempre me deu apoio e auxílio nos momentos de dificuldades;

Às Profas. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa e Maria da Graça Nascimento pela dedicação e orientação no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. André Avelino Pasa (do laboratório de filmes finos e superfícies – LFFS do departamento de física da UFSC) pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por sua grande e inestimável colaboração neste trabalho;

Aos Professores Ricardo José Nunes, Valdir Soldi e Vera Frescura por gentilmente terem aceitado participar da banca examinadora deste trabalho e contribuírem com sugestões;

Ao Thomas Spangenberg e ao Prof. Horst Niehus (Humboldt-Universität zu Berlin) que muito contribuíram com sugestões e idéias para a realização deste trabalho;

Às Profas. Maria Luísa Sartorelli e Lia de Oliveira do LFFS;

Aos meus amigos, em especial à Rosane Claumann Righez e Juliana Cardoso Coelho que estiveram comigo em bons e maus momentos;

Aos colegas do LFFS, em especial, à Luiz Felipe Martins e Alessandro S. da Rocha que me auxiliaram nos primeiros contatos com o microscópio de força atômica;

Aos colegas do laboratório de bioquímica e bioenergética de macromoléculas do departamento de farmácia da UFSC;

À todo departamento de graduação e pós-graduação em química da UFSC, em especial aos funcionários da secretária da Pós-Graduação do curso de Química, Jadir e Grace;

Aos órgãos CAPES, CNPq e PADCT III/CNPq pelo suporte financeiro.

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Sistemas biológicos modelo	2
1.2	Diversidade das membranas biológicas	4
1.3	Lipídeos	4
1.3.1	Fosfolipídeos	6
1.3.2	Propriedades estruturais dos fosfolipídeos	7
1.3.3	Transição de Fase dos fosfolipídeos	9
1.3.3.1	Diferentes fases em sistemas unitários	11
1.3.3.2	Diferentes fases em misturas fosfolipídicas	12
1.3.4	Formação de domínios lipídicos	12
1.4	Auto-organização dos filmes de fosfolipídeos	14
1.4.1	Filmes de monocamadas lipídicas	14
1.4.2	Filmes de bicamadas lipídicas e o paradoxo da pressão do vapor (VPP)	16
1.5	Métodos de análises dos filmes	19
1.5.1	Microscopia de Força Atômica (AFM)	20
1.5.1.1	Modo Contato	22
1.5.1.2	Modo Dinâmico	23
	a) Modo dinâmico MAC-MODE®	25
1.5.1.3	Aplicações	25
1.6	Peroxidação Lipídica	27
1.6.1	Espécies reativas de oxigênio (EROs) e seu mecanismo de ação	27
1.6.2	Principais reações radiculares em sistemas biológicos	31
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivos Gerais	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	METODOLOGIA	38
3.1	Preparação de suportes	38
3.2	Reagentes, solventes e fosfolipídeos utilizados	39
3.3	Métodos experimentais	41
3.3.1	Preparação dos filmes	41
3.3.1.1	Formação de filmes por fusão de vesículas lipídicas (lipossomas)	41

a) Preparação das vesículas lipídicas	41
b) Deposição sobre as superfícies	41
3.3.1.2 – Formação de filmes por evaporação de uma solução orgânica	42
a) Filmes formados pelo simples espalhamento de uma solução orgânica	42
b) Formação de filmes de espalhamento por rotação (“Spin-coating”)	43
3.4 – Caracterização por microscopia de força atômica	43
3.4.1 – Montagem da célula para líquidos do microscópio de força atômica	43
3.4.2 – Peroxidação lipídica dos filmes <i>in situ</i>	44
3.5 – Determinação da peroxidação lipídica por TBARS	44
3.5.1 – Peroxidação <i>in vitro</i>	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 – Preparação de filmes	45
4.1.1 – Análises dos suportes utilizados	46
4.1.2 – Fusão de vesículas sobre a superfície	47
4.1.3 – A deposição pelo espalhamento de uma solução orgânica	49
a) Preparação de filmes de espalhamento por rotação (“Spin-coating”)	49
b) Técnica do simples espalhamento de solução orgânica	50
c) Etapa de Hidratação	54
d) Amostras em condições fisiológicas	55
4.2 – Filmes de DMPC <i>in situ</i> em temperatura de transição de fase	58
a) Coexistência de duas fases em filmes de DMPC	58
b) Desaparecimento de pequenos defeitos em uma bicamada de DMPC	59
4.3 – Sistemas compostos por misturas lipídicas	60
4.3.1 – Domínios microscópicos e nanoscópicos em amostras de DPPC/DOPC e DPPC/PC <i>in situ</i>	62
4.4 – Peroxidação lipídica	65
4.4.1 – Análise de peroxidação lipídica com microscopia de força atômica	65
4.4.2 – Determinação da peroxidação lipídica por TBARS	76
5 CONCLUSÃO	77
6 PERSPECTIVAS	78
7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura de alguns dos principais ácidos graxos encontrados nas membranas biológicas	5
FIGURA 2	Representação geral de uma molécula de fosfolípídeo.	6
FIGURA 3	Exemplo de um fosfolípídeo de membrana.	6
FIGURA 4	Estrutura molecular dos fosfolípídeos derivados da lecitina.	7
FIGURA 5	Estruturamento microscópico dos fosfolípídeos.	8
FIGURA 6	Ilustração sobre a formação da fase “ripple”	10
FIGURA 7	Perfil de DSC sobre membranas multilamelares de DMPC	11
FIGURA 8	Diferentes métodos de formação de camadas de moléculas anfifílicas por Langmuir-Blodgett	15
FIGURA 9	Modelo de lipossoma unilamelar de fosfolípídeos	16
FIGURA 10	Representação de uma bicamada sobre uma superfície sólida	17
FIGURA 11	Esquema ilustrativo dos diferentes modos de operação do microscópio de força atômica.	22
FIGURA 12	Ilustração da aproximação da ponta que varre na amostra	23
FIGURA 13	Medida de amplitude durante a aproximação na superfície.	24
FIGURA 14	Exemplo de uma imagem de topografia, obtida por microscopia de força atômica	25
FIGURA 15	Energias de dissociação necessárias para a formação de radicais de uma cadeia carbônica	33
FIGURA 16	Ácidos graxos existentes em PC.	40
FIGURA 17	Célula para líquidos do microscópio de força atômica.	43
FIGURA 18	Análises de topografia por microscopia de força atômica dos suportes utilizados	46
FIGURA 19	O espalhamento de vesículas de DMPC sobre uma superfície de mica.	47
FIGURA 20	Imagem de vesículas de DMPC sobre a superfície da mica.	48
FIGURA 21	Imagem de topografia mostrando a formação de um filme multilamelar pela técnica de “spin-coating” sobre silício hidrofílico.	49
FIGURA 22	Imagens de topografia de camadas de DMPC preparadas com a utilização de diferentes solventes orgânicos.	50
FIGURA 23	Imagem de topografia mostrando a formação de multicamadas de DMPC após a evaporação do solvente sobre superfície de mica.	51
FIGURA 24	Imagem em 3D com formação dos terraços bilipídicos de DMPC.	52

FIGURA 25	Imagem de filmes de DMPC e DPPC sobre silício hidrofílico após a evaporação do solvente	53
FIGURA 26	Imagens de topografia da seqüência de hidratação da amostra de DPPC sobre superfície de mica.	54
FIGURA 27	Imagens de topografia obtidas por microscopia de força atômica de filmes de DMPC sobre silício hidrofílico; (a) em ar; (b) em água.	56
FIGURA 28	Imagem de topografia sobre a estrutura de uma amostra de DPPC sobre superfície de mica, após imersão em solução tampão pH 7,4 (HEPES).	57
FIGURA 29	A coexistência das duas fases diferentes em uma amostra de DMPC.	58
FIGURA 30	Desaparecimentos de pequenos defeitos na bicamada lipídica in-situ de DMPC devido ao aumento de temperatura durante a varredura do microscópio de força atômica.	59
FIGURA 31	Imagens de topografia: multicamadas de DPPC/DOPC e DPPC/PC	61
FIGURA 32	Amostra de DPPC/DOPC imersa em solução tampão HEPES (pH 7,4).	62
FIGURA 33	Domínios em uma bicamada lipídica formada pela mistura DPPC/PC.	63
FIGURA 34	Visão lateral de uma mistura lipídica hidratada.	64
FIGURA 35	Amostra de DPPC/PC durante uma reação de peroxidação lipídica.	66
FIGURA 36	Efeitos da peroxidação lipídica na mistura DPPC/DOPC.	69
FIGURA 37	Peroxidação lipídica em regiões de domínios na mistura DPPC/DOPC.	70
FIGURA 38	Formação e fechamento de um buraco na bicamada formada por DPPC/DOPC.	73
FIGURA 39	Danos causados na organização lipídica pelo ataque das EROs em bicamada de DPPC/PC	74
FIGURA 40	Formação de defeitos na fase gel, comprovação de nanoscópicos domínios na bicamada DPPC/PC.	74

ÍNDICE DE TABELAS E ESQUEMAS

TABELA 1	Principais espécies reativas de oxigênio (EROs).	28
TABELA 2	Aldeídos formados pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.	35
TABELA 3	Relação de lipídeos utilizados nos experimentos realizados com sua temperatura característica de transição e composição	39
ESQUEMA 1	Princípio de funcionamento do microscópio de força atômica.	20
ESQUEMA 2	Reação de Fenton, catalisada por ferro.	28
ESQUEMA 3	Formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) em processos metabólitos.	30
ESQUEMA 4	Reações caracterísitcas de radicais livres nos sistemas biológicos.	31
ESQUEMA 5	Etapas de um dos possíveis caminhos de reação de peroxidação na cadeia acila de um ácido graxo monoinsaturado.	32
ESQUEMA 6	Mecanismo representativo resumido da peroxidação lipídica com formação do MDA (malonaldeído) e 4-HDA (4-hidroxiacenaís)	34
ESQUEMA 7	Mecanismo de formação de hidroperóxidos e peróxidos cíclicos obtidos a partir do ácido araquidônico. MDA é o malonaldeído.	67
ESQUEMA 8	Formação do pentano durante a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados.	68
ESQUEMA 9	Produtos de reações secundárias, formados na oxidação do oleato de metila.	71
ESQUEMA 10	Formação de cetonas a partir da oxidação do oleato de metila.	72

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

EROs	= espécies Reativas de oxigênio
AFM	= microscopia de força atômica
DMPC	= 1,2-dimiristil-fosfatidil colina
DPPC	= 1,2-dipalmitil-fosfatidil colina
DOPC	= 1,2-dioleil-fosfatidil colina
POPC	= 1-palmitil-2-oleil-fosfatidil colina
PLPC	= 1-palmitil-2-linoleil-fosfatidil colina
DSPC	= 1,2-diesteril-fosfatidil colina
PC	= fosfatidil colina
L_{α}	= fase líquida
L_{β}	= fase gel
P_{β}	= fase “ripple”
LB	= Langmuir-Blodgett
T_m	= temperatura de fusão
$\bullet\text{OH}$	= radical hidroxila
$\text{O}_2^{\bullet-}$	= radical ânion superóxido
H_2O_2	= peróxido de hidrogênio
ERNs	= espécies Reativas de nitrogênio
TCA	= ácido tricloroacético
TBA	= ácido Tiobarbitúrico
DSC	= calorimetria de varredura diferencial
VPP	= paradoxo da pressão de vapor
MDA	= malonaldeído
4-HNE	= 4-hidróxi-2-nonenal
HEPES	= ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico
TBARS	= teste a substâncias reativas ao TBA
SFM	= microscopia de varredura por força
MAC-MODE [®]	= modo de operação do microscópio de força atômica
MAC-lever	= suporte utilizado no modo MAC-MODE [®]
RH	= umidade relativa
NP-S	= ponta usada no microscópio de força atômica
4-HDA	= 4-hidroxialcenais

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos filmes lipídicos e utilizados em estudos sobre propriedades estruturais de membranas biológicas. Observou-se a formação de filmes finos de fosfolipídeos, com DMPC (1,2-dimiristil-fosfatidil colina), DPPC (1,2-dipalmitil-fosfatidil colina), DOPC (1,2-dioleil-fosfatidil colina) e PC (fosfatidil colina), em suportes sólidos (mica, silício hidrofílico e hidrofóbico). Os filmes foram obtidos através do uso de diferentes técnicas de preparação, tais como a fusão de vesículas lipídicas sobre uma superfície sólida e a deposição através da evaporação de um solvente orgânico. Os solventes testados foram o clorofórmio e o iso-propanol. O método de análise utilizado foi a microscopia de força atômica (AFM). A aplicação da microscopia de força atômica forneceu informações sobre a estrutura e morfologia das camadas orgânicas obtidas através de análises de topografia das amostras. Foi possível concluir através deste estudo que a morfologia das camadas lipídicas depende dos lipídeos e do grau de hidratação das camadas formadas. As análises foram realizadas em condições fisiológicas de pH e força iônica e medidas pelo microscópio de força atômica em tempo real. Durante o desenvolvimento deste trabalho, observou-se o comportamento de membranas celulares sintéticas de DMPC na temperatura de transição de fase e foram também obtidas informações sobre a organização lateral de bicamadas lipídicas através da formação de domínios microscópicos e nanoscópicos em sistemas compostos por dois ou mais diferentes fosfolipídeos. Durante o estudo de uma peroxidação lipídica com os sistemas modelos foram observadas mudanças drásticas na organização lateral da bicamada. A peroxidação lipídica promoveu níveis diferentes de organização molecular da bicamada lipídica, devido à mudanças observadas em regiões de domínios específicos.

ABSTRACT

In this work lipid films were developed and used in studies on structural properties of biological membranes. The formation of thin phospholipid films of DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-3-glycero-phosphocholine), DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-3-glycero-phosphocholine) and Egg-Phosphatidylcholine on solid supports (mica, hydrophilic and hydrophobic silicon) was investigated. The films were developed by use of different preparation techniques which are the vesicle fusion on the surface and the deposition through the evaporation of an organic solvent. The tested solvents were chloroform and isopropanol. The used analysis method was the atomic force microscopy (AFM). The application of the atomic force microscopy supplied information about the structure and morphology of the organic films by analyses of the topography of the samples. It can be concluded by this study that the morphology of the films depends of the lipid type and the hydration level of the films. The analyses were realized under physiological conditions in pH and ionic strength and measured by AFM in real time. During this work the behavior of synthetic cell membranes of DMPC were observed at the temperature of phase transition, furthermore information about the lateral organization of lipid bilayers by the formation of microscopic and nanoscopic domains in composed systems for two or more different phospholipids was obtained. Drastic changes in the lateral organization of the bilayer during the study of lipid peroxidation at these model systems were observed. The lipid oxidation promotes different levels of molecular organization of the lipid bilayer

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Sistemas biológicos modelo

Em 2003, Peter Agre e Roderick MacKinnon receberam o Prêmio Nobel de Química por suas descobertas relacionadas com os canais de membranas celulares.¹ Estes trabalhos descrevem como íons e água são transportados para fora e para dentro das células dos organismos vivos.

Os conhecimentos sobre o funcionamento de células usando-se sistemas biológicos modelo progredem à medida que as técnicas de investigação são aperfeiçoadas.^{2,3,4}

Todas as informações celulares estão correlacionadas com a estrutura e as propriedades das membranas celulares.⁵ Para entender as propriedades de membranas biológicas é de grande importância estudar sua estrutura básica, a bicamada lipídica. Modelos de sistemas biológicos podem reconstituir a atividade biológica de membranas e proteínas de membranas respeitando suas funções e estrutura.⁶ Para o desenvolvimento de estudos relacionados com o comportamento de membranas biológicas, têm-se usado modelos de fosfolípidos de membranas.^{7,8,9,10,11,12,13} O uso de membranas modelo preparadas com apenas um único componente fosfolipídico^{14,15} ou mais, mas em pequeno número, tem a vantagem da simplificação.^{16,17}

O estudo em membranas modelo permite a avaliação de fenômenos individualizados no que concerne à participação dos fosfolípidos. Posteriormente, as informações obtidas com os modelos podem ser utilizadas para a integralização do conhecimento em sistemas mais complexos como é o caso de uma membrana celular.

Filmes de monocamadas e bicamadas lipídicas sobre suporte sólido tem atraído um considerável interesse de pesquisadores na última década.^{2,9} Estes modelos têm sido usados em estudos sobre a estrutura e propriedades de membranas biológicas naturais e para a investigação de processos biológicos,^{18,19} incluindo reorganização molecular, interações antígeno/anticorpo,²⁰ catálise enzimática e fusão de membranas,^{13,19,21} biosensores,²² biofuncionalização de sólidos inorgânicos¹⁶ e imobilização de DNA.²³ Estudos sobre alterações na morfologia de estruturas celulares e comportamento de proteínas, bem como a liberação controlada de fármacos e genes vêm sendo realizados no sentido de desenvolver biomateriais.^{22,24} A aplicação clínica que se pode esperar

destes dispositivos ou biomateriais artificiais é de grande importância na medicina moderna.

A microscopia de força atômica (AFM) tem-se mostrado um método útil para o estudo da morfologia de filmes orgânicos finos bem como da topologia de filmes compostos por monocamadas ou bicamadas lipídicas.^{4, 25}

No desenvolvimento deste trabalho serão avaliadas camadas lipídicas depositadas em suportes sólidos como um sistema biológico modelo. Neste sentido serão estudadas camadas de fosfolipídeos em sistemas unitários com o 1,2-dimiristil-fosfatidil colina (DMPC) e o 1,2-dipalmitil-fosfatidil colina (DPPC) e em sistemas binários com DPPC/DOPC (1,2-dioleil-fosfatidil colina) e DPPC/PC (fosfatidil colina) depositadas em mica ou silício. O sistema uma vez caracterizado será submetido à ação de espécies reativas de oxigênio. As amostras serão analisadas por microscopia de força atômica e imagens de topologia das diferentes superfícies e posteriormente utilizadas para avaliar o comportamento de fosfolipídeos organizados em camadas durante uma reação de peroxidação lipídica.

1.2 - Diversidade das membranas biológicas

As membranas biológicas são essenciais para a vida da célula. Membranas naturais consistem essencialmente em proteínas e lipídeos. A estrutura em bicamadas das membranas biológicas é composta por uma variedade de lipídeos que diferem significativamente em tamanho e estrutura devido as suas diferentes propriedades químicas.²⁶ Para entender as propriedades físicas das membranas biológicas, como a sua dinâmica e micromecânica é necessário ter conhecimentos sobre a interação entre os lipídeos dentro da bicamada em escala molecular.^{27,28}

Na superfície de membranas celulares existem regiões com morfologia distinta ou domínios, com microcanais, junções de célula-célula, e moléculas especializadas. Cada um destes domínios é especializado para uma função particular, como absorção de nutrientes, comunicações de célula para célula e endocitose.²⁹

O desenvolvimento de estudos relacionados com a química em nível molecular da interface membrana/água é um estudo complicado devido à fragilidade e tamanho dos tecidos biológicos. Uma compreensão completa deste estudo poderia conduzir a produção, por exemplo, de veículos químicos efetivos no transporte de medicamentos e uma melhor biocompatibilidade entre estes veículos sintéticos e as membranas celulares. Isso pode ser desenvolvido conhecendo-se o comportamento e as propriedades físico-químicas dos lipídeos de membrana através do uso de modelos simplificados.

1.3 – Lipídeos

Os lipídeos são biomoléculas insolúveis em água e altamente solúveis em solventes orgânicos. Suas funções biológicas incluem armazenamento de energia e permeabilidade entre o meio extracelular e intracelular. Existem cerca de 5×10^6 moléculas lipídicas em uma área de $1 \mu\text{m}^2$ de bicamada lipídica.²⁶

As três principais classes de lipídeos de membrana são os fosfolipídeos, os glicolipídeos e o colesterol. Todos os lipídeos de membrana têm um comportamento estrutural em comum: são *anfipáticas* (ou anfífilas) – isto é, elas possuem uma extremidade *hidrofóbica* (não-polar) e uma extremidade *hidrofílica* (polar). O grau de anfifilicidade depende dos detalhes estruturais das moléculas de lipídeos.^{30,31}

As moléculas de fosfolipídeos e glicolipídeos das membranas celulares apresentam cadeias de ácidos graxos que contém normalmente de 14 a 24 átomos de carbono. De acordo com o sistema, um ácido graxo é designado por dois números separados por dois pontos; o primeiro número é o número total de átomos de carbono no ácido graxo e o segundo é o número de insaturações. Assim 16:2 refere-se a um ácido C₁₆ com duas insaturações, que é o ácido hexadecadienóico.³²

Na Figura 1 estão representadas as estruturas de alguns dos principais ácidos graxos encontrados nas membranas biológicas.

Os fosfolipídeos são a principal classe de lipídeos de membrana, porque são os mais abundantes.

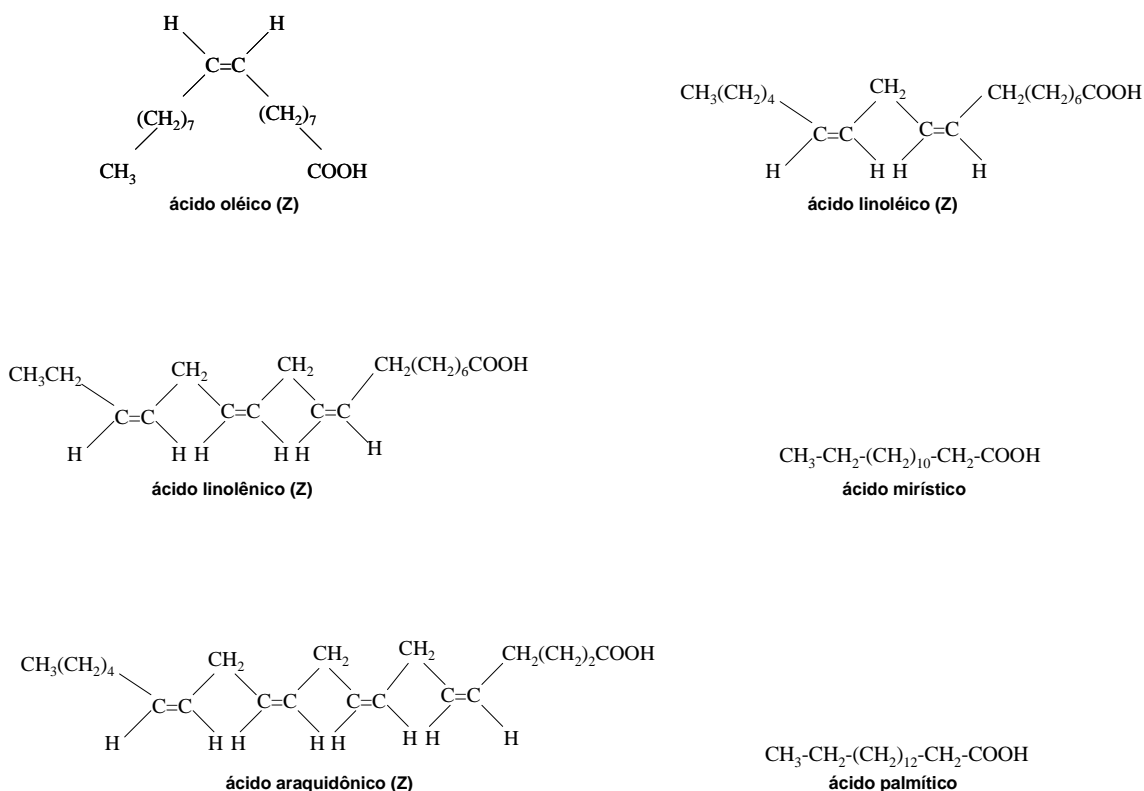


FIGURA 1 – Estrutura de alguns dos principais ácidos graxos encontrados nas membranas biológicas.³³

1.1.1 – Fosfolipídeos

Os fosfolipídeos são pequenas moléculas lipídicas, compostas de ácido graxo e glicerol. Diferem dos triglicerídeos por possuírem apenas duas moléculas de ácidos graxos unidas a uma molécula de glicerol cuja terceira hidroxila está ligada a um grupo fosfato. Este grupo fosfato pode estar unido a uma molécula de álcool (colina, etanolamina, inositol, glicerol ou serina).²⁶ (Figura 2)

A esfingomielina é o único fosfolipídeo em membranas que não é derivado do glicerol, contém um aminoálcool, a esfingosina, que contém uma longa cadeia hidrocarbônica insaturada.²⁶

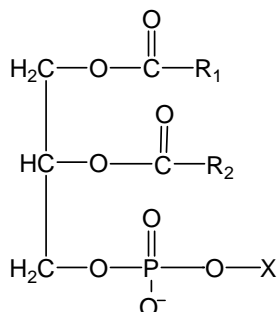


FIGURA 2 – Representação geral de uma molécula de fosfolipídeo **R1** e **R2** variam de acordo com o ácido graxo presente na molécula, **X** pode ser diferentes álcoois (colina, glicerol, etanolamina, inositol ou serina).

A Figura 3, mostra um exemplo de fosfolipídeo de membrana derivado da fosfatidil colina (também chamada de lecitina).²⁶

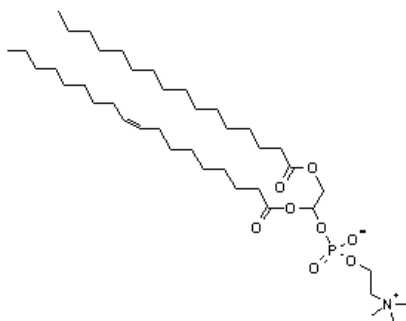


FIGURA 3 - Exemplo de um fosfolipídeo de membrana (POPC – 1-palmitil-2-oleil-fosfatidil colina).

Diferenças no comprimento e na saturação das cadeias carbônicas dos ácidos graxos são importantes, porque influenciam na capacidade das moléculas de fosfolípidos agruparem-se umas com as outras, e por esta razão provocam mudanças na fluidez da membrana.^{34,35}

Longe de ser somente uma matriz estrutural passiva, os fosfolípidos representam um papel ativo em transdução de sinais e modulação funcional³⁶, alguns dos quais são controlados pelo estado físico dos fosfolípidos nas membranas biológicas.³⁷

1.1.2 – Propriedades estruturais dos fosfolípidos

Devido à presença de grupos com diferentes polaridades, os fosfolípidos apresentam comportamentos diferentes dependendo da polaridade do meio em que se encontram.²⁶ (Figura 4)

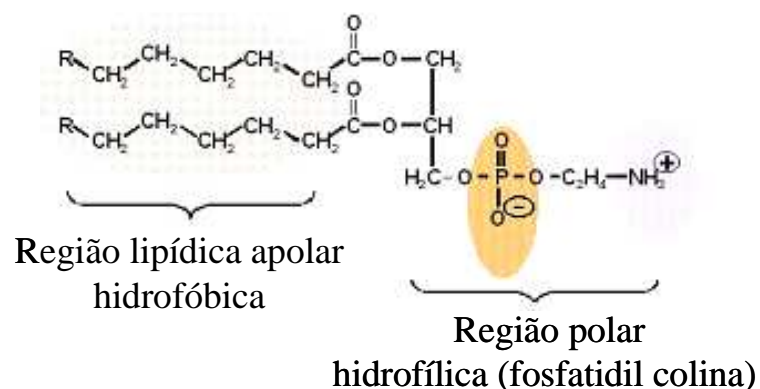


FIGURA 4 – Estrutura molecular dos fosfolípidos derivados da lecitina, salientando as diferentes polaridades na mesma molécula.

As moléculas de fosfolipídeos com desigualdade entre os grupos cabeça polar e caudas de hidrocarbonetos tendem a formar espontaneamente monocamadas orientadas em interface ar/água, mostrada na Figura 5.³⁸

Imersos em meio líquido aquoso os fosfolipídeos formam prontamente lâminas bimoleculares (bicamadas), que variam com as diferentes fases termodinâmicas e com diferentes composições químicas dos fosfolipídeos, ou seja, o tamanho médio das bicamadas em qualquer temperatura ou pressão depende do tamanho da porção polar da molécula e do comprimento e flexibilidade das cadeias apolares.²⁶ (Figura 5)

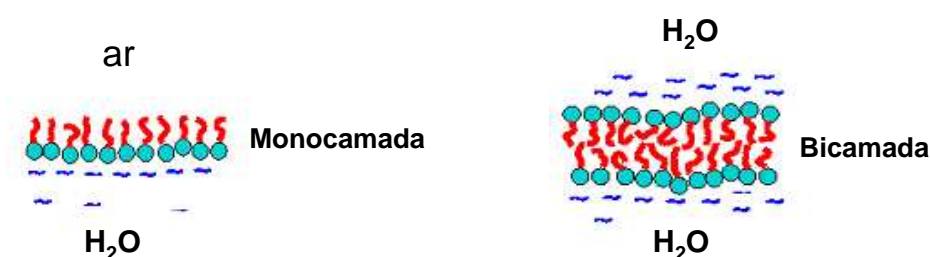


FIGURA 5 – Organização microscópica dos fosfolipídeos em interface ar/água e em meio aquoso.

A formação de bicamadas é um processo de automontagem, ou seja, a estrutura de uma bicamada é inerente à estrutura das moléculas de fosfolipídeos constituintes, especificamente de seu caráter anfifílico. A formação da estrutura em bicamada deve-se principalmente a interações hidrofóbicas e forças atrativas de van der Waals nas caudas hidrocarbônicas.

As cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos podem apresentar-se em estado ordenado, rígido ou relativamente desordenado, fluído.^{31,39}

Fosfolipídeos altamente orientados depositados em suportes sólidos oferecem possibilidades experimentais importantes para estudar o fenômeno de sua auto-organização, flutuações e interações entre as bicamadas.¹¹

Tem sido comprovado que bicamadas compostas por fosfolipídeos podem existir em fases diferentes, dependendo da temperatura e composição.^{12,40} Para construir um sistema composto por diferentes fases, usualmente realiza-se uma mistura de dois lipídeos que possuam diferentes transições de fase.

1.3.3 - Transição de fase dos fosfolipídeos

Os ácidos graxos presentes nos fosfolipídeos podem mudar da fase gel para a fase líquida em uma temperatura de fusão (ou, de transição) característica (abreviada por T_m , em que m vem do inglês e significa “melting” = fusão) (Stryer, 1988 Tien, 2003). Na transição de fase de um fosfolipídeo as ligações C–C mudam da conformação anti no estado ordenado para a conformação *gauche* (esquerda, em francês) através de uma rotação de 120° , ficando em estado relativamente desordenado.^{26,41}

A temperatura na qual a transição de fase ocorre é menor se as cadeias dos hidrocarbonetos são curtas ou contém duplas ligações; uma dupla ligação *cis* produz um ângulo na cadeia hidrocarbônica. Esse ângulo interfere nas interações intermoleculares das cadeias do ácido graxo, fazendo com que a temperatura de transição seja menor do que a dos fosfolipídeos saturados com o mesmo comprimento de cadeia. Por exemplo, o fosfolipídeo 1,2 –dioleil-fosfatidil colina (18:1), com uma insaturação na cadeia carbônica, possui temperatura de transição em -20°C , por outro lado, a do 1,2-diestearil fosfatidil colina (18:0) com o mesmo número de carbonos na cadeia, é de 50°C .⁴¹

Bicamadas lipídicas naturais podem ter regiões com lipídeos em fase gel, em estado ordenado, e em outras regiões com lipídeos em fase fluída, desordenados (fase líquida). Estas regiões são normalmente ricas em colesterol. Em determinadas regiões da membrana, provavelmente podem coexistir diferentes fases. Essas diferenças de fases na bicamada são responsáveis pela sua fluidez e se devem principalmente às temperaturas de transições das cadeias de ácidos graxos presentes.^{37,41,42}

Em sistemas modelo compostos por fosfolipídeos o que ocorre durante uma transição de fase não é tão simples, e foram realizados vários estudos na tentativa de conhecer exatamente o comportamento de membranas lipídicas durante a transição de fase do sistema.^{35,43}

Tem sido comprovado através de estudos com sistemas modelo, que uma bicamada lipídica com excesso de água pode sofrer transições de fase sob aquecimento⁴¹. Experimentalmente, a transição de fase pode ser observada e conseqüentemente

medida através do uso de diferentes técnicas, por exemplo, calorimetria de varredura diferencial e microscopia de força atômica.⁴⁴

Durante a transição de fase ocorrem mudanças na organização da membrana. A entalpia aumenta aproximadamente de 20-40 kJmol⁻¹, dependendo do comprimento da cadeia lipídica. O volume aumenta aproximadamente de 4 % e a área de 25 %.⁴¹

Em bicamadas lipídicas, regiões polares e apolares de moléculas de lipídeos tendem a repelir-se. À baixas temperaturas, as cadeias carbônicas hidrofóbicas rígidas são atraídas fortemente pelas forças de interação de van der Waals. Em altas temperaturas, na T_m, as flutuações lipídicas contribuirão para um aumento da entropia^{31,45}. A transição de fase, da gel para a líquida (fase L_β → fase L_α), é a principal e é acompanhada por uma grande mudança de entropia.

Existem estudos sobre transição de fase nos quais uma transição existente entre a pré-transição e a principal é abordada, a chamada, fase “ripple” (fase P_β), que é caracterizada por ondulações periódicas na bicamada lipídica. Esta fase tem sido observada em multicamadas de fosfatidilcolinas saturadas e fosfatidilgliceróis.⁴⁶ Todavia, este fenômeno “ripple” ainda não está totalmente esclarecido.^{47,48,49,50} (Figura 6)

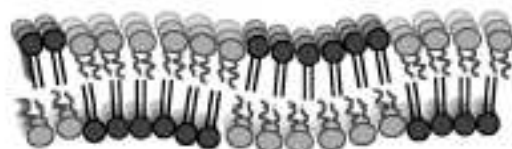


FIGURA 6 – Ilustração sobre a formação da fase “ripple”. Em cinza, está a representação dos lipídeos em fase líquida e em preto os lipídeos em fase gel.⁴¹

A entalpia do sistema muda durante a transição de fase, como já foi discutido antes, e esta mudança pode ser mostrada por medidas de transições térmicas de um sistema composto por fosfolipídeos usando a calorimetria de varredura diferencial (DSC).^{41,51}

A Figura 7, mostra um estudo por calorimetria de varredura diferencial (DSC) do fosfolipídeo 1,2-dimiristil-fosfatidil colina (DMPC) onde pode-se observar que o

principal evento durante a varredura é a transição principal de fase em T_m e no início da pré-transição até a principal, pode-se observar a fase “ripple”. A fase denominada “ripple” adota uma geometria diferente, exibindo ondulações periódicas na superfície, com periodicidades de 10-20 nm. Antes da transição principal e abaixo da pré-transição a membrana é plana, e após a principal a membrana encontra-se em estado fluído.⁴¹

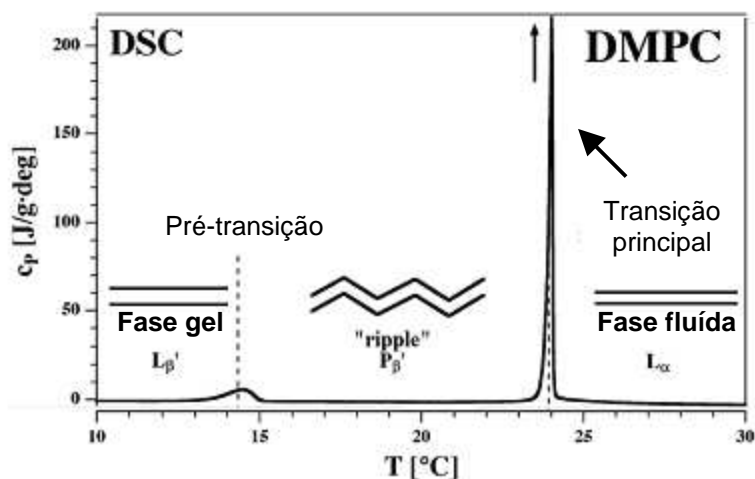


FIGURA 7 – Perfil de calor específico de membranas multilamelares de DMPC, mostrando a pré e a principal transição de fase.

1.3.3.1 – Diferentes fases em sistemas unitários

Diferentes fases em bicamadas lipídicas compostas de apenas um componente fosfolipídico podem ser visualizadas na presença de aquecimento, se a temperatura do sistema estiver próxima à de transição característica do fosfolipídeo em estudo.⁴⁴ Tem sido também demonstrado experimentalmente que em intervalo de temperatura, durante a transição de fase, a gel e a líquida podem coexistir. Por exemplo, a temperatura de transição (T_m) do estado de gel ordenado (fase L_β) para o líquido desordenado (fase L_α) do fosfolipídeo DMPC é descrita na faixa de 20-30 °C no banco de dados termodinâmicos dos lipídeos.^{52,53} Nestes experimentos, a temperatura é aumentada gradualmente até estar acima da de transição do fosfolipídeo componente do sistema.^{8,53}

1.3.3.2 – Diferentes fases em misturas lipídicas

Em certas condições de temperatura e pressão, dependendo de sua composição lipídica, misturas fosfolipídicas separam-se em duas fases imiscíveis, eventualmente uma delas permanece em fase gel (fase L_{β}), e a outra em fase fluída (fase L_{α}).^{16,54} Todavia, ainda existem dúvidas com relação à miscibilidade da fase gel na líquida, e vice-versa, em sistemas com misturas de fosfolipídeos. Em um sistema com misturas fosfolipídicas, isto é, composto por dois ou mais diferentes fosfolipídeos, a ocorrência das diferentes fases surge principalmente devido a presença de diferentes cadeias de ácidos graxos, em alguns casos mono ou poliinsaturados. Para uma mistura de fosfolipídeos em regiões de coexistência gel-fluído, a morfologia dos agregados de gel pode ser compacta ou ramificada dependendo do lipídeo utilizado.¹⁷

Filmes lipídicos estão sendo extensivamente investigados como modelos de membranas biológicas e forneceram informações importantes sobre agrupamentos lipídeo-lipídeo e interações lipídeo-proteína.^{54,55,56}

Investigações sobre separações de fase em filmes fosfolipídicos, mostraram-se particularmente úteis no estudo de domínios lipídicos que são regiões na membrana formadas devido à existência de separações de fase, promovidas pela presença de diferentes componentes lipídicos, cujo tamanho pode ter entre alguns nanômetros à micrometros.^{53,57}

1.3.4 – Formação de domínios lipídicos

O modelo de mosaico-fluído para membranas celulares descreveu a bicamada lipídica como uma estrutura bidimensional com proteínas associadas.⁵ Posteriormente, foi evidenciado que a bicamada possui uma estrutura lateral complicada conseqüentemente estudos neste sentido foram iniciados. Foi elucidada então a existência de domínios, demonstrando que a separação de fases na estrutura lateral pode existir em membranas. A separação de fases fluído-gel em misturas de fosfolipídeos, é um fenômeno relativamente bem investigado.^{16,17,58} A imiscibilidade de duas fases nestes sistemas é devido à diferenças nas transições de fase dos lipídeos. Esta imiscibilidade, é uma das responsáveis pela formação de domínios na organização lateral das bicamadas lipídicas, ou seja, domínios lipídicos são regiões com alguma

característica física que as diferenciam das demais regiões próximas, a composição molecular do domínio difere totalmente de suas vizinhanças na membrana.^{29,59}

A presença e o papel biológico de domínios lipídicos, ou microdomínios em membranas celulares estão atualmente sendo estudados, o que poderá contribuir para definir os mecanismos de interação entre os lipídeos e proteínas, conhecimento necessário para a compreensão da dinâmica nas membranas celulares.

A heterogeneidade de membranas biológicas é determinante em vários processos, por exemplo, a permeabilidade da membrana e a formação de domínios de membrana com ou sem separação de fase.²⁹ Um subconjunto biológico composto por sistemas heterogêneos descobertos recentemente, os “rafts”, são domínios de membranas até hoje não totalmente compreendidos.²⁹ O termo “rafts” é definido como uma composição especial de lipídeos que é rica em colesterol, esfingomielina e glicolipídeos, como o gangliosídeo GM1. Em regiões de domínios, como os “rafts” ocorrem as principais ligações com proteínas e anticorpos, a transdução de sinais e o estresse oxidativo da membrana.³³ Pesquisas estão sendo realizadas nesta área com o objetivo de descobrir se os “rafts” são estruturas rígidas ou se estão sujeitos à mudanças no estado físico e na composição.⁴¹

Está bastante claro que domínios lipídicos têm uma grande importância bioquímica por participarem diretamente da organização de proteínas. Assim, tudo o que altera o arranjo dos domínios pode promover mudanças nas funções da membrana, porque seu mecanismo funcional é dependente do conjunto de propriedades moleculares que a compõe.

Os domínios lipídicos podem ser estudados experimentalmente através da preparação de amostras com misturas lipídicas.^{57,59,60} Tem sido demonstrado que formações de domínios podem diferir, enquanto alguns formam agregados compactos isolados, outros ramificam-se e formam uma cadeia, comprovando que a morfologia da separação de fase é variável com os lipídeos presentes no sistema.⁶¹ Alguns trabalhos têm utilizado o colesterol, possibilitando que a biomembrana alcance uma geometria de superfície próxima a dos domínios “rafts” existentes nas membranas biológicas.⁵³

O desenvolvimento de estudos sobre domínios lipídicos e transição de fase são realizados utilizando-se sistemas biológicos modelo, por exemplo, filmes de bicamadas lipídicas. Estes, podem ser preparados por diferentes métodos descritos na literatura. Cada método apresenta algumas peculiaridades, apesar de todos formarem filmes de bicamadas lipídicas que são posteriormente utilizados em ensaios experimentais. Neste sentido, a seguir serão introduzidos alguns métodos de preparação de filmes incluindo os que serão utilizados neste trabalho.

1.4 – Auto-organização de filmes lipídicos

A auto-organização de monocamadas, simples bicamadas e multicamadas de fosfolipídeos sobre suportes sólidos têm atraído um considerável interesse durante as últimas décadas.⁴ Estruturalmente, os fosfolipídeos de membranas são extremamente expostos à ambientes aquosos. Conseqüentemente, é de relevância biológica estudar comportamentos sobre a estrutura de bicamadas lipídicas e suas propriedades em condições próximas às das fisiológicas.

Muitos métodos de preparação de membranas fosfolipídicas modelo têm sido abordados, entre os quais cita-se a fusão de vesículas lipídicas (lipossomas) sobre superfícies sólidas^{9,8,16,17,19,22}, formação de bicamada lipídicas (BLMs) por eletroquímica⁶², deposição de camadas por Langmuir-Blodgett⁶³.

Nestes sistemas modelo, são realizadas deposições de monocamadas lipídicas, bicamadas ou multicamadas em suportes sólidos.

1.4.1 - Filmes de monocamadas lipídicas

Estudos realizados a mais de 50 anos relatam a formação de filmes lipídicos utilizando a técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Nesta técnica, a formação dos filmes é realizada transferindo-se camadas monomoleculares de anfifílicos da interface água-ar para a superfície de um suporte.

Quando uma monocamada é transferida para a superfície de um suporte hidrofílico, normalmente realiza-se uma deposição de modo que os grupamentos hidrofílicos da molécula interagem com a superfície. Esta deposição é chamada **Y**. (Figura 8)

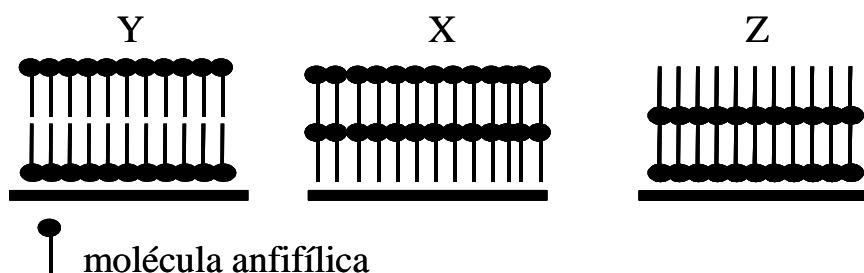


FIGURA 8 – Diferentes métodos de formação de bicamadas de moléculas anfifílicas por LB.

Por outro lado, se a superfície do suporte for hidrofóbica, a melhor interação com a superfície é na região de cadeias hidrofóbicas da molécula. Neste caso, pode-se usar a transferência da monocamada pela deposição chamada **X**, na qual as regiões hidrofóbicas da molécula ficam em contato com a superfície. As deposições de monocamadas na técnica LB podem ser realizadas destas formas, ou transferindo a monocamada de modo com que a parte hidrofóbica da molécula fique em contato, por exemplo, com uma superfície hidrofílica (chamada deposição **Z**). Na formação da camada lipídica, o modo mais usual de deposição é o tipo **Y**, por ser o mais estável, devido ao fato, de que neste tipo de deposição ocorrem interações entre regiões hidrofóbicas das moléculas, como nas membranas biológicas, na formação da bicamada lipídica.⁶⁴

Em experimentos realizados com dois tipos de fofoslipídeos, foi constatada a influência do pH e temperatura da água da qual os filmes foram transferidos.³⁷

A vantagem da deposição de filmes por LB é a produção de filmes de multicamadas com densidades e composição predeterminadas, homogêneos, bem-alinhados em vários suportes.⁶⁴

1.4.2 – Filmes de bicamadas lipídicas e o paradoxo da pressão de vapor (PPV)

Outras técnicas alternativas de preparação e deposição de bicamadas planas sobre suportes sólidos foram desenvolvidas em função das dificuldades na preparação de filmes por Langmuir-Blodgett.

Uma delas é a deposição de vesículas lipídicas esféricas (ou também chamados de lipossomas) sobre a superfície sólida.⁹ Os lipossomas podem ser formados por apenas uma bicamada lipídica (lipossomas unilamelares), ou por várias camadas bilipídicas (multilamelares). (Figura 9)

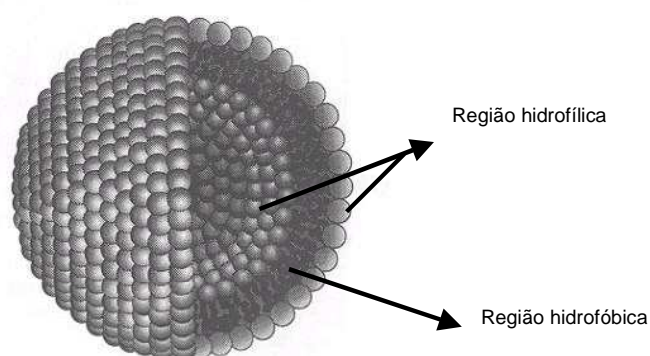


FIGURA 9 – Modelo de um lipossoma unilamelar de fosfolipídios.⁶⁵

Os lipossomas têm sido utilizados também como transportadores de drogas, aditivos alimentares e na indústria de cosméticos oferecendo a possibilidade de dissolver substâncias lipofílicas em sua bicamada lipídica ou hidrófilas em seu interior aquoso além da sua biodegradabilidade e baixa toxicidade. Têm sido realizadas experiências que investigam o efeito de concentração de lipídeos na formação de uma bicamada lipídica contínua simples, ou seja, em altas concentrações de vesículas lipídicas o filme tende a formar multicamadas.

Contudo, outros estudos na literatura afirmam que o processo de formação de multicamadas pode ser dependente somente do tempo de incubação (tempo necessário para que ocorra a ruptura e fusão entre as vesículas). Portanto, a formação de multicamadas ou até mesmo de uma simples bicamada por espalhamento de vesículas lipídicas não é um processo simples.⁸

Em princípio, está intuitivamente claro que o processo de formação dos filmes dependerá da concentração de lipídeos, uma vez que concentrações mais altas

aumentam a probabilidade de contato entre vesículas. Porém, é difícil considerar somente a dependência da concentração para a adsorção de uma vesícula. Na formação de um filme lipídico, deve-se considerar também a energia de adesão e a das regiões de borda.^{19,66,67} (Figura 10)

Por outro lado, pouco ainda é conhecido sobre a estrutura das regiões de borda. Apenas assume-se que quando filmes lipídicos planares são colocados em ambientes aquosos, a sua extremidade (região de borda) tende a fechar-se, uma vez que cadeias hidrofóbicas evitam o contato com a água presente devido ao processo de fusão.^{7,67}

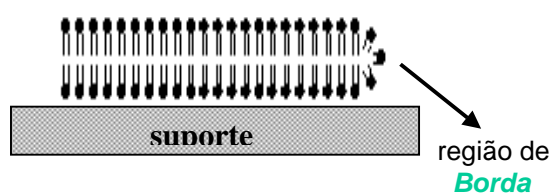


FIGURA 10 – Representação de uma bicamada sobre uma superfície sólida.

Um terceiro método utilizado na preparação de filmes, baseia-se no espalhamento de uma solução sobre uma superfície sólida contendo os lipídeos dissolvidos em um solvente orgânico.⁶⁸ Estudos têm demonstrado que as concentrações das soluções lipídicas e o tamanho do lipídeo representam um papel fundamental determinante para a espessura do filme preparado por este método.^{68,69,70,71}

Existem diversos estudos que apontam para o fato de que o processo de formação de multicamadas ocorre pela adsorção de camada-por-camada, e que isso facilita o possível equilíbrio entre as fases de espalhamento, adsorção do lipídeo e evaporação do solvente.^{15,72}

Outro método recentemente desenvolvido, baseado na técnica de espalhamento de solução orgânica é o “spin-coating”, que apresenta uma pequena diferença do método anterior, porque utiliza rotação (100 a 200 rpm) na preparação das amostras. O resultado é uma menor densidade dos filmes, devido ao melhor espalhamento produzido pela rotação. Suportes não-homogêneos ou impurezas podem resultar em deformações nos filmes durante o procedimento de “spin-coating”.⁷⁰

Nestas técnicas, os lipídeos não se encontram completamente hidratados como nas outras citadas anteriormente (LB e fusão de vesículas) e a maioria dos estudos

realizados posteriormente serão com amostras preparadas por evaporação de solvente orgânico, submetendo-as ao vapor de água.^{10,12,71,73,74}

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que filmes de lipídeos, suficientemente hidratados, para que possuíssem as mesmas condições físico-químicas de membranas celulares, poderiam ser formados apenas por técnicas em que os lipídeos estivessem previamente hidratados antes de serem depositados sobre a superfície sólida. Por muito tempo foi aceito que filmes produzidos pela dissolução de fosfolipídeos em um solvente orgânico, evaporação e posterior hidratação por vapor, não apresentariam as mesmas características físico-químicas dos outros previamente hidratados. E esta constatação foi chamada “o paradoxo da pressão do vapor”.⁷⁵

O controle da umidade é um ponto sutil, até que Katsaras provou experimentalmente que não há paradoxo se o controle da umidade da amostra celular for construído adequadamente para que se suprima tudo que provoca o abaixamento da UR (umidade relativa) na amostra, incluindo gradientes de temperatura e a condensação de água.^{11,10,73,76}

De acordo com as propriedades termodinâmicas elementares, a auto-organização de macromoléculas em água (bicamada completamente hidratada) não tem diferença quando preparada na presença de vapor de água saturado, i.e., 100% de umidade relativa (UR), uma vez que o potencial químico da água é o mesmo nos dois ambientes. Isto comprova que se a produção de filmes for realizada em 100% de vapor de água, ou seja, completamente hidratados, estes encontram-se nas mesmas condições físico-químicas que os previamente hidratados como nas técnicas de Langmuir-Blodgett ou fusão de vesículas lipídicas.^{10,64,71,73,74}

Durante a técnica de espalhamento da solução orgânica, tipicamente algumas centenas ou milhares de bicamadas lipídicas podem ser formadas dependendo da concentração da solução lipídica. Todavia, com este método é difícil o controle do número de bicamadas, contrariamente a técnica de LB (Langmuir-Blodgett) em que são depositadas monocamadas flutuantes repetidamente em um suporte e o número de monocamadas depositadas na superfície sólida (N) é controlado. Por outro lado, somente até duas bicamadas lipídicas podem ser preparadas por LB devido à fraca interação existentes entre elas, este fenômeno está relacionado com o processo de deposição da técnica LB. Aplicam-se também restrições semelhantes em N ao espalhamento de vesículas onde os lipídeos são depositados por adsorção e fusão de vesículas unilamelares ou multilamelares em superfícies sólidas.⁷⁰ Em comparação com

os filmes de Langmuir-Blodgett, a fusão de vesículas tem a vantagem de que os lipídeos estão auto-organizados em bicamadas antes da deposição.

1.5 - Métodos de análises dos filmes

Várias técnicas estão disponíveis para caracterizar a estrutura, composição e propriedades dos filmes de fosfolipídeos. Filmes de monocamadas e bicamadas lipídicas têm sido estudados extensivamente através de técnicas que informam sobre a estrutura e/ou orientação molecular dos filmes. As principais são espectroscopia de infravermelho,^{77,78} microscopia de fluorescência,^{2,79,80} eletroquímica,^{62,81} reflexão e difração de raios-X,^{9,10,69,73,82} e reflexão de nêutrons²⁵ entre outras.

Lipídeos transferidos sobre suportes sólidos oferecem a possibilidade de aplicação de um grande número de técnicas analíticas de superfície que não podem ser usadas para estudar membranas biológicas. Apesar desta grande variedade de métodos, até recentemente pouco se conhecia sobre a estrutura e as propriedades dos lipídeos em escala nanométrica, devido à falta de uma técnica com alta resolução de superfície.

O desenvolvimento da microscopia de força atômica (“Atomic Force Microscopy”)⁸³ abriu novas possibilidades na pesquisa sobre filmes lipídicos. A microscopia de força atômica tem provado ser um método útil para se investigar a morfologia de filmes de fosfolipídeos, durante a última década.⁸⁴

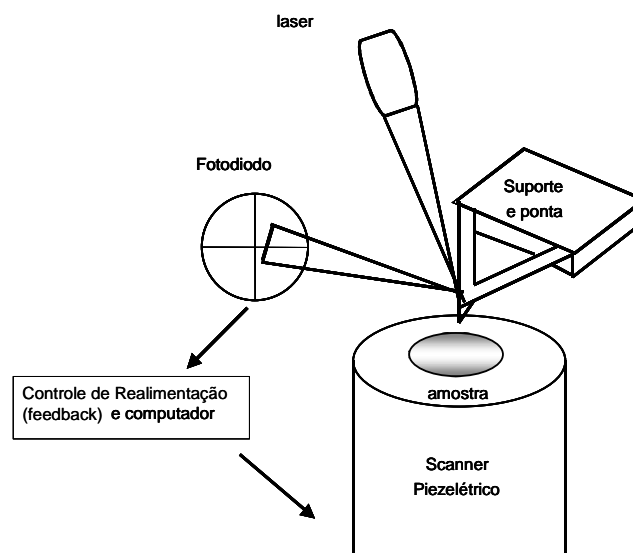
A aplicação da microscopia de força atômica na caracterização da morfologia e propriedades físico-químicas de filmes lipídicos tem sido abordada inclusive em alguns artigos de revisão.^{4,85} Esta técnica tem sido usada em estudos de misturas fosfolipídicas, morfologia dos filmes em diferentes condições, e a interação dos fosfolipídeos com proteínas e DNA.^{86,87}

Outros estudos com microscopia de força atômica também estão sendo desenvolvidos como, a elucidação de mecanismos de formação de filmes pelo espalhamento de solução orgânica com análises em *ex situ*,^{15,72,88} porém análises por microscopia de força atômica *in situ* (condições fisiológicas e em tempo real) por este método ainda não foram completamente desenvolvidas¹⁵.

1.5.1 - Microscopia de Força atômica

A microscopia de força atômica tem se mostrado um método bem apropriado para a investigação de superfícies com alta resolução espacial.⁸⁹

A idéia de operação do microscópio de força atômica é a aproximação de uma ponta, que está montada no final de um suporte, próxima da superfície de uma amostra e a mensuração da interação entre as forças que se estabelecem entre a ponta e a superfície da amostra, ou seja, o microscópio de força atômica usa a interações ponta-amostra para traçar o mapa da superfície. A ponta varre a superfície da amostra e suas interações com o suporte são medidas à partir das deflexões do suporte (que atua como uma mola). As deflexões do suporte são detectadas pela incidência de um feixe de laser no suporte que é refletido em um fotodiodo. O comprimento do suporte pode ter de 100 a 200 μm e, pode ter a forma de **V** ou de haste, em geral retangular. (Esquema 1)



ESQUEMA 1 – Princípio de funcionamento do microscópio de força atômica.

A força que a amostra exerce sobre a ponta é determinada pela deflexão do suporte, dada pela lei de Hooke $F = -ka$, onde a o deslocamento do suporte e k sua constante de mola própria, determinada pelas características de construção. As forças detectadas normalmente estão na ordem de nN (nanonewtons) a pN (piconewtons).

O movimento do suporte com a ponta na direção z e a amostra na direção x , y é realizado por um sistema piezoelétrico, que permite um movimento controlado nas três direções (x , y , z), em escala subnanométrica.

Para obter informações, por exemplo, sobre a morfologia, em uma determinada área escolhida na amostra move-se a amostra na direção x e y em um caminho pré-definido. O controle deste processo é finalizado por um computador. Todo tempo o controle de realimentação (“feedback”) ajusta a posição da direção z pelo z -piezo para que se mantenha fixa a condição de “feedback” (por exemplo, uma força constante ou uma amplitude constante). A condição de “feedback” depende do modo de operação utilizado na realização das varreduras, e estes modos serão discutidos adiante.

Em pontos pré-definidos (x , y) a expansão do z -piezo e outros parâmetros, por exemplo, a deflexão vertical do suporte (sinal de erro) ou a lateral (força lateral), será medida. O mapa da medida da expansão do z -piezo, por exemplo, pode ser visualizado diretamente no computador assim como a morfologia da amostra na área analisada.⁹⁰

A resolução espacial deste instrumento está limitada por um conjunto de parâmetros. Principalmente pelo controle do movimento piezo, o qual normalmente está abaixo da escala subnanométrica, e pelo tamanho efetivo da ponta. Este tamanho efetivo da ponta está relacionado com o seu raio (normalmente >10 nm), e com o recuo da ponta na superfície. Em superfícies suaves (ou moles) como camadas lipídicas ou outros materiais orgânicos, são esperadas resoluções de até 1nm (na direção x , y) nos melhores casos.

O mecanismo de realimentação (feedback) do microscópio permite diferentes modos de operação. Os modos de funcionamento mais comuns são o de contato e as operações dos modos dinâmicos (não contato, Tapping mode[®] e modo de MAC[®]).

Os dois principais modos de operação do microscópio de força atômica estão representados na Figura 11.⁸⁹

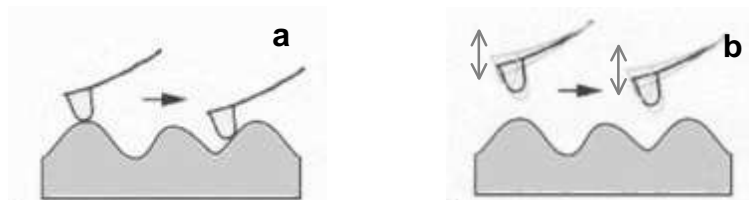


FIGURA 11 – Ilustração dos diferentes modos de operação do microscópio de força atômica. (a) modo contato; (b) modo dinâmico.

1.5.1.1 - Modo contato

Neste modo de operação a ponta será aproximada da superfície da amostra até que uma certa força (o “setpoint”) seja alcançada. Esta força é escolhida pelo operador e pode ser em princípio, repulsiva ou atrativa. Usualmente as forças repulsivas são usadas.

Quando a ponta aproxima-se da amostra, é primeiramente atraída pela superfície, devido a um amplo conjunto de forças atrativas existentes na região como as de van der Waals. Esta atração aumenta em um máximo quando a ponta aproxima-se muito da amostra, os átomos de ambas ficam tão próximos até atuação de forças de repulsão eletrostática (Figura 12).

Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ângstroms (da ordem característica de uma ligação química). Quando as forças tornam-se positivas, considera-se que os átomos da ponta e os da amostra estão em contato, e dominam as forças repulsivas.^{90,91}

Em distâncias muito próximas, em que nuvens eletrônicas dos átomos da ponta e os de superfície começam a sobrepor-se, a ponta é operada por forças repulsivas.

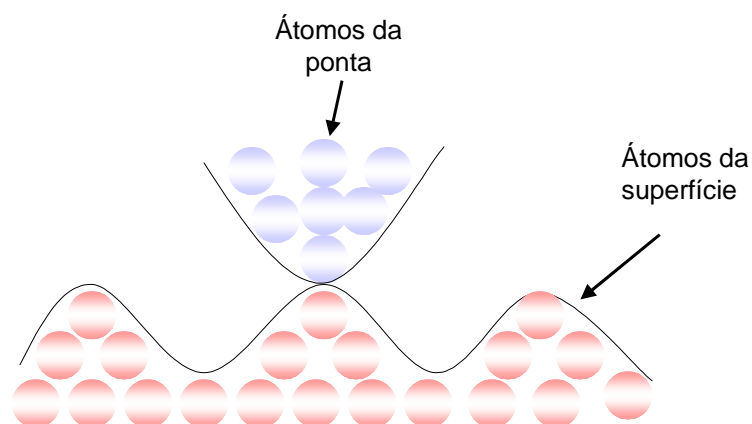


FIGURA 12 – Ilustração da aproximação da ponta que varre e a amostra.

Neste modo de operação, o controle por feedback ajusta a extensão do z-piezo até um ponto em que a força de varredura seja mantida constante. Este é o mais comum dos modos não dinâmicos de varredura.

1.5.1.2 - Modo dinâmico

No modo contato, devido à ponta estar sempre em contato com a superfície (forças repulsivas), uma força lateral considerável pode atuar e causar danos na área de varredura se a superfície investigada for muito mole, por exemplo, filmes de fosfolípidos em fase fluída. Neste caso, o melhor é utilizar outro modo de operação do microscópio, ou seja, o dinâmico.

A característica básica do princípio de operação do microscópio de força atômica no modo dinâmico é que o suporte oscila próximo à frequência de ressonância. A oscilação do suporte faz com que a ponta só interaja fortemente com a superfície no ponto de oscilação mais baixo. Esta configuração reduz a aplicação de forças laterais durante o processo de varredura.^{91,92}

Para entender a idéia principal de “feedback” para este modo, deve-se lembrar que o suporte (mola) portador da ponta é externamente dirigido e atua similarmente a um oscilador harmônico. A excitação do suporte é, normalmente dirigida por uma vibração supersônica (> 20 KHz) que faz com que este movimente-se por campo magnético (MAC-MODE[®], mais usado para operação em líquidos).

Quando o suporte (mola) aproxima-se da superfície até uma certa distância, recebe influência através da interação com a superfície, ocorrendo um decréscimo na medida da amplitude. As interações de forças adicionais (repulsivas ou atrativas) causam mudanças na frequência ressonante do suporte. Para a operação em ar e em líquidos, a frequência dirigida é constante. Isto significa que se a ponta interagir com a superfície, o suporte não é mais dirigido por ressonância. A consequência, é que a amplitude decresce. Esta mudança na amplitude devido à aproximação da ponta na amostra é mostrada na Figura 13, e é usada neste modo para o “feedback”. A condição de “feedback” do modo dinâmico em ar é o decréscimo da amplitude, que é reajustada cada vez que ocorre esse decréscimo.^{91,92}

Um segundo parâmetro de oscilação (não mostrado nos gráficos), é a fase, pode ser obtida e ser conectada com as propriedades físicas locais (como dureza ou adesão). A fase pode ser mostrada como um contraste adicional (relacionada com as propriedades físicas locais).

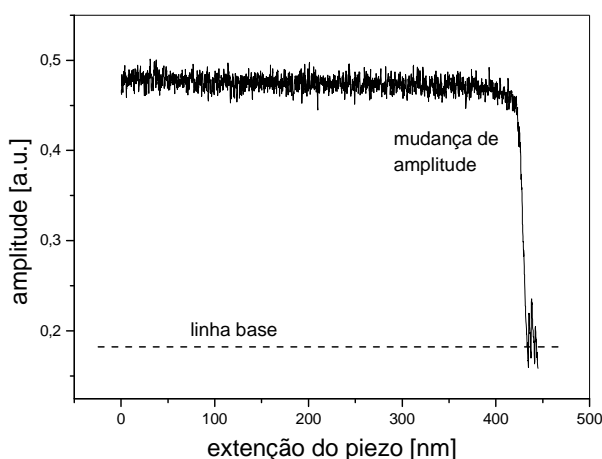


FIGURA 13 – Medida da amplitude durante a aproximação na superfície.⁹³

a) Modo dinâmico - MAC-MODE®

No modo dinâmico de operação do microscópio de força atômica MAC-MODE®, o suporte (mola) portador da ponta possui propriedades magnéticas e oscila sobre a superfície da amostra.⁹⁴ Isto é, a força oscilante é aplicada através de um solenóide diretamente no suporte magnetizado e o suporte magneticamente revestido é guiado para oscilar em um campo magnético.

1.5.1.3 – Aplicações

É importante que se tenha o conhecimento que a imagem de microscopia de força atômica revela a topografia da amostra na região observada. Para analisar-se dados, por exemplo, sobre as alturas desta região que estarão relacionadas com o comportamento estrutural da amostra, faz-se uma medida gráfica sobre a imagem. Essa medida, é chamada varredura de linha e revela informações sobre a morfologia do filme. Nas imagens obtidas por microscopia de força atômica, as regiões mais claras representam as mais altas do filme.

A Figura 14, mostra a análise topográfica de um filme de ouro (Au), depositado sobre silício, e o gráfico da altura do filme está representado pela varredura de linha na Figura 14b. Para obter-se informações mais abrangentes sobre a morfologia da amostra, esta análise é realizada em diversas regiões.

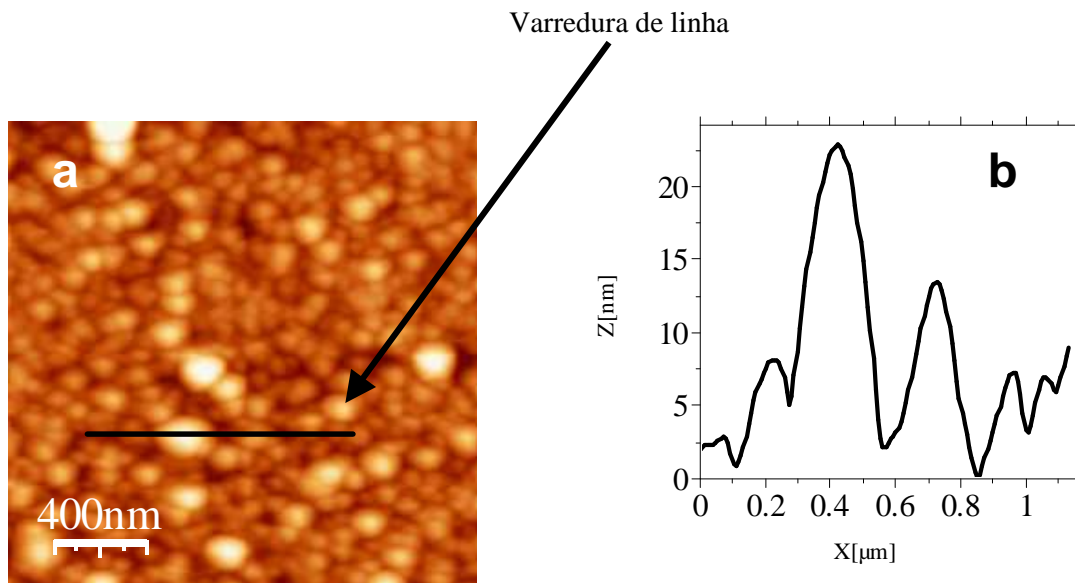


FIGURA 14 – (a) Exemplo de uma imagem de topografia obtida por microscopia de força atômica; (b) representação gráfica de uma varredura de linha de um filme de Au depositado sobre silício.

As vantagens do microscópio de força atômica são: (i) sondar, em tempo real e em ambiente aquoso, a estrutura da superfície de filmes lipídicos; (ii) medir propriedades físicas diretamente e com alta resolução espacial; (iii) possibilitar a modificação a estrutura de filme e analisar processos biofísicos de um modo controlado.^{4, 81, 95,96,97}

Um aspecto importante e de interesse neste trabalho é a formação de nanodomínios, caracterizados por arranjos moleculares de diferentes fases na bicamada lipídica, obtidos, como já foi discutido, pela mistura de fosfolipídeos com regiões hidrofóbicas de dimensões diferentes. A geometria desta organização molecular pode ser modificada por diferentes processos, e esta alteração na estrutura da bicamada poderá ser analisada pela microscopia de força atômica. Neste trabalho será utilizada a peroxidação lipídica induzida por uma espécie reativa de oxigênio como exemplo para esta avaliação. Sendo assim, na próxima secção será apresentado o tema “peroxidação lipídica”.

1.6 – Peroxidação Lipídica

1.6.1 - Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são expressões utilizadas na literatura de radicais livres, mas não são definidas normalmente. As Eros e as ERNs são originadas na produção de adenosina trifosfato (ATP) na mitocôndria. O ATP é a maior fonte de energia química de organismos vivos como bactérias, plantas e animais. O grupo fosfato terminal é transferido para várias biomoléculas aceptoras, e posteriormente são transformadas quimicamente para a realização dos trabalhos celulares dos organismos vivos.³³

A enzima citocromo oxidase, cataliticamente responsável pela redução de O_2 em H_2O nos organismos aeróbicos, através da adição de quatro elétrons, em etapas utiliza 90 % do oxigênio total consumido. Em 1986, Jones relacionou mais de 30 diferentes enzimas além da citocromo oxidase, em rins de mamíferos, os quais necessitam de oxigênio no seu metabolismo. Cada uma destas enzimas possui uma afinidade específica pelo O_2 e estão envolvidas em vários processos metabólitos. Dentro destes processos podemos citar o metabolismo de amins biológicas, prostaglandinas, purinas, esteróides, aminoácidos e carnitina e de outras atividades celulares incluindo auto-oxidação de pequenas moléculas tais como as flavinas, catecolaminas e hidroquinonas, ação das redutases de flavoproteínas e dos citocromos P_{450} .⁹⁸

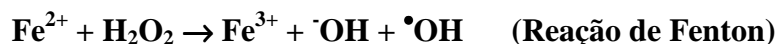
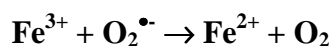
As reações dos processos metabólitos, muitas vezes geram as EROs, como os radicais superóxido (O_2^{\bullet}), hidroxila ($\bullet OH$), hidroperoxila ($\bullet OH_2$), peroxila (RO_2^{\bullet}) e o alcoxila (RO^{\bullet}). Frequentemente, o termo EROs é utilizado para designar radicais livres derivados do oxigênio molecular, mas também para espécies derivadas do oxigênio, que não são radicais livres, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$), entre outros. Alguns óxidos de nitrogênio, como monóxido de nitrogênio (NO^{\bullet}) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) são considerados radicais livres e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) que é um não-radical, são chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Outra forma usual utilizada para estas espécies, é o termo “oxidante”.

As principais EROs estão mostradas na Tabela 1.

TABELA 1 – Principais espécies reativas de oxigênio (EROs).⁹⁹

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	
RADICAIS	NÃO – RADICAIS
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peróxido de Hidrogênio, H ₂ O ₂
Hidroxila, [•] OH	Ácido Hipocloroso, HOCl
Peroxila, RO ₂ [•]	Ácido Hipobromoso, HOBr
Alcoxila, RO [•]	Ozônio, O ₃
Hidroperoxila, HO ₂ [•]	Oxigênio singlete, O ₂ ¹ Δ _g

A maioria da produção *in vivo* de radical hidroxila, o mais reativo destas espécies mencionados, provem da reação de H₂O₂ com o superóxido (reação de Haber-Weiss) a qual na realidade apresenta duas etapas, dependente de Fe³⁺ e algumas vezes de Cu³⁺, envolvendo a reação de Fenton.^{100,101} Ambas reações estão ilustradas (Esquema 2).



ESQUEMA 2 – Reação de Fenton, catalisada por ferro.

O óxido nítrico (NO[•], ou monóxido de nitrogênio) é um outro exemplo de radical livre produzido biologicamente tendo um amplo espectro de ação no organismo humano, muito conhecido principalmente pelo seu potencial de provocar vasodilatação.

A reação do óxido nítrico e superóxido pode levar à formação de peróxido de nitrito, o qual é um poderoso oxidante e causa danos em moléculas biológicas.^{102,103} A bioquímica desta espécie reativa, não radical, tem sido pesquisada exaustivamente. No processo inflamatório, por exemplo, esta molécula é capaz de nitrar e oxidar

biomoléculas, compostos fenólicos tais como a tirosina, implicando num impacto considerável sobre a estrutura celular.¹⁰⁴

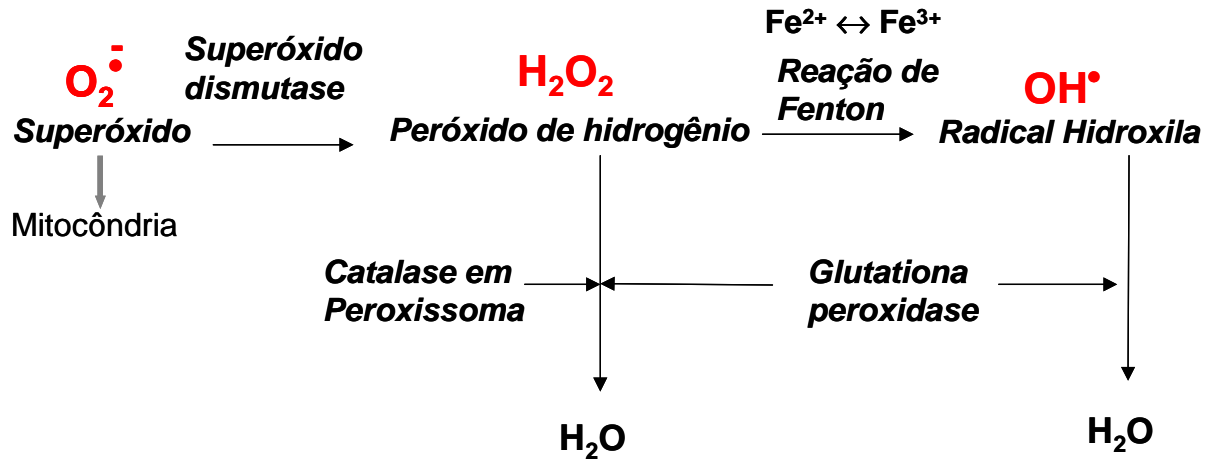
Todos os componentes celulares são susceptíveis às espécies ativas de oxigênio particularmente aos radicais hidroxila. Eles atacam proteínas causando modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas e aumento na susceptibilidade à proteólise.^{105,106} As espécies ativas de oxigênio causam também alterações no DNA, provocando mutações nas bases nitrogenadas. Ácidos graxos poliinsaturados como o araquidônico, também são modificados quimicamente por radicais livres alterando a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} , com conseqüente ativação de fosfodiesterases, e eventual ruptura da membrana e a morte celular.¹⁰⁷

Para o conhecimento sobre o mecanismo de ação das EROs no organismo, é necessário conhecer a ação do oxigênio molecular nos processos metabólicos. Hoje sabe-se que 2 a 5% do oxigênio respirado acabam gerando EROs. Esta transformação do oxigênio, majoritariamente na mitocôndria.¹⁰⁸

Para ligar a dois átomos de hidrogênio e formar uma molécula de água, o oxigênio precisa receber quatro elétrons. Todavia o O_2 nem sempre se transforma diretamente em água. Ao ganhar um elétron, o O_2 transforma-se em radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que pode reagir com outro radical superóxido. Quando isso acontece, o radical ânion superóxido volta a ser uma substância estável, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Duas moléculas de superóxido podem espontaneamente dismutar para peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular na presença de dois prótons. Esta reação ocorre com uma velocidade muito alta na presença da superóxido dismutase, uma enzima que possui cobre-zinco ou manganês tetramérico, no citosol e na mitocôndria respectivamente. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser convertido em oxigênio molecular e água pela catalase, uma enzima que contém o grupamento heme, ou reage com a glutatona na presença de glutatona peroxidase para formar água e dissulfeto de glutatona.¹⁰⁹

Por outro lado, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não tem um radical livre e não reage no mesmo lugar onde é formado. No entanto, as moléculas de H_2O_2 são extremamente reativas capazes de passar de uma célula para outra, aumentando a probabilidade de reagirem com os metais de transição, particularmente $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. A atração entre o H_2O_2 e átomos de ferro pode ser fatal para a célula, pois ao combinar-se com o ferro, recebe mais um elétron - o equivalente ao oxigênio com três elétrons extras

formando o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) reage instantaneamente com as biomoléculas.¹⁰⁹ (Esquema 3)



ESQUEMA 3 – Formação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) em processos metabólicos.¹⁰⁹

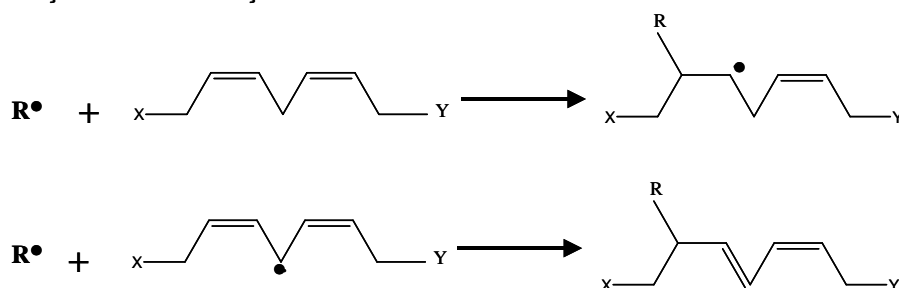
Como foi mencionado, as EROs e ERNs são produzidas em condições fisiológicas como resultado normal dos organismos vivos. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio na homeostase, que pode ser causado por várias patologias a produção de espécies reativas aumenta substancialmente prejudicando ainda mais o organismo enfermo.

Dentre as patologias relacionadas com o estresse oxidativo menciona-se aquelas que afetam o sistema nervoso central como a doença de Alzheimer e outras doenças degenerativas, bem como as injúrias por isquemia e reperfusão, doenças inflamatórias, circulatórias e cardiovasculares e aquelas relacionadas com o sistema imunológico e gastrointestinal.³³

1.6.2 Principais reações radicalares em sistemas biológicos

As EROs podem reagir formando novos radicais livres favorecendo reações em cadeia. Os radicais livres reagem com as biomoléculas inespecificamente. Esta falta de especificidade representa o maior obstáculo no estudo dos processos mediados por estas espécies que ocorrem em sistemas biológicos, que são quimicamente muito complexos.¹⁰⁹ No entanto, três tipos principais de interações de radicais com moléculas biológicas foram identificadas, estudadas e relacionadas com a lesão de tecidos. Dentre as interações possíveis menciona-se a adição, a transferência de elétrons e a abstração de átomos. Muito do que é conhecido com relação as patologias mediadas pelas EROs pode ser considerado da perspectiva desses três tipos de reação e das transformações esperadas, considerando a disponibilidade das moléculas-alvo nos tecidos. As reações mencionadas anteriormente serão mostradas a seguir no Esquema 4:

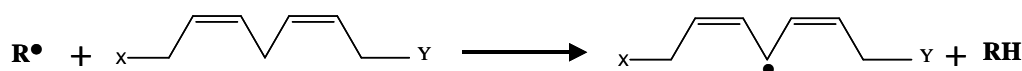
1. ADIÇÃO OU COMBINAÇÃO DE RADICAIS



2. TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS



3. ABSTRAÇÃO DE ÁTOMOS

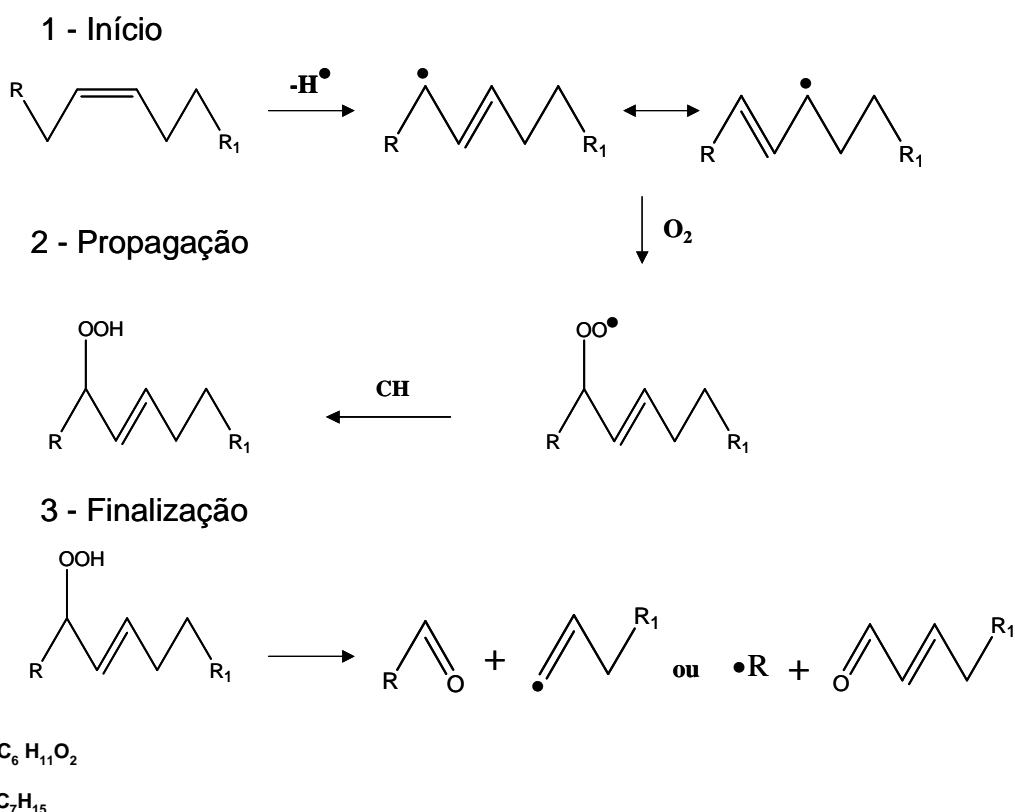


ESQUEMA 4 – Reações características de radicais livres nos sistemas biológicos.¹⁰⁹

Considerando os lipídeos como moléculas alvo, espécies químicas, como o radical hidroxila ($\bullet OH$), abstraem um átomo de hidrogênio no $-CH_2$ -alílico da molécula de um ácido graxo insaturado, produzindo radicais centrados no carbono que

posteriormente reagem com O_2 , para formar radicais peroxila. O radical peroxila produzido por esta reação, pode então abstrair outro átomo de hidrogênio da cadeia lateral do ácido graxo de uma molécula de lipídeo adjacente. Esta série de reações em cadeia, que constituem a fase de propagação da peroxidação lipídica, continuará até a formação de produtos não radicalares.^{33,110}

Estas reações podem ser caracterizadas em três etapas como mostra o Esquema 5. Após ser iniciada a formação de radicais livres (etapa 1), eles rapidamente propagam a reação de formação de hidroperóxidos (etapa 2), que por sua vez, se decompõem produzindo novos produtos de decomposição. Essa decomposição é favorecida pela grande quantidade de outros ácidos graxos que fornecem prótons aos hidroperóxidos. No final desta série de reações químicas, há formação de aldeídos, cetonas, álcoois e outros produtos (etapa 3). Ocorre também reação de radicais livres entre si, ou com outros compostos, formando espécies não radicalares ou de radicais não reativos.³²



ESQUEMA 5 – Etapas de um dos possíveis caminhos de reação de peroxidação na cadeia acil de um ácido graxo monoinsaturado.³²

A propagação da reação lipídica é governada pela energia de dissociação de ligações carbono-hidrogênio na cadeia carbônica, que podem ser vistas na Figura 15. As ligações carbono-hidrogênio mais fracas estão nos grupamentos metilênicos bis-álílicos com energia de dissociação de 75-80 kcal/mol contra ≈ 88 kcal/mol para os hidrogênios monoalílicos e ≈ 101 kcal/mol para uma ligação C-H alquila.¹¹¹

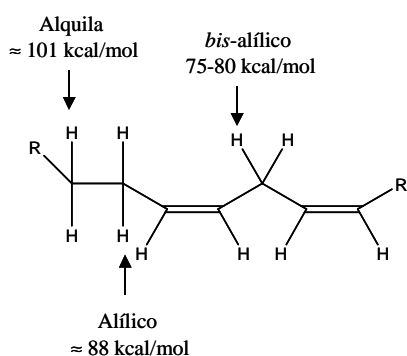
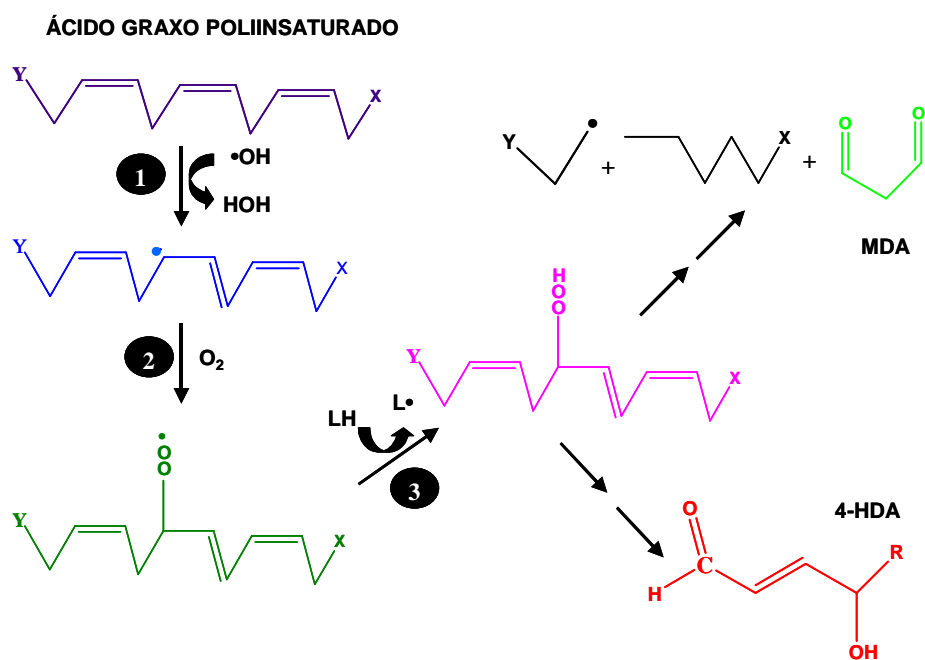


FIGURA 15 – Energias de dissociação necessárias na formação de radicais de uma cadeia carbônica.

Neste sentido, o ataque de lipoperóxidos à hidrogênios de grupamentos metilênicos bis-álílicos de lipídeos poliinsaturados é favorecido. Assim, teoricamente a peroxidação é mais intensa quanto mais insaturado for o ácido graxo, ou seja, quanto mais ácido for o hidrogênio metilênico, maior a probabilidade de ser abstraído. Acredita-se que o acúmulo dos produtos formados na lipoperoxidação (malonaldeído e 4-hidroxi-2-alcenais), aumente a rigidez e diminua a eficiência funcional da membrana causando o envelhecimento gradual das células (Esquema 6).^{112,113}

A oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados procede por um mecanismo de reação em cadeia no qual as reações terminais formam vários produtos, incluindo uma série de aldeídos. Alguns destes aldeídos formados na lipoperoxidação estão listados na Tabela 2.^{110,114,115}



ESQUEMA 6 - Representação resumida da peroxidação lipídica com formação do MDA (malonaldeído) e 4-HDA (4-hidroxiacenois).

TABELA 2 – Aldeídos formados pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.¹¹⁰

Aldeído	Ácido Graxo^a
Malonaldeído	20:4, 20:5, 22:6
Propanal	18:2, 20:4
Butanal	18:2, 20:4
Pentanal	18:2, 20:4
Hexanal	18:2, 20:4
2,4 - Heptadienal	18:2, 20:4
4-hidroxi-2-hexenal	22:6
4-hidroxi-2-octenal	18:2, 20:4
4-hidroxi-2-nonenal	18:2, 20:4
4-hidroxi-nona-2,6-dienal	20:5, 22:6
4,5-dihidroxi-decenal	20:4

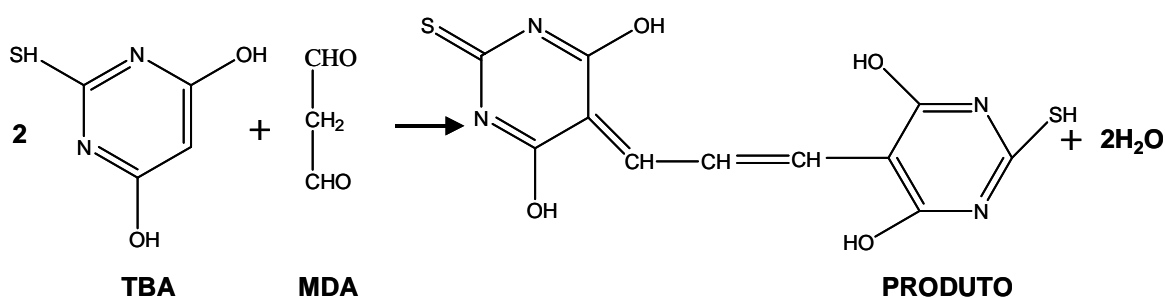
^aAbreviações: 18:2, ácido linoléico; 20:4, ácido araquidônico; 20:5, ácido eicosapentenóico; 22:6, ácido docosahexenóico.

O malonaldeído (MDA), é a molécula mais abundante que forma neste processo.¹¹⁶ Esta observação também comprovada em estudos com a oxidação do linoleato e do linolenato de metila, ésteres provenientes dos ácidos graxos linoléico (18:2) e linolênico (18:3) respectivamente.¹¹⁴ Em relação aos outros aldeídos mencionados, o 4-hidroxi-2-nonenal (4- HNE) também pode ser produzido abundantemente e sendo um agente tóxico, pode causar efeitos biológicos prejudiciais que estão associados a uma série de patologias principalmente a aterosclerose.^{117,118}

Aldeídos, como o 4-HNE reagem com grupamentos NH₂ de proteínas promovendo a formação de bases de Schiff, reagem também com grupamentos sulfidrila de enzimas inativando-as. Muitos outros produtos, como ácidos de cadeia curta, ésteres e cetonas podem ser formados através de reações radiculares em sistemas biológicos.^{33,110}

Portanto, a identificação e quantificação dos compostos derivados de aldeídos formados fornecem indiretamente um índice do dano oxidativo resultante da peroxidação lipídica.

A determinação do malonaldeído (MDA), é realizada por medida espectrofotométrica do produto colorido (róseo) formado a partir de sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método de análise é chamado de “teste a substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico” (abreviado por TBARS). Neste ensaio uma molécula de MDA reage com duas de TBA para formar um produto que possui absorção máxima em 535 nm (Equação 1).³³



Durante as últimas décadas, o número de estudos que envolvem a peroxidação lipídica em patologias humanas tem aumentado significativamente.^{119,120} Apesar da importância de elucidar os diferentes fatores envolvidos na iniciação e propagação de uma peroxidação lipídica em vários sistemas biológicos, em muitas investigações as variáveis experimentais ainda não são bem definidas. A metodologia mais comumente utilizada é o teste TBARS.^{107,121}

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) também pode ser utilizada para detecção de moléculas como lipoperóxidos resultantes das reações de peroxidação. O TBARS apresenta limitações intrínsecas aos métodos colorimétricos, incluindo a sensibilidade e grandes variações nos resultados.

Uma vantagem do uso da microscopia de força atômica na investigação *in situ* de uma peroxidação lipídica, é o fato de que é possível acompanhar as mudanças na topografia da amostra, devido às mudanças físicas e químicas nos filmes, sem causar perturbação na auto-organização das moléculas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi preparar membranas celulares sintéticas (biomembranas artificiais) em condições fisiológicas e caracterizar utilizando a microscopia de força atômica, bem como realizar estudos relacionados com a auto-organização lipídica e comportamentos físico-químicos dos fosfolipídeos em temperatura de transição de fase (fase gel para líquida). Posteriormente, efetuar ensaios de uma reação de peroxidação lipídica, para a visualização, em condições fisiológicas e em tempo real através da microscopia de força atômica, dos danos estruturais nas membranas modelos causados por espécies reativas de oxigênio.

2.2 – Objetivos específicos

- ↪ Conhecer o funcionamento científico e operacional do microscópio de força atômica.
- ↪ Preparar filmes lipídicos e analisar com microscopia de força atômica.
- ↪ Analisar os filmes fosfolipídicos em condições fisiológicas.
- ↪ Observar os filmes em temperatura de transição de fase (fase gel/líquida)
- ↪ Observar a formação de domínios microscópicos e nanoscópicos na estrutura lateral da bicamada lipídica.
- ↪ Estudar o comportamento morfológico das bicamadas lipídicas após a reação de peroxidação.

1 – METODOLOGIA

3.1 - Preparação dos Suportes

Os suportes utilizados foram lâminas de mica muscovita e de silício. As lâminas de mica utilizadas foram obtidas da SPI-supplies, West Chester, PA, U.S.A e realizou-se uma clivagem recente para o uso. Na clivagem da superfície de mica removeu-se as primeiras lâminas da superfície.

O silício 100 (tipo N) da MEMC Eletronic Materials (Malaysia) foi utilizado como suporte na formação dos filmes. Sabe-se que o silício em contato com o ar atmosférico forma uma camada de óxido. Esta pode ser removida a partir de uma solução de ácido fluorídrico (5%), que realiza uma limpeza química na superfície removendo completamente a camada de contaminação do óxido. Esta remoção foi então feita colocando-se a lâmina de silício por 15 segundos na solução de ácido fluorídrico (HF 5%), em seguida o silício foi removido e lavado com água ultrapura (resistividade específica 18 M Ω cm). O resultado é que ligações livres do silício ficam saturadas por átomos de hidrogênio.^{122,123} As ligações Si – H são estáveis e impedem uma nova contaminação do suporte pelo oxigênio do ar. Este procedimento proporciona a obtenção de superfícies hidrofóbicas.

Para a obtenção de superfícies hidrofílicas de silício utilizou-se uma solução saturada de hidróxido de potássio (KOH) em etanol (Salditt, 2002). A superfície é colocada em contato com esta solução por 1 minuto em seguida é removida e lavada com água ultrapura (resistividade específica 18 M Ω cm) em abundância. O excesso de água é retirado sob fluxo contínuo de gás nitrogênio (N₂). Na superfície ocorre a formação de ligações Si – OH, e esta torna-se hidrófila.

3.2 – Reagentes, solventes e fosfolípidos utilizados

a) Sigma®

Ácido ascórbico, fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) e ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico (HEPES).

b) Merck®

Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂ – 30%), cloreto de ferro (FeCl₃), cloreto de sódio (NaCl), isopropanol, metanol, clorofórmio, ácido fluorídrico (HF), etanol e hidróxido de potássio (KOH).

c) Avanti® Polar Lipids

1,2-dimiristil-fosfatidil colina (DMPC), 1,2-dipalmitil-fosfatidil colina (DPPC), 1,2-dioleil-fosfatidilcolina (DOPC) e fosfatidil colina (PC).

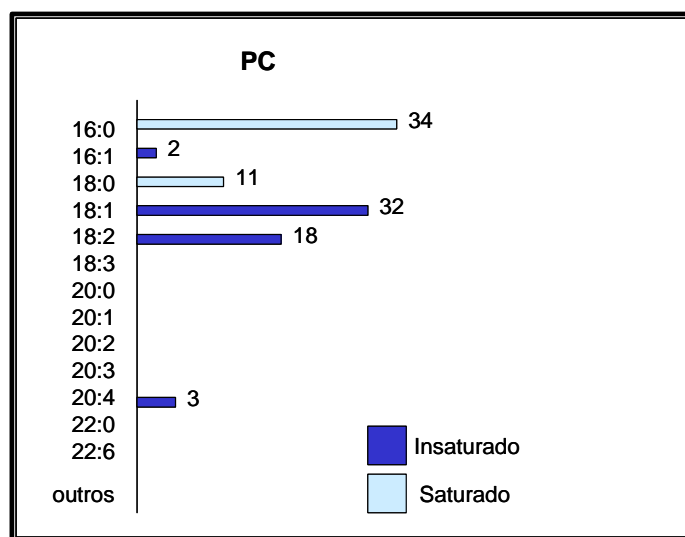
A Tabela 3, mostra os lipídeos que foram utilizados para a realização deste trabalho, a temperatura de transição característica e sua composição.

TABELA 3 – Relação de lipídeos utilizados nos experimentos realizados com a temperatura característica de transição e composição.^{41,51}

Lipídeo	Temperatura de Transição	Ácido Graxo ^a
DOPC	-20 °C	18:1
PC	-	mistura
DMPC	24 °C	14:0
DPPC	41 °C	16:0

^aAbreviações: 18:1, ácido oléico; 14:0, ácido mirístico; 16:0, ácido palmítico

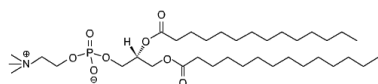
O fosfolípido PC é uma mistura contendo diferentes cadeias de ácidos graxos derivados da lecitina. Os ácidos graxos presentes em PC estão representados na Figura 16.



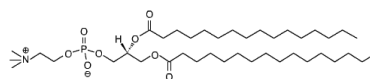
Abreviações: 16:0, ácido palmítico; 16:1 ácido hexadecenóico; 18:0, ácido esteárico; 18:1 ácido oléico; 18:2, ácido linoléico; 20:4, ácido araquidônico

FIGURA 16 – Ácidos graxos existentes em PC.¹²⁴

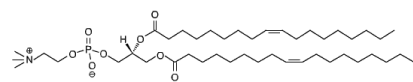
As estruturas dos fosfolípidos utilizados podem ser visualizadas abaixo, incluindo alguns dos ácidos existentes em PC:



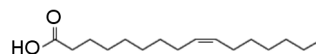
1,2-dipalmitil fosfatidil colina (16:0)
DPPC



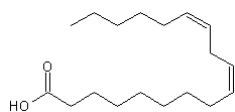
1,2-dimiristil fosfatidil colina (14:0)
DMPC



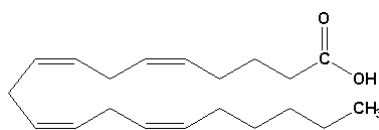
1,2-dioleil fosfatidil colina (18:1)
DOPC



ácido palmitoléico (16:1)



ácido linoléico (18:2)



ácido araquidônico (20:4)

d) Outras marcas

Ácido tricloroacético (TCA) da Synth[®].

Todos os reagentes e solventes utilizados apresentavam alto grau de pureza e foram usados sem purificações prévias.

3.3 – Métodos experimentais

3.3.1 - Preparação dos filmes

Os filmes utilizados nos experimentos foram preparados por três diferentes técnicas, fusão de vesículas lipídicas, espalhamento por rotação (“spin-coating”) e espalhamento de solução orgânica.

3.3.1.1 – Formação de filmes por fusão de vesículas lipídicas (lipossomas)

O fosfolípido DMPC foi depositado na superfície sólida na forma de lipossomas.⁹

a) Preparação das vesículas lipídicas

Vesículas lipídicas unilamelares ou multilamelares foram obtidas via método de extrusão através do seguinte procedimento: em um balão de vidro 20 mg de lipídeo foram dissolvidos em 1mL de clorofórmio. Em seguida o solvente foi removido sob gás nitrogênio formando um filme que posteriormente foi deixado sob vácuo até a completa evaporação do solvente. O filme formado foi então hidratado com solução tampão (HEPES ou tampão fosfato-KH₂PO₄) 10mM em pH 7,4, e agitado vigorosamente em agitador tipo vortex.

As vesículas lipídicas obtidas foram então diluídas em solução tampão até uma concentração final de 0,03 mg/mL.

b) Deposição sobre as superfícies

As vesículas lipídicas de DMPC foram espalhadas sobre a superfície sólida da seguinte maneira: 10 μL de solução, contendo as vesículas lipídicas com concentração 0,03 mg/mL, foram colocados em uma superfície de mica recentemente clivada com uma área de $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ e a amostra foi deixada em repouso por 10 minutos. O excesso de vesículas foi removido lavando-se a superfície com solução fisiológica de NaCl (0,9%). Em seguida as amostras foram analisadas por AFM.

3.3.1.2 – Formação de filmes por espalhamento de solução orgânica

a) Filmes formados por simples espalhamento da solução orgânica

Esta técnica requer o simples espalhamento da amostra sobre a superfície, espera-se a completa evaporação do solvente, e em seguida as amostras são submetidas à vácuo.⁶⁸

Os filmes foram preparados depositando-se, por meio de uma micropipeta, 15 μL de uma solução orgânica (com os fosfolipídeos DPPC ou DMPC dissolvidos em iso-propanol ou clorofórmio) no suporte desejado que possuía $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ de área, e em seguida permitiu-se que a solução se espalhasse espontaneamente e o solvente fosse evaporado. Após a evaporação do solvente, ocorreu uma auto-organização do filme em multicamadas e a amostra foi deixada sob vácuo (aprox.12 horas) para completa evaporação do solvente. A concentração variou de 0,5 a 2mg/mL. Na preparação de filmes com sistemas binários, compostos por dois diferentes fosfolipídeos, o mesmo procedimento foi adotado, em quantidades 1:1 (m/m) nos diferentes sistemas (DPPC/DOPC e DPPC/PC dissolvidos em iso-propanol). Os experimentos foram conduzidos em temperatura de aproximadamente 23°C.

O fenômeno que caracteriza a deposição da solução com iso-propanol pode ser resumido como segue.

A gota de solução depositada na superfície se espalha até atingir o tamanho final e desaparecer. Tipicamente uma solução de 15 μL com concentração de 2mg/mL (em superfície de $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ de área) produziu um filme com uma mancha que exibe cor caramelo em superfície hidrofílica de silício.

b) Formação de filmes de espalhamento por rotação

Foram preparadas soluções contendo o fosfolípido DMPC dissolvido em isopropanol ou clorofórmio em concentrações entre 0,5 – 2mg/mL, sendo 10 μ L destas soluções depositadas nas superfícies de silício hidrofílico e hidrofóbico de tamanho 1cm \times 1cm. Depois de depositar a amostra sobre a superfície, foi realizada a evaporação do solvente por alta rotação através do uso de uma centrífuga. Após evaporação do solvente a amostra é deixada sob vácuo por 12 horas para remoção de qualquer traço de solvente.

3.4 – Caracterização por AFM

As imagens da superfície de amostras foram obtidas em um microscópio de força atômica picoScan da Molecular Imaging Corporation (Tempe, Arizona). As medidas foram realizadas com suportes (cantilevers) de nitreto de silício (Si_3N_4) de 200 μm de comprimento e constante de mola nominal de 0,12 N/m, com ponta tipo NP-S. Para obtenção das imagens através do MAC-MODE[®] foram utilizados MAC-levers (Tipo I) de silício retangulares, e com constante de mola entre 0,15 – 1,5 N/m.

3.4.1– Montagem da célula para líquidos do microscópio de força atômica

A célula líquida do microscópio de força atômica fornecida pelo fabricante foi montada e selada com auxílio de uma fita de teflon. Adicionou-se na célula, sob a amostra, 200 μL de solução tampão (HEPES ou fosfato- KH_2PO_4 , pH 7,4, 10 mM) ou em alguns casos simplesmente água ultrapura. A ponta de varredura foi mergulhada na célula líquida, e iniciadas varreduras. Foram realizados ajustes para que todo o sistema estivesse equilibrado e pudesse obter dados *in situ* sobre a estrutura e morfologia das amostras analisadas. (Figura 17)

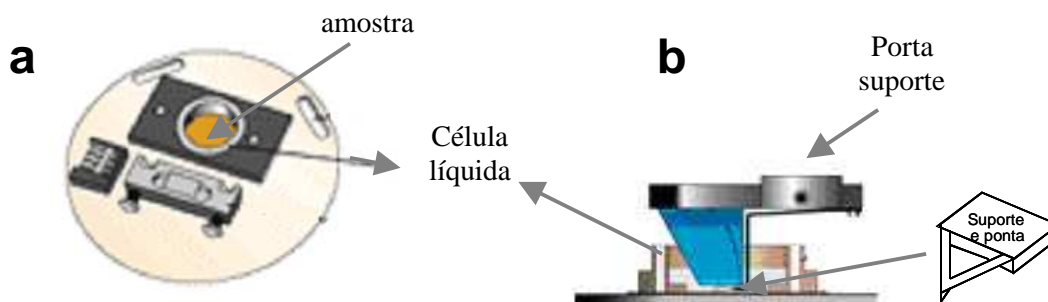


FIGURA 17– (a) Célula para líquidos do microscópio de força atômica com a amostra. (b) Equipamento preparado para varreduras.⁸⁹

3.4.2– Peroxidação lipídica dos filmes *in situ*

A peroxidação lipídica foi realizada nos sistemas modelos desenvolvidos neste trabalho, em condições fisiológicas com análises por AFM em tempo real.

Adicionou-se na célula líquida (sob o filme fosfolipídico em estudo, DPPC/DOPC ou DPPC/PC) durante as varreduras mais 200 μL de solução tampão (HEPES ou fosfato – pH 7,4) com os reagentes necessários para que ocorresse a peroxidação lipídica e mantendo-se a concentração final dos reagentes em um volume de 400 μL (considerando-se soma com os 200 μL adicionados na montagem da célula líquida) em: 0,1 mM de ácido ascórbico, 20 μM de cloreto de ferro, 2,8 mM de peróxido de hidrogênio em 10 mM de tampão fosfato (ou HEPES). Nestas condições foram obtidas *in situ*, imagens de AFM em função do tempo necessário para a observação dos danos provocados na membrana lipídica devido aos efeitos produzidos pelo ataque do radical hidroxila nos filmes de fosfolipídeos utilizados no experimento.

3.5 – Determinação da peroxidação lipídica por TBARS

No monitoramento de ensaios de peroxidação lipídica realizou-se uma peroxidação de lipossomas *in vitro*, para constatar através de um outro método o sistema utilizado para a peroxidação das biomembranas artificiais de fosfolipídeos.

3.5.1 – Peroxidação *in vitro*

Em ensaios de peroxidação *in vitro*, inicialmente preparou-se uma solução tampão contendo lipossomas na concentração de 50 mg/ml (como foi descrito no item 3.3.1.1) de DMPC, DPPC, DOPC ou PC. A concentração final dos lipossomas no meio reacional foi de 5 mg/mL contendo os outros reagentes necessários para a peroxidação.

O método utilizado baseia-se na oxidação induzida pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em membranas lipídicas. O radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) foi produzido pela reação de 0,1 mM de ácido ascórbico, 20 μM de cloreto de ferro, 2,8 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato (ou HEPES) 10 mM. Após a reação, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 min, em seguida foi adicionado ácido tricloroacético (TCA 12%) e o tiobarbitúrico (TBA 0,73%) e novamente os tubos foram incubados a 100°C por 30 min. A peroxidação lipídica foi determinada espectrofotometricamente a 535 nm, através da formação de um complexo róseo, vindo da reação entre o malonaldeído, formado durante a lipoperoxidação, com o TBA. (p. 36).^{107,121}

4– RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi a preparação e a aplicação de filmes de fosfolipídeos organizados em bicamadas sobre suportes sólidos, em estudos *in situ* (condições fisiológicas e análises em tempo real) e em escala nanoscópica através da microscopia de força atômica, sobre condições químicas que resultam em mudanças na morfologia da bicamada lipídica. Foram realizados testes sobre o comportamento morfológico das camadas através de uma reação de peroxidação. Devido ao fato da peroxidação ser um processo de degradação lipídica importante e existirem poucos estudos sobre a real morfologia das bicamadas lipídicas após uma reação de peroxidação, este foi uma nova forma de abordagem no tema.

A seqüência de resultados e discussões será apresentada na seguinte ordem:

- a) Preparação de filmes auto-organizados em bicamadas de fosfolipídeos sobre suportes sólidos por diferentes métodos descritos na literatura.
- b) Estudo de propriedades dos filmes lipídicos formados.
- c) Caracterização das camadas lipídicas e utilização dos filmes em análises sobre o comportamento estrutural de uma bicamada lipídica frente à reação de peroxidação.

4.1 – Preparação de filmes

Três técnicas foram testadas para a preparação de filmes lipídicos (a fusão de vesículas sobre a superfície, a técnica de espalhamento por rotação e o simples espalhamento de solução), com o objetivo de avaliar os diferentes modos de preparação das amostras, seguindo-se alguns critérios:

- i) A escolha de um método para a preparação dos filmes.
- ii) A estabilidade em ambiente aquoso.
- iii) A formação de filmes com misturas lipídicas, usando-se para isto fosfolipídeos com cadeia acila saturada e com cadeia acila insaturada, para viabilizar a análise sobre aspectos morfológicos de bicamadas lipídicas compostas por diferentes fases.

Análises utilizando imagens de AFM e medidas por varreduras de linha forneceram dados sobre a morfologia dos filmes. Para uma observação mais ampla sobre a morfologia completa da amostra estas análises foram realizadas em diversas regiões.

4.1.1 – Análises dos suportes utilizados

Os suportes sólidos que foram utilizados neste trabalho podem ser vistos na Figura 18, que mostra a superfície (hidrofílica) da mica logo após clivagem (Figura 18a), a de silício hidrofóbico (Figura 18b) e a do silício hidrofílico (Figura 18c). É possível também observar pelas varreduras de linha (Figuras 18d, 18e e 18f) que as três superfícies são planas, se comparadas com o tamanho médio de uma bicamada lipídica (± 5 nm),²⁶ e apresentam uma rugosidade similar (0,4 nm ou menos).

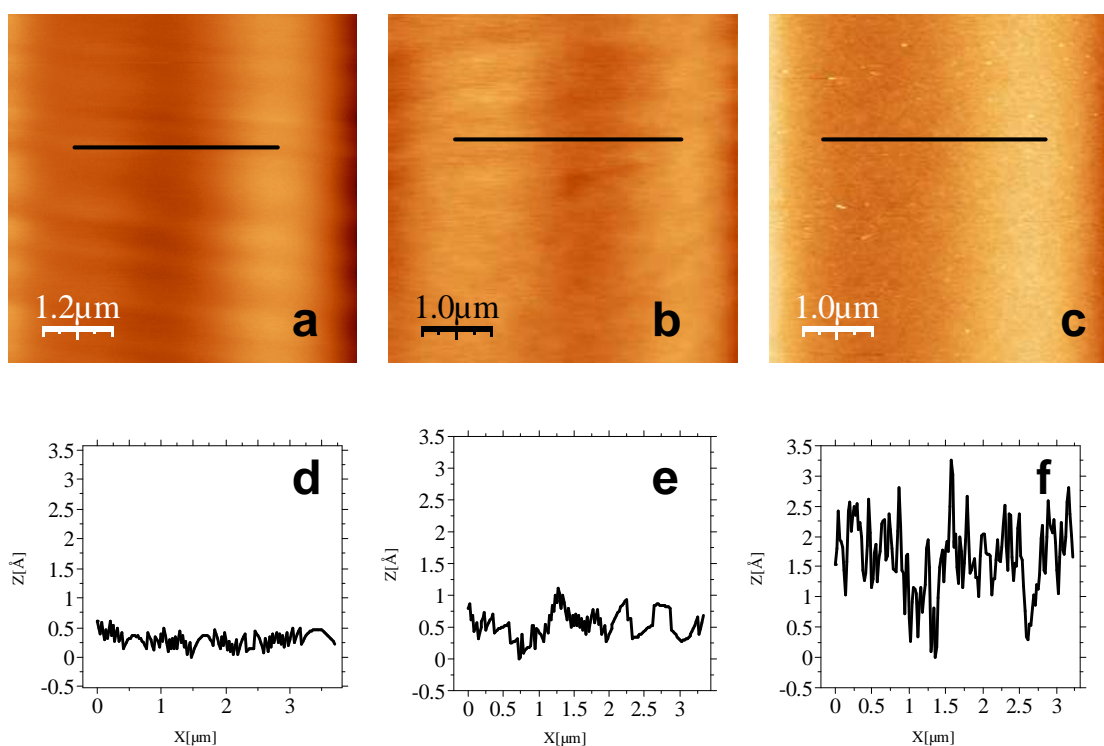


FIGURA 18 – Análises de topografia por microscopia de força atômica dos suportes utilizados, (a) mica; (b) silício hidrofílico; (c) silício hidrofóbico. A varredura de linha indicada nas imagens mostra a rugosidade nestas superfícies; (d) mica; (e) silício hidrofílico; (f) silício hidrofóbico.

Dentre os suportes escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho, a mica é o mais utilizado para estudos sobre bicamadas lipídicas, pois sabe-se que a primeira bicamada lipídica adere fortemente na superfície hidrofílica deste suporte, favorecendo a auto-organização das camadas subsequentes.⁷³ O silício é um material semicondutor e tem a vantagem de sua aplicabilidade no campo da biotecnologia, através do desenvolvimento de biossensores e outros dispositivos eletrônicos.¹²⁵

4.1.2 - Fusão de vesículas sobre a superfície

A Figura 19, apresenta imagens de topografia por microscopia de força atômica de amostras preparadas por fusão de vesículas, que pode ser representado por uma sucessão das seguintes etapas: (i) inicialmente ocorre a adsorção das vesículas na superfície (Figura 19a); (ii) em seguida a vesícula adsorvida pode romper-se ou fundir-se com outra antes da ruptura. Em ambos os casos, é formada uma bicamada planar na forma de discos que se fundirão com os outros para formar uma simples bicamada lipídica, mostrada na Figura 19b. O tempo médio para a completa formação da bicamada lipídica observado nos experimentos foi 140 minutos.

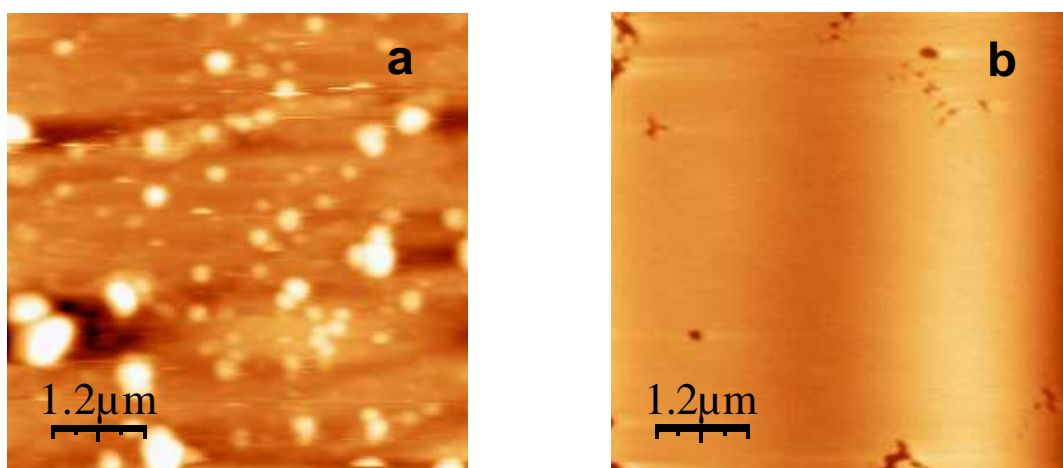


FIGURA 19 – Imagens de topografia de AFM (em solução fisiológica de NaCl 0,9 % a ~ 23 °C); (a) vesículas de DMPC adsorvidas sobre uma superfície de mica ($t = 0$) e (b) posterior formação de bicamada lipídica contínua sobre a superfície ($t = \sim 140$ min). Tamanho da imagem: $6 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$.

A varredura de linha na Figura 20b, mostra a altura de uma das vesículas depositada sobre a superfície (Figura 20a). Estas alturas variaram entre 10 – 60 nm, e estes valores têm sido relatados na literatura também por outros grupos de pesquisa, e tem uma variação que depende do método utilizado na produção das vesículas.¹²⁶

As vesículas lipídicas adsorvidas na superfície levam à formação de discos, a varredura de linha na Figura 20c mostra o perfil do início da formação de um disco, após a ruptura da vesícula lipídica (formada a partir de uma fusão entre vesículas).

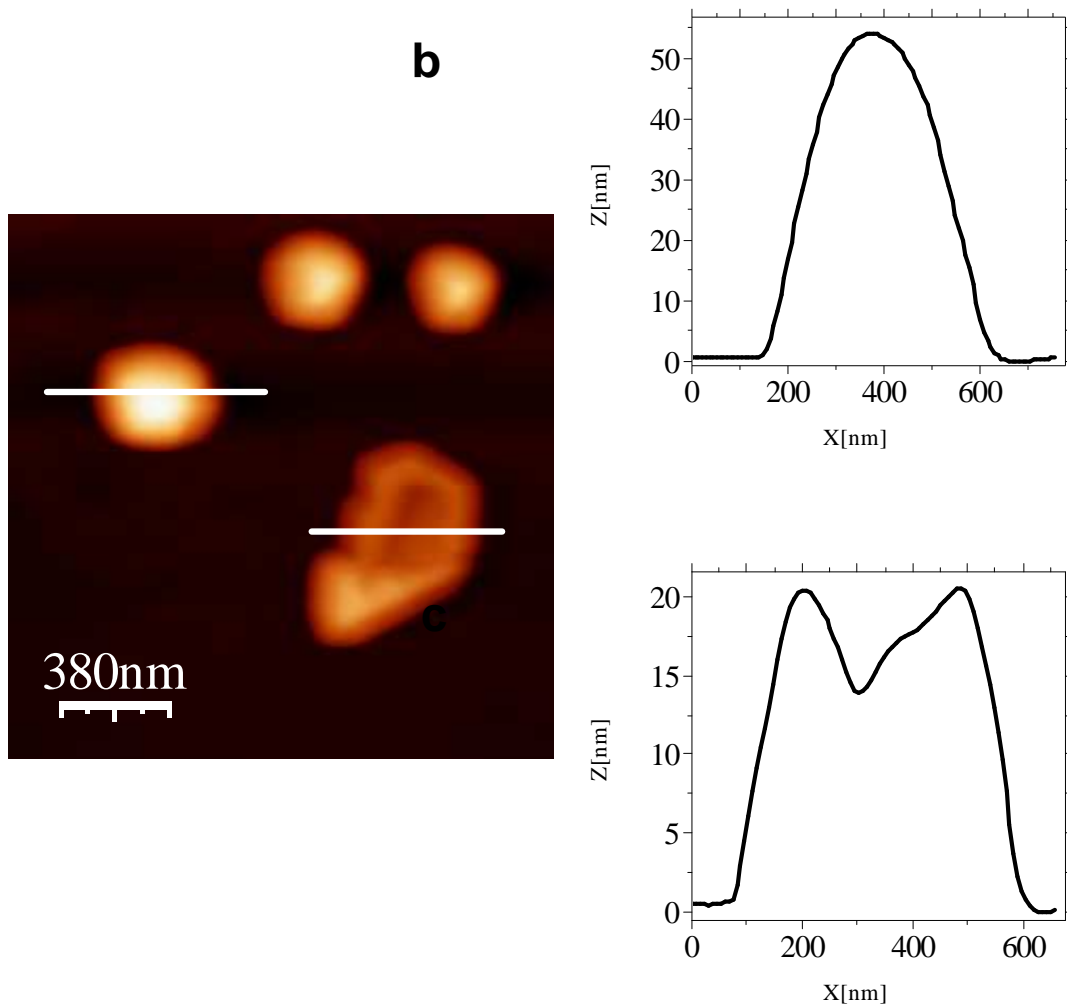


FIGURA 20 – Imagem de topografia de AFM de vesículas de DMPC, (a) vesículas adsorvidas na superfície de mica; (b) a varredura de linha mostra o tamanho de uma vesícula adsorvida; (c) a varredura de linha mostra o perfil do processo de formação de um disco.

Em análises por varredura de linha obtidas em regiões de borda em bicamadas formadas por este método (resultados não mostrados), a altura obtida foi $5 \pm 0,4$ nm para o fosfolípídeo DMPC.

Os resultados obtidos, indicam que as camadas lipídicas crescem pela agrupação de aglomerados (discos) próximos, resultando no completo recobrimento da superfície. As camadas formadas apresentam poucos defeitos microscópicos.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com a literatura.^{8,13,67,127} O estudo mecanístico sobre a formação da bicamada e o processo de fusão de vesículas lipídicas vem sendo realizado por vários grupos de pesquisa.^{19,67}

4.1.3 – Deposição pelo espalhamento de uma solução orgânica

a) Preparação de filmes de espalhamento por rotação (“Spin-coating”)

Na Figura 21a está mostrada uma imagem obtida por microscopia de força atômica de um filme de DMPC preparada pela técnica de espalhamento por rotação, utilizando-se iso-propanol como solvente, os experimentos foram realizados à 23 °C. Observa-se nesta figura a formação multilamelar com alturas de 2,5 ou 6 nm (Figura 21b).

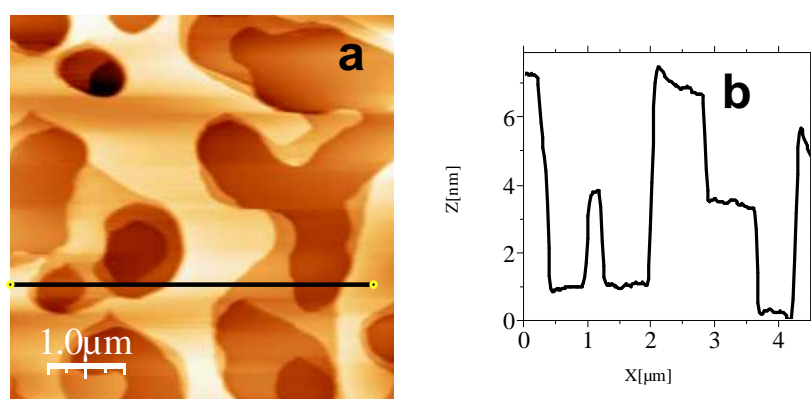


FIGURA 21 – Imagem de topografia de AFM mostrando a formação de um filme multilamelar (a) de DMPC sobre superfície de silício hidrofílico através da técnica de espalhamento por rotação. (b) A varredura de linha mostra a formação de uma superfície multilamelar. Temp. ~23 °C.

Com relação aos suportes e solventes, os melhores resultados obtidos foram com superfícies hidrofílicas e iso-propanol como solvente orgânico, os outros testados foram superfícies hidrofóbicas de silício e clorofórmio como solvente (estes resultados não estão mostrados, mas outros semelhantes serão discutidos no próximo item). A espessura dos filmes formados depende da concentração da solução e do grau de

hidratação da amostra. Superfícies não-homogêneas ou impurezas podem conduzir à mudanças morfológicas nos filmes (por exemplo, a formação incompleta do filme) durante o processo de formação dos filmes. A literatura descreve que a frequência rotacional com que são produzidos os filmes influência na sua espessura.⁷⁰

b) Técnica do simples espalhamento de solução orgânica

A Figura 22 mostra uma comparação entre filmes de DMPC obtidos em silício hidrofílico (Figura 22a) e hidrofóbico (Figura 22b) pelo simples espalhamento de solução sobre a superfície, utilizando-se iso-propanol como solvente. As imagens das amostras foram obtidas em temperatura de 23 °C aproximadamente.

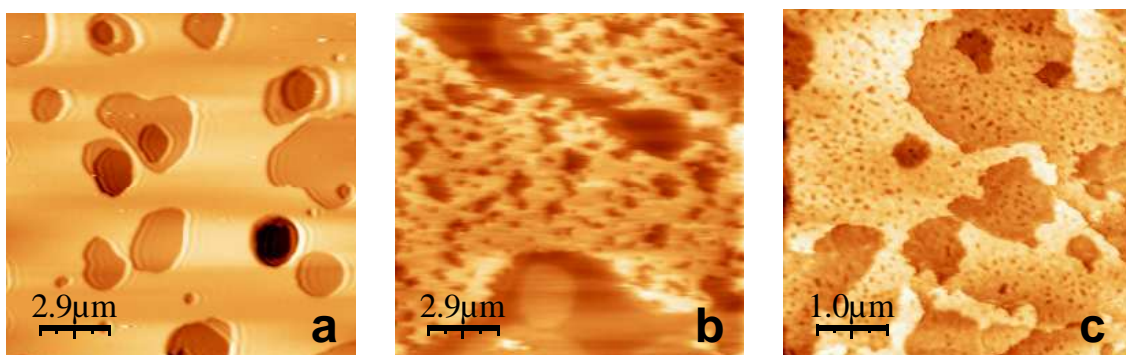


FIGURA 22 – Imagens de topografia obtidas por AFM de camadas de DMPC (a) formação de multicamadas em silício hidrofílico – lipídeos dissolvidos em iso-propanol; (b) formação de camadas não organizadas sobre silício hidrofóbico – lipídeos dissolvidos em iso-propanol; (c) formação de multicamadas sobre silício hidrofóbico – lipídeos dissolvidos em clorofórmio.

A variação de solventes para determinado fosfolípido e suporte provou ter uma forte influência no processo de formação e na morfologia do filme. Em suportes hidrofóbicos de silício, o clorofórmio mostrou-se o melhor solvente, provavelmente por ser de polaridade média, o que favoreceu seu espalhamento sobre a superfície hidrofóbica (Figura 22c). Em superfícies hidrofílicas (resultados não mostrados), o clorofórmio não permitiu um bom espalhamento da solução.

Comparando-se os resultados, obtidos observa-se que a superfície de silício hidrofílica permite a formação de grandes terraços (Figura 22a) ao contrário da superfície hidrofóbica (Figuras 22b e 22c).

Como neste trabalho há o interesse em superfícies lipídicas mais amplas foi dado o prosseguimento no estudo utilizando-se superfícies hidrofílicas e iso-propanol como solvente. Este solvente foi então utilizado em todos os filmes preparados pelo espalhamento de solução orgânica, em superfície de silício hidrofílico ou em superfície hidrofílica de mica.

A Figura 23 mostra uma imagem de topografia (AFM) de um filme de DMPC em mica após a evaporação do solvente. Verifica-se a presença de grandes terraços, regiões de camadas lipídicas e falhas no recobrimento (buracos).

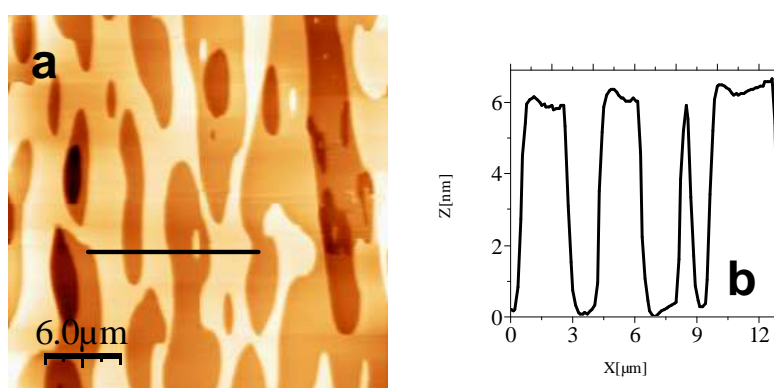


FIGURA 23 – Imagem de topografia por AFM mostrando a formação de multicamadas de DMPC após a evaporação do solvente sobre superfície de mica (a), a varredura de linha em (b) mostra a altura das camadas formadas. Tamanho da imagem: 30 μm × 30 μm.

Observando-se ao longo dos buracos, pode-se ter uma idéia da espessura do filme e considerar que nem todos os buracos revelam a superfície de suporte. Na Figura 23b é mostrado o perfil da superfície relacionado com a região marcada pela varredura de linha na imagem de topografia da amostra na Figura 23a. As alturas obtidas para uma camada de DMPC foram ~ 6 nm, e estas são concordantes com os valores existentes na literatura para a bicamada de DMPC que foram medidas por difração de raios-X.^{73,74}

Uma propriedade notável nos filmes lipídicos de DMPC é a sua tendência natural de se organizarem espontaneamente em grandes terraços lipídicos paralelos à superfície do suporte. Esta propriedade pode ser verificada na Figura 24, na qual é apresentada em três dimensões (3D) a morfologia da superfície de uma amostra de DMPC, após a evaporação do solvente, com diferentes níveis, correspondentes a diferentes camadas.

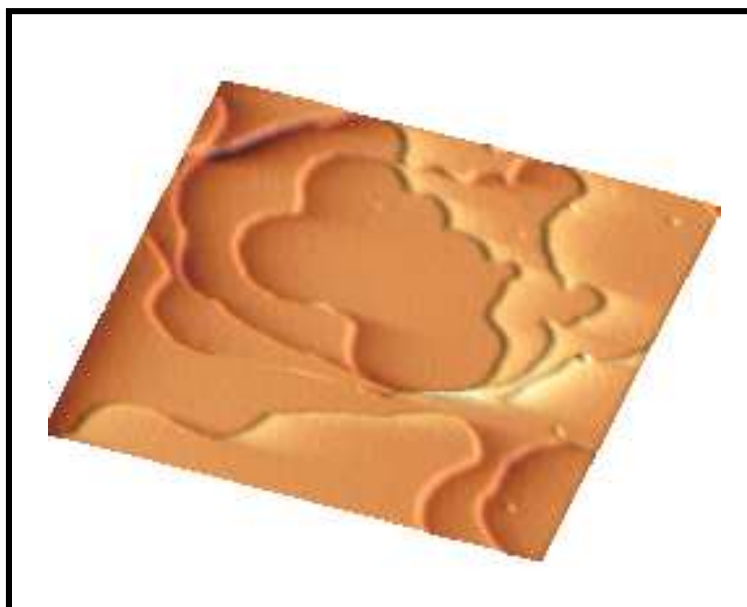


FIGURA 24 – Imagem de AFM em 3D obtida após a evaporação do solvente, revelando a formação dos terraços bilipídicos de DMPC (1 mg/mL dissolvido em isopropanol) sobre silício hidrofílico. Tamanho da imagem $\sim 10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$.

Por outro lado, filmes de DPPC não apresentam a formação de grandes terraços bilipídicos como os filmes de DMPC, quando preparados nas mesmas condições. Na Figura 25a observa-se novamente a formação de filmes com terraços amplos. A explicação para estes terraços é que as amostras de DMPC foram preparadas em temperaturas próximas a de sua transição de fase (Tabela 3), e portanto em algumas regiões do filme provavelmente existem lipídeos em fase líquida. Estes lipídeos presentes nas camadas do filme (pode-se lembrar que regiões em fase líquida nas bicamadas lipídicas biológicas são as principais responsáveis pela sua fluidez^{34,35}), apresentam uma melhor mobilidade. Ou seja, a maior fluidez das camadas de DMPC, devido a mistura de fases gel/líquida, é fundamental para a formação de terraços amplos na superfície de suportes sólidos.

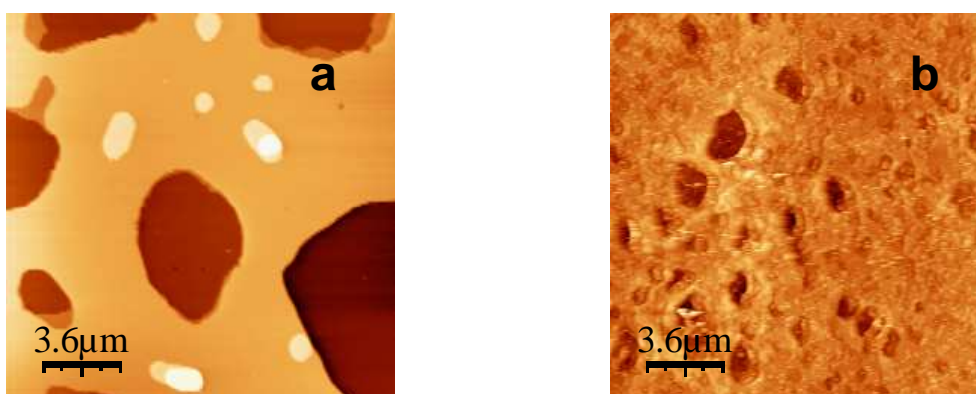


FIGURA 25 – Imagens de topografia obtidas por AFM sobre amostras de filmes lipídicos após a evaporação do solvente; (a) filme de DMPC; (b) filme de DPPC. Suporte utilizado: silício hidrofílico, análises em condições ambientes (temp.~ 23°C).

Por outro lado, os filmes de DPPC, (temperatura de transição 41 °C) que possuem somente lipídeos em fase gel (menor mobilidade em temperatura ambiente), não apresentam a mesma organização morfológica (Figura 25b).

Uma melhor organização (formação de terraços amplos de bicamadas lipídicas) das amostras foi obtida neste trabalho através da hidratação dos filmes, uma vez que filmes preparados por espalhamento de solução orgânica encontram-se apenas parcialmente hidratados e a hidratação após a evaporação do solvente ocorre apenas pela umidade do ar no ambiente.

c) Etapa de Hidratação

A Figura 26, mostra mudanças morfológicas no filme de DPPC durante hidratação em vapor de água à 40 °C. Observa-se através da imagem de topografia na Figura 26a que não ocorreu uma organização em grandes terraços bilipídicos após a evaporação do solvente e em temperatura ambiente, conforme discutido anteriormente. A Figura 26b mostra que após exposição de 20 min em vapor, inicia-se uma reorganização na amostra de DPPC, e com a formação de terraços bilipídicos. Após 30 min (Figura 26c) em vapor o filme está mais reorganizado exibindo amplos terraços, com alturas variando entre 5 – 6 nm (Figura 26d). Estes valores experimentais dependem do nível de hidratação e da posição relativa na amostra conforme observados em estudos por espalhamento de raios-X.⁸²

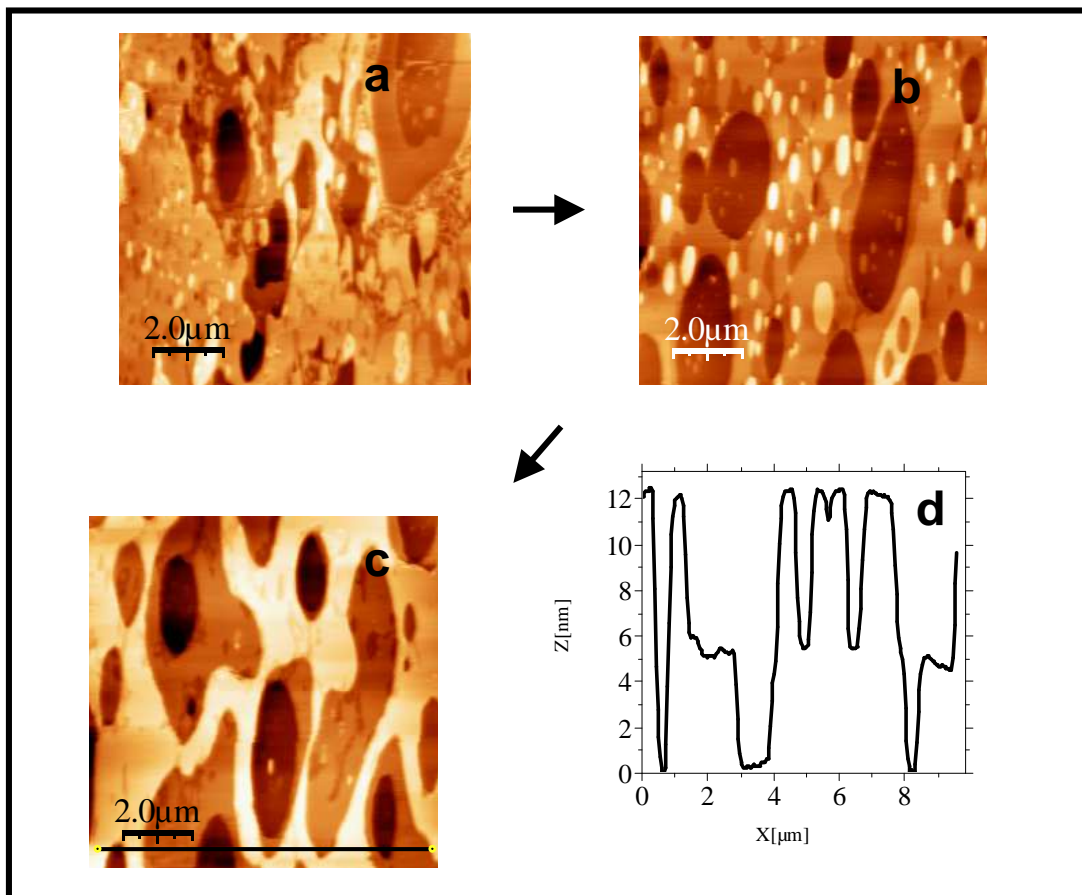


FIGURA 26 – Imagens de topografia da seqüência de hidratação da amostra de DPPC sobre superfície de mica (a) DPPC após a evaporação do solvente; (b) após 20 min em vapor; (c) após 30 min em vapor; (d) a linha de varredura revela as características da topografia ao longo da amostra.

A etapa de hidratação mostrou que com o aumento do calor e umidade ocorrem mudanças morfológicas nos filmes produzidos pelo espalhamento da solução orgânica, e observa-se a formação de ilhas bilipídicas maiores com menores defeitos nos filmes. Conseqüentemente, a pequena organização e o grande número de defeitos nos filmes são provavelmente devido ao fato da amostra não estar completamente hidratada.

O máximo de hidratação ocorre quando as amostras são completamente submergidas em água (ou solução tampão) ou mesmo em 100% vapor de água. Para se obter um filme hidratado, 100 % por vapor, é necessário um rígido controle de temperatura e pressão de vapor.⁷⁶

Nos experimentos realizados neste trabalho, para a obtenção da hidratação máxima, as amostras foram imersas em solução tampão de HEPES (pH 7,4) ou simplesmente água.

d) Amostras em condições fisiológicas

Na técnica de fusão de vesículas, os filmes que foram formados encontravam-se hidratados, por outro lado, na técnica de espalhamento de solução orgânica os filmes necessitam imersão da amostra em solução tampão ou água para as análises dos filmes em condições fisiológicas.

Todavia, as amostras preparadas pela técnica de espalhamento por rotação (resultados não mostrados) são menos estáveis quando muito hidratadas, quando comparadas com os sistemas de multicamadas preparados pelo espalhamento da solução orgânica e este resultado, também está descrito na literatura⁷⁰, e inviabiliza esta técnica para o estudo das camadas orgânicas *in situ*.

Os resultados obtidos após a completa hidratação das amostras preparadas por espalhamento de solução orgânica, serão mostrados a seguir.

A Figura 27^a, mostra a morfologia do filme de DMPC após a evaporação do solvente. Após a hidratação por água (Figura 27b) do filme, ocorreu uma grande reorganização na amostra, mas as ilhas bilipídicas continuam evidentes, mantendo a estrutura de multicamadas (Figura 27c).

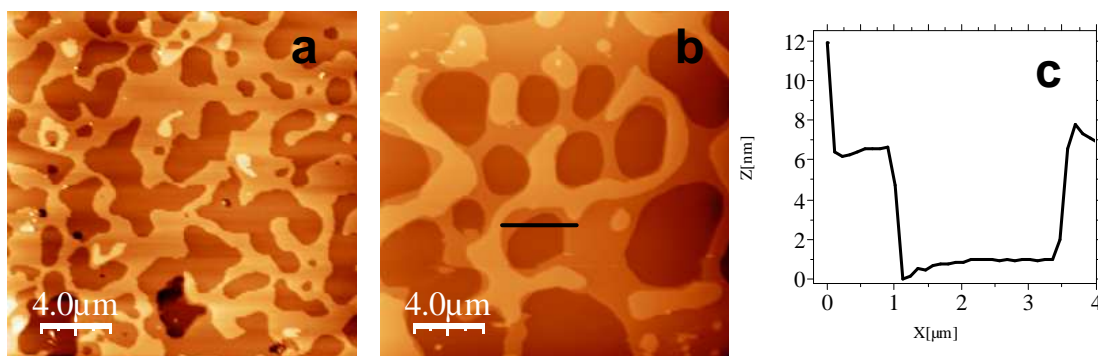


FIGURA 27 – Imagens de topografia obtidas por AFM de filmes de DMPC sobre silício hidrofílico; (a) bicamadas de DMPC após a evaporação do solvente; (b) bicamadas hidratadas; (c) a varredura de linha mostra que as alturas das bicamadas em água são de $(6,0 \pm 0,4)$ nm. Análises em temperatura (~ 23 °C).

Se comparar com a técnica da fusão de vesículas em que os melhores resultados são os que apresentam a formação de apenas uma única bicamada, os arranjos multilamelares (multicamadas) podem apresentar vantagens importantes em algumas aplicações. Por exemplo, a incorporação de proteínas funcionais, catálise enzimática, proteínas que absorvem luz ou para o transporte de fármacos. Estas aplicações podem ser compreendidas em escala linear com o volume das bicamadas. Um outro exemplo de formação de multicamadas ocorre nas plantas, especificamente nas membranas tilacóides dos cloroplastos.⁷⁰

Amostras de DPPC também foram analisadas em meio líquido, e assim como as amostras de DMPC, mostraram-se estáveis e igualmente formaram estruturas de multicamadas.

A Figura 28, mostra a topografia de uma amostra de DPPC imersa em tampão HEPES, pH 7,4 (Figura 28a), com a formação de grandes terraços multilamelares. Cada terraço corresponde a uma bicamada lipídica de DPPC com $(6,4 \pm 0,4)$ nm de altura (Figura 28b).

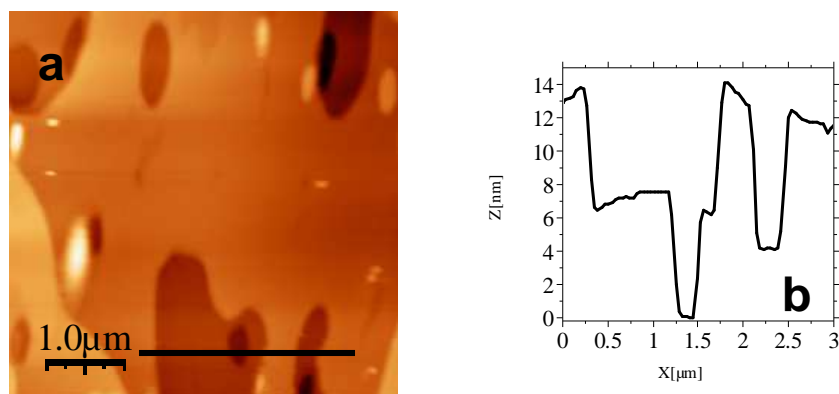


FIGURA 28 – Imagem de topografia obtida por AFM sobre a morfologia de uma amostra com formação de patamares multilamelares de DPPC, sobre superfície de mica, após imersão em solução tampão de HEPES (pH 7,4) em temperatura ambiente (a); a varredura de linha mostra a altura dos terraços (b).

Essa pequena diferença nas alturas entre a bicamada de DMPC (~6,0 nm) e a de DPPC (6.4 nm) está obviamente correlacionada com o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos dos respectivos ácidos graxos de cada fosfolípídeo. (DMPC-14:0 e DPPC-16:0). As alturas estão condizentes também com estudos realizados por difração de raios-X, utilizando-se o mesmo método de preparação de amostras.⁷³

Com estes resultados pode-se concluir que o método de espalhamento da solução orgânica é aplicável também para medidas *in situ*, possibilitando a análise por microscopia de força atômica de camadas lipídicas, com os respectivos lipídeos em fase gel em temperaturas menores que 24 °C para o fosfolípídeo DMPC. Foram observadas em temperaturas próximas a 24 °C, o DMPC inicia a transição de fase, e nestas temperaturas ocorrem algumas mudanças morfológicas nos filmes, que serão discutidas a seguir.

4.2 –Filmes de DMPC analisados *in situ* em temperatura de transição de fase

A transição de fase das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídeos resulta em mudanças conformacionais e nas interações intermoleculares.⁴² O tamanho médio da bicamada lipídica em qualquer temperatura ou pressão depende do comprimento e flexibilidade das cadeias apolares.^{31,45}

Neste trabalho, as mudanças físicas nos filmes (diferenças morfológicas), em temperaturas próximas a transição de fase dos fosfolipídeos componentes foram detectadas por microscopia de força atômica.

a) Coexistência de duas fases em filmes de DMPC

Na Figura 29a é mostrada a superfície de um filme de DMPC em temperatura próxima a de transição. Nesta imagem de topografia constata-se um claro contraste de altura (que pode ser observado pela varredura de linha na Figura 29b) na membrana de DMPC (Figura 29). A diferença de alturas entre as regiões claras e escuras no filme de DMPC estão em torno de 0,5 nm (5 Å) e não são condizentes a altura esperada para uma bicamada lipídica.

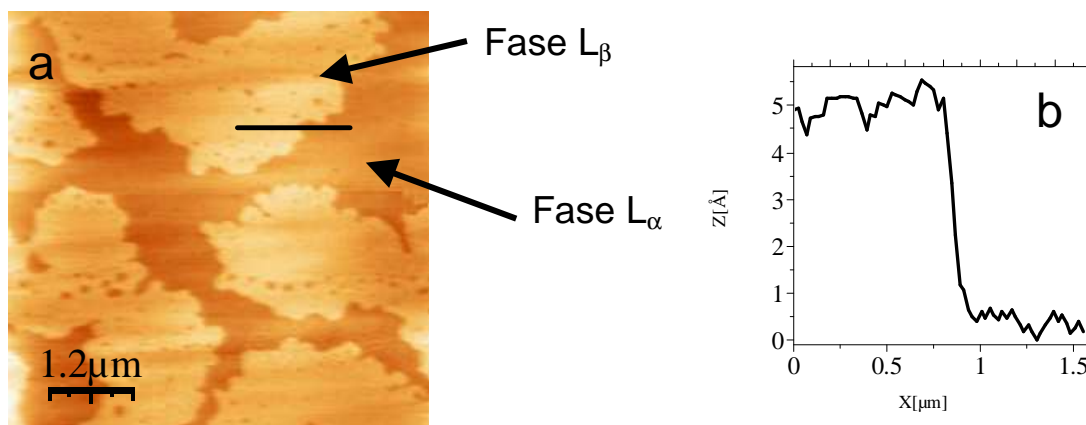


FIGURA 29 – (a) Coexistência das duas diferentes fases (L_{α} e L_{β}) obtidas por imagem de topografia de uma amostra de DMPC imersa em solução tampão HEPES (pH 7,4), temperatura ambiente (aprox. 24 °C).(b) A diferença nas alturas é de aproximadamente 0,5 nm vista na varredura de linha.

Este resultado permite concluir que duas fases, gel e líquida, coexistem na superfície do filme, em temperaturas próximas a de transição do DMPC (24 °C, vide

Tabela 3). Também pode-se concluir que as regiões mais claras (mais altas) contém lipídeos na fase gel, como descrito na literatura para amostras preparadas pela fusão de vesículas,^{8,44} ou camadas avaliadas por difração de raios-X em amostras preparadas por espalhamento de solução orgânica para o fosfolípido DMPC.^{12,68,70,71}

A origem desta diferença nas alturas, pode estar relacionada com o fato de que na fase gel (fase L_{β}) as cadeias de hidrocarbonetos encontram-se altamente organizadas. Por outro lado, quando os lipídeos encontram-se na fase líquida (fase L_{α}) as flutuações entrópicas contribuem para uma desorganização das moléculas.^{42,44}

b) Desaparecimento de pequenos defeitos em uma bicamada de DMPC

A Figura 30 mostra que em temperatura próxima a de transição de fase do DMPC ocorrem mudanças nos filmes, iniciando-se o fechamento de um defeito na bicamada lipídica. O completo fechamento de um filme de DMPC foi visualizado em temperatura próxima a 24 °C, quando todos os defeitos existentes em uma bicamada lipídica desapareceram (Figuras 30a, 30b, 30c e 30d). Conclui-se que o aumento da área ocupada por lipídeos que aumenta 5% à 7%⁴⁴ e mobilidade^{34,35} das moléculas lipídicas em fase fluída faz com que todos os defeitos formados na membrana desapareçam durante o experimento.

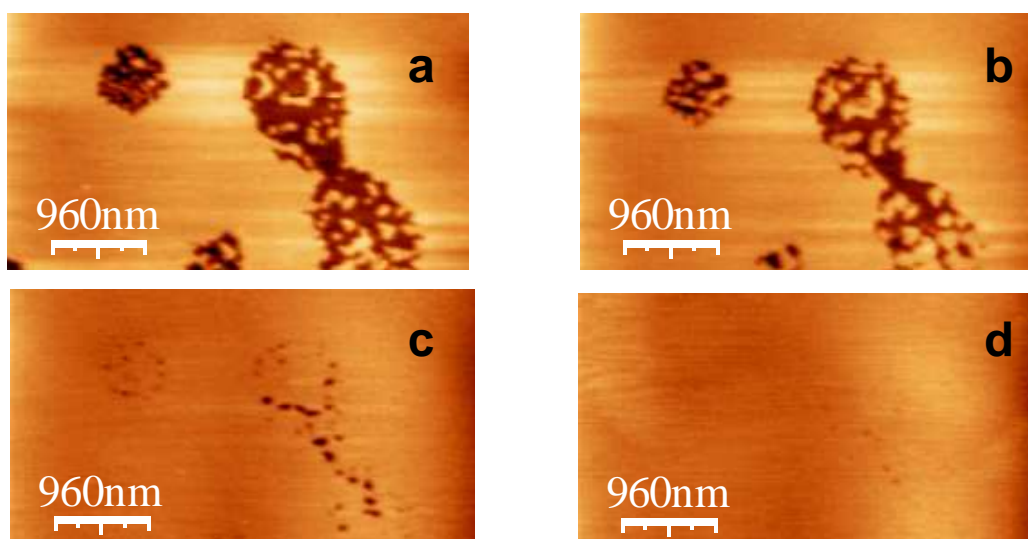


FIGURA 30 – Desaparecimento de pequenos defeitos na bicamada lipídica de DMPC devido ao aumento da temperatura durante a varredura de AFM. (a) início da varredura temp. ~18 °C, fase L_{β} ; (b) ~ 19 °C; (c) ~ 22 °C; (d) ~24 °C, fase L_{α} . Experimentos *in situ*.

4.3 – Sistemas compostos por misturas lipídicas

As membranas biológicas são estruturas heterogêneas, constituídas por diferentes fosfolípidos e para obter um sistema modelo para estudar o comportamento fisiológico de membranas celulares é necessário a preparação de filmes que se aproximem destas condições. Neste sentido, utiliza-se sistemas de misturas lipídicas, ou seja, compostos por lípidos em fase gel e na líquida cristalina (geralmente com cadeias de hidrocarbonetos insaturadas) à temperatura ambiente.

Neste trabalho, foram utilizados misturas lipídicas de sistemas DPPC/DOPC e DPPC/PC. O fosfolípido DOPC (18:1) possui transição de fase em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, encontrando-se em estado líquido à temperatura ambiente. O fosfolípido PC, que apresenta vários ácidos graxos (incluindo ácidos insaturados e poliinsaturados) em sua composição, e embora sua temperatura de transição não seja definida, encontra-se também em estado líquido à temperatura ambiente. Amostras de misturas fosfolipídicas foram preparadas pelo método do espalhamento de solução orgânica e observadas após a evaporação do solvente (Figura 31).

A Figura 31a, mostra a imagem de topografia do filme formado pela mistura DPPC/DOPC (1:1 m/m). Observa-se a formação de bicamadas no filme e através de uma análise por varredura de linha nota-se a formação de regiões com alturas (em torno de 1nm) não condizentes com uma bicamada lipídica ($\sim 6,4\text{ nm}$ para o fosfolípido DPPC).

Na mistura de DPPC/PC 1:1 m/m (Figura 31b), também observa-se na morfologia do filme, e após a evaporação do solvente, a formação de regiões com diferentes alturas, de $\sim 1,5\text{ nm}$ mostradas, pela varredura de linha na Figura 31d (zoom de imagem em Figura 31c).

No capítulo anterior foi discutido que em temperatura igual ou superior a de transição de fase, os filmes de DMPC apresentam uma pequena diferença de alturas (Figura 29). Pode-se então sugerir, que devido as diferenças na morfologia dos filmes e nas alturas, coexistem diferentes fases (Figura 31).

As diferentes fases observadas na Figura 31a e 31b, estão portanto relacionadas com a fase na qual encontram-se os fosfolípidos existentes nas misturas (Tabela 3) durante o experimento. Entre os fatores que poderiam também influir nestas diferenças nas alturas inclui-se, o comprimento da cadeia carbônica diferenciada, insaturações na cadeia e interações entre as bicamadas.

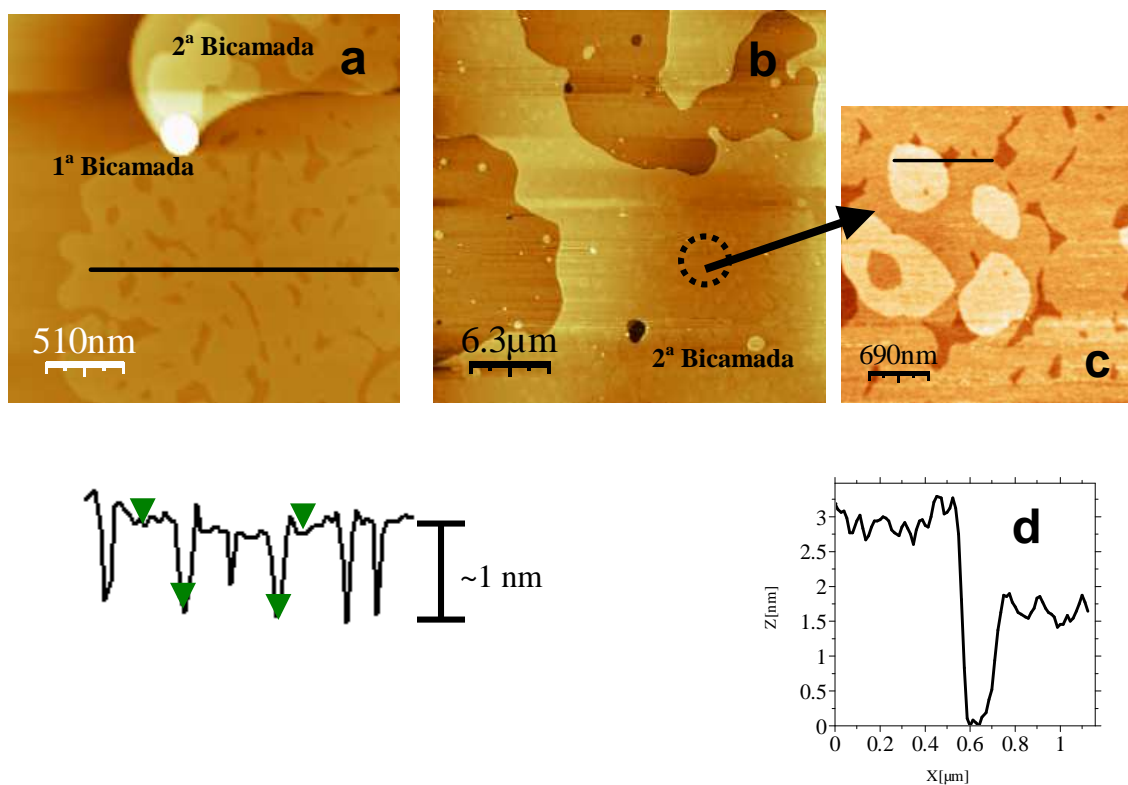


FIGURA 31 – Imagens de topografia de AFM mostrando a morfologia das amostras, após a evaporação do solvente (sobre superfícies de mica muscovita), de (a) multicamadas de DPPC/DOPC, formação de ilhas em fase gel (L_{β}) e em fase líquida (L_{α}) nas bicamadas indicadas também pela linha de varredura da imagem. (b) Formação de diferentes fases na amostra em DPPC/PC. A imagem em (c) é zoom da imagem em b; (d) a varredura de linha sugere a formação de diferentes fases no filme.

Como resultado das imagens na Figura 31, conclui-se que as regiões mais claras dos filmes dentro das bicamadas são compostas por lípidos em fase gel (DPPC), condizente com dados mostrados na literatura.¹⁶

4.3.1 – Domínios microscópicos e nanoscópicos em amostras de DPPC/DOPC e DPPC/PC *in situ*

As membranas lipídicas exibem espontaneamente a coexistência de estruturas em diferentes fases na presença de água em excesso (>95%).³⁴ Neste trabalho sistemas com misturas lipídicas foram analisados *in situ* (solução tampão HEPES 10 mM, pH 7,4), e os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

Em análise da imagem de topografia da mistura DPPC/DOPC mostrada na Figura 32, pode-se observar a formação de uma bicamada lipídica com altura em torno de 6,4 nm e dentro da bicamada regiões com alturas de ~1 nm. Sugere-se que existem na bicamada, regiões ricas em DOPC (fase líquida) e outras em DPPC (fase gel). Como as regiões ricas em fase líquida são aparentemente a grande maioria, pode-se assumir que existem regiões de domínios de DPPC dentro de regiões ricas em DOPC, uma vez que domínios são definidos como regiões dentro da membrana lipídica com composição molecular que os diferenciam das suas vizinhanças.²⁹

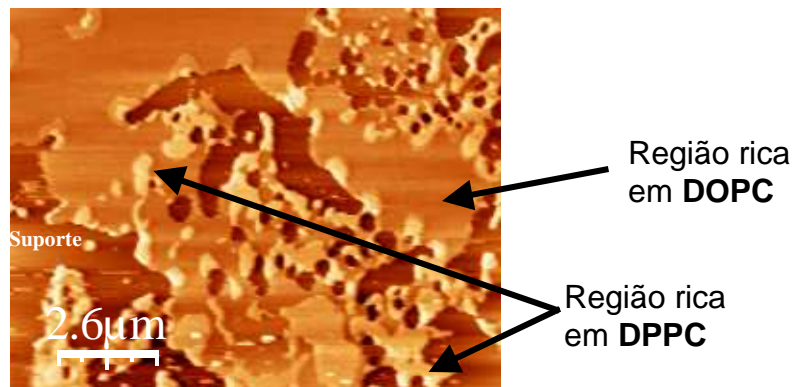


FIGURA 32 – Imagem AFM de topografia de uma amostra de DPPC/DOPC (1:1 m/m) imersa em solução tampão HEPES (pH 7,4) em temperatura ambiente. Imagem: 10 μm × 13 μm.

Através da microscopia de força atômica foi demonstrado então que domínios de DPPC (na mistura DPPC/DOPC, Figura 32) não formaram-se apenas nas extremidades da bicamada lipídica (regiões de borda), mas também em regiões centrais da bicamada. O tamanho dos domínios também variou de nanoscópicos (100 nm ou menos) até microscópicos (1 μm ou mais) incluindo valores intermediários (domínios

mesoscópicos). Os domínios foram distribuídos em toda bicamada lipídica, mostrando uma distribuição de tamanho heterogêneo com o tamanho de domínios intermediários que predominaram nas extremidades (regiões de bordas) das regiões de menor predominância de terraços da bicamada lipídica. Em contraste, domínios nanoscópicos, com um tamanho aparente de aproximadamente 100 nm, mostraram uma distribuição mais aleatória que os maiores.

A distribuição destes domínios está condizente com outros dados experimentais relatados na literatura em filmes preparados por fusão de vesículas.^{8,41,53}

Em mistura de DPPC/PC (o PC contém diferentes cadeias de ácidos graxos, vide Figura 16 p.40), nota-se a formação de duas principais fases com domínios microscópicos de fase gel, ricos em DPPC, com alturas em torno de ~1,5 nm (Figura 33b).

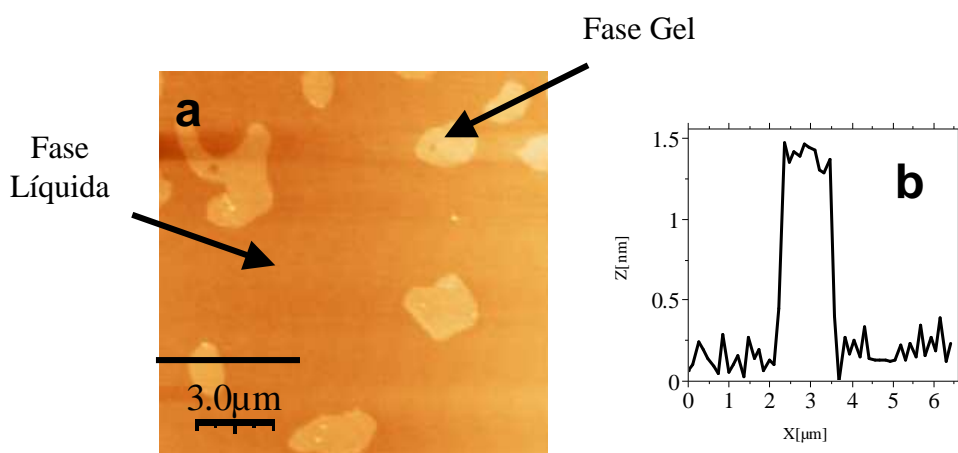


FIGURA 33 – Formação de domínios microscópicos em uma bicamada lipídica formada pela mistura DPPC/PC (1:1 m/m). Amostra imersa em solução tampão HEPES, (pH 7,4). Temp. ~23 °C.

Nos filmes, não foram observados domínios nanoscópicos (menores que 100 nm) de lipídeos em fase líquida (domínios mais baixos em altura) em regiões ricas em fase gel (regiões mais altas do filme). Como eles são extremamente pequenos, possivelmente encontram-se escondidos pela presença de moléculas mais altas do lipídeo DPPC (em fase gel), fazendo com que a ponta do microscópio de força atômica fique impossibilitada de analisá-los. A existência destes domínios tem sido comprovada em estudos por difração de nêutrons, em filmes de DMPC/DSPC.⁵⁸

A geometria de bicamadas de fosfolipídeos em um sistema binário (1:1) composto por misturas de lecitinas sintéticas, com diferenças nas cadeias de hidrocarbonetos forma diversos domínios de regiões ricas na fase gel e na líquida, em ambiente aquoso. A formação de domínios em sistemas de misturas lipídicas (representada por um modelo na Figura 34) tem sido comprovada também através do uso de difração de nêutrons.⁵⁸

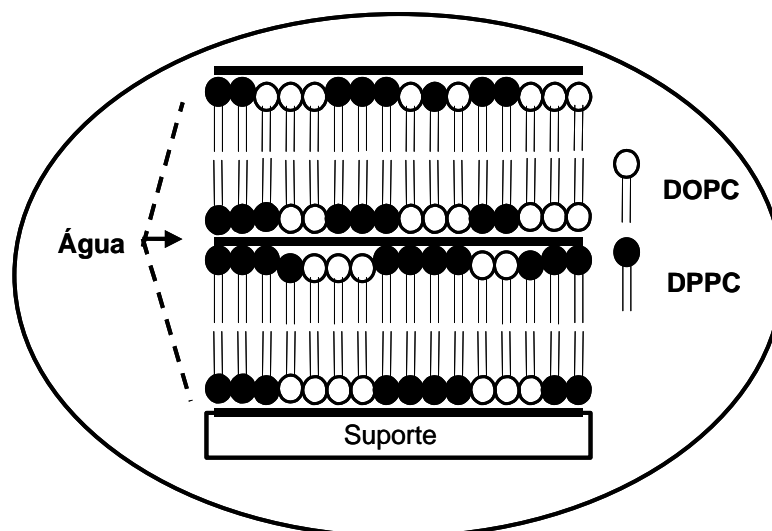


FIGURA 34 – Visão lateral de uma mistura lipídica hidratada.

Como resultado, observa-se que foi possível obter filmes compostos por misturas lipídicas, estáveis em solução aquosa pela técnica do espalhamento da solução orgânica. Observou-se a formação de domínios laterais de membrana e comprovou-se que estes mostraram-se estáveis durante os processos de varredura. O método de espalhamento da solução orgânica foi satisfatório em amostras *in situ* de DMPC, DPPC e em sistemas de misturas lipídicas compostas por DPPC/DOPC (1:1) e DPPC/PC (1:1).

Este foi então, o método de preparação escolhido para produção dos filmes que foram utilizados em ensaios de peroxidação lipídica em filmes de misturas lipídicas.

Um dos principais objetivos deste estudo foi visualizar diretamente e demonstrar por meio da microscopia de força atômica (AFM) a coexistência de domínios que são formados devido à presença de lipídeos em diferentes fases em sistema que não apresente grandes variações de temperatura e pressão. O efeito da oxidação lipídica na organização dos domínios nestas membranas foi também investigado, e os resultados obtidos serão mostrados a seguir.

4.4 – Peroxidação lipídica

4.4.1. – Análises de peroxidação lipídica com microscopia de força atômica

A investigação de uma reação de peroxidação lipídica com a microscopia de força atômica permitiu uma análise direta em escala nanométrica, sobre o mecanismo de ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos filmes lipídicos preparados neste trabalho.

Sabe-se que um radical ou outro intermediário reativo inicia a lesão tecidual através de alterações químicas nas moléculas. Conseqüentemente, acredita-se que a natureza e a extensão destas alterações deixem seqüelas fisiopatológicas.^{109,110}

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode espalhar-se pela membrana lipídica produzindo perturbações metabólicas sérias.³³ Uma delas é a formação do radical hidroxila (OH^\bullet), que é produzido pela quebra homolítica da ligação O – O na molécula de H_2O_2 , e é muito reativo e extremamente oxidante.

O processo de peroxidação lipídica pode formar longos fragmentos de cadeia acila ou pequenos fragmentos como moléculas de aldeídos, radicais não-reativos e álcoois, entre outros produtos.³³ Nestas condições, separações de fases podem ser formadas ou destruídas. A peroxidação lipídica pode ter efeito dual nos fosfolipídeos presentes, um que estava em um estado mais ordenado se desordenar e vice-versa dependendo do grau de oxidação e da organização lipídica antes da peroxidação.

A microscopia de força atômica detecta mudanças físicas induzidas quimicamente, devido à reação de peroxidação lipídica nos sistemas modelo estudados.

Em uma seqüência de reações de peroxidação na bicamada lipídica da mistura DPPC/PC, observou-se através de mudanças morfológicas no filme a evidência do desaparecimento de domínios de lipídeos em fase ordenada (fase gel). (Figura 35)

A Figura 35, mostra imagens de topografia de um filme composto por DPPC/PC (no qual regiões de domínios ricos em DPPC são evidenciados) durante a passagem de um período de tempo antes (Figura 35a) e após a adição (Figuras 35b–d) de substâncias que promovem a peroxidação lipídica. Nesta seqüência de imagens nota-se que o tamanho dos domínios lipídicos ricos em DPPC diminuem até o completo desaparecimento de alguns (marcado pela seta). É possível observar que o desaparecimento dos domínios inicia em regiões de fronteira entre as duas fases do filme. As alturas dos domínios foram medidas por varredura de linha e possuem aprox. 1,4 nm.

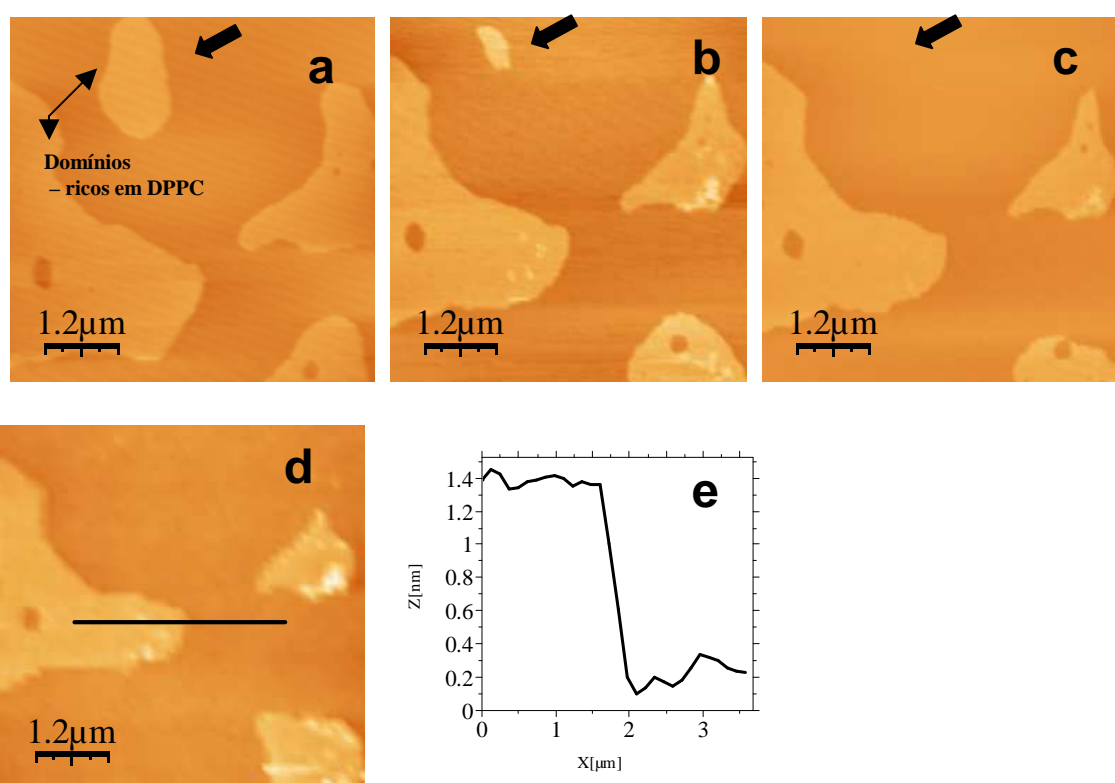
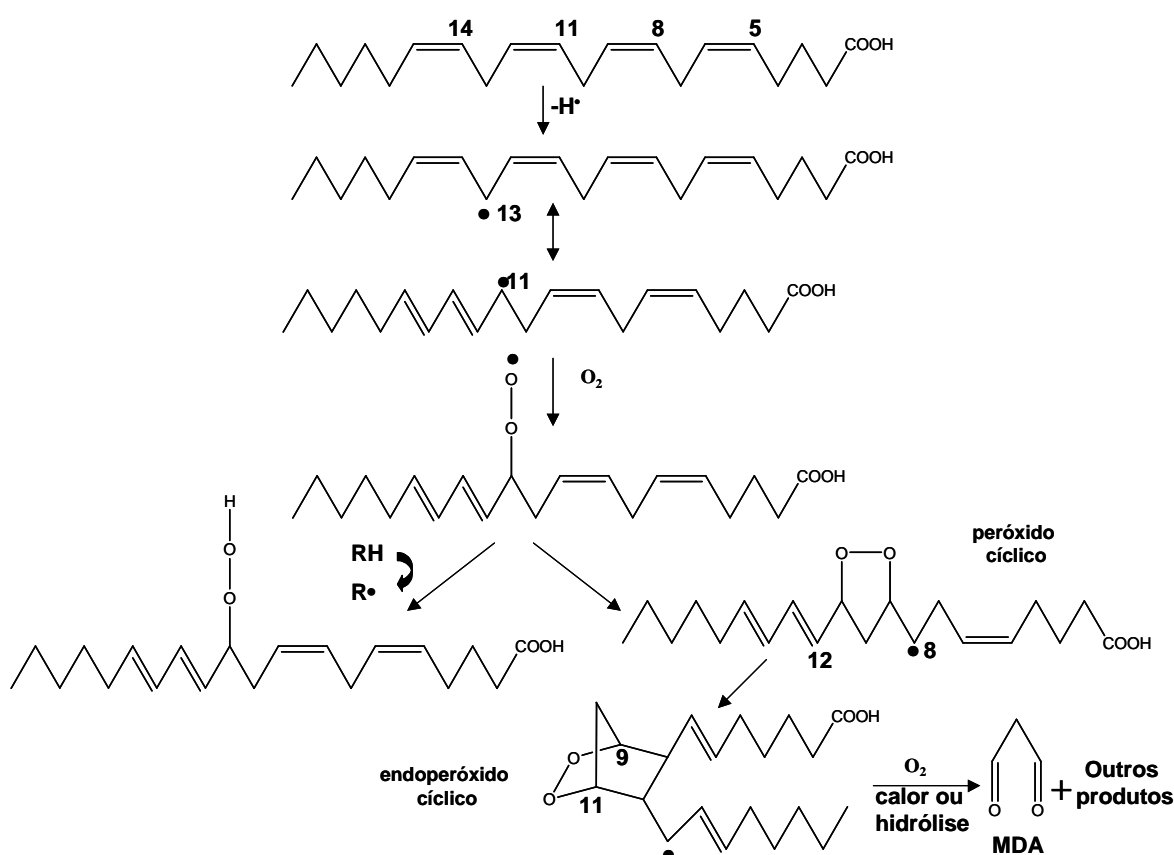


FIGURA 35 – Imagem de topografia de amostra composta por DPPC/PC, com domínios ricos com DPPC em evidência (regiões mais claras), durante uma reação de peroxidação em uma bicamada lipídica; (a) início da reação ($t = 0$); (b) início de mudanças nos domínios de lipídeos em estado ordenado (fase gel) $t = 12$ min; (c) modificações na morfologia do filme com mudanças na organização lateral do filme ($t = 30$ min); (d) ($t = 50$ min); (e) varredura de linha com altura dos domínios formados em misturas compostas por DPPC/PC.

A desorganização completa de uma região ordenada no filme lipídico indica que perturbações químicas ocorreram mudando a morfologia da bicamada lipídica. (Figura 35)

Durante uma peroxidação lipídica são formados muitos aldeídos de cadeia curta, solúveis em água. Estes novos materiais podem desordenar as regiões de domínios da bicamada lipídica e serem responsáveis pelas mudanças nos filmes (vide, Tabela 2).¹¹⁰

A presença de ácidos poliinsaturados no PC (ácido araquidônico, 20:4 e ácido linoléico, 18:2) leva a formação principalmente do malonaldeído pela abstração intramolecular de hidrogênios metilênicos (Esquema 7).



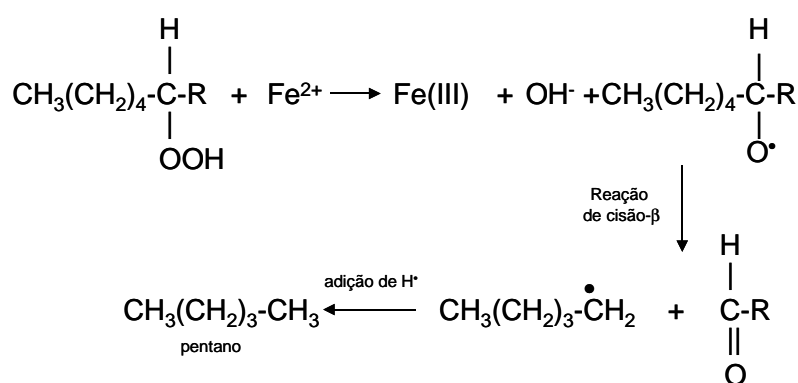
ESQUEMA 7 – Mecanismo de formação de hidroperóxidos e peróxidos cíclicos obtidos a partir do ácido araquidônico.³³

No Esquema 7, é mostrado inicialmente a abstração de um hidrogênio alílico em C-13. O hidrogênio pode ser abstraído também de C-10 ou C-7, fornecendo então outros peróxidos e produtos finais.

A decomposição de peróxidos por exposição a íons ferro ou cobre, gera uma mistura de produtos complexa, incluindo epóxidos, aldeídos saturados (por exemplo, hexanal), aldeídos insaturados, cetonas (por exemplo, butanonas, pentanonas, octanonas) e hidrocarbonetos.

Uma das reações pode proceder da seguinte maneira, o Fe^{2+} reage com hidroperóxidos na posição 5 a partir do final da cadeia carbônica do ácido graxo, e nestas condições, o pentano pode ser produzido (como gás em condições fisiológicas).

Esta reação pode ocorrer com o ácido linoléico ou com o araquidônico, como visto no Esquema 8:



R = $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_2$ (ácido linoléico)

R = $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_2$ (ácido araquidônico)

ESQUEMA 8 – Formação do pentano e aldeídos durante a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados.³³

Os gases etano (C_2H_6) e etileno ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$) também são produzidos em reações similares no ácido linolênico. A reação radicalar com cisão- β mostrada acima é bem conhecida, e ocorre especialmente com os radicais alcoxila.³³

A literatura sobre reações de peroxidação lipídica sugere que podem ocorrer inúmeras alterações na organização lipídica durante o processo da peroxidação.^{110,114,115} Porém, as dimensões destas alterações na morfologia da bicamada lipídica ainda não haviam sido observadas em escala microscópica.

Na próxima seqüência de imagens obtidas durante a peroxidação lipídica, é possível observar a destruição nas regiões de borda da bicamada lipídica. Nestas regiões a curvatura existente, devido a cadeias de hidrocarboneto que evitam o contato com a água, faz com que ocorra uma maior desorganização dos lipídeos em relação à de domínios centrais da bicamada lipídica. (Figura 36)

Nas imagens de topografia obtida por AFM em amostras de DPPC/DOPC durante a reação de peroxidação lipídica mostradas na Figura 36, observa-se que o ataque preferencial acontece nas regiões de borda, regiões ricas em DPPC. A seqüência dos efeitos da peroxidação lipídica mostra o desaparecimento de varias regiões (borda) ricas com lipídeos em fase ordenada (gel), sendo que uma destas mudanças está indicada com a seta.

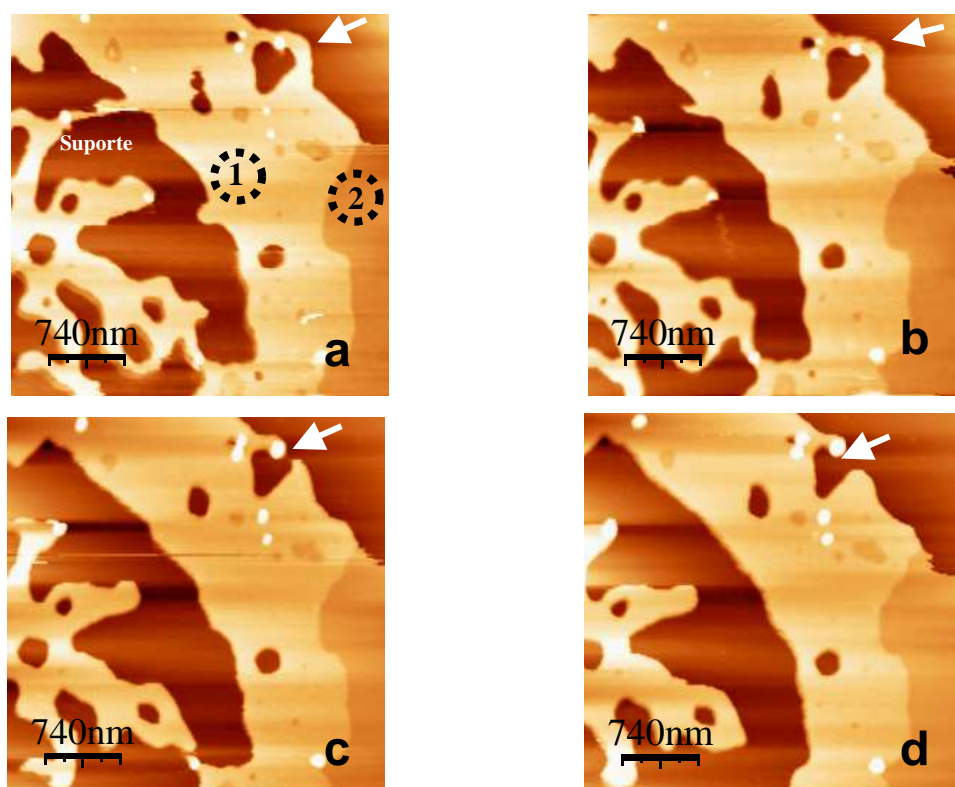


FIGURA 36 – Imagens de topografia de uma bicamada lipídica composta pela mistura DPPC/DOPC, onde observam-se regiões ricas em DPPC (1) com domínios de DOPC (2). (a) $t = 0$; (b) $t = 9$ min; (c) $t = 20$ min; (d) $t = 35$ min.

A destruição das regiões de borda na bicamada, provavelmente se deve por estarem presentes nestes fosfolídeos em fase líquida e estes possuírem insaturações na cadeia carbônica, alvos preferenciais para os ataques radiculares durante a reação de peroxidação.

Tem sido demonstrado na literatura, em filmes de bicamadas lipídicas, o ataque preferencial de fosfolipases (PLA₂) nas regiões de borda. Isto ocorre devido a facilidade da enzima promover a clivagem do seu alvo, que são os grupamentos glicéricos dos fosfolídeos, em relação às regiões centrais altamente organizadas na membrana.⁷

Nos resultados obtidos durante a peroxidação lipídica dos filmes, também observou-se o ataque preferencial em regiões de borda. (Figura 36)

A imagem apresentada na Figura 37, é de uma bicamada lipídica composta pela mistura de DPPC/DOPC onde observa-se uma grande região rica em DOPC e a formação de uma região rica em DPPC na qual foram evidenciados domínios mesoscópicos de DOPC. Estes dados são condizentes com a análise através de linhas de varredura na amostra, que forneceram as alturas das regiões de domínios e são em torno de 1 nm.

Observam-se os efeitos de uma reação de peroxidação em domínios de lípídeos em fase líquida, e sabe-se que estas reações ocorrem em lípídeos insaturados que formam estes domínios. Os resultados indicam que os danos oxidativos na bicamada levaram principalmente a uma reorganização estrutural, evidenciada principalmente em regiões de domínios de lípídeos em fase líquida (regiões ricas em lípídeos insaturados). No término da reação observa-se uma reorganização na estrutura lateral da bicamada.

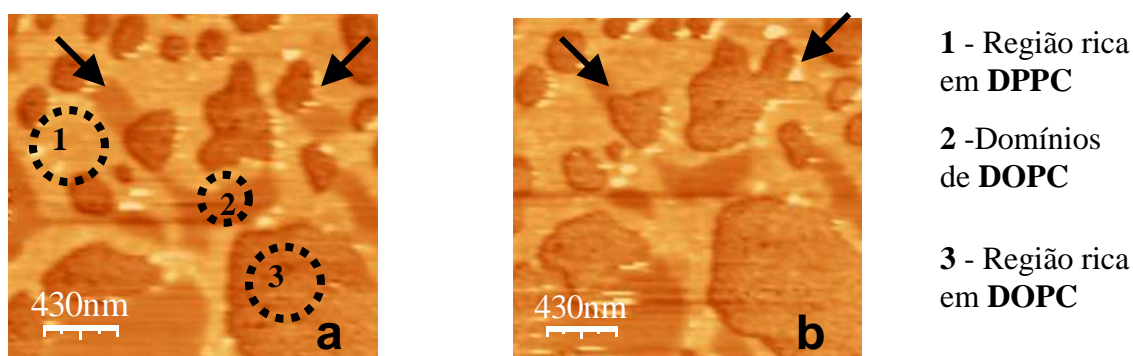
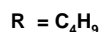
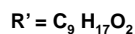
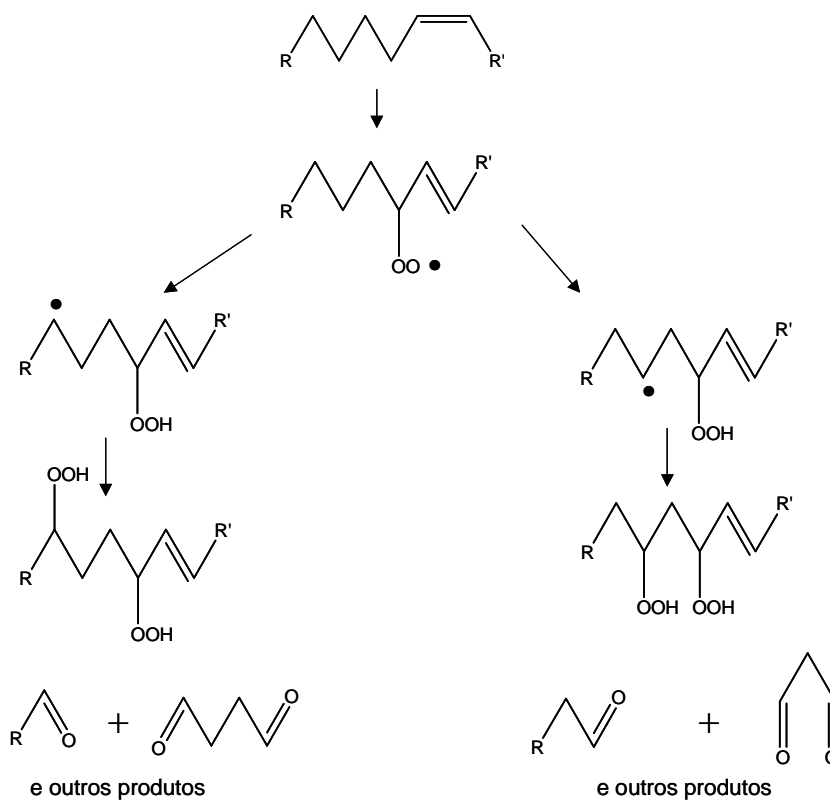


FIGURA 37 – Topografia da amostra na mistura DPPC/DOPC (a) Início da reação de peroxidação, $t = 0$; (b) $t = 30$ min.

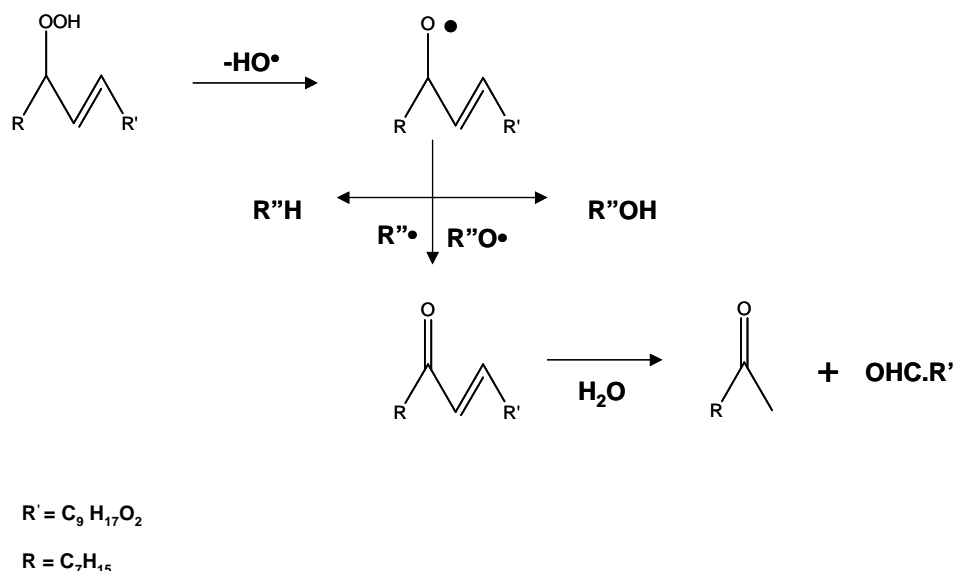
Como já foi mencionado, é conhecido que a oxidação dos ácidos graxos da membrana iniciada pela presença das EROs resulta na fragmentação de lipídeos com cadeia carbônica insaturada, produzindo resíduos de cadeia curta.¹²⁸

Na literatura, existem estudos que sugerem a formação de bis-hidroperóxidos como reação secundária da oxidação de oleatos, resultantes, por exemplo, da oxidação do oleato de metila, e que por sua vez são precursores de vários aldeídos de cadeia curta, incluindo o malonaldeído.¹²⁹ Os bis-hidroperóxidos resultam da abstração intramolecular de um hidrogênio proveniente de um carbono na posição β ou γ (Esquema 9).³²



ESQUEMA 9 – Produtos de reações secundárias, formados na oxidação do oleato de metila.³²

Além dos produtos formados por oxidação de ácidos graxos que foram discutidos até agora, ocorre também a produção de diversos ácidos de cadeia curta, álcoois e cetonas α,β -insaturadas que pode ser visto no Esquema 10.³²



ESQUEMA 10 – Formação de cetonas a partir da oxidação do oleato de metila.³²

Sugere-se que pelo fato de que durante uma reação de oxidação, na cadeia carbônica de um ácido graxo insaturado, uma grande quantidade de resíduos pode ser formada. Assim, poderão ocorrer defeitos nas bicamadas lipídicas.

Conforme mencionado, estes fenômenos foram visualizados neste trabalho através da microscopia de força atômica.

A próxima seqüência de imagens mostra a formação destes defeitos em filmes compostos pela mistura DPPC/DOPC, e comprova que através da formação de novas espécies químicas durante o processo de peroxidação lipídica, conforme previsto, podem ser observadas mudanças na morfologia dos filmes. Sabe-se que as regiões ricas pela presença de lipídeos em fase líquida (DOPC nesta amostra) tendem a esconder pequenos defeitos, como foi discutido no item 4.2, sobre a fluidez da fase líquida em uma bicamada lipídica (Figura 30, p. 59).

As reações de peroxidação que ocorreram, formaram um buraco na estrutura da bicamada lipídica. Porém, devido à presença de lipídeos em fase fluída este buraco foi rapidamente recoberto. (Figura 38)

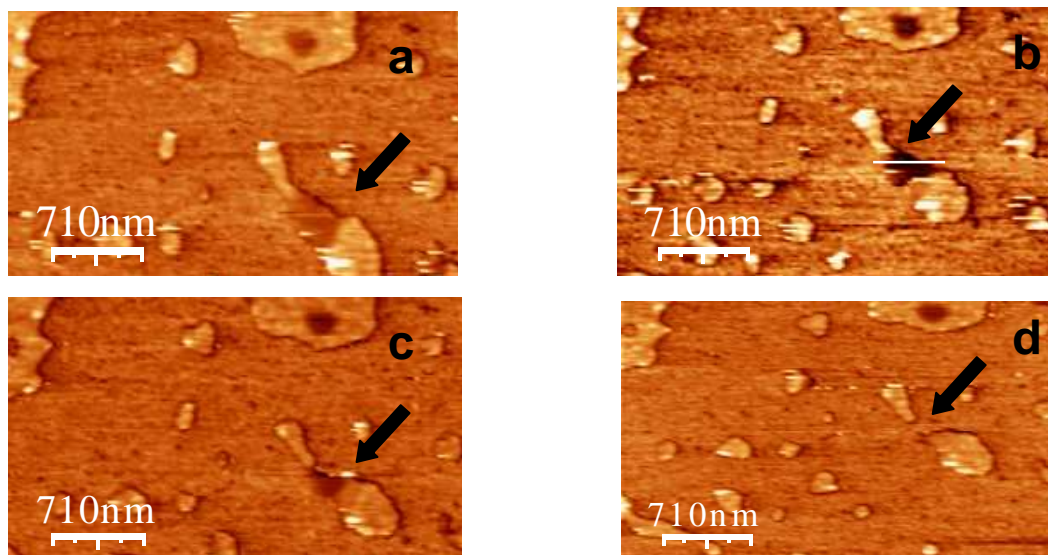


FIGURA 38 – Imagens de topografia de AFM mostrando a formação e fechamento de um buraco na bicamada (DPPC/DOPC) em região rica com o fosfolípídeo DOPC durante uma peroxidação lipídica, (a) $t = 0$, início do processo de peroxidação, (b) $t = 16$ min, formação de um buraco na bicamada, (c) $t = 26$ min, início do processo regenerativo da bicamada e, (d) $t = 34$ min, buraco completamente recoberto, (e) a varredura de linha mostra a altura do buraco formado na imagem em b.

Por outro lado, nem sempre a formação de defeitos na bicamada ocorreu em regiões ricas em fase fluída durante os experimentos.

A Figura 39, mostra uma seqüência de reações de peroxidação na bicamada lipídica composta pela mistura DPPC/PC. Foi observado durante a reação de peroxidação, a ocorrência de defeitos nas regiões ricas em lipídeos em fase gel. Devido ao fato dos lipídeos nestas regiões possuírem uma cadeia carbônica saturada e não terem a mesma mobilidade dos lipídeos em fase líquida, as modificações (buracos) na bicamada lipídica não foram recobertas como as que foram formadas nas regiões em fase líquida (mostradas na Figura anterior).

A Figura 39b, mostra que após uma reação de peroxidação lipídica apareceram buracos em regiões de domínios lipídicos ricos em fase gel, e também evidencia o desaparecimento destas regiões que inicia-se em regiões de fronteira entre as duas fases.

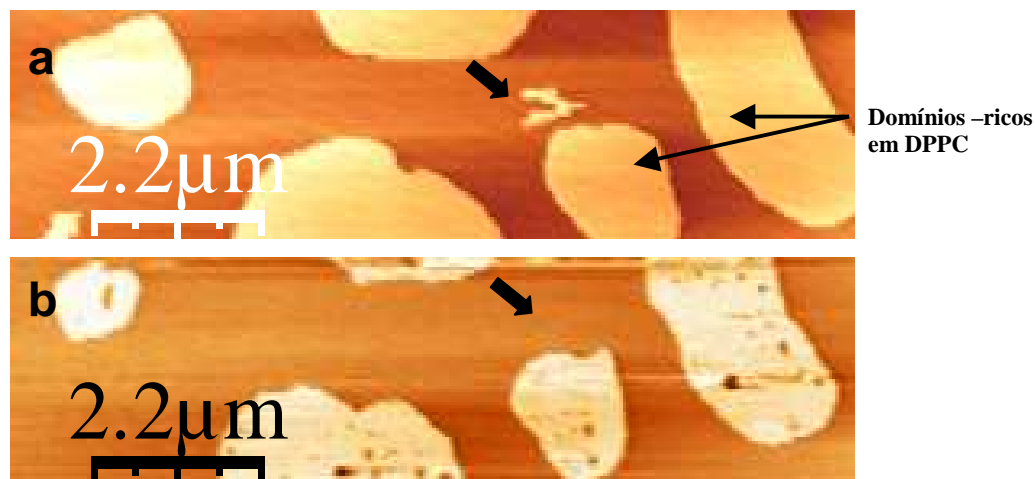


FIGURA 39 – Imagem de topografia de uma peroxidação lipídica (bicamada de DPPC/PC com regiões ricas com lipídeos de DPPC em evidência, regiões mais claras do filme) que mostra os danos causados na organização lipídica pelo ataque das EROs. (a) Início da reação $t = 0$; (b) modificações com formação de defeitos na organização lateral da bicamada lipídica ($t = 30$ min).

A Figura 40, mostra um ampliação de imagem da Figura anterior onde pode-se observar o desaparecimento de diversas regiões nanoscópicas dentro de regiões de domínios em fase gel.

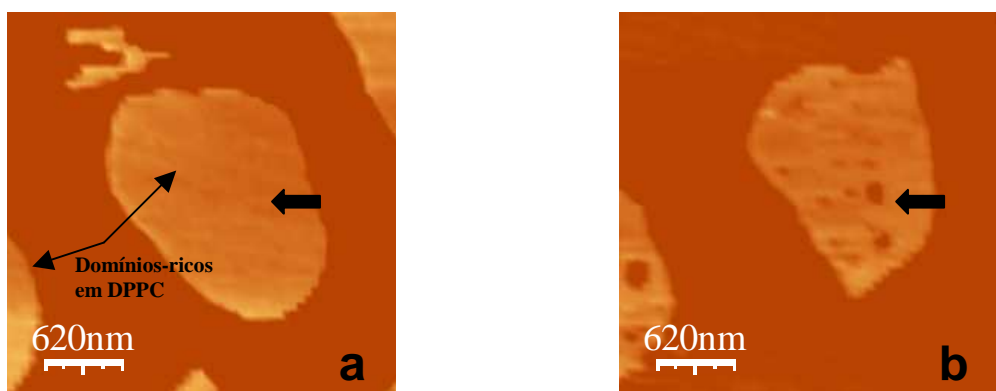


FIGURA 40– Imagem de topografia de AFM mostrando um ampliação em uma região da Figura 39b na amostra de DPPC/PC, sendo as regiões claras, domínios ricos em DPPC. (a) Início da reação ($t = 0$); (b) formação de defeitos na bicamada lipídica ($t = 30$ min).

Estas evidências experimentais sugerem a existência de domínios nanoscópicos de lipídeos em fase líquida dentro de regiões ricas em lipídeos em fase gel, através da evidência da peroxidação nestas regiões, aparentemente somente com lipídeos em fase gel, mas onde se observa o ataque de espécies reativas de oxigênio (Figura 40b).

Pode-se assim concluir que nas regiões de domínios ricos em DPPC vistos na Figura 40a provavelmente coexistam domínios nanoscópicos de lipídeos insaturados, mais susceptíveis à reações de peroxidação lipídica, pelo fato de se observar a formação de defeitos nos domínios de DPPC após a peroxidação lipídica. (Figura 40b)

A existência de domínios nanoscópicos de lipídeos em fase líquida coexistindo dentro de regiões ricas em fase gel, como foi discutido no capítulo de misturas lipídicas (p. 63) não tinha comprovação experimental pela microscopia de força atômica. A evidência da reação de peroxidação lipídica nestas regiões sugere a existência destes domínios.

Esta evidência experimental também satisfaz os efeitos mostrados e analisados nas Figuras anteriores quando ocorreram mudanças em regiões ricas em fase gel,. Que são compostas por lipídeos com cadeias carbônicas saturadas e, portanto onde não se esperaria que ocorressem mudanças na estrutura.

A literatura tem mostrado a coexistência de domínios nanoscópicos em membranas preparadas pela mistura de PLPC (1-palmitil-2-linoleil-fosfatidil colina) e diferentes quantidades de cardiolipina (tetra-acil-difosfatidilglicerol). Os resultados obtidos são uma evidência experimental da teoria do fenômeno da separação lateral de fases em misturas de fosfolipídeos com diferentes cadeias carbônicas.^{130,131}

Os estudos apresentados neste trabalho também estão de acordo com esta teoria, porque através de reações de peroxidação comprovou-se que domínios ricos em lipídeos com cadeia carbônica insaturada ou poliinsaturada realmente existiram nos filmes, devido a mudanças morfológicas em regiões específicas após a peroxidação lipídica.

Estes dados podem contribuir para o entendimento do mecanismo dos danos de uma peroxidação para as propriedades da membrana. Como consequência da oxidação, a auto-organização lipídeo-lipídeo se reorganiza em uma nova estrutura de diferente estado físico com desaparecimento de nanodomínios e de domínios microscópicos específicos.

Efeitos biológicos da ação de EROs podem ser considerados patológicos a nível molecular. Isto pode conduzir a uma perturbação das propriedades específicas que dependem, por exemplo, da conformação e organização das moléculas de lipídeo e

proteínas na membrana. Por outro lado, o processo de peroxidação lipídica pode também gerar uma heterogeneidade de produtos e conseqüentemente gerar novas separações de fase quando uma quantidade crítica de produto de reação se acumula na membrana. Neste trabalho, observou-se principalmente, através de análises de topografia, que mudanças induzidas através de reações de peroxidação em fosfolipídeos hidratados levaram a formação de novas estruturas desordenadas.

Resumindo, os resultados obtidos nas reações de peroxidação foram analisados através de diferenças na topografia da bicamada lipídica por evidências de mudanças na organização lateral de fases.

4.3.1.2 – Determinação da peroxidação lipídica por TBARS

O teste à substâncias reativas com o TBA (TBARS) realizado neste trabalho em amostras de lipossomas compostas pelo fosfolipídeo PC, DMPC, DPPC, DOPC. Observou-se a formação do produto obtido pela reação entre o MDA e o TBA em amostras de PC pela formação do produto colorido apresentado na equação 1, p.36, comprovando assim a eficiência do sistema que foi utilizado posteriormente na peroxidação lipídica em filmes fosfolipídicos desenvolvidos neste trabalho. Não foi observada a formação de MDA em reações de peroxidação lipídica com lipossomas de DPPC, DMPC e DOPC.

Sabe-se que a formação do MDA ocorre a partir das reações de cisão dos endoperóxidos formados na peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da cadeia de radicais peroxila.¹¹⁵ A comprovação da peroxidação lipídica pelo TBARS para lipossomas de PC se deve a presença de ácidos graxos com duas ou mais insaturações. Em PC, os ácidos linoléico (18:2) e araquidônico (20:4) são os que favorecem a formação do malonaldeído (MDA).^{110,115,116} No DOPC, a cadeia lateral possui uma insaturação e também pode ocorrer a formação do MDA em reações secundárias. Todavia não foi detectado por TBARS provavelmente pela baixa sensibilidade do método, mas a formação do MDA durante a oxidação do ácido oléico foi comprovada na literatura por análise de espectroscopia de massa.¹²⁹ O DMPC e o DPPC apresentam nas estruturas ácidos graxos saturados, portanto menos susceptíveis à reação de peroxidação.

2 – CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos pelo método de espalhamento de solução orgânica mostraram-se satisfatórios na formação de camadas de DMPC, DPPC e de sistemas com misturas lipídicas (DPPC/DOPC e DPPC/PC) sobre suportes hidrofílicos. Os aspectos morfológicos das camadas lipídicas dependem do tipo de lipídeo e do nível de hidratação do filme. Quando as amostras são imersas em solução líquida, observa-se uma reorganização do filme, e os filmes mostraram-se estáveis em medidas *in situ*.
- Nos estudos realizados em temperatura de transição de fase pode-se observar a mobilidade de regiões em fase líquida, e a detecção de diferentes fases lipídicas pela diferença nas alturas na bicamada lipídica. Observou-se a formação de domínios lipídicos tanto em análises *ex situ* como em análises *in situ*.
- Nas análises de peroxidação lipídica observou-se que o dano oxidativo iniciado pela reação do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) com o ácido graxo insaturado ou poliinsaturado do fosfolipídeo levou a fragmentação do ácido graxo em novos compostos. Quando diferentes compostos foram formados, estes causaram mudanças na organização lateral da bicamada lipídica. Quando estas mudanças ocorrem em regiões de fase líquida, o que normalmente se observa é a formação de defeitos na bicamada que desaparecem devido ao material fluído próximo ao defeito. Porém quando estes defeitos são formados em regiões de fase gel, sugere-se a existência de domínios nanoscópicos de lipídeos em fase líquida (lipídeos insaturados ou poliinsaturados). Os filmes permaneceram estáveis e puderam ser detectados através da microscopia de força atômica.
- As abordagens combinadas, utilizadas neste trabalho, AFM e peroxidação lipídica permitiram avaliações mecánísticas do comportamento de lipídeos considerando a formação de domínios, fenômenos de borda em camadas e transição de fase.
- Os possíveis produtos formados pelas lesões oxidativas nas membranas (em especial de PC) foram detectados por métodos espectrofotométricos.

6 - PERSPECTIVAS

Este trabalho pode contribuir no desenvolvimento de futuros estudos relacionados com mudanças em regiões de domínios lipídicos induzidas por reações de peroxidação lipídica das bicamadas.

Os filmes que foram desenvolvidos neste trabalho podem ser utilizados para a imobilização ou fixação de uma proteína de membrana como, por exemplo, canais iônicos ou anticorpos para o desenvolvimento de biossensores. Neste sentido, estudos futuros poderão ser desenvolvidos a partir desta primeira etapa, visando-se o desenvolvimento de biomateriais para nanobiotecnologia.

7 – BIBLIOGRAFIA

1. ADVANCED INFORMATION ON THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 8 october 2. Disponível em <http://www.kva.se> Acessada em: 12 de novembro de 2003.
2. GROVES, J. T.; ULMAN, N.; BOXER, S. G.; **Science**, 275, 651 (1997).
3. KOENIG, B. W.; KRUEGER, S.; ORTS, W. J.; MAJKRZAK, C. F.; BERK, N. F.; SILVERTON, J. V.; GAWRISCH, K.; **Langmuir**, 12, 1343 (1996).
4. DUFRÊNE, Y. F.; LEE, G.U.; **Biochim. Biophys. Acta**, 1509, 14 (2000).
5. SINGER, S.J. AND NICHOLSON, G.L.; **Science**, 175, 720 (1972).
6. CHAPMAN, D.; **Langmuir**, 9, 39 (1993).
7. GRANDBOIS, M.; CLAUSEN-SCHAUMANN, H.; GAUB, H.; **Biophys. J.**, 74, 2398 (1998).
8. TOKUMASU, F.; JIN, A. J.; DVORAK, J.A. ; **J. Electron Micros.**, 51, 1 (2002).
9. BRIAN, A. A. AND MACCONNELL H. M.; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81, 6159 (1984).
10. TRISTAM-NAGLE, S.; PETRACHE, H.I.; SUTER, R.M.; NAGLE, J.F.; **Biophys. J.**, 74, 1421 (1998).
11. SALDITT, T.; **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, 5, 19 (2000).
12. KATSARAS, J.; **Biophys. J.**, 75, 2157 (1998).
13. KUMAR, S. AND HOH, J. H.; **Langmuir**, 16, 9936 (2000).
14. WOODWARD J. T. AND SCHWARTZ, D.K., **J. Am. Chem. Soc**, 118, 7861 (1996).
15. WANG, L.; SONG, Y.; HAN, X.; ZHANG, B.; WANG, E.; **Chem. Phys. Lipids**, 123, 177 (2003).
16. REVIKINE, I.; SIMON, A. ; BRISSON, A.; **Langmuir**, 16, 1473 (2000).
17. VIÉ, V.; VAN MAU, N.; LESNIEWSKA, E.; GOUDONNET, J. P.; HEITZ, F.; LE GRIMELLE, C.; **Langmuir**, 14, 4574 (1998).
18. LAWRIE, G. A.; BARNES, G. T.; GENTLE, I. R.; **Colloids Surf. A**, 155, 69 (1999).

19. MURESAN, A . S. AND LEE, K. Y. C.; **J. Phys. Chem. B**, 105, 852 (2001).
20. POGLITSH, C.L. AND THOMPSON, N.L.; **Biochemistry**, 29, 248 (1990).
21. CULLISON, J.K.; HAWKRIDGE, F. M.; NAKASHIMA, N.; YOSHIKAMA, S.; **Langmuir**, 10, 877 (1994).
22. SACKMANN, E.; **Science**, 43, 271, (1996).
23. MOU, J.; CZAJKOWSKY, D. M.; ZHANG, Y.; SHAO, Z.; **FEBS Lett.**, 371, 279 (1995).
24. TERRETTAZ, S.; STORA, T.; DUSCHL, C.; VOGEL, H.; **Langmuir**, 9, 1361 (1993).
25. HOLLINSHEAD, C. M.; HANNA, M.; BARLOW, D. J.; DE BIASI, V.; BUCKNALL, D. G.; CAMILLERI, P.; HUTT, A . J.; LAWRENCE, M. J.; LU, J. R.; SU, T.J.; **Biochim. Biophys. Acta**, 49, 1511, (2001).
26. STRYER L.; **Biochemistry**, International Student Academic. Freeman (1988).
27. FUKADA, K.; GERSHFELD, N. L.; **J. Phys. Chem. B**, 41, 8225 (1997).
28. JIN, A.; EDIDIN, M.; NOSSAL, R.; GERSHFELD, N. L.; **Biochemistry**, 38, 13275 (1999).
29. ANDERSON, R.G.W AND JACOBSON, K.; **Science**, 296, 1821 (2002).
30. LUZZATI, V.; DEROUZS, M.; GULIK, A.; GAMBACORTA, A.; **Ann. Rev. Biophys. Chem.**, 16, 25 (1987).
31. DE KRUIJFF, B.; **Nature**, 329, 587 (1987).
32. GUNSTONE, F.D.; **An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides**, Richard Clay (The Chaucer Press) Ltd, Bungay, Suffolk (1967).
33. HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C.; **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press (1999).
34. HARBICH, W.; HELFRICH, W.; **Chem. Phys. Lipids**, 55, 191 (1990).
35. PRIEST, R.G; **Mol. Cryst. Liq**, 60, 167 (1980).
36. BERRIDGE, M. J. AND IRVINE, R. F.; **Nature**, 312, 315 (1984).
37. HUI, S. W.; VISWANATHAN, R.; ZASADZINSKI; J. A.; ISRAELACHVILI, J. N.; **Biophys. J.**, 68, 17 (1995).

38. ISRAELACHVILLI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W.; **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, 72, 2525 (1976).
39. CHUNG, H.; CAFFREY, M.; **Nature**, 368, 224 (1994).
40. KATSARAS, J.; JEFFREY, K. R; **Europhys. Lett**, 38, 43 (1997).
41. TIEN, H. T. AND OTTOVA-LEITMANNOVA, A.; **Planar Lipid Bilayer (BLMs) and their Applications**, H.T. Tien und A. Ottova-Leitmannova Editors, Elsevier, Amsterdam, 269 (2003).
42. LEE, C.; LIN, W; WANG, J.; **Opt. Eng.**, 40(10), 2077 (2001).
43. EXEROWA, D.; **Adv. Colloid Interface Sci.**, 96, 75 (2002).
44. XIE. A . F.; YAMADA, R.; GEWIRTH, A . A.; GRANICK, S.; **Phys. Rev. Lett.**, 89, 246103-1 (2002).
45. CULLIS, P. R.; HOPE, M. J.; TILCOCK, C. P. S.; **Chem. Phys. Lipids**, 40, 127 (1986).
46. CZAJKOWSKY, D. M.; HUANG, C.; SHAO, Z.; **Biochemistry**, 34, 12501 (1995).
47. KAASGAARD, T.; LEIDY, C.; CROWE, J. H. ; MOURITSEN, O.G.; JORGENSEN, K.; **Biophys. J.**, 85, 350 (2003).
48. SENGUPTA, K.; RAGHNATHAN, V. A.; KATSARAS, J.; **Phys. Rev. E**, 59, 2455 (1999).
49. MEYER, H. W.; DOBNER, B.; SEMMLER, K.; **Chem. Phys. Lipids**, 82, 179 (1996).
50. MAEDA, N.; SENDEN, T. J.; DI MEGLIO, J; **Biochim. Biophys. Acta**, 1564, 165 (2002).
51. HUANG C., LI S.; **Biochim. Biophys. Acta**, 1422, 273 (1999).
52. CAFFREY, M. AND HOGAN, J.; **Chem. Phys. Lipids**, 61, 1 (1992).
53. TOKUMASU, F.; JIN, A . J.; FEIGENSON, G. W.; DVORAK, J. A . ; **Ultramicroscopy**, 97, 217 (2003).
54. SCHENEIDER, J.; BARGER, W.; LEE, G. U.; **Langmuir**, 19, 1899 (2003).
55. VAN OUDENAARDEN, A.; BOXER, S. G. ; **Science**, 285, 1046 (1999).
56. WANG, L.; XIN-PU, H.; OTTOVA, A. TIEN, H. T.; **Eletrochem. Comm.**, 2, 287 (2000).

57. FANG, Y. AND YANG, J.; **Biochim. Biophys. Acta**, 1324, 309 (1997).
58. GLISS, C.; CLAUSEN-SHAUMANN, H.; GÜNTHER, R.; ODENBACH, S.; RANDI, O.; BAYERL, T.M.; **Biophys. J.**, 74, 2443 (1998).
59. KIRCHHAUSEN, T.; **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, 15, 705 (1999).
60. MURESAN, A. S.; DIAMANT, H.; LEE, K. Y. C.; **J. Am. Chem. Soc.**, 123, 6951 (2001).
61. RATTO, V. T. AND LONGO, M. L.; **Biophys. J.**, 83, 3380 (2002).
62. TIEN, H. T. AND SALAMON, Z.; **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 12, 478 (1990).
63. BLODGETT, K. A. AND LANGMUIR, I.; **Phys. Rev.**, 51, 964 (1937).
64. ULMAN, A.; **An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly**, United Kingdom Edition, Academic Press Limited, London (1991).
65. LABORATÓRIO DE BIOLOGIA. Disponível em: www.andrew.cmu.edu
Acessada em: 25 de novembro de 2003.
66. PUU, G. AND GUSTAFSON, I., **Biochim. Biophys. Acta**, 1327, 149 (1997).
67. REVIKINE, I. AND BRISSON, A.; **Langmuir**, 16, 1806 (2000).
68. SEUL, M. AND SAMMON, M. J.; **Thin Solid Films**, 185, 287 (1990).
69. NAGLE, J.; **Biophys. J.**, 64, 1476 (1993).
70. MENNICKE, U. AND SALDITT, T.; **Langmuir**, 18, 8172 (2002).
71. VOGEL, M.; MÜNSTER, C.; FENZE, W.; SALDITT, T.; **Phys. Rev. Lett.**, 84, 390 (2000).
72. TANG, Z.; JING, W.; WANG, E.; **Langmuir**, 16, 1696 (2000).
73. KATSARAS, J. AND RAGHUNATHAN, V. A.; **Aligned Lipid-Water Systems, in Lipid Bilayers: Structure and Interactions**. Ed. J. Katsaras and T. Gutberlet (springer, 2001) pp 25-45.
74. PERINO-GALLIA, L.; FRAGNETO, G.; MENNIKE, U.; SALDITT, T.; RIEUTORD, F.; **Eur. Phys. E**, 8, 275 (2002).
75. RAND, R. P. AND PARSEGAN, V.A. , **Biochim. Biophys. Acta**, 988, 351(1989).
76. NAGLE, J. F. AND KATSARAS, J.; **Phys. Rev. E**, 50, 7018 (1999).

77. GREGORY, B. W.; DLUHY, R. A.; BOTTOMLEY, L. A.; **J. Phys. Chem.**, 98, 1010 (1994).
78. TAMM, L.K.; TATULIAM, S. A.; **Biochemistry**, 32, 7720 (1993).
79. NOLLERT, P.; KIEFER, H.; JAHNIG, F., **Biophys. J.**, 69, 1447 (1995).
80. TAMM, L. K.; MCCONNELL, H. M.; **Biophys. J.**, 47, 105 (1985).
81. WU, Z.; TANG, J.; CHENG, Z.; YANG, X.; WANG, E.; **Anal. Chem.**, 72, 6030 (2000).
82. SEUL, M. AND EISENBERG, P.; **Phys. Rev. A**, 39, 4242 (1989).
83. BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER CH.; **Phys. Rev. Lett.**, 56, 930 (1986).
84. SHAO, Z. MOU, J. CZAJKOWSKY, D. M., YANG, J.; **Adv. Phys.**, 45, 1 (1996).
85. BALASHEV, K.; JENSEN, T. R.; JJAER, K.; BJORNHOLM, T.; **Biochemie**, 83, 387 (2001).
86. MOU, J.; CZAJKOWSKY, D. M.; ZHANG, Y.; SHAO, Z.; **FEBS Lett.**, 371, 279 (1995).
87. WEISENHORN. A. L., EGGER, M.; OHNESORGE, F.; GOULD, S. A. C. HEYN, S.P.; HANSMA, H.G., SINSHEIMER, R. L.; GAUB, H. E.; HANSMA, P. K.; **Langmuir**, 7, 8 (1991).
88. TILLMAN, N.; ULMAN, A.; PENNER, T. L.; **Langmuir**, 5, 101 (1989).
89. ATOMIC FORCE MICROSCOPY EQUIPAMENTS RESEARCH disponível em <http://www.jenck.com> . Acesso em: 05 de junho de 2002
90. BONNELL, D.A .; **Scanning tunneling microscopy and spectroscopy: theory, techniques and applications**, VCH Publishers, New York (1993).
91. LABORATÓRIO DE NANOSCOPIA disponível em <http://www.nanos.cbpf.br> . Acessada em: 15 de maio de 2002.
92. GARCIA, R.; PÉREZ, R.; **Surf. Sci. Rep.**, 47, 197 (2002).
93. SPANGENBERG, T. Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Physik, comunicação privada, Berlim (2003).
94. HAN, W.; LINDSAY, S. M.; JING, T.; **Appl. Phys. Lett**, 69(23), 4111(1996).
95. GRANT, A. AND MCDONNELL, L.; **Ultramicroscopy**, 97,177(2003).
96. KIENBERGER, F.; STROH, C.; KADA, G.; MOSER, R.; BAUMGARTNER, W.; PASTUSHENKO, V.; RANKL, C.; SCHMIDT, U.; MÜLLER, H.; ORLOVA, E.;

- LEGRIMELLE, C.; DRENCKHAHM, D.; BLAAS, D.; HINTERDORFER, P., **Ultramicroscopy**, 229, 237 (2003).
97. FOTIADIS, D.; SHEURING, S.; MÜLLER, S. A. ; ENGEL, A. ; MÜLLER, D. J.; **Micron**, 33, 385 (2002).
98. JONES, D. P.; **Ann. Ver. Physiol.**, 48, 33 (1986).
99. THOMAS, C.E AND KAKYANARAMAN, B.; **Oxygen Radicals and the Disease Process**, Edited by Craig E. Thomas and Balaraman Kakyanaraman; USA (1997).
100. LIOCHEV, S.; FRIDOVICH, I.; **Redox. Report**, 7, 55 (2002).
101. DUNFORD, H. B.; **Coord. Chem. Rev.**, 233-234, 311 (2002).
102. BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87, 1620 (1990).
103. SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W.; **Free Rad. Res, Commun.**, 10, 221 (1990).
104. KLOTZ, L.O.; SCHROEDER, P.; SIES, H.; **Free. Rad. Biol. Med.**, 33(6), 737 (2002).
105. STADTAMN, E. R.; **Science**, 257, 1120 (1992).
106. SIES, H.; **Eur. J. Biochem.**, 215, 213 (1993).
107. HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, M.C.; **FEBS Letters**, 128, 347 (1981).
108. MENEGHINI, R.A; A Toxidade do Oxigênio, **Ciência Hoje**, 5, no 28, 56 (1987). SBPC. São Paulo.
109. MOLSSEN, M.T.; SMITH, C.V.; **Free Radical Mechanism of Tissue Injury**, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA (1992).
110. PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J.; **Free Radicals, a practical approach**, Oxford University Press Inc., New York (1996).
111. WAGNER, A. B.; BUETTNER, G. R.; BURNS, P.; **Biochemistry**, 33, 4449 (1994).
112. REITER, R.J.; **Prog. Neurobiology**, 56, 359 (1998).
113. KEHRER, J. P.; **Crit. Rev. Toxicol.**, 23, 21 (1993).
114. FRANKEL, E.N. AND NEFF, W.E.; **Biochim. Biophys. Acta**, 754, 264 (1983).
115. PRYOR, W.A.; STANLEY, J.P.; BLAIR, E., **Lipids**, 11, 370 (1976).

116. ESTERBAUER, H; JURGENS, G. M.; QUEHENBERG, O .; KOLNER, E.; **J. Lipid Res.**, 28, 485 (1987).
117. VAN KUIJK, F.J.G.M.; HOLTE, L.L.; DRATZ, E.A.; **Biochim. Biophys. Acta**, 1043, 116 (1990).
118. BENEDETTI, A.; COMPORTI, M.; FULCERI, R.; ESTERBAUER, H.; **Biochim. Biophys. Acta**, 792, 172 (1984).
119. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C; **Arch. Biochem. Biophys.**, 219:1, 14 (1986)
120. YAGI, K.; **Chem. Phys. Lipids**, 45:337, 351 (1987).
121. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C.; ARUOMA, O.I.; **Anal. Biochem.**, 165, 215 (1987).
122. HIGASHI, G.S.; CHABAL, Y.J.; TRUCKS, G.W.; RAGHAVACHARI, K.; **Appl. Phys. Lett.**, 56, 656 (1990).
123. MORITA, Y.; TOKUMOTO, H.; **Appl. Phys. Lett.**, 67, 2654 (1995).
124. AVANTI POLAR LIPIDS, disponível em www.avantipolarlipids.com acessada em 30 de junho de 2003.
125. LIN, V. S.Y.; MOTESHAREI, K.; DANCIL, K. S.; SAILOR, M. J.; GHARDIRI, M. R.; **Science**, 278, 840 (1997).
126. SHIBATA-SEKI, T.; MASAI, J.; TAGAWA, T.; SORIN, T.; KONDO, S.; **Thin Solid Films**, 273, 297 (1996).
127. EGAWA, H. AND FURUSAWA, K.; **Langmuir**, 15, 1660 (1999).
128. MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S. M.; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, 2004 (1986).
129. LIU, J.; YEO, H. C.; DONIGER, S. J.; AMES, B. N.; **Anal. Biochem.**, 245, 161 (1997).
130. VALDRÈ, G.; ALESSANDRINI, A.; MUSCATELLO, U.; VALDRÈ, U.; VANNINI, V.; **Philos. Mag. B**, 79, 1 (1999).
131. IPSEN, J. H.; AND MOURITSEN, O. G.; **Biochim. Biophys. Acta**, 944, 121 (1988).