



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

ANDERSON AKIRA ARIMA

**Estudo da interação da Natamicina com membranas fosfolipídicas
incorporadas de esteróis**

BAURU

2014

ANDERSON AKIRA ARIMA

**Tese apresentada como requisito à
obtenção do título de Doutor à
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Materiais, sob a orientação do Prof. Dr.
Eduardo René Pérez González**

Bauru

2014

Arima, Anderson Akira.

Estudo da interação da natamicina com membranas fosfolipídicas incorporadas de esteróis / Anderson Akira Arima, 2014

177 f. : il.

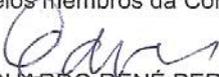
Orientador: Prof. Dr. Eduardo René Pérez González

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2014.

1. Natamicina. 2. Colesterol. 3. Ergosterol. 4. Filmes de Langmuir. 5. Lipossomos. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDERSON AKIRA ARIMA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 26 dias do mês de março do ano de 2014, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-graduação/FC, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Profa. Dra. AGNIESZKA JOANNA PAWLICKA MAULE do(a) Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos - UNESP, Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de ANDERSON AKIRA ARIMA, intitulado "Estudo da interação da natamicina com membranas fosfolipídicas incorporadas de esteróis". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: _____
APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ


Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO


Profa. Dra. AGNIESZKA JOANNA PAWLICKA MAULE


Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI


Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela vida, pela família (Roberto, Hilda e Andressa) e pela fiel companheira (Silvana) com as quais me presenteou.
- Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa tese. Em especial, ao prof. Dr. Eduardo R. P. González (Dudu) pela orientação e amizade; ao Dr. Felipe J. Pavinatto e ao prof. Dr. Antonio J. Costa-Filho (Jabá) pelas supervisões e pelos conselhos; ao prof. Dr. Osvaldo N. Oliveira Jr. (Chu) e ao prof. Dr. Otaciro R. Nascimento por permitirem o uso da excelente infraestrutura de seus respectivos grupos de pesquisa; à prof.^a Leila A. Chiavacci e à prof.^a Marisa V. Capela pelas supervisões durante o estágio de docência; aos que muito me ensinaram e/ou me acolheram nesses últimos anos: prof. Dr. Roberto M. Fernandez, prof. Dr. Carlos F.O. Graeff, prof. Dr. Paulo N. L. Filho, prof. Dr. Luiz C. Silva Filho, prof. Dr. André S. Pupo, Rafael G. Mendes (Druida), Luís G. M. Basso (Militar), Patrícia M. Kumagai (Paty), Nathalya Mesquita (Nathy), Derminda I. Moraes (Bel), José F. Lima, Andressa P.A. Pinto, Luís F. Mendes, Vananélia P.N. Geraldo (Vana), Adriano L. Souza, Adriana P. Costa, Thiers M. Uehara, Thatyane M. N. Pavinatto, Rafaela C. Sanfelice, Andrey C. Soares, Bruno B. M. Torres, Débora T. Balogh, Rafael D. Espírito Santo (Rafa), Fernanda S. Pereira (Fer), Carlos A.Z. Basseto Jr., Guilherme Ferreira; às secretárias da seção de pós-graduação (Andressa, Gethiely, Denise, Caroline e Simone) e à CAPES pelo apoio financeiro.
- Agradeço aos novos amigos e aos antigos que me acompanham.

DEDICATÓRIA
À memória de
Prof.^a Dr.^a ELZIRA YOKO UYENO

*“A felicidade não está em fazer o que a gente quer,
mas sim em querer o que a gente faz.”*
(Jean-Paul Sartre)

RESUMO

ARIMA, A. A. **Estudo da interação da Natamicina com membranas fosfolipídicas incorporadas de esteróis**. 2014. 177 p. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais - Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Bauru, 2014.

A natamicina (pimaricina) é um antifúngico de amplo espectro de ação, o qual já vem sendo empregado tanto como conservante alimentar, como no tratamento de infecções fúngicas superficiais. Embora esse antibiótico natural venha sendo isolado a partir de bactérias do solo (*Streptomyces sp.*) desde 1950, o seu mecanismo de ação ainda continua desconhecido. Por essa razão, neste estudo nós investigamos o efeito desse antibiótico em dois tipos de membranas modelo: filmes de Langmuir (monocamadas) e vesículas multilamelares (lipossomos). Os resultados obtidos foram correlacionados com o mecanismo de ação da natamicina em membranas biológicas. Nos estudos envolvendo monocamadas, os efeitos da natamicina sobre as propriedades mecânicas, a morfologia e a organização molecular desses sistemas foram analisados, respectivamente, através das isotermas de compressão, microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e Espectroscopia de Absorção-Reflexão Infravermelha com Polarização Modulada (PM-IRRAS); ao passo que a influência da natamicina sobre a organização e as transições de fase dos lipossomos foram monitoradas através da Ressonância Paramagnética Eletrônica e da Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), respectivamente.

Palavras-chave: Natamicina; Colesterol; Ergosterol; Filmes de Langmuir; Lipossomos.

ABSTRACT

ARIMA, A. A. **Study of the interaction of natamycin with phospholipid membranes incorporated by sterols.** 2014. 177 p. Doctoral Thesis – Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais - Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Bauru, 2014.

Natamycin is a broad spectrum antifungal, that due to its low oral and topical absorption, it already has been used both for food preservative and in the treatment of superficial mycoses. Although this natural antibiotic has been isolated from soil bacteria of genus *Streptomyces* since 1950, its mechanism of action on lipid environment of biomembranes has not been investigated enough. For this reason, in this study we investigated the effects of this antibiotic on two types of lipid model membranes — Langmuir films (monolayers) and multilamellar vesicles (liposomes) — and the obtained results were correlated with its mode of action on biomembranes. For monolayer models, the effect of natamycin on their mechanical properties, morphology and molecular organization were analyzed by, respectively, surface pressure isotherms, Brewster angle Microscopy (BAM) and Polarization-Modulation Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS); while the influence of natamycin on the lipid organization and the thermal properties for liposomes were characterized by, respectively, Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Keywords: Natamycin; Cholesterol; Ergosterol; Langmuir films; Liposomes

LISTA DE ABREVIATURAS

Materiais

- **COL** - Colesterol (*esterol de mamífero*)
- **CSL** - Colestano (*marcador de spin*)
- **DOPC** - Dioleoil Fosfatidil Colina (“Dioleoyl Phosphatidyl Choline”)
- **DOTAP** - Dioleoil Trimetil Amônio Propano (“Dioleoyl Trimethyl Ammonium Propane”)
- **DPPC** - Dipalmitoil Fosfatidil Colina (“Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline”)
- **DOPTC** - Dioleoil Fosfatidil(Tempo)Colina (“Dioleoyl Phosphatidyl Tempo Choline”) (*marcador de spin*)
- **DPPG** - Dipalmitoil Fosfatidil Glicerol (“Dipalmitoyl Phosphatidyl Glycerol”)
- **ERG**- Ergosterol (*esterol de fungo*)
- **n-PCSL**- 1-palmitoil-2(n-doxil estearoil) Fosfatidil Colina (onde n=5,14 e 16 corresponde ao n^o carbono marcado) (*marcador de spin*)
- **MLV** - Vesículas multilamelares lipídicas (“Multilamellar Lipid Vesicles”)
- **NAT** - Natamicina (*antifúngico macrolídeo poliêno*)
- **POPA** - Palmitoiloleoil Fosfatídico (“Palmitoyloleoil Phosphatidic Acid”)

Técnicas

- **BAM** - Microscopia de ângulo de Brewster (“Brewster Angle Microscopy”)
- **DSC** - Calorimetria Diferencial de Varredura (“Differential Scanning Calorimetry”)
- **EPR** - Ressonância Paramagnética Eletrônica (“Electron Paramagnetic Resonance”)
- **PM-IRRAS** – Espectroscopia de reflexão-absorção infravermelha com modulação da polarização (“Polarization-Modulation Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy”)

Símbolos

- **A₀** - Área média molecular [Å²]
- **A_{exc}** - Área média molecular em excesso [Å²]
- **C_s⁻¹** - Módulo de compressibilidade [mN/m]
- **π** - Pressão de superfície [mN/m]
- **X_{COL}** - Teor de colesterol [% mol]
- **γ** - Tensão de superfície [mN/m]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Diferentes formas (disco, bastão e arco) para as moléculas constituintes dos cristais líquidos termotrópicos e (B) exemplo de fases líquido-cristalinas termotrópicas para uma molécula do tipo bastão em função do aumento da temperatura. Fonte: elaborado pelo autor. Ilustrações mais completas referentes às anisotropias moleculares, assim como das mesofases formadas, podem ser encontradas em publicações que abordem os cristais líquidos em geral. (*Gennes e Prost, 1993; Demus et al., 1998; Singh, 2002; Khoo, 2007; Blinov, 2011*) 23

Figura 2 – Ilustração do fenômeno da birrefringência característica de materiais líquido-cristalinos termotrópicos: na ausência de campo elétrico o material polariza a luz na direção ortogonal ao plano de incidência, porém, se um campo elétrico aplicado é aplicado no sentido de propagação da luz, nenhuma alteração sobre o plano de polarização da luz é produzida. Fonte: figura adaptada de Nobelprize.org. (*Web Page 1*)..... 24

Figura 3 – Ilustração de (A) uma molécula anfifílica e (B) dos fenômenos: (II) adsorção numa interface gás-líquido (meios 1-2), (III) micelização, (IV) formação de mesofases líquido-cristalinas liotrópicas complexas e (V) cristalização a partir de monômeros de moléculas anfifílicas (I) dissolvidas em solução. As cabeças dos monômeros são hidrofílicas e as caudas hidrofóbicas. O meio 1 é apolar e o meio 2, polar. Fonte: elaborado pelo autor. Ilustrações e informações mais detalhadas desses fenômenos podem ser encontradas em publicações na área de colóides e interfaces. (*Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Myers, 1999; Butt et al., 2003; Platikanov e Exerowa, 2009; Cosgrove, 2010*) 25

Figura 4 – Ilustração de algumas mesofases líquido-cristalinas liotrópicas que podem ser observadas para os colóides de associação. As fases (A), (C), (E) e (F) formam-se em dispersantes polares, enquanto as demais (B), (D) e (F) em dispersantes apolares. Fonte: elaborado pelo autor. Ilustrações dessas estruturas podem ser encontradas em publicações relacionadas aos cristais líquidos liotrópicos (*Friberg, 1976; Seddon e Templer, 1995; Neto e Salinas, 2005*) ou a colóides e interfaces (*Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Butt et al., 2003; Cosgrove, 2010*). 27

Figura 5 – Fotografias dos pesquisadores pioneiros nos estudos dos filmes monomoleculares na interface ar-água: (A) Agnes Pockels, (B) Irving Langmuir e (C) Katherine Blodgett. Fonte: *Roberts (1990)*..... 28

Figura 6 – Ilustração simplificada (A) de uma cuba de Langmuir e de um filme de Langmuir na interface ar-água, (B) da técnica de espalhamento (“spreading”) sobre a superfície da subfase do composto de interesse dissolvido num solvente volátil e (C) do arranjo molecular do composto (monocamada) na interface ar-água após a evaporação do solvente: regiões hidrofílicas orientadas a favor do líquido (subfase), enquanto as hidrofóbicas a favor do meio gasoso (ar). Fonte: elaborado pelo autor. 30

Figura 7 – Ilustração da organização da membrana biológica no modelo de “mosaico fluido” sugerido por S.J. Singer e Garth Nicolson. (*Singer e Nicolson, 1972*) 32

Figura 8 – Ilustração da (A) geometria (“envelope”) molecular para lipídios com diferentes relações entre a área ocupada pelas cabeças (polares) e as caudas (hidrofóbicas) e das (B) mesofases favorecidas para cada geometria. Fonte: elaborado pelo autor. Figuras semelhantes podem ser encontradas em publicações referentes aos colóides e às interfaces. (*Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Butt et al., 2003; Vance e Vance, 2008; Cosgrove, 2010*) 34

Figura 9 - Ilustração da estrutura básica das membranas biológicas: bicamada lipídica (folheto duplo) incorporada de proteínas integrais. As proteínas periféricas não atravessam a bicamada, ao contrário das integrais. As regiões hidrofílicas e hidrofóbicas estão indicadas. Os carboidratos também estão presentes, mas encontram-se associados a proteínas (glicoproteínas) ou a lipídios (glicolipídios). Fonte: figura adaptada de *Lodish et al. (2004)*..... 35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 10- Ilustração da estrutura do glicerofosfolípido 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina ou fosfatidilcolina (PC). As numerações indicadas referem-se aos 3 carbonos pertencentes ao grupo glicerol (1,2,3-propanotriol). O grupo colina (caixa com linha sólida) e outros grupos álcoois são listados. Os nomes em parênteses referem-se à nomenclatura adquirida pelo lipídio devido à ligação do novo grupo álcool. Fonte: figura editada de *Vance e Vance (2008)*. 36
- Figura 11 – Ilustração da estrutura química do esteroide colesterol. Um esteroide é uma molécula com núcleo esteroidal (região em vermelho com carbonos numerados) na qual um grupo hidroxila (em azul) e uma cadeia hidrocarbônica estão presentes, respectivamente, no C-3 e no C-17. Fonte: Wikiciências (*Web Page4*). 37
- Figura 12 – Ilustração dos transportes passivos e ativos através da membrana plasmática. Fonte: figura adaptada de *Guyton e Hall (2006)*. 38
- Figura 13 – Ilustração da estrutura vesicular lipídica e seus diferentes tipos: multilamelares (MLVs), unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles -LUVs) e unilamelares pequenas (Small Unilamellar Vesicles - SUVs). Fonte: elaborada pelo autor. 40
- Figura 14- Ilustração do processo de formação de vesículas multilamelares (MLVs) a partir da hidratação (dispersão lipídica em água) de filmes lipídicos. O processamento das MLVs (Extrusão ou Sonicação) produz vesículas unilamelares. Fonte: figura adaptada de *Avanti Polar Lipids (Web Page 5)*. 41
- Figura 15- Ilustração dos diferentes modos de interação entre moléculas com lipossomos. Fonte: figura elaborada pelo autor e inspirada em *Kulkarni (2010)*. 42
- Figura 16 – Ilustração das diferentes mesofases líquido-cristalinas para estruturas lamelares lipídicas: (A) fase rígida $L\beta$, (B) fase de transição “ripple” e (C) fase fluida $L\alpha$. Fonte: figura adaptada de *Neto e Salinas (2005)*. 43
- Figura 17 – Ilustração do arranjo de (A) 3 moléculas com cadeias hidrocarbônicas saturadas (conformação *trans*), e de (B) 3 moléculas sendo apenas uma delas com cadeia hidrocarbônica insaturada (conformação *cis*). Fonte: figura adaptada de *Lodish et al. (2004)*. 44
- Figura 18: Ilustração da estrutura química dos antibióticos macrolídeos poliênicos: (A) anfotericina B, (B) nistatina e (C) natamicina (pimaricina). As caixas em linhas tracejadas indicam a estrutura do grupo amino-açúcar (micosamina) que é comum a todas as moléculas mostradas. Fonte: elaborada pelo autor. 47
- Figura 19 – Ilustração da estrutura química do antibiótico *natamicina* e dos lipídios *colesterol*, *ergosterol*, 1,2-dioleoil-fosfatidilcolina (*DOPC*), 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina (*DPPC*), 1,2-dipalmitoil-fosfatidilglicerol (*DPPG*), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatídico (*POPA*) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (*DOTAP*). 52
- Figura 20 – Ilustração dos marcadores de spin colestanos (*CSL*), dioleoilfosfo(tempo)colina (*DOPTC*), 5-(doxyl)fosfocolina (*5-PC*), 14-(doxyl)fosfocolina (*14-PC*) e 16-(doxyl)fosfocolina (*16-PC*). As caixas tracejadas indicam a presença do radical livre. 53
- Figura 21- Ilustração dos níveis de energia adquiridos devido à interação Zeeman ($m_s=+1/2$) e hiperfina ($m_f=+1, 0, -1$) típicas de um radical nítrógeno onde $S=1/2$ e $I=1$. As transições de energia permitidas estão indicadas e só ocorrem para $\Delta m_f=0$. Fonte: figura adaptada de *Brustolon e Giamello (2009)*. 56
- Figura 22 – Diagrama de blocos do espectrômetro de EPR: ponte, cavidade ressonante, magneto e espectro de EPR. Fonte: figura adaptada de *Brustolon e Giamello (2009)*. 57
- Figura 23 - Exemplo de espectros de movimento rápido obtidos para o radical nítrógeno: (a) espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro de absorção. Fonte: elaborada pelo autor. 58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 24- Ilustração esquemática de um espectro isotrópico mostrando os picos baixo ($m=+1$), central ($m=0$) e alto ($m=-1$) e suas respectivas alturas (h) e larguras (Δh). Fonte: elaborada pelo autor. 59
- Figura 25- Ilustração esquemática de um aparelho de DSC de compensação de potência: duas células (uma para a amostra e outra para a referência) contendo resistências e sensores de temperatura individuais. A temperatura entre as células é mantida invariável durante um resfriamento ou aquecimento das células através de variações na potência da resistência da amostra. Fonte: figura adaptada de *Menczel e Prime (2009)*. 62
- Figura 26- Ilustração de um perfil calorimétrico contendo um processo endotérmico e outro exotérmico para uma mesma amostra. A primeira estrutura (pico) corresponde a um aumento do calor específico e, portanto, refere-se a uma transição típica de um estado mais organizado para um menos organizado. A segunda estrutura (vale) corresponde à perda de calor específico pela amostra, isto é, perda de solvatação (recristalização), referindo-se a uma transição de um estado menos organizado para um mais organizado. Fonte: figura adaptada de *Gabbott (2008)*..... 63
- Figura 27- Ilustração esquemática de um perfil calorimétrico de uma transição endotérmica para um sistema lipídio-água. Os parâmetros T_{on} , T_m e T_{off} correspondem às temperaturas de início, de fase principal e do final de transição, respectivamente. A área abaixo da curva correspondente a energia principal absorvida na transição (ΔH). Fonte: figura adaptada de *Chapman et al. (1974)*. 64
- Figura 28 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). ... 69
- Figura 29 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). As setas pretas indicam regiões espectrais modificadas 69
- Figura 30 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 70
- Figura 31 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 70
- Figura 32 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). ... 71
- Figura 33 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). As setas pretas indicam regiões espectrais modificadas. 72
- Figura 34 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). As setas pretas indicam regiões espectrais modificadas. 72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 35 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]=100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 73
- Figura 36 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro em 10 mM de tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 76
- Figura 37 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA/Colesterol (1:1) em 10 mM tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 77
- Figura 38 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA/ Ergosterol (1:1) em 10 mM tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 78
- Figura 39 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro em 100 mM de tampão fosfato mono/dibásico, pH=5,0 e [NaCl]=100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 79
- Figura 40 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA / Colesterol (1:1) em 100 mM de tampão fosfato mono/dibásico, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 80
- Figura 41 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA/ Ergosterol (1:1) em 100 mM de tampão fosfato mono/dibásico, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). 81
- Figura 42 - Valores médios para a razão entre as alturas das linhas de campo baixo e central (h_{+1}/h_0) em função da temperatura referentes aos espectros de EPR obtidos para o marcador 16-PC incorporado em MLVs de POPA puro, POPA/Colesterol (1:1) ou POPA/Ergosterol (1:1) na presença ou ausência de 20% mol de natamicina (A) em 10 mM de tampão HEPES ([NaCl]=100mM); (B) em 100mM de tampão fosfato mono/dissódico e ([NaCl]=100mM). Erros inferiores a 5%. 83
- Figura 43 – Perfis calorimétricos para as MLVs de DPPC na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina. 84
- Figura 44 – Perfis calorimétricos para as MLVs de DPPC/colesterol (4:1) na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina. 85
- Figura 45 – Perfis calorimétricos para as MLVs de DPPC/ergosterol (4:1) na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina. 85
- Figura 46 - Termogramas de DSC para MLVs de DPPG ou DPPG/Esterol (4:1) na ausência (preto) e na presença de 20% mol de natamicina. O gráfico (A) corresponde aos perfis calorimétricos, enquanto em (B) são mostrados os Integrais (entalpia) dos perfis apresentados em (A). 87
- Figura 47- Ilustração da estrutura química do antibiótico *natamicina*, do estero *colesterol* e do fosfolípido 1,2-dipalmitoil-fosfolcolina (*DPPC*). Fonte: elaborado pelo autor. 99
- Figura 48 – Ilustração (A) de uma isoterma de compressão (pressão de superfície vs. Área por molécula) e (B) das transições de fase que ocorrem durante a compressão da monocamada: G= fase gasosa, LE= fase líquida-expandida, LC=fase líquida-condensada, C=fase condensada, X=colapso. A área extrapolada (a_{ext}) corresponde

LISTA DE FIGURAS

- a área média molecular medida na fase condensada ou na fase líquida condensada. Fonte: elaborada pelo autor. Ilustrações semelhantes podem ser encontradas em publicações relacionadas a interface gás-líquido. (Roberts, 1990; Petty, 1996; Adamson e Gast, 1997; Lyklema et al., 2000) 103
- Figura 49 – Fotografia da mini cuba de Langmuir KSV empregada para a obtenção das monocamadas lipídicas. Fonte: elaborado pelo autor..... 105
- Figura 50 – Ilustração de um feixe de luz p-polarizado incidente com um ângulo α em uma (A) interface ar-água limpa, na qual α é o ângulo de Brewster e a ausência da reflexão é o ângulo de Brewster e a ausência da reflexão é característica; (B) interface ar-água recoberta por uma monocamada (filme), na qual o ângulo α deixa de ser o ângulo de Brewster e a ocorrência do fenômeno da reflexão pode ser notada. Os termos n_1, n_2 e n_{FILME} indicam que o índice de refração, respectivamente, para o meio ar, água e filme (monocamada) são distintos. Fonte: elaborada pelo autor. 108
- Figura 51 – Fotografia do sistema BAM2Plus (Nano Film Technology, Alemanha) empregado para a microscopia de ângulo de Brewster (BAM). Fonte: elaborado pelo autor..... 110
- Figura 52 – Ilustração da relação entre a orientação do momento dipolo de transição (M) na interface ar(n_1)-água(n_2) e o sinal das bandas de absorção nos espectros de PM-IRRAS: (A) banda positiva com M orientado paralelo a superfície, (B) banda negativa quando M orientado normal a superfície e (C) ausência de banda, quando M orientado com ângulo de Brewster em relação a superfície. Fonte: elabora pelo autor e inspirada em Zheng e Leblanc (2007). 113
- Figura 53 – Fotografia de um sistema PMI 550 KSV (fonte de luz infravermelha e detector) acoplado a uma mini cuba de Langmuir. Fonte: figura adaptada de KSV NIMA (Web Page 6). 114
- Figura 54- Espectro UV-Visível obtido para 3 concentrações distintas de natamicina em água ultrapura: 0.04g/L (linha vermelha), 0.02g/L (linha preta) e 0.01g/L (linha verde). As bandas entre 280nm e 320nm são típicas de moléculas tetraênicas, enquanto a banda em 220nm (enona) é característica da molécula de natamicina. .. 115
- Figura 55 – Cinética de adsorção da natamicina numa interface ar-água limpa. A atividade interfacial da natamicina foi estudada empregando-se como subfase água ultrapura (pH 5.8) à 21°C na presença de 0,15µM (linha verde), 0,3µM (linha vermelha) ou 0,6µM (linha lilás) de natamicina solubilizada. 117
- Figura 56 – Cinética de adsorção da natamicina numa interface ar-água recoberta por uma monocamada de DPPC estabilizada para dois valores distintos de pressão inicial de superfície (5mN/m e 13mN/m). A atividade interfacial da natamicina foi testada empregando-se como subfase água ultrapura (pH 5.8) à 21 °C na ausência (linha preta) e na presença de 0,3 µM (linha vermelha) ou 0,6µM (linha lilás) de natamicina. 118
- Figura 57 – Cinética de adsorção da natamicina numa interface ar-água recoberta por uma monocamada de colesterol formada inicialmente para um valor de pressão de superfície correspondente a 11mN/m. A atividade interfacial da natamicina foi testada empregando-se como subfase água ultrapura (pH 5.8) à 21 °C na ausência (linha preta) ou na presença de (0,6µM) de natamicina, a qual foi injetada (linha lilás) ou previamente solubilizada (linha vermelha). 120
- Figura 58 – (A) Isotermas de compressão (Pressão de superfície vs. área média molecular) para monocamadas de DPPC e de colesterol na interface ar-água. A subfase utilizada foi água ultrapura, pH = 5,8, T = 21 °C, com ou sem a adição de natamicina. (B) Gráfico da variação da elasticidade planar (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para as monocamadas investigadas. Os valores de C_s^{-1} (figura 58B) foram calculados a partir das isotermas da figura 58A, empregando-se a equação (4). 122
- Figura 59 – Imagens de BAM obtidas para uma monocamada pura de DPPC (A, B, C) ou na presença de natamicina na subfase (D, E, F) a diferentes valores de pressão (mN/m) vs. área molecular por lipídio (\AA^2). .. 125

LISTA DE FIGURAS

- Figura 74 - Espectros do marcador CSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Ergosterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas..... 167
- Figura 75 - Espectros do marcador DOPTC (0,5% mol) incorporados em MLVs de DOPC puro ou de DOPC/esterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina à temperatura ambiente. 168
- Figura 76 - Espectros do marcador 14-PC (0,5% mol) incorporados em MLVs de DOPC puro ou de DOPC/esterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina à temperatura ambiente. 168
- Figura 77 - Espectros do marcador colestano (0,5% mol) incorporados em MLVs de DOPC puro ou de DOPC/esterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina à temperatura ambiente..... 169
- Figura 78 – Ilustração de uma interface gás-líquido e das forças intermoleculares (coesão) na superfície (resultante aponta para o interior do líquido) e no interior de um líquido (resultante nula). Fonte: elaborada pelo autor. Ilustrações semelhantes podem ser encontradas em publicações que abordem a região de interface gás-líquido. (*Myers, 1999; Butt et al., 2003*)..... 173
- Figura 79 – Ilustração de (A) uma microbalança de Wilhelmy e (B) da placa retangular (comprimento l , largura w e espessura t) em contato (ângulo θ) com a superfície de líquido, onde h corresponde a porção (altura) da placa imersa no líquido. Fonte: figura adaptada de *Petty (1996) e Birdi (2002)*..... 175

PREFÁCIO

Este trabalho acadêmico resulta da investigação do mecanismo de ação do antibiótico poliêno macrolídeo natamicina em membranas modelo lipídicas. O projeto de pesquisa orientado pelo prof. Eduardo R. P. González foi executado pelo doutorando Anderson A. Arima durante o período compreendido entre março de 2010 a fevereiro de 2014 (48 meses). Os experimentos foram realizados em sua totalidade no Instituto de Física, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos-SP. Os estudos empregando-se as vesículas multilamelares (lipossomos) como modelos de membrana foram realizadas no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do grupo de pesquisa “Biofísica Molecular - Sérgio Mascarenhas”, sob supervisões e colaborações dos pesquisadores Antônio J. Costa-Filho e Luís G.M. Basso. Por sua vez, os experimentos adotando-se as monocamadas de Langmuir como membranas modelo foram realizadas no laboratório (sala limpa) do grupo de pesquisa “Polímeros-Bernhard Gross”, sob supervisões e colaborações dos pesquisadores Osvaldo N. Oliveira Jr. e Felipe J. Pavinatto.

A presente tese foi escrita em 5 capítulos. O primeiro capítulo promove uma revisão de literatura referente tanto à natureza dos sistemas empregados como modelos de membrana, quanto da molécula de interesse (natamicina), cujo mecanismo de ação é investigado. Ao final desse capítulo é também apresentada a problemática, para cuja busca por uma solução culmina na motivação e nos objetivos da presente pesquisa, os quais são definidos e apresentados no segundo capítulo. O terceiro e o quarto capítulos abordam as discussões dos resultados obtidos para os estudos envolvendo, respectivamente, os lipossomos e as monocamadas como modelos de membranas, assim como, a metodologia experimental particularmente adotada para a caracterização da interação da molécula de interesse com cada um desses sistemas. No quinto e último capítulo, os resultados mais relevantes são revistos e algumas considerações relacionadas às contribuições deste trabalho são descritas. Ao final da tese encontram-se disponibilizados materiais anexos e apêndices para consulta.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	21
1.1) CRISTAIS LÍQUIDOS	22
A) Termotrópicos	22
B) Liotrópicos	25
1.2) MEMBRANAS MODELO	28
A) MONOCAMADAS	28
<i>i. História</i>	28
<i>ii. Filmes de Langmuir como membranas modelo</i>	30
B) BICAMADAS	32
<i>i. História</i>	32
<i>ii. Dispersão Lipídica</i>	33
<i>iii. Membrana Plasmática</i>	35
<i>iv. Lipossomos como modelos de membrana</i>	40
<i>v. Fluidez das bicamadas</i>	43
1.3) ANTIFÚNGICOS POLIÊNCOS E A NATAMICINA	46
CAPÍTULO 2 –MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	49
2.1) Motivação:	50
2.2) Objetivos:	50
CAPÍTULO 3 –ESTUDOS EM LIPOSSOMOS	51
3.1) MATERIAIS E MÉTODOS	52
A) Reagentes	52
B) Amostras: dispersões lipídicas	53
C) Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	55
<i>i. Teoria</i>	55
<i>ii. Experimental</i>	60
B) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	61
<i>i. Teoria</i>	61
<i>ii. Experimental</i>	65
3.2) RESULTADOS	66
A) Espectros de EPR	66
<i>i. Efeito da natamicina em MLVs de DPPC</i>	66
<i>ii. Efeito da natamicina em MLVs de DOPC</i>	67
<i>iii. Efeito da natamicina em MLVs carregadas negativamente (POPA) ou positivamente (DOTAP)</i>	68

SUMÁRIO

iv.	<i>Efeito da natamicina em MLVs negativamente carregadas (POPA) a diferentes valores de temperaturas</i>	75
B)	<i>Perfis calorimétricos de DSC</i>	84
i.	<i>Fosfolípido zwitteriônico com cadeias saturadas (DPPC)</i>	84
ii.	<i>Fosfolípido negativamente carregado com cadeias saturadas (DPPG)</i>	87
3.3)	DISCUSSÃO GERAL	91
3.4)	CONCLUSÃO.....	94
3.5)	EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES	96
CAPÍTULO 4 –ESTUDOS EM MONOCAMADAS.....		97
4.1)	MATERIAIS E MÉTODOS.....	98
A)	Reagentes e preparação de amostras	98
B)	Cinética de adsorção na interface ar-água.....	99
C)	Isotermas de compressão na interface ar-água.....	100
i.	<i>Teoria</i>	100
ii.	<i>Experimental</i>	105
iii.	<i>Análise das isotermas</i>	106
D)	<i>Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)</i>	108
i.	<i>Teoria</i>	108
ii.	<i>Experimental</i>	110
E)	<i>Espectroscopia de absorção-reflexão Infravermelha com polarização modulada (PM-IRRAS)</i>	111
i.	<i>Teoria</i>	110
ii.	<i>Experimental</i>	114
4.2)	RESULTADOS	115
A)	Solubilidade da natamicina em água.....	115
B)	Estudos da cinética de adsorção da natamicina na interface ar-água.....	117
i.	<i>Interface ar-água limpa</i>	117
ii.	<i>Interface ar-água recoberta por uma monocamada de DPPC</i> ...118	
iii.	<i>Interface ar-água recoberta por uma monocamada de colesterol</i>	120
C)	Efeito da natamicina em monocamadas puras de DPPC ou de Colesterol.....	122
i.	<i>Propriedades mecânicas</i>	122

SUMÁRIO

ii.	<i>Morfologia</i>	125
iii.	<i>Orientação molecular</i>	128
D)	Efeito da natamicina em monocamadas mistas de DPPC e Colesterol.....	133
i.	<i>Propriedades Mecânicas</i>	133
ii.	<i>Propriedades Termodinâmicas</i>	138
4.3)	DISCUSSÕES GERAIS.....	140
4.4)	CONCLUSÕES	142
4.5)	EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES	143
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES DO TRABALHO.....		144
REFERÊNCIAS.....		148
ANEXOS.....		162
ANEXO I: Espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) obtidos a diferentes temperaturas para lipossomos constituídos pelo lipídio zwitteriônico dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC).....		163
ANEXO II: Espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) obtidos à temperatura ambiente (24 °C) para lipossomos constituídos pelo lipídio zwitteriônico dioleoil fosfatidilcolina (DOPC).....		168
APÊNDICES.....		170
A)	<i>Interações intermoleculares</i>	171
B)	<i>Tensão de superfície e a interface ar-água</i>	173
C)	<i>Balança (Método Wilhelmy)</i>	175

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

*"O começo de todas as ciências
é o espanto de as coisas serem o que são."
(Aristóteles)*

1. INTRODUÇÃO

1.1) CRISTAIS LÍQUIDOS

Os termos “cristal líquido (LC)” e “líquido-cristalino” são sinônimos e designam um estado em que a matéria apresenta propriedades intermediárias entre o estado sólido cristalino (regularmente ordenado) e o estado líquido (fluido) isotrópico. (Gennes e Prost, 1993; Petty, 1996; Demus et al., 1998; Khoo, 2007) Os materiais líquido-cristalinos são encontrados em muitas substâncias e misturas, sendo que a maioria pode ser encontrada em mais de uma fase organizacional, as quais são conhecidas como mesofases. Basicamente, a distinção entre os fatores responsáveis pelo seu polimorfismo (diversidade de fases) permite a classificação dos cristais líquidos em 2 categorias (termotrópicos e liotrópicos), (Singh, 2002) as quais serão melhores descritas a seguir. Nesta tese, um maior enfoque é dado aos liotrópicos, uma vez que correspondem aos sistemas (colóides de associação) empregados como modelos de membrana biológica na presente pesquisa.

A) Termotrópicos

Os cristais líquidos termotrópicos são assim denominados por abrangerem materiais cujas transições de fase dependem basicamente da temperatura e da pressão. Desse modo, à pressão constante (experimento isobárico) transformações estruturais e de ordenamento podem ocorrer apenas em função da variação da temperatura. (Neto e Salinas, 2005) As estruturas líquido-cristalinas formadas para esse tipo de material são constituídas de unidades básicas moleculares que apresentam anisotropia de forma (figura 1A), ou seja, possuem geometrias moleculares correspondentes a bastões, discos, arcos, entre outras. (Gennes e Prost, 1993; Blinov, 2011) A figura 1B ilustra mesofases líquido-cristalinas termotrópicas para moléculas do tipo “bastão” em função do aumento da temperatura. Nessa figura, embora as fases cristalina e isotrópica correspondam a fases típicas de materiais sólidos e líquidos, respectivamente; duas fases incomuns podem ser observadas: a esméctica e a nemática. A esméctica consiste numa configuração na qual as moléculas apresentam ordem direcional e de posição, ou seja, os eixos longitudinais das moléculas alinham-se favoravelmente (em média) numa mesma direção e os

1. INTRODUÇÃO

centros de massas encontram-se aproximadamente alinhados sob a forma de camadas. Por sua vez, na nemática as moléculas também apresentam ordem direcional, mas não apresentam ordem de posição, ou seja, embora os eixos longitudinais das moléculas alinhem-se favoravelmente (em média) numa mesma direção, os centros de massas encontram-se desalinhados.

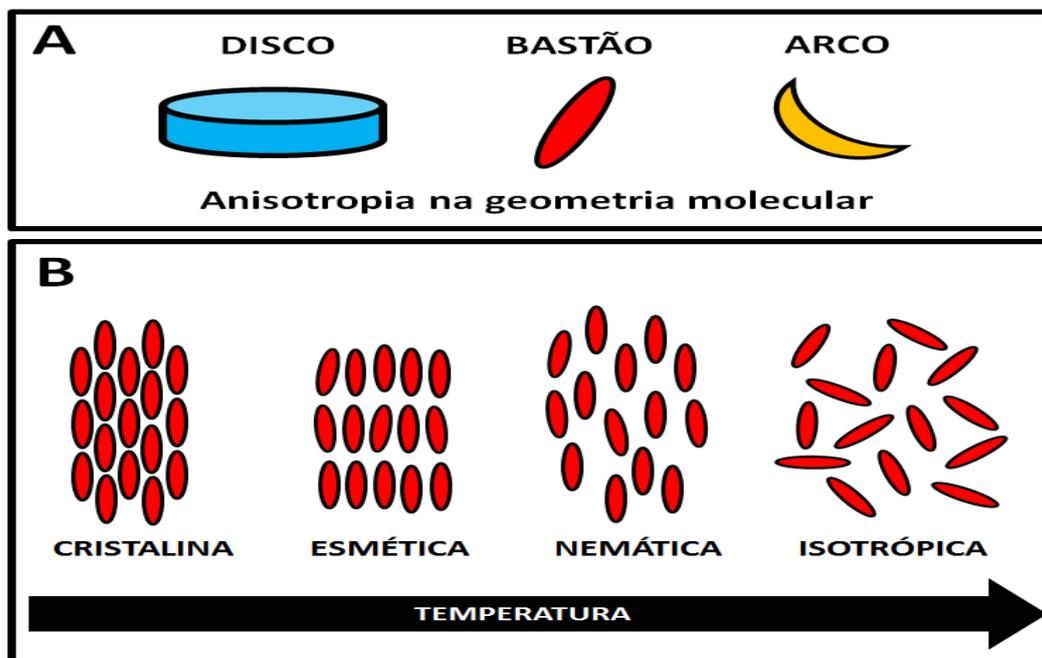


Figura 1 – (A) Diferentes formas (disco, bastão e arco) para as moléculas constituintes dos cristais líquidos termotrópicos e (B) exemplo de fases líquido-cristalinas termotrópicas para uma molécula do tipo bastão em função do aumento da temperatura. Fonte: elaborado pelo autor. Ilustrações mais completas referentes às anisotropias moleculares, assim como das mesofases formadas, podem ser encontradas em publicações que abordem os cristais líquidos em geral. (*Gennes e Prost, 1993; Demus et al., 1998; Singh, 2002; Khoo, 2007; Blinov, 2011*)

Uma importante aplicação dos termotrópicos é na fabricação dos famosos LCDs (Liquid Crystal Displayers) presentes nos visores digitais de variados produtos eletrônicos (calculadoras, celulares, notebooks, tablets, televisores, entre outros). As moléculas dos termotrópicos, como mencionado anteriormente, apresentam anisotropia de forma e, desse modo, interagem-se de maneira particular dependendo da direção em que um campo eletromagnético é aplicado. Baseado nesse princípio que os LCDs funcionam. Simplificadamente, um LCD convencional é um sistema composto por duas camadas de agentes polarizantes cruzados (filtros) entre os quais o material líquido-cristalino é inserido (figura 2). (*Web Page 1*) O primeiro agente polariza a luz num plano ortogonal ao plano de

1. INTRODUÇÃO

polarização do segundo. Após ser polarizada pelo primeiro agente, a luz incide no material termotrópico do tipo “twisted”, o qual apresenta suas moléculas orientadas de modo a alterar o plano de polarização da luz a favor da direção do plano de polarização do segundo agente. A fase “twisted” pode ser compreendida como uma sobreposição de planos nemáticos (figura 1B), porém, a direção de alinhamento médio das moléculas é gradualmente variada de um plano para outro, de modo que nos planos opostos mais externos eles apresentem direções de alinhamento molecular ortogonais entre si. Desse modo, a luz polarizada é capaz de atravessar todo o sistema, sendo posteriormente filtrada a fim de exibir uma determinada coloração. Por outro lado, aplicando-se um campo elétrico sobre o material termotrópico na direção da trajetória da luz polarizada, verificar-se-á que suas moléculas irão se alinhar paralelamente à direção do campo e, conseqüentemente, o material LC “twisted” não irá alterar o plano de polarização inicial da luz, o que resultará na total absorção da luz polarizada pelo segundo agente, ou seja, nenhuma coloração será exibida.

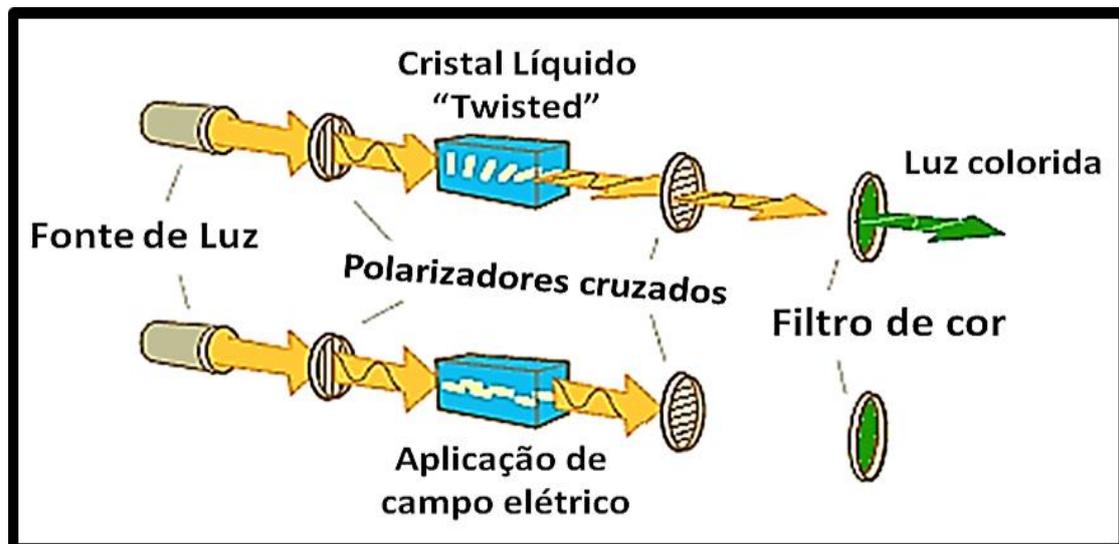


Figura 2 – Ilustração do fenômeno da birrefringência característica de materiais líquido-cristalinos termotrópicos: na ausência de campo elétrico o material polariza a luz na direção ortogonal ao plano de incidência, porém, se um campo elétrico aplicado é aplicado no sentido de propagação da luz, nenhuma alteração sobre o plano de polarização da luz é produzida. Fonte: figura adaptada de Nobelprize.org. (Web Page 1).

1. INTRODUÇÃO

B) Liotrópicos

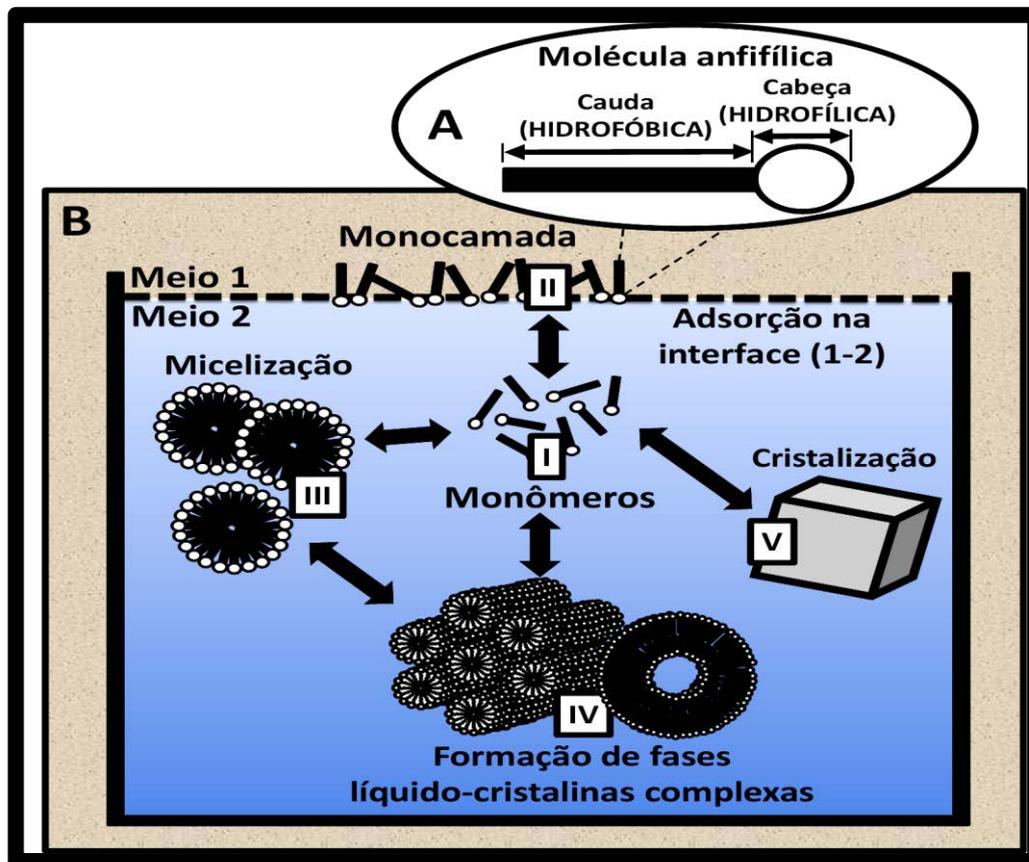


Figura 3 – Ilustração de (A) uma molécula anfifílica e (B) dos fenômenos: (II) adsorção numa interface gás-líquido (meios 1-2), (III) micelização, (IV) formação de mesofases líquido-cristalinas liotrópicas complexas e (V) cristalização a partir de monômeros de moléculas anfifílicas (I) dissolvidas em solução. As cabeças dos monômeros são hidrofílicas e as caudas hidrofóbicas. O meio 1 é apolar e o meio 2, polar. Fonte: elaborado pelo autor. Ilustrações e informações mais detalhadas desses fenômenos podem ser encontradas em publicações na área de colóides e interfaces. (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Myers, 1999; Butt et al., 2003; Platikanov e Exerowa, 2009; Cosgrove, 2010)

Os cristais líquidos liotrópicos também conhecidos como colóides de associação são formados quando determinadas quantidades de moléculas anfifílicas são dispersas num dado solvente. (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Cosgrove, 2010) As moléculas anfifílicas (figura 3A), também conhecidas como anfipáticas apresentam em sua estrutura regiões polares e outras apolares, as quais possibilitam que diferentes configurações de auto-organização (“self-assembly”) possam ocorrer para essas moléculas em função da polaridade e da quantidade relativa do solvente (dispersante) adotado. (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Butt et al., 2003; Neto e Salinas, 2005) Desse modo, não só a temperatura

1. INTRODUÇÃO

e a pressão, mas essencialmente a concentração relativa entre os diferentes componentes, são determinantes do tipo de fase assumida pelos materiais liotrópicos. (*Friberg, 1976; Neto e Salinas, 2005*)

Considerando-se um sistema no qual os valores para a pressão e para a temperatura são mantidos constantes, podemos observar a ocorrência de diferentes mesofases e fenômenos (figura 3B) em função apenas do incremento na concentração das moléculas anfifílicas dispersas (figura 3A) num dado solvente polar. (*Seddon e Templer, 1995*) Inicialmente, em pequenas concentrações, ocorre o equilíbrio dinâmico entre os monômeros da solução (figura 3B-I) e as moléculas adsorvidas na região de interface 1-2 (figura 3B-II). (*Myers, 1999*) Nesse caso, as moléculas anfifílicas adsorvem-se e dispõem-se de modo a formar um filme muito fino, no qual a porção hidrofílica molecular (cabeça) orienta-se a favor do meio polar (meio 2), enquanto as regiões hidrofóbicas (cauda) para o meio predominantemente apolar (meio 1). (*Petty, 1996*) Esse filme fino que apresenta a espessura de ordem molecular (nanométrica) é conhecido como monocamada de Langmuir (ver seção 1.2A). Por outro lado, acima de um valor crítico (concentração micelar crítica ou CMC) estabelece-se uma nova fase liotrópica em equilíbrio com os monômeros em solução (figura 3B-III), a qual é denominada fase micelar. (*Cosgrove, 2010*) Nesse processo conhecido como micelização, e considerando-se que as cabeças das moléculas anfipáticas são hidrofílicas, enquanto as caudas são hidrofóbicas; verifica-se que, quando a CMC é atingida, a proximidade entre as caudas apolares determinam que as interações hidrofóbicas atrativas (apêndice A) entre elas tornem-se fortes o suficiente para promoverem uma auto-organização dessas moléculas em agregados esféricos (superfície polar) sem volume interno de solvente (interior hidrofóbico), os quais são conhecidos como micelas (figura 4A). (*Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Platikanov e Exerowa, 2009*) Conforme aumenta-se a concentração das moléculas anfifílicas dispersas, a formação de fases líquido-cristalinas mais complexas (figura 3B-IV) que as micelares é favorecida, como por exemplo, a lamelar (figura 4G), na qual as moléculas organizam-se sob a forma de bicamadas, fase micelar inversa (figura 4B), fase hexagonal direta/inversa (figura 4C/D), cúbica direta/inversa (figura 4E/F), entre outras. Cabe lembrar que dentre as fases citadas, as fases diretas

1. INTRODUÇÃO

(figura 4A, 4C, 4E e 4F) formam-se espontaneamente em dispersantes polares, enquanto, as inversas (figura 4B, 4D e 4E) são mais favorecidas quando solventes apolares são empregados como meios dispersantes. (Hiemenz e Rajagopalan, 1997) Finalmente, em elevadas concentrações, as moléculas anfifílicas passam a se cristalizar (figura 3B-V), uma vez que a solubilidade dessas moléculas é relativamente baixa e os fenômenos tanto de adsorção como de dispersão (formação de cristais líquidos) se saturam. (Myers, 1999)

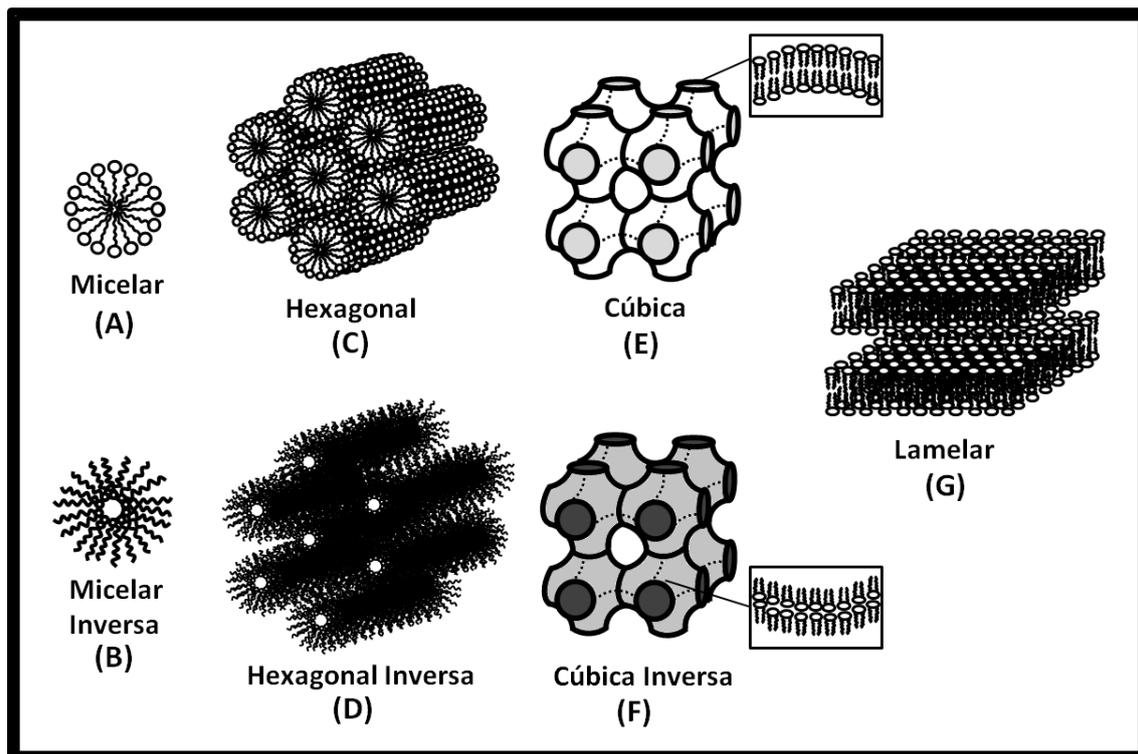


Figura 4 – Ilustração de algumas mesofases líquido-cristalinas liotrópicas que podem ser observadas para os colóides de associação. As fases (A), (C), (E) e (F) formam-se em dispersantes polares, enquanto as demais (B), (D) e (F) em dispersantes apolares. Fonte: elaborado pelo autor. Ilustrações dessas estruturas podem ser encontradas em publicações relacionadas aos cristais líquidos liotrópicos (Friberg, 1976; Seddon e Templer, 1995; Neto e Salinas, 2005) ou a colóides e interfaces (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Butt et al., 2003; Cosgrove, 2010).

1. INTRODUÇÃO

1.2) MEMBRANAS MODELO

Nesta seção promovemos uma revisão de literatura referente à aplicação dos cristais líquidos liotrópicos (ver seção anterior) como modelos de membrana. Em particular, uma breve revisão é realizada apenas para as monocamadas e para os lipossomos, uma vez que ambos correspondem aos modelos de membrana empregados na presente pesquisa.

A) MONOCAMADAS

i. História

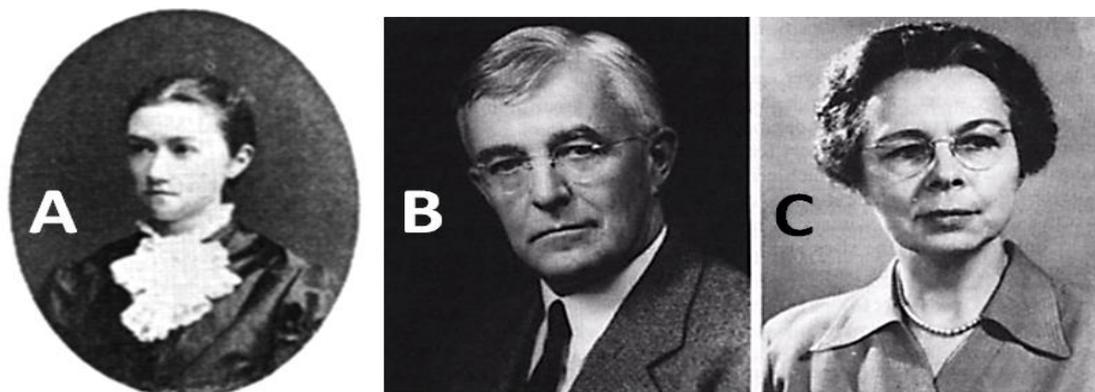


Figura 5 – Fotografias dos pesquisadores pioneiros nos estudos dos filmes monomoleculares na interface ar-água: (A) Agnes Pockels, (B) Irving Langmuir e (C) Katherine Blodgett. Fonte: *Roberts (1990)*

Filmes finos “flutuantes” sobre a superfície da água são conhecidos desde o século XVIII a.C., época na qual os babilônios já empregavam substâncias oleosas dispersas sobre a superfície da água em rituais de previsões. (*Roberts, 1990; Edidin, 2003*) Os japoneses a partir do século XII d.C. passaram a espalhar propositalmente uma tinta preta denominada “sumi”, a qual foi inventada pelos chineses há mais de 200 anos atrás, sobre a superfície da água para que, após a imersão e a retirada de uma folha de papel nesse sistema, formasse sobre essa folha diferentes desenhos “impressos” (adsorvidos). (*Dynarowicz-Latka et al., 2001*) No século XVIII d.C., Benjamin Franklin, famoso revolucionário e cientista norte-americano, constatou que a presença do azeite de oliva disperso sobre a superfície da água provocava o amortecimento das ondas. (*Lyklema et al., 2000; Edidin, 2003; Pashley e Karaman, 2004*)

1. INTRODUÇÃO

Foi somente a partir do século XIX d.C., que as primeiras observações de grande importância científica referente aos filmes interfaciais foram realizadas. Naquela época as mulheres não possuíam acesso ao ensino superior, entretanto, a alemã Agnes Pockels (1862-1935) (figura 5A) desafiou esse preconceito e valendo-se de ferramentas encontradas em sua própria cozinha, (Roberts, 1990; Edidin, 2003; Pashley e Karaman, 2004) conseguiu investigar durante 10 anos (desde os 18 anos de idade) o efeito da presença de impurezas sobre a tensão de superfície da água (apêndice B e C). Suas descobertas só foram publicadas na famosa revista científica *Nature* graças ao apoio do prestigiado físico inglês John W. Strutt (*Lord Rayleigh*);(Pashley e Karaman, 2004) sendo, posteriormente, reconhecida como uma das pioneiras na área de Ciências de Superfície, ao receber o prêmio Laura Leonard da “*Colloid Society*” em 1931 e o título de doutoranda honorária em 1932 pela “*Braunschweig Technical University*”. (Web Page 2; Web Page 3) Nesse mesmo ano, Irving Langmuir (1881-1957) (figura 5B) recebeu o prêmio Nobel em Química pelos seus estudos referentes aos filmes finos monomoleculares na interface ar-água e à descrição dos fenômenos de adsorção na superfície. Por essa razão, as monocamadas formadas na interface ar-água são atualmente conhecidas como *filmes de Langmuir*. (Roberts, 1990) Posteriormente, uma colega de trabalho de Langmuir, Katherine Blodgett (1898 - 1979) (figura 5C), desenvolveu um método de transferência (deposição) desses filmes formados na interface ar-água para a superfície de um substrato sólido, motivo pelo qual os filmes depositados por esse processo são denominados *filmes de Langmuir-Blodgett*. (Roberts, 1990) Uma importante consideração refere-se ao fato de que, embora seja atribuído o nome de Langmuir para a identificação da cuba empregada nos estudos de monocamadas, a primeira versão dessa cuba foi criada por Pockels, sendo ela também a responsável pela criação da técnica de espalhamento (“*spreading*”): os compostos a serem investigados sobre a região de interface ar-água deveriam ser previamente dissolvidos em solventes voláteis e imiscíveis em relação à água para que, posteriormente ao gotejamento cuidadoso de pequenas alíquotas dessas soluções, ocorresse uma rápida evaporação do solvente presente nessas gotículas, e, conseqüentemente, apenas as moléculas do composto se mantivessem adsorvidas na região de interface.

1. INTRODUÇÃO

ii. Filmes de Langmuir como membranas modelo

Como mencionado anteriormente, os filmes de Langmuir são filmes finos constituídos por moléculas anfifílicas organizadas na interface ar-água. São bastante especiais por apresentarem uma espessura de ordem molecular (nanométrica), motivo pelo qual são também conhecidos como monocamadas. Nesses sistemas o meio aquoso é denominado subfase e o seu papel é funcionar como um substrato para a formação das monocamadas, as quais costumam ser formadas e estudadas num equipamento conhecido como cuba de Langmuir (figura 6A), o qual, basicamente, corresponde a um recipiente simétrico, que contém a subfase aquosa, sobre o qual são acoplados duas barreiras móveis e um sensor de pressão (apêndice C). O revestimento da superfície, tanto da cuba, como das barreiras, é de um material inerte (comumente Teflon®), o que impede o acúmulo de resíduos e evita a contaminação entre experimentos consecutivos.

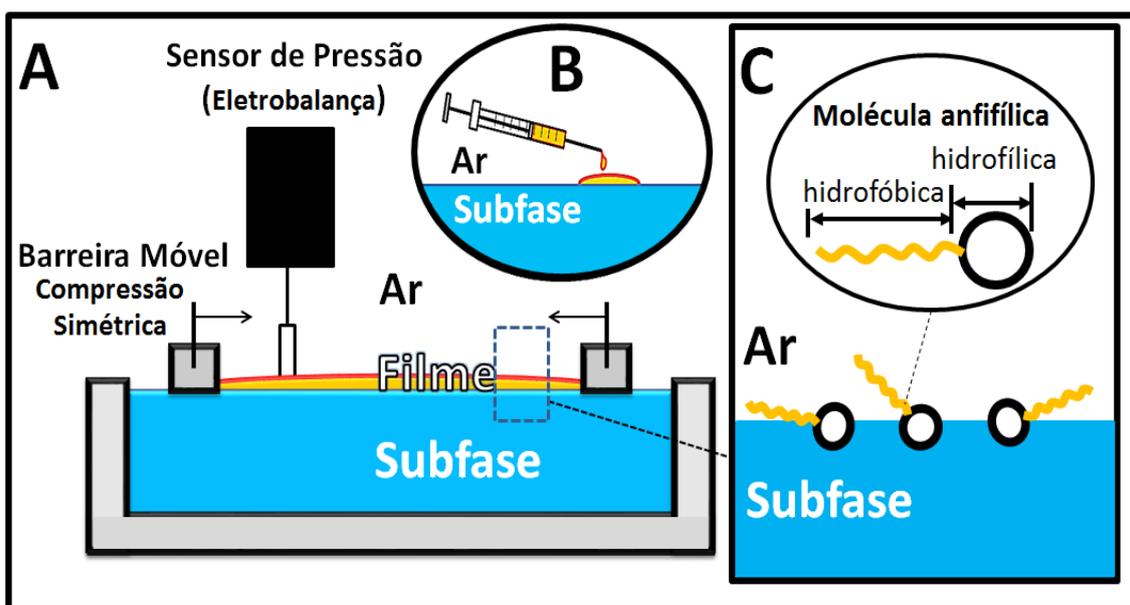


Figura 6 – Ilustração simplificada (A) de uma cuba de Langmuir e de um filme de Langmuir na interface ar-água, (B) da técnica de espalhamento ("spreading") sobre a superfície da subfase do composto de interesse dissolvido num solvente volátil e (C) do arranjo molecular do composto (monocamada) na interface ar-água após a evaporação do solvente: regiões hidrofílicas orientadas a favor do líquido (subfase), enquanto as hidrofóbicas a favor do meio gasoso (ar). Fonte: elaborado pelo autor.

1. INTRODUÇÃO

Para a formação de um filme de Langmuir, um desejado composto anfifílico deve ser previamente dissolvido num solvente volátil (geralmente clorofórmio) e imiscível em relação à água para que, posteriormente ao espalhamento cuidadoso (“spreading”) de pequenas alíquotas dessa solução na superfície da subfase (figura 6B), ocorra a rápida evaporação do solvente presente nessas gotículas, e, conseqüentemente, apenas as moléculas do composto anfifílico de interesse mantenham-se adsorvidas na região dessa interface (figura 6C). Esse processo de arranjo molecular é espontâneo devido à auto-organização (“*self-assembly*”) das moléculas anfifílicas na interface entre dois meios com polaridade distintas: as regiões polares (hidrofílicas) orientam-se a favor do meio aquoso, enquanto as regiões apolares (hidrofóbicas) preferem se posicionar no meio gasoso (figura 6C). A presença dessas moléculas anfifílicas altera o valor da tensão de superfície da água, motivo pelo qual são também conhecidas como agentes surfactantes. (Cosgrove, 2010)

Uma das aplicações das monocamadas é o seu emprego como modelo de membranas biológicas em estudos biofísicos. Nesse caso, as moléculas anfifílicas empregadas são os lipídios e, apesar de mimetizarem somente a superfície interna ou externa de uma membrana plasmática (ver seção 1.2B), esses modelos apresentam a vantagem de possibilitar um grande controle da arquitetura (composição e morfologia) do modelo a ser formado (Shah, 1972; Mcconlogue e Vanderlick, 1997), o que facilita a reprodutibilidade experimental e a fidelidade do sistema. Além disso, outra vantagem está na baixa quantidade (microgramas) de material necessário para formá-las, o que assegura, conseqüentemente, o emprego de pequenas quantidades dos compostos, cuja interação com esse modelo (monocamada) deseja ser investigada. Esse fator é de extrema importância, no caso de estudos envolvendo proteínas e outros compostos de difícil e/ou custosos processos de síntese.

1. INTRODUÇÃO

B) BICAMADAS

i. História

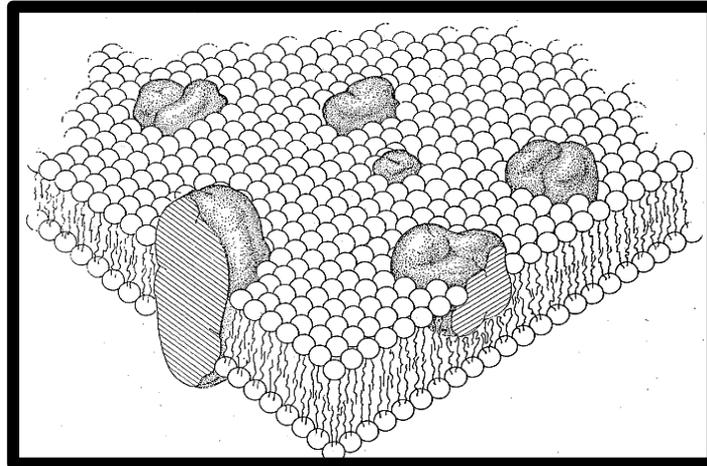


Figura 7 – Ilustração da organização da membrana biológica no modelo de “mosaico fluido” sugerido por S.J. Singer e Garth Nicolson. (Singer e Nicolson, 1972)

Retomando-se nossa história, após Irving Langmuir realizar seus primeiros estudos com filmes finos na interface ar-água, em 1925 Gorter (pediatra) e Grendel (químico) extraíram os lipídios constituintes de hemácias pertencentes a diferentes espécies de mamíferos e, empregando-se como ferramenta de análise uma cuba de Langmuir (ver seção 1.2 A), conseguiram determinar que a área total ocupada por essas moléculas numa monocamada era equivalente (aproximadamente) ao dobro do valor da área da superfície celular para cada espécie (Gorter e Grendel, 1925; Robertson, 1981; Killian e Van Meer, 2001). Desse modo, para que todas as moléculas lipídicas extraídas pudessem compor uma membrana, elas precisariam estar organizadas sob a forma de uma bicamada esférica. O emprego preferencial das hemácias em estudos da membrana plasmática deve-se ao fato de que nos mamíferos elas apresentam-se em sua maturidade como formas celulares anucleadas e ausentes de organelas citoplasmáticas e, desse modo, essas características justificam o baixo tempo de vida dessas células e também garantem que os lipídios extraídos sejam praticamente em sua totalidade constituintes da membrana plasmática. Após a descoberta de Gorter e Grendel, inúmeras investigações e diversos modelos de organização da membrana plasmática foram propostos, até que em 1972 S.J. Singer e Garth Nicolson sugerissem o modelo de “mosaico fluido” (Singer e Nicolson, 1972; Robertson, 1981), o qual

1. INTRODUÇÃO

ainda continua sendo o modelo mais aceito atualmente. Nesse modelo, a membrana biológica corresponde a uma bicamada lipídica fluida e contínua, na qual estariam imersas diferentes proteínas (figura 7).

ii. Dispersão Lipídica

Os lipídios são moléculas anfifílicas, isto é, caracterizam-se por apresentarem tanto regiões hidrofílicas, como hidrofóbicas, e, desse modo, quando dispersas, formam espontaneamente (“*self-assembly*”) agregados líquido-cristalinos (colóides de associação) resultantes das forças atrativas (força de van der Waals) entre moléculas (apêndice A). Um fator importante que influencia o tipo de mesofase formada (figura 8B) é a geometria molecular determinada pela diferença entre a secção de área ocupada pelas regiões polares (cabeça) e a secção de área ocupada pelas hidrofóbicas (cadeias hidrocarbônicas) (figura 8A). (*Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Hafez e Cullis, 2001; Vance e Vance, 2008; Cosgrove, 2010*) Lipídios com uma única cadeia hidrocarbônica apresentam uma geometria molecular aproximadamente cônica invertida, o que favorece a formação de estruturas em fases micelares ou hexagonais diretas; ao passo que lipídios com duas cadeias hidrocarbônicas apresentam uma geometria cilíndrica, o que dificulta a formação de micela e favorece o processo de formação de bicamadas, isto é, formam-se estruturas lamelares. Como os glicerofosfolipídios em sua maioria, em especial a fosfatidilcolina (PC), a fosfatidilserina (PS) e o fosfatidilinositol (PI), apresentam geometria cilíndrica, esse fator justifica o motivo desses lipídios serem os mais abundantes nas membranas biológicas (*Van Meer et al., 2008; Van Meer e De Kroon, 2011*) e, conseqüentemente, os mais empregados em sistemas miméticos (modelos) de biomembranas. Por outro lado, lipídios com uma reduzida secção de área ocupada pelas regiões polares em relação à das hidrofóbicas, caso do esteroide colesterol, por exemplo, irão apresentar uma geometria levemente cônica, o qual determinará uma organização sob a forma micelar invertida ou hexagonal invertida. Cabe ressaltar que, entretanto, além da geometria molecular, a polaridade e a quantidade relativa do solvente (dispersante) utilizado são importantes fatores limitantes do tipo de agregação

1. INTRODUÇÃO

líquido-cristalina produzida. Desse modo, como foi explicado anteriormente, dispersões lipídicas em solventes polares favorecem a formação de fases lipídicas diretas, cabeças hidrofílicas em contato direto com o solvente polar, enquanto que na presença de solventes apolares, fases lipídicas inversas, cadeias hidrocarbônicas (hidrofóbicas) em contato direto com o solvente apolar, sejam geralmente observadas. Na próxima seção, será descrito mais profundamente o modelo de membrana lipídica lamelar (bicamada) empregado na presente pesquisa.

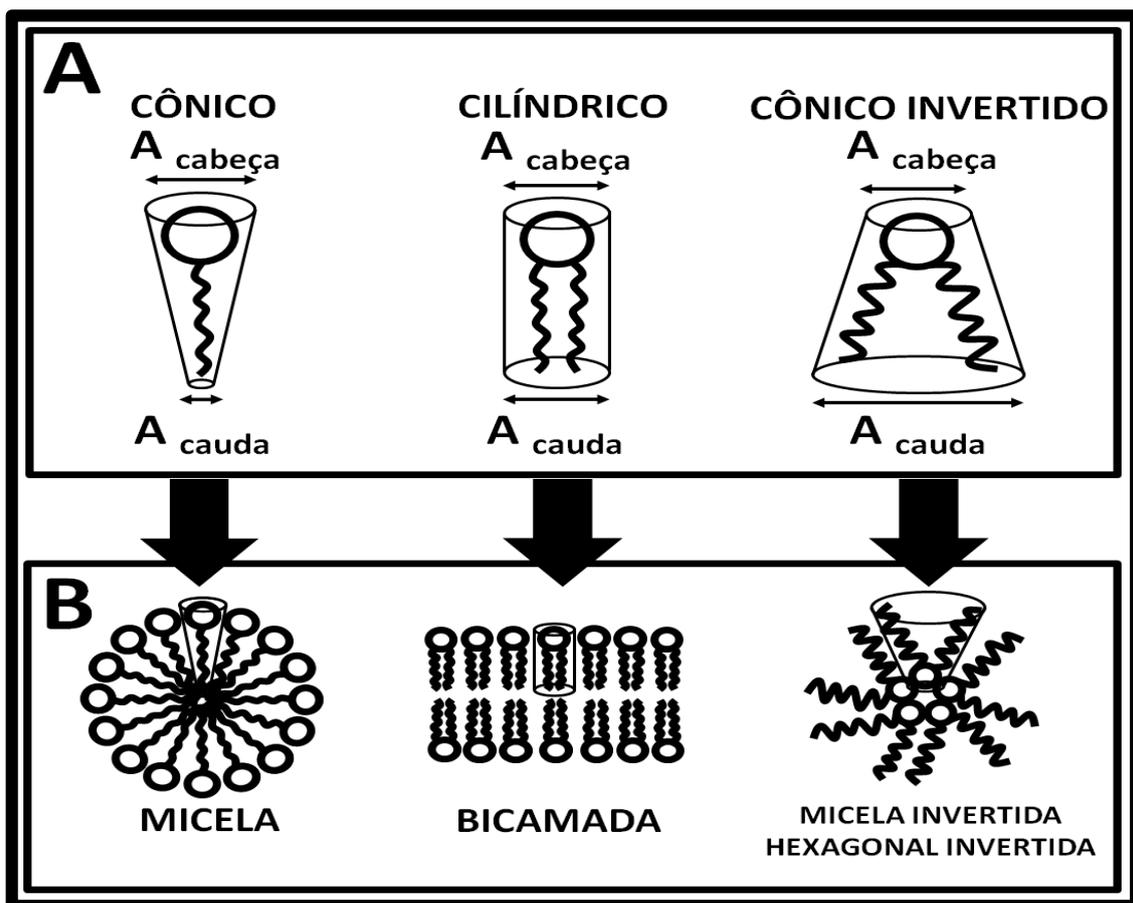


Figura 8 – Ilustração da (A) geometria (“envelope”) molecular para lipídios com diferentes relações entre a área ocupada pelas cabeças (polares) e as caudas (hidrofóbicas) e das (B) mesofases favorecidas para cada geometria. Fonte: elaborado pelo autor. Figuras semelhantes podem ser encontradas em publicações referentes aos colóides e às interfaces. (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Butt et al., 2003; Vance e Vance, 2008; Cosgrove, 2010)

1. INTRODUÇÃO

iii. Membrana Plasmática

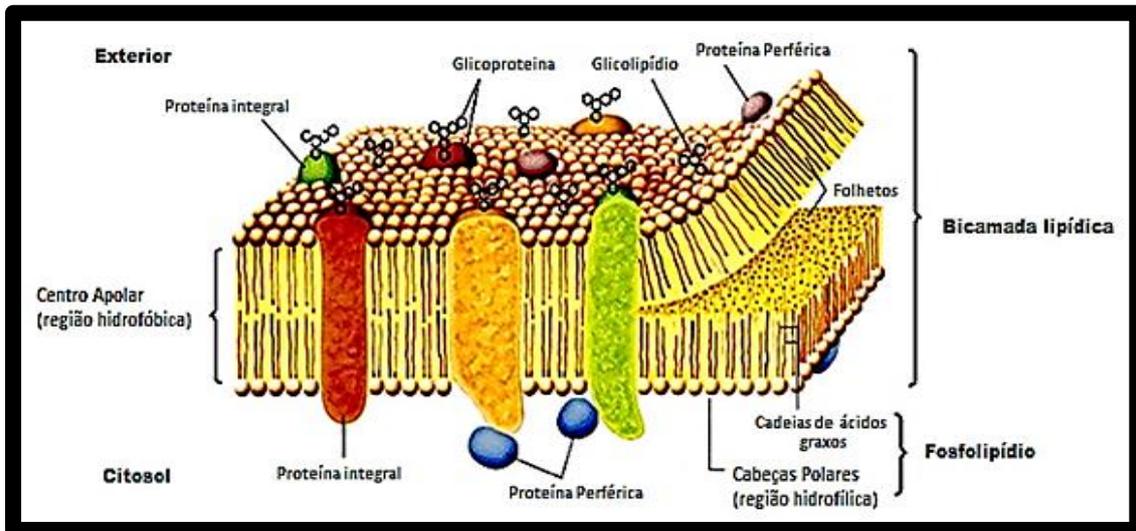


Figura 9 - Ilustração da estrutura básica das membranas biológicas: bicamada lipídica (folheto duplo) incorporada de proteínas integrais. As proteínas periféricas não atravessam a bicamada, ao contrário das integrais. As regiões hidrofílicas e hidrofóbicas estão indicadas. Os carboidratos também estão presentes, mas encontram-se associados a proteínas (glicoproteínas) ou a lipídios (glicolipídios). Fonte: figura adaptada de *Lodish et al. (2004)*.

As membranas biológicas são cristais líquidos liotrópicos constituídos basicamente por uma bicamada lipídica (fase lamelar) na qual se encontram incorporadas diversas moléculas proteicas (figura 9). Os lipídios representam uma classe de moléculas anfífilicas caracterizadas por uma grande diversidade quanto a sua estrutura e função biológica, podendo ser desde combustíveis celulares a moléculas sinalizadoras (*Stryer, 1981; Vance e Vance, 2008*). Em relação à morfologia celular, são importantes constituintes estruturais da membrana plasmática e das organelas citoplasmáticas. Por essa razão, considerando-se a aplicação biológica dos liotrópicos, tanto para estudos biofísicos (membranas modelo), quanto como sistemas carreadores de fármacos (“drug delivery systems”) (*Hafez e Cullis, 2001*), a composição dos sistemas empregados são preferencialmente de natureza lipídica. Isso ocorre, porque esses sistemas precisam possuir uma composição semelhante à membrana plasmática, seja para aumentar a fidelidade do modelo de membrana, seja para minimizar os efeitos tóxicos durante o uso terapêutico.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os lipídios que compõem a membrana plasmática, os mais abundantes são os glicerofosfolipídios e os esteróis, (Van Meer *et al.*, 2008; Van Meer e De Kroon, 2011) os quais são melhores descritos a seguir.

a) Glicerofosfolipídios

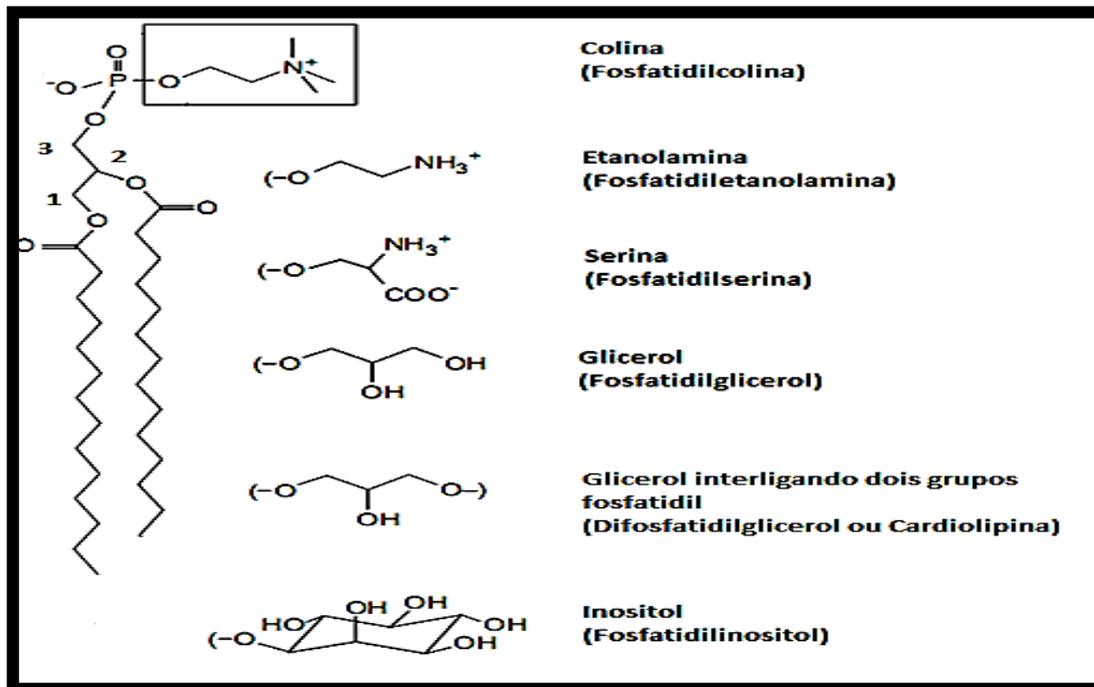


Figura 10- Ilustração da estrutura do glicerofosfolipídio 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina ou fosfatidilcolina (PC). As numerações indicadas referem-se aos 3 carbonos pertencentes ao grupo glicerol (1,2,3-propanotriol). O grupo colina (caixa com linha sólida) e outros grupos álcoois são listados. Os nomes em parênteses referem-se à nomenclatura adquirida pelo lipídio devido à ligação do novo grupo álcool. Fonte: figura editada de Vance e Vance (2008).

A estrutura molecular dos glicerofosfolipídios corresponde basicamente a uma molécula glicerol (1,2,3-propanotriol) a qual encontra-se esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e a um grupo fosfato no carbono 3 (figura 10). O grupo fosfato, por sua vez, é também esterificado a um grupo alcoólico: este último pode ser simplesmente uma hidroxila (OH), ou grupos de maior complexidade tais como a colina (caixa em destaque, figura 10), a etanolamina, a serina, o glicerol e o inositol. Desse modo, podemos observar nessa mesma figura, que os glicerofosfolipídios apresentam característica anfifílica, isto é, possuem uma cabeça polar hidrofílica (grupo fosfato esterificado a um grupo alcoólico) e grupos não polares (hidrofóbicas) correspondentes às cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos.

1. INTRODUÇÃO

b) Esteróis

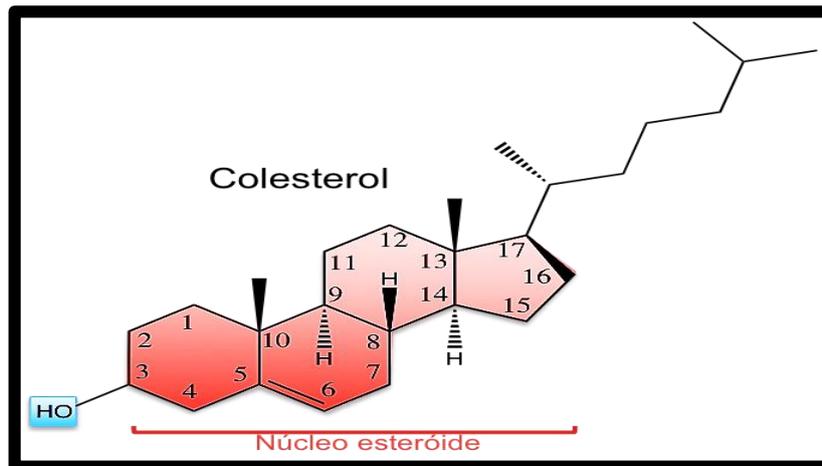


Figura 11 – Ilustração da estrutura química do esteroide colesterol. Um esteroide é uma molécula com núcleo esteroidal (região em vermelho com carbonos numerados) na qual um grupo hidroxila (em azul) e uma cadeia hidrocarbônica estão presentes, respectivamente, no C-3 e no C-17. Fonte: Wikipédia (Web Page4).

Os esteróis são lipídios, cuja estrutura básica deriva de uma molécula esteroidal (figura 11), - estrutura tetracíclica na qual 17 carbonos estão organizados em 3 anéis hexagonais e um pentagonal. Por outro lado, distinguem-se dos esteroides por apresentarem adicionalmente pelo menos um grupo álcool (hidroxila) no carbono-3 e uma cadeia hidrocarbônica (8 ou mais carbonos) no carbono-17. São encontrados nas membranas plasmáticas de todos seres vivos eucariontes, sendo o colesterol (figura 11) o esteroide típico de animais; os fitoesteróis comuns nos vegetais superiores e o ergosterol, nos fungos. As funções dos esteróis são diversas, sendo que no caso dos mamíferos, por exemplo, o colesterol participa da biossíntese dos sais biliares e de hormônios (Solomonov et al., 2009) e é um importante componente estrutural e regulador da fluidez na membrana plasmática (ver seção 1.2B-v). Além disso, inúmeras pesquisas vêm sugerindo que as regiões da membrana ricas em colesterol e em esfingomielinas, as quais são fosfolipídios que apresentam a esfingosina (2-amino-4-octadeceno-1,3-diol) como cadeia base de esterificação ao invés do glicerol presente nos glicerofosfolipídios, são responsáveis pela formação de microdomínios ("rafts") (Brown e London, 2000; Salaun et al., 2004; Silvius, 2005; Ramstedt e Slotte, 2006; Lindner e Naim, 2009) caracterizados por um ordenamento lipídico mais rígido em relação às suas vizinhanças e, que por

1. INTRODUÇÃO

esse motivo, poderiam funcionar como sítios preferências de localização para certas proteínas.

c) Função

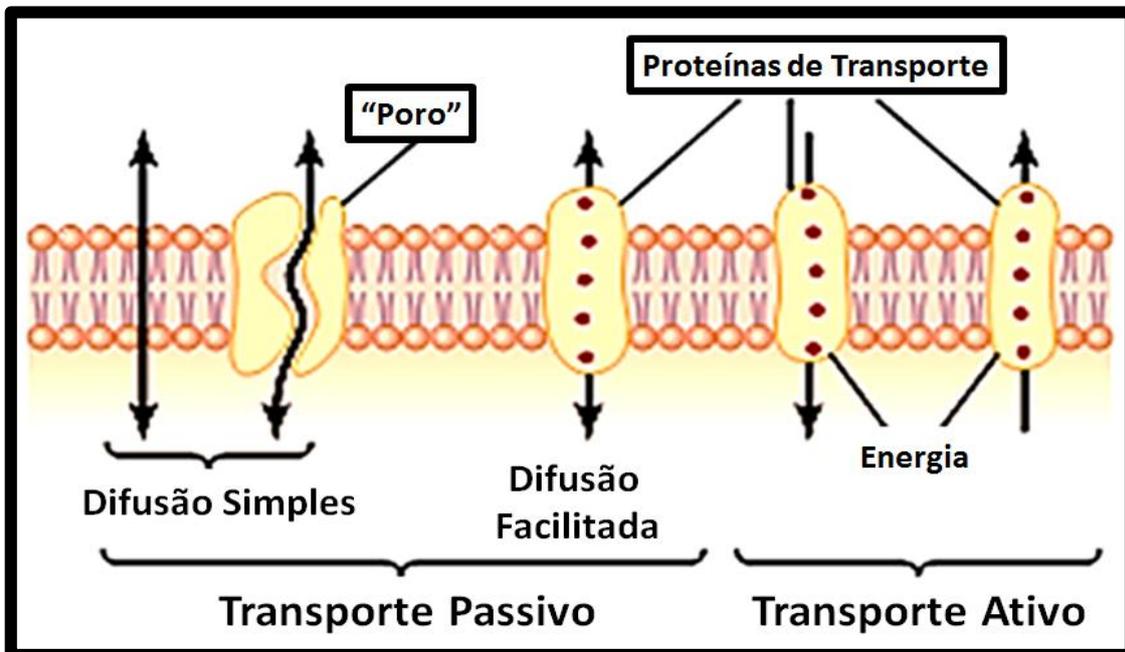


Figura 12 – Ilustração dos transportes passivos e ativos através da membrana plasmática. Fonte: figura adaptada de Guyton e Hall (2006).

Um estudo recente (Stano et al., 2013) demonstrou que o encapsulamento lipossômico (vesículas lipídicas) de diversas biomoléculas (DNA, RNA, enzimas, aminoácidos) dispersas em solução permitiu a formação espontânea de uma engenharia capaz de transcrever proteínas no interior desses lipossomos, o que realça a importância da formação de microcompartimentos para a ocorrência das reações bioquímicas intracelulares essenciais à vida. Desse modo, podemos definir que o papel principal das membranas biológicas é delimitar as dimensões celulares e de organelas citoplasmáticas, de modo que as composições particulares para cada compartimento aquoso sejam asseguradas. Essa função de barreira é desempenhada graças à permeabilidade seletiva intrínseca das membranas biológicas (figura 12): moléculas lipossolúveis (hidrofóbicas) podem atravessar passivamente a matriz lipídica a favor do gradiente de concentração; por outro lado, compostos polares ou ionizados (carregados) precisam ser transportados

1. INTRODUÇÃO

passivamente por intermédio de “poros” ou “aquaporinas” (difusão facilitada) ou ativamente, seja mediado por proteínas de transporte, como, por exemplo, as proteínas co-transportadoras de outras substâncias. Além disso, substâncias de grandes pesos moleculares só conseguem transpor essas barreiras por processos que desencadeiem a endocitose. Embora todos os processos citados sejam importantes, considerando-se que a maioria dos fármacos são ácidos ou bases fracos, eles tendem a se manter em sua forma química não-ionizada (lipossolúvel), e, portanto, são principalmente absorvidas pelo transporte passivo lipídico, o que torna esse processo muito importante para absorção das moléculas biologicamente ativas em geral. Desse modo, os estudos biofísicos relacionados ao modo como diferentes biomoléculas interagem com o ambiente lipídico podem contribuir para um melhor entendimento dos aspectos relacionados ao transporte dessas substâncias através da matriz lipídica (*Fahr et al., 2005*).

1. INTRODUÇÃO

iv. Lipossomos como modelos de membrana

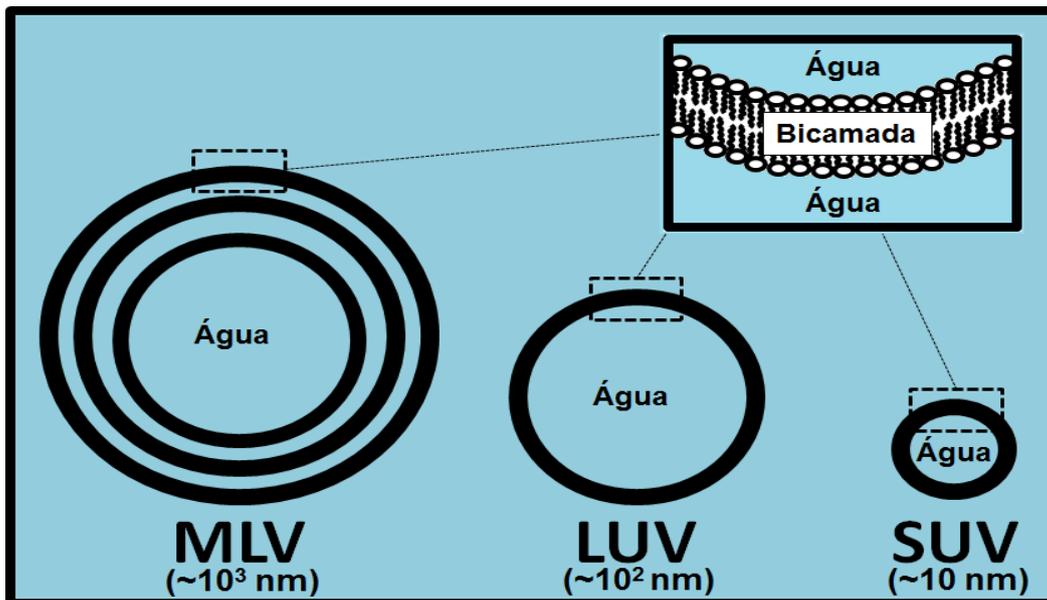


Figura 13 – Ilustração da estrutura vesicular lipídica e seus diferentes tipos: multilamelares (MLVs), unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles -LUVs) e unilamelares pequenas (Small Unilamellar Vesicles - SUVs). Fonte: elaborada pelo autor.

Lipossomos são vesículas microscópicas uni ou multilamelares que mimetizam a organização lipídica presente nas membranas biológicas, sendo os mais conhecidos (figura 13): vesícula multilamelar (MLV), unilamelar grande (LUV) e unilamelar pequena (SUV). Essas estruturas lamelares correspondem a mesofases líquido-cristalinas liotrópicas (seção 1.1B) e, portanto, formam-se espontaneamente quando determinadas concentrações de lipídios com envelope cilíndrico (seção 1.2B-ii) são dispersos em solvente polar. No caso das MLVs, as bicamadas lipídicas arranjam-se em estruturas lamelares concêntricas com volume de solvente polar entre elas (*Lasic, 1988; 1998; Matteucci e Thrall, 2000; Batista et al., 2007*) (figura 13), ou seja, as cadeias hidrocarbônicas interagem entre si de modo não covalente (forças de van der Waals) e formam uma região apolar (hidrofóbica) correspondente ao interior de cada bicamada; enquanto as regiões das cabeças polares arranjam-se de modo a formar regiões polares (hidrofílica) correspondentes às superfícies (interna e externa) de cada lamela.

O método de síntese mais simples desses lipossomos consiste na elaboração prévia de um filme lipídico, o qual ao ser hidratado (dispersão lipídica em solução polar), forma espontaneamente (“*self-assembly*”) as vesículas

1. INTRODUÇÃO

lipídicas multilamelares (figura 14). O filme é obtido através da solubilização de um lipídio (pó) em clorofórmio e posterior volatilização do solvente (aplicação de fluxo de gás nitrogênio e descanso no vácuo por no mínimo 2h). Considerando-se que vesículas multilamelares (MLVs) de diversos tamanhos são produzidas espontaneamente após a dispersão lipídica (figura 14), a obtenção de lipossomos unilamelares de tamanhos específicos (LUVs ou SUVs) requer o devido processamento dessas MLVs. Embora existam vários tipos de processamento, o do tipo mecânico é o mais comum: as LUVs são preparadas através da extrusão da dispersão de MLVs, enquanto as SUVs por sonicação.

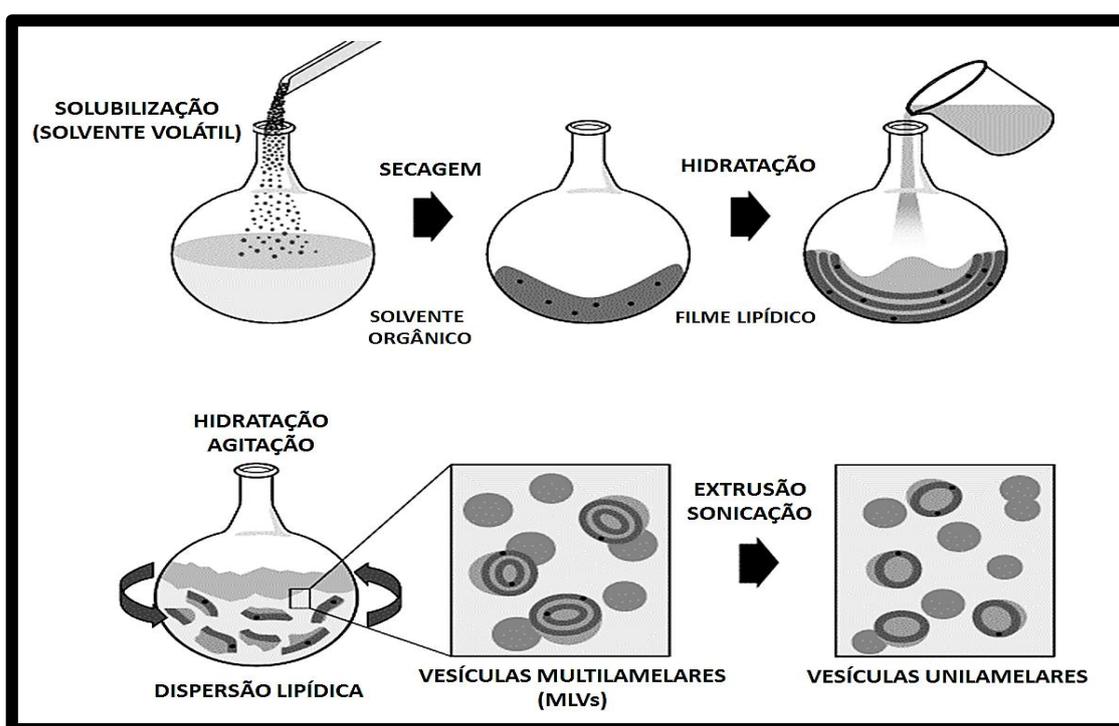


Figura 14- Ilustração do processo de formação de vesículas multilamelares (MLVs) a partir da hidratação (dispersão lipídica em água) de filmes lipídicos. O processamento das MLVs (Extrusão ou Sonicação) produz vesículas unilamelares. Fonte: figura adaptada de Avanti Polar Lipids (Web Page 5).

Em 1965, Alec Bangham empregando-se da microscopia eletrônica foi o primeiro a observar a formação dessas vesículas lipídicas, as quais por esse motivo foram inicialmente chamadas de “Banghasomes” e só, posteriormente, denominadas “liposomes” (lipossomos). (Deamer, 2010) Desse modo, desde a sua descoberta, esses sistemas são empregados há mais de 40 anos pela ciência como modelos de membrana biológica, entretanto, foi somente a partir de 1971, através dos estudos realizados por Gregory Gregoriadis, é que eles

1. INTRODUÇÃO

passaram a ter uma aplicação tecnológica e farmacológica, isto é, utilizados como veículos para liberação controlada de fármacos e de pró-fármacos (“drug delivery system”), assim como, de material genético (terapia gênica), de cosméticos, e de outras macromoléculas. Em relação a esse papel desempenhado pelos lipossomos como transportadores de macromoléculas, conforme está ilustrado na figura 16, as substâncias a serem transportadas podem ser adsorvidas na superfície polar das vesículas (moléculas hidrofílicas ionizadas), incorporadas na matriz lipídica (moléculas hidrofóbicas) ou encapsuladas no interior aquoso da vesícula (moléculas hidrofílicas não ionizadas)(*Kulkarni, 2010*). Desse modo, considerando-se o presente trabalho, espera-se que um melhor esclarecimento do modo como a natamicina interagem com vesículas lipídicas venham incentivar o desenvolvimento de novos mecanismos de transporte para essa molécula.

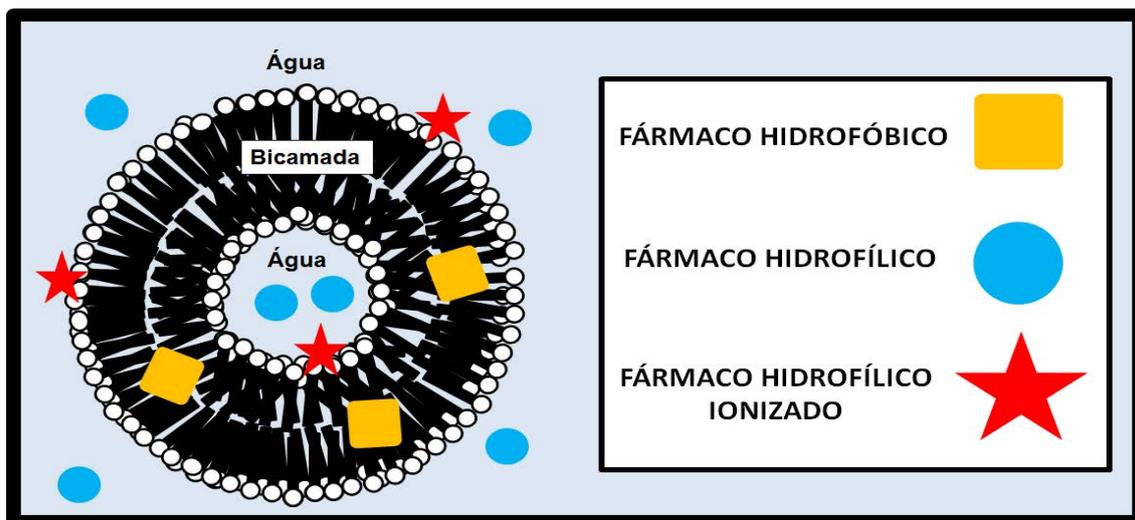


Figura 15- Ilustração dos diferentes modos de interação entre moléculas com lipossomos. Fonte: figura elaborada pelo autor e inspirada em *Kulkarni (2010)*.

1. INTRODUÇÃO

v. *Fluidez das bicamadas*

A organização da membrana plasmática é um importante determinante de sua permeabilidade seletiva e, portanto, a manutenção de um grau de fluidez adequado para a bicamada lipídica é vital para a sobrevivência celular (Stryer, 1981; Voet e Voet, 1995). Uma bicamada pode assumir duas importantes configurações (figura 16): a lamelar rígida ou ordenada ($L\beta$) e a lamelar fluida ou isotrópica ($L\alpha$), sendo a transição de uma mesofase para outra caracterizada por um valor específico de temperatura denominada temperatura de transição de fase principal (T_m). Primeiramente, considerando-se o efeito da temperatura, podemos verificar que para valores abaixo de T_m (fase $L\beta$), as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolípidios apresentam uma taxa de movimento (dinâmica) baixa, o que favorece a interação intermolecular (hidrofóbica) e o empacotamento da bicamada; enquanto que acima de T_m (fase $L\alpha$), as cadeias hidrocarbônicas apresentam grande mobilidade, o que reduz as interações intermoleculares e, conseqüentemente, favorece a fluidez da bicamada. No intervalo de temperatura de transição T_m , uma mesofase denominada como *ripple*, caracterizada pela presença de ondulação das lamelas tem sido sugerida na literatura (figura 16).

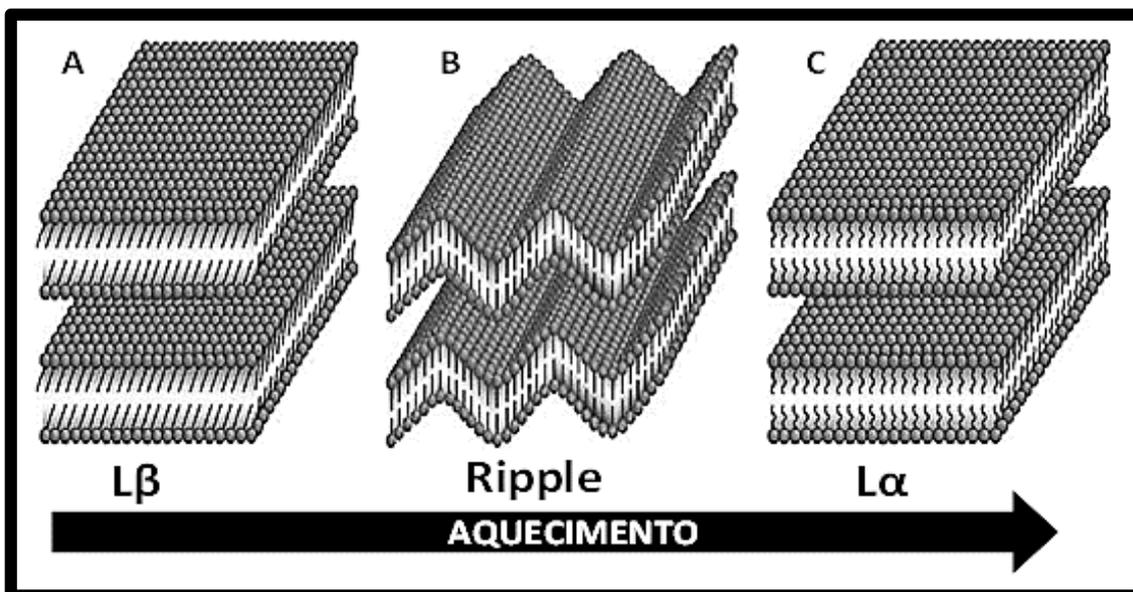


Figura 16 – Ilustração das diferentes mesofases líquido-cristalinas para estruturas lamelares lipídicas: (A) fase rígida $L\beta$, (B) fase de transição “*ripple*” e (C) fase fluida $L\alpha$. Fonte: figura adaptada de Neto e Salinas (2005).

1. INTRODUÇÃO

Em segundo lugar, além da temperatura, outros fatores que interferem na organização lipídica são: o comprimento das cadeias hidrocarbônicas e a presença de insaturações nas mesmas (*Subczynski et al., 1994*). Ao contrário das moléculas constituídas por cadeias curtas, observa-se nas moléculas detentoras de cadeias hidrocarbônicas longas que as interações intercadeias (hidrofóbicas) são bastante intensas e, conseqüentemente, contribuem para o ordenamento do sistema. Da mesma forma, ligações saturadas (C-C) determinam uma conformação *trans*, (figura 17A) na qual as cadeias se encontram estendidas, o que favorece as interações intermoleculares e a rigidez da membrana. Por sua vez, a presença de ligações insaturadas (C=C) determina a conformação do tipo *cis* (figura 17B), na qual as cadeias hidrocarbônicas apresentam “dobras” nas regiões dessas insaturações, o que reduz as interações intercadeias e, conseqüente, contribui para a fluidez do sistema (*Ziblat et al., 2011*). Essas propriedades são muito importantes, pois permitem que as células controlem a fluidez de suas membranas plasmáticas através da manutenção de fosfolipídios constituídos por cadeias hidrocarbônicas contendo comprimento e o grau de insaturação adequados. (*Subczynski e Wisniewska, 2000*).

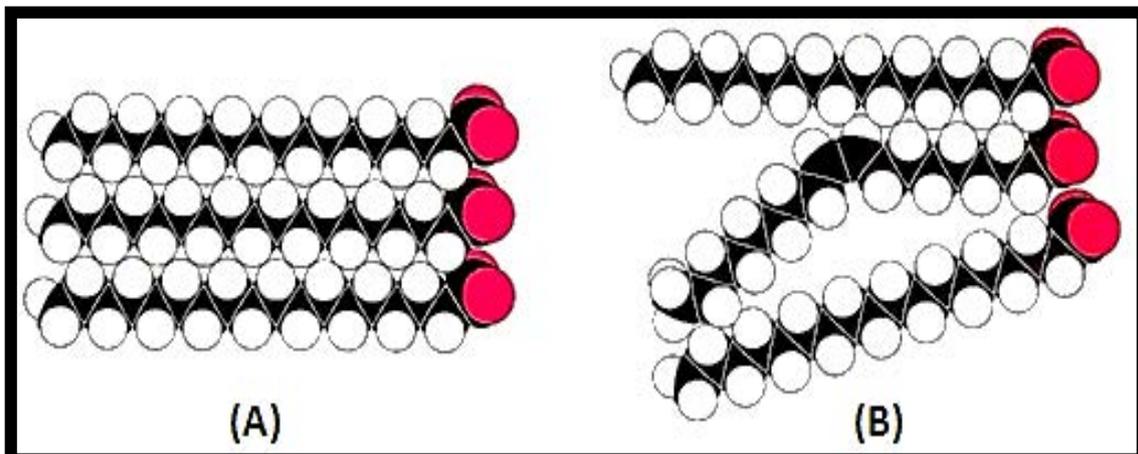


Figura 17 – Ilustração do arranjo de (A) 3 moléculas com cadeias hidrocarbônicas saturadas (conformação *trans*), e de (B) 3 moléculas sendo apenas uma delas com cadeia hidrocarbônica insaturada (conformação *cis*). Fonte: figura adaptada de *Lodish et al. (2004)*.

Finalmente, cabe mencionar a importância do colesterol no controle da fluidez das bicamadas. Como visto anteriormente (seção 1.2B-iii-b), o colesterol é um típico constituinte das membranas de animais e sua estrutura química

1. INTRODUÇÃO

cíclica e predominantemente hidrofóbica difere bastante das estrutura anfifílica dos fosfolipídios, o que impede que bicamadas puras de colesterol sejam formadas. Entretanto, a sua presença na bicamada é essencial para manutenção da fluidez do sistema, uma vez que funciona como uma impureza, isto é, a sua inserção desfavorece as interações intermoleculares entre as cadeias dos fosfolipídios, o que acaba por inibir a formação de fases extremamente rígidas mesmo diante de quedas bruscas na temperatura. Além disso, sua interação com os fosfolipídios promove a formação de uma fase predominantemente fluida, mas mais condensada que a $L\alpha$, o que, por sua vez, impede um aumento brusco na fluidez da membrana mesmo quando sujeita a um elevado incremento da temperatura. Desse modo, a fluidez das membranas biológicas também pode ser regulada através do controle de quantidades adequadas de colesterol em suas composições lipídicas. (*Subczynski et al., 1994*)

1. INTRODUÇÃO

1.3) ANTIFÚNGICOS POLIÊNCOS E A NATAMICINA

Diante do aumento de indivíduos com sistema de defesa comprometido, determinado por diversos fatores, tais como a disseminação da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e a crescente administração de fármacos imunossupressores necessários durante o tratamento de câncer e em transplantes de órgãos, os casos de doenças causadas por infecções fúngicas oportunistas se agravaram. (Greenwood et al., 2007; Kavanagh, 2011) Para resolução desse problema novos medicamentos antifúngicos têm sido empregados, dentre os quais merecem destaque os antibióticos poliênicos. (Zotchev, 2003)

Os antibióticos macrolídeos poliênicos (figura 18) são geralmente produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* e caracterizam-se por possuírem um anel macrocíclico poliol e insaturado por duplas ligações, podendo este ser glicosilado a um amino-açúcar (micosamina e isômeros) ou não. Essa configuração estrutural garante propriedades anfifílicas e eficiente atividade antifúngica a esses antibióticos. (Rychnovsky, 1995) A anfotericina B (figura 18A) e a nistatina (figura 18B), são exemplos dessa classe de substâncias que apresentam o mecanismo de ação antifúngico mais bem conhecido. (Kinsky, 1970; Greenwood et al., 2007; Kavanagh, 2011) ligam-se por afinidade ao ergosterol, que é um esteroide característico de membranas fúngicas, resultando na formação de poros ou canais, os quais aumentam a permeabilidade da membrana, ocasionando desequilíbrio homeostático e consequente morte celular. Uma consequência desse mecanismo de ação e que merece destaque refere-se à baixa indução de resistência, pois apenas fatores que alterem a disponibilidade de ergosterol nas membranas fúngicas podem reduzir a eficácia de um tratamento com antifúngicos poliênicos. (Ghannoum e Rice, 1999) Uma grande desvantagem refere-se à toxicidade e ao transporte sistêmico dessas substâncias, os quais tem sido enfrentadas através de novas formulações farmacêuticas para esses fármacos, caso da anfotericina B, para a qual formulações lipídicas e lipossômicas (Denning e Hope, 2010) são as mais recomendadas para uso terapêutico.

1. INTRODUÇÃO

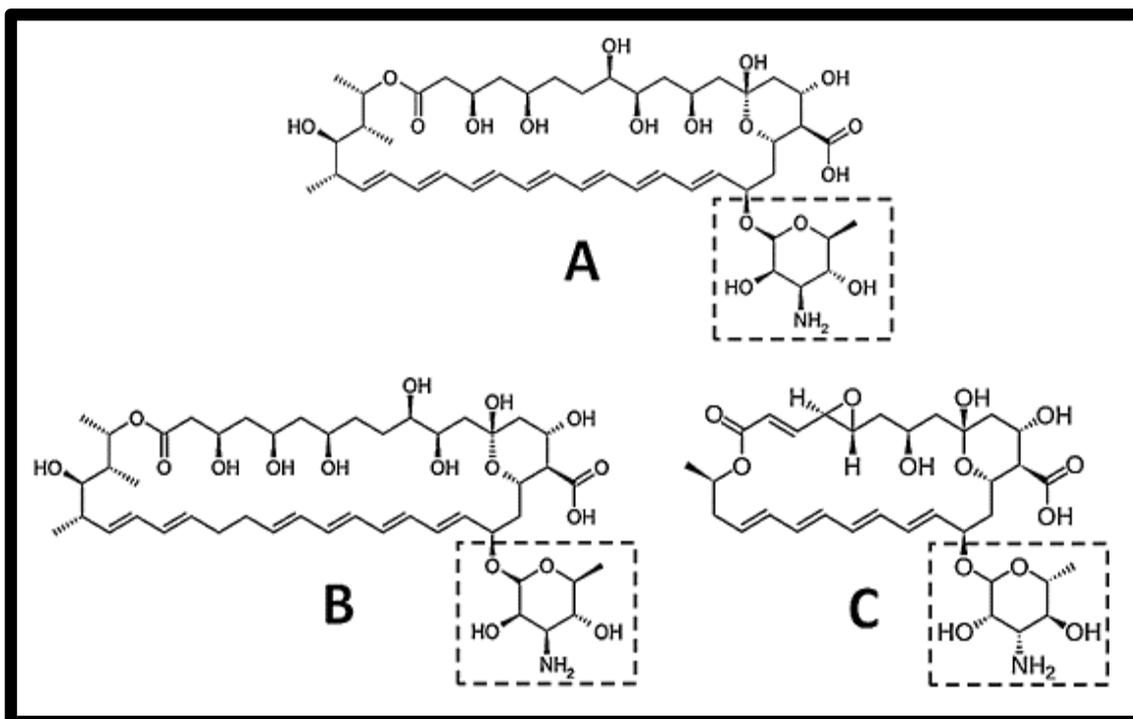


Figura 18: Ilustração da estrutura química dos antibióticos macrolídeos poliênicos: (A) anfotericina B, (B) nistatina e (C) natamicina (pimaricina). As caixas em linhas tracejadas indicam a estrutura do grupo amino-açúcar (micosamina) que é comum a todas as moléculas mostradas. Fonte: elaborada pelo autor.

A natamicina (figura 18C), também conhecida como pimaricina, é um antifúngico macrolídeo tetraêno que exibe amplo espectro de ação. Foi isolado primeiramente em 1955 a partir de amostras de solo coletadas na província de Natal, perto da cidade de Pietermaritzburg, África do Sul e, por esse motivo a bactéria responsável por sua produção foi denominada *Streptomyces natalensis*. No passado, esse antifúngico era conhecido como pimaricina, mas devido às determinações da Organização Mundial da Saúde (WHO), os antibióticos produzidos pelas bactérias do gênero *Streptomyces* deveriam possuir o sufixo “micina” em seus nomes, e desde então esse antibiótico é conhecido como natamicina. (Brik, 1981) Esse antifúngico natural é pouco solúvel em água e insolúvel na maioria dos solventes apolares. Na forma de pó e ao abrigo da luz, esse composto é extremamente estável por longos períodos de armazenamento, enquanto que sob a forma de suspensões aquosas a natamicina demonstra degradar quando exposta aos raios ultravioleta, a agentes oxidantes e a metais pesados. (Brik, 1981; Juneja et al., 2012) A aplicação da natamicina sobre a superfície de alimentos não altera suas qualidades (cor, sabor e textura) e sua ingestão é segura, isto é, a absorção oral da natamicina é praticamente nula,

1. INTRODUÇÃO

sendo, portanto, essas características justificantes do emprego desse antifúngico como conservante alimentar. (Brik, 1994; Aparicio et al., 2000; Juneja et al., 2012) Além disso, devido a sua baixa toxicidade (oral e tópica), não só é empregada como conservante, mas também no tratamento de micoses superficiais. A natamicina é o único antifúngico aprovado pelo órgão *Food and Drug Administration (FDA)* para uso oftálmico. Acreditava-se que a natamicina apresentava um mecanismo de ação similar ao aceito para a anfotericina B e nistatina, entretanto, um minucioso estudo *in vivo* e *in vitro* mostraram que embora haja uma afinidade desse antibiótico pelo esterol ergosterol, a atividade antifúngica não foi acompanhada de um aumento na permeabilidade das membranas fúngicas, (Te Welscher et al., 2008) o que, por sua vez, assegura que seu mecanismo de ação não está correlacionado à formação de poros na membrana. Curiosamente, existem muitos estudos da pimaricina abordando a sua síntese e a síntese de seus derivados, (Aparicio et al., 2000; Recio et al., 2004; Belakhov et al., 2010; Fajardo et al., 2010; Santos-Aberturas et al., 2011) novas formulações para aplicação oftálmica (Bhatta et al., 2012) e o desenvolvimento de novos sistemas poliméricos para liberação controlada, (Cong et al., 2007; Türe et al., 2009; Fajardo et al., 2010; Pintado et al., 2010; Bierhalz et al., 2012) entretanto, poucos são os artigos que investigaram seu mecanismo de ação. Dentre esses últimos destacam-se as descobertas que relatam a associação da atividade antifúngica da natamicina com um efeito inibitório tanto do processo de endocitose nas células fúngicas, (Van Leeuwen et al., 2009; Te Welscher et al., 2010) como da atividade de proteínas transmembrana de transporte. (Te Welscher et al., 2012) Por outro lado, até o nosso conhecimento não existe nenhum resultado claro que correlacione o mecanismo de ação da natamicina com as possíveis alterações no ambiente lipídico, as quais, por sua vez, seriam ocasionadas pelo estabelecimento da interação natamicina-esterol. Por essa razão, através do estudo da interação da natamicina com membranas modelos é que a presente pesquisa foi realizada.

CAPÍTULO 2

MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

*“O cientista sente-se recompensado
por aquilo a que Henri Poincaré chamou
a alegria da compreensão,
e não pelas possibilidades de aplicação
que qualquer descoberta sua possa ter.”
(Albert Einstein)*

2. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

2.1) Motivação:

Diante do aumento de indivíduos com o sistema imunológico comprometido, sejam aqueles acometidos pela SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), sejam os que são submetidos a tratamentos quimioterápicos, a incidência de infecções fúngicas oportunistas tem-se tornado um problema alarmante. Nesse cenário, os antibióticos macrolídeos poliênicos (anfotericina B, nistatina e natamicina) tem-se mostrado como boas alternativas para o tratamento de infecções fúngicas, uma vez que são naturais (produzidos por bactérias), apresentam um amplo espectro de ação, e o mais importante, não induzem resistência nos fungos durante o tratamento. Por outro lado, embora a natamicina já seja um antibiótico macrolídeo poliênico empregado topicamente para tratamento de infecções fúngicas, e também aprovado em muitos países como conservante natural de alimentos, ao contrário da anfotericina B e da nistatina, ela apresenta um mecanismo de ação ainda desconhecido.

2.2) Objetivos:

O presente trabalho visa preencher essa lacuna através de um estudo a nível molecular, ou seja, caracterizar que tipo de perturbação a presença da natamicina provoca sobre o grau organização de diversos lipídios constituintes de membranas modelo (monocamadas e lipossomos) e correlacionar esses efeitos com o mecanismo de ação desse antibiótico em membranas biológicas.

CAPÍTULO 3

ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

“A ciência é a irmã caçula da arte;

talvez bastarda.”

(César Lattes)

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

3.1) MATERIAIS E MÉTODOS

A) Reagentes

O antifúngico natamicina e os esteróis (colesterol e ergosterol) foram adquiridos de Sigma Chemical Co (figura 19). Os fosfolipídios 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dioleoi-*sn*-3-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico (POPA) (figura 19) e o lipídio 1,2-dioleoil-3-trimetil-amônio-propano (DOTAP) (figura 19), assim como os marcadores de spin, colestano (CSL), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo(tempo)colina (DOPTC) e 1-palmitoil-2-(*n*-doxil estearoil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina ($n=5, 14$ e 16) (figura 20), o tampão HEPES (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizina-ácido etanosulfônico), os tampões fosfato mono/dissódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), o cloreto de sódio (NaCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram gentilmente cedidos pelo grupo de Biofísica do IFSC-USP.

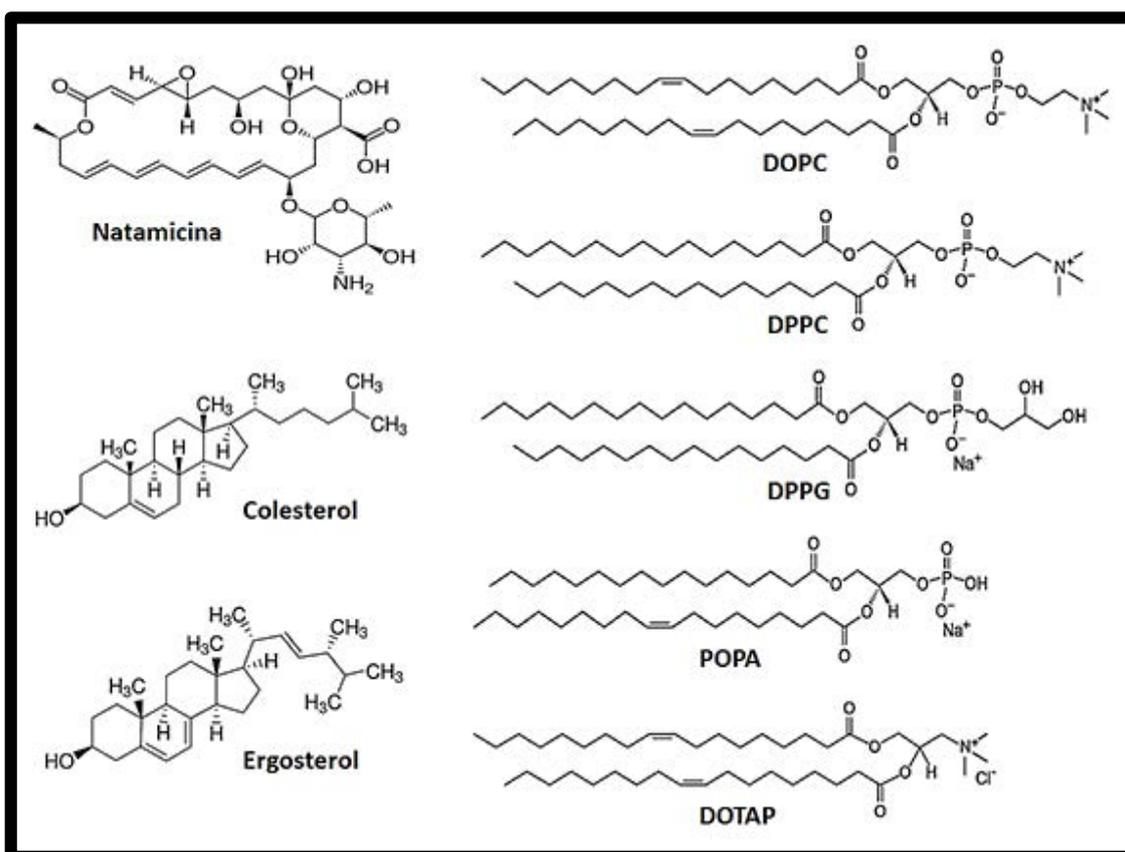


Figura 19 – Ilustração da estrutura química do antibiótico *natamicina* e dos lipídios *colesterol*, *ergosterol*, 1,2-dioleoil-fosfatidilcolina (*DOPC*), 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina (*DPPC*), 1,2-dipalmitoil-fosfatidilglicerol (*DPPG*), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico (*POPA*) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (*DOTAP*).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

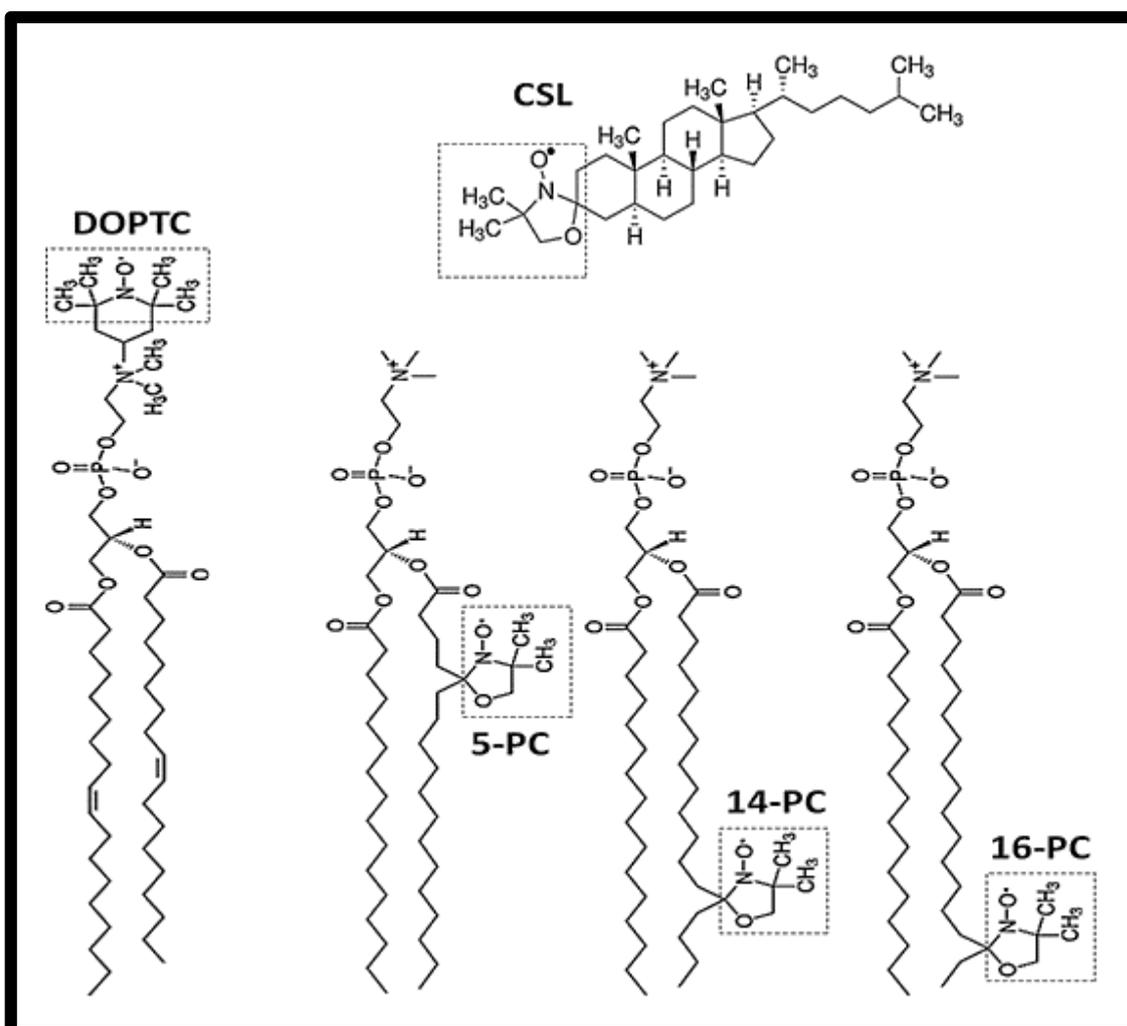


Figura 20 – Ilustração dos marcadores de spin colestano (CSL), dioleoilfosfo(tempo)colina (DOPTC), 5-(doxyl)fosfocolina (5-PC), 14-(doxyl)fosfocolina (14-PC) e 16-(doxyl)fosfocolina (16-PC). As caixas tracejadas indicam a presença do radical livre.

B) Amostras: dispersões lipídicas

As soluções estoques individuais para os lipídios (DPPC, DOPC, DPPG, POPA, DOTAP, colesterol e ergosterol) e para cada marcador de spin (CSL, 5-PC, 14-PC ou 16-PC) foram preparadas empregando-se clorofórmio como solvente hidrofóbico; enquanto que para a natamicina, o solvente empregado consistiu numa mistura polar de DMSO/água (85:15). Para o preparo das amostras analisadas por EPR, inicialmente foram elaborados filmes lipídicos pipetando-se o volume desejado de cada solução estoque em tubos de ensaio, de modo que a massa final lipídica correspondesse a 1mg e a concentração do

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

marcador de cada marcador spin não ultrapassasse 0,5% mol; removendo-se os solventes acumulados no interior desses tubos através da passagem de um fluxo ultrapuro de nitrogênio gasoso e posterior evacuação em centrífuga por uma noite toda. O colesterol ou o ergosterol, quando presentes no preparo dos filmes, apresentaram uma concentração correspondente a 20% mol ou a 50% mol. A concentração da natamicina quando presente foi de 20% mol. As dispersões lipídicas foram produzidas através da hidratação dos filmes lipídicos previamente formados empregando-se pequenos volumes (50ul) da solução tampão com o valor do pH desejado (HEPES ou fosfato mono/dissódico) acrescido de 100 mM de NaCl. O valor de pH=7,0 para o tampão HEPES foi corrigido empregando-se NaOH, enquanto o valor de pH=5,0 foi ajustado misturando-se proporções adequadas entre os tampões fosfato monossódico e o dissódico. A etapa final correspondente à formação de vesículas lipídicas multilamelares (MLVs) consistiu na homogeneização das dispersões lipídicas através da vortexação e da sonicação das mesmas acima da temperatura de transição gel-líquido cristalina característica de cada composição lipídica. As amostras analisadas termicamente por DSC foram preparadas de maneira idêntica às empregadas na EPR, entretanto, sem a adição de marcadores de spin e ajustando-se as concentrações dos componentes presentes para um volume maior de solução tampão em cada amostra (800ul).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

C) Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

i. Teoria

(Marsh, 1981)

A ressonância paramagnética eletrônica (EPR), também conhecida como ressonância do spin eletrônico (ESR) ou ressonância magnética eletrônica (RME), é o nome dado ao processo de absorção ressonante de micro-ondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, os quais devem possuir ao menos um elétron desemparelhado. Considerando-se que bicamadas e vesículas não apresentam caráter paramagnético, é necessária a utilização do método do marcador de spin, que consiste na incorporação de um grupo paramagnético (sonda) no sistema a ser analisado. No caso de estudos biofísicos envolvendo membranas modelo, esse grupamento paramagnético geralmente é o radical nitróxido ($N-O$) e a molécula que o contém pode ser inserida no sistema por meio de intercalação física entre os componentes lipídicos da bicamada.

a) O fenômeno da ressonância

(Atherton, 1993; Weil e Bolton, 2007)

Na ausência de um campo magnético externo, a magnetização total do sistema (amostra) é nula, visto que os dipolos magnéticos intrínsecos aos spins dos elétrons desemparelhados encontram-se distribuídos aleatoriamente e, conseqüentemente, não existem diferenças energéticas populacionais bem definidas. Por sua vez, se um campo magnético externo (\vec{H}_0) for aplicado numa direção fixa, após o equilíbrio térmico ser atingido, observa-se a formação de populações com níveis energéticos distintos devido à interação Zeeman, isto é, decorrentes da interação entre os dipolos magnéticos dos elétrons desemparelhados e o campo magnético aplicado (figura 21). O número de estados produzidos varia conforme o número quântico de spin M da partícula e obedece à regra $2M+1$. Como o número quântico de spin do elétron é $M=1/2$, o número de estados possíveis será dois, sendo suas energias proporcionais a $m_s=+1/2$ e $m_s=-1/2$, e portanto, os elétrons desemparelhados irão orientar-se em dois modos distintos devido a interação Zeeman: paralela (menor energia) ou antiparalela (maior energia) em relação ao campo magnético externo aplicado

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

(figura 21). Por outro lado, o núcleo também possui um momento de dipolo magnético intrínseco. Desse modo, o momento magnético nuclear pode interagir com os dipolos magnéticos eletrônicos, provocando uma perturbação energética denominada interação hiperfina ou acoplamento hiperfino. Isso provocará novamente um desdobramento de energia para os elétrons desemparelhados segundo a regra $2M_I+1$, onde agora M_I corresponderá ao valor do número quântico de spin nuclear interagente. No caso do marcador de spin (sonda) radical nitróxido, o nitrogênio apresenta número quântico de spin nuclear $M_I=1$ e, portanto, cada nível energético decorrente da interação Zeeman ($m_s=+1/2$ e $m_s=-1/2$) se desdobrará em três novos estados energéticos ($m_I=-1$, $m_I=0$ e $m_I=+1$) devido a interação hiperfina. Por fim, se a esse sistema for aplicado uma micro-onda oscilante (\vec{H}_1), verificaremos que caso o valor da frequência (ω_1) dessa micro-onda coincida com a diferença específica de energia (ΔE) entre os diferentes estados, os elétrons desemparelhados entram em ressonância, transitando entre esses níveis. Cabe lembrar, entretanto, que essa transição de energia entre os estados ressonantes é bem definida e só ocorre quando $\Delta m_s=\pm 1$ entre os estados provenientes da interação Zeeman e, quando $\Delta m_I=0$ entre os estados produzidos pela interação hiperfina (figura 21). A essa condição obrigatória denomina-se *Regra de Seleção*.

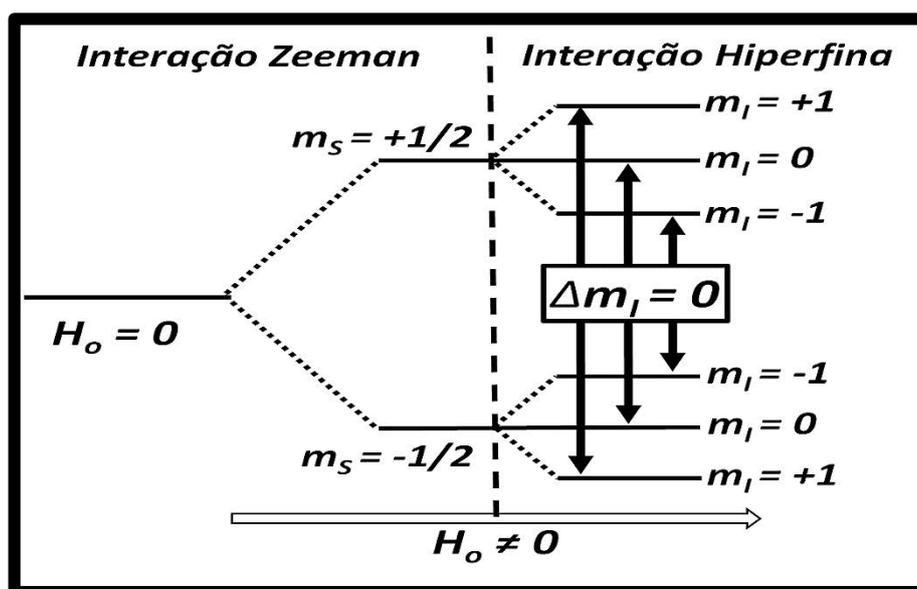


Figura 21- Ilustração dos níveis de energia adquiridos devido à interação Zeeman ($m_s=\pm 1/2$) e hiperfina ($m_I=+1, 0, -1$) típicas de um radical nitróxido onde $S=1/2$ e $I=1$. As transições de energia permitidas estão indicadas e só ocorrem para $\Delta m_I=0$. Fonte: figura adaptada de *Brustolon e Giamello (2009)*.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

b) O espectrômetro de EPR

(Marsh, 1981; Weil e Bolton, 2007; Brustolon e Giamello, 2009)

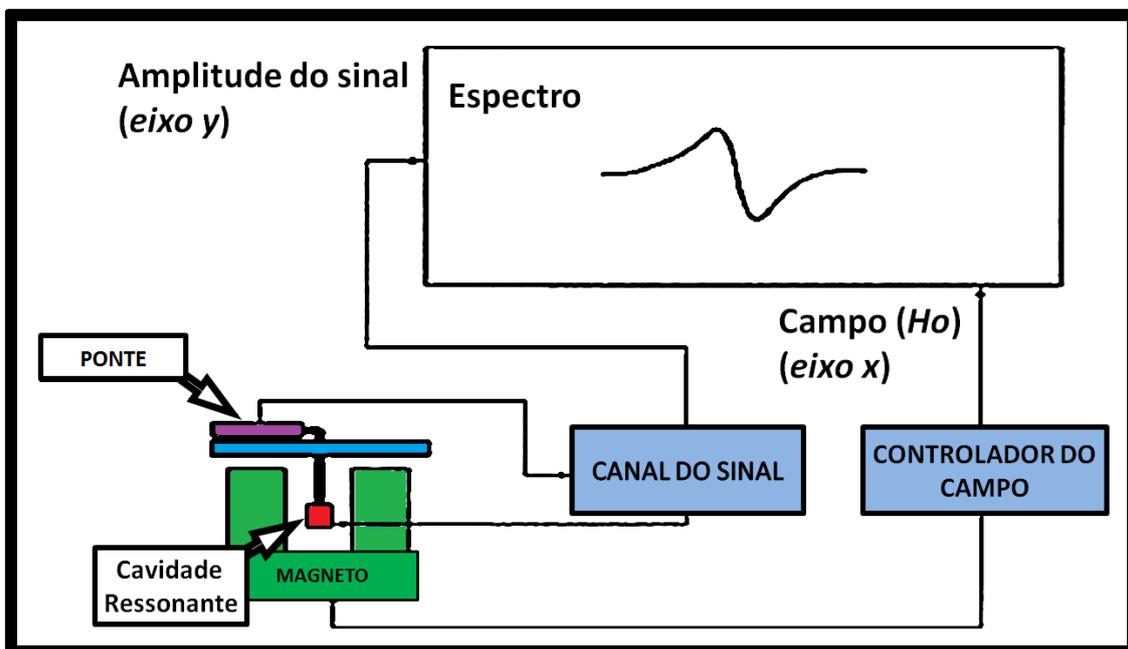


Figura 22 – Diagrama de blocos do espectrômetro de EPR: ponte, cavidade ressonante, magneto e espectro de EPR. Fonte: figura adaptada de Brustolon e Giamello (2009).

A figura 22 é um diagrama de blocos de um espectrômetro típico de EPR. A ponte de micro-ondas contém tanto a fonte produtora de micro-onda, como um detector. A micro-onda de banda (frequência) fixa produzida na ponte incide sobre a amostra que está numa cavidade localizada entre ímãs geradores do campo magnético (\vec{H}_0), cuja intensidade é convenientemente variada dentro de um intervalo desejado. Após a ocorrência do fenômeno da ressonância e consequente absorção de energia pela amostra, a micro-onda refletida retorna para a ponte e terá sua intensidade detectada. A diferença entre a intensidade da micro-onda incidente e refletida será correspondente a intensidade de energia absorvida pela amostra, sendo essa quantidade adquirida para cada valor do campo magnético varrido num espectro que geralmente corresponde à primeira derivada de um espectro de absorção.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

c) O espectro de EPR

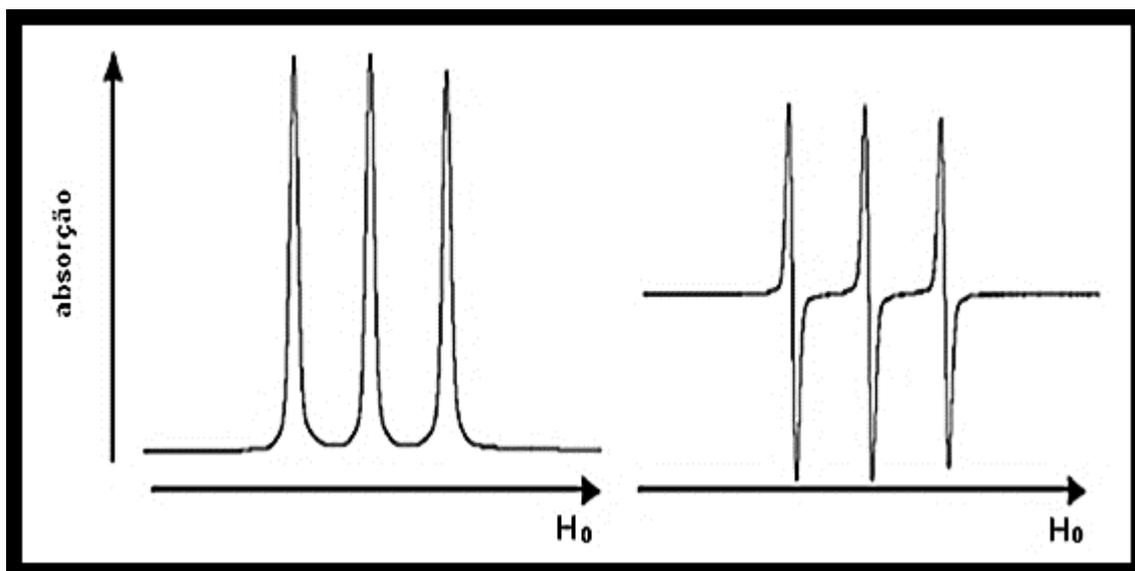


Figura 23 - Exemplo de espectros de movimento rápido obtidos para o radical nitróxido: (a) espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro de absorção. Fonte: elaborada pelo autor.

O espectro de EPR de marcadores de spin anfífilos incorporados a agregados lipídicos corresponde à primeira derivada (figura 23b) do espectro de absorção (figura 23a) para um dado marcador de spin e ele informa sobre a microviscosidade e a polaridade da região onde se encontra o grupo paramagnético. (Marsh, 1981; Ge e Freed, 1998; Brustolon e Giamello, 2009) Esse grupo sonda pode tanto estar ligado à cabeça polar do anfífilo, portanto informando sobre propriedades da interface do agregado com o meio aquoso, como estar ligado a um dos carbonos da cadeia acila do anfífilo. No caso do radical nitróxido (grupo sonda), cujo espectro de EPR é caracterizado pela presença de três linhas hiperfinas (figura 23b) devido às três transições energéticas permitidas (ver seção 4.C-i-(a)) (Atherton, 1993; Weil e Bolton, 2007) durante a ressonância, a assimetria desse radical torna seu espectro de EPR sensível ao ordenamento da região onde ele se encontra. Portanto, as linhas espectrais são muito sensíveis ao grau de ordenamento e de mobilidade dos marcadores de spin. (Schneider e Freed, 1989b; Fernandez e Lamy-Freund, 2000) Desse modo, uma análise direta dos dados obtidos com a técnica de EPR pode ser realizada através do estudo comparativo entre as medidas das alturas e das larguras das linhas espectrais. (Marsh, 1981; Fernandez e Lamy-Freund, 2000; Turchiello et al., 2000; Duarte et al., 2008) Considerando-se que os

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

espectros isotrópicos monitoram regiões mais fluidas, enquanto espectros anisotrópicos são característicos de sistemas mais viscosos, dentre os parâmetros utilizados na análise direta destacam-se:

- a razão entre as alturas (figura 24) dos picos para o campo baixo e central (h_{+1}/h_0) ou entre o campo alto baixo e central (h_{-1}/h_0): um valor próximo de uma unidade indica que as alturas dos diferentes picos apresentam valores semelhantes e, portanto, maior será a isotropia do sistema, ou seja, maior o grau de fluidez.
- larguras do pico (figura 24) para campo central (Δh_0), para campo baixo (Δh_{+1}) e para o campo alto (Δh_{-1}): quanto maior a largura dos picos, maior será anisotropia do sistema, ou seja, maior a viscosidade.

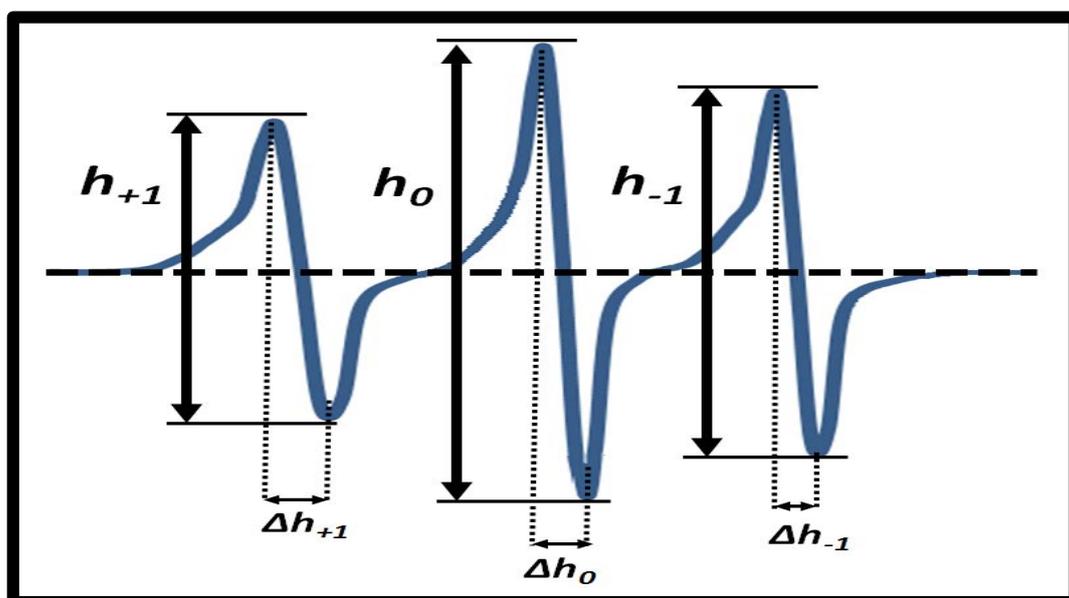


Figura 24- Ilustração esquemática de um espectro isotrópico mostrando os picos baixo ($m=+1$), central ($m=0$) e alto ($m=-1$) e suas respectivas alturas (h) e larguras (Δh). Fonte: elaborada pelo autor.

Cabe lembrar ainda, que como as características espectrais são influenciadas tanto pelo tipo de marcador utilizado, assim como, pelas alterações de vizinhanças que eles monitoram, certos espectros de EPR podem apresentar picos pouco definidos, o que determina uma baixa sensibilidade para uma análise direta das medidas de suas linhas e, portanto, nesses casos uma análise indireta via simulação espectral é mais adequada. (Schneider e Freed, 1989a; Fernandez e Lamy-Freund, 2000)

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

ii. Experimental

Os espectros de EPR de radiação contínua foram obtidos empregando-se o espectrômetro de EPR da Varian modelo E-109. A frequência da micro-onda foi mantida fixa (banda 9 GHz e potência 10 mW), enquanto o campo magnético (campo central de 3265 G) aplicado foi variado dentro um intervalo correspondente a 140 G, para um intervalo de tempo de cada varredura (“scan”) correspondente a 120s. Os valores para a modulação (0,5 ou 1,0) e para o ganho foram variados visando-se a redução do ruído nas aquisições. O número de pontos por varredura foi fixado em 2048 e a constante de tempo empregada foi de 64ms.

No caso das MLVs de DPPC, de DPPG, ou POPA os espectros para cada tipo de marcador foram obtidos para diferentes valores de temperatura, visando-se monitorar a organização lipídica sob a *fase gel*, de *transição principal* (“ripple”) e *fluida*. Por outro lado, para o caso particular dos lipídios DOPC e DOTAP, os quais apresentam temperatura de transição muito baixas (negativas ou próximas de 0°C), (Hirsch-Lerner e Barenholz, 1998; Zhou et al., 1999; Regelin et al., 2000; Ge e Freed, 2003) não foram realizados estudos envolvendo a variação da temperatura. Nesses casos, as medidas de EPR foram coletadas à temperatura ambiente (24°C), para a qual as MLVs desses lipídios se encontram já na fase *fluida*.

As análises dos dados obtidos com a técnica de EPR foram realizadas apenas diretamente, a qual consistiu no estudo comparativo dos valores medidos para as alturas das linhas espectrais (seção anterior). Essas medidas diretas correspondem a médias de no mínimo três repetições e quando não mostrados, os erros são inferiores a 5%.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

B) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

i. Teoria

A análise térmica de materiais pode ser realizada por um conjunto variado de técnicas, entretanto, todas elas visam um mesmo objetivo: medir a resposta de um material diante de um aquecimento ou de um resfriamento, permitindo, assim, determinar correlações entre propriedades físicas do material analisado em relação a variações de temperatura (*Hatakeyama e Liu, 1998*). A calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry - DSC*) é a técnica mais amplamente utilizada para análise térmica de materiais e consiste na medição da diferença de fluxo de calor para uma amostra em relação a uma referência diante de uma variação linear de temperatura, à pressão constante (*Gabbott, 2008; Menczel e Prime, 2009*).

a) O aparelho de DSC

(Gabbott, 2008; Menczel e Prime, 2009)

Um aparelho de DSC, que utiliza o princípio de compensação de potência, é basicamente composto por duas células, sendo uma destinada à amostra e outra à referência, as quais se apresentam isoladas adiabaticamente do ambiente. Cada uma contém acoplada uma resistência, que é responsável pelo fornecimento de calor individual, e um sensor de temperatura (figura 25). A temperatura entre as células é mantida invariável, mas ambas são aquecidas ou resfriadas linearmente conforme o intervalo de temperatura desejado. Quando a célula contendo a amostra absorve ou libera calor, ela exige que uma maior ou menor potência seja fornecida, respectivamente, para que a sua temperatura seja mantida coincidente com a da referência. Desse modo, essa variação de potência de energia fornecida entre a referência é convertida em curvas de **calor específico (C_p) vs. Temperatura (T)**, que são também conhecidas como perfis calorimétricos. Esse fato pode ser justificado, considerando que uma maior (menor) potência implica numa maior (menor) quantidade de calor a ser fornecida para que o sistema varie sua temperatura, indicando, portanto, um aumento (decréscimo) do calor específico (**C_p**) dessa amostra. Essas variações quanto ao calor específico estão correlacionadas a alterações físico-químicas na

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

amostra, e, portanto, resultam no monitoramento de diferentes propriedades assumidas pelo sistema em função da temperatura.

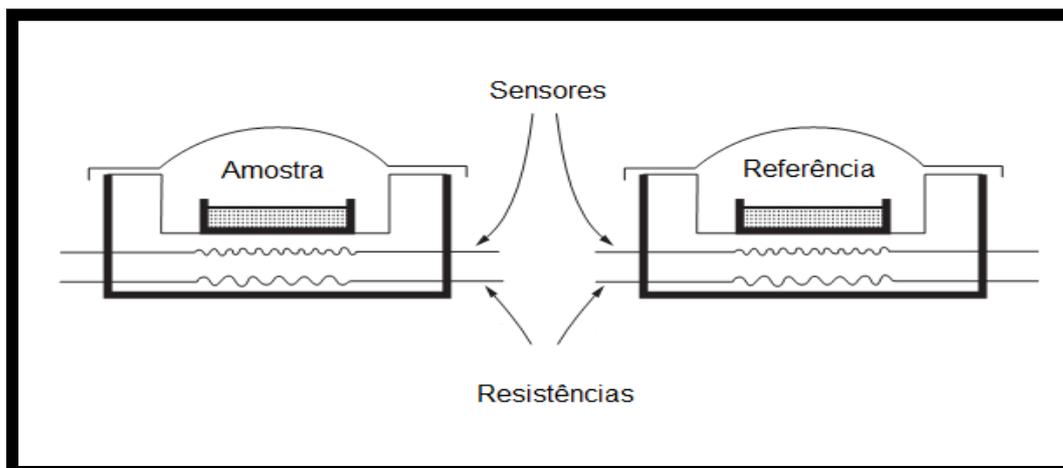


Figura 25- Ilustração esquemática de um aparelho de DSC de compensação de potência: duas células (uma para a amostra e outra para a referência) contendo resistências e sensores de temperatura individuais. A temperatura entre as células é mantida invariável durante um resfriamento ou aquecimento das células através de variações na potência da resistência da amostra. Fonte: figura adaptada de *Menczel e Prime (2009)*.

b) Os perfis calorimétricos

(Chapman et al., 1974; Gabbott, 2008)

A técnica de DSC é bastante empregada para o estudo das transições de fase de membranas modelo e de diversos materiais orgânicos ou não. Nesse caso, essa técnica é utilizada para detectar os intervalos de temperatura em que as transições de fase ocorrem à pressão constante, através da medição de picos ou de vales de calor específico (C_p) em função da temperatura (T), os quais corresponderão a curvas de calor absorvido ou liberado, respectivamente (figura 26). Ainda, como tanto a altura, quanto a forma dessas curvas podem variar, elas são também conhecidas como perfis calorimétricos, cujas características estão intimamente associadas com as propriedades físico-químicas de cada sistema. Por exemplo, na figura 26, pode-se observar um processo endotérmico seguido por um exotérmico para uma mesma amostra. Esse comportamento pode ser explicado por uma transição com perda de organização estrutural (pico), seguida por uma transição com ganho de organização (vale). Esta última é característica de materiais que apresentam uma propriedade de recristalização, a qual é produzida geralmente devido a uma perda de solvatação em suas estruturas.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

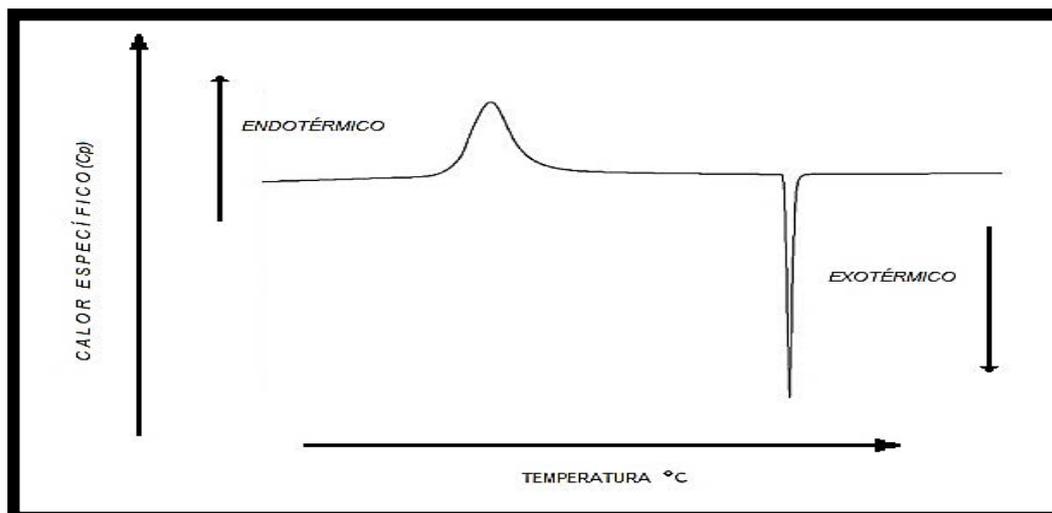


Figura 26- Ilustração de um perfil calorimétrico contendo um processo endotérmico e outro exotérmico para uma mesma amostra. A primeira estrutura (pico) corresponde a um aumento do calor específico e, portanto, refere-se a uma transição típica de um estado mais organizado para um menos organizado. A segunda estrutura (vale) corresponde à perda de calor específico pela amostra, isto é, perda de solvatação (recristalização), referindo-se a uma transição de um estado menos organizado para um mais organizado. Fonte: figura adaptada de *Gabbott (2008)*.

Sistemas constituídos por apenas fosfolipídios e água costumam apresentar um pico característico de transição de fase em seus perfis calorimétricos. A carga das cabeças polares lipídicas, valor de pH, força iônica, assim como o comprimento das cadeias hidrocarbônicas são exemplos de fatores que podem alterar o modo como lipídios interagem entre si e com outras biomoléculas, o que é refletido também em alterações de perfis calorimétricos. Em perfis calorimétricos representados por picos de formas simétricas pode-se estimar a cooperatividade de transição desses sistemas, a qual será proporcional à medida da largura a meia altura desses picos em curvas DSC: uma perda na cooperatividade de um sistema (alargamento do pico) corresponde a um decréscimo na quantidade média de lipídios que transicionam uniformemente de um estado a outro para um dado valor ou intervalo de temperatura, e vice-versa.

Além disso, como a integral da área das curvas calorimétricas de *calor específico x temperatura* correspondem à entalpia de transição (ΔH), (*Heimburg e Biltonen, 1994; Heimburg, 1998*) cujo valor se refere à energia envolvida num processo de transição, pode-se determinar a quantidade de energia total (calor)

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

que deve ser fornecida (processo **endotérmico**, $\Delta H > 0$) ou liberada (processo **exotérmico**, $\Delta H < 0$) da amostra para que haja uma mudança de fase. Uma redução no valor de ΔH , a qual foi correlacionada a uma perda na intensidade de interação (forças de van der Waals) entre as cadeias hidrocarbônicas, (Ohline et al., 2001) assume a mesma interpretação empregada para um efeito de alargamento no pico de transição calorimétrica, e, portanto, geralmente refere-se à presença de impurezas que determinem que um sistema lipídico transicione de modo não-uniforme (menos cooperativo). (Chapman et al., 1974; McMullen e Mcelhaney, 1997; Prenner et al., 1999; Mannock, D.A. et al., 2010)

Desse modo, os parâmetros mais estudados por essa técnica em processos de transição de fase são (figura 27):

- **T_{on}**: temperatura do início da transição,
- **T_{off}**: temperatura do final da transição,
- **T_m**: temperatura de transição de fase principal, geralmente correspondente à temperatura em que 50% da transição está completa,
- **ΔH**: entalpia de transição normalizada por mol ou por unidade de massa,
- **C_p**: calor específico, que correspondente a quantidade de calor (por mol ou por unidade de massa) requerido para variar em 1° a temperatura da amostra à pressão constante.

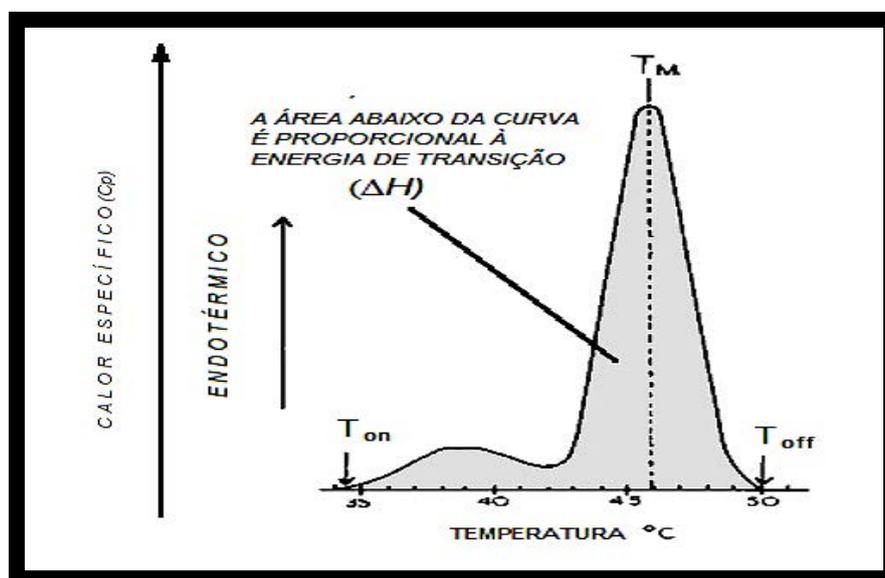


Figura 27- Ilustração esquemática de um perfil calorimétrico de uma transição endotérmica para um sistema lipídio-água. Os parâmetros T_{on} , T_m e T_{off} correspondem às temperaturas de início, de fase principal e do final de transição, respectivamente. A área abaixo da curva correspondente a energia principal absorvida na transição (ΔH). Fonte: figura adaptada de Chapman et al. (1974).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

ii. Experimental

As medidas calorimétricas foram realizadas à pressão constante em um microcalorímetro de alta sensibilidade da Microcal e modelo VP-DSC, empregando-se os seguintes parâmetros: uma taxa de varredura de 30 °C/h, intervalo de variação da temperatura entre 20 °C a 65 °C e tempo de espera (equilíbrio térmico) de 10 minutos. As subtrações das linhas de base e as integrais (entalpia de transição) dos perfis calorimétricos foram realizadas no software ORIGIN também da Microcal. Nos perfis calorimétricos é possível monitorar as temperaturas de pré-transição (T_p) e a transição principal (T_m), caso as transições de fase ocorram no sistema para o intervalo de temperatura considerado. Além disso, como a cooperatividade de um sistema é proporcional à medida da largura a meia altura do pico de transição ($\Delta T_{1/2}$) nas curvas de DSC, para cada perfil calorimétrico esse parâmetro foi determinado. A integral referente à área das curvas calorimétricas de calor específico vs. temperatura, foram também calculadas, a qual corresponde à entalpia de transição (ΔH), cujo valor equivale à energia total envolvida no processo de transição da fase observado.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

3.2) RESULTADOS

A) Espectros de EPR

i. Efeito da natamicina em MLVs de DPPC

Relembrando-se que o lipídio zwitteriônico fosfatidilcolina (PC) é fosfolipídio mais abundante presente nas membranas biológicas, nossos estudos focaram-se inicialmente na investigação do efeito da natamicina em modelos de membrana correspondentes a vesículas multilamelares (MLVs) constituídas pelo fosfolipídio saturado dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) dispersas em tampão HEPES (pH=7,0 e [NaCl] = 100mM) e submetidas a 3 valores de distintos de temperatura. Considerando-se que a transição da fase gel para a líquido-cristalina (T_M) do DPPC ocorre em torno dos 41 °C, (*Mansour e Zografi, 2007; Mannock, D. A. et al., 2010*) os valores de temperatura monitorados para essas MLVs foram selecionados visando-se estudar essas MLVs em diferentes fases de organização: fase gel (25 °C), fase próxima da T_M do DPPC e da temperatura média do corpo humano (37 °C), e fase fluida (45 °C). Lembrando-se que essas MLVs não apresentam radicais livres em sua composição, o monitoramento da região próxima à superfície das bicamadas foi garantida através da inserção do marcador 5-PC, enquanto o interior hidrofóbico das bicamadas, pela incorporação dos marcadores CSL ou 14-PC.

Como pode ser observado nas figuras presentes no anexo I, nossos resultados indicam que a presença de 20% mol de natamicina (linha vermelha) não altera o perfil, nem as larguras das linhas dos espectros de EPR das MLVs puras de DPPC (linha preta) tanto na região próxima à superfície das bicamadas (figura 66), quanto no interior hidrofóbico das bicamadas (figura 67) e (figura 72). Essas observações demonstram que a natamicina não afeta a dinâmica, nem a organização lipídica das MLVs puras de DPPC para as regiões das bicamadas analisadas.

Por fim, ainda observando-se as figuras no anexo I, podemos notar que o efeito da natamicina em MLVs de DPPC incorporadas de 20% mol de esterol (colesterol ou de ergosterol) também foi estudado. Novamente, nossos resultados mostram que a presença da natamicina (linha vermelha) não modifica o perfil, nem as larguras das linhas dos espectros de EPR, o que indica que a

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

natamicina não perturba a dinâmica, nem a organização molecular das MLVs de DPPC (linha preta), mesmo quando essas incorporadas pelos esteróis colesterol (figuras 68, 69 e 73) ou ergosterol (figuras 70, 71 e 74).

ii. Efeito da natamicina em MLVs de DOPC

Conforme visto da seção anterior, nenhuma alteração pôde ser notada adotando-se o fosfolipídio zwitteriônico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), caracterizado por possuir cadeias hidrocarbônicas saturadas. Desse modo, com o intuito de verificarmos se o grau de insaturação presente nas cadeias hidrocarbônicas afetariam a sensibilidade das vesículas multilamelares (MLVs) de fosfatidilcolina (PC) em relação a presença da natamicina, realizou-se um novo estudo empregando-se MLVs constituídas pelo fosfolipídio zwitteriônico dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), o qual difere do DPPC por apresentar em cada cadeia hidrocarbônica uma insaturação por dupla ligação. Considerando-se que a transição da fase gel para a líquido-cristalina (T_M) do DOPC é negativa (em torno dos -18°C), (Zhou *et al.*, 1999; Ge e Freed, 2003) os espectros de EPR foram obtidos apenas à temperatura ambiente (24°C), uma vez que para qualquer valor positivo para a temperatura, as MLVs de DOPC encontrar-se-iam no estado fluido.

Nesse caso, como pode ser visto nas figuras presentes no anexo II, a presença da natamicina (linha vermelha) não promove nenhuma alteração significativa nos espectros de EPR para as MLVs de DOPC (linha preta), tanto na região das cabeças polares monitoradas pelo marcador DOPTC (anexo II, figura 75), como no interior hidrofóbico das bicamadas monitorado pelos marcadores 14-PC (figura 76) e CSL (figura 77), mesmo quando a essas MLVs são incorporadas 20% mol de esterol (colesterol ou ergosterol) em sua composição.

Em resumo, esses resultados iniciais obtidos para as MLVs de DOPC somados aos observados na seção anterior para as MLVs de DPPC, indicam que, para as configurações experimentais selecionadas, isto é, empregando-se os fosfolipídios zwitteriônico de fosfatidilcolina (PC) dispersos em tampão HEPES (pH=7,0 e [NaCl]=100mM), o efeito da natamicina é desprezível

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

independentemente da presença ou da ausência de insaturações ao longo das cadeias hidrocarbônicas do PC. Da mesma forma, a incorporação ou não de 20% mol de esterol aparentemente não afeta a sensibilidade das MLVs de PC diante da presença de natamicina.

iii. Efeito da natamicina em MLVs carregadas negativamente (POPA) ou positivamente (DOTAP)

Finalmente, uma vez que nenhuma alteração significativa pode ser constatada empregando-se fosfolipídios zwitteriônicos de fosfatidilcolina (PC), com o objetivo de verificarmos se a carga líquida das cabeças polares lipídicas era um fator importante para interação da natamicina com os sistemas lipídicos, foram obtidas medidas de EPR à temperatura ambiente (24 °C) para MLVs constituídas por lipídios carregados positivamente de dioleoiltrimetilamônio (DOTAP) ou negativamente carregados de palmitoiloleoilfosfatídico (POPA), os quais foram dispersos em soluções tampões ajustadas para dois valores distintos de pH: 7,0 e 5,0. Esses valores de pH não foram escolhidos ao acaso, mas porque representam um valor acima e um abaixo em relação ao $pI=6,5$ da natamicina e, portanto, referem-se a uma configuração na qual a natamicina se encontra com carga líquida negativa e positiva, respectivamente. Os esteróis (colesterol ou ergosterol) quando presentes apresentaram 50% mol de concentração, enquanto a natamicina, 20% mol.

Primeiramente, a seguir estão plotados os espectros de EPR obtidos para MLVs positivamente carregadas de DOTAP (figuras 28 e 29) ou negativamente carregadas de POPA (figuras 30 e 31) dispersas em tampão HEPES ($pH=7,0$ e $[NaCl]=100mM$), para os marcadores DOPTC e 16PC. Nesses espectros, a mudança mais significativa foi monitorada apenas pelo marcador 16-PC incorporado no sistema lipídico de DOTAP/colesterol (1:1), para o qual verifica-se que a presença de 20% mol de natamicina tornou o espectro mais isotrópico (figura 29), isto é, houve um aumento no valor da razão entre as alturas dos picos para campo baixo e central (h_{+1}/h_0) como pode ser visto na tabela 1.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

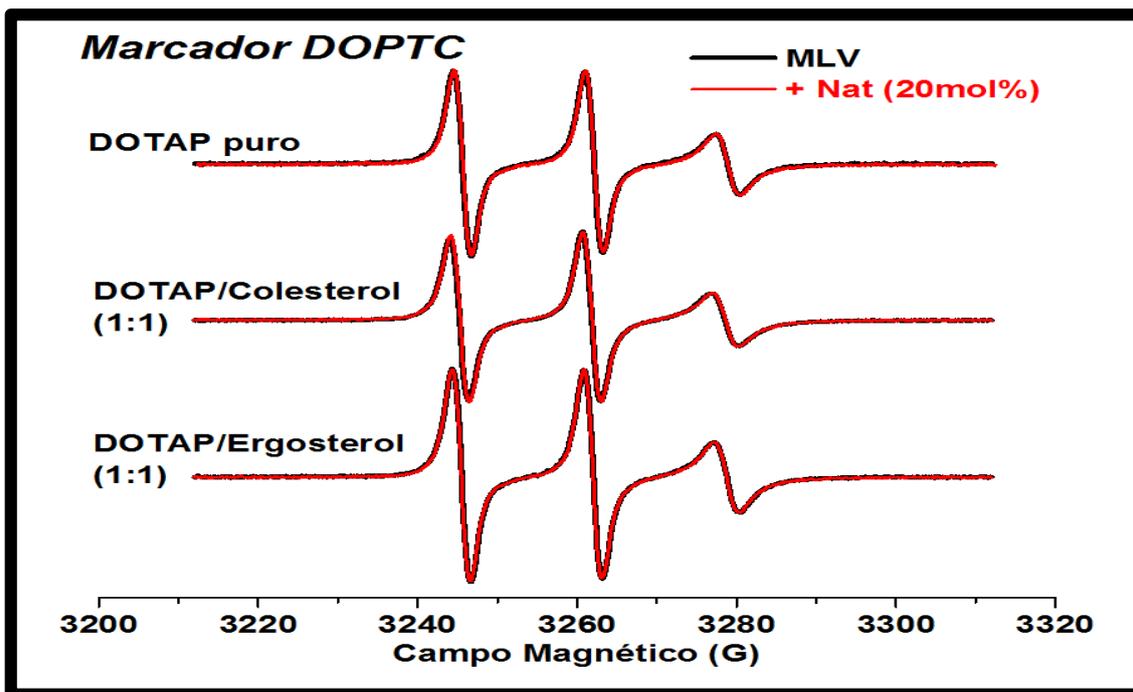


Figura 28 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

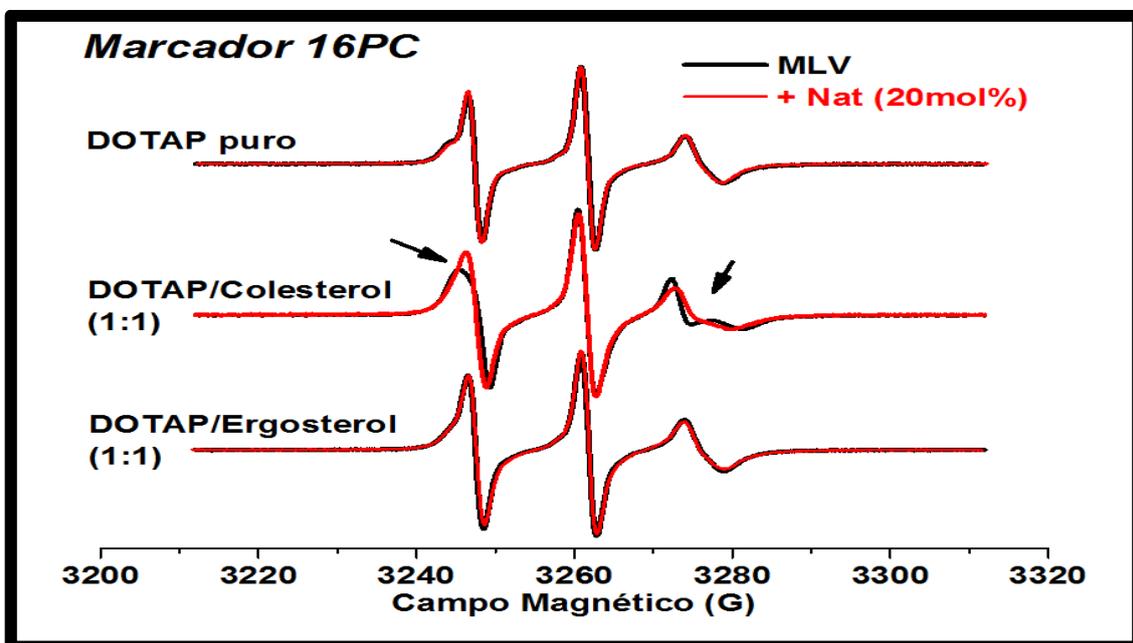


Figura 29 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). As setas pretas indicam regiões espectrais modificadas

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

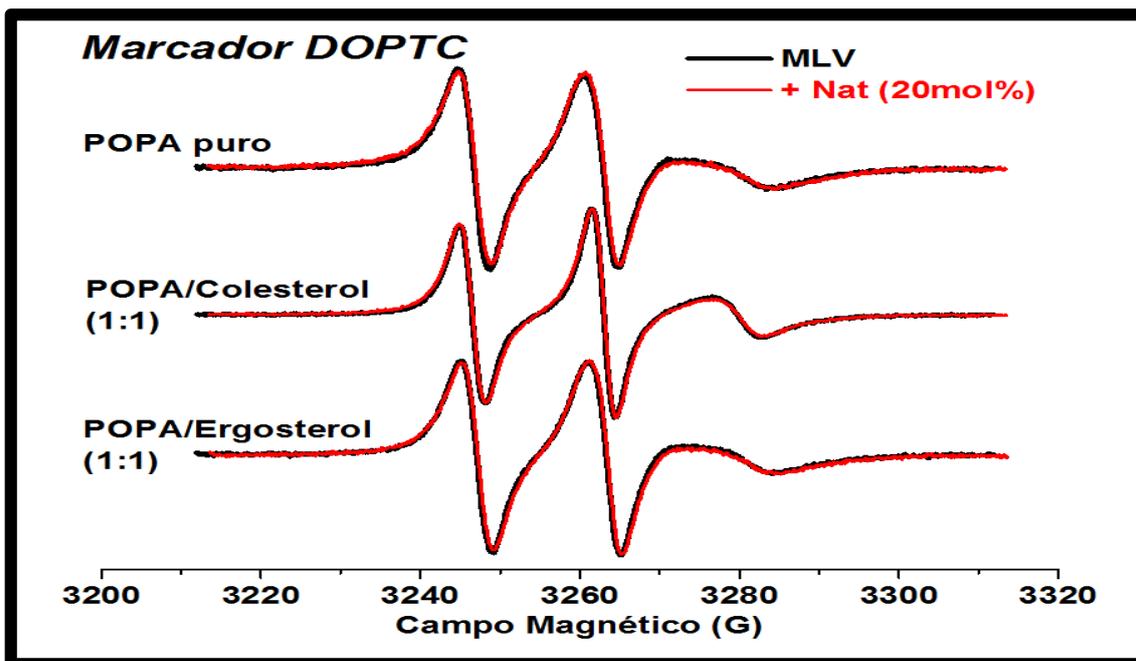


Figura 30 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

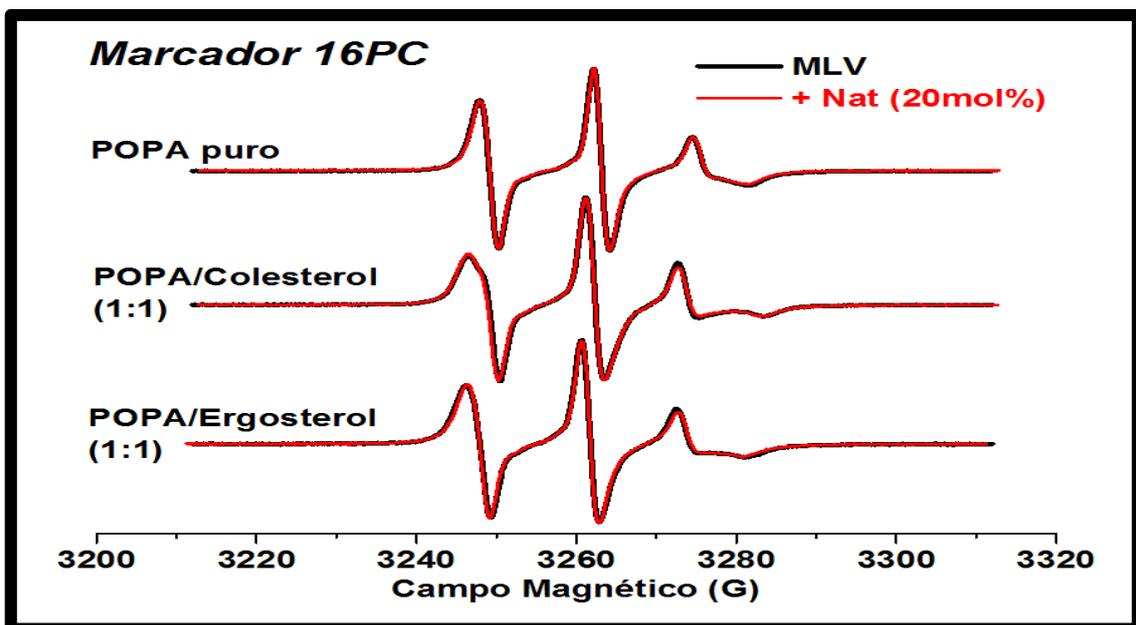


Figura 31 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Tabela 1– Valores médios das alturas dos picos para campo baixo (h_{+1}) e central (h_0). Erros inferiores a 5%.

Sistema	h_{+1}	h_0	h_{+1}/h_0
DOTAP/Col (1:1)	0,6475	1,00	0,6475
+ 20% mol NAT	0,7404	1,00	0,7404
Diferença	0,0929	0	0,0929

A razão entre as alturas do pico baixo e central (h_{+1}/h_0) e a diferença entre elas é mostrada.

Em segundo lugar, os experimentos anteriores foram repetidos, empregando-se os mesmos lipídios e as mesmas condições experimentais, exceto para o valor do pH, o qual foi ajustado para pH=5,0, cujo valor é inferior ao anteriormente utilizado (pH=7,0). Desse modo, a nova solução tampão constituiu-se de 100mM de fosfato mono/dissódico ([NaCl]= 100mM) e os esteróis (colesterol ou ergosterol) quando presentes apresentaram 50% mol de concentração, enquanto a natamicina, 20% mol. A seguir, encontram-se os espectros de EPR obtidos em pH=5,0 para as MLVs positivamente carregadas de DOTAP (figuras 32 e 33) e para negativamente carregadas de POPA (figuras 34 e 35).

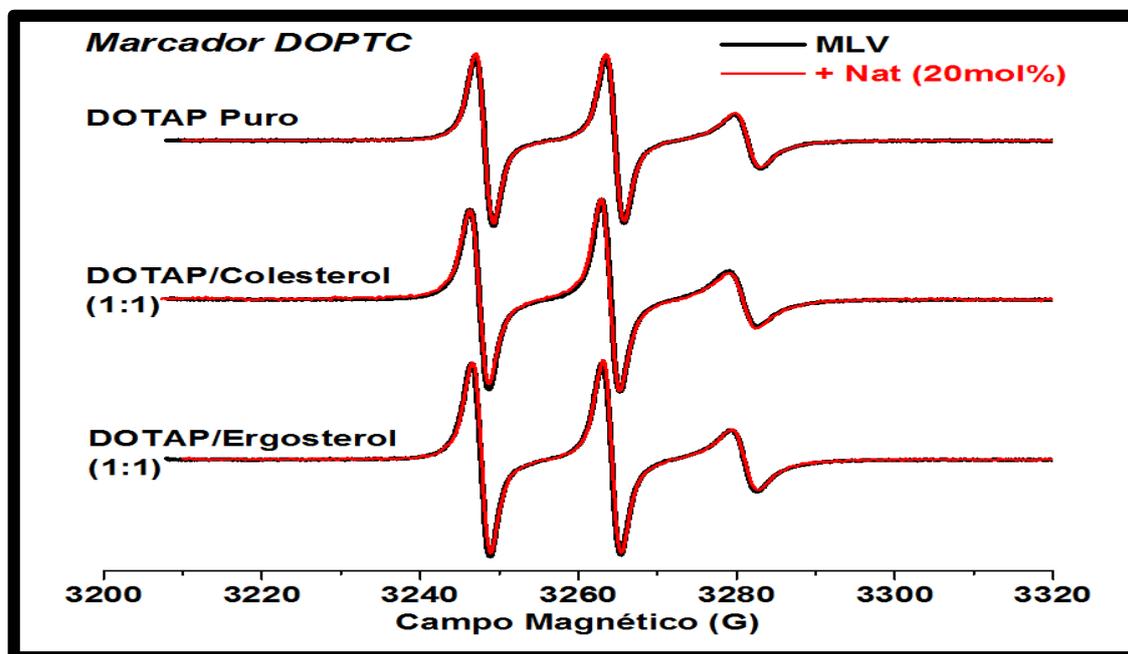


Figura 32 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

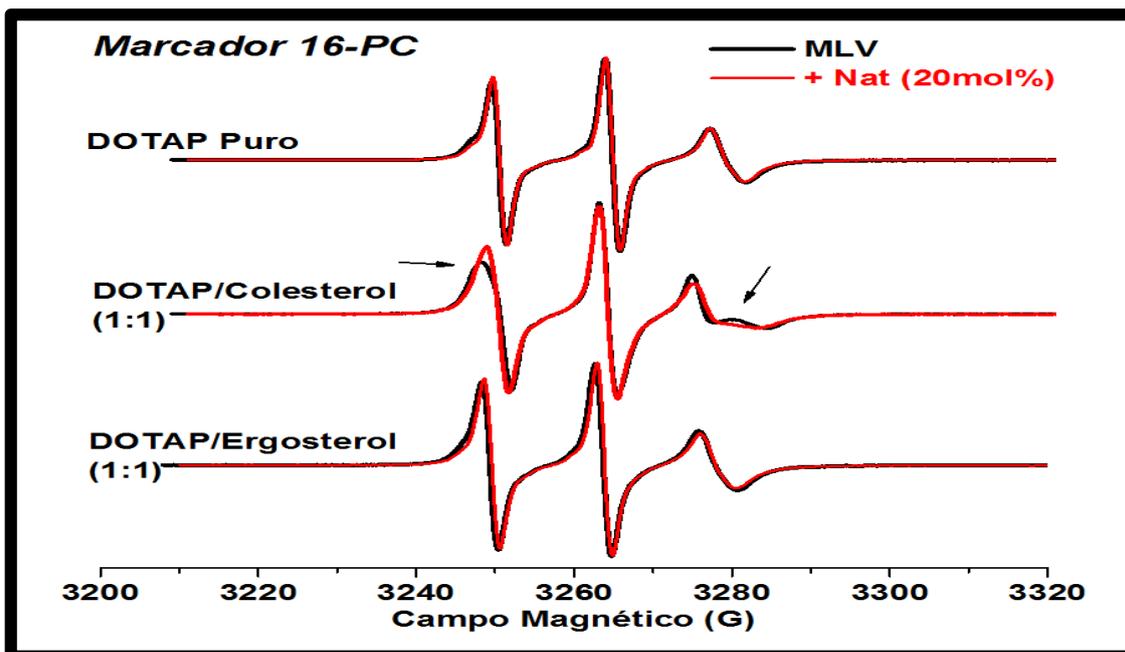


Figura 33 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de DOTAP puro ou de DOTAP/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). As setas pretas indicam regiões espectrais modificadas.

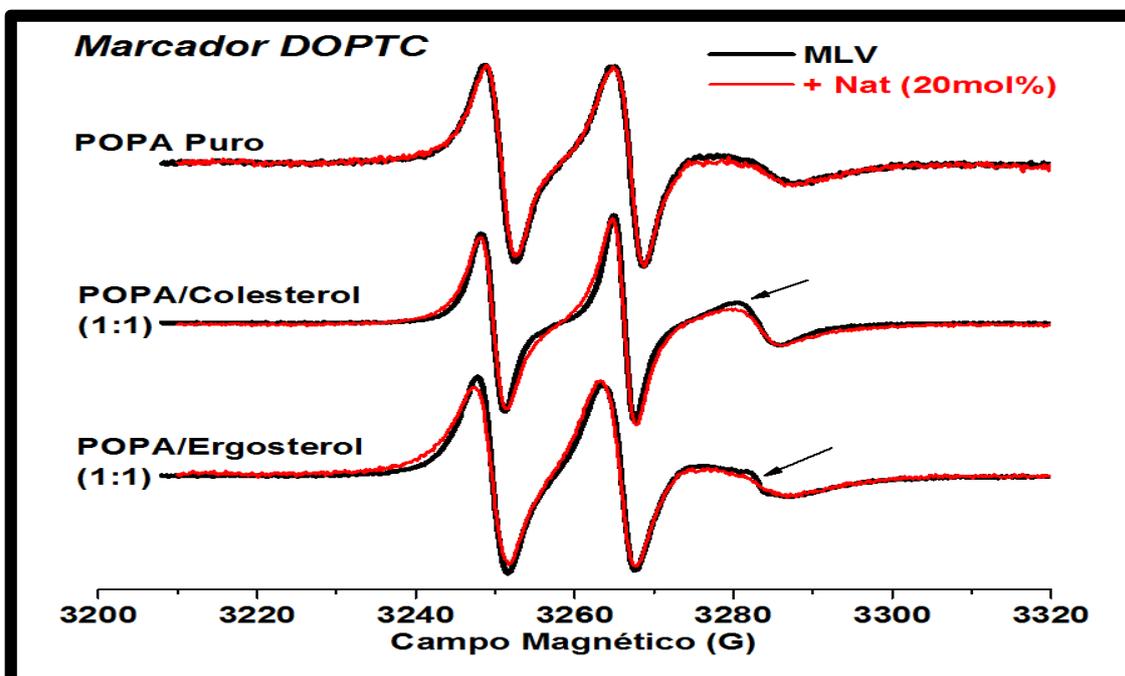


Figura 34 - Espectros de EPR obtidos para o marcador DOPTC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol). As setas pretas indicam regiões espectrais modificadas.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

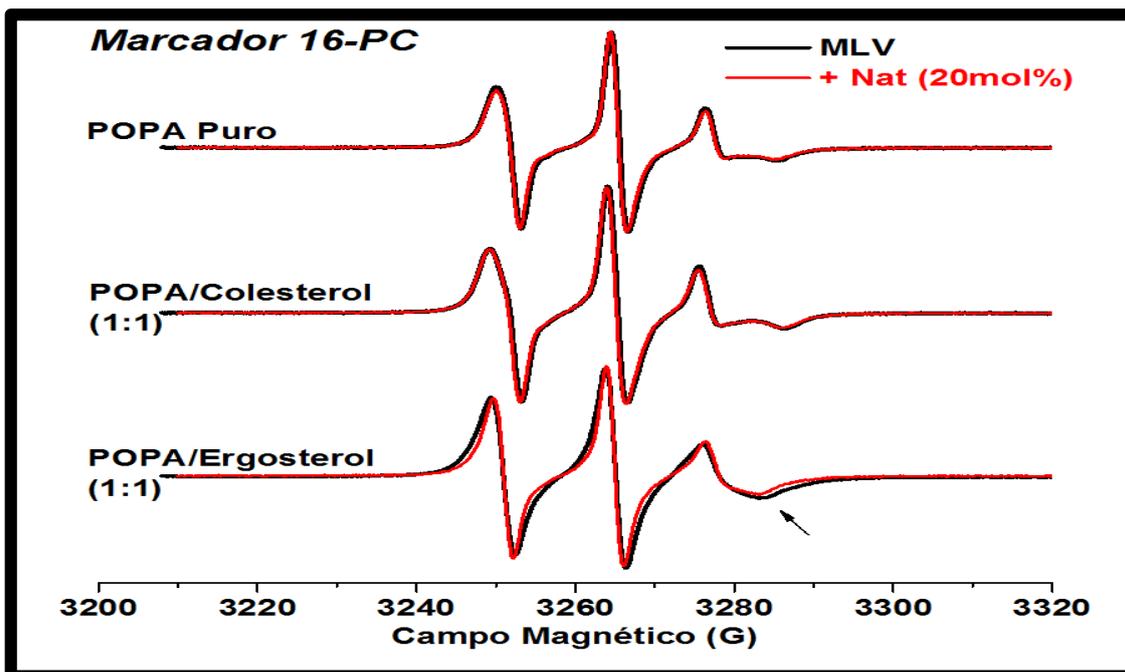


Figura 35 - Espectros de EPR obtidos para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro ou de POPA/esterol (colesterol ou ergosterol a 50% mol) em tampão fosfato, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

Tabela 2– Valores médios das alturas dos picos para campo baixo (h_{+1}) e central (h_0). Erros inferiores a 5%.

Sistema	h_{+1}	h_0	h_{+1}/h_0
DOTAP/Col (1:1)	0,6603	1,00	0,6603
+ 20% mol NAT	0,7505	1,00	0,7505
Diferença	0,0902	0	0,0902

A razão entre as alturas do pico baixo e central (h_{+1}/h_0) e a diferença entre elas é mostrada.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Considerando-se as MLVs positivamente carregadas de DOTAP em pH=5,0 acrescidas ou não de esterol (colesterol ou ergosterol), a presença da natamicina (linha vermelha) não promove nenhuma alteração nos espectros de EPR para o marcador DOPTC (figura 32) para todos os sistemas lipídicos considerados (linha preta), enquanto que para o marcador 16 PC (figura 33) pode-se notar uma mudança bastante significativa apenas para os espectros correspondentes aos sistemas lipídicos de DOTAP/Colesterol (1:1). Nesse caso, verifica-se que a presença de 20% mol de natamicina torna o espectro mais isotrópico, isto é, ocorre um aumento do valor razão entre as alturas (tabela 2) dos picos para campo baixo e central (h_{+1}/h_0). Esse tipo de mudança e com a mesma ordem de grandeza também foi visualizada para o marcador 16-PC incorporado em DOTAP/Colesterol (1:1) em pH=7,0 na presença da natamicina (ver tabela 1 e figura 28), o que sugere que esse efeito seja ocasionado independente do pH, e possivelmente devido a interação hidrofóbica do sistema lipídico em questão com a natamicina.

Por fim, para as MLVs negativamente carregadas de POPA em pH=5,0, na região monitorada pelo marcador DOPTC (figura 34) a presença da natamicina (linha vermelha) promove alargamentos muito pequenos (aumento da anisotropia) apenas nas linhas espectrais de EPR referentes aos sistemas lipídicos contendo esteróis (colesterol o ergosterol); enquanto que para o marcador 16 PC (figura 35), a presença da natamicina modifica (sutilmente) apenas os espectros correspondentes aos sistemas lipídicos contendo ergosterol. Esses resultados, embora apontem mudanças diminutas, sugerem que as MLVs de POPA apresentam uma maior sensibilidade à presença da natamicina em pH=5,0 do que em pH=7,0.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

iv. Efeito da natamicina em MLVs negativamente carregadas (POPA) a diferentes valores de temperaturas

Na seção anterior, os espectros de EPR foram adquiridos para pH=5,0 ou pH=7,0 apenas à temperatura ambiente (24°C), para cuja temperatura as vesículas multilamelares (MLVs) de POPA encontram-se na fase gel, visto que a transição principal da fase gel para a fluida (T_M) desse fosfolípido ocorre em torno dos 24-28 °C. (Demel et al., 1992; Dacosta et al., 2002; Mansour e Zografí, 2007) Desse modo, visando-se investigar se a interação da natamicina com as MLVs de POPA poderia se alterar em função das diferentes fases organizacionais que essas MLVs pudessem assumir; decidiu-se estudar a interação da natamicina com as MLVs POPA em função da variação da temperatura. Considerando-se que o marcador 16-PC monitora uma região (centro da bicamada) na qual a organização molecular (cadeias hidrocarbônicas) é bastante sensível à variação da temperatura, os espectros de EPR a diferentes valores de temperaturas foram obtidos apenas para o marcador 16PC incorporado em MLVs de POPA em pH=7,0 (figuras 36-38) e pH=5,0 (figuras 39-41).

Cabe lembrar que, embora as MLVs de DOTAP também tenham sido estudadas na seção anterior, as MLVs de DOTAP apresentam um valor de temperatura para a transição principal próxima de 0°C, (Hirsch-Lerner e Barenholz, 1998; Regelin et al., 2000) o que torna inviável a obtenção dos espectros de EPR a diferentes valores positivos de temperaturas, uma vez que as MLVs de DOTAP se encontrariam num mesmo estado organizacional, isto é, na fase fluida.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

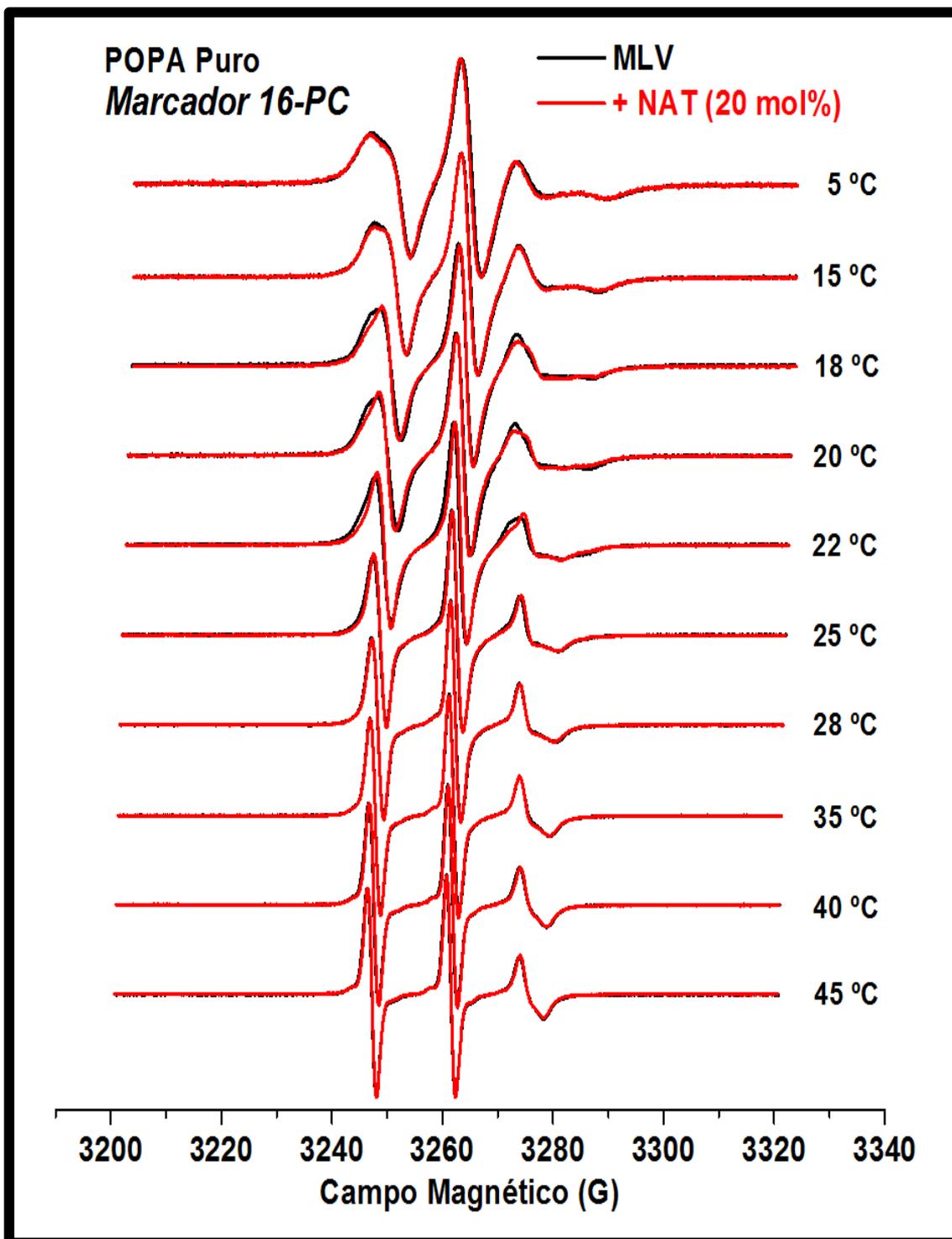


Figura 36 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro em 10 mM de tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

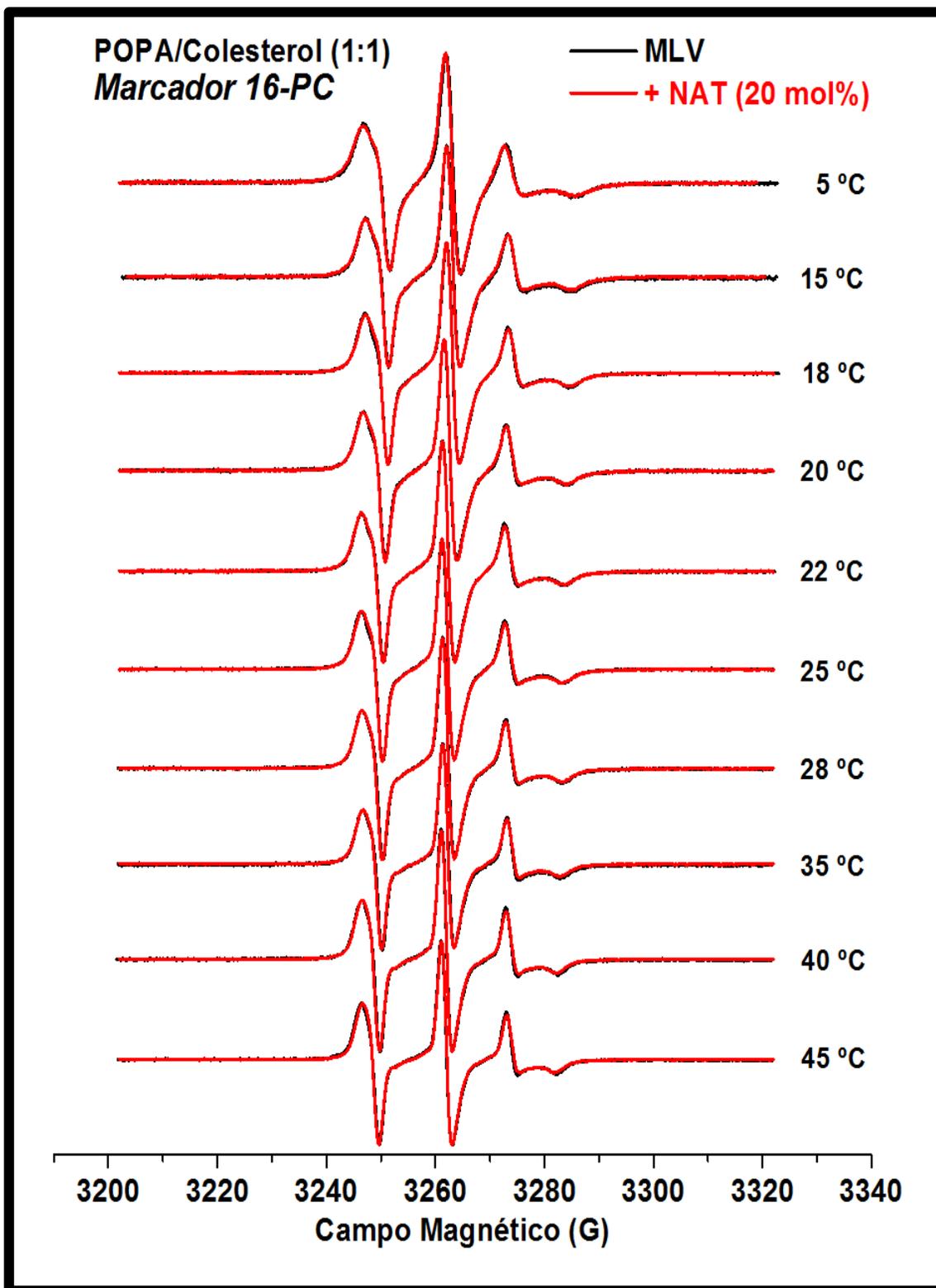


Figura 37 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA/Colesterol (1:1) em 10 mM tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]=100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

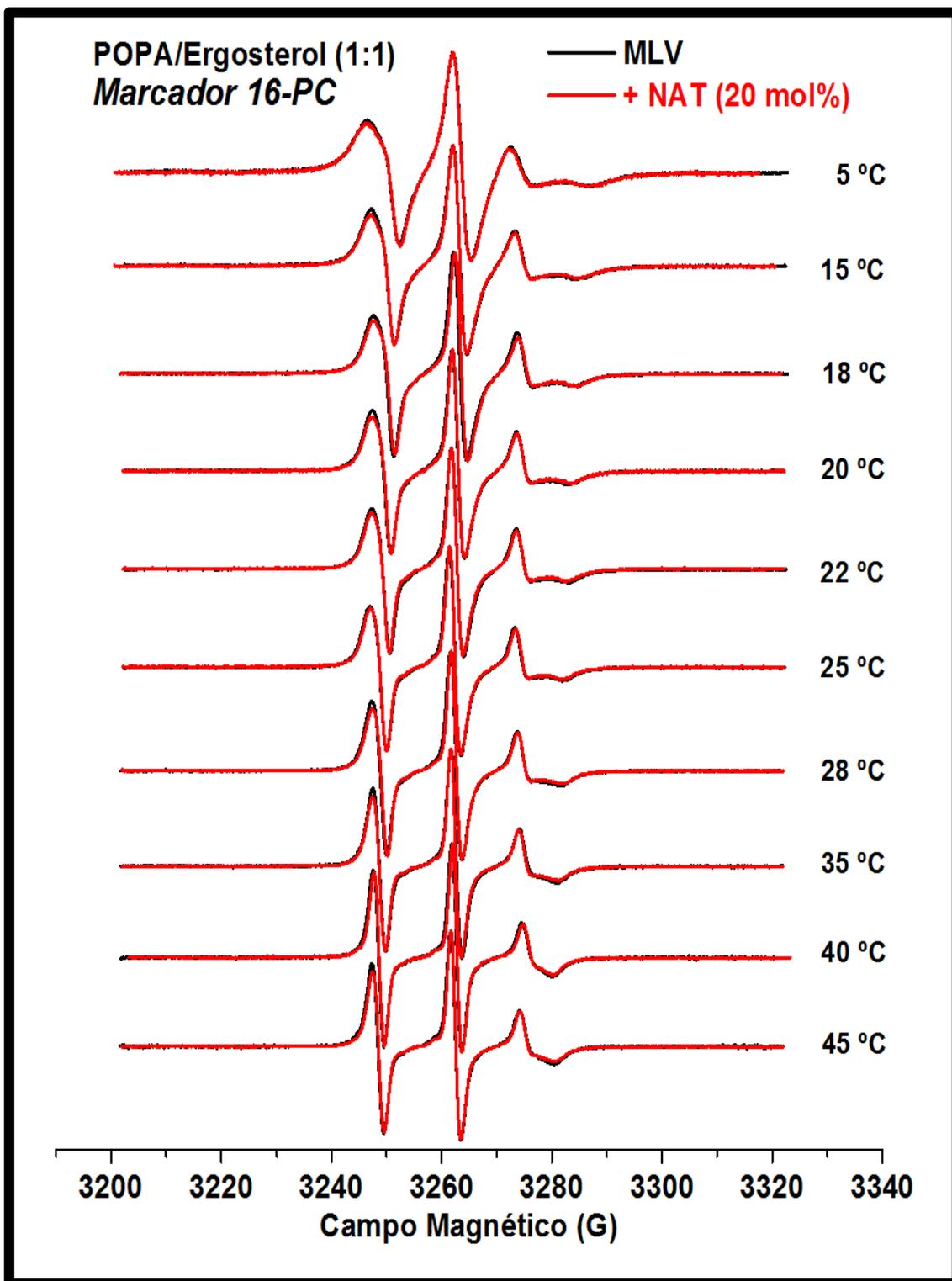


Figura 38 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA/ Ergosterol (1:1) em 10 mM tampão HEPES, pH=7,0 e [NaCl]=100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

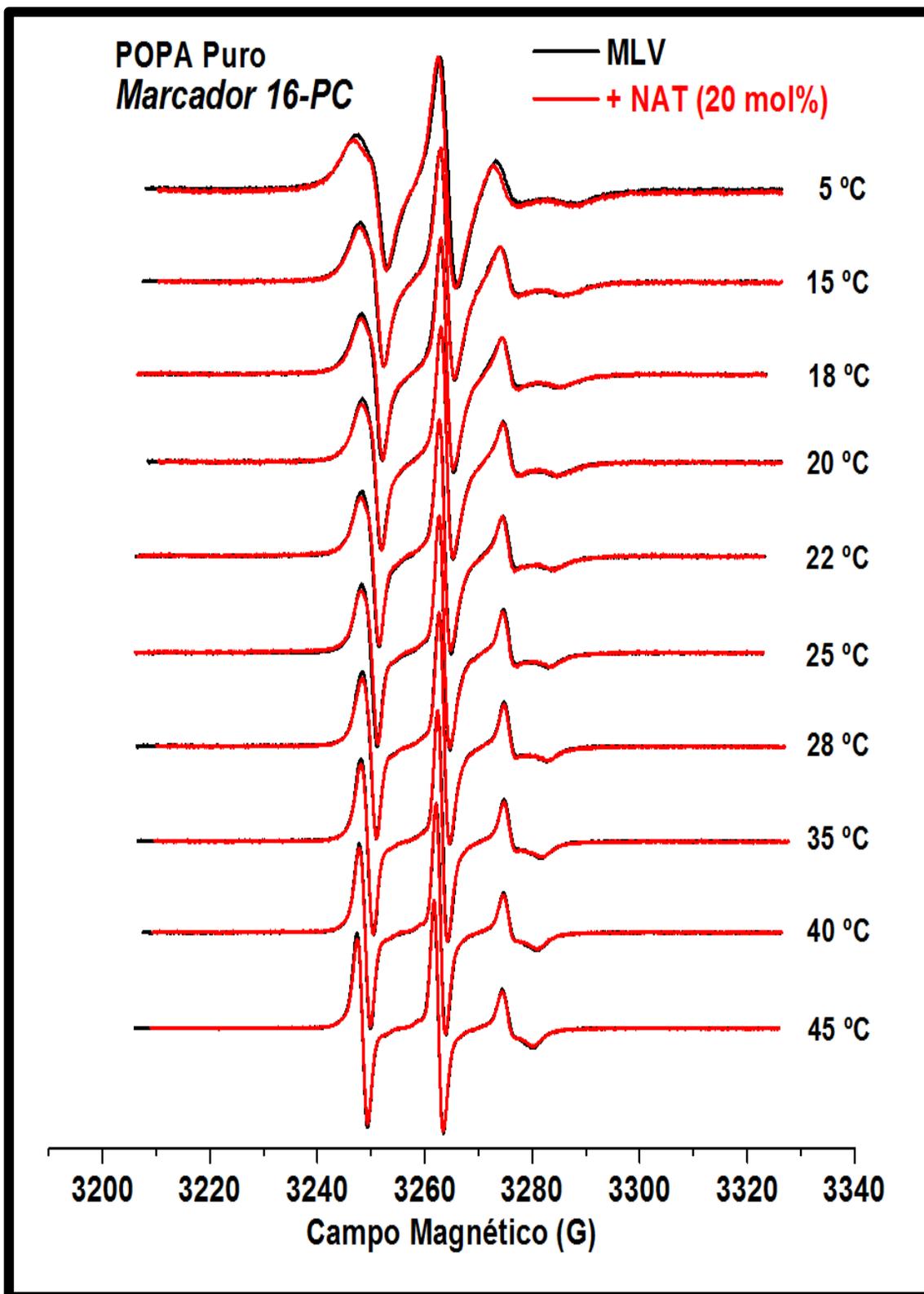


Figura 39 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA puro em 100 mM de tampão fosfato mono/dibásico, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

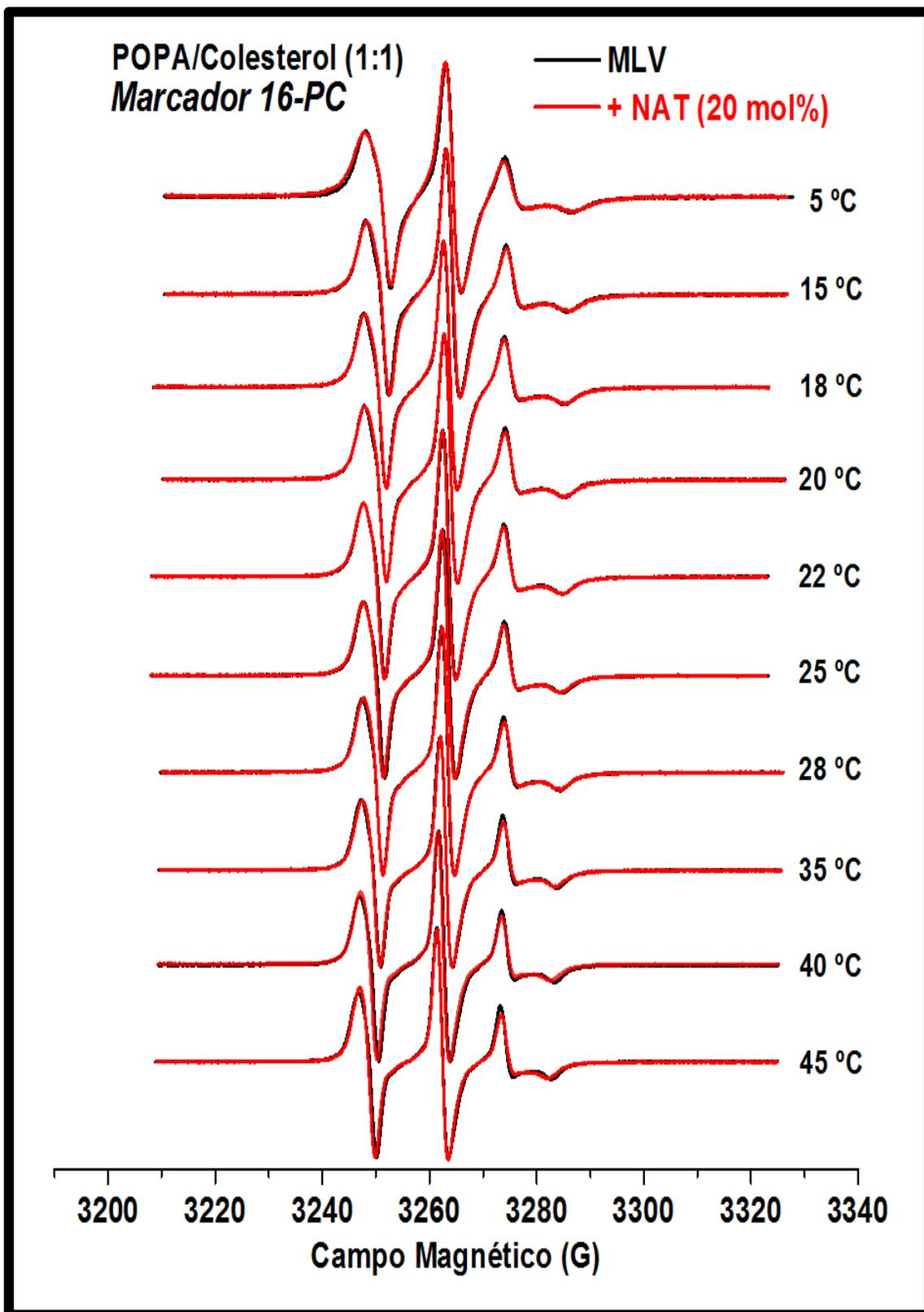


Figura 40 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA / Colesterol (1:1) em 100 mM de tampão fosfato mono/dibásico, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

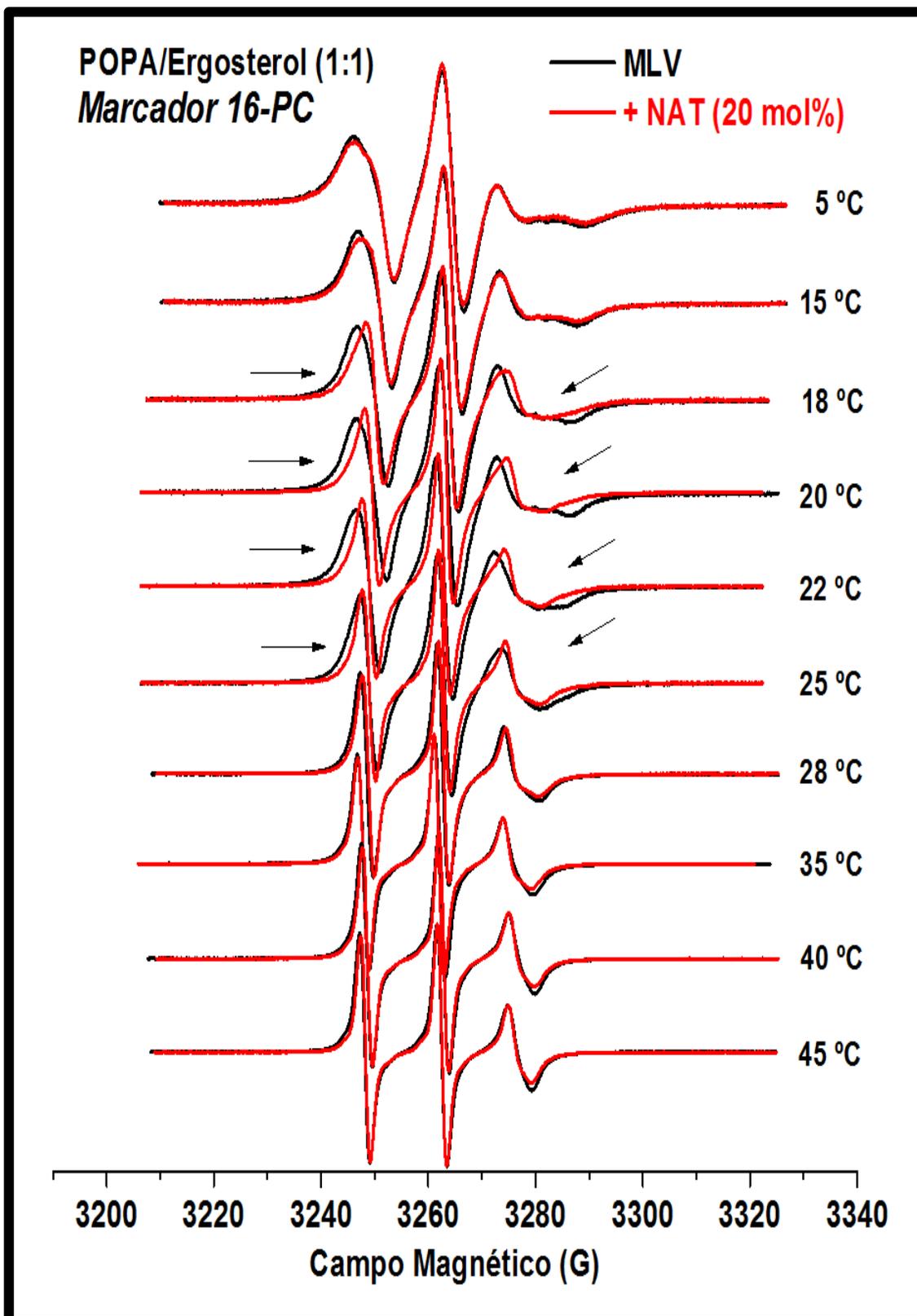


Figura 41 - Espectros de EPR obtidos a diferentes temperaturas para o marcador 16PC incorporado em uma dispersão lipídica multilamelar de POPA/ Ergosterol (1:1) em 100 mM de tampão fosfato mono/dibásico, pH=5,0 e [NaCl]= 100mM, na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de natamicina (20% mol).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Primeiramente, uma análise apenas qualitativa permite inferir que o sistema POPA/Colesterol (1:1) não sofre alteração com a presença da natamicina, seja para o pH=7,0 (figura 37), seja para o pH=5,0 (figura 40). Já em relação ao sistema POPA puro, a presença da natamicina provoca pequenas alterações no espectro entre 18 °C e 22 °C em pH=7,0 (figura 36), enquanto que para o pH=5,0 nenhuma alteração significativa pode ser notada (figura 39). Por outro lado, em relação ao sistema POPA/ergosterol(1:1), em pH=7,0 nenhuma alteração sobre os espectros pode ser notada com a adição de natamicina (figura 38), enquanto em pH=5,0 a incorporação de natamicina em POPA/Ergosterol(1:1) demonstra provocar mudanças espectrais para todas temperaturas (figura 41), sendo as mudanças mais significativas encontradas para o intervalo de temperatura entre 18 °C e 25 °C.

Em segundo lugar, uma análise quantitativa pode ser realizada através da comparação dos valores das razões entre as alturas dos picos para campo baixo e central (h_{+1}/h_0) dos espectros de EPR com ou sem a presença de natamicina. Nesse caso, quanto mais próximo de uma unidade for o valor desse parâmetro, maior será a isotropia do sistema e, portanto, menos ordenado. Os gráficos 42A e 42B mostram os valores de h_{+1}/h_0 obtidos de espectros para o marcador 16-PC incorporado nos diferentes sistemas lipídicos de POPA em pH=7,0 e em pH=5,0, respectivamente. Como pode ser visto na figura 42A, em pH=7,0 a presença da natamicina não provoca alterações significativas em h_{+1}/h_0 tanto para os sistemas POPA puro como para o POPA/Colesterol (1:1), enquanto que uma pequena redução em h_{+1}/h_0 é observado com a adição da natamicina em POPA/Ergosterol (1:1) para a maioria das temperaturas, o que indica que a presença da natamicina provoca um pequeno aumento geral no ordenamento lipídico desse último sistema. Já na figura 42B, em pH=5,0 a presença da natamicina somente não provoca alterações em h_{+1}/h_0 para o sistema POPA/Colesterol(1:1), já que no sistema POPA puro pequenos aumentos em h_{+1}/h_0 são observados para todas as temperaturas, o que indica um aumento do ordenamento geral; no sistema POPA/Ergosterol (1:1) um comportamento anômalo pode ser notado: entre 15 °C e 25 °C ocorre um aumento significativo em h_{+1}/h_0 , isto é, um aumento da fluidez do sistema; enquanto uma redução em

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

h_{+1}/h_0 ocorre para temperaturas mais altas (entre 30 °C e 45 °C), o que sugere um aumento do ordenamento nessas temperaturas.

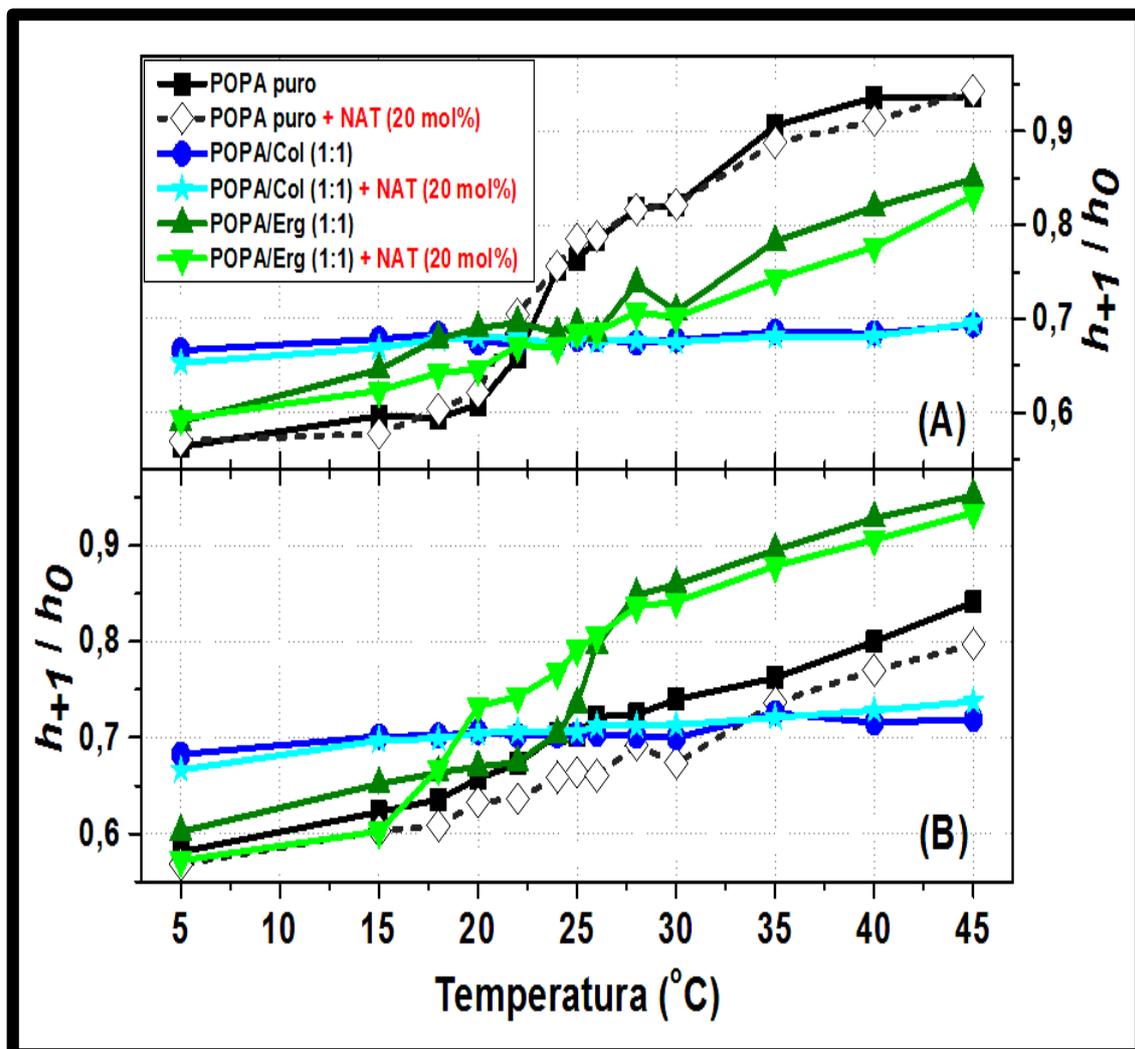


Figura 42 - Valores médios para a razão entre as alturas das linhas de campo baixo e central (h_{+1}/h_0) em função da temperatura referentes aos espectros de EPR obtidos para o marcador 16-PC incorporado em MLVs de POPA puro, POPA/Colesterol (1:1) ou POPA/Ergosterol (1:1) na presença ou ausência de 20% mol de natamicina (A) em 10 mM de tampão HEPES ([NaCl]=100mM); (B) em 100mM de tampão fosfato mono/dissódico e ([NaCl]=100mM). Erros inferiores a 5%.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

B) Perfis calorimétricos de DSC

i. Fosfolipídio zwitteriônico com cadeias saturadas (DPPC)

Uma análise apenas qualitativa indica que a presença da natamicina não provoca alterações significativas nos perfis calorimétricos de MLVS de DPPC puro (figura 43) e de DPPC/colesterol (4:1) (figura 44). Por outro lado, ela alterou tanto a forma como a largura das linhas para as MLVs de DPPC/Ergosterol (4:1) (figura 45). Desse modo, a análise qualitativa indica uma interação preferencial da natamicina com MLVs de DPPC contendo o esteroil ergosterol.

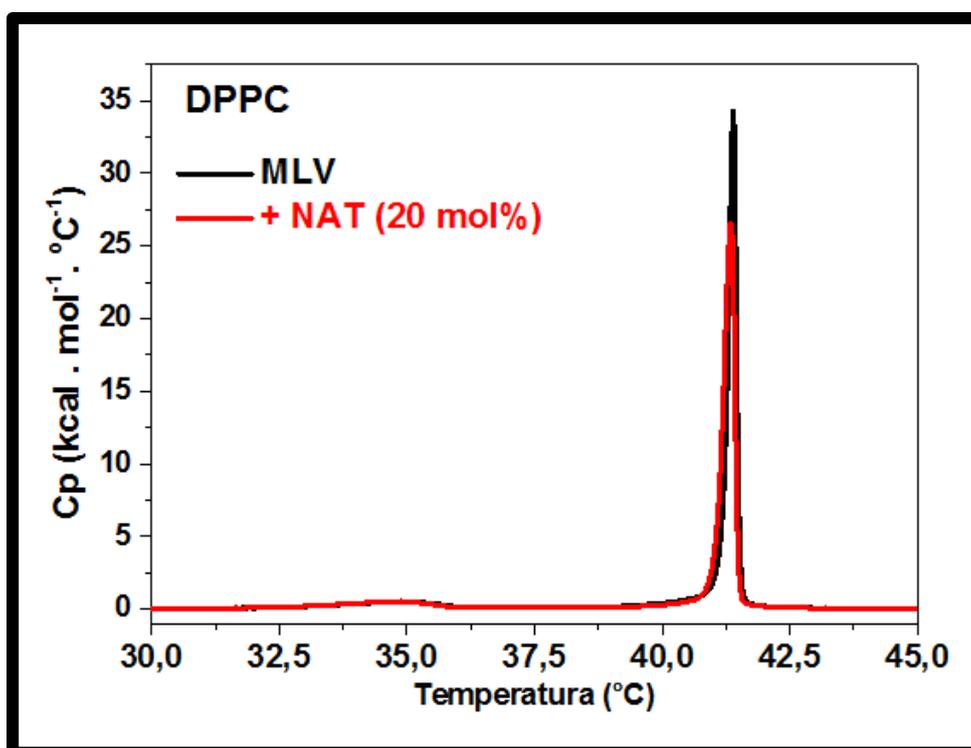


Figura 43 – Perfis calorimétricos para as MLVs de DPPC na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

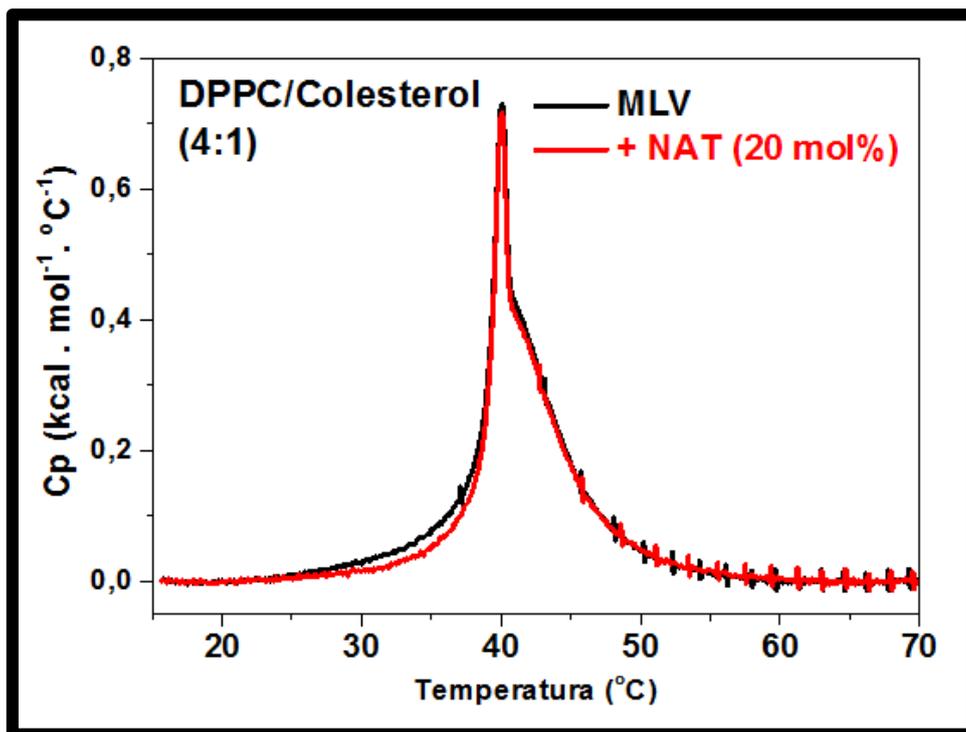


Figura 44 – Perfis calorimétricos para as MLVs de DPPC/colesterol (4:1) na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina.

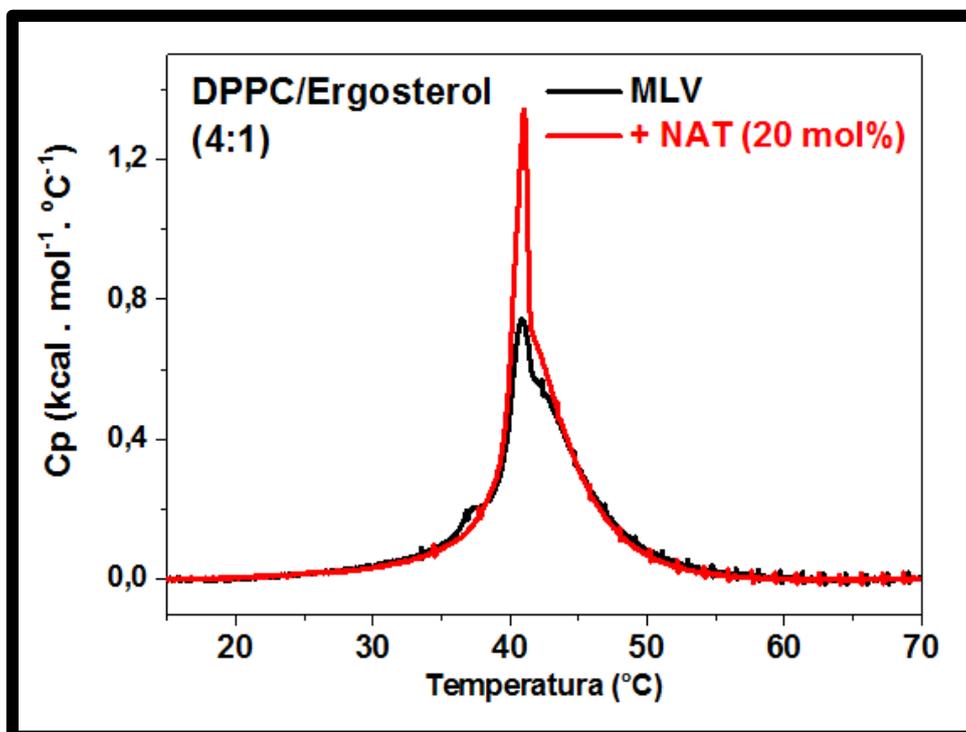


Figura 45 – Perfis calorimétricos para as MLVs de DPPC/ergosterol (4:1) na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Uma análise quantitativa mostra que a natamicina não altera significativamente os valores de T_p , T_m , ΔH e $\Delta T_{1/2}$ das MLVs de DPPC e das MLVs de DPPC/colesterol (Tabela 3). Esses resultados sugerem uma fraca interação da natamicina com esses sistemas. Por outro lado, sua presença em MLVs de DPPC/ergosterol reduziu o valor de $\Delta T_{1/2}$ (Tabela 3) em mais de 50%, o que indica um aumento na cooperatividade de transição do sistema provocado pela presença do fármaco. Esses resultados sugerem que a natamicina possui uma maior afinidade pelo ergosterol do que pelo colesterol. Entretanto, não esclarecem que tipo de alteração a natamicina produz na organização molecular das MLVs contendo ergosterol, uma vez que nos espectros de EPR para as MLVs de DPPC/Erg (seção 3.2A-i) não observa-se mudanças significativas.

Tabela 3 – Valores médios dos parâmetros termodinâmicos. Erros inferiores a 5%.

Sistema	T_p (°C)	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$
DPPC	34,88	41,39	10,45	0,18
<i>+ 20% mol Nat</i>	<i>34,78</i>	<i>41,34</i>	<i>10,25</i>	<i>0,27</i>
DPPC/Col	-	40,06	3,73	2,89
<i>+ 20% mol Nat</i>	-	<i>40,04</i>	<i>3,41</i>	<i>2,69</i>
DPPC/Erg	-	40,82	5,46	4,81
<i>+ 20% mol Nat</i>	-	<i>40,99</i>	<i>5,83</i>	<i>1,92</i>

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

ii. Fosfolipídio negativamente carregado com cadeias saturadas (DPPG)

Considerando-se que os resultados mais relevantes foram encontrados para a interação da natamicina em função da variação da temperatura para o fosfolipídio negativo POPA num valor ácido de pH, e como o estoque (pó) de POPA havia-se esgotado, optou-se por realizar medidas de DSC empregando-se dispersões lipídicas do fosfolipídio negativo DPPG preparadas nas mesmas condições utilizadas para as MLVs de POPA em pH=5,0, isto é, em tampão fosfato mono/dissódico (100mM) e [NaCl] = 100mM.

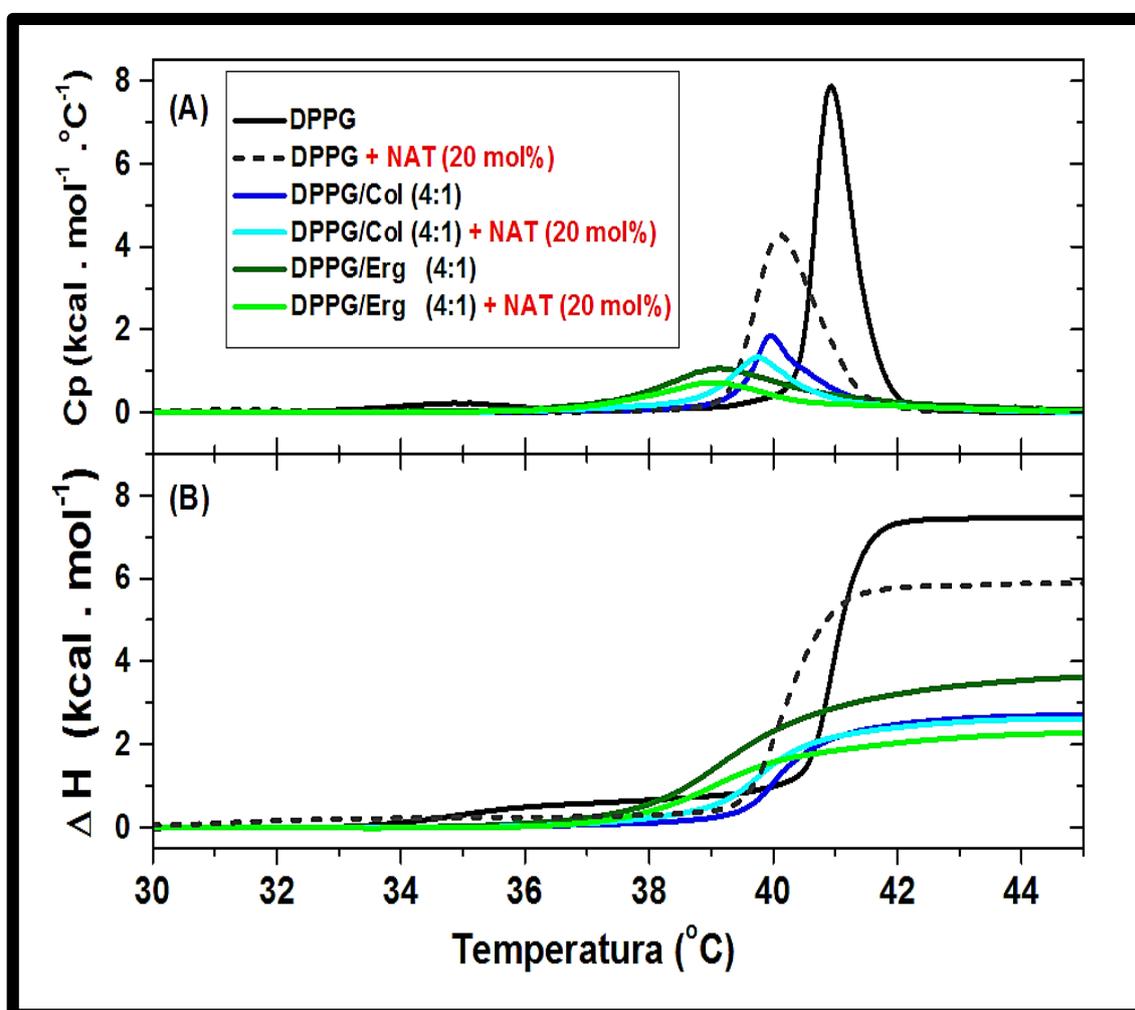


Figura 46 - Termogramas de DSC para MLVs de DPPG ou DPPG/Esterol (4:1) na ausência (preto) e na presença de 20% mol de natamicina. O gráfico (A) corresponde aos perfis calorimétricos, enquanto em (B) são mostrados as Integrais (entalpia) dos perfis apresentados em (A).

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Em primeiro lugar, uma análise apenas qualitativa indica que a presença de 20% mol de natamicina provoca alterações significativas nos perfis calorimétricos de MLVS constituídas por DPPG puro ou incorporadas de 20% mol de esterol (colesterol ou ergosterol) (figura 46A): em todos os casos, a presença da natamicina deslocou o pico de transição principal para valores menores de temperatura em relação aos seus respectivos sistemas sem a sua adição. Já na figura 46B, pode-se notar que as curvas de entalpia (ΔH) para sistemas contendo natamicina, adquirem valores positivos antecipadamente às curvas referentes aos sistemas lipídicos sem a incorporação do antifúngico, isto é, a transição inicia-se em valores de temperaturas inferiores aos encontrados para os respectivos sistemas de controle. Além disso, nessa mesma figura pode-se notar que a presença da natamicina reduz o valor de entalpia (ΔH) final para todos os sistemas lipídicos, exceto para o caso dos sistemas DPPG/Col e DPPG/Col+Nat, para os quais a natamicina aparentemente não alterou expressivamente o valor desse parâmetro (figura 46B). Esses resultados, portanto, indicam que a natamicina interage diretamente com o DPPG puro, enquanto que, no caso dos sistemas lipídicos contendo esterol, as interações parecem ser maiores na presença do ergosterol, uma vez que a entalpia de transição para os sistemas contendo colesterol aparentemente não sofre mudança.

Tabela 4 – Valores médios dos parâmetros termodinâmicos. Erros inferiores a 5%.

Sistema	T _P (°C)	T _M (°C)	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$
DPPG	35.05	40.95	9.54	0.68
+ 20% mol Nat	31.48	40.12	8.51	1.17
DPPG/Col	-	39.98	3.92	0.99
+ 20% mol Nat	-	39.75	4.26	1.33
DPPG/Erg	-	39.17	4,96	2.49
+ 20% mol Nat	-	39.22	3.28	2.33

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Em segundo lugar, uma análise quantitativa (Tabela 4) mostra que a natamicina reduz significativamente o valor da temperatura de pré-transição (T_P) para as MLVs de DPPG, sendo que para as MLVs de DPPG/esterol as inexistências de picos de pré-transição (figura 46A) levam a não determinação do valor para esse parâmetro (Tabela 4). Além disso, em relação aos valores obtidos para a temperatura de transição principal (T_M), a presença da natamicina também reduz esses valores para às MLVs de DPPG, mas praticamente não altera para as MLVs de DPPG/Col e para as MLVs de DPPG/Erg. Além disso, reduções significativas nos valores de entalpia só são observadas para as MLVs de DPPG e de DPPG/Erg, pois para as MLVs de DPPG/Col esse parâmetro praticamente não é afetado. Curiosamente, em relação às larguras de linha à meia altura ($\Delta T_{1/2}$) dos picos de transição, as MLVs de DPPG e de DPPG/Col sofrem um aumento no valor desse parâmetro, enquanto uma leve redução é verificada para as MLVs de DPPG/Erg.

Retomando-se o que foi dito, considerando-se o fato de que reduções nos valores entalpia (ΔH) (ver, figura 46B e tabela 4) e nos valores de temperatura de transição principal (T_M) (ver, figura 46A) foram verificadas para todos os sistemas em que a natamicina foi adicionada, pode-se concluir que em pH=5,0 e à alta força iônica (100mM de tampão e 100mM de NaCl) as MLVs de DPPG estão sujeitas à interação direta com a natamicina (20% mol), sendo que, quando incorporadas com 20% mol de esterol (colesterol ou ergosterol), o efeito da natamicina sobre as MLVs é distinto: a natamicina aumenta a largura de linha ($\Delta T_{1/2}$) para os sistemas contendo colesterol, mas reduz sutilmente o valor desse parâmetro para os sistemas contendo ergosterol. Isso significa que a natamicina reduz a cooperatividade de transição lipídica das MLVs de DPPG/Col, mas aumenta sutilmente a cooperatividade para as MLVs de DPPG/Erg. Como uma perda de cooperatividade também é verificada para as MLVs de DPPG puro na presença de natamicina, isso sugere que essa redução de cooperatividade verificada nas MLVs de DPPG/Col possivelmente também ocorra devido à interação eletrostática da natamicina com os fosfolipídios negativamente carregados de DPPG e não necessariamente devido a interação da natamicina com o colesterol. Como em pH=5,0 a natamicina se encontra positivamente

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

carregada, a natureza da interação dessa molécula com o fosfolípido negativamente carregado DPPG é provavelmente eletrostática.

No caso especial das MLVs de DPPG/Erg as mudanças não ocorreriam somente devido a interação direta da natamicina com o DPPG, mas também devido a uma interação da natamicina com o ergosterol. Nesse caso, as moléculas de natamicina de alguma maneira associar-se-iam às moléculas de ergosterol e reduziriam a quantidade de esteróis disponíveis para interação com os fosfolípidos de DPPG, conseqüentemente. Isso explicaria o aumento de cooperatividade de transição, ou seja, a natamicina ao reduzir a quantidade de ergosterol disponível para associação com as moléculas de DPPG, torna as MLVs com menor teor de “impureza”, o que aumentaria a homogeneidade das MLVs e permitiria que elas transicionem num intervalo de temperatura mais estreito. Esses resultados corroboram com a relatada preferência de interação da natamicina por MLVs contendo ergosterol. (*Teerlink et al., 1980; Te Welscher et al., 2008*)

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

3.3) DISCUSSÃO GERAL

Em primeiro lugar, nossos espectros de EPR indicam que a organização molecular das MLVs constituídas pelo fosfolípido zwitteriônico fosfatidilcolina (PC) não são afetadas pela presença da natamicina, independentemente do grau de saturação das cadeias do fosfolípido e da temperatura (figuras em anexo I, anexo II). Nesse caso, mesmo a incorporação de 20% mol de esterol (colesterol ou ergosterol), não modifica a organização das MLVs de PC diante da natamicina. Apenas para as MLVs de DPPC contendo 20% mol de ergosterol um pequeno ganho de cooperatividade na transição da fase gel para fluida pôde ser notada (figura 45, tabela 3). Esses resultados, portanto, indicam que a natamicina não é capaz de atravessar as bicamadas lipídicas, e que, entretanto, a natamicina apresenta uma ligeira preferência de interação hidrofóbica com sistemas contendo ergosterol, que é o esterol típico de membranas fúngicas. Esses resultados corroboram com as descobertas de Teerlink et al. (1980) e de Welscher et al. (2008), os quais demonstraram que as vesículas lipídicas contendo ergosterol eram mais sensíveis à interação com a natamicina do que as com colesterol.

Em segundo lugar, considerando-se que a natamicina apresenta um ponto isoelétrico em pH=6,5, suas moléculas podem apresentar carga líquida não nula diante da variação do pH do meio. Desse modo, para um valor de pH=7,0 suas moléculas apresentam carga líquida ligeiramente negativa, o que de certo modo deveria favorecer a sua interação eletrostática com o lipídio positivamente carregado DOTAP e desfavorecer sua interação com o lipídio negativamente carregado POPA. Como esperado, na figura 30 podemos observar que não há mudanças nos espectros de EPR para os sistemas lipídicos de POPA e de POPA/esterol na presença ou na ausência de natamicina na região das cabeças polares lipídicas (marcador DOPTC), enquanto que no centro da bicamada (marcador 16PC), apenas para o sistema POPA/Ergosterol a presença da natamicina promove uma pequena redução geral no valor do parâmetro h_{+1}/h_0 (figura 42A), o que indica uma leve perda de ordenamento para todo intervalo de temperatura considerado (5°C a 45° C). Por outro lado, não houve interação significativa entre a natamicina e o sistema lipídicos de DOTAP, exceto para o

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

caso do sistema lipídico DOTAP/colesterol monitorado pelo marcador 16PC (figura 29), para o qual uma alteração nos espectros é observada. Nesse caso, verifica-se que o espectro se torna isotrópico na presença da natamicina: comprovado pelo aumento no valor do parâmetro h_{+1}/h_0 (tabela 1), o que pode ser interpretado como um aumento da fluidez dos sistemas DOTAP/Colesterol provocado pela interação com a natamicina.

Por sua vez, já para o valor de pH=5,0, as moléculas de natamicina encontram-se positivamente carregadas e, desse modo, uma interação eletrostática favorável entre a natamicina e os lipídios POPA era esperada, enquanto que com o lipídio positivo DOTAP não. Como esperado, verifica-se que na região das cabeças polares (marcador DOPTC) a natamicina torna os espectros ligeiramente mais anisotrópicos (figura 34), ou seja, torna a região das cabeças lipídicas de POPA ligeiramente mais ordenadas, enquanto que no centro da bicamada (marcador 16PC), a presença da natamicina não provoca alterações em h_{+1}/h_0 (figura 42B) apenas para o sistema POPA/Colesterol(1:1), já que para o sistema POPA puro, pequenos aumentos em h_{+1}/h_0 são observados para todas as temperaturas, o que indica um aumento do ordenamento geral; para o sistema POPA/Ergosterol (1:1) um comportamento incomum é notado: entre 15 °C e 25 °C ocorre um aumento significativo em h_{+1}/h_0 , isto é, um aumento da fluidez do sistema; enquanto uma redução em h_{+1}/h_0 ocorre para temperaturas mais altas (entre 30 °C e 45 °C), o que sugere um aumento do ordenamento nessas temperaturas. Por outro lado, nos sistemas lipídicos de DOTAP, a natamicina apresenta um comportamento similar ao observado com o pH=7,0: embora alterações não sejam observadas na superfície da bicamada (figura 42), no centro, a presença da natamicina torna o espectro significativamente mais isotrópico especificamente para o sistema DOTAP/colesterol (figura 43), - comprovado pelo aumento no valor do parâmetro h_{+1}/h_0 (tabela 2).

Em resumo, nossos resultados indicam que em MLVs de fosfolipídio zwitteriônico a natamicina não apresenta nenhum efeito significativo. Por outro lado, para MLVs de fosfolipídios negativamente carregados, seja em pH=7,0, seja em pH=5,0, a natamicina aparentemente prefere interagir com sistemas contendo ergosterol do que com colesterol, isto é, independe da carga líquida da

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

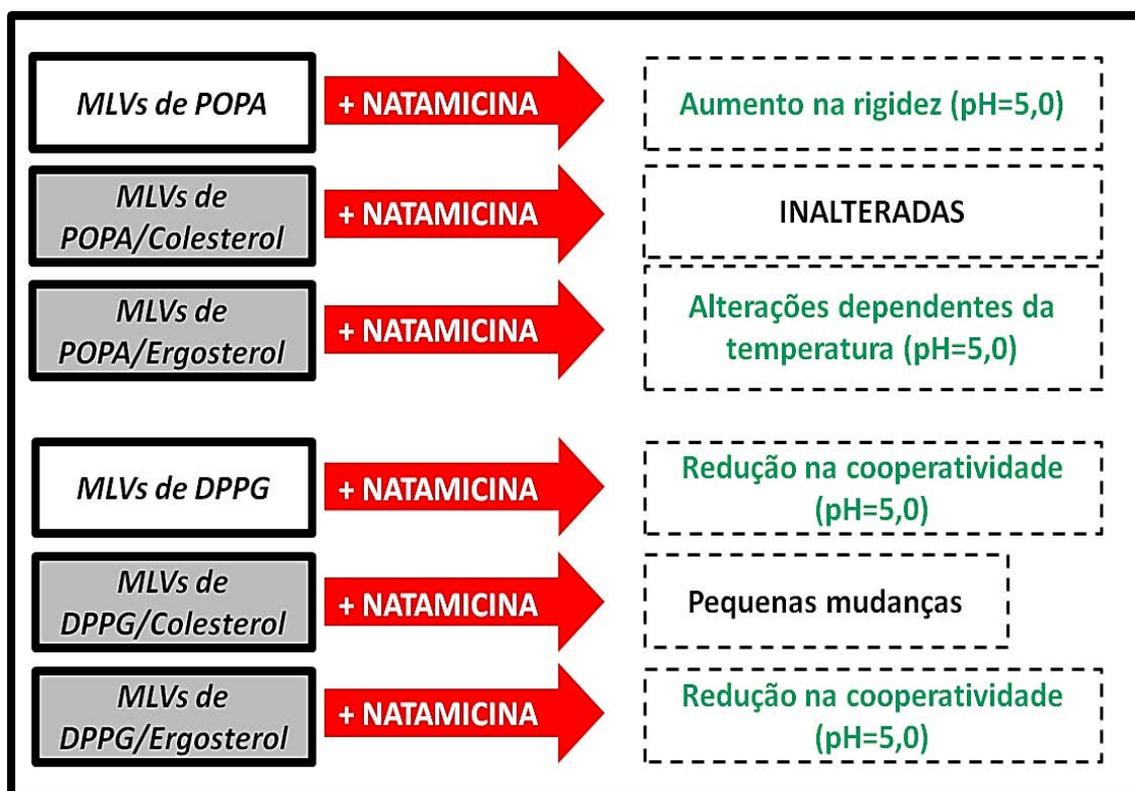
natamicina, o que indica que essa interação é de natureza hidrofóbica. Apenas em pH=5,0 a carga positiva da natamicina demonstra favorecer a sua interação eletrostática diretamente com os fosfolipídios negativos. Curiosamente, para o lipídio positivo DOTAP, a interação da natamicina ocorre apenas em sistemas contendo colesterol (figura 29 e 33) e o efeito resultante dessa interação (aumento da fluidez) apresenta a mesma magnitude (tabelas 1 e 2) independentemente do pH do meio, e, desse modo, essa interação deve ser provavelmente do tipo hidrofóbica.

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

3.4) CONCLUSÃO

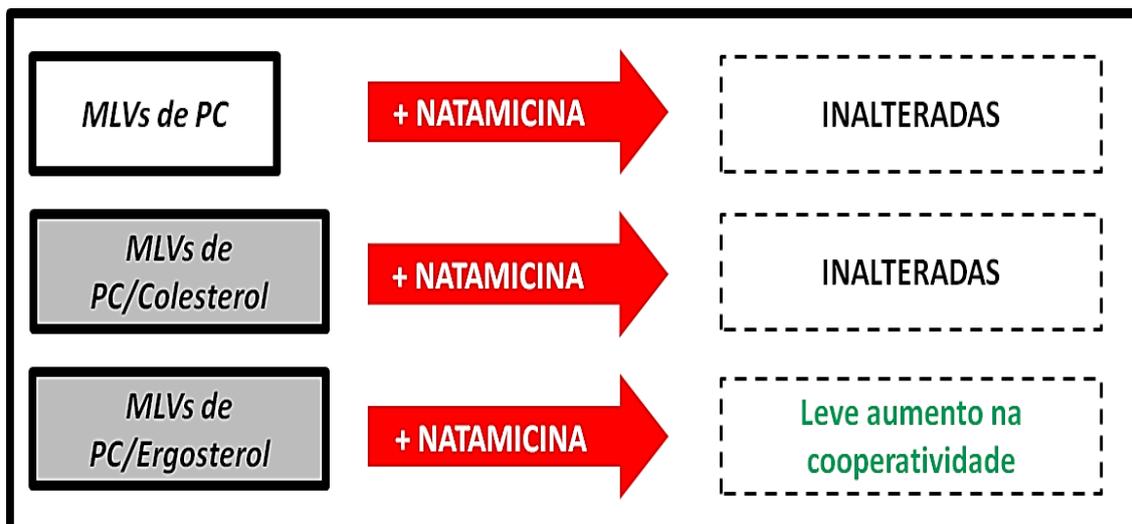
Retomando-se o que foi dito pode-se concluir que apenas para o valor de pH=5,0 a natamicina demonstrou ser capaz de promover modificações em MLVs puras de POPA, enquanto que para MLVs incorporadas de 20% mol de esterol apenas o sistema POPA/Ergosterol mostrou-se sensível à presença da natamicina independentemente do pH do meio. Esses resultados (esquema 1) indicam que: 1) em pH=5,0 a carga líquida positiva da natamicina (pI=6,5) favorece a sua interação (eletrostática) com o POPA negativamente carregado; 2) como a natamicina produz perturbações no ordenamento para sistemas de POPA enriquecidos com ergosterol, mas não com colesterol, isso pode sugerir uma maior afinidade da natamicina em interagir hidrofobicamente com o ergosterol.

Esquema 1: Resumo comparativo dos efeitos da natamicina nas MLVs negativamente carregadas de palmitoil-oleoil-fosfatídico (POPA) incorporadas ou não esteróis (colesterol ou ergosterol)



3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

Esquema 2: Resumo comparativo dos efeitos da natamicina nas MLVs de zwitteriônicas de fosfatidilcolina (PC) incorporadas ou não esteróis (colesterol ou ergosterol)



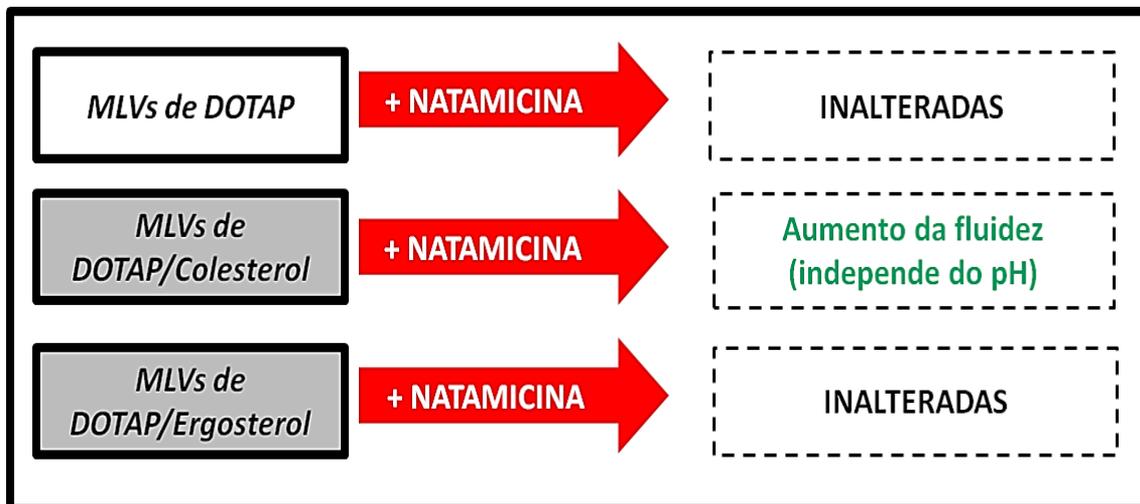
Nossas medidas calorimétricas de DSC corroboram com a suposta maior afinidade da natamicina pelo ergosterol (esquema 2): efeitos de aumento na cooperatividade de transição foram maiores em sistemas de DPPC/ergosterol do que em DPPC/colesterol, o que demonstra um maior efeito da interação hidrofóbica da natamicina em sistemas que contenham o ergosterol. No caso especial das MLVs do fosfolípido negativo DPPG em pH=5,0, as mudanças nos perfis calorimétricos puderam ser observadas tanto em membranas puras como naquelas incorporadas de esterol, o que reforça a importância da interação eletrostática para a ação da natamicina em membranas negativamente carregadas (esquema 2).

Curiosamente, a interação da natamicina com MLVs do lipídio positivo DOTAP ocorrem apenas na presença de colesterol no sistema e de modo independente da carga líquida da natamicina (esquema 3), uma vez que um efeito de aumento na isotropia de mesma magnitude é observado nos espectros para o centro das bicamadas tanto em pH=7,0, quanto em pH=5,0, e em ambos os casos, a presença da natamicina torna o centro das bicamadas de DOTAP/colesterol mais fluidas. Esse resultado, embora ele não contribua para o mecanismo de ação da natamicina em membranas biológicas, uma vez que lipídios positivos não existem na natureza, sugere que MLVs mistas de DOTAP e de colesterol possam ser bons carreadores (“drug delivery”) da natamicina para

3. ESTUDOS EM LIPOSSOMOS

possíveis aplicações terapêuticas e, portanto, pode possuir uma importância terapêutica.

Esquema 3: Resumo comparativo dos efeitos da natamicina nas MLVs de positivamente carregadas de dioleoil-trimetilamônio-propano (DOTAP) incorporadas ou não de esteróis (colesterol ou ergosterol)



3.5) EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES

Seria interessante investigar detalhadamente a interação da natamicina com MLVs negativamente carregadas de DPPG em diferentes condições a fim de se comparar os resultados com os obtidos para o fosfolípido negativo POPA. No caso dos estudos envolvendo as MLVs de POPA, nosso estudo carece das análises calorimétricas desses sistemas e em relação às medidas de EPR, a simulação (análise indireta) dos espectros obtidos poderia fornecer detalhes relevantes relacionados à dinâmica molecular e à orientação dos fosfolípidos e, portanto, seria também oportuno realizá-los.

CAPÍTULO 4

ESTUDOS EM MONOCAMADAS

*“Em algum lugar,
alguma coisa incrível
está esperando para ser conhecida.”
(Carl Sagan)*

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

4.1) MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo envolvendo as monocamadas lipídicas como membranas modelo foi realizada em colaboração com o grupo “Polímeros-Bernhard Gross” pertencente ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC), da Universidade de São Paulo (USP). Desse modo, os resultados a serem apresentados foram obtidos empregando-se tanto os equipamentos (cubas de Langmuir e acessórios), como as instalações (sala limpa classe 10.000) do citado grupo. A temperatura no interior da sala limpa foi mantida controlada a $21 \pm 0,5$ °C.

A) Reagentes e preparação de amostras

O antibiótico macrolídeo poliêno natamicina (figura 47) foi obtido da Fluka (pureza padrão analítica). O esteroide colesterol (pureza 99%) (figura 47) foi comprado da Sigma-Aldrich e o glicerofosfolípido (pureza 99%) 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) (figura 47) da Avanti Polar Lipids. O solvente orgânico clorofórmio (pureza padrão analítica) foi fornecido pela Sigma-Aldrich e o solvente polar água ultrapura obtido nas próprias instalações empregando-se o sistema de filtragem Milli-Q. Todos reagentes foram utilizados sem purificações adicionais. Os estoques primários dos lipídios (DPPC ou colesterol) a serem espalhados na interface ar/água foram preparados diariamente em clorofórmio (0.5mg/mL), sendo os estoques secundários correspondentes às misturas empregando-se as proporções desejadas de cada estoque primário; enquanto o estoque da natamicina, em água ultrapura (0.02mg/mL). A escolha desse valor de concentração não foi aleatório e para maiores informações ver a seção de resultados (seção 4.2 A). O tempo médio aguardado para que o clorofórmio evaporasse por completo da superfície da água foi de 20 minutos antes do início da aquisição dos dados (cinética de adsorção e isotermas de compressão).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

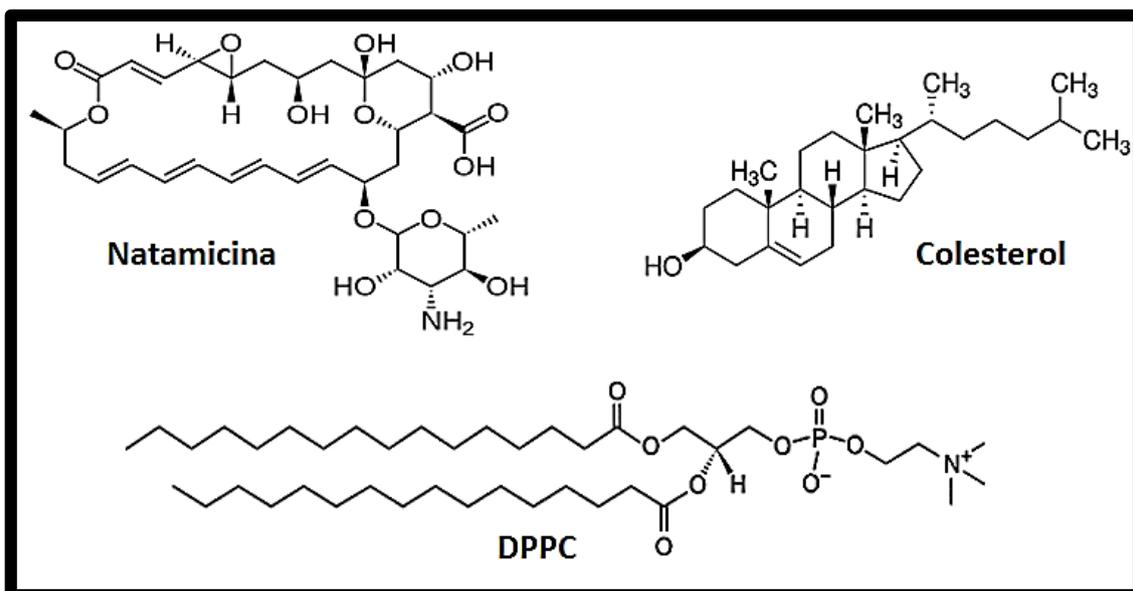


Figura 47- Ilustração da estrutura química do antibiótico *natamicina*, do esteroide *colesterol* e do fosfolípido 1,2-dipalmitoil-fosfolina (*DPPC*). Fonte: elaborado pelo autor.

B) Cinética de adsorção na interface ar-água

As medidas de cinética de adsorção foram realizadas em um pequeno recipiente de Teflon® com 4 cm de diâmetro e contendo 10mL de subfase aquosa, o qual foi adaptado sobre uma cuba de Langmuir KSV mini, cuja eletrobalança (apêndice C) monitorou as variações nos valores de pressão de superfície da interface ar-água em função do tempo. Alíquotas das soluções estoque dos lipídios foram espalhadas sobre a superfície da subfase até que, após evaporação do solvente, se atingisse o valor de pressão desejado. O estudo da adsorção da natamicina na interface ar-água foi realizado de duas maneiras: através da injeção (via microseringa) de volumes específicos de sua solução estoque de natamicina na subfase ou da prévia dissolução de volumes adequados dessa solução estoque na subfase. A temperatura da subfase foi mantida à $21 \pm 0,5$ °C (sala limpa).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

C) Isotermas de compressão na interface ar-água

i. Teoria

Um experimento típico consiste nas seguintes etapas: primeiramente, dissolve-se as moléculas anfífilas desejadas em um solvente (volátil e imiscível com a água) e, a seguir, espalha-se (“spreading”) pequenos volumes dessa solução sobre a interface (seção 1.2A-ii, figura 6b), isto é, na superfície da subfase entre as barreiras móveis; em segundo lugar, aguarda-se um intervalo de tempo adequado para garantia da total evaporação do solvente espalhado e da estabilização (equilíbrio térmico) das moléculas anfífilas adsorvidas na interface; finalmente, através das barreiras móveis, realiza-se uma compressão simétrica e à taxa constante ($v=[\text{cm}^2/\text{minuto}]$) das moléculas que ficaram adsorvidas na interface. A área por molécula ocupada na superfície é dada pela fórmula (1):

$$a_m = \frac{A_s}{n} \quad (1)$$

onde a_m é a área por molécula, A_s é a área da superfície da cuba (entre as barreiras) e n é o número de moléculas do composto de interesse. Desse modo, como durante a compressão a área de superfície entre as barreiras (A_s) decresce progressivamente, enquanto não se altera o número de moléculas constituintes da monocamada (n), verifica-se que ocorre um aumento relativo da densidade de moléculas por unidade de área, isto é, a área disponível para ocupação por molécula (a_m) do filme é continuamente reduzida. Além disso, como o microvolume disperso das moléculas de interesse é previamente definido e ele corresponde a uma alíquota de uma solução estoque cuja concentração é conhecida, a fórmula (1) pode ser reescrita mais convenientemente conforme a equação (2) (Petty, 1996):

$$a_m = \frac{A_s}{c \cdot N_A \cdot V} \quad (2)$$

onde c é a concentração molar da solução estoque do composto de interesse, N_A é o número de Avogrado e V é o volume espalhado dessa solução estoque.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Por sua vez, essa compressão produz um aumento relativo da concentração das moléculas anfifílicas apenas na região da interface ar-água compreendida entre as barreiras. Como essas moléculas são agentes surfactantes, (Cosgrove, 2010) conseqüentemente, essa compressão resulta numa gradativa redução local no valor de tensão de superfície da água, cuja mudança é monitorada pelo sensor de pressão localizado entre as barreiras da cuba, através do método Whilhelmy (Apêndice C). Desse modo, para cada experimento é obtido uma curva de pressão de superfície em função da área por molécula, à qual é denominada *isoterma de compressão*, uma vez que a temperatura da subfase é mantida constante durante todo experimento.

A relação entre a pressão medida pelo sensor e a tensão de superfície da água é dada pela equação (3):

$$\pi = \gamma - \gamma_0 \quad (3)$$

onde π é a pressão de superfície medida, γ é o valor da tensão de superfície limpa da subfase e γ_0 , a tensão de superfície da subfase recoberta pela monocamada. (Roberts, 1990) Analisando-se a equação (3) e lembrando que as moléculas anfifílicas são tensoativas (surfactantes), isto é, reduzem a tensão da superfície da água, podemos constatar que a pressão de superfície assume valores positivos e crescentes com a redução da área molecular por lipídio. Isso ocorre porque, como visto anteriormente, a compressão provoca uma gradativa redução na área de superfície disponível para ocupação pelas moléculas na superfície, o que, por consequência, produz um aumento relativo da área de superfície recoberta por essas moléculas anfifílicas (tensoativas), e, finalmente, resulta numa contínua redução no valor da tensão de superfície ($\pi > 0$ quando $\gamma < \gamma_0$).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Como mencionado anteriormente, uma das grandes vantagens em realizar-se estudos biofísicos envolvendo monocamadas está na facilidade de monitoramento das diferentes fases que esses modelos de membrana podem assumir. Através dos perfis obtidos para as isotermas de compressão (figura 48A), as diferentes fases organizacionais (arquitetura) de uma monocamada podem ser controladas durante uma compressão: primeiramente, após a completa evaporação do solvente empregado para solubilização e espalhamento do composto de interesse na interface ar-água, as moléculas adsorvidas à superfície encontram-se na fase gasosa (*G*) e a pressão de superfície se mantém próxima de zero (*fase G*, figura 48A), porque a área por cada molécula (distância) é elevada (*fase G*, figura 48B) e, conseqüentemente, a interação intermolecular é desprezível; a seguir com o início da compressão, a pressão de superfície assume pequenos valores positivos (*fase LE*, figura 48A), o que indica que a monocamada encontra-se na fase líquida-expandida (*LE*), para qual a redução na área disponível para cada lipídio resulta numa maior proximidade entre as moléculas (*fase LE*, figura 48B) e, conseqüentemente, no aparecimento de forças intermoleculares fracas; finalmente, na fase líquida-condensada (*LC*) e condensada (*C*), a área por molécula assume os menores valores, ou seja, as distâncias entre as moléculas é a mínima possível (*fases LC e C*, figura 48B) e, conseqüentemente, as interações intermoleculares são as mais significantes, e, portanto, essas fases são caracterizadas por regiões nas quais ocorre um súbito aumento na pressão de superfície (*fases LC e C*, figura 48A). Além disso, nas fase líquida-condensada (*LC*) e condensada (*C*) a área por molécula é tão pequena (*fases LC e C*, figura 48B) que aproxima-se do valor da área média de uma molécula na fase sólida e, portanto, uma extrapolação da isoterma para essas fases permite a determinação do valor aproximado para área molecular média (a_{ext} , figura 48A). Cabe realçar que se a compressão de uma monocamada ocorrer para valores muito inferiores aos encontrados para a área extrapolada, o sistema entra em colapso (*fase X*, figura 48B), ou seja, o arranjo molecular sob a forma de monocamada deixa de existir e diversas estruturas podem ser formadas (Goto e Caseli, 2013).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

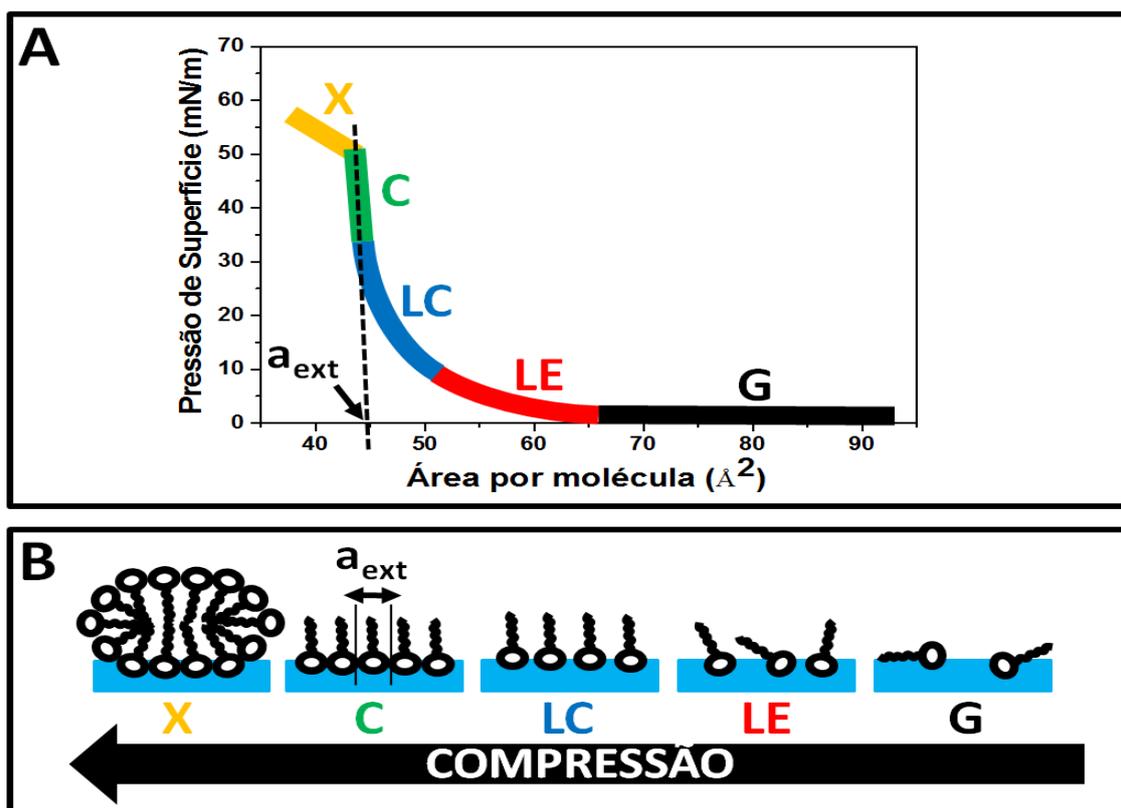


Figura 48 – Ilustração (A) de uma isoterma de compressão (pressão de superfície vs. Área por molécula) e (B) das transições de fase que ocorrem durante a compressão da monocamada: G= fase gasosa, LE= fase líquida-expandida, LC=fase líquida-condensada, C=fase condensada, X=colapso. A área extrapolada (a_{ext}) corresponde a área média molecular medida na fase condensada ou na fase líquida condensada. Fonte: elaborada pelo autor. Ilustrações semelhantes podem ser encontradas em publicações relacionadas a interface gás-líquido. (Roberts, 1990; Petty, 1996; Adamson e Gast, 1997; Lyklema et al., 2000)

Conforme visto, as isotermas de compressão são excelentes formas gráficas de se visualizar as fases de uma monocamada em função da redução no valor da área por molécula. Por outro lado, ela é uma técnica incompleta, pois não permite o estudo *in situ* da morfologia, nem da conformação das moléculas numa monocamada (Mendelsohn et al., 1995; Mendelsohn e Flach, 2002). Desse modo, além das isotermas de compressão, técnicas microscópicas e espectroscópicas tem sido empregadas para se obter maiores informações das monocamadas investigadas (Ferreira et al., 2005). Algumas dessas técnicas estão listadas na tabela 5, assim como, o tipo de informação que cada uma pode oferecer. Na presente pesquisa empregamos a microscopia do ângulo de Brewster (**BAM**) e a espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho (**IRRAS**) como técnicas complementares, motivo pelo qual elas serão melhores descritas nas seções 4.1D e 4.1E, respectivamente.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Tabela 5 – Algumas técnicas de caracterização de monocamadas na interface ar-água.

Técnica de caracterização	Informação fornecida
Isotermas de pressão vs. área por molécula	-Interação da monocamada com componentes da subfase -Formação (Transições de fase) e estabilidade da monocamada -Elasticidade no plano -Área média molecular
Microscopia:	
<i>Ângulo de Brewster (BAM)</i>	Morfologia dos domínios em diferentes fases
<i>Fluorescência</i>	
Espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho (IRRAS)	-Pontes de hidrogênio -Conformação e orientação das cadeias e dos grupos funcionais moleculares
Elipsometria	Espessura da monocamada
Espectroscopia por difração de raio-X	Organização e orientação molecular no plano
Espectroscopia de ótica não linear:	
<i>Geração de soma de frequências (SFG)</i>	-Conformação e orientação molecular
<i>Geração de segundo harmônico (SHG)</i>	-Densidade superficial da monocamada

Fontes: (Mendelsohn et al., 1995; Dynarowicz-Latka et al., 2001; Mendelsohn e Flach, 2002; Ferreira et al., 2005)

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

ii. Experimental

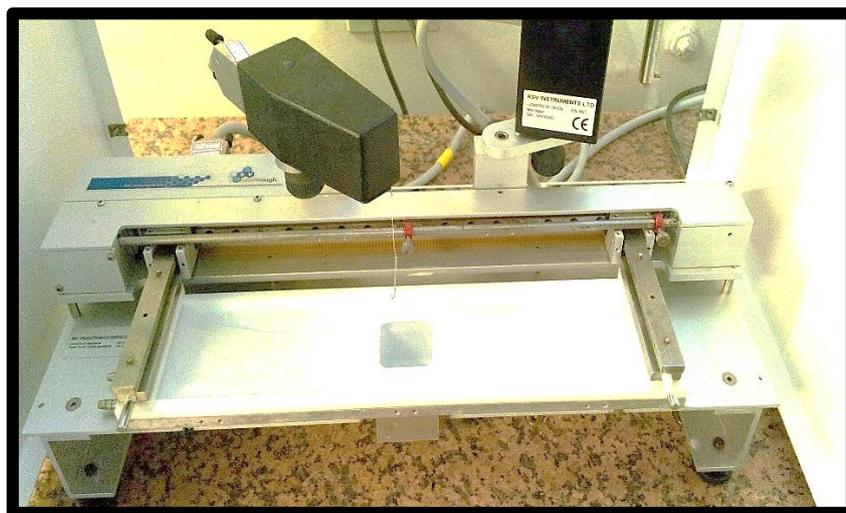


Figura 49 – Fotografia da mini cuba de Langmuir KSV empregada para a obtenção das monocamadas lipídicas. Fonte: elaborado pelo autor.

As isotermas de compressão para as monocamadas lipídicas foram obtidas numa cuba de Langmuir de Teflon® modelo KSV mini contendo 250mL de subfase aquosa (figura 49). De maneira similar aos experimentos de cinética de adsorção, alíquotas desejadas das soluções estoques lipídicas foram espalhadas na interface ar-água e as variações na pressão de superfície foram monitoradas por uma eletrobalaça (Arczewska e Gagos, 2011) (apêndice C) durante a compressão simétrica executada pelas barreiras móveis. A taxa de compressão dessas barreiras foi $30 \text{ cm}^2/\text{min}$ e a subfase empregada foi água ultrapura à $21 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (sala limpa) na presença ou não da solução estoque de natamicina dissolvida. Antes da aquisição de cada isoterma, cerca de 20 minutos foram aguardados para garantir total evaporação do solvente presente nas soluções espalhadas na superfície. Além disso, considerando-se que uma significativa oxidação das moléculas de colesterol na interface ar-água começa a ocorrer em torno de 40 minutos (Weiner et al., 1972; Cadenhead et al., 1982; Sabatini et al., 2008), todas isotermas foram adquiridas num intervalo de tempo inferior a esse. As isotermas para cada sistema foram obtidas no mínimo três vezes para garantia da reprodutibilidade e as mais representativas são mostradas nos resultados.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

iii. Análise das isotermas

- A área média molecular foi determinada através da medição da área extrapolada (seção 4.1A-i, figura 48) a partir da isoterma obtida para cada monocamada.
- As propriedades mecânicas das monocamadas foram analisadas através dos valores para o módulo de compressão (C_s^{-1}), os quais foram obtidos a partir da fórmula (4):

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad (4)$$

onde A é a área média por molécula correspondente a um determinado valor π de pressão de superfície. Quanto maior o valor para C_s^{-1} , maior é a rigidez no plano da monocamada. Como pode ser notado na equação (4), o cálculo dos valores para C_s^{-1} introduz poucos erros numéricos e de acordo com a classificação de Davis e Rideal (1963) as fases das monocamadas podem ser caracterizadas através do monitoramento desse parâmetro: fase líquida-expandida para $C_s^{-1} = 12,5-50\text{mN/m}$, fase líquida para $C_s^{-1} = 50-100\text{mN/m}$, fase líquida-condensada para $C_s^{-1} = 100-250\text{mN/m}$ e fase condensada (praticamente sólida) para $C_s^{-1} > 250\text{mN/m}$. A pressão de colapso da monocamada é definida quando o valor de $C_s^{-1} = 0$.

- As propriedades termodinâmicas (estabilidade e miscibilidade) das monocamadas foram estudadas através da determinação dos valores para a área média molecular em excesso A_{exc} a diferentes pressões de superfície, os quais foram calculados a partir da equação (5) (Dynałowicz-Łątka et al., 2003; Miñones et al., 2005; Hac-Wydro e Dynałowicz-Łątka, 2006a; b; Hac-Wydro et al., 2007; Minones et al., 2009; Pavinatto et al., 2009; Arczewska e Gagos, 2011; Szczes et al., 2012; Pavinatto et al., 2013):

$$A_{exc} = A_{12} - (A_1 X_1 + A_2 X_2) \quad (5)$$

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

onde A_{12} é a área média por molécula obtida de uma isoterma para uma monocamada mista binária (substâncias 1 e 2); A_1 e A_2 são os valores das áreas médias moleculares medidas nas isotermas para as monocamadas puras, respectivamente, da substância 1 e da 2; X_1 e X_2 são suas respectivas frações molares presentes na monocamada mista binária. Os valores diferentes de zero indicam a miscibilidade entre os componentes (*Mansour et al., 2001*), sendo que valores negativos para A_{exc} indicam a presença de interações mais fortes que a ideal entre os componentes 1 e 2 da monocamada binária e revelam, conseqüentemente, a formação de um sistema mais estável (*Mansour et al., 2001; Pavinatto et al., 2009; Herculano et al., 2011*). Por outro lado, valores nulos para A_{exc} indicam imiscibilidade entre os componentes 1 e 2, enquanto valores positivos, a formação de um sistema binário expandido e instável.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

D) Microscopia de ângulo de Brewster (BAM)

i. Teoria

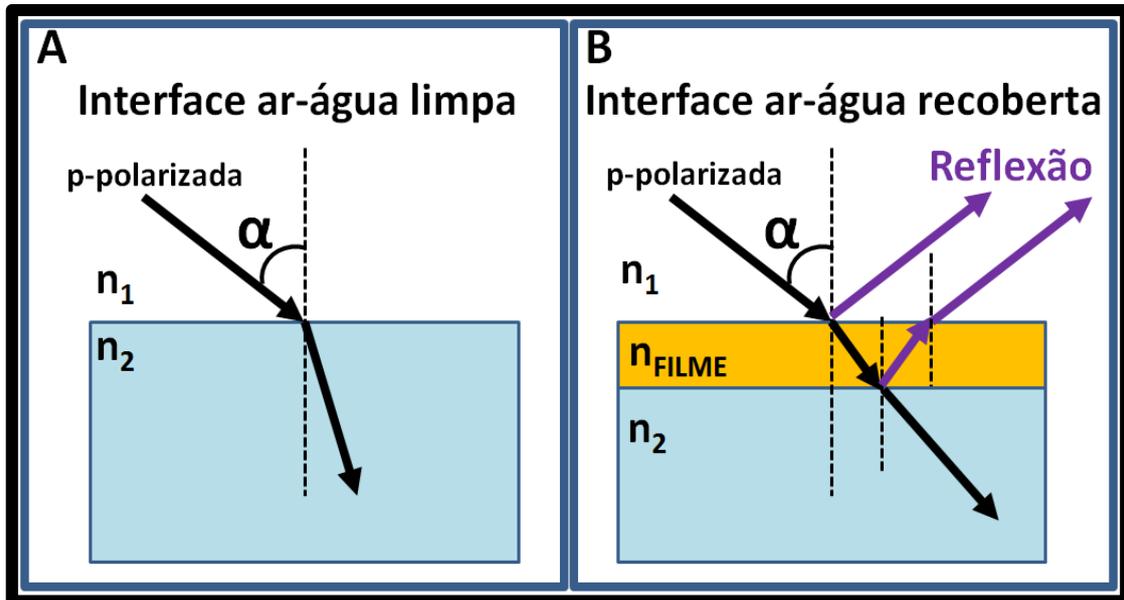


Figura 50 – Ilustração de um feixe de luz p-polarizado incidente com um ângulo α em uma (A) interface ar-água limpa, na qual α é o ângulo de Brewster e a ausência da reflexão é o ângulo de Brewster e a ausência da reflexão é característica; (B) interface ar-água recoberta por uma monocamada (filme), na qual o ângulo α deixa de ser o ângulo de Brewster e a ocorrência do fenômeno da reflexão pode ser notada. Os termos n_1, n_2 e n_{FILME} indicam que o índice de refração, respectivamente, para o meio ar, água e filme (monocamada) são distintos. Fonte: elaborada pelo autor.

O ângulo de Brewster (α) é o ângulo de incidência na interface entre dois meios com índices de refração distintos ($n_2 > n_1$), para cujo valor um feixe de luz p-polarizado não sofre o fenômeno de reflexão (figura 50A). O ângulo de Brewster (α) é definido pela seguinte equação (7) (HéN *n* e Meunier, 1991; Honig e Mobius, 1992; Kaercher et al., 1993):

$$\tan \alpha = \frac{n_2}{n_1} \quad (6)$$

onde n_2 é o índice de refração da água e n_1 é o índice de refração do ar. Como a fonte de luz empregada apresenta um comprimento de onda de 632.8nm (laser de He-Ne), os índices de refração da água e do ar são, respectivamente, $n_2=1.333$ e $n_1=1$ (Kaercher et al., 1993); e, conseqüentemente, o ângulo de Brewster adotado para a interface ar-água foi de aproximadamente $\alpha \approx 53^\circ$

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

(*HéN n e Meunier, 1991; Honig e Mobius, 1992; Kaercher et al., 1993*). Nessa configuração experimental (*Dynarowicz-Łątka et al., 2003; Hidalgo et al., 2005; Miñones et al., 2005; Minones et al., 2009; Nasir e Besson, 2012*), quando o feixe de luz laser p-polarizado incide com o ângulo de Brewster (α) na interface ar-água limpa (figura 50A), nenhuma reflexão pode ser notada (imagem escura detectada pelo microscópio). Por outro lado, na presença de um filme de Langmuir (figura 50B), o índice de refração local da interface ar-filme (superfície da água recoberta pela monocamada) se torna progressivamente distinta de uma interface limpa ar-água. Desse modo, o valor do ângulo de Brewster para essa nova interface recoberta se torna diferente daquele inicialmente adotado para a interface ar-água limpa e, conseqüentemente, pode-se verificar que o fenômeno da reflexão passa a ocorrer continuamente (figura 50B). Por conseguinte, esses feixes refletidos pelo filme podem ser capturados pela câmera de vídeo do microscópio e, conseqüentemente, uma imagem da morfologia da monocamada (imagem branca e brilhante) para um valor desejado de pressão de superfície pode ser gravada (*Dynarowicz-Łątka et al., 2003; Hidalgo et al., 2005; Miñones et al., 2005; Minones et al., 2009; Nasir e Besson, 2012*). Nessas imagens em tons de cinza, as regiões mais escuras representam a superfície da água limpa (ausência de reflexão da luz), enquanto as mais claras, a superfície da água recoberta pelos domínios da monocamada (reflexão intensa da luz). Cabe lembrar que, embora a técnica de microscopia por fluorescência seja a mais comum e antiga (desde 1980) para a visualização desses domínios, ela requer que marcadores fluorescentes sejam incorporados nas monocamadas lipídicas, os quais mesmo em pequenas proporções podem funcionar como “impurezas” no sistema (*HéN n e Meunier, 1991; Honig e Mobius, 1992; Meunier, 2000*) e, portanto, a técnica microscópica BAM (desde 1991) vem sendo preferencialmente utilizada por apenas basear-se na captação do fenômeno de reflexão de luz sobre os domínios das monocamadas (*HéN n e Meunier, 1991; Honig e Mobius, 1992; Meunier, 2000; Minones et al., 2009; Nasir e Besson, 2012; Roldan-Carmona et al., 2012; Dynarowicz-Latka et al., 2013; Pinheiro et al., 2013*).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

ii. Experimental

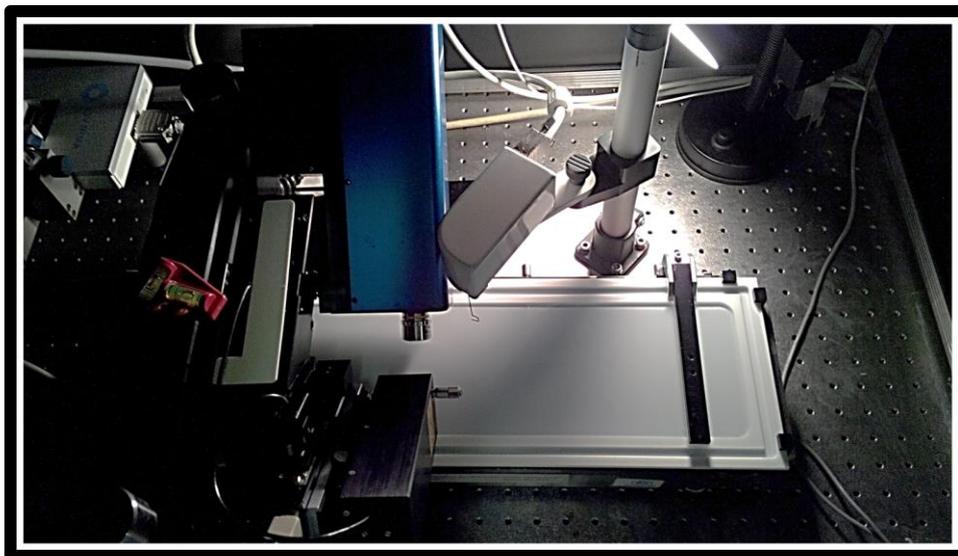


Figura 51 – Fotografia do sistema BAM2Plus (Nano Film Technology, Alemanha) empregado para a microscopia de ângulo de Brewster (BAM). Fonte: elaborado pelo autor.

As imagens da morfologia das monocamadas na interface ar-água foram capturadas por um microscópio de ângulo de Brewster (BAM) (figura 51), modelo BAM2Plus (Nano Film Technology , Alemanha). Esse microscópio foi acoplado a uma cuba de Langmuir NIMA e os materiais espalhados, as configurações da subfase (composição e temperatura) e a velocidade das barreiras foram os mesmos empregados nos experimentos de isotermas de compressão.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

E) Espectroscopia de absorção-reflexão Infravermelha com polarização modulada (PM-IRRAS)

i. Teoria

A radiação infravermelha foi descoberta a mais de dois séculos atrás por William Herschel, mas o seu emprego na espectroscopia só se firmou a partir de 1945 quando Gerhard Herzberg publicou seus estudos no livro intitulado como “*Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*” (Gremlich e Yan, 2001). A espectroscopia de radiação infravermelha (IR) é uma técnica sensível às vibrações que provocam mudança no momento dipolo molecular. Nesse caso, quando a energia da radiação infravermelha coincide com a frequência de oscilação de uma dada ligação ou grupo químico, ocorre o fenômeno de ressonância e, conseqüente absorção dessa radiação. Considerando que cada molécula apresenta ligações ou grupos químicos particulares, e que as vizinhanças em que essa molécula se encontra acaba por afetar esses modos vibracionais, os espectros infravermelhos são típicos para uma molécula num dado sistema e, portanto, a espectroscopia de radiação infravermelha é muito eficaz para a identificação tanto da estrutura, como das alterações conformacionais moleculares (Gremlich e Yan, 2001; Mendelsohn e Flach, 2002; Mendelsohn et al., 2010).

Em 1960, o método de espectroscopia de reflexão-absorção infravermelha (IRRAS) foi desenvolvida por Robert G. Greenler e destacou-se por permitir a investigação de filmes finos depositados sobre substratos metálicos (Buffeteau et al., 1991; Blaudez et al., 2011). Nesse método, quando a radiação infravermelha incide com um ângulo rasante (cerca de 80°) sobre uma superfície metálica, apenas a radiação p-polarizada (paralela ao plano de incidência) é refletida (Buffeteau et al., 1991; Blaudez et al., 1992; Blaudez et al., 1993). Esse fenômeno é conhecido como regra de seleção de superfície metálica e determina que apenas momentos de dipolo com componente de vibração nessa direção (não pertencentes ao plano da superfície) possam ser detectados.

Por sua vez, na interface ar-água, a regra de seleção metálica não existe e, portanto, a detecção das vibrações em todas as direções é simultaneamente obtida, o que impede a identificação da orientação precisa das moléculas adsorvidas numa superfície aquosa. Além disso, as bandas das vibrações das

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

moléculas de água presentes na subfase líquida e no ambiente sob a forma de vapor podem sobrepor os de grupos com grande importância biológica (1400-1800 cm^{-1}), cujas moléculas são amplamente investigadas nesse tipo de interface ar-água. Essas dificuldades só foram superadas através do desenvolvimento da técnica de espectroscopia de absorção-reflexão infravermelha com polarização modulada (PM-IRRAS), a qual foi empregada em estudos de filmes de Langmuir na interface ar-água pela primeira vez no ano 1993 (*Blaudez et al., 1993; Blaudez et al., 2011*). Essa técnica caracteriza-se pelo emprego da radiação infravermelha polarizada em dois planos distintos (*s* e *p*, ortogonais entre si), cuja modulação em alta frequência (kHz) garante uma incidência alternada e praticamente simultânea entre o feixe de luz *p*-polarizado (paralela ao plano de incidência) e o feixe *s*-polarizado (perpendicular ao plano de incidência) na superfície de um substrato. Nesse caso, os espectros gerados pela absorção- reflexão para esses dois planos de incidência são capturados quase que simultaneamente e a refletividade diferencial (*S*) entre o plano *p* (R_p) e o plano *s* (R_s) pode ser calculada pela seguinte fórmula (7) (*Blaudez et al., 1996*) :

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (7)$$

Desse modo, esse espectro para a refletividade diferencial (*S*) é independente da absorção isotrópica (*Mendelsohn et al., 1995*), uma vez que as absorções isotrópicas estão presentes igualmente nos espectros de refletividade relativa de cada plano, e, portanto, a interferência tanto do vapor água, como do monóxido de carbono ambiente são minimizadas. Os espectros de PM-IRRAS (unidades arbitrárias vs. comprimento de onda) fornecidos pelo software do aparelho são normalizados (*Mendelsohn et al., 1995*) através da seguinte equação (8) (*Blaudez et al., 2011*):

$$\frac{\Delta S}{S} = \frac{S - S_0}{S_0} \quad (8)$$

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

onde $\Delta S/S$ corresponde ao espectro de PM-IRRAS normalizado, S é a refletividade de polarização modulada medida para a superfície da subfase recoberta pelo filme e a S_0 refletividade medida para a superfície limpa da subfase. Nesses espectros de PM-IRRAS, as bandas com picos positivos (figura 52A) indicam uma orientação do momento de dipolo de transição (M) preferencialmente no plano da superfície, enquanto que as bandas com picos de valores negativos, por sua vez, representam uma orientação preferencial de M perpendicular à superfície (figura 52B) (Blaudez *et al.*, 1994). Além disso, para M orientado a cerca de 53° (ângulo de Brewster) em relação à superfície, há ausência de bandas (figura 52C).

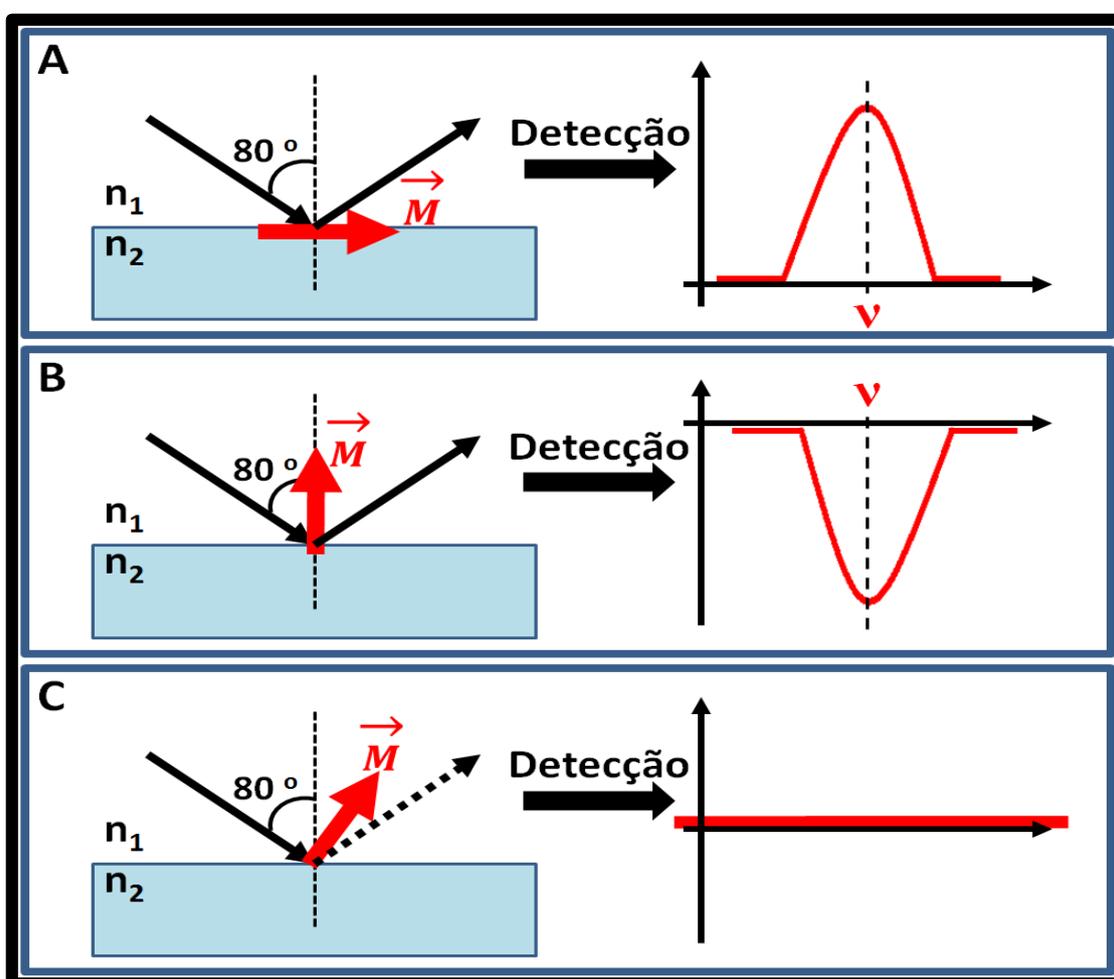


Figura 52 – Ilustração da relação entre a orientação do momento dipolo de transição (M) na interface ar(n_1)-água(n_2) e o sinal das bandas de absorção nos espectros de PM-IRRAS: (A) banda positiva com M orientado paralelo a superfície, (B) banda negativa quando M orientado normal a superfície e (C) ausência de banda, quando M orientado com ângulo de Brewster em relação a superfície. Fonte: elabora pelo autor e inspirada em Zheng e Leblanc (2007).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

ii. Experimental

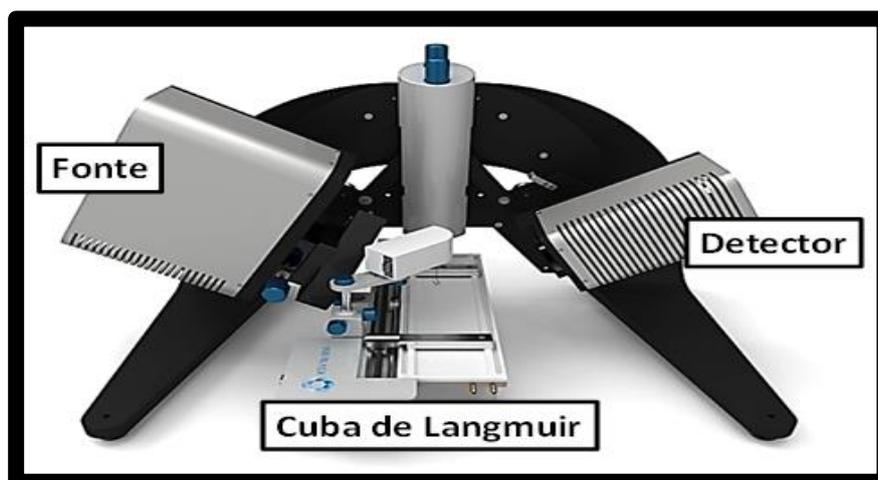


Figura 53 – Fotografia de um sistema PMI 550 KSV (fonte de luz infravermelha e detector) acoplado a uma mini cuba de Langmuir. Fonte: figura adaptada de KSV NIMA (*Web Page 6*).

Os espectros de infravermelho da região de interface ar-água foram obtidas empregando-se a Espectroscopia de absorção-reflexão Infravermelha com Polarização Modulada (PM - IRRAS O sistema de espectroscopia infravermelha PMI 550 KSV foi montada em uma mini cuba de Langmuir KSV (figura 53). A posição da fonte de luz infravermelha com polarização modulada foi ajustada de modo que o feixe de luz incidisse sob um ângulo de 80° (Blaudez *et al.*, 1994) (em relação à normal na interface ar-água). A resolução do aparelho é de aproximadamente 8 cm^{-1} . O tempo total de aquisição para cada espectro foi de 5 min e os valores das variáveis para a formação das monocamadas foram os mesmos empregados nos experimentos de isotermas de compressão. Apenas os espectros mais representativos são apresentados nos resultados. Conforme mencionado anteriormente, essa configuração experimental é considerada a mais otimizada para se obter espectros infravermelhos dos filmes de Langmuir na interface ar-água (Pavinatto *et al.*, 2009; Mendelsohn *et al.*, 2010; Nasir e Besson, 2012; Damalio *et al.*, 2013; Pavinatto *et al.*, 2013): primeiramente, porque a relação sinal-ruído é a mais elevada para esse ângulo de incidência (Blaudez *et al.*, 1994) e, em segundo lugar, porque o efeito de interferência do ambiente devido as vibrações das moléculas de vapor de água e do dióxido de carbono é significativamente reduzido com a polarização modulada da luz infravermelha.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

4.2) RESULTADOS

A) Solubilidade da natamicina em água

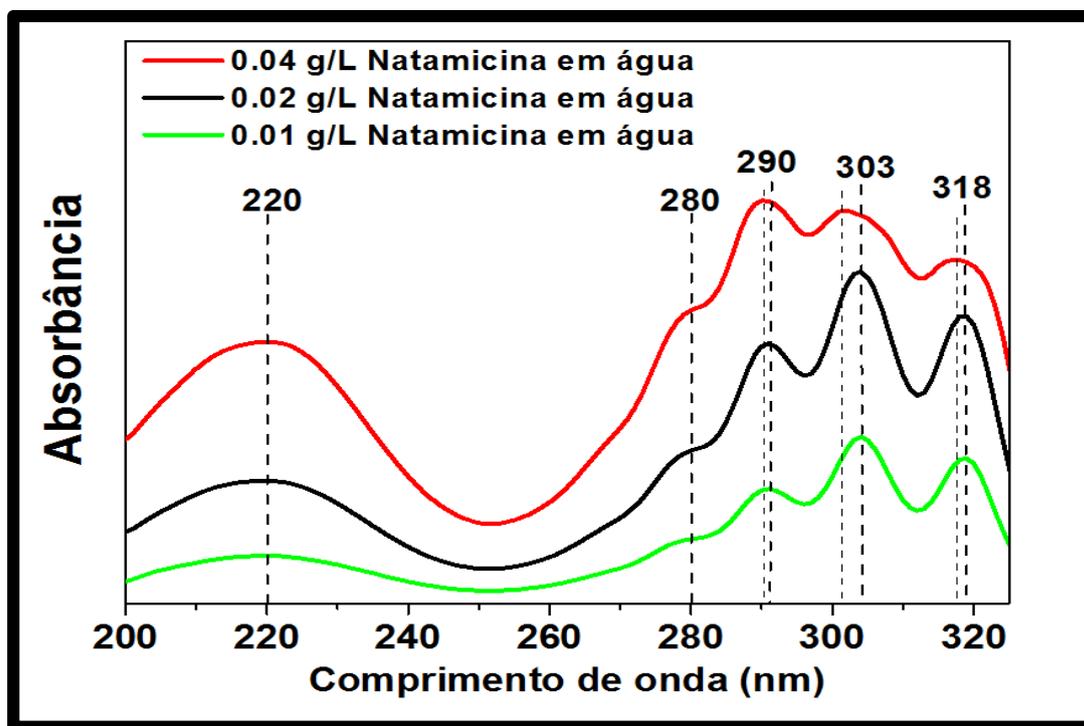


Figura 54- Espectro UV-Visível obtido para 3 concentrações distintas de natamicina em água ultrapura: 0.04g/L (linha vermelha), 0.02g/L (linha preta) e 0.01g/L (linha verde). As bandas entre 280nm e 320nm são típicas de moléculas tetraênicas, enquanto a banda em 220nm (enona) é característica da molécula de natamicina.

A natamicina é praticamente insolúvel em solventes não polares e em relação a sua atividade biológica, as soluções e as suspensões aquosas de natamicina são bastante estáveis, (Brik, 1981) o que justifica a preferência do emprego das formulações aquosas tanto para uso terapêutico, (Xu et al., 2009; Bhatta et al., 2012; Prajna et al., 2012) quanto como aditivo (conservante) alimentar. (Brik, 1994; Aparicio et al., 2000; Juneja et al., 2012) Por esse motivo, neste trabalho as soluções estoques de natamicina foram preparadas empregando-se água ultrapura (pH = 5,5 ~ 6) como solvente, para cujo valor de pH as moléculas de natamicina encontram-se ligeiramente carregadas positivamente, uma vez que o ponto isoelétrico desse antibiótico ocorre para um valor aproximado de pH = 6,5. (Brik, 1981; Thomas e Delves-Broughton, 2003) Embora a solubilidade da natamicina em água tenha sido estimada entre 0,03 g/L a 1,0 g/L, (Brik, 1981; Thomas e Delves-Broughton, 2003) nossas

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

investigações preliminares empregando-se 0,04 g/L como concentração inicial demonstraram que os experimentos não são reprodutíveis (dados não mostrados). Na figura 54, podemos observar os espectros de absorbância UV-visível para três distintos valores de concentrações da natamicina em água (0,01g/L, 0,02g/L e 0,04g/L), assim como, as 4 bandas distintas típicas dos compostos tetraênos no intervalo entre 280 a 320nm e a banda em 220 nm (enona cromófora) característica da estrutura química da natamicina. (Brik, 1981). Nessa figura, podemos notar que apenas para a presença de 0,04 g/L de natamicina em água (linha vermelha) diminutos alargamentos nas bandas 303nm e 318nm podem ser observados, o que significa que esse espectro UV-visível já monitora uma condição saturada para essa particular concentração. Por essas razões, para todos os experimentos descritos a seguir, escolhemos 0,02 g/L (linha preta) como valor de concentração padrão para a solução estoque de natamicina.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

B) Estudos da cinética de adsorção da natamicina na interface ar-água

Considerando-se que até o nosso conhecimento não existe nenhuma investigação profunda da atividade superficial (propriedades tensoativas) da natamicina na interface ar-água, os estudos cinéticos a seguir foram escolhidos como primeiros testes a fim de se investigar a capacidade ou não das moléculas de natamicina perturbarem a tensão de superfície da água, na presença ou não de monocamadas lipídicas.

i. Interface ar-água limpa

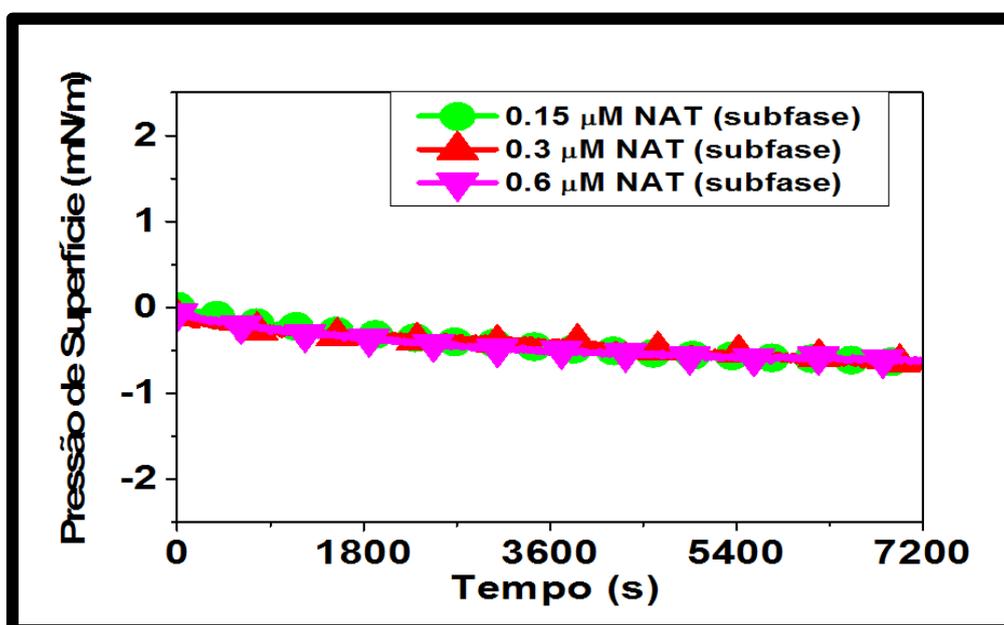


Figura 55 – Cinética de adsorção da natamicina numa interface ar-água limpa. A atividade interfacial da natamicina foi estudada empregando-se como subfase água ultrapura (pH 5.8) à 21°C na presença de 0,15μM (linha verde), 0,3μM (linha vermelha) ou 0,6μM (linha lilás) de natamicina solubilizada.

A figura 55 mostra que a presença de diferentes concentrações de natamicina na subfase não altera significativamente a pressão de superfície em função do tempo. Esses resultados indicam que, apesar do carácter anfotérico das moléculas de natamicina, elas não tendem a se adsorver numa interface ar-água limpa: essas moléculas “preferem” permanecer dispersas no interior do líquido, ao invés de migrarem para a região da interface. Desse modo, pode-se concluir que as moléculas de natamicina sozinhas não são capazes de formar uma monocamada de Gibbs numa interface ar-água limpa. Monocamadas de Gibbs são filmes monomoleculares formados na interface ar-água a partir da

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

adsorção de moléculas provenientes da subfase (Pavinatto et al., 2010). Essas verificações são interessantes, porque explicam os resultados obtidos por Demel et al. (1965), que mostrou pela primeira vez que dentre outros poliênos (anfotericina, nistatina e filipina) apenas a natamicina espalhada na interface ar-água exibia uma isoterma de compressão de baixa qualidade, isto é, apenas um pequeno aumento na pressão de superfície ($\sim 5\text{mN/m}$) pôde ser observado mesmo para valores extremamente baixos de área média por molécula ($\sim 8\text{Å}^2$) (Demel et al., 1968).

ii. Interface ar-água recoberta por uma monocamada de DPPC

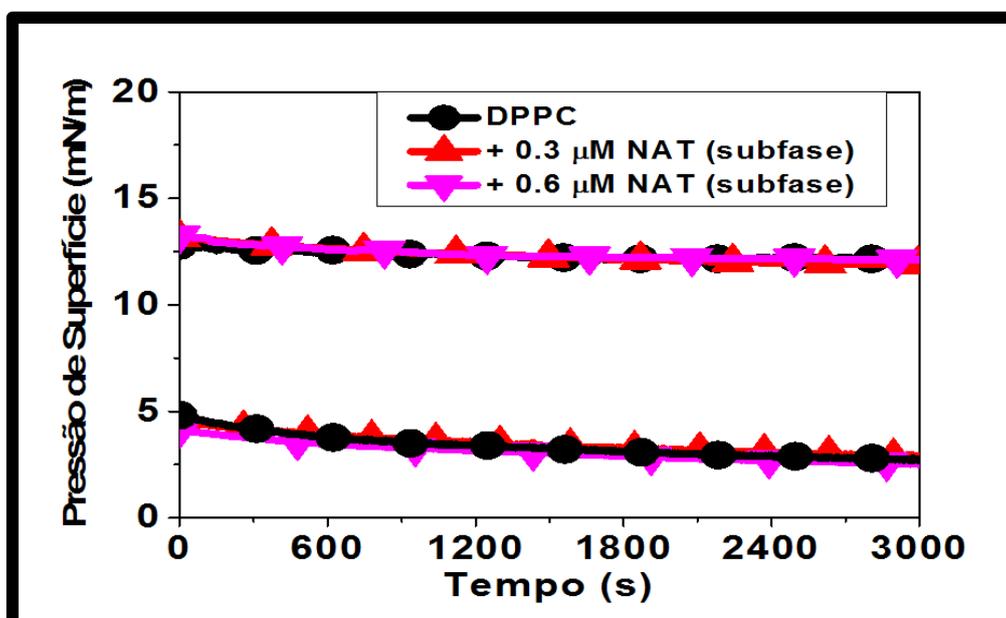


Figura 56 – Cinética de adsorção da natamicina numa interface ar-água recoberta por uma monocamada de DPPC estabilizada para dois valores distintos de pressão inicial de superfície (5mN/m e 13mN/m). A atividade interfacial da natamicina foi testada empregando-se como subfase água ultrapura ($\text{pH } 5.8$) à 21°C na ausência (linha preta) e na presença de $0,3\text{ }\mu\text{M}$ (linha vermelha) ou $0,6\text{ }\mu\text{M}$ (linha lilás) de natamicina.

O fosfolípido zwitteriônico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) é frequentemente empregado em modelos de membranas, porque a fosfatidilcolina (PC) é o componente mais abundante em membranas de mamíferos, sendo também um importante constituinte do fluido alveolar. (Mcconlogue e Vanderlick, 1997) A figura 56 mostra que as monocamadas puras constituídas pelo fosfolípido DPPC são bastante estáveis: as curvas em preto,

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

tanto para um baixo valor de pressão de superfície inicial (5 mN/m) como para um médio valor inicial (13 mN/m), atingem rapidamente cada qual um valor mínimo de pressão: 3 mN/m e 12 mN/m, respectivamente; cujos valores são mantidos praticamente inalterados em função do tempo. Por sua vez, a presença de diferentes concentrações de natamicina na subfase (curvas em vermelho e em violeta) não perturbam a estabilidade final (valores mínimos de pressão) das monocamadas de DPPC, o que indica que a natamicina, não penetra em monocamadas de DPPC na interface ar-água. Desse modo, esses resultados mostram que mesmo para uma superfície recoberta por um filme de Langmuir de DPPC, a natamicina não demonstra formar uma monocamada de Gibbs (*Pavinatto et al., 2010*). Em 1967 os estudos de Weissman e Sessa (1967) mostraram que soluções aquosas de agregados esféricos de fosfatidilcolina (PC) eram inertes na presença de natamicina. Estudos recentes *in vivo* e *in vitro* (*Te Welscher et al., 2008; Van Leeuwen et al., 2009*), empregando-se de marcadores fluorescentes, demonstraram que a natamicina não provoca ruptura, nem alterações na permeabilidade tanto nas membranas de fungos, quanto em vesículas unilamelares de DPPC. Nossos resultados corroboram com essas descobertas, já que, as moléculas de natamicina não exibem atividade superficial na presença de monocamadas de DPPC. Somando-se nossos resultados com os já obtidos na literatura, portanto, pode-se concluir que para as membranas modelo puras de DPPC, sejam elas monocamadas, sejam elas bicamadas (vesículas), as moléculas de natamicina, não penetram na matriz lipídica desses sistemas.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

iii. Interface ar-água recoberta por uma monocamada de colesterol

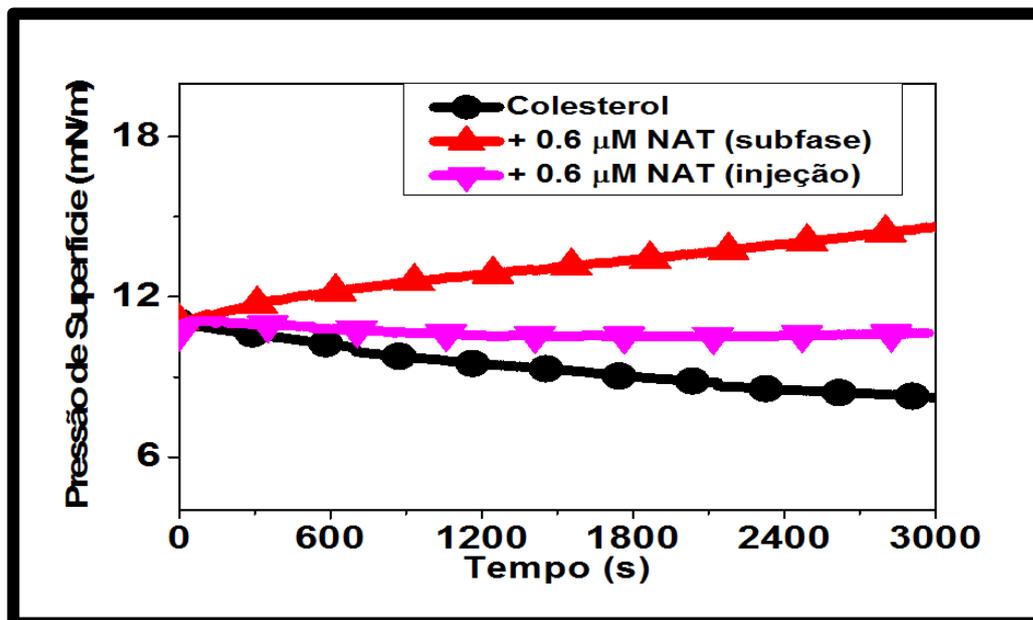


Figura 57 – Cinética de adsorção da natamicina numa interface ar-água recoberta por uma monocamada de colesterol formada inicialmente para um valor de pressão de superfície correspondente a 11mN/m. A atividade interfacial da natamicina foi testada empregando-se como subfase água ultrapura (pH 5.8) à 21 °C na ausência (linha preta) ou na presença de (0,6μM) de natamicina, a qual foi injetada (linha lilás) ou previamente solubilizada (linha vermelha).

Embora bicamadas puras de colesterol não existam na natureza (*Van Meer et al., 2008*), esse composto é constantemente estudado em modelos de membrana por ser o esterol típico da membrana plasmática em mamíferos e por participar diretamente na regulação da fluidez das bicamadas lipídicas. O comportamento da curva preta na figura 57 mostra que: 1) apesar do caráter predominantemente apolar, as moléculas de colesterol são capazes de formar um filme Langmuir nessa interface (valores positivos de pressão de superfície); (*Sabatini et al., 2008*) 2) ocorre uma lenta e progressiva queda na pressão de superfície inicial em função do tempo, o que pode estar correlacionada a uma metaestabilidade da monocamada formada (*Damalio et al., 2013*). Além disso, a injeção de natamicina favorece claramente a estabilidade da monocamada de colesterol: os valores da pressão de superfície se mantêm à 11 mN/m para o intervalo de tempo considerado (curva em roxo). Essa condição ocorre, provavelmente, devido a um equilíbrio entre o fenômeno de adsorção lenta de moléculas de natamicina injetadas e a o fenômeno de

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

empacotamento das moléculas de colesterol na interface. Finalmente, a curva em vermelho mostra que quando as moléculas de colesterol são espalhadas sobre a interface de uma subfase previamente enriquecida com natamicina, há um grande aumento nos valores de pressão de superfície (de 11 mN/m para 15 mN/m) em função do tempo, o que pode ser explicado pela intensa interação das moléculas de natamicina com as de colesterol na interface. Esses resultados confirmam a relatada afinidade da natamicina por moléculas de esterol (*Patterson, J. et al., 1979; Patterson, J. M. et al., 1979; Teerlink et al., 1980; Te Welscher et al., 2008*), pois mostram-se que a natamicina previamente dissolvida na subfase só apresenta uma grande atividade superficial (adsorção e penetração) quando a interface é rica em esterol, no caso o colesterol.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

C) Efeito da natamicina em monocamadas puras de DPPC ou de Colesterol

i. Propriedades mecânicas

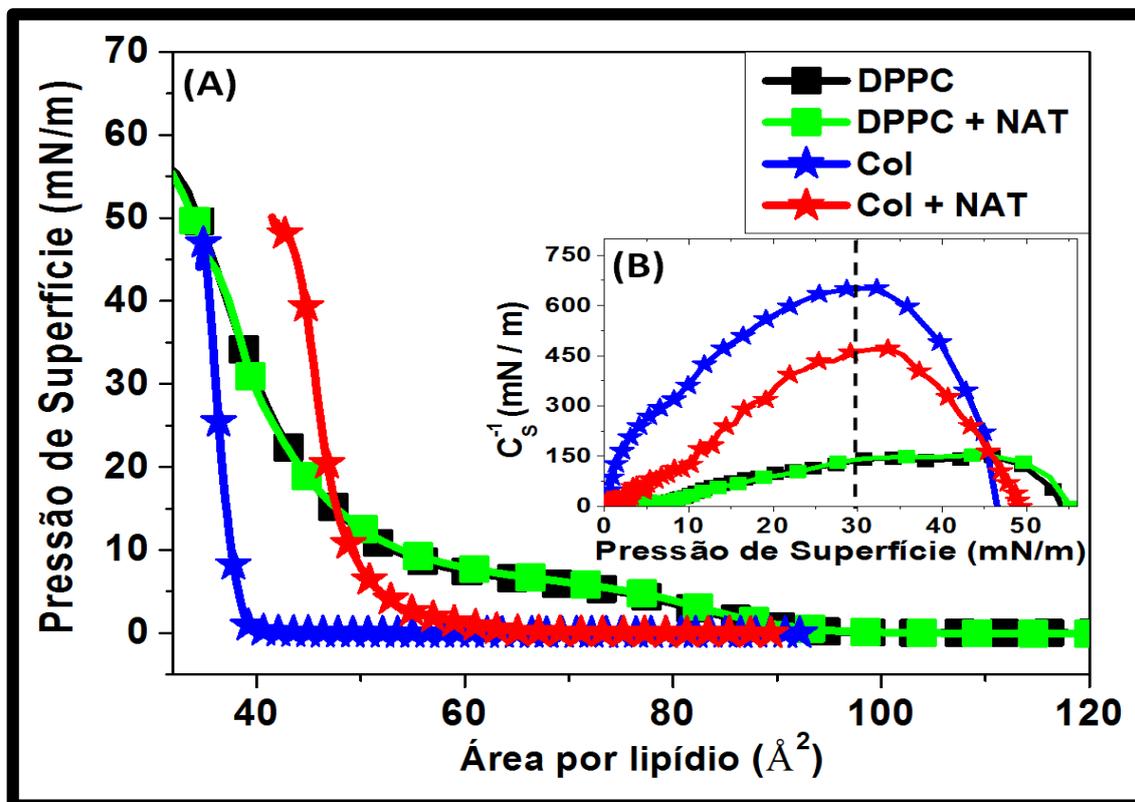


Figura 58 – (A) Isotermas de compressão (Pressão de superfície vs. área média molecular) para monocamadas de DPPC e de colesterol na interface ar-água. A subfase utilizada foi água ultrapura, pH = 5,8, T = 21 °C, com ou sem a adição de natamicina. (B) Gráfico da variação da elasticidade planar (C_s^{-1}) em função da pressão de superfície para as monocamadas investigadas. Os valores de C_s^{-1} (figura 58B) foram calculados a partir das isotermas da figura 58A, empregando-se a equação (4).

Em primeiro lugar, a figura 58A mostra que a presença de natamicina na subfase (linha verde) não altera o perfil da isoterma compressão para a monocamada de DPPC pura (linha preta), enquanto que em relação à isoterma padrão para o colesterol (linha azul), as moléculas de natamicina não só alteram o perfil dessa curva, mas como também promovem um significativo deslocamento dessa isoterma para maiores valores de área média por molécula (linha vermelha). Esses comportamentos podem ser quantificados através da análise dos valores para a área extrapolada (tabela 6) dessas isotermas, os quais mostram que a presença da natamicina não altera significativamente a área média molecular do DPPC, mas aumenta sensivelmente a área média

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

molecular do colesterol, ou seja, as moléculas de natamicina adsorvem/penetram nas monocamadas de colesterol e o efeito dessa interação é uma expansão da monocamada. Esses resultados eram esperados, uma vez que nossos estudos da cinética de adsorção demonstraram que as moléculas de natamicina apresentam atividade superficial apenas quando a interface ar-água é recoberta por monocamadas de colesterol.

Tabela 6 – Valores da área extrapolada e do módulo de compressibilidade (à 30mN/m) para as monocamadas de DPPC e de colesterol na ausência ou na presença de natamicina na subfase.

Monocamada	Área extrapolada (± 2Å²)	Cs⁻¹ (mN/m)
DPPC	52	138
+ Natamicina (Subfase)	53	140
Colesterol	38	650
+ Natamicina (Subfase)	49	463

Em segundo lugar, como explicado nos materiais e métodos, uma análise das propriedades mecânicas das monocamadas pode ser realizada através do cálculo da elasticidade no plano (seção 4.1C-iii, equação 4) a partir das isotermas de compressão obtidas. De acordo com a classificação proposta por Davis e Rideal (1963), a elasticidade no plano (Cs⁻¹) medida à 30mN/m (tabela 6), a qual corresponde ao valor de pressão equivalente de uma bicamada, mostra que as monocamadas de DPPC na presença ou não de natamicina encontram-se na fase líquida-condensada (Cs⁻¹= 100-250 mN/m), enquanto as monocamadas de colesterol puro ou adsorvidas por natamicina encontram-se ambas na fase condensada (Cs⁻¹> 250 mN/m). Além disso, neste particular valor de pressão de superfície, pode-se notar que o valor de Cs⁻¹ não se modifica significativamente para a monocamada de DPPC com a presença da natamicina, entretanto, torna-se bastante reduzida para a monocamada de colesterol adsorvida pelas moléculas de natamicina. Finalmente, como pode ser verificado no gráfico 58B, essa redução no valor da elasticidade no plano (Cs⁻¹) verificada para a monocamada de colesterol na presença de natamicina à 30mN/m (tabela 6), também ocorre nos demais valores de pressão de superfície considerados, o que indica que a natamicina interage com a monocamada de colesterol e que o

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

efeito dessa interação é um aumento geral na compressibilidade dessa monocamada, isto é, uma redução em sua rigidez. Nesse caso, a presença das moléculas de natamicina provavelmente leva à formação de domínios menos cooperativos (“soft material”) (*Pavinatto et al., 2009*), o que explicaria a perda do empacotamento (rigidez) típico de uma monocamada pura de colesterol. Por sua vez, a interação da natamicina com as moléculas de DPPC aparentemente é muito fraca ou inexistente, visto que a elasticidade no plano não sofre nenhuma alteração significativa para todo intervalo de pressão analisado (figura 58B).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

ii. Morfologia

As morfologias das monocamadas de DPPC e de colesterol na presença ou ausência da natamicina foram estudadas através da análise das imagens obtidas por microscopia do ângulo de Brewster (BAM). Como mencionado anteriormente (ver BAM , materiais e métodos) , nessas imagens em escala de cinza, as regiões mais escuras representam a superfície de água limpa (sem reflexão da luz), enquanto as mais brilhantes , a superfície da água recoberta pelas moléculas de monocamada (reflexo da luz).

a) Efeito da natamicina sobre a morfologia da monocamada de DPPC

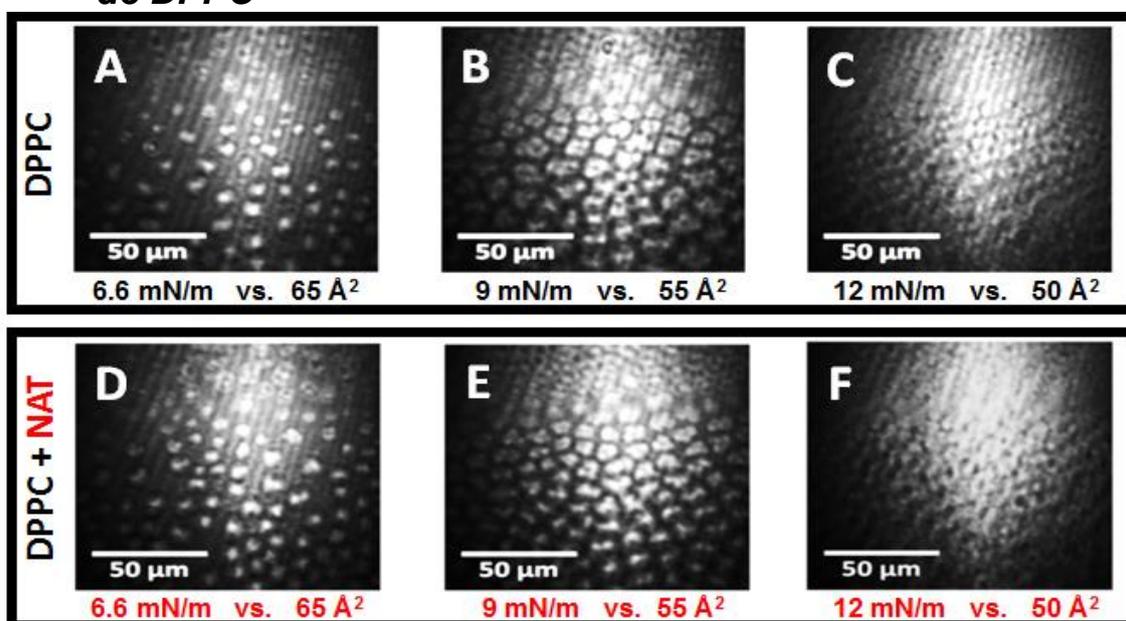


Figura 59 – Imagens de BAM obtidas para uma monocamada pura de DPPC (A, B, C) ou na presença de natamicina na subfase (D, E, F) a diferentes valores de pressão (mN/m) vs. área molecular por lipídio (Å²).

Em primeiro lugar, na figura 59, o conjunto de imagens (A,B e C) e o conjunto (D,E e F) correspondem, respectivamente, às imagens de BAM capturadas para as monocamadas puras de DPPC e para as monocamadas de DPPC na presença de natamicina. Essas imagens provam que a presença da natamicina não altera a morfologia da monocamada de DPPC: à 6,6 mN/m (figura 59A) e à 9mN/m (figura 59B) a característica coexistência das fases líquida-expandida (regiões escuras) e líquida-condensada (domínios brilhantes) (Mcconlogue e Vanderlick, 1997; Sabatini et al., 2008) mantém-se inalterada

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

com a presença das moléculas de natamicina (figura 59D e E); do mesmo modo, à 12 mN/m (figura 59C) o início da fase líquido-condensada (filme contínuo e brilhante), não é afetada pela natamicina (figura 59F).

b) Efeito da natamicina sobre a morfologia da monocamada de Colesterol

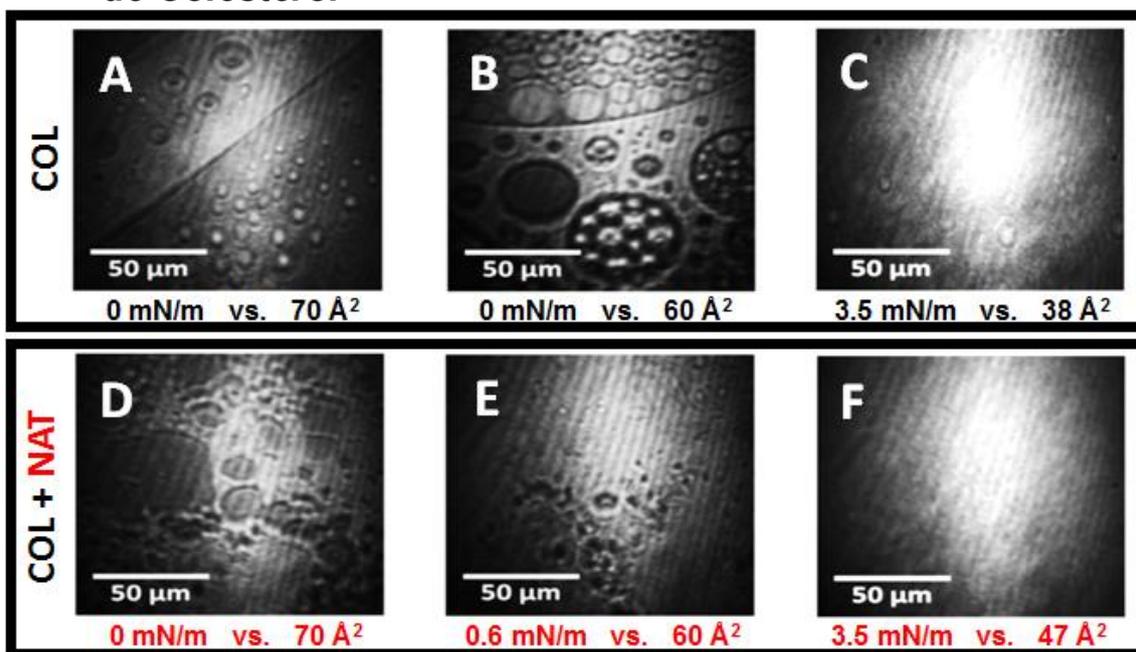


Figura 60 – Imagens de BAM obtidas para uma monocamada pura de colesterol (A, B, C) ou na presença de natamicina na subfase (D, E, F) a diferentes valores de pressão (mN/m) vs. área molecular por lipídio (Å²).

Na figura 60 o conjunto de imagens (A, B, C) e o conjunto (D, E e F) referem-se, respectivamente, às imagens de BAM capturadas para as monocamadas puras de colesterol e para as monocamadas de colesterol adsorvidas de natamicina. Como pode ser visto nessas imagens, a presença das moléculas de natamicina modifica drasticamente a morfologia das monocamadas de colesterol à baixa pressões: para a área média molecular 70Å² (figura 60A) a monocamada de colesterol não altera a tensão de superfície da água (pressão nula) e é caracterizada pela predominância da fase gasosa (regiões escuras) na qual estão presentes domínios retilíneos ou circulares na fase líquido-condensada (regiões claras), enquanto que a adição da natamicina nesse sistema (figura 60D) provoca a formação de “clusters” de formas

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

geométricas irregulares; à 60 Å, a monocamada pura de colesterol também não altera a tensão de superfície da água (pressão nula) e a coexistência de domínios circulares na fase líquido-expandida (regiões claras) e de domínios na fase gasosa (regiões escuras) ainda pode ser notada (figura 60B), enquanto que na presença das moléculas de natamicina (figura 60E), exceto pelas diminutas regiões na fase gasosa regiões (escuras), essa monocamada encontra-se praticamente em sua totalidade na fase líquida-condensada (filme contínuo e brilhante) e, conseqüentemente, um valor positivo para a pressão de superfície é registrado (0,6 mN/m). Por sua vez, para um mesmo valor positivo de pressão de superfície (3.5 mN/m), embora a área ocupada por lipídio para a monocamada de colesterol contendo natamicina adsorvida (47Å) tenha-se tornado significativamente maior que a monocamada pura (38 Å), podemos notar que tanto a monocamada pura de colesterol (figura 60C) quanto a na presença de natamicina (figura 60F) encontram-se numa fase líquida-condensada (filme contínuo e brilhante). Desse modo, para esse último valor de pressão o efeito da natamicina sobre a morfologia das monocamadas de colesterol não pode ser definido empregando-se a técnica em questão.

Em resumo, esses resultados revelam que a natamicina não altera a morfologia das monocamadas de DPPC, mas modifica significativamente a morfologia dos filmes de colesterol à baixa pressão (pressão próxima de zero). Além disso, confirmam que essa adsorção promove um efeito expansivo das monocamadas de colesterol, pois para um mesmo valor de área média molecular (60 Å), os filmes de colesterol adsorvidos de natamicina tornam-se praticamente contínuos (figura 60E), enquanto os filmes colesterol puro ainda encontram-se numa fase mais segregada (figura 60B).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

iii. Orientação molecular

O efeito da natamicina sobre as orientações moleculares dos lipídios foi estudado através da análise dos espectros de PM- IRRAS obtidos para as monocamadas de DPPC (figura 61) e de colesterol (figura 62) a diferentes pressões de superfície (5mN/m, 10mN/m e 30mN/m).

a) Efeito da natamicina sobre a organização molecular da monocamada de DPPC

Primeiramente, analisemos os espectros de PM-IRRAS para as monocamadas de DPPC. No intervalo de frequências entre 1000 e 1800 cm^{-1} (figura 61A, B e C) e para todos os valores de pressão de superfície considerados, pode-se verificar que a presença da natamicina (linha vermelha) não desloca as bandas de vibrações originais (linha preta) do DPPC, às quais correspondem ao estiramento do grupo C=O ($\nu=1736\text{-}1739\text{ cm}^{-1}$), do grupo P=O ($\nu_{AS} = 1228\text{cm}^{-1}$ e $\nu_S = 1086\text{cm}^{-1}$) e às vibrações tipo “tesoura” do CH₂ ($\nu=1469\text{ cm}^{-1}$). O aumento no valor de frequência do C=O (linha preta) de 1736cm^{-1} (figura 61A e B) para 1739cm^{-1} (figura 61 C) com o incremento no valor da pressão de superfície comprova que as moléculas de DPPC se tornam mais ordenadas (Dziri *et al.*, 1999) devido à compressão: inicialmente (pressão 5mN/m) as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água (subfase) e o grupo C=O determinam uma frequência de vibração mais reduzida para esse grupo; entretanto, a contínua compressão dessa monocamada leva a um progressivo incremento na pressão de superfície (10mN/m e 30 mN/m), e, portanto, gera um emparelhamento das cadeias hidrocarbônicas, o que, por sua vez, desfavorece as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e o grupo C=O e assegura, conseqüentemente, uma maior liberdade de movimento para esse grupo, ou seja, valores mais altos de frequências de vibração do C=O para uma monocamada mais condensada. Do mesmo modo, considerando-se que não só o grupo C=O, mas também o P=O dos fosfolipídios são muito sensíveis a ligações de hidrogênio e, visto que a presença das moléculas natamicina (linha vermelha) não altera as bandas de vibrações originais (linha preta) desses grupos, pode-se concluir que a hidratação das cabeças polares do DPPC não é afetada (Mendelsohn *et al.*, 2010) para todas as pressões consideradas (figura

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

61 A,B e C). Além disso, como tanto a intensidade, quanto a frequência de vibração "tesoura" do CH₂ também não se modificam com a presença da natamicina para as diferentes pressões de superfície monitoradas durante a compressão, esses resultados demonstram que a presença desse fármaco não altera a cooperatividade (uniformidade) de transição das cadeias hidrocarbônicas (Dziri *et al.*, 1999).

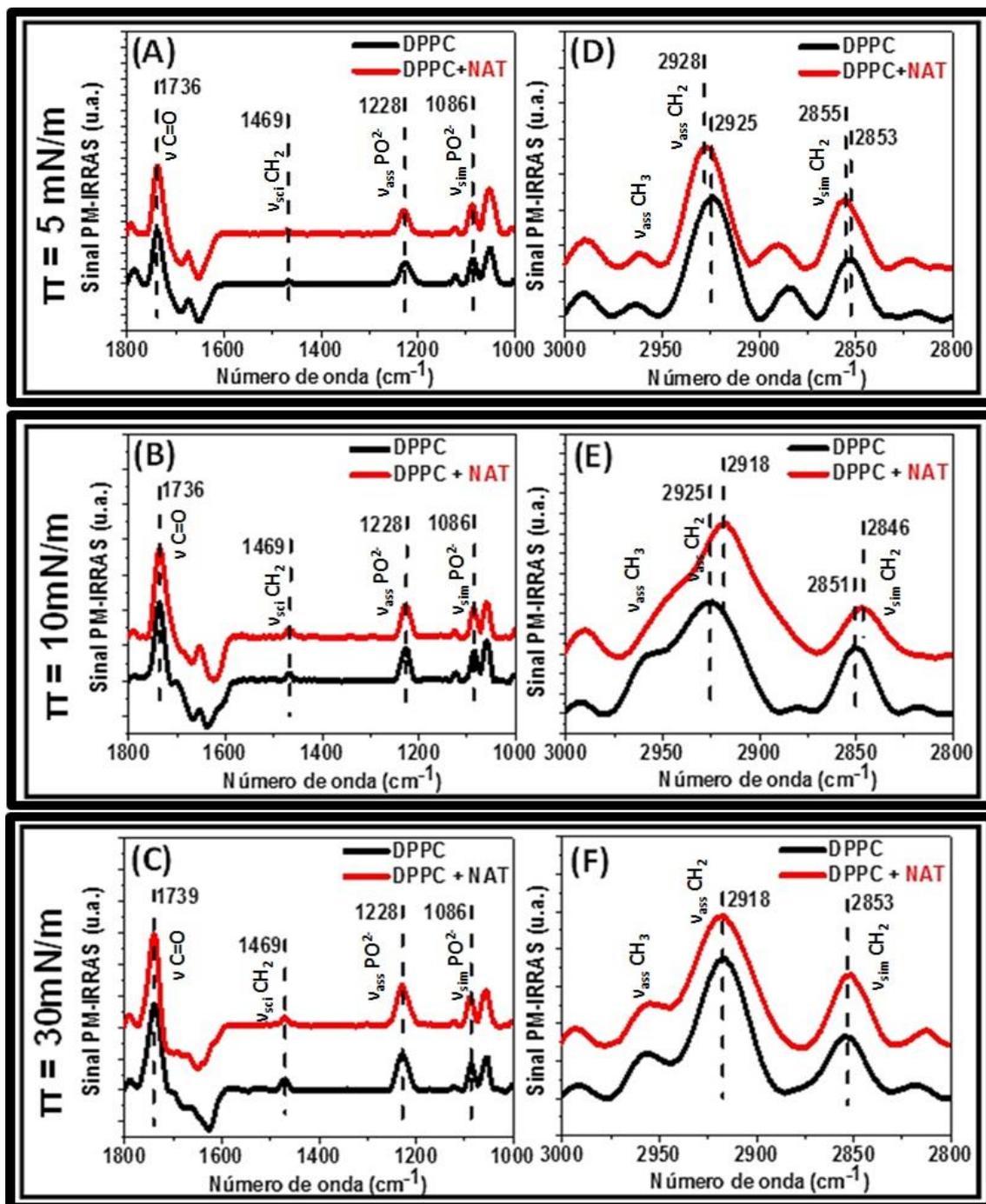


Figura 61 – Espectros de PM-IRRAS obtidos para as monocamadas de DPPC à 5 mN/m (A e D), 10mN/m (B e) e 30mN/m (C e F).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Por fim, para o intervalo de frequências entre 2800 e 3000 cm^{-1} (figura 61 D, E e F), pode-se notar que a presença da natamicina promove os seguintes efeitos: à pressão de superfície à 5mN/m (Figura 61D) ocorre um inexpressivo aumento tanto nas vibrações de estiramento assimétrico do CH_2 (2925 cm^{-1} deslocado para 2918 cm^{-1}), como no simétrico (2853 cm^{-1} deslocado para 2855 cm^{-1}); à 10mN/m (figura 61E) ocorre uma leve diminuição tanto nas vibrações de estiramento assimétrico do CH_2 (2925 cm^{-1} deslocado para 2928 cm^{-1}), como no simétrico (2851 cm^{-1} deslocado para 2846 cm^{-1}); enquanto que à 30mN/m (figura 61F) nenhuma alteração pode ser observada. À 5mN/m e à 10mN/m a monocamada de DPPC encontra-se, respectivamente, no início e no final da fase de transição LE-LC (*Sabatini et al., 2008; Dynarowicz-Latka et al., 2013*), a qual corresponde ao patamar na isoterma de compressão do DPPC (figura 58A) e caracteriza-se pela coexistência de domínios na fase líquida-expandida (LE) e na líquida-condensada (LC) (figura 59A) (*Mcconlogue e Vanderlick, 1997*); enquanto que à 30mN/m ela encontra-se integralmente na fase condensada.

Sumariamente nossas medidas de PM-IRRAS indicam que o efeito da natamicina sobre a organização das monocamadas de DPPC é desprezível. Esses resultados somados aos anteriores sugerem que a interação da natamicina com as monocamadas de DPPC é tão fraca de modo que nenhuma alteração significativa pôde ser notada na elasticidade (compressibilidade), na morfologia (BAM) e nas orientações moleculares (bandas de PM-IRRAS) dessas monocamadas.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

b) Efeito da natamicina sobre a organização molecular da monocamada de Colesterol

Se para as monocamadas de DPPC não foi possível verificar nenhuma alteração significativa, por outro lado, para as monocamadas de colesterol, a presença de natamicina promove notáveis modificações: à 5 mN/m (figura 62A), há um aumento das vibrações tanto para o estiramento assimétrico (2937 cm^{-1} deslocado para 2944 cm^{-1}) e simétrico do CH_2 (2851 cm^{-1} deslocado para 2856 cm^{-1}), como para estiramento simétrico do CH_3 (2886 cm^{-1} deslocado para 2890 cm^{-1}); à 10 mN/m (figura 62B), ocorre um aumento nas vibrações tanto para o estiramento simétrico do CH_2 (2851 cm^{-1} deslocado para 2853 cm^{-1}), como para o estiramento simétrico do CH_3 (2886 cm^{-1} deslocado para 2890 cm^{-1}), enquanto que o valor correspondente à razão entre as intensidades das bandas para o estiramento assimétrico do CH_2 (2934 cm^{-1}) e do CH_3 (2953 cm^{-1}) é reduzida. Esses valores para as bandas estão de acordo com aqueles relatados por Sócrates (2001), (Socrates, 2001) e esses resultados indicam que a adsorção da natamicina promove uma leve perda de ordenamento molecular, (Mendelsohn e Flach, 2002; Pavinatto *et al.*, 2009; Mendelsohn *et al.*, 2010), isto é, os grupos CH_2 e CH_3 do colesterol apresentam um pequeno aumento na frequência de suas vibrações. Esse efeito está provavelmente correlacionado a um aumento na distância entre as moléculas de colesterol através da formação de “defeitos” (domínios irregulares) pela ação natamicina, os quais puderam ser observados nas imagens por BAM (figura 60 D e E). Além disso, à 10mN/m a intensidade da banda para o estiramento assimétrico do CH_3 aumenta, enquanto que para o CH_2 diminui. Considerando-se que alterações nas intensidades das bandas C-H estão relacionadas a mudanças de orientação molecular, (Tolstoy *et al.*, 2003; Pavinatto *et al.*, 2009) nós podemos inferir que para esse valor específico de pressão a presença da natamicina perturba a orientação e a organização das moléculas de colesterol na interface ar-água. Finalmente, considerando-se o valor de pressão de superfície equivalente a uma bicamada (30 mN/m) (Marsh, 1996; Anglin e Conboy, 2008), a presença da natamicina aparentemente não promove nenhuma alteração na organização da monocamada de colesterol (figura 62C), uma vez que nenhuma das bandas originais (em preto) sofreu alterações decorrentes da adição da natamicina (em vermelho).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

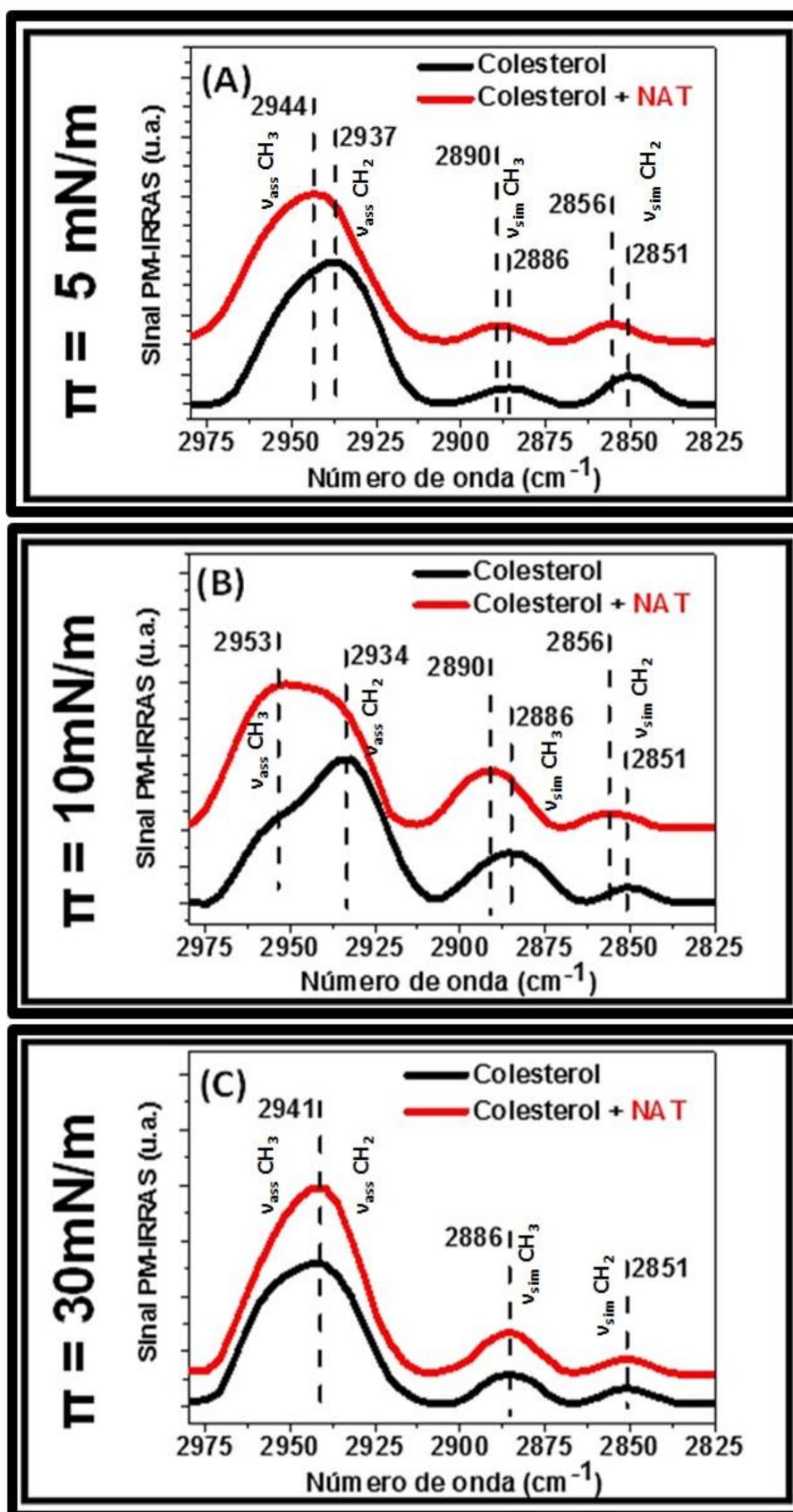


Figura 62 – Espectros de PM-IRRAS obtidos para as monocamadas de colesterol à (A) 5mN/m, (B) 10mN/m e (C) 30mN/m.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

D) Efeito da natamicina em monocamadas mistas de DPPC e Colesterol

Considerando-se que os resultados anteriores comprovam uma atividade superficial (interface ar-água) da natamicina na presença do esteroi colesterol, decidiu-se investigar a interação da natamicina com filmes de Langmuir que mimetizassem uma membrana biológica rica em esteroi e, portanto, a composição escolhida para essas monocamadas correspondeu à mistura de diferentes proporções entre DPPC e colesterol, os quais, como mencionado anteriormente, são o fosfolipídeo e o esteroi, respectivamente, mais abundantes nas membranas de mamíferos.

i. Propriedades Mecânicas

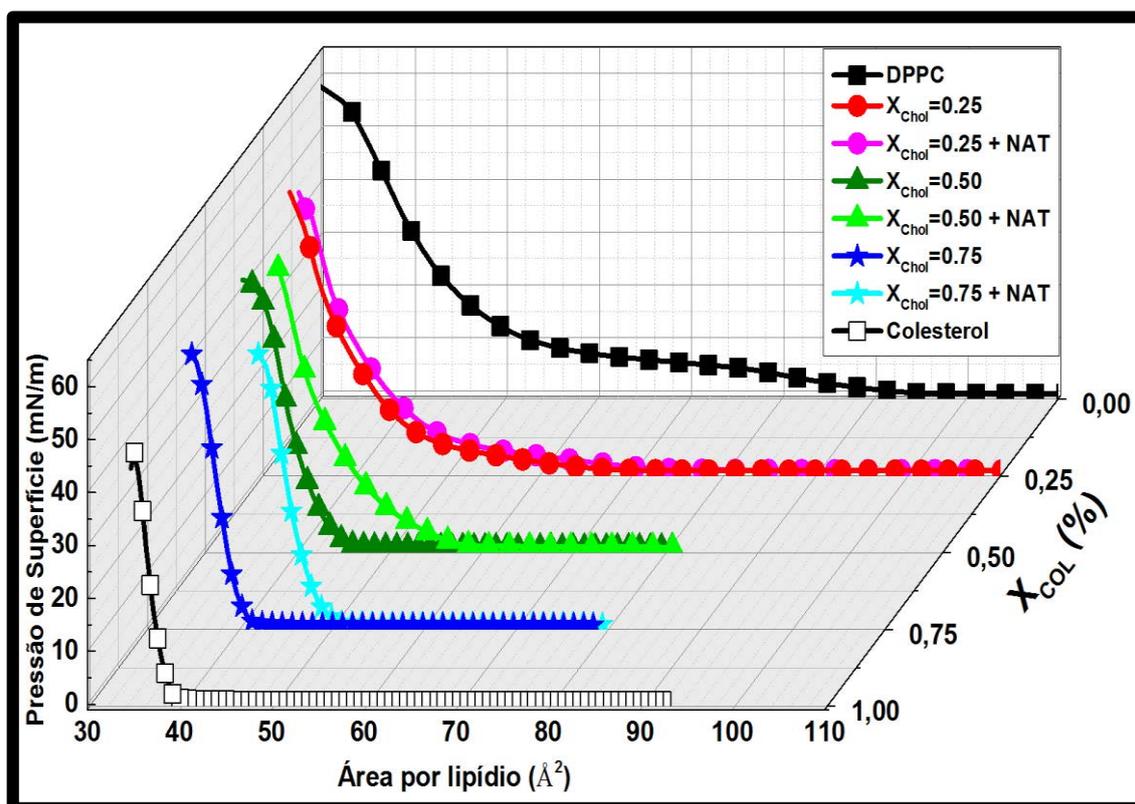


Figura 63- Pressão de superfície (π) vs. área média molecular isotérmica (A) compressão para DPPC e colesterol e suas misturas (fração molar do colesterol, X_{col}) espalhados na interface ar-água. A subfase utilizado foi água ultrapura, pH = 5,8, T = 21 ° C, com ou sem a adição de natamicina.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Em primeiro lugar, a análise das curvas de pressão de superfície vs. a área média molecular (figura 63) mostra que conforme aumenta-se o teor de colesterol (X_{Col}) nas monocamadas de DPPC, as isotermas correspondentes deslocam progressivamente para esquerda, isto é, para uma região com valores menores de área por lipídio, quando comparadas com a isoterma do DPPC puro. Esse comportamento pode ser quantificado através da medição dos valores para a área extrapolada nessas isotermas (tabela 7), os quais assumem valores menores proporcionais ao aumento de colesterol (X_{Col}) na monocamada estudada. Esse efeito de condensação devido à presença de colesterol já é conhecido para monocamadas de fosfolípidos (*Sabatini et al., 2008; Minones et al., 2009; Pavinatto et al., 2009*). Além disso, exceto para a monocamada com baixo teor de colesterol ($X_{Col} = 0,25$), a presença de natamicina na subfase reduz esse efeito de condensação do colesterol, isto é, desloca as isotermas correspondentes para regiões de maiores valores de área por lipídio (figura 63). Esse fenômeno pode ser comprovado através da análise da área extrapolada dessas isotermas (tabela 7), a qual assume maiores valores para as monocamadas contendo médio-alto teor de colesterol ($X_{Col}=0,5$ e $X_{Col}=0,75$) com a presença da natamicina. Esses resultados, portanto, indicam que: (i) as moléculas da natamicina preferem adsorver em monocamadas de DPPC com médio-alto teor de colesterol ($X_{Col} \geq 0,5$), e que (ii) essa interação resultante promove um efeito de expansão dessas monocamadas mistas.

Tabela 7: Valores da área extrapolada e do módulo de compressibilidade para diferentes composições de monocamadas na ausência ou na presença de natamicina na subfase.

Monocamada DPPC/Colesterol	Área extrapolada ($\pm 2 \text{ \AA}^2$)	Cs⁻¹ (mN/m)
$X_{COL}=0,25$	46	172
+ Natamicina (Subfase)	47	163
$X_{COL}=0,5$	43	358
+ Natamicina (Subfase)	47	192
$X_{COL}=0,75$	41	474
+ Natamicina (Subfase)	44	469

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

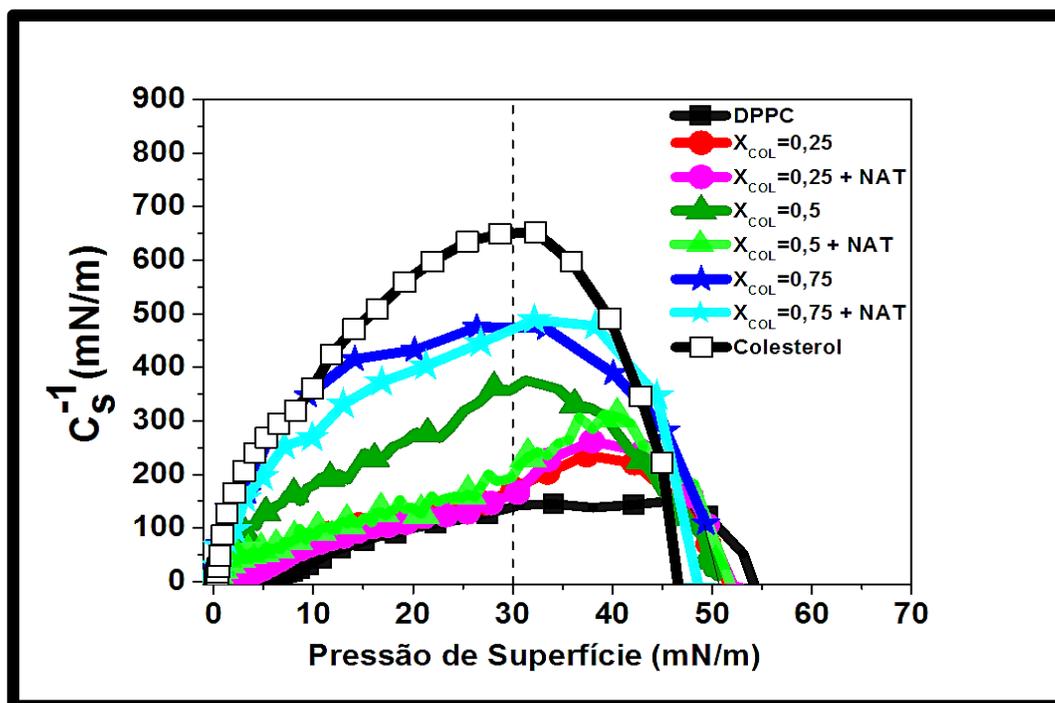


Figura 64 – Elasticidade planar (C_s^{-1}) vs. pressão de superfície para as monolayers investigadas. Os valores foram calculados a partir das isotermas pontos da figura 35, utilizando a equação (5)

Em segundo lugar, a análise da elasticidade planar (C_s^{-1}) vs. pressão de superfície (figura 64), permite verificar que quanto maior é o teor de colesterol (X_{Col}), maior é a rigidez (C_s^{-1}) da monolayer correspondente. Entre 0 a 30 mN/m, a adição de natamicina na subfase para monolayers com baixo teor de colesterol ($X_{Col} = 0,25$) não promove uma alteração significativa na elasticidade geral, enquanto que para a com elevado teor de colesterol ($X_{Col} = 0,75$), ocorre uma pequena diminuição (figura 64). Curiosamente, apenas para $X_{Col} = 0,5$, a presença da natamicina altera significativamente o perfil da isoterma, o que pode ser comprovada por meio da verificação de uma elevada redução na rigidez (C_s^{-1}) para essa monolayer mista entre 0 a 30 mN/m (figura 64).

Como esperado, para o valor específico de pressão 30 mN/m (tabela 7), o qual corresponde à pressão equivalente de uma bicamada (Marsh, 1996; Anglin e Conboy, 2008), os comportamentos anteriores se repetem, isto é, a presença da natamicina provoca uma alteração pouca significativa na rigidez (C_s^{-1}) para monolayer com baixo teor de colesterol ($X_{Col} = 0,25$), uma pequena redução para a monolayer com alto teor de colesterol ($X_{Col} = 0,75$), e uma grande redução para a monolayer contendo médio teor de colesterol ($X_{Col} = 0,50$).

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

É importante notar que de acordo com a classificação de Davis e Rideal (1963), apenas para a monocamada contendo $X_{Col} = 0,5$ podemos verificar a ocorrência de uma transição de fase com a presença da natamicina (tabela 7): inicialmente essa monocamada mista encontra-se na fase condensada ($Cs^{-1} > 250 \text{ mN/m}$), e após a adsorção da natamicina assume características de uma fase líquida-condensada ($Cs^{-1} = 100\text{-}250\text{mN/m}$). Esse efeito de transição está relacionado provavelmente com a solubilidade máxima das moléculas de colesterol em membranas de fosfatidilcolina (PC): apenas cerca de 37,5% mol de colesterol é homogeneamente disperso numa bicamada fosfolipídica (Barrett et al., 2013), acima desse valor ocorre a formação de pequenas placas (agregados lamelares) de colesterol (Ziblat et al., 2010; 2011; Ziblat et al., 2012; Mainali et al., 2013).

Kim et al. (2001) empregou a técnica de microscopia por força atômica (AFM) para estudar a morfologia de filmes Langmuir-Blodgett constituídos por diferentes proporções entre DPPC e colesterol, e seus resultados mostraram que as monocamadas contendo 10-30% mol de colesterol eram homogêneas e lisas, enquanto que as com 50% mol de colesterol foram caracterizadas como filmes mais rugosos e dotados de domínios irregulares. Desse modo, considerando-se que somente as monocamadas com baixo teor de colesterol ($X_{Col} = 0,25$) encontram-se na fase líquida-condensada ($Cs^{-1} = 100\text{-}250\text{mN/m}$) independentemente da presença ou não de natamicina (figura 64, tabela 7), pode-se sugerir que as moléculas de natamicina aparentemente demonstram combater a formação dessas placas de colesterol numa monocamada com $X_{Col} = 0,5$, provavelmente, através da remoção (sequestro) ou da solubilização das moléculas excedentes de colesterol, até que esta monocamada adquira propriedades mecânicas (elasticidade geral) equivalente a uma com baixo teor de colesterol ($X_{Col}=0,25$), para cuja composição lipídica a solubilidade do colesterol é garantida ($X_{Col} < 37,5\%$ mol). Por outro lado, esse efeito de aumento da fluidez (redução nos valores de Cs^{-1}) devido à natamicina é quase imperceptível tanto nas monocamadas com baixo quanto nas com alto teor de colesterol porque: (i) a primeira ($X_{Col} = 0,25$) como mencionado anteriormente, já apresenta a totalidade das moléculas de colesterol homogeneamente dissolvidas e, além disso, essa composição vem sendo considerada a configuração da membrana modelo binária mais estável (Sabatini et al., 2008;

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Szczes *et al.*, 2012); (ii) enquanto a última ($X_{Col} = 0,75$) apresenta um elevado valor para sua elasticidade (tabela 7) que é muito próximo daquele encontrado para uma monocamada pura de colesterol adsorvida de natamicina (tabela 6), e portanto, o valor coincidente em torno dos ~ 460 mN/m aparentemente demonstra caracterizar um valor limite para a rigidez ($Cs^{-1} > 250$ mN/m) de uma monocamada de colesterol perturbada pela presença de impurezas, as quais no nosso caso são representadas pela adição de moléculas anfotéricas de natamicina e/ou de DPPC.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

ii. Propriedades Termodinâmicas

A figura 65A mostra que a área média de excesso A_{exc} assume valores negativos para todas proporções de misturas entre DPPC e colesterol, o que confirma o "efeito de condensação" do colesterol (Sabatini et al., 2008; Minones et al., 2009; Pavinatto et al., 2009) e a miscibilidade dos componentes investigados (Mansour et al., 2001). Como pode ser visto, os valores mais negativos para a área média molecular em excesso A_{exc} ocorre para $X_{Col} = 0,25$ (figura 65A), mesmo quando a natamicina está presente nessa composição (figura 65B), o que confirma a grande estabilidade e a forte interação entre as moléculas de DPPC e de colesterol nesse sistema. Como esperado, apenas para as monocamadas contendo médio-alto teor de colesterol ($X_{Col} \geq 0,5$) a A_{exc} assume valores positivos com a adição da natamicina no sistema (figura 65B), o que indica uma expansão dessas monocamadas (Sabatini et al., 2008; Minones et al., 2009; Szczes et al., 2012). Além disso, quanto maior o teor de colesterol, maior é esse efeito expansivo promovido pela interação natamicina-colesterol, isto é, A_{exc} assume maiores valores positivos quanto maior for o teor de colesterol presente na monocamada (figura 65B) e, conseqüentemente, elas se tornam mais instáveis.

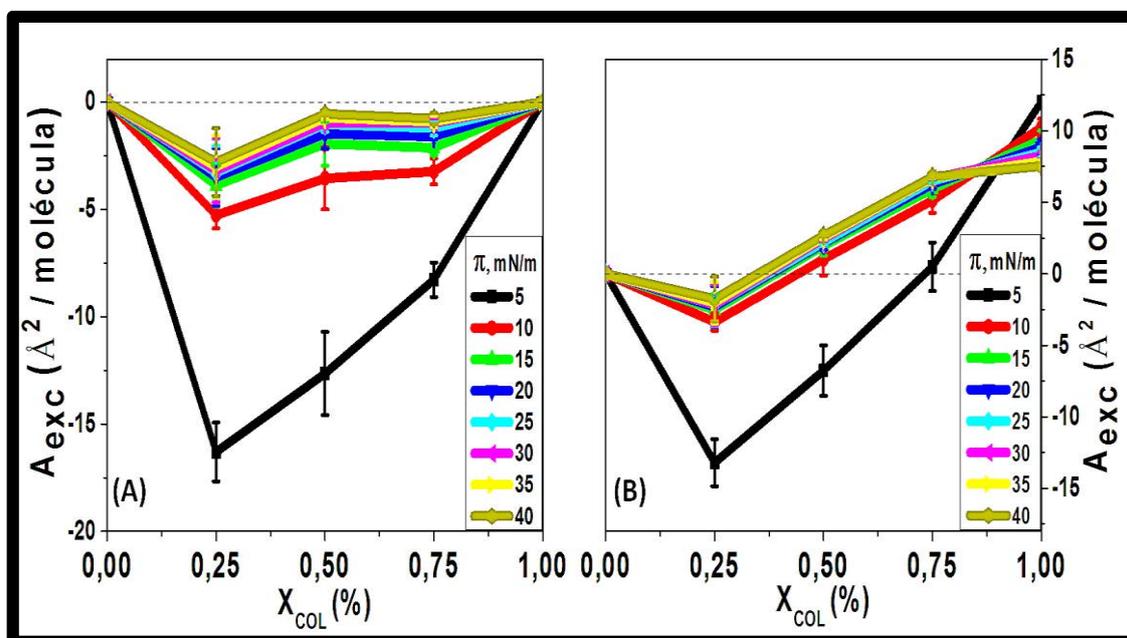


Figura 65- Área média em excesso (A_{exc}) vs. composição da monocamada (fração molar de colesterol, X_{Col}) a diferentes pressões de superfície obtidas para misturas de DPPC e colesterol espalhadas na superfície da (A) água ultrapura, ou (B) de uma solução aquosa de natamicina.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

Em resumo, esses resultados mostram que a natamicina expande as monocamadas de colesterol, mas não as de DPPC. Desse modo, para monocamadas mistas contendo baixo teor de colesterol ($X_{Col} = 0,25$) o efeito expansivo da natamicina é inferior ao efeito condensativo das moléculas de colesterol sobre as moléculas de DPPC. Por outro lado, para elevados teores de colesterol ($X_{Col} \geq 0,5$), o efeito expansivo da natamicina sobre as moléculas de colesterol supera o efeito condensativo das moléculas de colesterol sobre as moléculas de DPPC.

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

4.3) DISCUSSÕES GERAIS

Primeiramente, desde os estudos de Demel et al.(1965), cujas investigações abordaram extensivamente a penetração de monocamadas e de bicamadas lipídicas por antibióticos poliênos macrolídeos (Demel e Van, 1965; Demel et al., 1968; Demel e Joos, 1968; Van Zutphen et al., 1971; Dekruiff et al., 1974; Teerlink et al., 1980), até o nosso conhecimento nós comprovamos pela primeira vez que as moléculas de natamicina não formam uma monocamada de Gibbs numa interface ar-água limpa. Esse resultado é interessante porque: explica o motivo de Demel et al. (1965; 1968) ter obtido isotermas de compressão de baixa qualidade ao se espalhar a natamicina numa superfície limpa (aquosa); e também porque confirma a tendência das moléculas de natamicina de ficarem dispersas no interior da subfase, hipótese esta primeiramente sugerida por Weissmann e Sessa (1967). Por outro lado, em relação às monocamadas lipídicas puras, nossos resultados revelam que as moléculas de natamicina não são capazes de perturbar a organização das monocamadas de DPPC, enquanto que para as monocamadas de colesterol as interações intermoleculares entre as moléculas de natamicina e colesterol são fortes o bastante para alterar os domínios (morfologia), cujas alterações foram acompanhadas por uma expansão da monocamada (aumento da área média molecular ocupada) e por uma redução na elasticidade (aumento na compressibilidade).

Em segundo lugar, em relação às monocamadas lipídicas mistas, observou-se que a presença do antifúngico natamicina não alterou de forma significativa o comportamento das curvas de pressão de superfície vs. área molecular por lipídio para monocamadas que mimetizam as membranas de mamíferos ($X_{Col} = 0,25$) (Minones et al., 2009). Isso pode ser explicado devido à grande estabilidade dessa composição lipídica (os valores mais baixos observados para A_{exc}), e conseqüentemente, esse resultado explicaria o porquê da administração oral e tópica da natamicina ser segura em mamíferos. (Juneja et al., 2012; Xu et al., 2009; Thomas, 2003) Esse efeito protetor também foi observado por Kim et al. (2001): para essa particular composição lipídica a adsorção da proteína albumina foi suprimida. Por outro lado, para médio-alto teor de colesterol ($X_{Col} \geq 0,5$) as mudanças nas monocamadas decorrentes da

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

interação entre o antifúngico e as moléculas de colesterol são evidentes: a presença do antifúngico na subfase promoveu uma redução na estabilidade (valores positivos para A_{exc}) e um efeito expansivo (aumento na área média molecular) proporcional à quantidade de colesterol. Como discutido anteriormente, esses resultados podem ser explicados através da competição entre o efeito condensativo do colesterol sobre as monocamadas de DPPC e do efeito expansivo da natamicina sobre os domínios ricos em colesterol: quando o teor de colesterol é baixo, o efeito condensativo supera o expansivo, enquanto que para elevadas proporções de colesterol o efeito expansivo prevalece.

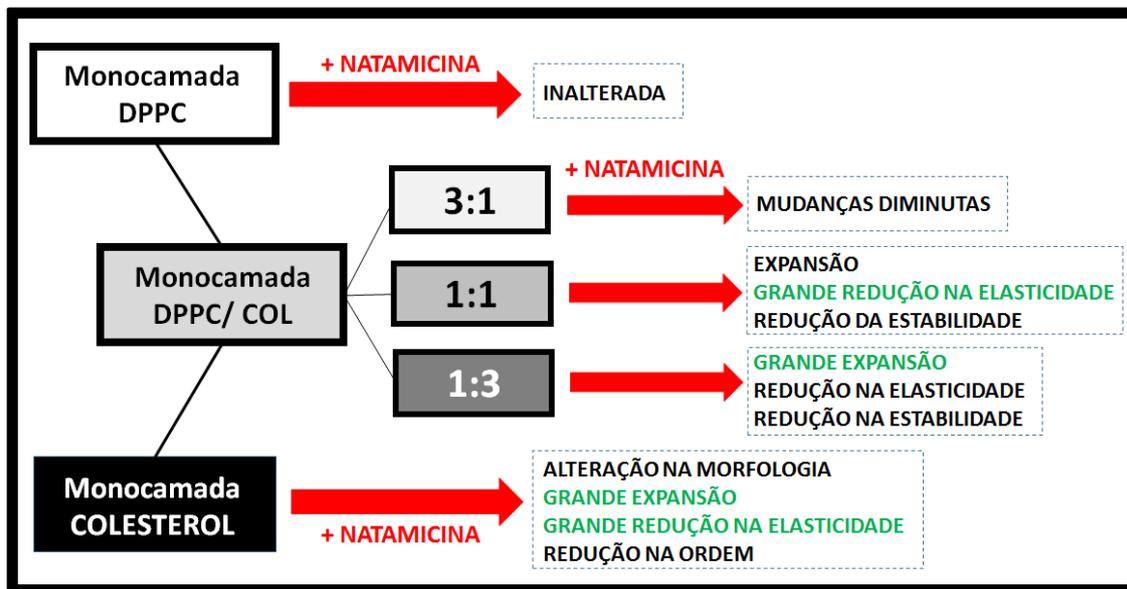
Curiosamente, a presença da natamicina na monocamada com $X_{Col} = 0,5$ tornou o perfil da isoterma e a elasticidade geral muito semelhantes às encontradas para monocamada pura com baixo teor de colesterol ($X_{Col} = 0,25$). Esse resultado foi explicado baseando-se na solubilidade máxima do colesterol em membranas modelo: acima de 37,5% o colesterol não é mais solúvel, e como consequência, ocorre a formação de placas (agregados cristalinos ou não) de colesterol na membrana (Ziblat *et al.*, 2010; 2011; Ziblat *et al.*, 2012; Mainali *et al.*, 2013). Além disso, medidas de AFM (Kim *et al.*, 2001) demonstraram que filmes Langmuir-Blodgett de DPPC constituídos por 10-30% mol de colesterol são lisos e densamente empacotados, enquanto que para 50% mol de colesterol o filme se torna rugoso e irregular. Desse modo, podemos sugerir que as moléculas de natamicina aparentemente aumentam a solubilidade do colesterol nessa monocamada contendo $X_{Col} = 0,5$, de modo que essa monocamada adquira uma organização e uma elasticidade geral equivalentes a uma com baixo teor de colesterol ($X_{Col}=0,25$), para cuja composição a solubilidade do colesterol é teoricamente assegurada e o filme é mais homogêneo, isto é, o teor presente de colesterol é inferior ao seu limite de solubilidade em bicamadas (inferior a 37,5% mol). Esse resultado é interessante, uma vez que apresenta indícios para uma nova aplicação terapêutica para a natamicina: além de antifúngico, esse fármaco pode possuir propriedades que auxiliem na prevenção ou mesmo no combate ao acúmulo de agregados de colesterol (aterosclerose) nas paredes internas dos vasos sanguíneos. Nesse caso, seria interessante estudar profundamente o efeito de formulações farmacêuticas contendo natamicina sobre a taxa de colesterol sanguínea; já que a baixa absorção oral da natamicina somada à sua afinidade pelo colesterol poderiam levar a uma inibição da

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

absorção desse esteroide ao longo do trato digestório, mecanismo este já aceito para o polímero quitosana, por exemplo. (Bokura e Kobayashi, 2003)

4.4) CONCLUSÕES

Esquema 4: Resumo comparativo dos efeitos da natamicina sobre as monocamadas investigadas.



Em resumo (esquema 4), nossas investigações indicam que as monocamadas de DPPC contendo proporções mais baixas de colesterol são menos suscetíveis à ação de natamicina, já que para essa particular composição o efeito expansivo da natamicina sobre os domínios ricos em colesterol não supera o efeito condensativo do colesterol sobre as monocamadas de DPPC. Essas conclusões são interessantes porque comprovam que apenas membranas ricas em esteróis, no caso o colesterol (Patterson, J. et al., 1979; Patterson, J. M. et al., 1979), são sensíveis a ação da natamicina. Além disso, devido a natureza altamente hidrofóbica do colesterol, demonstra-se que a interação dessa natureza é de grande importância para o mecanismo de ação da natamicina em membranas de mamíferos. Em particular, para as monocamadas contendo 50% mol de colesterol nossas observações sugerem que a natamicina talvez possa possuir uma nova aplicação terapêutica, a qual estaria relacionada na prevenção e/ou no combate à formação de agregados de colesterol; e, portanto, estudos explorando essa nova possibilidade seriam interessantes. Por fim, considerando-se que as células de mamíferos apresentam cerca de 30% mol de colesterol em sua composição, nossos

4. ESTUDOS EM MONOCAMADAS

resultados estão de acordo com a relatada baixa absorção oral e tópica da natamicina, o que, por consequência, justifica a baixa toxicidade da natamicina quando ingerida (*Juneja et al., 2012*) e/ou empregada para tratar infecções fúngicas superficiais (*Xu et al., 2009*). Desse modo, conclui-se que, embora as moléculas de natamicina apresentem afinidade pelas de colesterol, nossos estudos provam que as moléculas de natamicina não podem penetrar em monocamadas que mimetizem a composição de membranas de mamíferos, o que confirma a relatada grande estabilidade dessa composição (*Sabatini et al., 2008; Szczes et al., 2012*) e, principalmente, indica que essa particular composição lipídica é a maior responsável pela garantia da proteção das membranas de mamíferos contra a ação da natamicina.

4.5) EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES

Como mencionado anteriormente, nossos resultados demonstram que as moléculas de natamicina não são capazes de penetrar em membranas modelos que mimetizem a composição lipídica de mamíferos (75% mol de fosfolípido zwitteriônico DPPC e 25% mol de colesterol), (*Dynarowicz-Łątka et al., 2003; Minones et al., 2009; Szczes et al., 2012*) o que, por sua vez, justificaria a sua baixa absorção oral e tópica em mamíferos. Por outro lado, cabe lembrar que as células dos seres vivos também são constituídas por macromoléculas carregadas tais como proteínas, enquanto as células fúngicas não são constituídas pelo esterol colesterol, mas sim por ergosterol. Portanto, para uma profunda compreensão do mecanismo de ação da natamicina, estudos complementares precisam ser realizados. Desse modo, nosso grupo já começou a estudar a interação da natamicina com fosfolípidos negativamente carregados, caso do dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), a fim de se investigar a importância das interações eletrostáticas. Além disso, considerando-se que a natamicina é um antifúngico de amplo espectro de ação, também temos analisado a interação de natamicina com outros esteróis tais como o ergosterol, com intuito de se estudar o mecanismo de ação da natamicina em membranas modelo que mimetizem as fúngicas (*Dynarowicz-Łątka et al., 2003; Miñones et al., 2005; Hac-Wydro e Dynarowicz-Latka, 2006a; Recamier et al., 2010*). Os resultados desses estudos complementares serão oportunamente comunicados.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES DO TRABALHO

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”
(George Bernard Shaw)*

5. CONCLUSÕES DO TRABALHO

Motivados pela busca de uma elucidação do mecanismo de ação do fármaco macrolídeo poliêno natamicina em nível molecular (capítulo 2), neste trabalho estudamos a interação desse fármaco com dois sistemas lipídicos miméticos de membranas biológicas: os lipossomos (capítulo 3) e as monocamadas (capítulo 4).

Primeiramente, lembrando que os lipossomos, no nosso caso as vesículas multilamelares lipídicas (MLVs), representem modelos lamelares com organização molecular mais semelhante à encontrada nas membranas biológicas, esses sistemas foram selecionados como sistemas iniciais de estudo (capítulo 3). Nossos resultados mostram que as membranas constituídas puramente pelo fosfolípido zwitteriônico fosfatidilcolina (PC) aparentemente não são suscetíveis à ação da natamicina, enquanto que diante à incorporação de esterol (colesterol ou ergosterol), apenas para o caso da presença ergosterol esses sistemas lipídicos tornaram-se sensíveis à adição da natamicina. Considerando-se que este esterol apresenta natureza predominantemente apolar e que ele corresponde a um componente típico de membranas fúngicas, a interação preferencial da natamicina com o ergosterol era esperada (*Teerlink et al., 1980; Te Welscher et al., 2008; Te Welscher et al., 2010*) e, portanto, nossa constatação comprova que a interação do tipo hidrofóbica esterol-natamicina é de grande importância para o mecanismo de ação desse fármaco. Além disso, verificamos que a interação desse fármaco com sistemas constituídos pelo fosfolípido fosfatídico (PA) negativamente carregado foi favorecida principalmente para um valor de pH levemente ácido (pH=5,0), para o qual a natamicina (pI=6,5) se encontra positivamente carregada. Desse modo, embora este estudo prove que a interação hidrofóbica entre a natamicina e os esteróis de membrana seja fundamental para o seu mecanismo de ação, nossas observações também sugerem que uma interação de natureza eletrostática não pode ser descartada para a atividade da natamicina em membranas biológicas, principalmente em ambientes levemente ácidos, como é o caso da superfície da pele (pH=5,0), (*Schmid-Wendtner e Korting, 2006*) por exemplo.

Em segundo lugar, a interação da natamicina com monocamadas lipídicas também foi investigada (capítulo 4). Apesar das monocamadas de Langmuir mimetizarem apenas o folheto externo ou o interno de uma bicamada

5. CONCLUSÕES DO TRABALHO

(membrana), nesses filmes finos (espessura molecular) é possível controlar facilmente tanto a composição, quanto a arquitetura molecular. Desse modo, o emprego das monocamadas como modelos de membrana favorece o estudo da interação (adsorção) de diversas biomoléculas com sistemas lipídicos caracterizados por propriedades previamente definidas e, por esse motivo, esses filmes finos lipídicos vem ganhando bastante destaque em pesquisas que envolvam o mecanismo de ação de moléculas biologicamente ativas. Lembrando que nossas observações anteriores demonstraram que a natamicina não possuía afinidade por lipossomos constituídos pela mistura entre o fosfolipídio zwitteriônico fosfatidilcolina (PC) e o esteroi colesterol, com o intuito de investigarmos mais profundamente essa mistura binária, nesta nova etapa os sistemas empregados como modelos de membrana corresponderam a monocamadas mistas constituídas por diferentes proporções entre esses componentes. Nesse caso, nossos resultados indicam que para as monocamadas compostas por elevados teores de colesterol a natamicina apresenta grandes efeitos sobre as propriedades desses modelos de membrana, o que comprova a afinidade da natamicina pelos esteróis, no caso o colesterol, e reforça a importância da interação hidrofóbica para a ação desse fármaco em membranas. Para as monocamadas contendo 50% mol de colesterol a natamicina promove um significativo aumento na fluidez da membrana. Esse resultado é interessante, uma vez que aponta para uma possível nova aplicação médica da natamicina: formulações farmacêuticas contendo natamicina poderiam ser futuramente estudadas visando-se o combate da formação intravascular das placas ou agregados de colesterol. Por fim, apenas para o caso particular das membranas modelo que mimetizam a composição lipídica presente em membranas de mamíferos, isto é, as que eram constituídas por 25 mol% de colesterol, nossos resultados em monocamadas corroboram com os resultados obtidos para os lipossomos: apenas para essa especial composição a natamicina não apresenta nenhum efeito significativo sobre a organização molecular desses sistemas. Desse modo, podemos inferir que a própria estabilidade organizacional garantida por essa particular composição lipídica protegeria as membranas dos mamíferos contra a ação da natamicina. Isso, por sua vez, justificaria a baixa absorvidade oral e tópica da natamicina e,

5. CONCLUSÕES DO TRABALHO

consequentemente, estaria correlacionada com a baixa toxicidade (oral e tópica) da natamicina em humanos.

Retomando-se o que foi dito, podemos concluir que as nossas investigações demonstraram que a atividade biológica da natamicina está provavelmente correlacionada às perturbações na organização molecular da bicamada lipídica, as quais, por sua vez, são decorrentes da interação entre esse fármaco e os esteróis presentes nas membranas de fungos (ergosterol) e de mamíferos (colesterol). As membranas modelo incorporadas de ergosterol, o qual corresponde ao esterol típico de membranas fúngicas, mostraram-se mais sensíveis à presença da natamicina do que as constituídas por colesterol, o que sugere uma maior afinidade dessa molécula por membranas fúngicas e, portanto, pode justificar as propriedades antifúngicas desse fármaco. Já para o caso específico das membranas contendo 25% mol de colesterol e 75% mol de fosfolipídios, a grande estabilidade verificada para essa composição lipídica (*Kim et al., 2001; Sabatini et al., 2008; Szczes et al., 2012*) é provavelmente a maior responsável por garantir um efeito protetor às membranas de mamíferos contra a atividade da natamicina. Além disso, a presença das moléculas de natamicina demonstrou inibir o efeito condensativo do esterol colesterol sobre as membranas fosfolipídicas (com maior ou igual a 50% mol de colesterol). Essa última constatação é interessante, porque representa um indício de que a natamicina talvez apresente propriedades que poderiam ser exploradas com o intuito de se prevenir ou combater a formação de placas de colesterol (aterosclerose) e, portanto, estudos futuros abordando essa possível nova aplicação desse fármaco podem possuir grande importância médica. Por outro lado, apesar das contribuições deste trabalho, os experimentos inicialmente planejados empregando-se tanto os lipossomos, quanto as monocamadas como modelos de membranas biológicas não puderam ser realizados em sua totalidade. Desse modo, seria oportuna a realização de estudos complementares ainda investigando-se o efeito da natamicina sobre esses sistemas lipídicos, com o intuito de esclarecer mais profundamente o mecanismo de ação da natamicina. Descrições desses experimentos futuros adotando-se os lipossomos e as monocamadas foram descritos no final dos capítulos 3 e 4, respectivamente.

REFERÊNCIAS

*“Faz-se ciência com os fatos,
como se faz uma casa com pedras;
mas uma acumulação de fatos não é ciência,
assim como um monte de pedras não é uma casa.”*

(Henri Poincaré)

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. 6th. John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- ANGLIN, T. C.; CONBOY, J. C. Lateral pressure dependence of the phospholipid transmembrane diffusion rate in planar-supported lipid bilayers. **Biophys J**, v. 95, n. 1, p. 186-93, 2008.
- APARICIO, J. et al. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 11, p. 895-905, 2000.
- ARCZEWSKA, M.; GAGOS, M. Molecular organization of antibiotic amphotericin B in dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers induced by K(+) and Na(+) ions: the Langmuir technique study. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 11, p. 2706-13, 2011.
- ATHERTON, N. M. **Principles of Electron Spin Resonance**. Ellis Horwood, 1993.
- BARRETT, M. A. et al. Solubility of cholesterol in lipid membranes and the formation of immiscible cholesterol plaques at high cholesterol concentrations. **Soft Matter**, v. 9, n. 39, p. 9342, 2013.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BELAKHOV, V. V.; SHENIN, Y. D.; IONIN, B. I. Synthesis and antifungal activity of N-aryl-substituted pimaricin derivatives. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, n. 9, p. 486-492, 2010.
- BHATTA, R. S. et al. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies. **Int J Pharm**, v. 432, n. 1-2, p. 105-12, 2012.
- BIERHALZ, A. C. K.; DA SILVA, M. A.; KIECKBUSCH, T. G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 1, p. 18-25, 2012.
- BIRDI, K. S. **Self-assembly monolayer structures of lipids and macromolecules at interfaces**. Plenum, 2002.
- BLAUDEZ, D. et al. Polarization-Modulated Ft-Ir Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air-Water-Interface. **Applied Spectroscopy**, v. 47, n. 7, p. 869-874, 1993.
- _____. Polarization Modulation Ftir Spectroscopy at the Air-Water-Interface. **Thin Solid Films**, v. 242, n. 1-2, p. 146-150, 1994.
- BLAUDEZ, D. et al. Characterization of Langmuir-Blodgett Monolayers Using Polarization Modulated Ftir Spectroscopy. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 648-651, 1992.

REFERÊNCIAS

BLAUDEZ, D.; CASTANO, S.; DESBAT, B. PM-IRRAS at liquid interfaces. In: PRADIER, C. M. e CHABAL, Y. J. (Ed.). **Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy**. 1st. Academic Press: Elsevier, 2011. cap. 2, p.27-55.

BLAUDEZ, D. et al. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions**, v. 92, n. 4, p. 525-530, 1996.

BLINOV, L. M. **Structure and Properties of Liquid Crystals**. Springer Dordrecht Heidelberg, 2011.

BOKURA, H.; KOBAYASHI, S. Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Eur J Clin Nutr**, v. 57, n. 5, p. 721-5, 2003.

BRIK, H. Natamycin. In: FLOREY, K. (Ed.). **Analytical Profiles of Drug Substances**: Academic Press, v.10, 1981. p.513–561.

_____. Natamycin. In: BRITAIN, H. G. (Ed.). **Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients**: Academic Press, v.23, 1994. p.399–419.

BROWN, D. A.; LONDON, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. **J Biol Chem**, v. 275, n. 23, p. 17221-4, 2000.

BRUSTOLON, M.; GIAMELLO, E. **Electron paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit**. John Wiley & Sons, 2009.

BUFFETEAU, T.; DESBAT, B.; TURLET, J. M. Polarization Modulation Ft-Ir Spectroscopy of Surfaces and Ultra-Thin Films - Experimental Procedure and Quantitative-Analysis. **Applied Spectroscopy**, v. 45, n. 3, p. 380-389, 1991.

BUTT, H.; GRAF, K.; KAPPL, M. **Physics and Chemistry of Interfaces**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2003.

CADENHEAD, D. A.; KELLNER, B. M. J.; BALTHASAR, D. M. Cholesterol Oxidation and the Behavior of 5-Alpha-Hydroperoxy-Cholesterol at the Air Water Interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 31, n. 1, p. 87-96, 1982.

CHAPMAN, D.; URBINA, J.; KEOUGH, K. M. Biomembrane Phase Transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 8, p. 2512-2521, 1974.

CONG, F.; ZHANG, Y.; DONG, W. Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 71-75, 2007.

REFERÊNCIAS

COSGROVE, T. **Colloid Science - Principles, Methods and Applications**. 2nd. John Wiley & Sons Ltd, 2010.

DACOSTA, C. J. et al. Lipid-protein interactions at the nicotinic acetylcholine receptor. A functional coupling between nicotinic receptors and phosphatidic acid-containing lipid bilayers. **J Biol Chem**, v. 277, n. 1, p. 201-8, 2002.

DAMALIO, J. C. et al. Lipid interaction triggering Septin2 to assembly into beta-sheet structures investigated by Langmuir monolayers and PM-IRRAS. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828, n. 6, p. 1441-8, 2013.

DAVIS, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial Phenomena**. New York: Academic Press, 1963

DEAMER, D. W. From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. **FASEB J**, v. 24, n. 5, p. 1308-10, 2010.

DEKRUIJFF, B. et al. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 339, n. 1, p. 44-56, 1974.

DEMEL, R. A. et al. Interaction of Polyene Antibiotics with Single and Mixed Lipid Monomolecular Layers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 150, n. 1, p. 1-&, 1968.

DEMEL, R. A.; JOOS, P. Interaction between lecithins and cholesterol at the air-water and oil-water interfaces. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 2, n. 1, p. 35-46, 1968.

DEMEL, R. A.; VAN, D. Penetration of Lipid Monolayers by Polyene Antibiotics. Correlation with Selective Toxicity and Mode of Action. **J Biol Chem**, v. 240, p. 2749-53, 1965.

DEMEL, R. A. et al. Monolayer characteristics and thermal behaviour of phosphatidic acids. **Chem Phys Lipids**, v. 60, n. 3, p. 209-23, 1992.

DEMUS, D. et al. **Fundamentals**. WILEY-VCH Verlag GmbH, 1998.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.

DUARTE, E. L. et al. On the Interaction of the Anthraquinone Barbaloin with Negatively Charged DMPG Bilayers. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4041-4049, 2008.

DYNAROWICZ-LATKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA, O. N., JR. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 91, n. 2, p. 221-93, 2001.

REFERÊNCIAS

DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P. et al. Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoyl phosphatidylcholine Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, n. 2-3, p. 249-263, 2003.

DYNAROWICZ-LATKA, P. et al. Miscibility and phase separation in mixed erucylphosphocholine-DPPC monolayers. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 107C, p. 43-52, 2013.

DZIRI, L.; DESBAT, B.; LEBLANC, R. M. Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy Studies of Acetylcholinesterase Secondary Structure at the Air - Water Interface. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 9618 - 9625, 1999.

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. 414-8, 2003.

FAHR, A. et al. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 251-265, 2005.

FAJARDO, P. et al. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 4, p. 349-356, 2010.

FERNANDEZ, R. M.; LAMY-FREUND, M. T. Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: a comparative study with sodium ions and cholesterol. **Biophys. Chem.**, v. 87, p. 87-102, 2000.

FERREIRA, M. et al. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

FRIBERG, S. **Lyotropic Liquid Crystals and the Structure of Biomembranes**. American Chemistry Society, 1976.

GABBOTT, P. **Principles and Applications of Thermal Analysis**. Blachwell Pyblishing, 2008.

GE, M.; FREED, J. H. Polarity Profiles in Oriented and Dispersed Phosphatidylcholine Bilayers Are Different: An Electron Spin Resonance Study. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 910-917, 1998.

GE, M.; FREED, J. H. Hydration, structure, and molecular interactions in the headgroup region of dioleoylphosphatidylcholine bilayers: an electron spin resonance study. **Biophys J**, v. 85, n. 6, p. 4023-40, 2003.

GENNES, P. G.; PROST, J. **The Physics of Liquid Crystals**. 2nd. Oxford University Press, 1993.

REFERÊNCIAS

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-+, 1999.

GORTER, E.; GREDEL, F. On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. **J Exp Med**, v. 41, n. 4, p. 439-43, 1925.

GOTO, T. E.; CASELI, L. Understanding the collapse mechanism in Langmuir monolayers through polarization modulation-infrared reflection absorption spectroscopy. **Langmuir**, v. 29, n. 29, p. 9063-71, 2013.

GREENWOOD, D. et al. **Antimicrobial Chemotherapy**. 5th Oxford University Press, 2007.

GREMLICH, H. U.; YAN, B. **Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials** Marcel Dekker, Inc. , 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 11th. Elsevier, 2006.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers--the role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophys Chem**, v. 123, n. 2-3, p. 154-61, 2006a.

_____. Nystatin in Langmuir monolayers at the air/water interface. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 53, n. 1, p. 64-71, 2006b.

HAC-WYDRO, K. et al. The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene antifungal antibiotic A Langmuir monolayer study. **Chem Phys Lipids**, v. 150, n. 2, p. 125-35, 2007.

HAFEZ, I. M.; CULLIS, P. R. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, n. 2-3, p. 139-48, 2001.

HATAKEYAMA, T.; LIU, Z. **Handbook of Thermal Analysis**. Jonh Wiley & Sons, 1998.

HEIMBURG, T. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1415, p. 147-162, 1998.

HEIMBURG, T.; BILTONEN, R. L. Thermotropic Behavior of Dimyristoylphosphatidylglycerol and Its Interaction with Cytochrome c. **Biochemistry**, v. 33, p. 9477-9488, 1994.

HÉNON, S.; MEUNIER, J. Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. **Review of Scientific Instruments**, v. 62, n. 4, p. 936, 1991.

REFERÊNCIAS

- HERCULANO, R. D. et al. The lipid composition of a cell membrane modulates the interaction of an antiparasitic peptide at the air-water interface. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 7, p. 1907-12, 2011.
- HIDALGO, A. A.; TABAK, M.; OLIVEIRA, O. N., JR. The interaction of meso-tetraphenylporphyrin with phospholipid monolayers. **Chem Phys Lipids**, v. 134, n. 2, p. 97-108, 2005.
- HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry** 3rd. CRC Press, 1997.
- HIRSCH-LERNER, D.; BARENHOLZ, Y. Probing DNA-cationic lipid interactions with the fluorophore trimethylammonium diphenyl-hexatriene (TMADPH). **Biochim Biophys Acta**, v. 1370, n. 1, p. 17-30, 1998.
- HONIG, D.; MOBIUS, D. Reflectometry at the Brewster-Angle and Brewster-Angle Microscopy at the Air-Water-Interface. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 64-68, 1992.
- JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P.; YAN, X. Novel natural food antimicrobials. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 3, p. 381-403, 2012.
- KAERCHER, T.; HONIG, D.; MOBIUS, D. Brewster angle microscopy. A new method of visualizing the spreading of Meibomian lipids. **Int Ophthalmol**, v. 17, n. 6, p. 341-8, 1993.
- KAVANAGH, K. **Fungi biology and applications**. 2nd. John Wiley & Sons, 2011.
- KHOO, I.-C. **Liquid Crystals**. 2nd. John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- KILLIAN, J. A.; VAN MEER, G. The 'double lives' of membrane lipids. Workshop: Anno 2000. A lipid milestone. **EMBO Rep**, v. 2, n. 2, p. 91-5, 2001.
- KIM, K.; KIM, C.; BYUN, Y. Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. **Langmuir**, v. 17, n. 16, p. 5066-5070, 2001.
- KINSKY, S. C. Antibiotic interaction with model membranes. **Annu Rev Pharmacol**, v. 10, p. 119-42, 1970.
- KULKARNI, V. S. **Handbook of non-invasive drug delivery systems**. Elsevier, 2010.
- LASIC, D. D. Review article. The mechanism of vesicle formation. **Biochem. J.**, v. 256, p. 1-11, 1988.

REFERÊNCIAS

- _____. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.
- LINDNER, R.; NAIM, H. Y. Domains in biological membranes. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 17, p. 2871-8, 2009.
- LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology** 5th. WHFreeman, 2004.
- LYKLEMA, J. et al. **Liquid-Fluid Interfaces**. 2000.
- MAINALI, L.; RAGUZ, M.; SUBCZYNSKI, W. K. Formation of cholesterol bilayer domains precedes formation of cholesterol crystals in cholesterol/dimyristoylphosphatidylcholine membranes: EPR and DSC studies. **J Phys Chem B**, v. 117, n. 30, p. 8994-9003, 2013.
- MANNOCK, D. A.; LEWIS, R. N.; MCELHANEY, R. N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1798, n. 3, p. 376-88, 2010.
- MANNOCK, D. A.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 376-388, 2010.
- MANSOUR, H. et al. Comparison of bilayer and monolayer properties of phospholipid systems containing dipalmitoylphosphatidylglycerol and dipalmitoylphosphatidylinositol. **Langmuir**, v. 17, n. 21, p. 6622-6632, 2001.
- MANSOUR, H. M.; ZOGRAFI, G. The relationship between water vapor absorption and desorption by phospholipids and bilayer phase transitions. **J Pharm Sci**, v. 96, n. 2, p. 377-96, 2007.
- MARSH, D. Electron spin Resonance: Spin Labels. **Membrane Spectroscopy. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics**, v. 31, p. 51-142, 1981.
- _____. Lateral pressure in membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.
- MATTEUCCI, M. L.; THRALL, D. E. The Role of Liposomes in Drug Delivery and Diagnostic Imaging: a Review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 41, p. 100-107, 2000.
- MCCONLOGUE, C. W.; VANDERLICK, T. K. A close look at domain formation in DPPC monolayers. **Langmuir**, v. 13, n. 26, p. 7158-7164, 1997.
- MCMULLEN, T. P. W.; MCELHANEY, R. N. Differential Scanning Calorimetric Studies of the Interaction of Cholesterol with Distearoyl and Dielaidoyl Molecular Species of

REFERÊNCIAS

Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, and Phosphatidylserine **Biochemistry**, v. 36, p. 4979-4986, 1997.

MENCZEL, J. D.; PRIME, R. B. **Thermal Analysis of Polymers. Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2009.

MENDELSON, R.; BRAUNER, J. W.; GERICKE, A. External Infrared Reflection Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air-Water Interface. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 305-334, 1995.

MENDELSON, R.; FLACH, C. R. Infrared Reflection–Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air–Water Interface. 2002.

MENDELSON, R.; MAO, G.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochim Biophys Acta**, v. 1798, n. 4, p. 788-800, 2010.

MEUNIER, J. Why a Brewster angle microscope? **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 171, n. 1-3, p. 33-40, 2000.

MIÑONES, J. et al. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 270-271, p. 129-137, 2005.

MINONES, J., JR. et al. Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes--a Langmuir monolayer study. **Biophys Chem**, v. 140, n. 1-3, p. 69-77, 2009.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**. 2nd. John Wiley & Sons, 1999.

NASIR, M. N.; BESSON, F. Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1818, n. 5, p. 1302-8, 2012.

NETO, A. M. F.; SALINAS, S. R. A. **Physics of Lyotropic Liquid Crystals: Phase Transitions and Structural Properties** 2005. Oxford University Press, University of Oxford

OHLIN, S. M. et al. Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. A Biophysical Chemistry Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 9, p. 1251-1256, 2001.

PASHLEY, R. M.; KARAMAN, M. E. **Applied Colloid and Surface Chemistry** John Wiley & Sons Ltd., 2004.

REFERÊNCIAS

- PATTERSON, J.; HOLLAND, J.; BIEBER, L. L. Studies on the competition of polyene antibiotics for sterols. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 32, n. 6, p. 646-53, 1979.
- PATTERSON, J. M. et al. Effects of experimental conditions on the interaction of filipin and pimaricin with cholesterol. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 32, n. 11, p. 1193-200, 1979.
- PAVINATTO, A. et al. Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 104, p. 48-53, 2013.
- PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; OLIVEIRA, O. N. Chitosan in nanostructured thin films. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 8, p. 1897-908, 2010.
- PAVINATTO, F. J. et al. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 10051-61, 2009.
- PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett Films an Introduction**. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1996.
- PINHEIRO, M. et al. Effects of a novel antimycobacterial compound on the biophysical properties of a pulmonary surfactant model membrane. **Int J Pharm**, v. 450, n. 1-2, p. 268-77, 2013.
- PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 240-246, 2010.
- PLATIKANOV, D.; EXEROWA, D. **Highlights in Colloid Science**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- PRAJNA, N. V. et al. The Mycotic Ulcer Treatment Trial: A Randomized Trial Comparing Natamycin vs Voriconazole. **Arch Ophthalmol**, p. 1-8, 2012.
- PRENNER, E. J. et al. Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1417, p. 211-223, 1999.
- RAMSTEDT, B.; SLOTTE, J. P. Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. **Biochim Biophys Acta**, v. 1758, n. 12, p. 1945-56, 2006.
- RECAMIER, K. S. et al. Effect of membrane structure on the action of polyenes: I. Nystatin action in cholesterol- and ergosterol-containing membranes. **J Membr Biol**, v. 237, n. 1, p. 31-40, 2010.
- RECIO, E. et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 40, p. 41586-93, 2004.

REFERÊNCIAS

- REGELIN, A. E. et al. Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. **Biochim Biophys Acta**, v. 1464, n. 1, p. 151-64, 2000.
- ROBERTS, G. **Langmuir Blodgett Films**. New York, USA: Prentice Hall, 1990.
- ROBERTSON, J. D. Membrane-Structure. **Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 3, p. S189-S204, 1981.
- ROCHA, W. R. **Interações intermoleculares**. Cadernos Temáticos: Quím. Nova na Escola. Estrutura da matéria: 31-36 p. 2001.
- ROLDAN-CARMONA, C. et al. Revisiting the Brewster Angle Microscopy: the relevance of the polar headgroup. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 173, p. 12-22, 2012.
- RYCHNOVSKY, S. D. Oxo Polyene Macrolide Antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 6, p. 2021-2040, 1995.
- SABATINI, K.; MATTILA, J. P.; KINNUNEN, P. K. Interfacial behavior of cholesterol, ergosterol, and lanosterol in mixtures with DPPC and DMPC. **Biophys J**, v. 95, n. 5, p. 2340-55, 2008.
- SALAUN, C.; JAMES, D. J.; CHAMBERLAIN, L. H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. **Traffic**, v. 5, n. 4, p. 255-64, 2004.
- SANTOS-ABERTURAS, J. et al. Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimaricin genes and identification of binding boxes. **J Biol Chem**, v. 286, n. 11, p. 9150-61, 2011.
- SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006.
- SCHNEIDER, D. J.; FREED, J. H. Calculating slow motional magnetic resonance spectra – A user's guide. **Biological Magnetic Resonance**, v. 8, p. 1-76, 1989a.
- _____. Spin relation and motion dynamics. **Advances in Chemical Physics**, v. 73, p. 387-527, 1989b.
- SEDDON, J. M.; TEMPLER, R. M. Polymorphism of Lipid-Water Systems In: (Ed.). **Handbook of Biological Physics** Elsevier Science B. V v.1, 1995. cap. 3,
- SHAH, D. O. Monolayers of Lipids in Relation to Membranes. In: (Ed.). **Progress in Surface Science**, v.3, 1972. p.221–278.

REFERÊNCIAS

SILVIUS, J. R. Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1746, n. 3, p. 193-202, 2005.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-31, 1972.

SINGH, S. **Liquid Crystals Fundamentals**. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. , 2002.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies**. Third Edition. John Wiley & Sons Ltd, 2001.

SOLOMONOV, I. et al. Hydrated cholesterol: phospholipid domains probed by synchrotron radiation. **Eur Phys J E Soft Matter**, v. 30, n. 2, p. 215-21, 2009.

STANO, P. et al. A Remarkable Self-Organization Process as the Origin of Primitive Functional Cells. **Angew Chem Int Ed Engl**, 2013.

STRYER, L. **Biochemistry**. S. Francisco: W.H. Freeman and Company, 1981.

SUBCZYNSKI, W. K.; WISNIEWSKA, A. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. **Acta Biochim Pol**, v. 47, n. 3, p. 613-25, 2000.

SUBCZYNSKI, W. K. et al. Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. **Biochemistry**, v. 33, n. 24, p. 7670-81, 1994.

SZCZES, A.; JURAK, M.; CHIBOWSKI, E. Stability of binary model membranes--prediction of the liposome stability by the Langmuir monolayer study. **J Colloid Interface Sci**, v. 372, n. 1, p. 212-6, 2012.

TE WELSCHER, Y. M. et al. Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 6, p. 2618-25, 2010.

TE WELSCHER, Y. M. et al. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. **J Biol Chem**, v. 283, n. 10, p. 6393-401, 2008.

TE WELSCHER, Y. M. et al. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 28, p. 11156-9, 2012.

TEERLINK, T.; DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R. A. The action of pimaricin, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. **Biochim Biophys Acta**, v. 599, n. 2, p. 484-92, 1980.

REFERÊNCIAS

THOMAS, L. V.; DELVES-BROUGHTON, J. **Natamycin**. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition: 4109-4115 p. 2003.

TOLSTOY, V. P.; CHERNYSHOVA, I. V.; SKRYSHEVSKY, V. A. **Handbook of Infrared Spectroscopy of Thin Films**. John Wiley & Sons, Inc. , 2003.

TURCHIELLO, R. F. et al. How Bradykinin Alters the Lipid Membrane Structure: A Spin Label Comparative Study with Bradykinin Fragments and Other Cations. **Biopolymers**, v. 54, n. 3, p. 211-221, 2000.

TÜRE, H. et al. Physical properties of biopolymers containing natamycin and rosemary extract. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 402-408, 2009.

VAN LEEUWEN, M. R.; GOLOVINA, E. A.; DIJKSTERHUIS, J. The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. **J Appl Microbiol**, v. 106, n. 6, p. 1908-18, 2009.

VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. Lipid map of the mammalian cell. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 1, p. 5-8, 2011.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 112-24, 2008.

VAN ZUTPHEN, H. et al. The action of polyene antibiotics on lipid bilayer membranes in the presence of several cations and anions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 241, n. 2, p. 310-330, 1971.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 5th. Elsevier, 2008.

VOET, D.; VOET, J. D. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1995.

Web Page 1. Liquid Crystals, **Nobel Media AB 2013 Web**, Disponível em: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/liquid_crystals/history/index.html>. Acesso em: 8 de março.

Web Page 2. Agnes Pockels - Housewife and Chemist, **Technische Universität Braunschweig**, Disponível em: <<https://www.tu-braunschweig.de/agnes-pockels-labor/agnes>>. Acesso em: 8 de março.

Web Page 3. CONTRIBUTIONS OF 20TH CENTURY WOMEN TO PHYSICS, **University of California**, Disponível em: <http://cwp.library.ucla.edu/Phase2/Pockels_Agnes@871234567.html>. Acesso em: 8 de março.

REFERÊNCIAS

Web Page 4. Esteróis, **Wikipediãcias**, Disponível em: <<http://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/index.php/Ester%C3%B3is>>. Acesso em: 8 de março.

Web Page 5. Liposome preparation, **Avanti Polar Lipids**, Disponível em: <http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372>. Acesso em: 8 de março.

Web Page 6. PM-IRRAS, **KSV NIMA**, Disponível em: <<http://www.ksvnima.com/products/pm-irras-infrared#>>. Acesso em: 8 de março.

WEIL, J. A.; BOLTON, J. R. **Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications**. John Wiley & Sons, 2007.

WEINER, N. D.; NOOMNONT, P.; FELMEISTER, A. Autoxidation of cholesterol in aqueous dispersions and in monomolecular films. **J Lipid Res**, v. 13, n. 2, p. 253-5, 1972.

WEISSMANN, G.; SESSA, G. The action of polyene antibiotics on phospholipid-cholesterol structures. **J Biol Chem**, v. 242, n. 4, p. 616-25, 1967.

XU, Y. et al. In vitro comparison of the efficacies of natamycin and silver nitrate against ocular fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1636-8, 2009.

ZHENG, J.; LEBLANC, R. M. Chapter 10 Infrared Reflection Absorption Spectroscopy of Monolayers at the Air–Water Interface. In: (Ed.). **Interface Science and Technology**, v.14, 2007. p.247-276.

ZHOU, Z. et al. Studies of phospholipid hydration by high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance. **Biophys J**, v. 76, n. 1 Pt 1, p. 387-99, 1999.

ZIBLAT, R. et al. Spontaneous formation of two-dimensional and three-dimensional cholesterol crystals in single hydrated lipid bilayers. **Biophys J**, v. 103, n. 2, p. 255-64, 2012.

ZIBLAT, R.; LEISEROWITZ, L.; ADDADI, L. Crystalline domain structure and cholesterol crystal nucleation in single hydrated DPPC:cholesterol:POPC bilayers. **J Am Chem Soc**, v. 132, n. 28, p. 9920-7, 2010.

_____. Crystalline lipid domains: characterization by X-ray diffraction and their relation to biology. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 50, n. 16, p. 3620-9, 2011.

ZOTCHEV, S. B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 211-223, 2003.

ANEXOS

*“Vale mais o lobo por sua experiência
do que pela sua natureza.”
(Dudu, El cabrón)*

ANEXO I

ANEXO I: Espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) obtidos a diferentes temperaturas para lipossomos constituídos pelo lipídio zwitteriônico dipalmitoil fosfatidilcolina (**DP**PC).

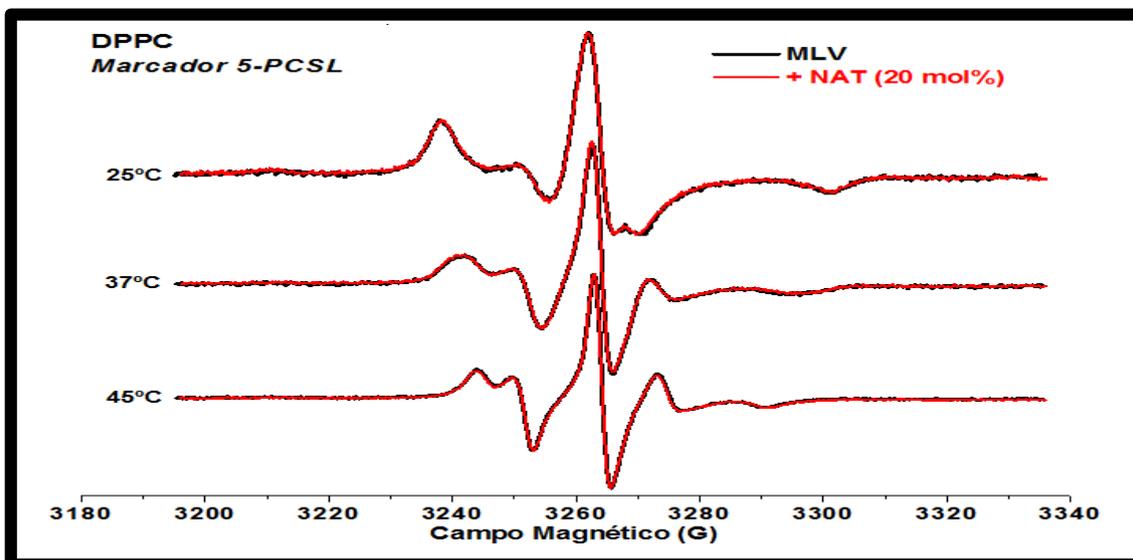


Figura 66 - Espectros do marcador 5-PCSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPCC em pH=7,0 e [NaCl]= 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

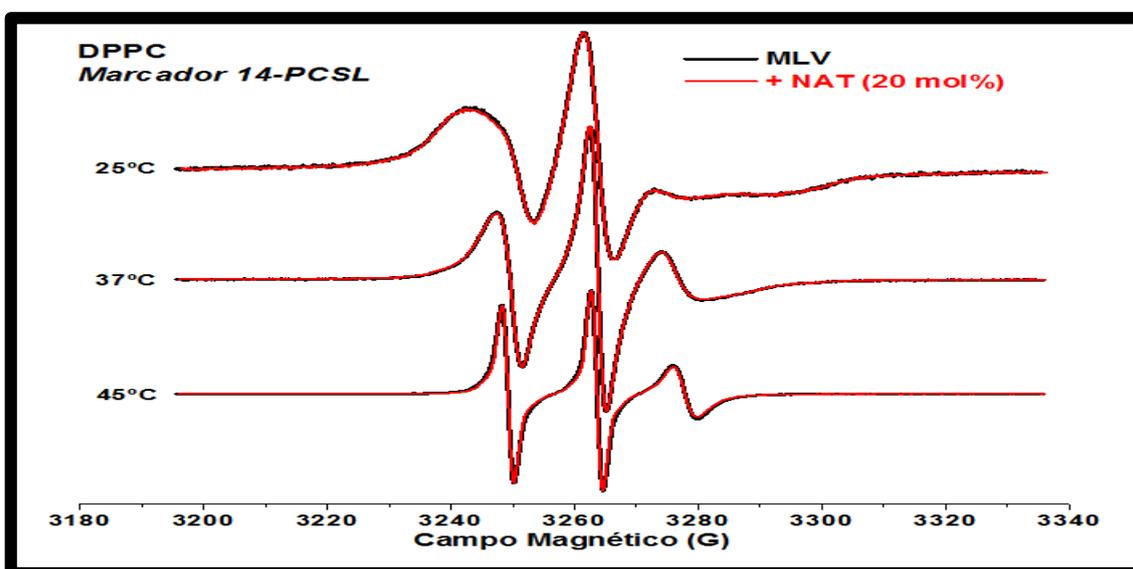


Figura 67 - Espectros do marcador 14-PCSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPCC em pH=7,0 e [NaCl]= 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

ANEXO I

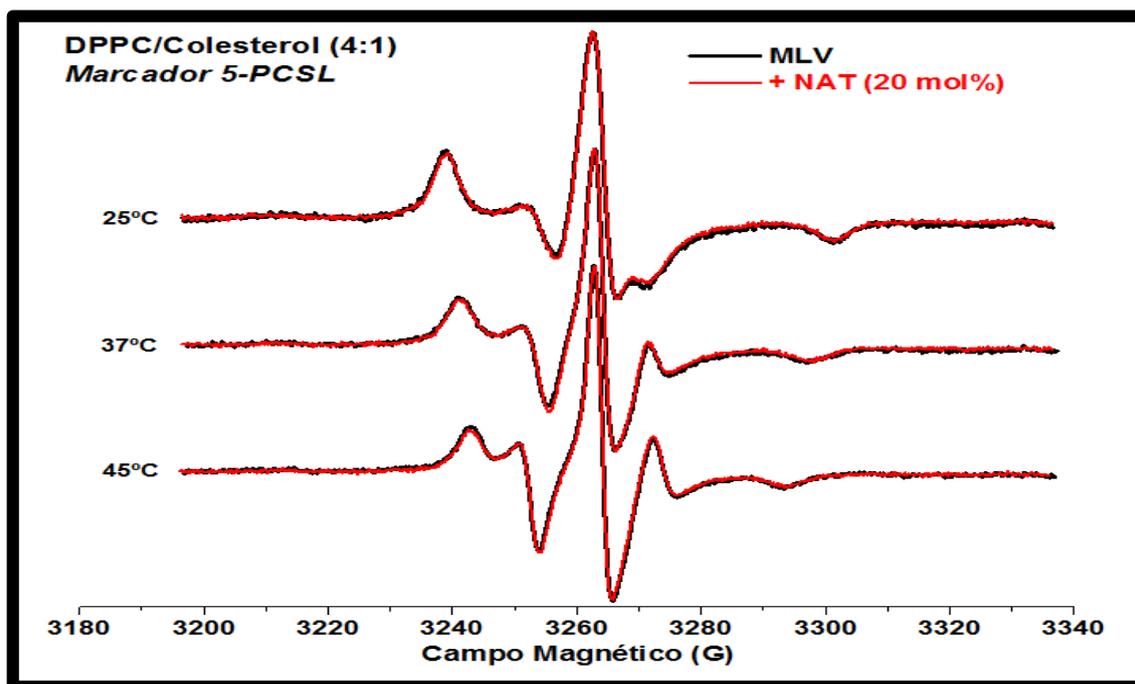


Figura 68 - Espectros do marcador 5-PCSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Colesterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl]= 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

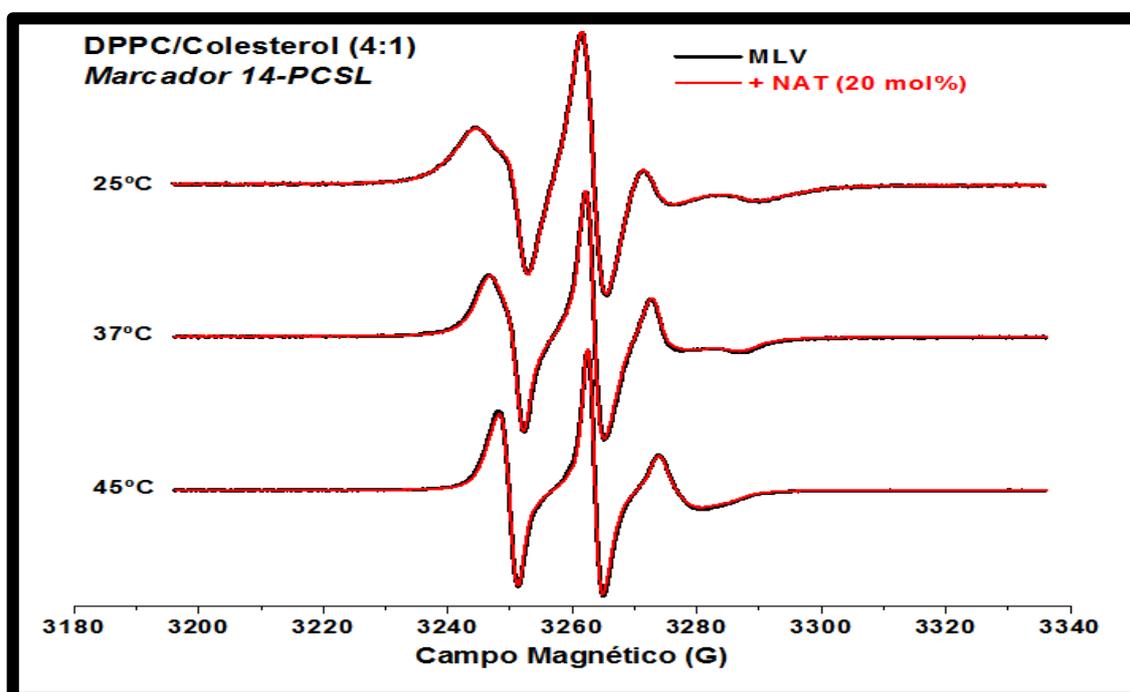


Figura 69 - Espectros do marcador 14-PCSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Colesterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl]= 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

ANEXO I

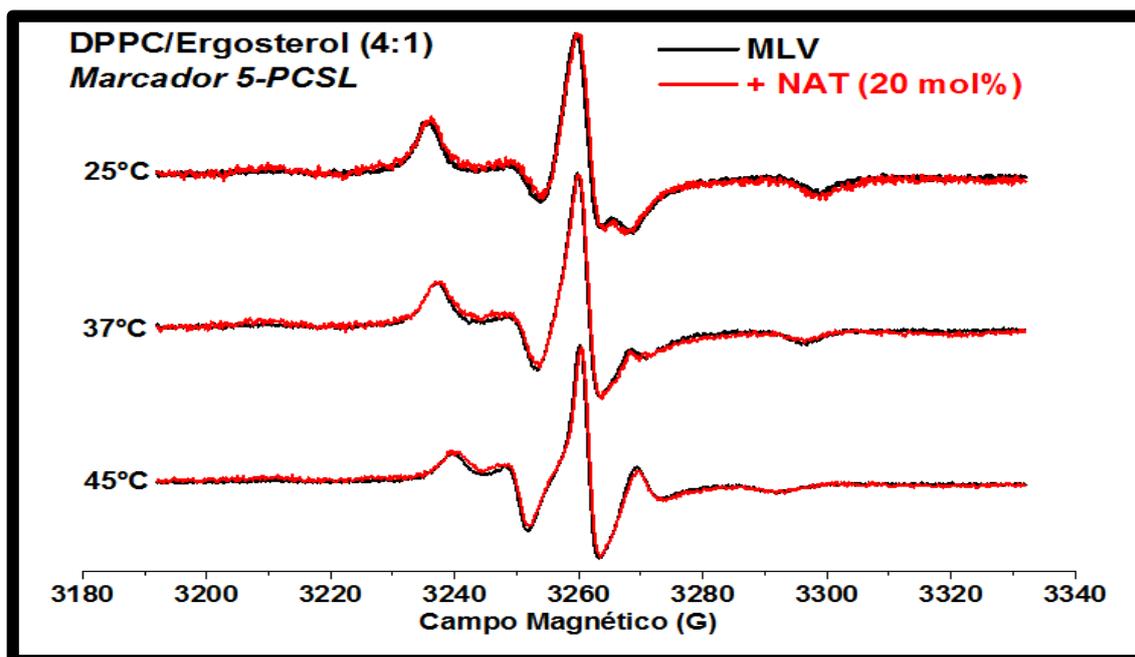


Figura 70 - Espectros do marcador 5-PCSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Ergosterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl]= 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

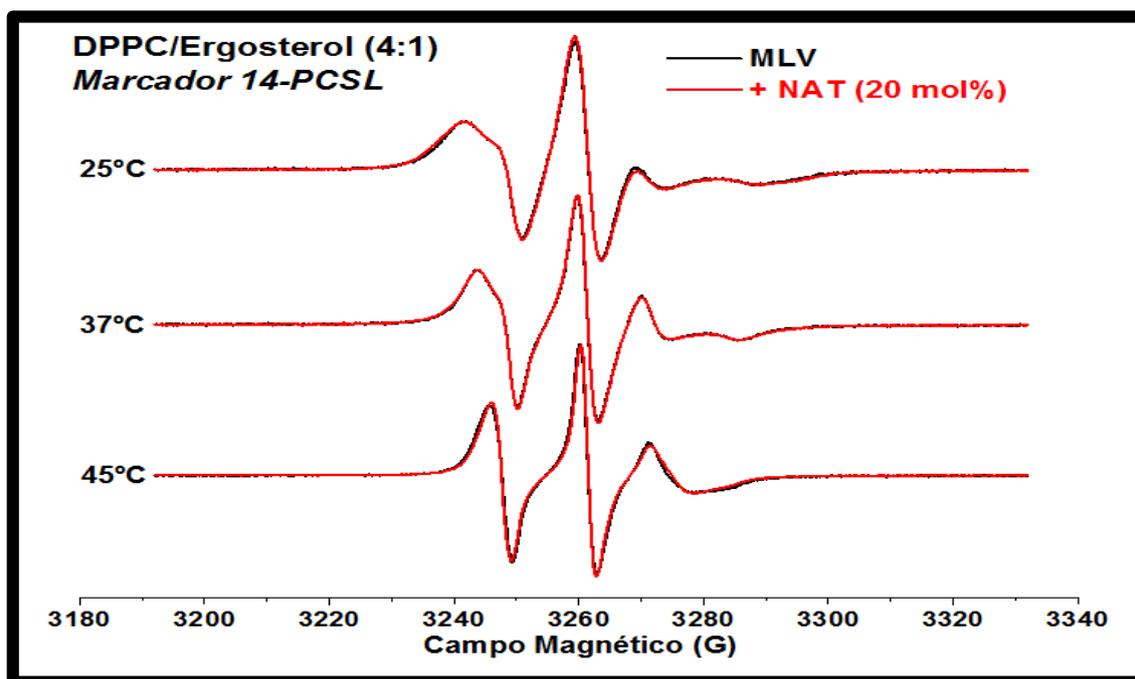


Figura 71 - Espectros do marcador 14-PCSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Ergosterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl]= 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

ANEXO I

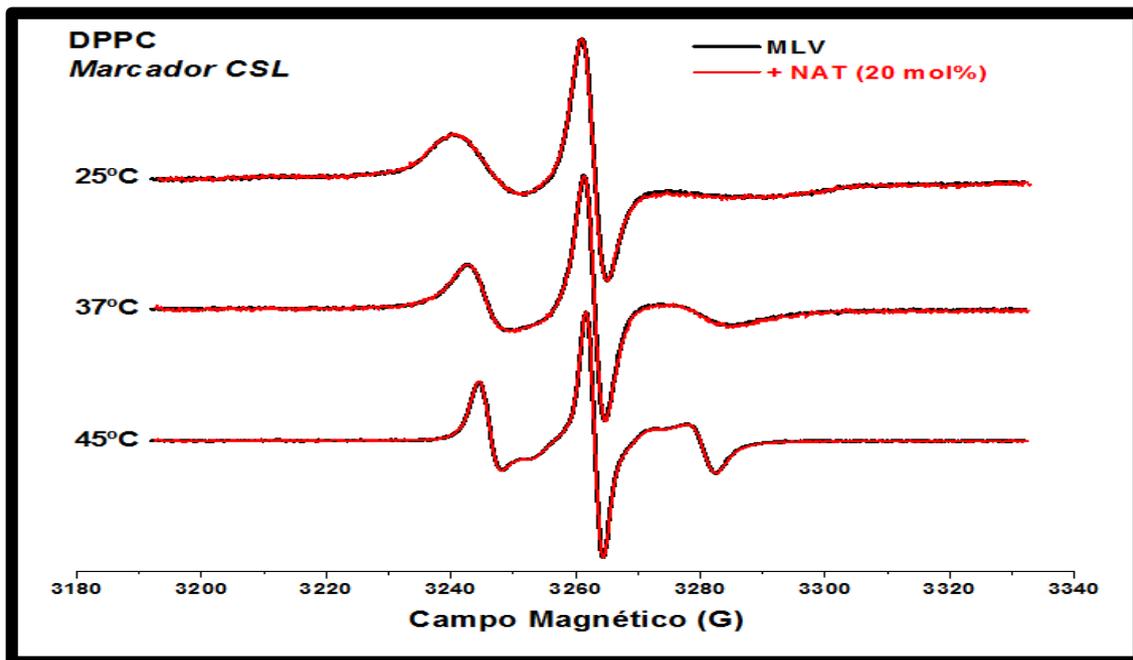


Figura 72 - Espectros do marcador CSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

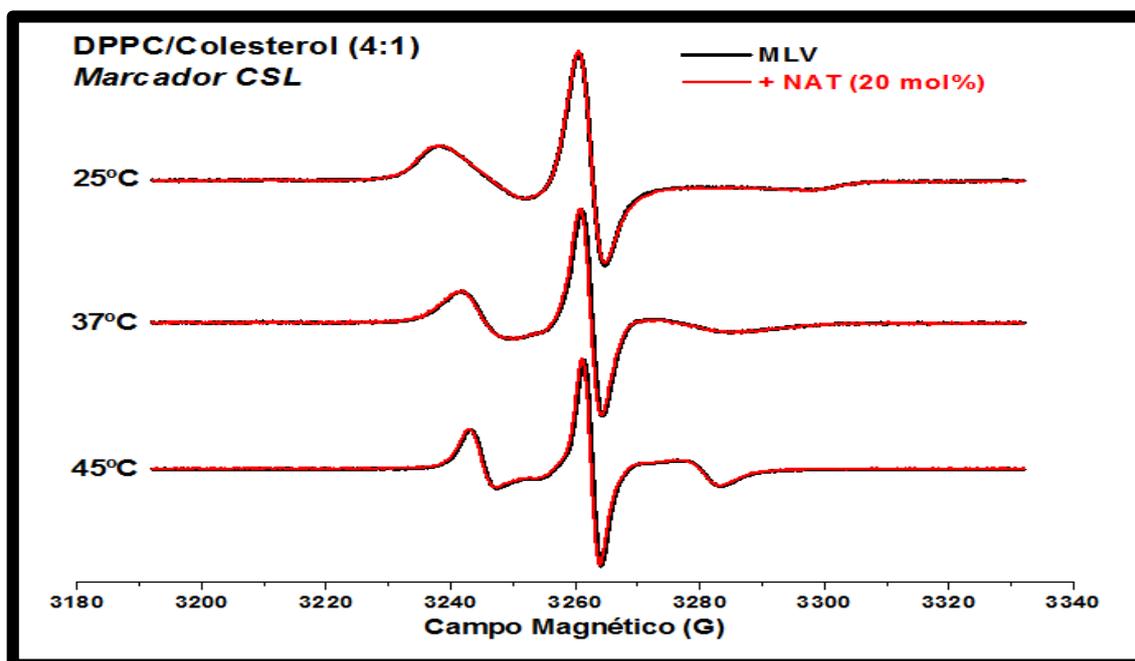


Figura 73 - Espectros do marcador CSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Colesterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

ANEXO I

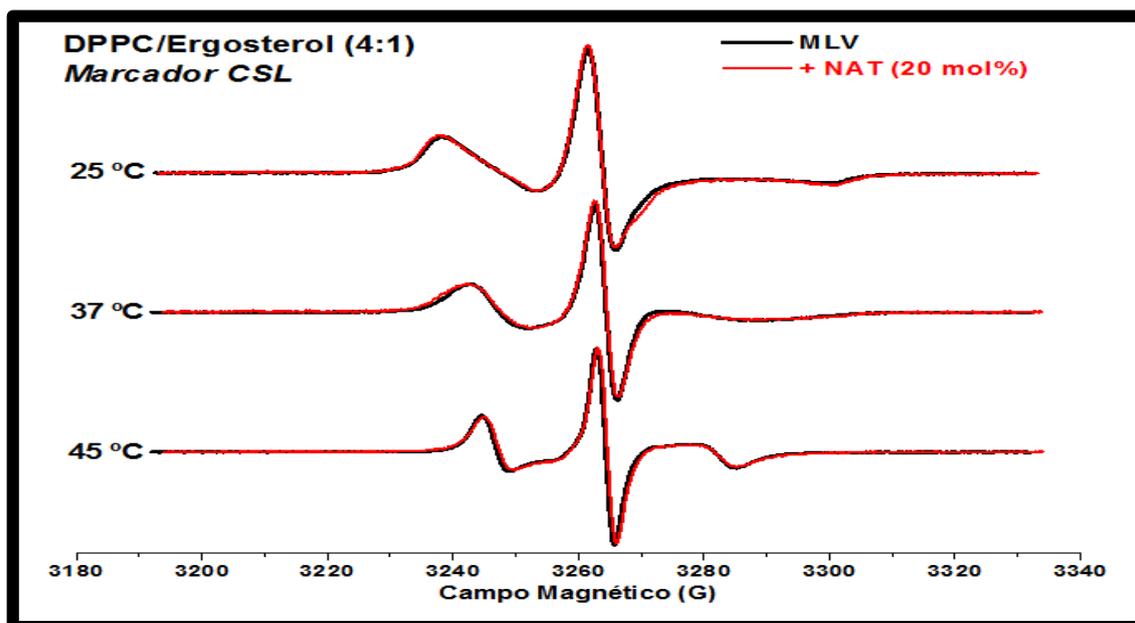


Figura 74 - Espectros do marcador CSL (0,5% mol) incorporados em MLVs de DPPC/Ergosterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina obtidos em três temperaturas distintas.

ANEXO II

ANEXO II: Espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) obtidos à temperatura ambiente (24 °C) para lipossomos constituídos pelo lipídio zwitteriônico dioleoil fosfatidilcolina (**DOPC**).

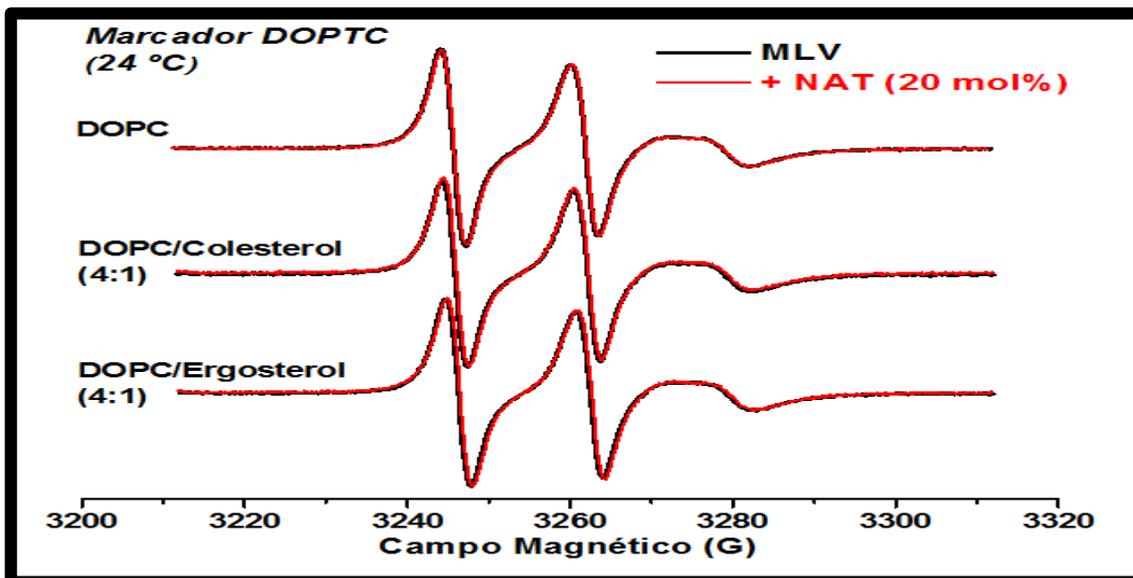


Figura 75 - Espectros do marcador DOPTC (0,5% mol) incorporados em MLVs de DOPC puro ou de DOPC/esterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina à temperatura ambiente.

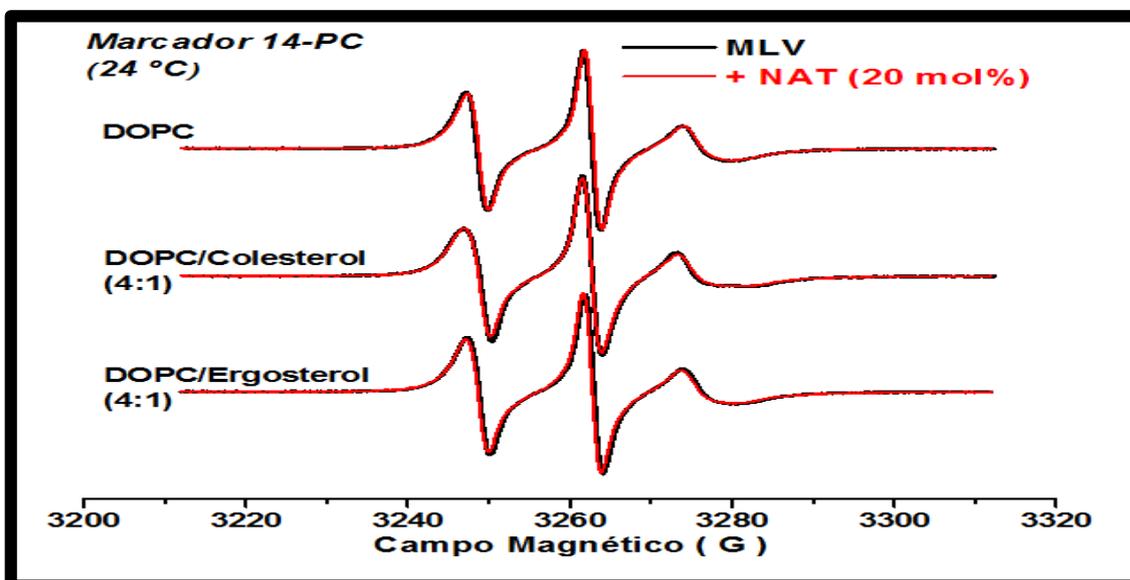


Figura 76 - Espectros do marcador 14-PC (0,5% mol) incorporados em MLVs de DOPC puro ou de DOPC/esterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina à temperatura ambiente.

ANEXO II

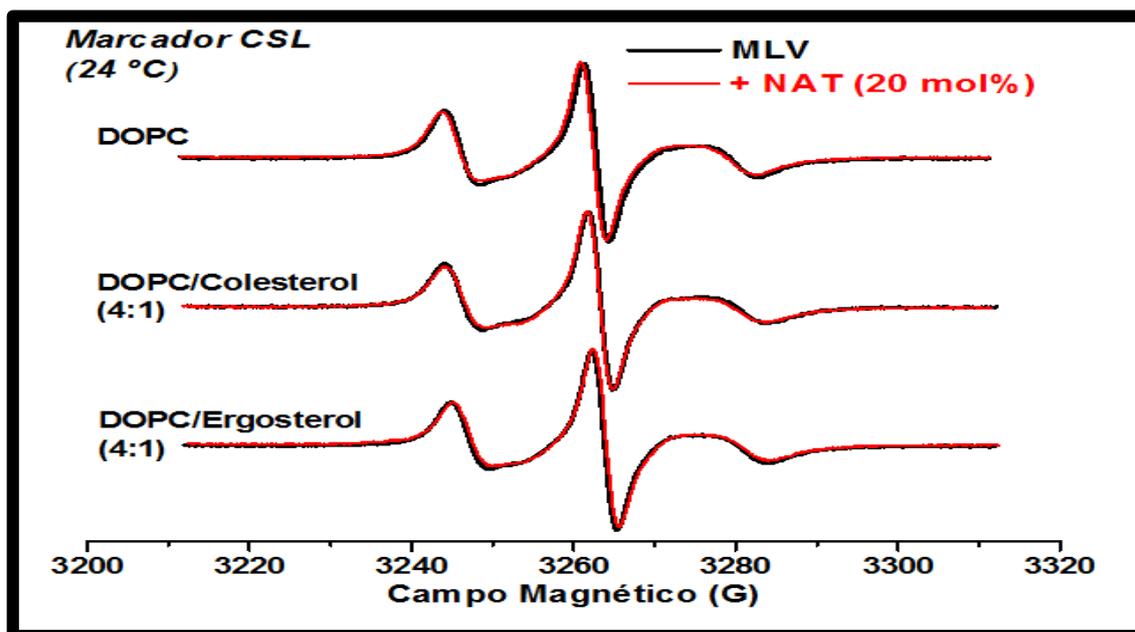


Figura 77 - Espectros do marcador colestano (0,5% mol) incorporados em MLVs de DOPC puro ou de DOPC/esterol (4:1) em pH=7,0 e [NaCl] = 100mM na ausência (preto) e na presença (vermelho) de 20% mol de natamicina à temperatura ambiente.

APÊNDICE

“O Homem está condenado a ser livre.”

(Jean-Paul Sartre)

APÊNDICE A

A) *Interações intermoleculares*

Em primeiro lugar, cabe diferenciarmos basicamente as reações químicas das interações físicas. As reações entre partículas (átomos, íons ou moléculas) não inertes levam a quebra/formação de ligações químicas e, portanto, relacionam-se na produção de novas substâncias. Por outro lado, no caso das interações físicas (interpartículas) não há a formação de novos compostos, entretanto, são responsáveis por todas as propriedades físicas da matéria: determinam tanto as conformações, quanto as fases de organização molecular e, portanto, são também conhecidas como interações intermoleculares (*Rocha, 2001*).

Em segundo lugar podemos classificar as interações intermoleculares em dois tipos: as de curto e as de longo alcance. As primeiras ocorrem para uma distância intermolecular característica correspondente a um valor menor ou igual a 3nm, sendo o carácter dessas interações do tipo *eletrostático* (repulsivo), visto que são consequentes da proximidade (sobreposição) das distintas nuvens eletrônicas (orbitais) pertencentes às partículas interagentes. Por outro lado, as de longo alcance ocorrem para distâncias intermoleculares mais elevadas, isto é, para valores acima de 3nm e inferiores a 5nm, sendo a natureza dessas interações, por sua vez, essencialmente atrativas. Basicamente, essas forças atrativas podem ser de 3 tipos:

- ***eletrostáticas***: ocorrem entre partículas ionizadas com carga líquida de sinais opostos. Essas interações, portanto, são típicas entre os cátions e os ânions presentes nos compostos iônicos, mas também ocorrem entre os grupos ionizáveis de macromoléculas, tais como as interações entre as aminas protonadas (NH_3^+) e os ácidos carboxílicos desprotonados (COO^-) presentes nos diversos aminoácidos constituintes dos peptídeos e das proteínas.
- ***van der Waals***: ocorrem entre partículas ou grupos funcionais não ionizados, mas que sejam detentores de um momento dipolo permanente ou induzido. Moléculas constituídas por uma assimetria constante na distribuição de cargas (densidade eletrônica) apresentam um momento dipolo permanente e, conseqüentemente, podem interagir com outras moléculas que também apresentem momento dipolo não nulo. Nesse caso, a interação de van der Waals

APÊNDICE A

é denominada *polar* e caracteriza-se pela afinidade de interação entre a porção mais eletronegativa (pólo negativo) de uma molécula com a porção mais eletropositiva (pólo positivo) de outra e vice-versa. Por outro lado, mesmo em moléculas apolares, as vibrações interatômicas intrínsecas ou até a presença de moléculas polarizadas nas vizinhanças, podem ocasionar variações (flutuações) temporárias na densidade eletrônica ao longo da estrutura molecular e, conseqüentemente, podem provocar o surgimento de momento dipolos induzidos. Nesse caso, essas interações de van de Waals entre moléculas com dipolos induzidos são denominadas *dispersivas de London*, e considerando-se que as flutuações na densidade eletrônica podem ocorrer em qualquer molécula (polar ou apolar), essas interações dispersivas podem ser encontradas em todos os sistemas moleculares. Além disso, embora essas interações de *London* sejam bastante fracas, elas apresentam um caráter cumulativo e, portanto, acabam assumindo uma intensidade significativa em sistemas constituídos por moléculas de cadeias longas e/ou quando essas moléculas se encontram em elevadas concentrações. Particularmente, quando ocorrem apenas entre moléculas e/ou grupos moleculares apolares, as interações *dispersivas de London* são especificamente denominadas *hidrofóbicas* e são muito importantes para a formação dos cristais líquidos liotrópicos (seção 1.1B).

- **Ligações de hidrogênio:** ocorrem especificamente entre o hidrogênio e elementos de alta eletronegatividade, tais como flúor, oxigênio e nitrogênio. Esse tipo de ligação difere das ligações covalentes, visto que não forma uma ligação permanente, entretanto, também difere das interações de van der Waals, uma vez que é direcional e mais intensa. Graças a sua geometria molecular e a presença dessa característica interação entre o hidrogênio e o oxigênio, que a substância água apresenta propriedades físicas tão especiais: suas moléculas polares apresentam uma forte coesão, o que lhe garante uma tensão superficial de grande magnitude mesmo na temperatura ambiente (20 °C) (ver apêndice B, tabela 8).

APÊNDICE B

B) Tensão de superfície e a interface ar-água

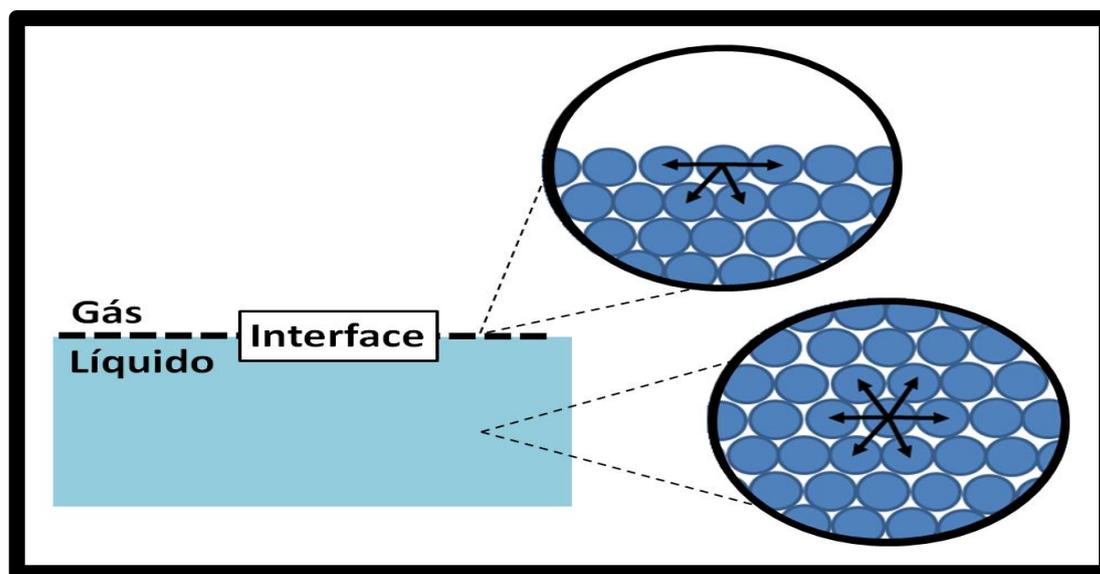


Figura 78 – Ilustração de uma interface gás-líquido e das forças intermoleculares (coesão) na superfície (resultante aponta para o interior do líquido) e no interior de um líquido (resultante nula). Fonte: elaborada pelo autor. Ilustrações semelhantes podem ser encontradas em publicações que abordem a região de interface gás-líquido. (Myers, 1999; Butt et al., 2003)

O que é tensão de superfície (γ) e, o que torna a região de interface ar-água tão especial? Primeiramente, precisamos compreender o que é a região de interface gás-líquido. Segundo o físico-químico norte-americano Josiah Willard Gibbs (1839-1903), considerando-se dois meios distintos e adjacentes, a interface corresponde a uma região de espessura finita, cujas propriedades físico-químicas (composição, densidade, condutividade, entre outras) diferem simultaneamente em relação aos dois meios, isto é, corresponde a uma região descontínua entre dois meios distintos. Todo líquido apresenta forças intermoleculares do tipo atrativa (ver apêndice A), isto é, forças responsáveis pela manutenção da coesão entre suas moléculas e a unidade do meio. Entretanto, na região de interface gás-líquido (figura 78), ao contrário do interior de um líquido, no qual cada molécula apresenta várias outras moléculas vizinhas em todas as direções, o que determina uma resultante de forças nula; as moléculas da superfície de um líquido não apresentam moléculas vizinhas em suas porções superiores, -pois logo acima delas se encontram as moléculas do meio gasoso, e, portanto, a resultante das forças intermoleculares para cada molécula na superfície aponta para o interior do líquido. Essa resultante não nula

APÊNDICE B

garante que a superfície apresente uma espontânea tendência a se contrair (compactar), isto é, existe uma tensão de superfície ($\gamma = [N/m]$), cuja força por unidade de comprimento age de maneira a minimizar o contato (minimizar a energia livre) das moléculas da superfície do líquido com o meio gasoso. Desse modo, a tensão de superfície também pode ser compreendida como uma energia livre de superfície ($\gamma = [J/m^2]$), cujo valor corresponde ao mínimo trabalho (aumento de energia livre, ΔG) que precisa ser realizado para que haja uma expansão (ΔA) de uma unidade na área de superfície do líquido, sendo essa relação descrita por Gibbs através da equação (9):

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{n,T,P} \quad (9)$$

onde n , T e P se referem, respectivamente, ao número de mols, temperatura e pressão, cujos valores são considerados constantes. Em segundo lugar, como no caso específico da água as forças de coesão referentes às ligações de hidrogênio (ver apêndice A) são muito fortes, esse material no estado fluido apresenta um elevado valor para a sua tensão de superfície ($\gamma = 72.8 \text{ mN/m}$ à $20 \text{ }^\circ\text{C}$), quando comparada com os demais líquidos não-metálicos na temperatura ambiente (tabela 8). Por esse motivo, a interface ar-água é especial, já que devido à peculiar tensão de superfície da água, essa superfície compacta e estável pode funcionar como um substrato ideal para formação de monocamadas, as quais serão descritas na próxima seção.

Tabela 8 – Valores da tensão de superfície para diferentes líquidos à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e do tipo de força intermolecular envolvidas: ligação metálica, ligação de hidrogênio e van der Waals (vdW).

Líquido	Tensão de superfície [mN/m] à $20 \text{ }^\circ\text{C}$	Ligação intermolecular
<i>Mercúrio</i>	485	<i>Metálica</i>
<i>Água</i>	72.8	<i>Hidrogênio + vdW</i>
<i>n-Octanol</i>	27.5	<i>Hidrogênio + vdW</i>
<i>n-Hexano</i>	18.4	<i>vdW</i>
<i>Perfluoroctano</i>	12	<i>vdW fraca</i>

Fonte: (Pashley e Karaman, 2004)

C) **Balança (Método Wilhelmy)**

A variação no valor da tensão de superfície da água devido a presença de filmes finos ou mesmo de contaminantes pode ser determinada medindo-se o valor da pressão de superfície em função do tempo (cinética de adsorção) ou em função da redução da área de superfície (isotermas de compressão). O método comumente empregado para medição da pressão de superfície é aquele desenvolvido por Ludwig Ferdinand Wilhelmy em 1863 (*Adamson e Gast, 1997; Birdi, 2002*). Esse método consiste basicamente no emprego da balança de Wilhelmy (figura 79A): uma microbalança (eletrônica ou não) acoplada a um fio em cuja extremidade inferior se encontra suspensa uma pequena placa retangular (figura 79B) com dimensões conhecidas (comprimento l , largura w e espessura t), a qual, por sua vez, é mantida em contato (ângulo θ) com a superfície do líquido, cuja tensão superficial se deseja medir (*Shah, 1972; Petty, 1996*). Por esse motivo, os materiais empregados para a produção dessa placa de Wilhelmy são materiais inertes e “molháveis” (não hidrofóbicos) tais como papel filtro, platina, vidro e quartzo.

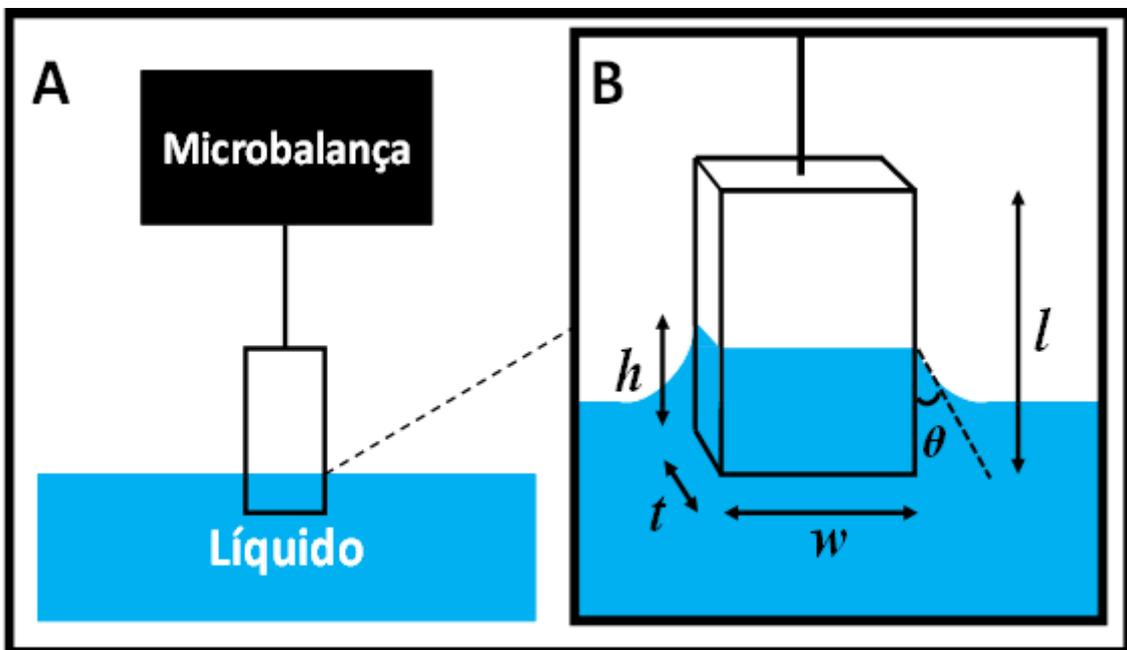


Figura 79 – Ilustração de (A) uma microbalança de Wilhelmy e (B) da placa retangular (comprimento l , largura w e espessura t) em contato (ângulo θ) com a superfície de líquido, onde h corresponde a porção (altura) da placa imersa no líquido. Fonte: figura adaptada de *Petty (1996) e Birdi (2002)*.

Primeiramente, podemos notar que as forças atuantes na direção vertical (normal a superfície do líquido) sobre a placa de Wilhelmy são: a força gravitacional (\vec{P}) e a força referente à ação da tensão de superfície ($\vec{\gamma}$), ambas apotando para baixo, e o empuxo ($\vec{\xi}$) no sentido oposto a essas duas primeiras. Desse modo, o valor (módulo) da resultante (\vec{F}) dessas forças sobre a placa podem ser calculado através da seguinte equação 10:

$$F = P + (\gamma \cdot d \cdot \cos\theta) - \xi \quad (10)$$

onde,

- $P = \rho_p(t \cdot w \cdot l)g$: é a intensidade da força peso resultante da ação de uma gravidade g atuante sobre a placa de comprimento l , largura w , espessura t e densidade ρ_p .
- $(\gamma \cdot d \cdot \cos\theta)$: representa o módulo da força referente à tensão de superfície ($\vec{\gamma}$) agindo sobre o perímetro da base $d=2(w+t)$ da placa de Wilhelmy.
- $\xi = \rho_a(t \cdot w \cdot h)g$: é a intensidade do empuxo referente à coluna do líquido deslocado com altura h , largura w , espessura t e densidade ρ_a , diante de da presença de uma gravidade g .

Em segundo lugar, para uma condição estacionária, na qual a força gravitacional e o empuxo são constantes, e considerando-se que o perímetro d da placa possui um valor aproximado equivalente à largura w , pois a espessura t é muito menor que a largura ($t \ll w$), uma análise da equação 10 nos permite inferir que a variação no valor da resultante das forças (ΔF) detectada pela microbalança é caracterizada pela seguinte fórmula 11:

$$\Delta F = \Delta\gamma \cdot 2w \cdot \cos\theta \quad (11)$$

Além disso, conforme pode ser verificado na equação 11 uma variação no valor da resultante das forças (ΔF) é diretamente proporcional a uma variação na tensão da superfície do líquido ($\Delta\gamma$). Além disso, como $\cos\theta = 1$ para um

ângulo de contato $\theta \sim 0^\circ$, isto é, considerando-se que a porção imersa da placa é completamente “molhada” pelo líquido, pode-se concluir que a pressão de superfície (π) medida por uma balança de Wilhelmy equivale à variação na tensão de superfície do líquido (Birdi, 2002), conforme mostrada pela equação 12:

$$\pi = -\frac{\Delta F}{2w} = -\Delta\gamma = (\gamma_0 - \gamma_f) \quad (12)$$

onde o sinal negativo indica que a tensão de superfície inicial (γ_0) é maior do que a final (γ_f), ou seja, um valor de pressão de superfície positivo ($\pi > 0$) medido pela balança de Wilhelmy indica que a tensão de superfície de um líquido é reduzida ($\gamma_f < \gamma_0$) tanto pela presença de impurezas, como pela de moléculas anfifílicas empregadas na produção dos filmes de Langmuir.

Finalmente, como pode ser observado na equação 11 e na 12, é importante realçar que a pressão de superfície é variável muito sensível tanto em relação à largura da placa (w), quanto ao ângulo de contato (θ) e, portanto, um minucioso controle das dimensões da placa, assim como do seu ideal posicionamento (orientação) normal ao plano de superfície do líquido, é essencial para a garantia da reprodutibilidade nos valores de pressão de superfície para uma dada configuração experimental.