

Tiago Filipe dos Santos Palmeira

**INTERACÇÃO DE UMA SÉRIE HOMÓLOGA  
DE ANFIFÍLAS FLUORESCENTES COM  
BICAMADAS LIPÍDICAS NA FASE  
LÍQUIDO ORDENADO**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química

Área de especialização em Química Avançada e Industrial

**Orientadora:**

Professora Doutora Maria João Moreno

**Setembro 2012**

Universidade de Coimbra



## Agradecimentos

---

A conclusão do mestrado marca o final de uma etapa importante da minha vida, que não teria sido conseguida sem o contributo de várias pessoas que, de diferentes maneiras, me ajudaram a alcançar este objectivo e às quais apresento a minha gratidão.

Antes de mais, quero deixar um agradecimento à minha supervisora, Prof. Dra. Maria João Moreno, pelo apoio, incentivo e motivação que me deu ao longo destes dois anos. Além disso, quero agradecer pela sua disponibilidade para me ensinar, ajudar e estou-lhe grato pelos seus conselhos, rigor e pela sua paciência ao longo deste meu processo de formação como mestre.

Quero agradecer ao Hugo, ao Filipe e acima de tudo ao Renato que, ao longo destes dois anos, de uma forma descontraída mas ao mesmo tempo exigente me transmitiram muito do seu conhecimento.

Aos meus amigos que, ao longo desta etapa, tiveram sempre ao meu lado para me ajudar a superar as dificuldades que apareciam e sem os quais, tudo isto se tornava muito mais difícil.

Por último, queria deixar um agradecimento à minha família que, desde sempre, tem estado ao meu lado e sem a qual isto não era possível. Agradeço, ao mesmo tempo aos meus pais e aos meus avós que, ao longo de todos estes anos, contribuíram directamente para a minha formação como pessoa e me ajudaram sempre em tudo o que precisei. Agora que esta etapa acabou, a eles deixo um agradecimento muito especial.



# Índice

---

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xi</b>

## Parte I - Introdução

<b>1. Membranas Biológicas</b> .....	<b>1</b>
1.1. Lípidos: componentes bases da bicamada .....	1
1.2. Porque são formadas as bicamadas? .....	4
1.3. Membranas modelo .....	5
1.3.1. Lipossomas .....	5
<b>2. Propriedades físicas das membranas</b> .....	<b>7</b>
2.1. Dinâmica das membranas .....	7
2.2. Estado físico das membranas .....	9
2.3. Efeito do Colesterol no comportamento de fases .....	11
2.4. Propriedades electrostáticas da membrana .....	13
2.5. Bicamadas como barreiras semi-permeáveis .....	14
2.6. Assimetria dos lípidos nas membranas .....	17
<b>3. Barreira hemato–encefálica</b> .....	<b>18</b>
<b>4. Objectivo deste estudo</b> .....	<b>20</b>

## Parte II - Material e Métodos

<b>1. Material</b> .....	<b>25</b>
1.1. Reagentes .....	25
1.2. Equipamento .....	25
<b>2. Métodos</b> .....	<b>26</b>
2.1. Preparação dos LUVs com sonda .....	26
2.2. Análise da concentração dos lípidos nos LUVs .....	27

2.2.1. Determinação da concentração de Fosfatos nos LUVs .....	27
2.2.2. Determinação da concentração de Colesterol nos LUVs .....	27
2.3. Estimativa da constante de equilíbrio das anfifílas entre a fase aquosa e os LUVs ( $K_D$ ) .....	28
2.4. Determinação do Rendimento Quântico .....	30
2.5. Determinação da Constante de Ionização .....	33
2.6. Determinação da Anisotropia de Fluorescência .....	34
2.7. Determinação dos Tempos de Vida de Fluorescência .....	35
2.8. Determinação da Velocidade de Translocação .....	36

### **Parte III - Resultados e Discussão**

<b>1. Caracterização fotofísica do NBD-<math>C_n</math> em bicamadas de POPC:Col (1:1) .....</b>	<b>37</b>
1.1. Rendimento Quântico de Fluorescência .....	37
1.2. Constante de Ionização .....	42
1.3. Anisotropia e Tempos de Vida de Fluorescência .....	47
<b>2. Estudo da velocidade de translocação do NBD-<math>C_n</math> em bicamadas de POPC:Col (1:1) .....</b>	<b>52</b>
2.1. Estado de transição da translocação .....	52
2.2. Translocação do NBD- $C_n$ em bicamadas de POPC:Col (1:1) .....	54
<b>Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>65</b>

## Resumo

---

O estudo cinético e termodinâmico da interacção de anfifílas fluorescentes com bicamadas lipídicas é essencial, tanto em termos biológicos como farmacológicos, para prever a permeação de fármacos através de membranas biológicas importantes, como por exemplo, a barreira hemato-encefálica. Esta vasta área tem impulsionado o nosso grupo de investigação, nos últimos anos, num estudo extensivo e detalhado no processo de permeação de anfifílas através de membranas com diferentes propriedades (Abreu, Moreno et al. 2004; Sampaio, Moreno et al. 2005; Moreno, Estronca et al. 2006; Cardoso, Martins et al. 2011).

De forma a caracterizar a interacção de anfifílas com bicamadas lipídicas, é necessário o conhecimento quantitativo de diferentes constantes de velocidade como a translocação, a inserção e a desorção, sendo que estas duas últimas definem o coeficiente de partição. A racionalização destes parâmetros permitem modular a velocidade de permeação de uma anfifíla através de uma bicamada lipídica.

Neste trabalho de mestrado estudou-se a interacção de uma série homóloga de aminas gordas fluorescentes, o (*7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il*)-acil amina com uma cadeia hidrocarbonada de comprimento  $n$  (NBD- $C_n$ ), com uma bicamada lipídica composta pela mistura binária equimolar de *1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (POPC) e Colesterol. Ao longo da série homóloga, o grupo hidrofílico (NBD) foi mantido e a razão hidrofílica/hidrofóbica das anfifílas foi modificada através da alteração do comprimento da cadeia hidrocarbonada,  $C_n$  ( $n=8, 10, 12, 14$  e  $16$ ).

O estudo de propriedades físicas, como o rendimento quântico, tempo de vida e anisotropia de fluorescência e a constante de ionização, permite obter detalhes sobre a localização da série homóloga NBD- $C_n$  nas membranas modelo compostas por POPC:Col (1:1). Observou-se que o aumento da cadeia hidrocarbonada não é um factor determinante na anisotropia e no rendimento quântico de fluorescência, enquanto que, para a constante de ionização, verificou-se um crescimento tendencial de 0.3 unidade de pH para as cadeias mais longas.

A velocidade de translocação da série NBD-C<sub>n</sub> foi o parâmetro cinético estudado neste trabalho e a sua dependência com temperatura permitiu a obtenção da termodinâmica do processo. Observou-se que o aumento da cadeia hidrocarbonada determina uma diminuição na velocidade de translocação de aproximadamente uma ordem de grandeza, a 25°C, entre o NBD-C<sub>10</sub> e o NBD-C<sub>16</sub>.



## Abstract

---

The kinetic and thermodynamic study of the interaction of fluorescent amphiphiles with lipid bilayers is a fundamental tool, for both biological and pharmacological areas, to predict the permeation of xenobiotics through relevant biological membranes such as, the blood brain barrier. This vast area of interest has prompted our group, in the last years, towards an extensive and detailed study of the amphiphiles and membranes key properties in the permeation process (Abreu, Moreno et al. 2004; Sampaio, Moreno et al. 2005; Moreno, Estronca et al. 2006; Cardoso, Martins et al. 2011).

In order to characterize the interaction of the amphiphiles with lipid bilayers it is required the quantitative knowledge of several rate constants like translocation, insertion and desorption, being the partition coefficient defined by latter two constants. The rationalization of this parameters allow to modulate the permeation rate of an amphiphile across a lipid bilayer.

In this work we report the interaction between an homologous series of fluorescent fatty amines, (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-alkyl amines with an alkyl chain of length  $n$  (NBD- $C_n$ ), with a lipid bilayer prepared from a equimolar binary mixture of *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glicero-3-phosphatidylcholine* (POPC) and Cholesterol. Along this homologous series, the hydrophilic group is maintained and the hydrophilic/hydrophobic ratio is changed *via* the length of the alkyl chain,  $C_n$  ( $n=8, 10, 12, 14$  or  $16$ ).

The study of the physical properties such as fluorescence quantum yield, fluorescence lifetime, steady state anisotropy and ionization constante, gives us details about the localization of NBD- $C_n$  homologous series in model membranes composed by POPC:Col (1:1). Following our research results, we notice that the increase of the alkyl chain is not a determining factor in fluorescence quantum yield and anisotropy, whereas, for the ionization constant there is a trend growth of 0.3 pH units for the longer chains.

The temperature dependence of the translocation rate allowed us to recover the thermodynamic parameters of this kinetic process. It was verified that the increase

of the alkyl chain states a decrease in the translocation rate of approximately one order of magnitude, at 25°C, between NBD-C<sub>10</sub> and NBD-C<sub>16</sub>.

## Abreviaturas

---

**ATP** – Adenosina trifosfato;

**AVC** – Acidente vascular cerebral;

**BHE** – Barreira hemato-encefálica;

**CAC** – Concentração de agregação crítica;

**Col** – Colesterol;

**DMPC** – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

**DMPE** – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina;

**DPPC** – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

**EDTA** – Ácido etilenodiamina tetra-acético;

**GUV** – Vesículas unilamelares pequenas;

**$k_f$**  – Constante de velocidade de translocação;

**$K_L$**  – Constante de equilíbrio;

**$k_R$**  – Constante de velocidade de reacção do NBD com o ditionito;

**LUV** – Vesículas unilamelares gigantes;

**MLV** – Vesículas lamelares;

**NBD- $C_n$**  – 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il com uma cadeia acilo de comprimento n;

**PC** – Fosfatidilcolina;

**POPC** – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

**SNC** – Sistema nervoso central;

**SOPC** – 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;

**SUV** – Vesículas lamelares pequenas;



## Índice de Figuras

---

- Figura 1:** Estruturas dos glicerofosfolípidos: (a) Fosfatidiletanolamina; (b) Fosfatidilserina; (c) Fosfatidilcolina; Estas estruturas, cujo nome deriva do álcool polar (Etanolamina, Serina e Colina), são compostas por uma região polar, que é hidrofílica e por uma região apolar que é hidrofóbica. Adaptado de (Moran, Horton et al. 2011) ..... 2
- Figura 2:** Estrutura do esfingofosfolípido mais abundante nas membranas biológicas, a esfingomielina. A azul está representada a esfingosina, a estrutura principal, à qual o grupo fosfatidilcolina está também ligado. A cadeia acilo está ligada ao grupo amino da esfingosina. Adaptado de (Denniston, Joseph et al. 2007) ..... 3
- Figura 3:** Estrutura do Colesterol. Adaptado de (Lodish, Berk et al. 2003) ..... 3
- Figura 4:** Diferentes parâmetros críticos de empacotamento originam a formação de diferentes agregados. Adaptado de (Hiemenz and Rajagopalan 1997) ..... 5
- Figura 5:** Representação dos diferentes modos de difusão dos lípidos numa bicamada: (a) Dinâmica vibracional dos lípidos através de oscilações das ligações simples C-C e de isomerização *trans/gauche*; (b) Modo de difusão rotacional; (c) Modo de difusão translacional; (d) Modo de difusão transversal (Flip-Flop). Adaptado de (Yeagle, 2005) ..... 8
- Figura 6:** Fase Gel ( $L_{\beta}$  e  $L_{\beta'}$ ). A fase gel é caracterizada por uma ordem conformacional, rotacional e translacional elevada. As cadeias acilo, que apresentam uma conformação *all trans*, estão completamente estendidas, paralelas entre si. A fase gel designada por  $L_{\beta'}$  é caracterizada por uma inclinação das cadeias acilo devido à área de corte da região polar ser maior que a área de corte da região apolar. Adaptado de (Vaz 2008) ..... 9
- Figura 7:** Fase Líquida ( $L_{\alpha}$ ). A fase líquida é caracterizada por uma entropia conformacional elevada. A diminuição da razão conformacional *trans/gauche*, pela diminuição das interações de Van der Waals origina uma diminuição da espessura da bicamada. Adaptado de (Vaz 2008) ..... 9
- Figura 8:** Estrutura de dois tipos de lípidos: (a) *1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (DPPC); (b) *1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (DMPC) ..... 10
- Figura 9:** Diferentes transições de fases para membranas compostas por fosfatidilcolina. Adaptado de (Gennis 1988) ..... 11
- Figura 10:** Diagrama de fases de uma mistura binária DPPC:Col. As várias fases estão identificadas como so (sólido ordenado),  $l_d$  (líquido desordenado) e  $l_o$  (líquido ordenado). Adaptado de (Ipsen, Mouritsen et al. 1990) ..... 12
- Figura 11:** Imagem esquemática da Barreira hemato-encefálica e dos trajectos que as diferentes substâncias podem ter para atravessar esta barreira. As substâncias essenciais para o correcto funcionamento do SNC

atravessam a BHE utilizando vários tipos de transporte, como transporte activo, transporte mediado, ou outros sistemas mais complexos como a transcitose (Abbott 2004) .....	19
<b>Figura 12:</b> Diagrama de fases do POPC:Col. Adaptado de (Mateo, Acuna et al. 1995) .....	21
<b>Figura 13:</b> Estrutura química das anfifílas NBD-C <sub>8</sub> , NBD-C <sub>10</sub> , NBD-C <sub>12</sub> e NBD-C <sub>16</sub> , compostas pelo fluoróforo NBD (a vermelho) ligado a uma cadeia hidrocarbonada compreendida entre 8 e 16 carbonos .....	22
<b>Figura 14:</b> Estruturas de duas anfifílas fluorescentes: (a) Estrutura do NBD-C <sub>12</sub> ; (b) Estrutura do NBD-LysoMPE; Na figura, a vermelho, está representado o grupo fluorescente NBD .....	29
<b>Figura 15:</b> Espectros de Absorção; <b>Painel A:</b> Espectro de absorção do POPC:Col (1:1) (—) e espectro de absorção típico do NBD-C <sub>16</sub> em POPC:Col (1:1) (----) sem tratamento. <b>Painel B:</b> Espectro de absorção típico do NBD-C <sub>16</sub> em POPC:Col (1:1) (—) após subtração da dispersão dos LUVs .....	32
<b>Figura 16:</b> Esquema da reação do ditionito com o grupo nitro do NBD .....	36
<b>Figura 17:</b> Espectros de absorção e fluorescência, a $\lambda_{exc}=475$ nm, normalizados do NBD-C <sub>8</sub> diluído em metanol (vermelho) e água (negro). Estão representados os espectros de absorção do NBD-C <sub>8</sub> em metanol (----) e em água (••••) e os espectros de fluorescência do NBD-C <sub>8</sub> em metanol (-•-•-) e em água (—). <i>Inset</i> são apresentados os gráficos de fluorescência do NBD-C <sub>8</sub> em água e metanol normalizados relativamente ao solvente em que a sonda é mais fluorescente, o metanol .....	38
<b>Figura 18:</b> Espectros de absorção típicos do NBD-C <sub>8</sub> (—), NBD-C <sub>10</sub> (—), NBD-C <sub>12</sub> (—), NBD-C <sub>14</sub> (—) e NBD-C <sub>16</sub> (—) normalizados relativamente à referência NBD-DMPE em POPC (—), a 25°C .....	39
<b>Figura 19:</b> Espectros de fluorescência típicos, a $\lambda_{exc}=460$ nm, do NBD-C <sub>8</sub> (—), NBD-C <sub>10</sub> (—), NBD-C <sub>12</sub> (—), NBD-C <sub>14</sub> (—) e NBD-C <sub>16</sub> (—) normalizados relativamente à referência, o NBD-DMPE em POPC (—), a 25°C. <i>Inset</i> está representado o gráfico de fluorescência normalizado das diferentes espécies .....	40
<b>Figura 20:</b> Valores do rendimento quântico de fluorescência para a série homóloga NBD-C <sub>n</sub> (n=8-16) inserido em bicamadas de POPC:Col (1:1) (□) e POPC (○). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão associado a um mínimo de três experiências .....	41
<b>Figura 21:</b> Mecanismo de protonação ( $pK_a \approx 0.2$ ) e desprotonação ( $pK_a \approx 10.2$ ) do grupo NBD. Adaptado de (Meyers, Jurss et al. 1983) .....	43
<b>Figura 22:</b> Espectros de fluorescência obtidos para uma titulação típica do NBD-C <sub>10</sub> , a 25°C, inserido em bicamadas de POPC:Col (1:1), a $\lambda_{exc}=475$ nm. A seta vertical na figura representa o aumento de volume de NaOH .....	44
<b>Figura 23:</b> Curvas de titulação típicas através da intensidade de fluorescência normalizada para as diferentes sondas na série homóloga NBD-C <sub>n</sub> , a 25°C. <b>Painel A:</b> NBD-C <sub>8</sub> (Δ), ( $pK_a \approx 9.8$ ); NBD-C <sub>10</sub> (◇), ( $pK_a \approx 9.7$ ); <b>Painel B:</b> NBD-C <sub>12</sub> (□), ( $pK_a \approx 9.7$ ); NBD-C <sub>14</sub> (Δ), ( $pK_a \approx 9.9$ ); NBD-C <sub>16</sub> (○), ( $pK_a \approx 10.1$ ) e curvas dos respectivos ajustes, segundo a equação 16. A linha a tracejado corresponde ao valor do $pK_a$ para o NBD-C <sub>12</sub> .....	45

- Figura 24:** Valores da constante de ionização obtidos para a série homóloga do NBD- $C_n$  inserida em bicamadas de POPC:Col (1:1) ( $\square$ ) e de POPC ( $\circ$ ). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão obtido para um mínimo de três experiências independentes ..... 46
- Figura 25:** Espectros de anisotropia, a  $\lambda_{exc} = 475$  nm, definidos segundo as componentes horizontais,  $I_{VH}$  (—) e verticais  $I_{VV}$  (----) para o NBD- $C_{12}$ , a 25°C, em bicamadas de POPC:Col (1:1). *Inset* está o gráfico do factor  $G$  obtido para a sonda em metanol ..... 48
- Figura 26:** Espectros da anisotropia de fluorescência, a 25°C, a  $\lambda_{exc}=475$  nm e a  $\lambda_{em}=540-560$  nm. **Painel A:** NBD- $C_8$  ( $\Delta$ ), NBD- $C_{10}$  ( $\circ$ ) e NBD- $C_{12}$  ( $\square$ ); **Painel B:** NBD- $C_{14}$  ( $\Delta$ ) e NBD- $C_{16}$  ( $\diamond$ ). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão associados a um mínimo de três experiências independentes ..... 49
- Figura 27:** Valores da anisotropia (**Painel A**) e dos tempos de vida ( $\tau$ ) médio (**Painel B**), a  $\lambda_{exc} = 460$  e  $\lambda_{em} = 530$  nm, de fluorescência, a 25°C, da série homóloga NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) ( $\square$ ) e POPC ( $\circ$ ). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão associado ao mínimo de três experiências ..... 49
- Figura 28:** Representação esquemática do passo de translocação de uma anfifila numa bicamada ..... 54
- Figura 29:** Decréscimo da intensidade de fluorescência devido à reacção do ditionito com o NBD- $C_{10}$  (A), NBD- $C_{12}$  (B) e NBD- $C_{16}$  (C) a 25°C. As linhas na figura, a vermelho, representam o melhor ajuste das equações diferenciais obtidas por Moreno et al. 2006, do qual se obteve  $k_f \approx 0.65$  s $^{-1}$  para o NBD- $C_{10}$ ,  $k_f \approx 0.26$  s $^{-1}$  para o NBD- $C_{12}$  e  $k_f \approx 0.0051$  s $^{-1}$  ..... 55
- Figura 30:** Representação da constante de velocidade de translocação,  $k_f$  em função do número de carbonos da cadeia acilo para a série homóloga do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) ( $\square$ ) e em bicamadas de POPC ( $\circ$ ), a 25°C. *Inset* está representado o gráfico do logaritmo natural do  $k_f$  em função do número de carbonos ..... 57
- Figura 31:** Gráficos do tipo Arrhenius para o processo de translocação para a série homóloga das aminas gordas NBD- $C_{10}$  ( $\Delta$ ) e NBD- $C_{12}$  ( $\circ$ ) (**Painel A**) e para a série NBD- $C_{14}$  ( $\square$ ) e NBD- $C_{16}$  ( $\diamond$ ) (**Painel B**). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação dada pela teoria do estado de transição ..... 59
- Figura 32:** Parâmetros termodinâmicos do processo de translocação em função do tamanho da cadeia acilo da série homóloga de aminas gordas estudadas, em bicamadas de POPC:Col (1:1) a 25°C; variação entálpica ( $\square$ ) (A); variação entrópica ( $\circ$ ) (B); energia livre de Gibbs ( $\Delta$ ) (C) ..... 60





## Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1:</b> Valores da constante de equilíbrio, $K_L$ , para o NBD-LysoMPE a 25°C .....	<b>29</b>
<b>Tabela 2:</b> Valores do $K_L$ para a série homóloga do NBD- $C_n$ (n=8-16) obtidos em bicamadas de POPC e os valores estimados da mesma série para bicamadas de POPC:Col (1:1) .....	<b>30</b>
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da translocação da série homóloga do NBD- $C_n$ através das bicamadas de POPC:Col (1:1) e bicamadas de POPC, a 25°C .....	<b>59</b>



# **Parte I**

## ***Introdução***



## **1. Membranas Biológicas**

As membranas biológicas são estruturas dinâmicas constituídas maioritariamente por dois tipos de moléculas biológicas, os lípidos e as proteínas, que desempenham um papel importante na estruturação e no funcionamento das células. Uma das suas funções mais importantes é definir a compartimentalização da estrutura celular, criando uma separação física entre um meio interno e um meio externo, de modo a conceder-lhes a sua individualidade, controlando também o fluxo das diferentes substâncias que passam estes dois meios. Podem-se assim definir as membranas biológicas como barreiras selectivamente permeáveis (Gennis 1988).

Os organelos, que fazem parte da constituição e são responsáveis pelo correcto funcionamento das células, são compostos por membranas biológicas, onde diferentes processos metabólicos ocorrem. Exemplos desses processos são a fotossíntese, que ocorre nas membranas internas dos cloroplastos, e a fosforilação oxidativa, um processo de produção de Adenosina trifosfato (ATP), que ocorre nas membranas internas das mitocôndrias (Stryer 1988).

As membranas são tão diversas na sua estrutura como no seu funcionamento. A sua estrutura base, as bicamadas, são formadas por várias moléculas lipídicas, que em meio aquoso se associam devido maioritariamente ao efeito hidrofóbico (Vaz 2008).

### **1.1. Lípidos: Componentes bases das bicamadas**

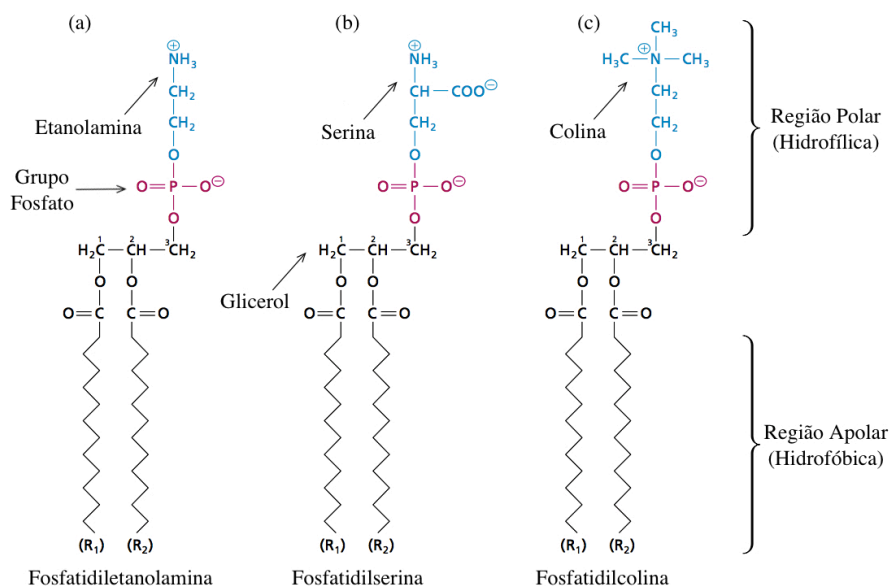
Os lípidos, estruturalmente, apresentam duas regiões com solubilidades distintas. A região polar, também designada por parte hidrofílica devido à interacção favorável com as moléculas de água, é solúvel em solventes polares enquanto a região apolar, designada de parte hidrofóbica porque não interage com as moléculas de água, é solúvel em solventes apolares. Esta propriedade concede aos lípidos a designação de moléculas anfifílicas (Gennis 1988).

As membranas biológicas, são maioritariamente constituídas por três tipos de lípidos, os fosfolípidos, os glicolípidos e os esteróis (Lehninger, Nelson et al. 1997; Ziegler 2008).

Os fosfolípidos são os principais constituintes das membranas biológicas e podem ter como estrutura principal o glicerol (figura 1), no caso dos glicerofosfolípidos, ou a esfingosina (figura 2), no caso dos esfingofosfolípidos (Gennis 1988). Estas estruturas são constituídas por duas cadeias acilo ligadas à estrutura principal, ao qual um grupo fosfato e um álcool polar também estão ligados (Lehninger, Nelson et al. 1997).

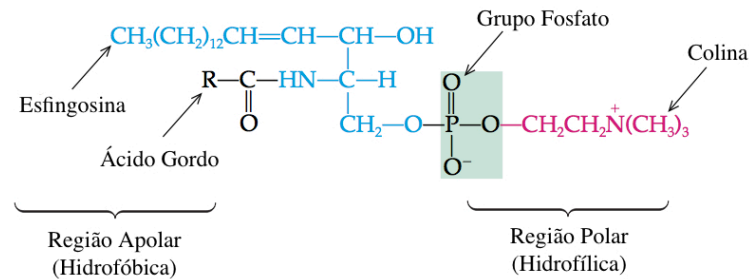
Os glicerofosfolípidos são compostos por duas cadeias acilo, que constituem a região apolar da molécula e que podem possuir entre 12 a 24 carbonos, esterificadas na posição *sn*-1 e *sn*-2 do glicerol. Estas cadeias podem ser saturadas (não ter ligações duplas) ou insaturadas (ter 1, 2 ou mais ligações duplas), sendo que, quando insaturadas, as ligações duplas têm geralmente a configuração *cis* (Voet 2008).

O álcool polar ligado ao grupo fosfato, que por sua vez está ligado na posição *sn*-3 do glicerol, determina o nome da região polar da molécula. O grupo polar mais comum nos glicerofosfolípidos é a fosfatidilcolina (figura 1 c), que é composto por um álcool polar, colina, ligado ao grupo fosfato. A fosfatidilserina (figura 1 b) e a fosfatidiletanolamina (figura 1 a) são grupos polares que também podem ser encontrados nos glicerofosfolípidos, compostos pelos álcoois polares serina e etanolamina, respectivamente (Lodish, Berk et al. 2003).



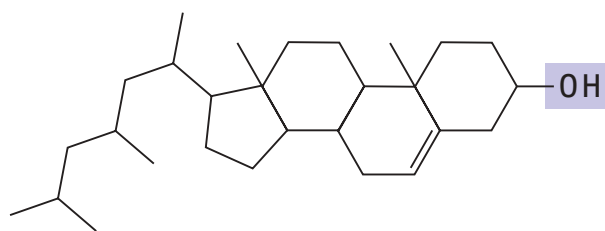
**Figura 1:** Estruturas dos glicerofosfolípidos: (a) Fosfatidiletanolamina; (b) Fosfatidilserina; (c) Fosfatidilcolina; Estas estruturas, cujo nome deriva do álcool polar (Etanolamina, Serina e Colina), são compostas por uma região polar, que é hidrofílica e por uma região apolar que é hidrofóbica. Adaptado de (Moran, Horton et al. 2011).

Os glicolípidos, tal como o esfingofosfolípidos, são derivados da esfingosina, mas ao contrário da esfingomielina (figura 2), o esfingofosfolípido mais abundante nas membranas biológicas, os glicolípidos têm uma região polar constituída por um ou mais açúcares, ligados à esfingosina (Stryer 1988).



**Figura 2:** Estrutura do esfingofosfolípido mais abundante nas membranas biológicas, a esfingomielina. A azul está representada a esfingosina, a estrutura principal, à qual o grupo fosfatidilcolina está também ligado. A cadeia acilo está ligada ao grupo amino da esfingosina. Adaptado de (Denniston, Joseph et al. 2007).

Os esteróis são um tipo de lípidos estruturalmente diferentes dos lípidos referidos até ao momento. O colesterol (figura 3), o esteroide mais abundante nas membranas biológicas dos animais (cerca de 30 mol % (Gennis 1988)), tem uma região polar constituída apenas por um grupo  $-OH$  e a uma região apolar composta por quatro anéis fundidos com uma cadeia acilo substituída, o que lhe confere um forte carácter hidrofóbico e uma elevada rigidez (Voet 2008). A sua estrutura tem uma profunda influência nas propriedades físico-químicas das membranas, aspecto que será discutido no capítulo 2 da introdução.



**Figura 3:** Estrutura do Colesterol. Adaptado de (Lodish, Berk et al. 2003).

A natureza anfifílica das diferentes moléculas conduz à formação de agregados em solução aquosa. A estrutura destes agregados está relacionada com a sua composição química.

## 1.2. Porque são formadas as bicamadas?

Devido à sua extensa região apolar, a solubilidade dos lípidos em solução aquosa é bastante reduzida. Acima de uma determinada concentração, estes tendem a formar agregados de forma a reduzir o contacto da sua região apolar com a água, reduzindo assim a energia livre de Gibbs do sistema. Esta concentração é chamada de concentração de agregação crítica (CAC) (Gennis 1988; Tanford 1991). O valor da CAC depende das propriedades químicas das moléculas sendo que, devido às suas extensas cadeias acilo (entre 14 e 24 carbonos), os fosfolípidos apresentam uma CAC na região dos nM ou inferior. Magda et al. obteve para o fosfolípido *1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina* (DMPE), marcado com a sonda fluorescente *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl* (NBD), um valor de CAC na ordem dos  $\approx 5 \times 10^{-9}$  M (Abreu, Moreno et al. 2004).

As moléculas anfifílicas em solução aquosa, acima da CAC, podem formar diferentes tipos de agregados. Nestas estruturas, as regiões polares estão orientadas para as moléculas de água porque estabelecem interações favoráveis, enquanto as regiões apolares se associam entre si. Esta associação das regiões apolares em solução aquosa deve-se maioritariamente ao efeito hidrofóbico e está directamente relacionadas com factores termodinâmicos.

Os lípidos quando adicionados a uma solução aquosa originam uma diminuição da entropia do sistema, porque as moléculas de água organizam-se em volta das regiões apolares, diminuindo assim o seu número de microestados. Como esta organização é desfavorável para o sistema, este reage de modo a aumentar o número de microestados, aumentando a entropia. Este aumento é feito através da formação de agregados, em que as regiões polares interagem com as moléculas de água por pontes de hidrogénio e por ligações electrostáticas e as regiões apolares são estabilizadas entre si por interações de Van der Waals (Tanford 1991).

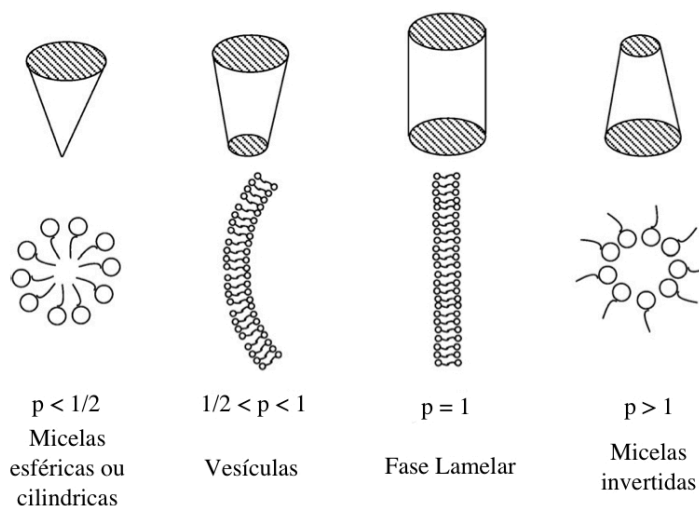
A geometria das moléculas anfifílicas em solução aquosa pode-se definir assim de acordo com a equação do parâmetro crítico de empacotamento ( $p$ ):

$$p = \frac{v}{a.l} \quad (1)$$



onde ( $a$ ) é a área ocupada pela superfície polar e ( $l$ ) e ( $v$ ), o comprimento máximo e o volume molecular das cadeias acilo, respectivamente.

Na figura 4 estão representados os diferentes tipos de estruturas que as moléculas anfifílicas podem formar em solução aquosa, que dependem do balanço entre a região polar e a região apolar.



**Figura 4:** Diferentes parâmetros críticos de empacotamento originam a formação de diferentes agregados. Adaptado de (Hiemenz and Rajagopalan 1997).

Os lípidos apresentam uma estrutura singular onde o balanço entre as regiões polares e apolares é idêntico, por isso, estes formam bicamadas.

### 1.3. Membranas modelo

As membranas biológicas são estruturas complexas de se estudar devido à sua variada composição, tanto de lípidos como de proteínas. De modo a tornar o seu estudo possível, diferentes sistemas modelo de membranas têm sido desenvolvidos. As membranas modelo mais simples que se podem estudar são compostas apenas por um único tipo de lípidos.

Das diferentes estruturas que as moléculas anfifílicas formam em solução aquosa (figura 4), as que tem particular relevância no estudo das membranas modelo são os lipossomas.

#### 1.3.1. Lipossomas

Os fosfolípidos em solução aquosa, acima da CAC formam bicamadas. Como as regiões hidrofóbicas dos extremos estão em contacto com a solução aquosa, a

sua estrutura é instável, por isso, ocorre a formação de uma estrutura esférica de modo a minimizar a exposição das regiões hidrofóbicas aumentando a estabilidade da bicamada em solução aquosa. Estas estruturas esféricas são designadas de lipossomas (Lehninger, Nelson et al. 1997). Os lipossomas são vesículas esféricas, que no seu interior têm um determinado volume de solução, e podem ser classificadas com base no seu tamanho e número de bicamadas que os constituem. Podemos classificar os lipossomas como vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV).

As vesículas multilamelares (MLV) são esferas concêntricas que contêm no seu interior várias bicamadas, que podem ser preparadas através da hidratação e agitação de um filme lipídico. O seu diâmetro está compreendido entre 0.2 e 50  $\mu\text{m}$  (Luckey 2008). Dos MLV podem ser preparadas as vesículas unilamelares através da técnica de extrusão, onde a solução, sob pressão, passa através de filtros de policarbonato com diferentes tamanhos.

Os GUV são as maiores vesículas unilamelares com um diâmetro compreendido entre 5-300  $\mu\text{m}$ , o que lhes confere um valor médio de curvatura pequeno. Os SUV, pelo contrário, têm um diâmetro na ordem dos 20-50 nm, por isso apresentam um valor médio de curvatura elevado.

O estudo das membranas modelo é feito maioritariamente com LUVs (Feigenson 1997; Rukmini, Rawat et al. 2001; Sampaio, Moreno et al. 2005). O seu diâmetro compreendido entre 50-500 nm, corresponde a um valor médio de curvatura semelhante ao valor médio da curvatura das membranas biológicas.

## 2. Propriedades físicas das membranas

O primeiro modelo das bicamadas lipídicas foi inicialmente sugerido em 1925 por Gorter e Grendel (Gorter and Grendel 1925), quando estes extraíram lípidos de eritrócitos com acetona e determinaram a sua área de superfície, verificando que correspondia a duas vezes a área calculada para os eritrócitos. Desde então, vários investigadores têm vindo a estudar e a desenvolver um modelo que melhor explique a estrutura e composição das membranas biológicas. Em 1972, Singer e Nicolson contribuíram de forma fundamental para o estudo das membranas biológicas ao introduzirem o modelo do mosaico de fluido das membranas biológicas (Singer and Nicolson 1972). De acordo com este modelo, as membranas biológicas são caracterizadas como uma solução bidimensional de proteínas integrais e periféricas, orientadas numa bicamada fluida de fosfolípidos, na qual os lípidos e proteínas podem difundir livremente. O conceito da membrana como uma estrutura fluida continua a ser a base para o entendimento da função das membranas biológicas.

### 2.1. Dinâmica das membranas

O paradigma das membranas biológicas como estruturas estáticas foi modificado com a introdução do modelo do mosaico de fluido. As interações não covalentes entre as cadeias acilo dos lípidos nas bicamadas, faz com que estas estruturas apresentem propriedades dinâmicas que ocorrem em diferentes escalas de tempo. Estas propriedades dinâmicas, que dependem de vários factores como a temperatura, pressão, hidratação e composição lipídica (tamanho das cadeias acilo e da região polar), podem ser divididas em quatro categorias: conformacional, rotacional, translacional e transversal (Vaz 2008). A sua ocorrência em diferentes escalas de tempo, que vai dos femtossegundos (dinâmica vibracional entre as ligações simples C-C das moléculas de lípidos) a horas (difusão transversal), tornam o seu estudo um desafio, porque nenhuma técnica experimental tem uma amplitude temporal tão alargada.

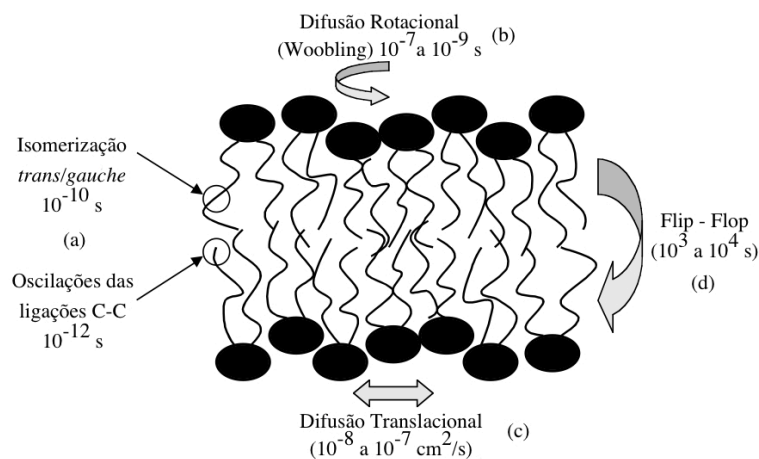
A dinâmica vibracional dos fosfolípidos nas bicamadas (figura 5 a) são caracterizadas por movimentos intramoleculares como oscilações vibracionais e torsionais em torno das ligações simples C-C, isomerização *trans/gauche* e

rotações axiais. Estes modos vibracionais ocorrem na escala de tempo dos femtos aos nanossegundos (Moore, Lopez et al. 2001).

A difusão rotacional dos lípidos (figura 5 b), que pode ser caracterizada por movimentos giratórios em torno da normal à bicamada, em que o movimento que a molécula descreve é semelhante a um cone (*Woobling*) e por movimentos ao longo do seu eixo vertical, ocorrem na escala de tempo dos  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  s (Johnson and Garland 1983; Jovin and Vaz 1989; Essmann and Berkowitz 1999).

Os modos de difusão translacional (figura 5 c) dos lípidos ocorrem no plano da bicamada, com um coeficiente de difusão de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  (Vaz and Hallmann 1983; Jovin and Vaz 1989; Almeida, Vaz et al. 1992).

Por último, o modo de difusão translacional (translocação) (Figura 5 d), também designado de flip-flop, ocorre através da deslocação de um fosfolípido de uma monocamada para a outra. Este movimento ocorre na escala de tempo dos  $10^2$  a  $10^4$  s (Moreno, Estronca et al. 2006) e corresponde ao modo dinâmico mais lento dos referidos. A passagem da região polar do lípido no centro hidrofóbico da bicamada, é um processo que tem uma barreira de energia associada elevada, por isso a sua velocidade é menor (Gennis 1988).



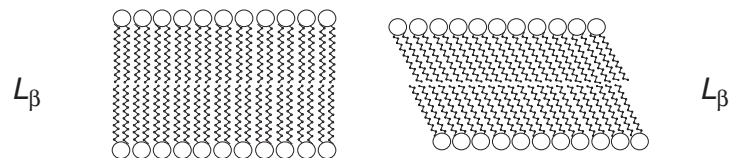
**Figura 5:** Representação dos diferentes modos de difusão dos lípidos numa bicamada: **(a)** Dinâmica vibracional dos lípidos através de oscilações das ligações simples C-C e de isomerização *trans/gauche*; **(b)** Modo de difusão rotacional; **(c)** Modo de difusão translacional; **(d)** Modo de difusão transversal (Flip-Flop). Adaptado de (Yeagle, 2005).

Um factor importante, que pode originar a diminuição da dinâmica dos lípidos, é o estado físico em que a bicamada se encontra (Kol, de Kroon et al. 2001; John, Schreiber et al. 2002; Moreno, Estronca et al. 2006).

## 2.2. Estado físico das membranas

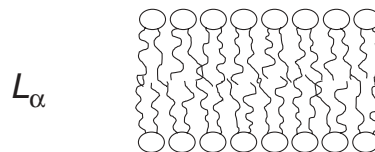
Uma bicamada em excesso de água, dependendo da temperatura, pode-se encontrar em dois tipos de fases, na fase gel ou na fase líquida.

Os lípidos constituintes de uma bicamada na fase gel ( $L_{\beta}$ ) (figura 6) apresentam uma razão conformacional *trans/gauche* elevada. As cadeias acilo, completamente estendidas numa conformação *all trans*, estão organizadas entre si de uma forma paralela e são estabilizadas por interacções de Van der Waals fortes. Apresentam uma ordem rotacional e translacional elevada, sendo que a espessura da bicamada é máxima nesta fase (Nagle 1980; Vaz 2008).



**Figura 6:** Fase Gel ( $L_{\beta}$  e  $L_{\beta}'$ ). A fase gel é caracterizada por uma ordem conformacional, rotacional e translacional elevada. As cadeias acilo, que apresentam uma conformação *all trans*, estão completamente estendidas, paralelas entre si. A fase gel designada por  $L_{\beta}'$  é caracterizada por uma inclinação das cadeias acilo devido à área de corte da região polar ser maior que a área de corte da região apolar. Adaptado de (Vaz 2008).

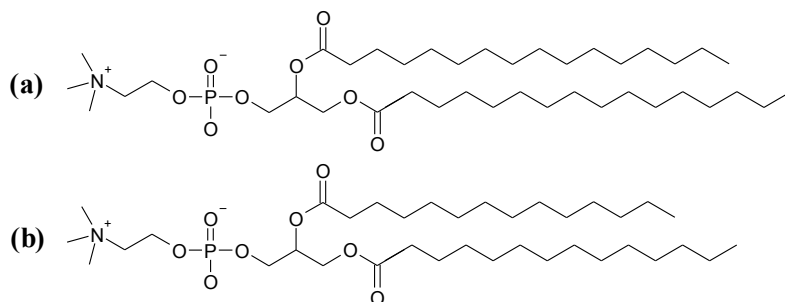
Na fase líquida ( $L_{\alpha}$ ) (figura 7), a bicamada é caracterizada por uma razão conformacional *trans/gauche* baixa. A diminuição das interacções de Van der Waals, relativamente à fase gel, origina um aumento da distância entre os lípidos e uma diminuição da organização das cadeias acilo e da ordem rotacional e translacional. Nesta fase a espessura da bicamada, relativamente à fase gel, diminui (Nagle 1980; Sun, Suter et al. 1994).



**Figura 7:** Fase Líquida ( $L_{\alpha}$ ). A fase líquida é caracterizada por uma entropia conformacional elevada. A diminuição da razão conformacional *trans/gauche*, pela diminuição das interacções de Van der Waals origina uma diminuição da espessura da bicamada. Adaptado de (Vaz 2008).

A transição da fase gel para a fase líquida ocorre quando uma determinada temperatura, designada temperatura de transição,  $T_m$ , é atingida. O valor da temperatura, ao qual ocorre a transição de fase, depende de factores como a pressão, a força iónica do meio e a região polar dos lípidos que compõem as bicamadas. Outro factor que é importante e do qual a temperatura de transição depende maioritariamente é das propriedades das cadeias acilo (Gennis 1988).

Lípidos com regiões apolares compostas por duas cadeias saturadas de diferentes tamanhos, por exemplo o *1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (DPPC) (figura 8 a), com 16 carbonos, e o *1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (DMPC) (figura 8 b), com 14 carbonos, têm temperaturas de transição diferentes, 41°C e 23°C, respectivamente (Mabrey and Sturtevant 1976; Blume 1983). Esta diferença deve-se à extensão das interacções de Van der Waals serem menores entre as cadeias com menor número de carbonos, o que faz com que a energia necessária para promover a transição da fase gel para a fase líquida seja menor (Gennis 1988; Sun, Tristram-Nagle et al. 1996).

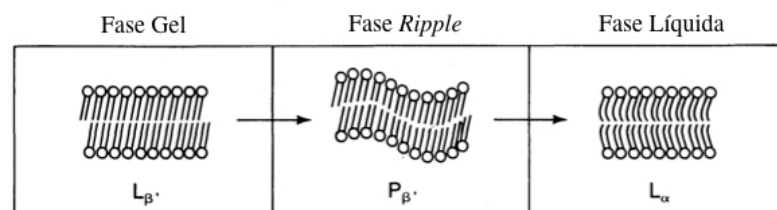


**Figura 8:** Estrutura de dois tipos de lípidos: (a) *1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (DPPC); (b) *1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (DMPC).

Outra propriedade das cadeias acilo, que provoca uma alteração da temperatura a que ocorre a transição de fases é o seu grau de saturação. Regiões apolares compostas por duas cadeias acilo saturadas têm  $T_m$  maiores do que lípidos compostos por uma cadeia saturada e outra insaturada ou quando ambas as cadeias são insaturadas. Esta diferença na temperatura deve-se ao facto da cadeia insaturada apresentar uma restrição conformacional (*kink*) na posição da dupla. Esta restrição faz com que a interacção dos lípidos na fase gel seja mais fraca porque a extensão das interacções de Van der Waals entre os lípidos são menores. Sendo assim, a energia necessária para promover a transição da fase gel para a fase fluida é menor. Esta característica é particularmente relevante se

a ligação dupla tiver a configuração *cis*. Caso a configuração da ligação dupla seja *trans* a cadeia fica quase linear e as interações entre cadeias são bastante fortes devido à maior polarizabilidade da ligação dupla (Coolbear, Berde et al. 1983; Lewis, Sykes et al. 1988; Marsh 2010). O *1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (SOPC) é composto por duas cadeias de 18 carbonos cada, sendo uma saturada e outra insaturada. Quando a cadeia insaturada tem a configuração *cis*, o lípido apresenta uma  $T_m$  de 5.5°C enquanto que, quando a cadeia insaturada tem configuração *trans*, o lípido apresenta uma  $T_m$  de 31.1°C (Roach, Feller et al. 2004).

Bicamadas que têm na sua região polar fosfatidilcolinas apresentam uma pré-transição onde ocorre a formação de uma estrutura designada por fase *ripple* (figura 9). Nesta fase, a bicamada apresenta ondulações possuindo uma superfície polar superior ao previsto pela soma das áreas de corte das regiões polares (Gennis 1988).



**Figura 9:** Diferentes transições de fases para membranas compostas por fosfatidilcolina. Adaptado de (Gennis 1988).

Um lípido que tem uma profunda influência na estrutura física da membrana é o colesterol.

### 2.3. Efeito do Colesterol no comportamento de fases

A presença de colesterol nas membranas tem uma enorme influência na sua fluidez. A sua estrutura rígida provoca efeitos contrários nas diferentes fases em que a membrana se pode encontrar.

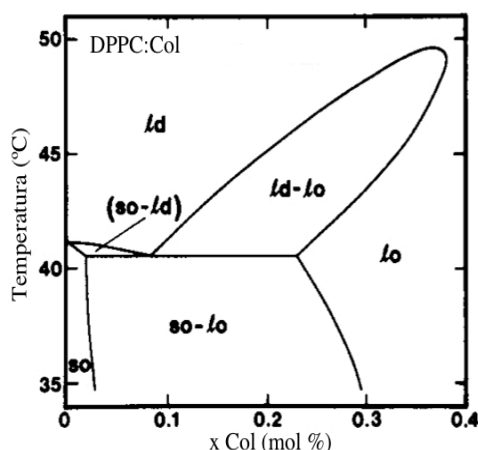
O colesterol, quando adicionado a uma membrana na fase líquida ( $L_\alpha$ ), diminui o volume livre entre fosfolípidos originando um aumento na ordem da membrana. Este, provoca um efeito de condensação, que resulta das interações entre as cadeias acilo e a sua estrutura rígida e as leva a assumir uma razão conformacional *trans/gauche* elevada (McMullen, Lewis et al. 2004; Yeagle

2005). A ordem conformacional *all trans* imposta pelo colesterol, aumenta a espessura da membrana na fase líquida e origina uma diminuição na difusão translacional dos fosfolípidos da bicamada (Almeida, Vaz et al. 1992; Filippov, Oradd et al. 2003).

Em membranas na fase gel, o colesterol diminui a ordem cristalina ao diminuir a extensão das interações de Van der Waals entre as cadeias acilo, isto porque, como o colesterol é estruturalmente diferente dos fosfolípidos, este vai impedir o empacotamento perfeito entre as cadeias acilo dos fosfolípidos (McMullen, Lewis et al. 2004; Simons and Vaz 2004). A diminuição da extensão das interações de Van der Waals na fase gel origina uma diminuição da espessura da bicamada, isto porque a ordem conformacional com o colesterol diminui (Gennis 1988; Thewalt and Bloom 1992; Ohvo-Rekila, Ramstedt et al. 2002).

Com o aumento da concentração de colesterol nas membranas, as fases  $L_{\beta}$  e  $L_{\alpha}$  são convertidas numa única fase, designada de fase líquido ordenado,  $L_o$  (Ipsen, Karlstrom et al. 1987). Esta fase,  $L_o$ , é caracterizada por ter propriedades intermédias entre a fase gel e a fase líquida (McMullen, Lewis et al. 2004).

Na figura 10 está representado o diagrama de fase para a mistura binária do DPPC:Col.



**Figura 10:** Diagrama de fases de uma mistura binária DPPC:Col. As várias fases estão identificadas como *so* (sólido ordenado), *ld* (líquido desordenado) e *lo* (líquido ordenado). Adaptado de (Ipsen, Mouritsen et al. 1990).

Com o aumento da fração molar de colesterol em função da temperatura, em bicamadas compostas por DPPC:Col, são visíveis regiões com coexistências



de fases. Acima da temperatura de transição do DPPC (41.5°C), ocorre coexistência de fases ld-lo até uma fracção molar de colesterol de  $\approx 0.4$  mol %. Acima da fracção molar de 0.4 mol %, independentemente da temperatura, a bicamada encontra-se numa única fase, a fase líquido ordenado, deixando de haver transição e coexistência de fases.

Para além da variação nas conformações *trans/gauche* dos grupos acilo, já referida, a mudança de fases na membrana, por alteração da temperatura ou pela presença de colesterol origina alterações nas propriedades interfaciais, e consequentemente nas suas propriedades electrostáticas.

#### **2.4. Propriedades electrostáticas da membrana**

As propriedades electrostáticas de uma membrana podem ser descritas através da contribuição de três componentes: o potencial transmembranar, o potencial de superfície e o potencial dipolar (Wang 2012).

O potencial transmembranar é definido como a diferença de potencial eléctrico entre os dois meios aquosos que a membrana separa. A diferença de potencial resulta da permeação de alguns iões ser mais fácil em relação à permeação dos contra-íões, que demoram mais tempo a permear a membrana, criando uma diferença entre cargas nos dois lados da membrana (Vaz 2008).

O potencial de superfície, resulta da existência de lípidos na bicamada que têm regiões polares com carga global não nula. A monocamada que está em contacto com o citoplasma tem na sua composição  $\approx 10$  % de fosfatidilserina e fosfatidilinositol, que são carregados negativamente (Kiessling, Wan et al. 2009), o que faz com que a densidade de carga à superfície da monocamada do citoplasma seja negativa. Estas cargas negativas à superfície da monocamada vão ser parcialmente neutralizadas por contra-íões que se encontram no meio aquoso do citoplasma.

O potencial de superfície, que depende da densidade de carga à superfície da membrana e da concentração de iões em solução aquosa, pode ser descrito pela teoria de Gouy-Chapman (Gennis 1988).

O potencial dipolar é originado pela orientação dos dipolos dos lípidos e das moléculas de água, sendo positivo no centro da bicamada e negativo na

superfície (Simon and McIntosh 1989; Brockman 1994). Foi determinado que o potencial dipolar afecta a passagem de iões e a inserção de proteínas nas membranas (Flewelling and Hubbell 1986) e está dependente do grau de saturação, do tamanho e do tipo de ligações, éster ou éter, das cadeias acilo e das regiões polares dos lípidos (Gawrisch, Ruston et al. 1992).

Em membranas compostas por PC, o potencial dipolar tem origem nos oxigénios dos grupos carbonilo, nos grupos metilo terminais das cadeias acilo e nas moléculas de água que interagem com as regiões polares dos lípidos na superfície da membrana (Franklin and Cafiso 1993). O valor experimental do potencial dipolar em monocamadas compostas por PC está compreendido entre 400-500 mV (Disalvo, Lairion et al. 2008), enquanto que os valores das bicamadas, também compostas por PC, estão compreendidos entre os 220-240 mV (Peterson, Mannock et al. 2002).

Um ião polar, em solução aquosa, tem uma determinada energia de hidratação, isto porque, interage electrostaticamente com as moléculas de água, que formam à sua volta uma esfera de hidratação. A interacção deste ião com a bicamada lipídica e a sua passagem de um meio para o outro pode ocorrer de diferentes formas. Factores como a perda da energia de hidratação (no caso de um ião polar), a barreira de energia associada à passagem do ião polar no centro da bicamada, a interacção de um ião apolar com a interface polar e o tamanho do ião tornam o processo de permeação desfavorável (Flewelling and Hubbell 1986; Gennis 1988).

## **2.5. Bicamadas como barreiras semi-permeáveis**

O transporte de solutos através de uma bicamada lipídica é de extrema relevância na homeostase celular. A sua importância não se resume apenas à biologia celular, mas também à medicina ou à indústria farmacêutica uma vez que, a biodisponibilidade dos fármacos depende directamente da sua permeação através das barreiras biológicas. A permeabilidade é assim uma propriedade fundamental das membranas, permitindo a troca selectiva de substâncias entre os dois meios aquosos que separa (Gennis 1988).

Em 1890, Charles Ernest Overton observou que a permeação de pequenas moléculas, com peso molecular compreendido entre 50 e 300 g/mol, através da membrana está correlacionada com a sua capacidade de particionar de uma solução aquosa para o solvente hexadecano ou óleo. Meyer fez uma observação semelhante e esta é referida como a regra de Meyer-Overton (Walter and Gutknecht 1986; Missner and Pohl 2009). Esta observação indica que a capacidade de um soluto passar através da membrana relaciona-se com a sua natureza química, isto é, a sua passagem pela membrana é resultado da sua solubilidade na mesma, sendo que quanto mais solúvel é o soluto na membrana, maior é a sua permeabilidade. Este trabalho foi ainda fundamental na compreensão das propriedades das membranas indicando a existência de uma região apolar.

A permeação de solutos pequenos e neutros através de uma bicamada pode de facto ser descrita recorrendo ao mecanismo de partição-difusão (Volkov, Paula et al. 1997). Um soluto, para atravessar a membrana, tem três passos fundamentais:

1. Particionar do meio aquoso para a bicamada, superando qualquer resistência da interface;
2. Difundir através do núcleo hidrofóbico;
3. Particionar da membrana para o meio aquoso, novamente, superando qualquer resistência da interface;

Esta capacidade de permeação do soluto pode ser quantificada através do coeficiente de permeabilidade ( $P$ ) e é dada pela equação 2:

$$P = \frac{K_p D_m}{d} \quad (2)$$

onde  $K_p$  é o coeficiente de partição do soluto a permear entre a membrana e o meio aquoso,  $D_m$  é o coeficiente de difusão do soluto através da membrana e  $d$  é a espessura da bicamada.

No entanto, para as moléculas de água e solutos iónicos foi proposto um outro mecanismo, baseado na formação de poros transientes de moléculas de água (Jansen and Blume 1995).

No mecanismo de poros transientes assume-se que ocorre a formação de poros, formados por moléculas de água ligadas entre si por pontes de hidrogénio, que atravessam perpendicularmente a membrana. O processo de permeação por poros transientes é mais rápido do que o processo partição-difusão para o caso de iões e solutos muito polares, isto porque, através deste mecanismo, a partícula a permear evita a barreira de energia de Born associada ao mecanismo de partição-difusão. A formação destes poros está relacionada com alterações na densidade, na conformação *trans/gauche* e com o perfil eléctrico da membrana (Nichols and Deamer 1980; Jansen and Blume 1995).

Diferentes tipos de solutos podem atravessar a membrana graças à sua natureza heterogénea, o que lhe confere solubilidades diferentes dependendo da zona a considerar. Moléculas polares, apolares e anfifílicas podem atravessar a bicamada pelos dois mecanismos descritos em cima, sendo que as propriedades da membrana afectam o tipo de mecanismo de permeação do soluto.

A passagem de solutos de acordo com o mecanismo de partição-difusão ou com o mecanismo de poros transientes está relacionada com a espessura da bicamada. A permeação do ião  $K^+$  na bicamada ocorre através do mecanismo de poros transientes para cadeias acilo inferiores a 16 carbonos, sendo que para cadeias superiores a 18 carbonos, o mecanismo de permeação passa a ser o de partição-difusão (Paula, Volkov et al. 1996; Paula, Volkov et al. 1998). Para os iões  $Cl^-$ ,  $Br^-$  e  $I^-$ , o mecanismo de partição-difusão é o que melhor descreve a sua permeação através da bicamada, sendo que esta diminui com o aumento da espessura da bicamada e com aumento do tamanho do ião ( $\approx 10^9$  cm/s para o ião  $Cl^-$  numa bicamada de PC:Col) (Paula, Volkov et al. 1998). Para os protões, a alteração entre o mecanismo de poros transientes e difusão ocorre para cadeias superiores a 22 carbonos. Moléculas polares pequenas, como a água, glicerol, a ureia e moléculas neutras, atravessam a membrana através do mecanismo de partição-difusão independentemente da espessura da bicamada (Paula, Volkov et al. 1996).

As membranas biológicas são estruturas heterogéneas no que diz respeito à organização lipídica.

## 2.6. Assimetria dos lípidos nas membranas

A distribuição dos diferentes tipos de lípidos nas monocamadas interna e externa é assimétrica e pode ser mantida por sistemas dependentes de ATP (Op den Kamp 1979).

Nas membranas plasmáticas dos eritrócitos, a monocamada que está em contacto com o meio exterior é composta maioritariamente por fosfatidilcolina e esfingomiéline enquanto que a membrana interna, que está em contacto com o citoplasma, é composta por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (Gennis 1988; Quinn 2002). A presença de lípidos com regiões polares como a fosfatidilserina na monocamada interna, que está em contacto com o citoplasma, mantém a membrana electricamente polarizada (Devaux 1991).

A distribuição de colesterol na membrana é também feita de forma assimétrica, sendo que nos eritrócitos, o colesterol é localizado em maior concentração na monocamada interna (Schroeder, Nemezc et al. 1991).

A assimetria dos lípidos nas membranas leva a que estas estruturas apresentem diferentes propriedades nas diferentes monocamadas. Os estudos destas propriedades que as membranas apresentam são importantes para entender todos os processos que nelas ocorrem. Neste trabalho em particular, o estudo das propriedades da membrana em líquido ordenado é importante para entender uma membrana específica, a membrana da barreira hemato-encefálica (BHE).

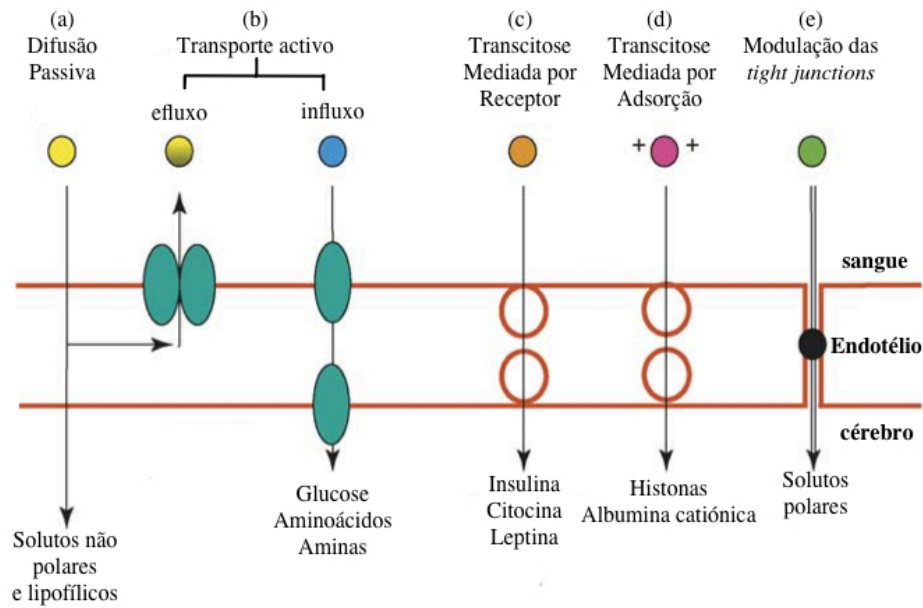
### 3. Barreira hemato-encefálica

Os neurónios que constituem o Sistema Nervoso Central (SNC) comunicam usando sinais eléctricos e químicos, por isso, o controlo das substâncias neste micro ambiente é crítico para o correcto funcionamento da sua comunicação (Cardoso, Brites et al. 2010).

A barreira hemato-encefálica (BHE), formada por células especializadas do endotélio, é uma barreira selectiva que impede a livre passagem de grande parte das substâncias que circulam na corrente sanguínea para o SNC, sendo só permeável de forma passiva a substâncias muito pequenas e apolares, como por exemplo o O<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub>, gases que conseguem difundir livremente através da BHE (Abbott 2004; Abbott, Patabendige et al. 2010).

A monocamada externa da membrana das células endoteliais, tal como a monocamada externa dos eritrócitos, é constituída maioritariamente por esfingomiéline, fosfatidilcolina e colesterol. Esta composição lipídica induz a membrana numa fase líquido ordenado, o que origina uma baixa permeabilidade às diferentes substâncias, por isso, a BHE apresenta um enorme desafio no desenvolvimento de fármacos necessários ao tratamento de várias doenças neurológicas, como Acidente vascular cerebral (AVC), doença de Alzheimer e doença de Parkinson, doenças que comprometem o correcto funcionamento do SNC (Abbott, Ronnback et al. 2006).

A permeação de diferentes substâncias através da BHE (figura 11) pode ocorrer por difusão passiva (figura 11 a), através da interacção das substâncias com a membrana, por difusão activa (figura 11 b), com a ajuda de transportadores específicos associados à membrana, e por transcitose mediada por receptor (figura 11 c) e por adsorção (figura 11 d). Para além da difusão das substâncias pela membrana, estas também podem difundir pelos espaços intracelulares (figura 11 d). No entanto, na BHE estes espaços entre as células do endotélio estão selados por *tight junctions* (Abbott 2004; Wong, Wu et al. 2012).



**Figura 11:** Imagem esquemática da Barreira hemato-encefálica e dos trajectos que as diferentes substâncias podem ter para atravessar esta barreira. As substâncias essenciais para o correcto funcionamento do SNC atravessam a BHE utilizando vários tipos de transporte, como transporte activo, transporte mediado, ou outros sistemas mais complexos como a transcitose (Abbott 2004).

A difusão passiva (figura 11 a), é um processo que depende da estrutura e propriedades da membrana e das propriedades químicas da substância a permear. Substâncias que sejam solúveis em lípidos (lipofílicas) conseguem difundir através da BHE e entrar no cérebro passivamente.

O estudo de diferentes anfífilas fluorescentes, como modelos de fármacos que permeiam uma membrana com características semelhantes à BHE, pode levar a uma melhor compreensão do transporte passivo de substâncias para o SNC (Abbott, Ronnback et al. 2006).

#### 4. Objectivo deste estudo

O processo de permeação de fármacos através da BHE ocorre maioritariamente por difusão passiva e o conhecimento deste processo é importante no *design* de fármacos que tenham um maior efeito e sejam menos tóxicos para as células (Habgood, Begley et al. 2000)

As membranas biológicas são estruturas dinâmicas heterogéneas e o conhecimento das suas propriedades físico-químicas é essencial para o controlo da permeação dos fármacos.

Ao longo de vários anos, o nosso grupo de investigação tem vindo a realizar um estudo quantitativo da cinética e termodinâmica da interacção de diferentes moléculas anfifílicas com bicamadas lipídicas em diferentes fases (Estronca, Moreno et al. 2002; Abreu, Moreno et al. 2004; Moreno, Estronca et al. 2006; Estronca, Moreno et al. 2007; Cardoso, Filipe et al. 2010; Cardoso, Martins et al. 2011).

Muitos dos fármacos não são fluorescentes, o que torna o estudo da sua permeação algo complexo. Para ultrapassar esta dificuldade têm sido utilizadas diferentes moléculas anfifílicas fluorescentes, com grupos polares e apolares distintos, podendo deste modo ser seguida a sua permeação através da membrana.

Neste trabalho é feita uma caracterização quantitativa dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a interacção de séries homólogas de anfifílas fluorescentes com bicamadas em diferentes fases. Pretende-se ainda modelar a permeação das diferentes anfifílas fluorescentes através da BHE e, assim, comparar com fármacos que tenham propriedades semelhantes. O objectivo é identificar regras que permitam prever a velocidade de permeação passiva de uma determinada molécula com base na sua estrutura química e nas propriedades físico-químicas da barreira membranar.

Para entender como ocorre o processo de permeação da anfifíla fluorescente numa membrana, é necessário estudar as três constantes de velocidade dos três passos da passagem do soluto através da membrana.



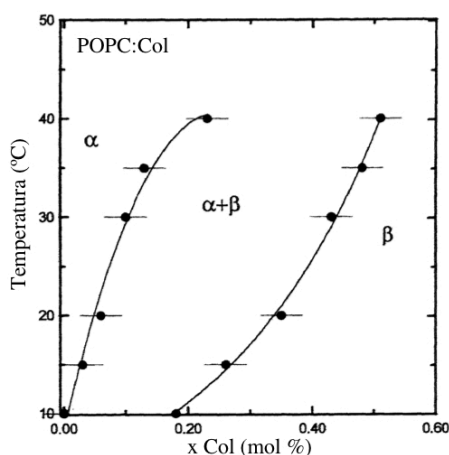
1. Inserção da anfifíla fluorescente na bicamada ( $k_+$ );
2. Translocação de uma monocamada para a outra monocamada ( $k_f$ );
3. Desorção a anfifíla fluorescente da bicamada ( $k$ );

Nesta tese de mestrado foi feito o estudo fotoquímico, cinético e termodinâmico da interacção da série homóloga de uma anfifíla fluorescente com bicamadas na fase ordenada composta pela mistura binária de *1-palmitoil-2-oleoil-sn-glycero-3-fosfatidilocolina* (POPC) com o colesterol (Col).

O POPC é um glicerofosfolípido com uma região polar composta por uma fosfatidilcolina, figura 1 (pág. 2), e com uma região apolar composta por uma cadeia saturada e outra cadeia monoinsaturada (no carbono 9) de 16 e 18 carbonos, respectivamente.

Como foi referido, a monocamada exterior da membrana das células endoteliais encontra-se na fase líquido ordenado. Como esta monocamada é a primeira barreira que um soluto tem que ultrapassar de modo a entrar na célula e passar para o cérebro, é importante caracterizar, através dos diferentes estudos, interacção de anfifílas fluorescente com a membrana nesta fase.

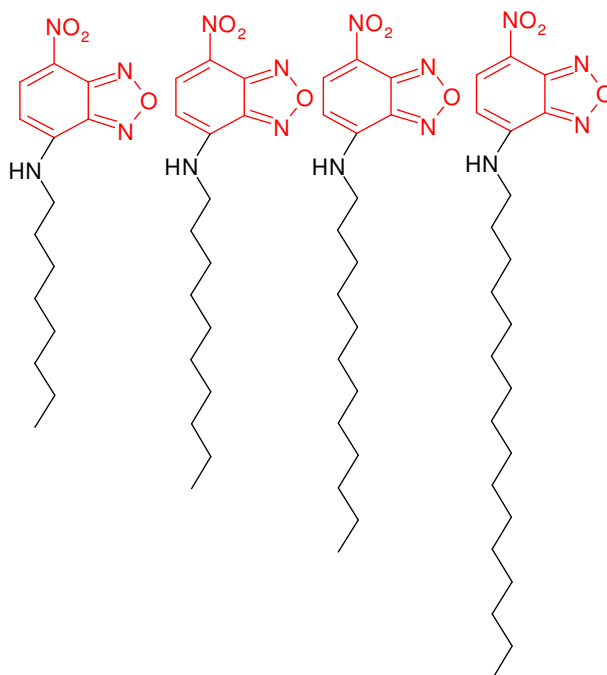
A mistura binária de POPC com colesterol, dependendo da fracção molar de colesterol, pode-se encontrar em diferentes fases (figura 12). Com base no diagrama de fase do POPC:Col obtido por Mateo et al. verifica-se que para um valor de fracção molar de colesterol acima de 0.5 mol %, a 25°C, a bicamada encontra-se na fase líquido ordenado (Mateo, Acuna et al. 1995), por isso, a proporção de POPC:Col usada neste estudo é de 1:1.



**Figura 12:** Diagrama de fases do POPC:Col. Adaptado de (Mateo, Acuna et al. 1995).

A anfífila fluorescente utilizada neste estudo é composta por uma região polar fluorescente, o NBD, ligada a uma única cadeia hidrocarbonada com 8, 10, 12, 14 e 16 carbonos.

O NBD (figura 13) é uma sonda fluorescente utilizada no estudo das propriedades das membranas, devido ao facto da sua fluorescência depender da polaridade do meio em que está inserida (Chattopadhyay and London 1988; Chattopadhyay 1990).



**Figura 13:** Estrutura química das anfífilas NBD-C<sub>8</sub>, NBD-C<sub>10</sub>, NBD-C<sub>12</sub> e NBD-C<sub>16</sub>, compostas pelo fluoróforo NBD (a vermelho) ligado a uma cadeia hidrocarbonada compreendida entre 8 e 16 carbonos.

Para atingir os objectivos deste trabalho, começou-se por estudar as propriedades fotofísicas da série homóloga do NBD inserida na bicamada de POPC:Col (1:1). O estudo fotofísico está dividido em três importantes parâmetros:

1. Rendimento quântico de fluorescência;
2. Anisotropia e tempos de vida de fluorescência;
3. Constante de ionização;

Através destes três parâmetros é possível estimar a posição das sondas, com diferentes regiões apolares, na membrana. Esta propriedade mostrou-se de grande importância na interpretação dos parâmetros para a interacção desta série

homóloga com bicamadas compostas unicamente por POPC (Cardoso, Filipe et al. 2010; Cardoso, Martins et al. 2011).

Realizado o estudo fotofísico, passou-se ao estudo da velocidade da translocação da série homóloga do NBD nas membranas de POPC:Col (1:1). Através deste estudo podemos determinar a velocidade de permeação de uma monocamada para a outra e, deste processo, determinar os parâmetros termodinâmicos para a série homóloga do NBD na bicamada e na fase líquido ordenado.

O estudo da cinética de inserção e desorção da sonda na membrana, bem como da respectiva partição entre a fase aquosa e a fase membranar, não foi possível devido à sua complexidade. Foi observado que a partição entre a fase aquosa e as bicamadas de POPC:Col (1:1) é muito pouco favorável para o caso das anfifílas de cadeia acilo mais curta. Por outro lado, as anfifílas com uma cadeia acilo mais longa não são suficientemente solúveis em solução aquosa para permitir a caracterização da partição entre a fase aquosa e a membrana (Cardoso, Filipe et al. 2010).



# **Parte II**

## ***Material e Métodos***



## 1. Material

### 1.1. Reagentes

- Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich, lote no. 14798MJ);
- Ácido Perclórico (70%) (Sigma-Aldrich, lote no. BCBD6143);
- Ácido Acético Glacial (Panreac, lote no. 0000212445);
- Anidrido Acético (Panreac, lote no. 0000239970);
- Azida de Sódio (Fluka, lote no. 419515/1);
- Clorofórmio (99.8%) (Sigma-Aldrich, lote no. 0155-9KC);
- Cloreto de Sódio (ABSOLVE, lote no. 11214);
- Ditionito de Sódio (Sigma-Aldrich, lote no. S17218-135);
- EDTA (GPR, lote no. 28021);
- HEPES (Sigma-Aldrich, lote no. 058K5411);
- Hidróxido de Sódio (Baker Analised, lote no. 9601550002);
- Isopropanol (Panreac, lote no. 50361KBT);
- Metanol (99.9%) (Sigma, lote no. 21109P03);
- Molibdato de Amônio (Sigma, lote no. 76H3669);
- Sulfato de Sódio Anidro (Sigma-Aldrich, lote no. S23360-334);
- Trizma Base (Sigma-Aldrich, lote no.66H5711);
- POPC (Avanti, lote no.160-181PC-181);
- Colesterol (Avanti, lote no. CH-57);

### 1.2. Equipamento

- Espectrofotômetro UV/VIS Spectronic Unicam UV500;
- Espectrômetro de Fluorescência Varian Cary Eclipse;
- Medidor de pH Jenway 3510;
- Extrusor Lipex Biomembranes;
- Fluorímetro Stopped Flow termostatizado Hi-Tech;

## 2. Métodos

### 2.1. Preparação dos LUVs com sonda

A solução final de POPC:Col (1:1) foi preparada a partir da mistura de volumes, previamente calculados, de duas soluções stock de POPC e de Colesterol. As soluções stock foram elaboradas através da dissolução de uma quantidade de POPC e Colesterol numa mistura azeotrópica de Clorofórmio e Metanol (87:13% (v/v)). O volume pretendido do stock de sonda em metanol foi adicionado à mistura final de POPC:Col. A concentração do stock da sonda a adicionar foi determinada recorrendo ao seu espectro de absorção, considerando o  $\epsilon=21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

A mistura final do lípido com sonda foi agitada num vortex e posteriormente foi aguardado  $\approx 45$  min para que esta atingisse o equilíbrio. Passado este tempo evaporou-se, cuidadosamente, o solvente aquecendo o tubo ao mesmo tempo que se colocava um fluxo contínuo de azoto no seu interior. O filme formado foi colocado num exsiccador, sob vácuo, por um período entre 6-12 horas. No final da secagem o filme foi hidratado, com uma solução temporizada (0.01 M HEPES, 0.02% (m/m) Azida de Sódio, 0.15 M Cloreto de Sódio, 0.001 M EDTA, pH 7.4) previamente aquecida a 55°C, com o volume calculado para obter a concentração final de lípido e sonda desejada. A suspensão do lípido e sonda foi produzida através de vários ciclos incubação (55°C) e agitação durante 30 min a 1 h.

Após observar que todo o filme se encontrava em suspensão, procedeu-se à sua extrusão, a 55°C, passando a solução dispersante 15 vezes no extrusor Lipex Biomembranes, com dois filtros de policarbonato com poros de 0.1  $\mu\text{m}$ . Como durante a extrusão, a amostra é sujeita a pressões relativamente elevadas ( $\approx 15$  psi), a solução foi posteriormente equilibrada por um período mínimo de 8 h, durante o qual foi submetida a ciclos de aquecimento e arrefecimento da temperatura, entre 55°C e 25°C.



## **2.2. Análise da concentração dos lípidos nos LUVs**

A quantificação do lípido é uma parte de extrema importância uma vez que, durante a extrusão a 55°C, algum do lípido pode ser perdido, alterando assim a concentração final da amostra. A amostra sendo constituída por dois tipos de lípidos completamente distintos, há a necessidade de quantificar de forma separada o POPC e o Colesterol.

A concentração de POPC nos LUVs foi determinada usando uma versão modificada do ensaio de Bartlett (Bartlett 1959), ao passo que, a concentração de colesterol em solução foi determinada usando o método de Lieberman-Burchard (Taylor, Broccoli et al. 1978).

### **2.2.1. Determinação da concentração de fosfatos nos LUVs**

A quantificação do POPC baseia-se na análise do fosfato em solução, que é reduzido a fosfomolibdênio formando um complexo corado que absorve no comprimento de onda de 700 nm.

Para obter a recta de calibração, pipetou-se, em duplicado, os volumes 0, 100, 150, 200, 250 e 300 µL de uma solução stock de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM. Para a análise das amostras, foram preparados triplicados, que eram diluídos, de modo a que a sua concentração final se encontrasse no meio da recta de calibração. O volume de cada tubo foi ajustado até 300 µL com água desionizada. Com uma pipeta de vidro, foi adicionado a cada tubo, 700 µL de Ácido Perclórico a 70% (v/v).

As soluções foram cobertas com berlindes e aquecidas em banho seco a 190°C durante 1h e 30 min. Após um arrefecimento lento até à temperatura ambiente, adicionou-se 2 ml de molibdato de amónio 1% (m/v) e 2 ml de ácido ascórbico 4% (m/v). As soluções finais foram incubadas a 37°C durante 1h e 30 min. Posteriormente, a absorvância das soluções foi medida ao comprimento de onda de 700 nm.

### **2.2.2. Determinação da concentração de Colesterol nos LUVs**

Para a determinação da concentração de colesterol em solução preparou-se uma solução, conhecida por reagente de Lieberman-Burchard, de ácido acético, anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 35:55:10% (v/v),

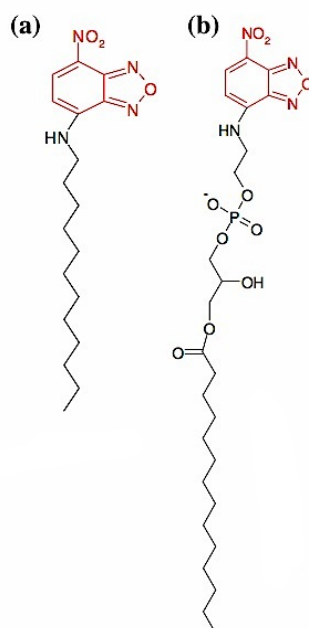
respectivamente, à qual se adicionou 1% (m/v) de sulfato de sódio anidro, mantendo-se sempre a solução em gelo. Para obter a recta de calibração, pipetou-se, em duplicado, 0, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{L}$  de uma solução stock de colesterol 2 mM em álcool isopropílico.

As amostras, preparadas em triplicado, foram diluídas de modo a que a sua concentração final se encontrasse no meio da recta de titulação. O volume foi ajustado em cada tubo até 100  $\mu\text{L}$  com álcool isopropílico. Adicionou-se 3 mL da solução de reagente de Lieberman-Burchard e incubou-se a 37°C durante 20 min.

A quantificação do colesterol foi baseada na análise do grupo hidroxilo do colesterol que ao reagir com um reagente de Lieberman-Burchard aumenta a conjugação da insaturação do anel condensado adjacente, originando uma solução com cor verde, que absorve no comprimento de onda de 625 nm (Taylor, Broccoli et al. 1978).

### **2.3. Estimativa da constante de equilíbrio das anfífilas entre a fase aquosa e os LUVs ( $K_L$ )**

A constante de equilíbrio  $K_L$ , que corresponde à constante de ligação entre a sonda e a membrana, da série homóloga do NBD- $C_n$  ( $n=8-16$ ) em bicamadas de POPC:Col (1:1) foi estimada através da análise e comparação dos resultados, previamente obtidos, para a sonda NBD-*liso-1-miristoil-fosfatidiletanolamina* (NBD-LysoMPE) em bicamadas de POPC e POPC:Col (1:1) (Sampaio, Moreno et al. 2005). O NBD-LysoMPE (figura 14 b) é uma molécula anfifíla, semelhante ao NBD-DMPE, composta apenas por uma única cadeia acilo. O NBD- $C_{12}$  (figura 14 a) é constituído por uma cadeia hidrocarbonada de 12 carbonos ligada ao grupo NBD. A diferença entre o NBD-LysoMPE e o NBD- $C_{12}$  está na composição da região polar.



**Figura 14:** Estruturas de duas anfifílas fluorescentes: (a) Estrutura do NBD-C<sub>12</sub>; (b) Estrutura do NBD-LysoMPE; Na figura, a vermelho, está representado o grupo fluorescente NBD.

Na tabela 1 encontram-se os valores do  $K_L$  para o NBD-LysoMPE a 25°C.

**Tabela 1:** Valores da constante de equilíbrio,  $K_L$ , para o NBD-LysoMPE a 25°C.

NBD-LysoMPE	POPC <sup>(a)</sup>	POPC:Col (1:1) <sup>(a)</sup>
$K_L$ (M <sup>-1</sup> )	$1.3 \times 10^9$	$6.1 \times 10^8$

(a) Dados obtidos de (Sampaio, Moreno et al. 2005).

Da análise da tabela 1 verifica-se que a diferença entre os valores do  $K_L$  para o NBD-LysoMPE em bicamadas de POPC e POPC:Col (1:1) é aproximadamente meia ordem de grandeza menor, respectivamente. Desta diferença, entre os valores do  $K_L$  do NBD-LysoMPE para os dois sistemas, estimámos os valores do  $K_L$  para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) atendendo aos valores obtidos, para o  $K_L$  da mesma série em bicamadas de POPC, por Cardoso et al. (Cardoso, Filipe et al. 2010).

Tendo em conta que o NBD-LysoMPE é estruturalmente diferente do NBD-C<sub>n</sub>, para os valores do  $K_L$  da série homóloga fluorescente em bicamadas de POPC:Col (1:1), foi feita uma aproximação de uma ordem de grandeza menor relativamente ao  $K_L$  obtido para a mesma série em bicamadas de POPC.

Na tabela 2 estão os valores obtidos do  $K_L$  para a série homóloga do NBD- $C_n$  por Cardoso et al. em bicamadas de POPC e os valores estimados para a mesma série, em bicamadas de POPC:Col (1:1).

**Tabela 2:** Valores do  $K_L$  para a série homóloga do NBD- $C_n$  ( $n=8-16$ ) obtidos em bicamadas de POPC e os valores estimados da mesma série para bicamadas de POPC:Col (1:1).

$K_L$ ( $M^{-1}$ )	POPC <sup>(a)</sup>	POPC:Col (1:1) <sup>(b)</sup>
NBD- $C_8$	$1.93 \times 10^9$	$1.9 \times 10^8$
NBD- $C_{10}$	$1.37 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^9$
NBD- $C_{12}$	$9.52 \times 10^{10}$	$9.5 \times 10^9$
NBD- $C_{14}$	$6.50 \times 10^{11}$	$6.5 \times 10^{10}$
NBD- $C_{16}$	$4.61 \times 10^{12}$	$4.6 \times 10^{11}$

(a) dados obtidos de (Cardoso, Filipe et al. 2010);

(b) valores estimados assumindo um  $K_L$  10 vezes menor;

#### 2.4. Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência é definido como a razão entre o número de fótons absorvidos e o número de fótons emitidos. Pode também ser definido como a razão entre a velocidade da transição que origina fluorescência e a soma das velocidades de todas as outras formas de desactivação (equação 3).

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (3)$$

O valor do rendimento quântico de uma espécie fluorescente depende da existência de processos adicionais de desactivação. Este parâmetro depende do ambiente em que a anfifila fluorescente está envolvida.

O rendimento quântico absoluto da série homóloga de aminas gordas NBD- $C_n$  inseridas em bicamadas de POPC:Col (1:1), foi calculado recorrendo à equação 4 e considerando  $\Phi_R = 0.4$ , para o NBD-DMPE em POPC (Brown, Brennan et al. 1994),

$$\Phi_F = \Phi_R \frac{I_{Abs} n}{I_R Abs_R n_R} \quad (4)$$

onde  $n$  e  $n_R$  correspondem ao índice de refração do solvente em que o composto e a referência estão dissolvidos,  $I$  e  $Abs$  correspondem à área da intensidade de fluorescência e ao valor da absorvância do composto no máximo de absorção da

referência, respectivamente, e  $I_R$  e  $Abs_R$  correspondem à área da intensidade de fluorescência e ao valor máximo da absorvância da referência.  $\Phi_R$  corresponde ao valor do rendimento quântico da referência (Lakowicz 1999). No cálculo do rendimento quântico absoluto foi considerado  $n/n_R \approx 1$ .

Para este estudo utilizaram-se LUVs de POPC:Col (1:1) com uma concentração de 0.5 mM, preparados de acordo com o procedimento descrito na secção 2.1 de material e métodos, com a diferença no passo de hidratação, no qual o filme lipídico foi hidratado com uma solução não tamponizada (0.02% Azida de Sódio, 0.15 M Cloreto de Sódio, 0.001 M EDTA), de modo a obter uma concentração final de sonda de 1.25  $\mu$ M.

A razão molar sonda/lípido utilizada neste estudo foi determinada tendo em conta três aspectos fundamentais, a solubilidade de sonda em água (de modo a não exceder o valor da CAC), a razão sinal/ruído e a dispersão de luz (a ser inferior a 0.1).

Para o cálculo da concentração da sonda em meio aquoso, recorreu-se à equação 5, onde se calculou, com base no  $K_L$ , a concentração de sonda na membrana,  $[AL_V^\infty]$  (Abreu, Moreno et al. 2004),

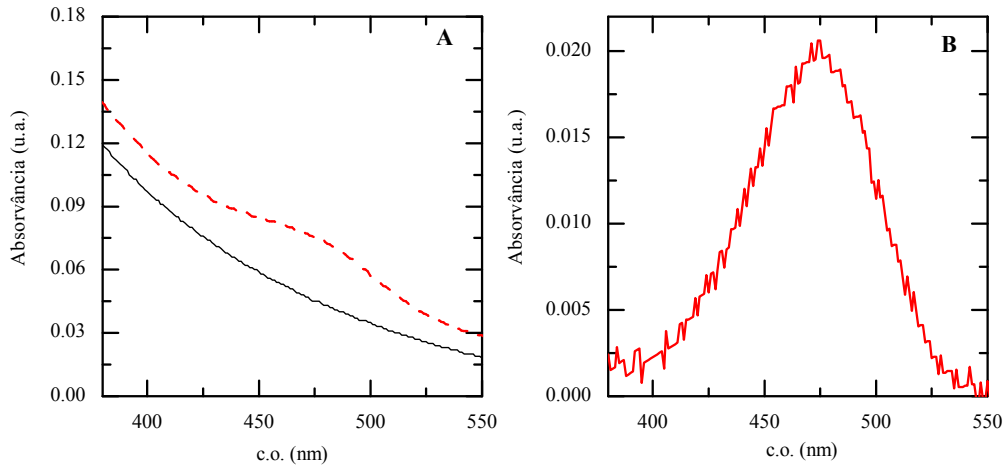
$$[AL_V^\infty] = \frac{2K_L[L_V][A_T]}{1+2K_L[L_V]} \quad (5)$$

onde  $[L_V]$  corresponde à concentração de LUVs usada, 0.5 mM (0.25 mM de POPC e 0.25 mM de Colesterol),  $[A_T]$  corresponde à concentração total de sonda utilizada, 1.25  $\mu$ M e  $K_L$ , corresponde à constante de ligação, estimada para o POPC:Col (1:1), valores apresentados na tabela 2.

Pre vemos assim, para as diferentes sonda utilizadas, uma percentagem na membrana de 66% para o NBD-C<sub>8</sub>, 93% para o NBD-C<sub>10</sub>, 99% para o NBD-C<sub>12</sub>, 100% para o NBD-C<sub>14</sub>, 100% para o NBD-C<sub>16</sub>. Destes valores obtidos para a sonda na membrana, calculámos a percentagem de sonda na água e verificamos para o NBD-C<sub>8</sub> e NBD-C<sub>10</sub>, cuja percentagem na membrana é < 95%, que a concentração em água é menor que a CAC. Para as restantes sondas, verificou-se que a concentração em água era ligeiramente superior à CAC.

Os espectros de absorção foram obtidos para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1). Na figura 15 A está representado um espectro de

absorção típico do NBD-C<sub>16</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) sem subtracção da dispersão.



**Figura 15:** Espectros de Absorção; **Painel A:** Espectro de absorção do POPC:Col (1:1) (—) e espectro de absorção típico do NBD-C<sub>16</sub> em POPC:Col (1:1) (---) sem tratamento. **Painel B:** Espectro de absorção típico do NBD-C<sub>16</sub> em POPC:Col (1:1) (—) após subtracção da dispersão dos LUVs.

Na figura 15 A pode-se observar que o espectro de absorção obtido, que contém a absorção da sonda perto dos 475 nm, é afectado pela dispersão do lípido. Para obter o espectro de absorção do NBD-C<sub>16</sub> foi necessário retirar a dispersão do lípido do espectro da figura 15 A. Para isso, fez-se um tratamento dos dados através de um ajuste entre a equação 6 e a equação 7, sendo que, o espectro obtido deste tratamento está representado na figura 15 B. Da equação 6 obteve-se o valor da absorvância da sonda, através da multiplicação do espectro do NBD-C<sub>16</sub> em POPC:Col (1:1), ao qual foi subtraído um factor,  $f_1$ , pelo espectro do branco subtraído por uma constante,  $cst$ .

$$A = (\lambda_{NBD-C_n}^{POPC:Col} - f_1) \times (\lambda_{POPC:Col} - cst) \quad (6)$$

Como durante a extrusão ocorre a perda de sonda, torna-se necessário proceder a um ajuste, através da equação 7, de modo a minimizar a diferença entre os valores do espectro obtido para a sonda sem dispersão da equação 6 e do espectro da sonda em metanol.

$$A = (\lambda_{NBD}^{MeOH} - f_2) \quad (7)$$

Na equação 7 é subtraído um outro factor,  $f_2$ , ao espectro de absorção da sonda em metanol.

O ajuste foi realizado com auxílio da ferramenta *solver* do *excel*<sup>®</sup> através da alteração dos parâmetros,  $f_1$ ,  $f_2$  e  $cst$ .

O estudo da fluorescência na determinação do rendimento quântico para a série homóloga do NBD- $C_n$  em POPC:Col (1:1) foi realizado e, para os espectros de fluorescência obtidos, foi também necessário proceder a um ajuste, feito através da equação 8,

$$IF = IF_{NBD-C_n}^{POPC:Col} - (IF_{POPC:Col} \times f_1) \quad (8)$$

onde foi subtraído o espectro de fluorescência do POPC:Col (1:1), nas mesmas condições experimentais, multiplicado pelo factor,  $f_1$ , obtido do ajuste da absorção. A multiplicação pelo factor  $f_1$  é necessária na fluorescência, para complementar com a variação do ajuste feito ao espectro de absorção. Este factor deve-se ao facto de que a concentração final de lípido não é exactamente igual nas soluções de LUVs com e sem sonda e também à possibilidade de ligeiras diferenças no tamanho dos lipossomas que conduzem a diferentes intensidades de dispersão da luz incidente.

Ao espectro de fluorescência obtido do ajuste foi feita a integração entre 485 nm e 700 nm e, o valor obtido, foi dividido pelo valor obtido da integração do espectro de fluorescência da referência nas mesmas condições experimentais.

## 2.5. Determinação da Constante de Ionização

A constante de ionização do grupo amino da série homóloga do NBD- $C_n$  em LUVs de POPC:Col (1:1) foi obtida com uma concentração total de lípido igual a 0.5 mM, numa proporção sonda/lípido de 1:400.

O filme de lípido com sonda foi hidratado com uma solução aquosa não tamponizada (0.02% (m/m) Azida de Sódio, 0.15 M Cloreto de Sódio, 0.001 M EDTA) com o pH controlado a valores  $\approx 7.1$ . Na titulação, o pH foi modificado para valores mais alcalinos através de adições precisas de NaOH entre 1 e 10  $\mu$ L, de acordo com a concentração do stock de NaOH utilizada (para aumentar a precisão das adições, prepararam-se dois stocks de NaOH, 0.1 e 1 mM, respectivamente). Após a adição de NaOH à cuvete contendo a solução, esta foi agitada recorrendo a um magneto, por um período de cerca de 3 min, até o valor do pH estabilizar, ao qual se seguia a obtenção do espectro de fluorescência. Para

uma leitura precisa e fidedigna do pH final da solução, este foi, cuidadosamente, medido repetidamente antes e após a obtenção do espectro de fluorescência. Quando os valores de pH não eram coincidentes, considerava-se o valor médio.

## 2.6. Determinação da Anisotropia de Fluorescência

Quando a luz de excitação incide numa molécula, a sua transição para o estado excitado pode ser descrita pela interação de um componente eléctrico da luz incidente com o momento dipolar de transição da molécula (Lakowicz 1999).

No estudo da anisotropia de fluorescência, a luz de excitação é polarizada segundo dois eixos, um horizontal ( $I_{VH}$ ) e um vertical ( $I_{VV}$ ). A luz de excitação polarizada segundo estes eixos origina uma distribuição anisotrópica das moléculas excitadas, isto é, moléculas que têm um momento dipolar de transição paralelo à polarização da luz incidente são excitadas, enquanto que as que têm um momento dipolar perpendicular à polarização da luz incidente não são excitadas.

O estado excitado a partir do qual ocorre a emissão de fluorescência pode ser distinto daquele originado por absorção da radiação sendo que, neste caso, o momento dipolar da transição para o estado fundamental pode ter uma orientação distinta da do momento dipolar da transição ocorrida aquando da excitação. Para além disso, no estado excitado, as moléculas podem rodar originando um momento dipolar de emissão diferente do inicial. Esta rotação está dependente do coeficiente de difusão rotacional do fluoróforo, sendo que este depende da viscosidade do ambiente, do tamanho e da estrutura do fluoróforo.

Caso o momento dipolar de emissão seja o mesmo que o momento dipolar de excitação, o que significa que o fluoróforo não sofreu alteração na sua orientação antes de emitir radiação, a anisotropia de emissão de fluorescência ( $r$ ), dada pela equação 9, é igual a 0.4.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (9)$$

Se o momento dipolar de emissão for o diferente do momento dipolar de excitação, significa que o fluoróforo sofreu alteração na sua orientação (ou no estado excitado) antes de emitir radiação. O aumento na velocidade de difusão



rotacional do fluoróforo tem como consequência uma anisotropia que tende para 0 (Lakowicz 1999).

Na equação 9, além dos eixos em que a luz pode ser polarizada, horizontal ( $I_{VH}$ ) e vertical ( $I_{VV}$ ), é ainda necessário considerar outro parâmetro, o factor geométrico também designado por factor  $G$ . O factor  $G$  é um factor instrumental que corresponde à sensibilidade relativa do equipamento à luz polarizada vertical ou à luz polarizada horizontalmente. Este factor é usado para corrigir  $I_{VH}$  no cálculo da anisotropia.

A anisotropia de fluorescência foi calculada para a série homóloga do NBD- $C_n$  ( $n=8-16$ ) em bicamadas de POPC:Col (1:1) 0.5 mM, com uma razão sonda/lípido 1:400. As soluções foram preparadas numa solução aquosa não tamponizada (0.02% Azida de Sódio, 0.15 M Cloreto de Sódio, 0.001 M EDTA) com o valor do pH controlado a valores  $\approx 7.1$ .

O factor  $G$  foi determinado no aparelho de fluorescência, através da utilização de um padrão fluorescente não dispersante. O padrão usado na medição foi NBD- $C_n$ , com a mesma concentração usada nos LUVs, em metanol.

## 2.7. Determinação dos Tempos de Vida de Fluorescência

O tempo de vida de fluorescência é definido como o tempo médio da molécula no estado excitado, antes do processo de relaxamento, e é dado pela equação 10,

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (10)$$

onde  $k_r$  e  $k_{nr}$  corresponde à constante radiativa e à constante não radiativa, respectivamente.

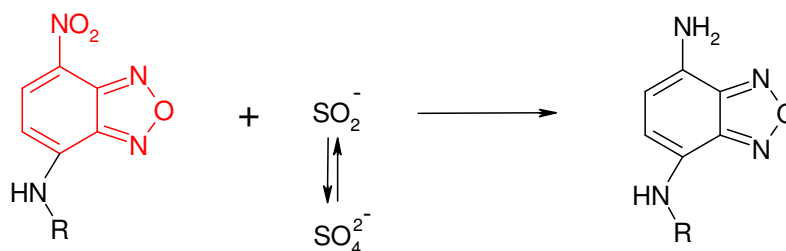
O tempo de vida médio foi calculado segundo a equação 11, sendo pesado pela intensidade de fluorescência devido a cada um dos componentes.

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^n a_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n a_i \tau_i} \quad (11)$$

As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 2.1 do material e métodos, tendo sido usada uma concentração de lípido POPC:Col (1:1) de 1 mM e uma razão sonda/lípido de 1:200.

## 2.8. Determinação da Velocidade de Translocação

O processo de translocação entre monocamadas lipídicas é um passo essencial na determinação da sua permeação através de uma bicamada (Moreno, Estronca et al. 2006). Para obter a constante de velocidade,  $k_f$ , deste processo, foi usado um método baseado na extinção de fluorescência do grupo NBD resultante da redução irreversível do seu grupo nitro pelo ditionito, como é demonstrado na figura 16 (McIntyre and Sleight 1991).



**Figura 16:** Esquema da reacção do ditionito com o grupo nitro do NBD.

O ditionito foi inicialmente dissolvido num volume de solução Trizma–Base 1 M a pH 10, de modo a obter uma concentração final de 1 M.

Aos LUVs de POPC:Col (1:1) e NBD-C<sub>n</sub> preparados de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 2.1 do material e métodos, com uma razão sonda/lípido 1:1000, foi adicionado um volume da solução stock 1 M de ditionito de forma a obter uma concentração final na mistura com os LUVs de 20 mM. A emissão de fluorescência das soluções foi seguida através do equipamento de *stop-flow* com um comprimento de onda de excitação de 475 nm e um filtro *cutoff* a 530 nm na emissão.

# Parte III

## *Resultados e Discussão*



## 1. Caracterização fotofísica do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1)

As bicamadas lipídicas são estruturas que não possuem locais de ligação definidos, por isso, a posição destas moléculas relativamente à normal da bicamada é um dos parâmetros relevantes na caracterização das propriedades físicas da membrana.

Neste capítulo apresentamos os resultados e a discussão das diferentes propriedades fotofísicas medidas para a série homóloga NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1).

### 1.1. Rendimento Quântico de Fluorescência

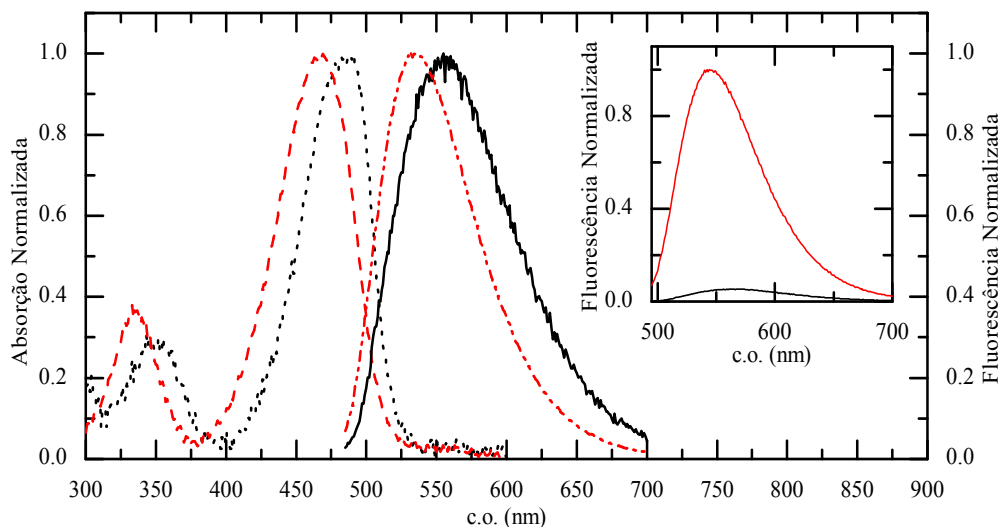
O NBD é um grupo fluorescente, que devido ao facto da sua fluorescência apresentar uma acentuada dependência com a polaridade do meio, tem vindo a ser utilizado no estudo de diferentes propriedades das membranas biológicas, como a fluidez, a dinâmica e a permeabilidade (Arvinte, Cudd et al. 1986; Chattopadhyay 1990; Almeida, Vaz et al. 1992; Mazères, Schram et al. 1996; Cardoso, Filipe et al. 2010).

Quando localizado em ambientes polares, o grupo NBD exhibe, tanto no seu espectro de absorção como no de fluorescência, um desvio para comprimentos de onda maiores, ao passo que, em ambientes apolares, o grupo NBD exhibe um desvio para comprimentos de onda mais baixos (Chattopadhyay 1990; Lin and Struve 1991).

Na figura 17 estão representados os espectros de absorção e fluorescência a 25°C do NBD diluído em metanol e água, dois solventes com diferentes polaridades, sendo a água o mais polar.

Os espectros de absorção mostram duas bandas a comprimentos de onda diferentes. A primeira banda, a comprimentos de onda na ordem dos 350 nm para o NBD-C<sub>8</sub> em água, corresponde a uma transição  $\pi$ - $\pi^*$  enquanto que a segunda banda, a comprimentos de onda na ordem dos 475 nm, corresponde ao máximo de absorção do grupo NBD. Esta última banda é referente à transferência de carga, em que o grupo amino do NBD serve como dador de electrões enquanto que o

grupo nitro serve como receptor dos electrões (Feryforques, Fayet et al. 1993). É visível que ambas as banda de absorção, da transição  $\pi-\pi^*$  e da transferência de carga do NBD- $C_8$  em metanol, sofrem um ligeiro desvio para comprimentos de onda menores com a diminuição da polaridade do solvente.



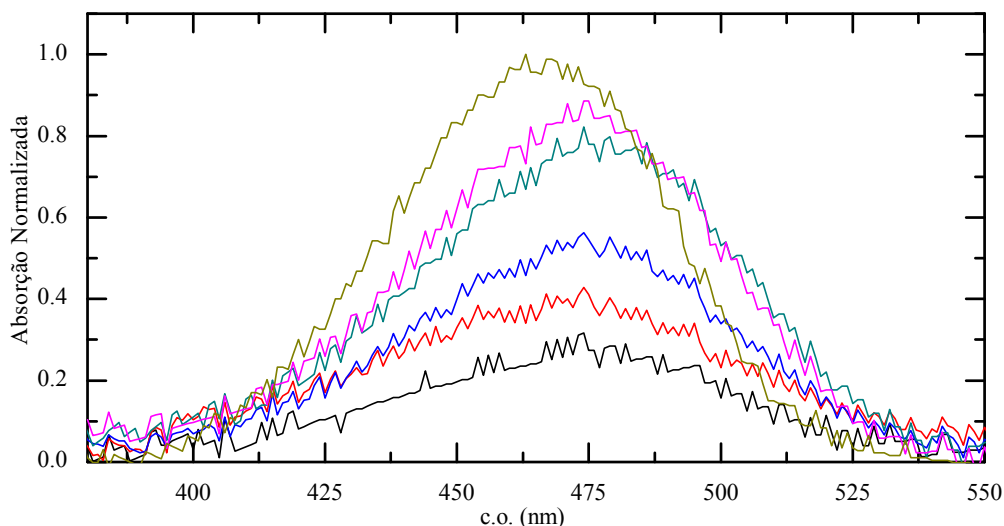
**Figura 17:** Espectros de absorção e fluorescência, a  $\lambda_{exc}=475$  nm, normalizados do NBD- $C_8$  diluído em metanol (vermelho) e água (negro). Estão representados os espectros de absorção do NBD- $C_8$  em metanol (---) e em água (••••) e os espectros de fluorescência do NBD- $C_8$  em metanol (-•-) e em água (—). *Inset* são apresentados os gráficos de fluorescência do NBD- $C_8$  em água e metanol normalizados relativamente ao solvente em que a sonda é mais fluorescente, o metanol.

Nos espectros de fluorescência do NBD- $C_8$  diluído em água é visível um desvio do máximo de emissão para comprimentos de onda maiores devido ao aumento da polaridade. Ao contrário da absorção, o espectro de fluorescência é caracterizado por uma única banda, com um máximo de emissão em metanol nos 530 nm, que com o aumento da polaridade do solvente sofre um desvio no máximo de emissão para valores de comprimento de onda maiores. Em *inset*, figura 17, estão representados os espectros de fluorescência do NBD- $C_8$  em água e metanol normalizados em relação ao solvente em que o NBD- $C_8$  apresenta maior intensidade de fluorescência, o metanol. Com o aumento da polaridade do solvente, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência, isto é, em solventes apolares a intensidade de fluorescência do grupo é maior do que em solventes polares. Esta propriedade é importante para interpretar a posição do grupo NBD nas membranas.

O rendimento quântico de fluorescência foi obtido a 25°C para a série homóloga do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) e o seu valor absoluto foi

calculado, através da equação 4, relativamente à referência, NBD-DMPE em POPC.

Na figura 18 estão representados os espectros de absorção típicos obtidos após o ajuste com as equações 6 e 7, para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1).

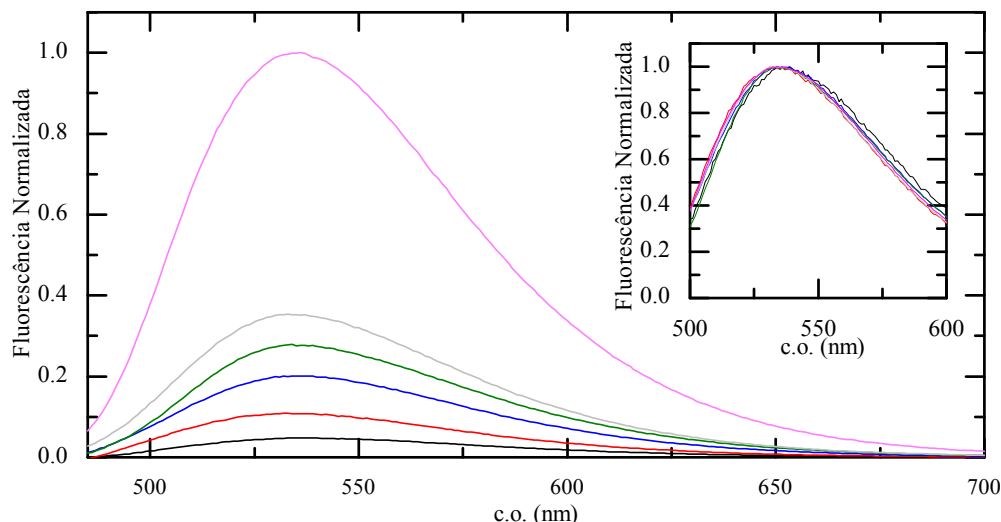


**Figura 18:** Espectros de absorção típicos do NBD-C<sub>8</sub> (—), NBD-C<sub>10</sub> (—), NBD-C<sub>12</sub> (—), NBD-C<sub>14</sub> (—) e NBD-C<sub>16</sub> (—) normalizados relativamente à referência NBD-DMPE em POPC (—), a 25°C.

A diferença nos valores do espectro de absorção observada para as diferentes cadeias carbonadas ligadas ao grupo NBD deve-se ao facto da constante de partição entre a solução aquosa e a membrana POPC:Col (1:1) ser baixa, aumentando com o aumento da cadeia hidrocarbonada. Aquando da preparação das amostras existia assim uma fracção significativa de sonda na fase aquosa, principalmente para as cadeias mais curtas, o que conduziu à diminuição da sua concentração devido a adsorção aos filtros utilizados na extrusão (este efeito foi bastante evidente, ficando os filtros com uma coloração amarelada).

Como o espectro de absorção da referência, NBD-DMPE, tem um  $\lambda_{m\acute{a}x}^{Abs} \approx 460$  nm, para o cálculo do rendimento quântico absoluto foi necessário obter o valor da absorção do NBD-C<sub>n</sub> no máximo de absorção da referência.

Os espectros de fluorescência, complementares dos espectros de absorção representados na figura 18, obtidos após o ajuste pela equação 7, estão representados na figura 19.



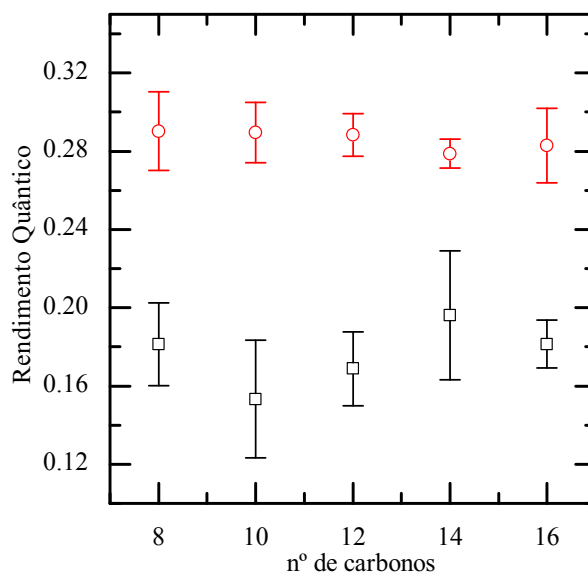
**Figura 19:** Espectros de fluorescência típicos, a  $\lambda_{exc}=460$  nm, do NBD- $C_8$  (—), NBD- $C_{10}$  (—), NBD- $C_{12}$  (—), NBD- $C_{14}$  (—) e NBD- $C_{16}$  (—) normalizados relativamente à referência, o NBD-DMPE em POPC (—), a 25°C. *Inset* está representado o gráfico de fluorescência normalizado das diferentes espécies.

Na figura 19, podemos verificar que o NBD-DMPE em bicamadas de POPC tem uma fluorescência muito maior relativamente à espécie mais fluorescente em bicamadas de POPC:Col (1:1), o NBD- $C_{16}$ . A elevada fluorescência do NBD-DMPE está relacionada com a sua localização nas bicamadas de POPC, indicando um ambiente mais apolar.

Os valores do rendimento quântico absoluto calculados para o NBD- $C_n$  em POPC:Col (1:1), a partir da equação 4, e os valores obtidos por Cardoso et al. para a mesma série homóloga em bicamadas de POPC estão representados na figura 20. É de referir que os valores do rendimento quântico absoluto do NBD- $C_n$  em POPC e POPC:Col (1:1) foram obtidos para a mesma referência, o NBD-DMPE, nas mesmas condições experimentais.

Podemos observar, na figura 20, que dentro do erro os valores do rendimento quântico são semelhantes entre si e, deste modo, não é visível qualquer dependência do rendimento quântico da série homóloga estudada com o tamanho da cadeia hidrocarbonada. O elevado erro obtido na experiência está associado à baixa fluorescência da sonda em POPC:Col (1:1), que faz com que a razão sinal/ruído seja baixa conduzindo a uma incerteza elevada.





**Figura 20:** Valores do rendimento quântico de fluorescência para a série homóloga NBD-C<sub>n</sub> (n=8-16) inserido em bicamadas de POPC:Col (1:1) (□) e POPC (○). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão associado a um mínimo de três experiências.

Comparativamente com os resultados obtidos para o NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC, verificamos que em POPC:Col (1:1) apresenta valores de rendimento quântico absolutos mais baixos. Esta diminuição do rendimento quântico obtido para o NBD-C<sub>n</sub> em POPC:Col (1:1), indica-nos uma alteração da posição da sonda na membrana. Esta alteração da posição da sonda está directamente relacionada com o estado físico da membrana. Como já foi referido anteriormente, é geralmente considerado que o colesterol quando presente na membrana numa determinada concentração, induz a formação da fase líquido ordenado, fase que é caracterizada por uma elevada organização, relativamente à fase líquido desordenado. Esta organização implica que a posição da sonda seja mais à interface da membrana, porque o colesterol, além de promover uma organização das cadeias acilo do POPC, diminui o volume livre entre lípidos. Estudos de simulação por dinâmica molecular efectuados por este grupo de investigação para a série homóloga NBD-C<sub>n</sub> em POPC (Filipe, Moreno et al. 2011) mostraram que o grupo NBD se encontra localizado na região da interface entre as cadeias acilo e a cabeça polar (estabelecendo uma ligação por ponte de hidrogénio entre o grupo amina do NBD e os oxigénio dos grupos éster do POPC). Os resultados obtidos em bicamadas formadas por POPC:Col (1:1) sugerem uma localização mais externa para o grupo NBD, num ambiente mais polar.

Como já foi referido, uma propriedade importante do grupo NBD é a dependência da sua fluorescência com as propriedades do solvente em que este se encontra. Quando o grupo NBD está dissolvido em solventes polares, os dipolos das moléculas do solvente interagem com o dipolo do NBD no estado fundamental apresentando uma distribuição ordenada à sua volta. A diferença de energia do estado fundamental para o estado excitado, provoca uma mudança no momento dipolar do NBD, o que induz um rearranjo nos dipolos das moléculas do solvente. Como a excitação para níveis de energia mais elevados demora menos do que o tempo necessário para as moléculas do solvente se reorientarem, há um atraso entre a excitação e a reorientação das moléculas do solvente em torno do NBD, que tem um momento dipolar maior no estado excitado do que no estado fundamental. Após a excitação do NBD para níveis vibracionais mais elevados, esta energia é rapidamente perdida para as moléculas do solvente, enquanto o NBD relaxa para níveis vibracionais de menor energia. As moléculas do solvente reorientam-se em torno do NBD conduzindo a uma diminuição da sua energia. Devido ao maior momento dipolar do NBD no estado excitado, a estabilização devido à reorientação das moléculas de solvente é maior neste estado do que no estado fundamental, conduzindo a uma diminuição da separação energética entre o estado excitado e o estado fundamental.

O aumento da polaridade do solvente, origina uma maior estabilização do estado excitado que resulta num desvio da emissão de fluorescência para comprimentos de onda maiores, como já foi verificado na figura 17.

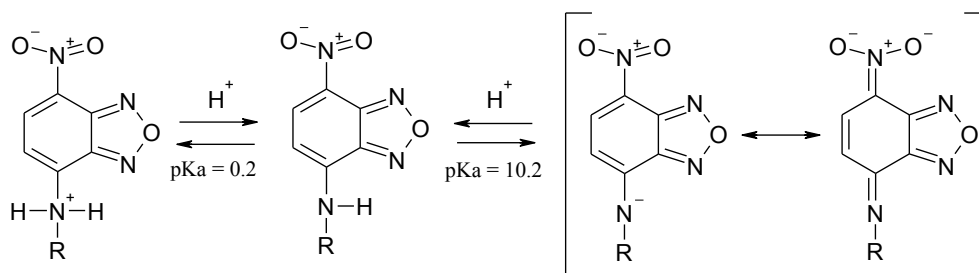
De seguida são apresentados os resultados e a discussão da constante de ionização.

## **1.2. Constante de Ionização**

A determinação da constante de ionização do NBD-C<sub>n</sub> em diferentes solventes (composições lipídicas) pode-nos acrescentar alguma informação relativamente ao ambiente e à posição da anfifíla na bicamada.

O NBD é uma espécie fluorescente que, a pH 7, existe sob a forma neutra (Meyers, Jurss et al. 1983; Chattopadhyay and London 1988). Alterando o pH este pode apresentar duas constantes de ionização. A primeira constante de ionização,

que corresponde á formação da forma protonada do grupo amina do NBD- $C_n$ , ocorre a valores de pH ácidos ( $pK_a \approx 0.2$ ). A segunda constante de ionização, que corresponde á forma desprotonada do grupo amina do NBD- $C_n$ , e ocorre a valores de pH alcalinos ( $pK_a \approx 10.2$ ) (Meyers, Jurss et al. 1983). Na figura 21 estão representados as espécies originadas para as duas constantes de ionização.

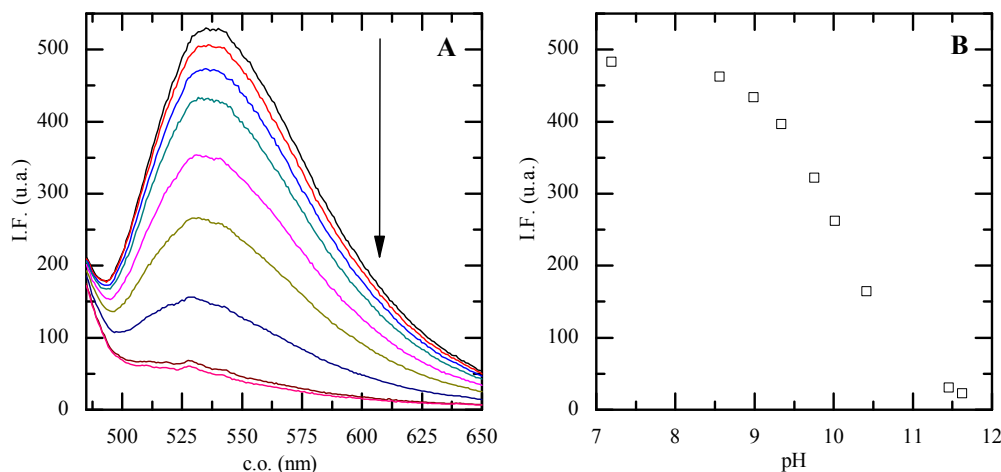


**Figura 21:** Mecanismo de protonação ( $pK_a \approx 0.2$ ) e desprotonação ( $pK_a \approx 10.2$ ) do grupo NBD. Adaptado de (Meyers, Jurss et al. 1983).

Neste trabalho a constante de ionização que ocorre a pH alcalino foi determinada através do decréscimo de fluorescência do fluoróforo NBD, em bicamadas de POPC:Col (1:1), sendo o pH alterado por adição de pequenos volumes de NaOH, figura 22 A.

Foi estudada apenas a constante de ionização que corresponde à desprotonação do grupo amino, uma vez que a pH mais ácidos iria ocorrer simultaneamente a protonação do grupo fosfato do fosfolípido da membrana ( $pK_a \approx 0.8$ ) (Moncelli, Becucci et al. 1994). Deste modo, a alteração da ionização da fosfatidilcolina poderia induzir alterações nas propriedades físico-químicas da bicamada em questão (POPC:Col).

Na figura 22 estão representados os espectros de fluorescência obtidos para uma titulação típica do NBD- $C_{10}$  inserido em bicamadas de POPC:Col (1:1), para os diferentes volumes de hidróxido de sódio adicionado, e a respectiva curva de titulação obtida ao valor máximo de emissão (530 nm).



**Figura 22:** Espectros de fluorescência obtidos para uma titulação típica do NBD-C<sub>10</sub>, a 25°C, inserido em bicamadas de POPC:Col (1:1), a  $\lambda_{exc}=475$  nm. A seta vertical na figura representa o aumento de volume de NaOH.

O mecanismo químico referente ao equilíbrio de ionização, bem como as equações que descrevem a concentração de cada uma das espécies envolvidas estão descritas abaixo, onde AH, A<sup>-</sup> e K<sub>a</sub> representam as espécies protonada, desprotonada e a constante de ionização, respectivamente.



$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \quad (13)$$

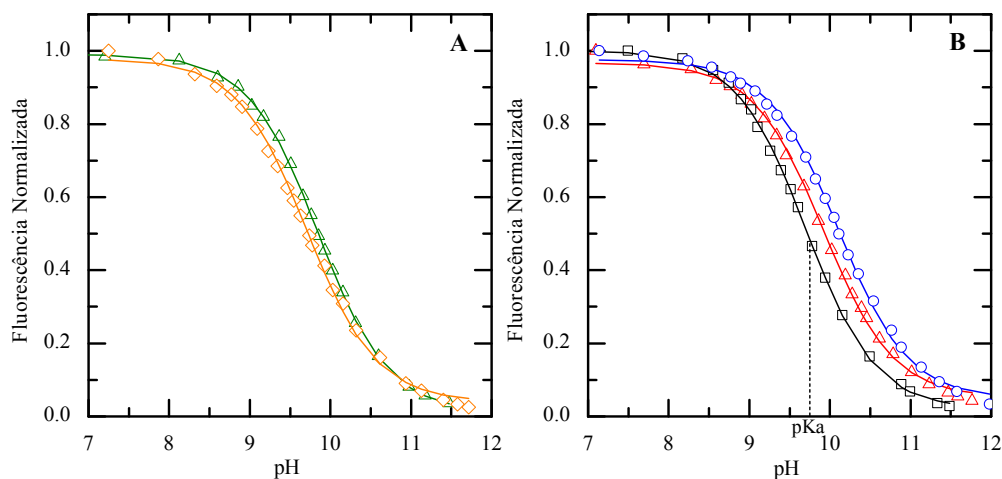
$$AH = \frac{[A_T][H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (14)$$

$$[A_T] = [AH] + [A^-] \quad (15)$$

Através das concentrações de AH e A<sup>-</sup> podemos assim obter a equação 8 que descreve a variação na intensidade de fluorescência em função do pH.

$$IF = \phi_{A^-} [A^-] + \phi_{AH} [AH] \quad (16)$$

O ajuste entre a equação acima e a variação observada para a fluorescência do NBD-C<sub>n</sub> permite obter a constante de ionização (pK<sub>a</sub>) para cada uma das sondas. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 23.



**Figura 23:** Curvas de titulação típicas através da intensidade de fluorescência normalizada para as diferentes sondas na série homóloga NBD- $C_n$ , a 25°C. **Painel A:** NBD- $C_8$  ( $\Delta$ ), ( $pK_a \approx 9.8$ ); NBD- $C_{10}$  ( $\diamond$ ), ( $pK_a \approx 9.7$ ); **Painel B:** NBD- $C_{12}$  ( $\square$ ), ( $pK_a \approx 9.7$ ); NBD- $C_{14}$  ( $\Delta$ ), ( $pK_a \approx 9.9$ ); NBD- $C_{16}$  ( $\circ$ ), ( $pK_a \approx 10.1$ ) e curvas dos respectivos ajustes, segundo a equação 16. A linha a tracejado corresponde ao valor do  $pK_a$  para o NBD- $C_{12}$ .

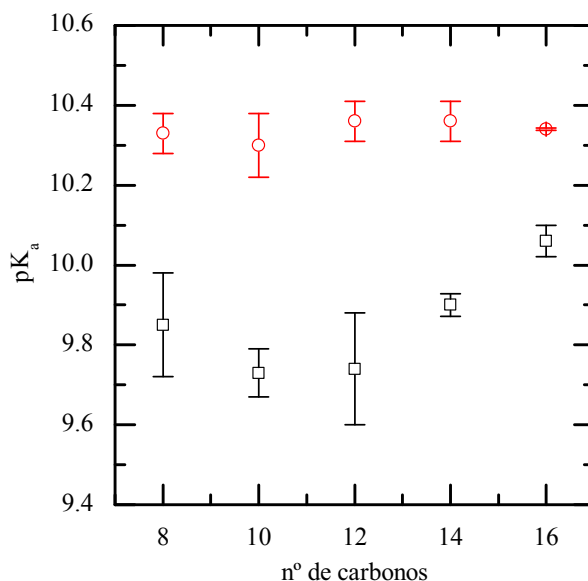
Na figura 23 B verifica-se um desvio para valores de pH maiores, com a alteração do número de carbonos da cadeia acilo do NBD de 12 para 16 carbonos. Tal variação não ocorre na figura 23 A, onde o valor da constante de ionização do NBD- $C_{10}$  é inferior ao valor do NBD- $C_8$ .

Na figura 24 estão representados os valores médios da constante de ionização obtidos para a série homóloga do NBD- $C_n$  inserida em bicamadas de POPC:Col (1:1) e os valores para a mesma série obtidos por Cardoso et al. em bicamadas de POPC.

Os valores da constante de ionização para o NBD- $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$  e  $C_{14}$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) apresentam valores semelhantes, atendendo ao erro associado. O elevado erro experimental associado às sondas NBD- $C_8$ ,  $C_{10}$  e  $C_{12}$  deve-se à razão sinal/ruído, que para estas sondas é pequeno, uma vez que a sua partição para a membrana é baixa. Do NBD- $C_{12}$  ao  $C_{16}$  ocorre um aumento do valor da constante de ionização, sendo que o erro associado para o NBD- $C_{14}$  e  $C_{16}$  é menor, devido à sua partição para a membrana ser elevada.

Comparativamente aos resultados obtidos em bicamadas de POPC, os valores da constante de ionização em POPC:Col (1:1) são significativamente mais baixos para todas as anfífilas da série homóloga NBD- $C_n$ . Esta diminuição do valor da constante de ionização em POPC:Col (1:1), tal como se verificou para o rendimento quântico, está associada à localização do grupo NBD na membrana

que é afectada pelo estado físico em que a membrana se encontra, e que depende da presença de colesterol.



**Figura 24:** Valores da constante de ionização obtidos para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> inserida em bicamadas de POPC:Col (1:1) (□) e de POPC (○). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão obtido para um mínimo de três experiências independentes.

A constante de ionização indicada acima corresponde ao valor de pH em que o grupo NBD perde o protão do grupo NH. Este valor depende maioritariamente de dois factores, do potencial de superfície da membrana e da posição da sonda na bicamada. O potencial de superfície pode afectar o valor do constante de ionização, porque membranas que tenham regiões polares carregadas positivamente ou negativamente vão ter na interface os contra-íões (nomeadamente o H<sup>+</sup>), o que origina uma concentração de H<sup>+</sup> à superfície da membrana diferente da concentração na fase aquosa *bulk* (medida com o eléctrodo de pH) (Tsui, Ojcius et al. 1986). Como no caso do POPC, a região polar é zwitterionica, o valor da constante de ionização não é significativamente afectado.

A posição da sonda na bicamada afecta a sua ionização pois a concentração local de H<sup>+</sup> varia e pode existir estabilização de uma ou outra forma (em bicamadas sem carga a forma neutra é geralmente estabilizada e tanto mais quanto menos polar for o ambiente em torno da sonda). Em bicamadas de POPC, na fase líquido desordenado, a sonda está numa posição mais perto do seu centro apolar, ao passo que em bicamadas de POPC:Col (1:1), na fase líquido ordenando, a bicamada é mais organizada, logo, a posição da sonda é mais longe do centro da

bicamada, localizando-se mais próximo da interface exposta à fase aquosa. Os valores de  $pK_a$  obtidos em POPC:Col (1:1) são assim mais próximos dos valores observados para as sondas na fase aquosa ( $\approx 10$ ) (Chattopadhyay and London 1988; Cardoso, Filipe et al. 2010).

Cardoso et al. verificou que o valor da constante de ionização da série homóloga do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC não variava com o aumento do tamanho da cadeia carbonada. Em bicamadas de POPC:Col (1:1) verificou-se que entre o NBD- $C_{12}$  e o NBD- $C_{16}$  ocorre um aumento significativo ( $\approx 0.3$  unidades de pH) no valor da constante de ionização, sendo que, entre o NBD- $C_{12}$  e o NBD- $C_{14}$ , sejam verificadas semelhanças nos valores, tendo em conta o erro associado ao NBD- $C_{12}$ . A variação de  $\approx 0.3$  unidades de pH verificada entre o NBD- $C_{12}$  e o NBD- $C_{16}$  é semelhante à variação entre o valor obtido para o NBD- $C_6$  ( $pK_a=9.99\pm 0.08$ ) em água e o NBD- $C_6$  em bicamadas de POPC ( $pK_a=10.28\pm 0.06$ ) (Cardoso, Filipe et al. 2010).

Por último, apresentamos os resultados e a discussão para a anisotropia e tempos de vida de fluorescência.

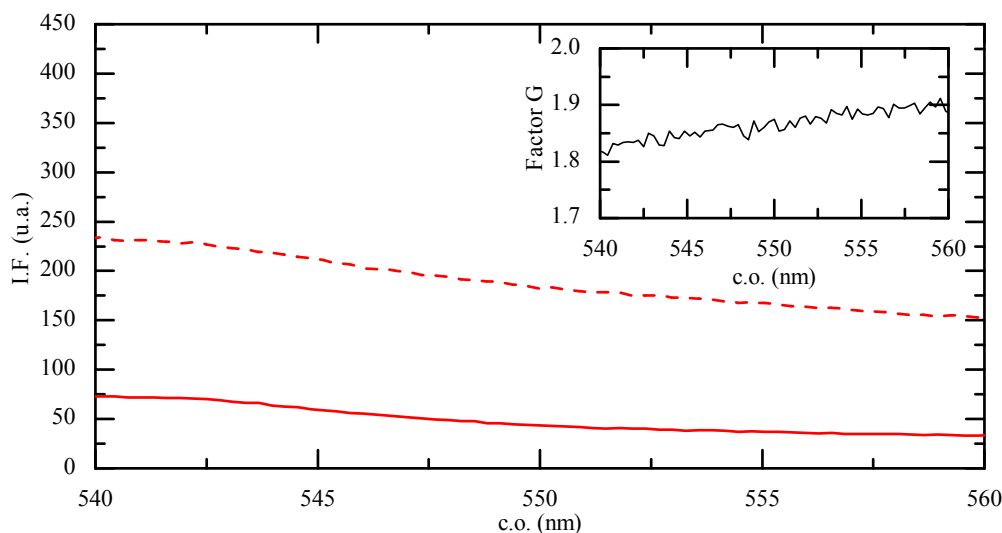
### 1.3. Anisotropia e Tempos de Vida de Fluorescência

A anisotropia e os tempos de vida de fluorescência foram determinados para a série homóloga do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1).

A amostra foi excitada com luz polarizada segundo uma orientação vertical ou horizontal e a intensidade de fluorescência com polarização segundo as duas orientações foi medida. A excitação com luz polarizada horizontalmente deveria conduzir à mesma intensidade de fluorescência quando medida segundo a polarização vertical ou horizontal, as diferenças reflectem sensibilidades distintas do equipamento às duas polarizações e permitem o cálculo do factor G. A intensidade de fluorescência segundo a orientação vertical ou horizontal após excitação com luz polarizada verticalmente ( $I_{VV}$  e  $I_{VH}$  respectivamente) permite calcular a anisotropia de fluorescência, equação 9 (pág. 39).

Na figura 25 está representado um espectro da intensidade de fluorescência segundo a componente vertical ( $I_{VV}$ ) e a componente horizontal ( $I_{VH}$ ), para o NBD- $C_{12}$  entre 540 nm e 560 nm. Foi usada esta gama de comprimentos de onda

entre 540 nm e 560 nm, excluindo o máximo de emissão (530 nm), pois para comprimentos de onda inferiores a 540 nm a intensidade medida é afectada pela dispersão de luz por parte dos lipossomas. Notamos também que, para uma excitação a 475 nm, o pico de Raman da água e dos lípidos situam-se a comprimentos de onda ligeiramente inferiores a 540 nm e este sinal afecta de forma artificial a anisotropia de fluorescência calculada.



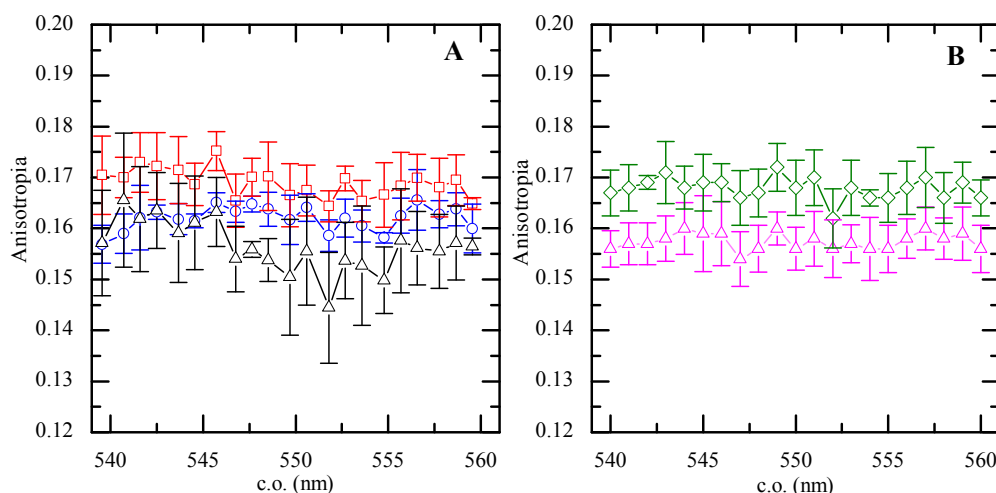
**Figura 25:** Espectros de anisotropia, a  $\lambda_{exc} = 475$  nm, definidos segundo as componentes horizontais,  $I_{VH}$  (—) e verticais  $I_{VV}$  (---) para o NBD- $C_{12}$ , a 25°C, em bicamadas de POPC:Col (1:1). *Inset* está o gráfico do factor  $G$  obtido para a sonda em metanol.

A estas duas componentes, obtidas para a série homóloga do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1), foi necessário subtrair a dispersão do branco, de modo a obter o valor exacto para a sonda em estudo. Um dos aspectos a considerar, é que ao espectro do NBD- $C_n$  em POPC:Col (1:1) foi necessário multiplicar o factor,  $f_1$ , obtido do ajuste da equação 6 (pág. 36) no tratamento do rendimento quântico.

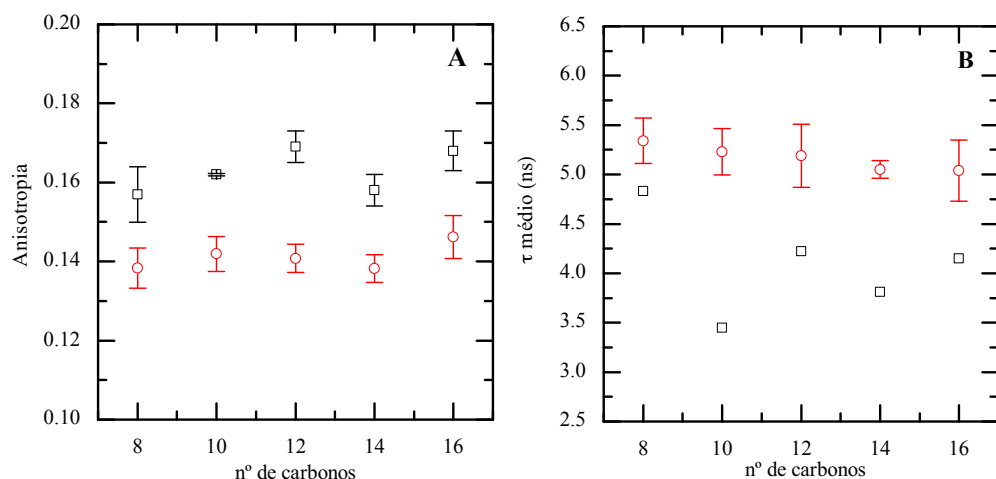
Da equação 9 (pág. 39), recorrendo aos valores obtidos para o  $I_{VV}$ , o  $I_{VH}$  e o factor  $G$ , determinou-se a anisotropia em função do comprimento de onda. Os valores médios para a série homóloga do NBD- $C_n$  inserida em bicamadas de POPC:Col (1:1) estão representados na figura 26.

Observou-se que os valores de anisotropia obtidos entre 540 e 560 nm não apresentam, dentro do erro, qualquer tipo de variação ou tendência permitindo a obtenção de um valor médio, independente do comprimento de onda, cuja dependência com o tamanho de cadeia acilo está representado na figura 27.





**Figura 26:** Espectros da anisotropia de fluorescência, a 25°C, a  $\lambda_{exc}=475$  nm e a  $\lambda_{em}=540-560$  nm. **Painel A:** NBD-C<sub>8</sub> ( $\Delta$ ), NBD-C<sub>10</sub> ( $\circ$ ) e NBD-C<sub>12</sub> ( $\square$ ); **Painel B:** NBD-C<sub>14</sub> ( $\Delta$ ) e NBD-C<sub>16</sub> ( $\diamond$ ). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão associados a um mínimo de três experiências independentes.



**Figura 27:** Valores da anisotropia (**Painel A**) e dos tempos de vida ( $\tau$ ) médio (**Painel B**), a  $\lambda_{exc} = 460$  e  $\lambda_{em} = 530$  nm, de fluorescência da série homóloga NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) ( $\square$ ) e POPC ( $\circ$ ). As barras verticais correspondem ao valor do desvio padrão associado ao mínimo de três experiências.

Para os valores obtidos da anisotropia de fluorescência do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1), figura 27 A, não atendendo ao erro associado, é visível um aumento entre o NBD-C<sub>8</sub> e o NBD-C<sub>12</sub>, sendo que se verificam dois valores mínimos: para o NBD-C<sub>8</sub> e o NBD-C<sub>14</sub>. Dentro do erro associado, verificamos que a anisotropia para o NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) apresenta valores algo semelhantes, não apresentando qualquer tipo de variação com o aumento da cadeia carbonada.

Comparativamente aos valores obtidos para a mesma série homóloga em bicamadas de POPC, os valores obtidos em POPC:Col (1:1) apresentam valores de anisotropia maiores. Duas razões podem levar a uma alteração da anisotropia, a viscosidade do ambiente em que sonda se encontra ou o tempo de vida de fluorescência da sonda na amostra em estudo.

Dados preliminares da medição dos tempos de vida do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1), indicam uma ligeira tendência decrescente, com o aumento da cadeia acilo. Na figura 27 B estão representados os resultados preliminares do tempo de vida médio de fluorescência obtidos para o NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) e os resultados para a mesma série em bicamadas de POPC, obtidos por Cardoso et al (Cardoso, Filipe et al. 2010).

Verifica-se que os tempos de vida médios, tanto o do NBD-C<sub>10</sub> como o do NBD-C<sub>14</sub>, apresentam desvios à tendência decrescente com o aumento da cadeia hidrocarbonada, sendo que o valor é maior para o NBD-C<sub>10</sub>. Estes desvios para estas duas anfifílas, pode estar relacionado com a dispersão. Como os resultados apresentados para o NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) são preliminares, é necessário a realização de replicados para confirmar qualquer semelhança entre os valores obtidos.

Relativamente aos resultados do NBD-C<sub>n</sub> em POPC, em POPC:Col (1:1) o tempo de vida obtido é menor, sendo que, a tendência decrescente com o aumento da cadeia carbonada é semelhante, sendo ligeiramente mais acentuada para o NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1). Cardoso et al. obteve para o NBD-C<sub>6</sub> em solução aquosa um tempo de vida de 0.9 ns. Realizou também o estudo do tempo de vida de fluorescência para o NBD-C<sub>n</sub> (n=8-16) em metanol, tendo obtido 5.2±0.1 ns, independente do tamanho da cadeia acilo. Destes dois resultados, obtidos para solventes com polaridades distintas, podemos referir que a polaridade do solvente implica uma diminuição do tempo de vida de fluorescência. A diferença entre os tempos de vida para o NBD-C<sub>n</sub> em diferentes bicamadas está então relacionada com a localização da sonda, que, como já verificamos dos resultados obtidos para o rendimento quântico e constante de ionização para o POPC:Col (1:1), está num ambiente mais polar, ou seja, na interface lípido/água.

Tendo em conta a diferença de valores verificada para os tempos de vida, estimamos o valor da anisotropia de fluorescência para o NBD-C<sub>16</sub>, com base na equação de Perrin (Lakowicz 1999), equação 17,

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\Phi}} \quad (17)$$

onde  $r$  corresponde à anisotropia,  $r_0$  corresponde ao valor da anisotropia fundamental,  $\tau$  corresponde ao tempo de vida da amostra e  $\Phi$  o tempo de correlação rotacional, calculado através da equação 18,

$$\phi = \frac{\eta V}{RT} \quad (18)$$

considerando a viscosidade,  $\eta$ , igual a  $1.3 \times 10^{-3}$  Pa.s, o volume,  $V$ , igual a  $0.006 \text{ m}^3/\text{mole}$ ,  $R$  igual a  $8.3145$  e  $T$  igual a  $298 \text{ K}$ .

Através do cálculo de  $\Phi$  e considerando  $r_0$  0.4 podemos determinar o valor previsto para a anisotropia do NBD-C16 em POPC e POPC:Col (1:1), 0.148 e 0.167, respectivamente.

Desta estimativa verificamos que a variação da anisotropia calculada pela equação de Perrin para o NBD-C<sub>16</sub> é semelhante à variação verificada para a anisotropia obtida experimentalmente, 0.168 em bicamadas de POPC:Col (1:1) e 0.146 em bicamadas de POPC, e com isso, podemos especular que a diferença da anisotropia entre bicamadas de POPC e POPC:Col (1:1) se deve à diferença verificada nos tempos de vida para o NBD-C<sub>n</sub>.

Tendo em conta que a alteração da anisotropia se deve ao tempo de vida, podemos referir que a viscosidade do ambiente do NBD-C<sub>n</sub> em POPC e POPC:Col (1:1) é muito semelhante.

## 2. Estudo da Velocidade de Translocação do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1)

Neste capítulo apresentamos os resultados e a discussão da determinação da constante de velocidade de translocação e os parâmetros termodinâmicos para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1).

### 2.1. Estado de transição da Translocação

Uma das propriedades fundamentais das membranas biológicas é a sua baixa permeabilidade a moléculas polares e iões. Esta propriedade baseia-se na natureza apolar do centro da bicamada e na organização do empacotamento das cadeias hidrocarbonadas dos lípidos, que depende da presença do colesterol na bicamada. A estrutura rígida do colesterol confere aos lípidos uma organização das suas cadeias hidrocarbonadas, promovendo a formação da fase líquido ordenado, sendo assim de esperar uma menor velocidade de permeação para moléculas polares e iões, relativamente à observada na fase líquido desordenado.

Uma anfifíla em meio aquoso, quando interage com a monocamada externa de uma bicamada lipídica, pode translocar para a monocamada interna da mesma bicamada. O esquema cinético que traduz o processo de translocação da anfifíla de uma monocamada para a outra é dado pela seguinte equação:



onde  $AL_V^{out}$  corresponde à anfifíla na monocamada externa do LUV e  $AL_V^{in}$  corresponde à anfifíla na monocamada interna do LUV. A velocidade de translocação é definida por  $k_f^{out \rightarrow in}$ , que indica a velocidade de translocação da anfifíla da monocamada externa para a monocamada interna, e por  $k_f^{in \rightarrow out}$ , que indica a velocidade de translocação da anfifíla da monocamada interna para a monocamada externa. A razão entre estas duas constantes de velocidade dá-nos a distribuição de anfifíla nas duas monocamadas no equilíbrio, e é representada pela equação:

$$K_f = \frac{k_f^{out \rightarrow in}}{k_f^{in \rightarrow out}} = \frac{AL_V^{in}}{AL_V^{out}} \quad (20)$$

A fluorescência da anfifíla NBD- $C_n$  em ambas as monocamadas dos LUVs de POPC:Col (1:1) foi extinta através da reacção com o ditionito e a velocidade de translocação foi determinada através da diminuição da fluorescência total das anfifílas.

Como a composição química é semelhante em ambas as monocamadas e a curvatura dos LUVs é pequena, podemos então considerar que as constantes de velocidade de translocação nos dois sentidos são iguais,  $k_f^{out \rightarrow in} = k_f^{in \rightarrow out} = k_f$ .

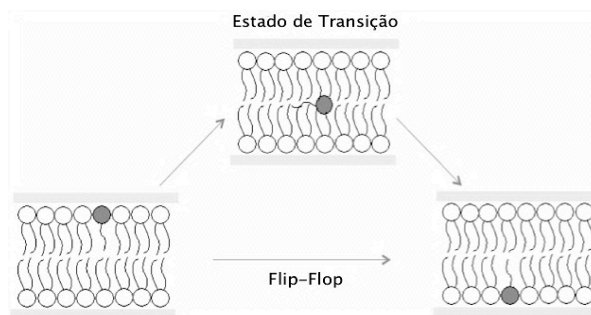
Destas equações, conseguimos obter os parâmetros cinéticos necessários para caracterizar a velocidade de translocação da anfifíla na membrana. Para saber a termodinâmica do processo, foi determinada a velocidade de translocação a diferentes temperaturas, entre 15°C e 55°C.

Os parâmetros termodinâmicos da translocação da série homóloga do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) foram determinados tendo em conta a Teoria do Estado de Transição de Eyring, que envolve o estado de maior energia no processo e é dada pela equação:

$$\ln(k) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) + \frac{\Delta S^{0\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{0\ddagger}}{RT} \quad (21)$$

onde  $k$  é a constante cinética considerada,  $k_B$  representa a constante de Boltzman,  $T$  a temperatura,  $h$  representa a constante de Planck,  $R$  representa a constante de gases ideais,  $\Delta S^{0\ddagger}$  e  $\Delta H^{0\ddagger}$  são a variação de entropia e de entalpia, respectivamente, entre o estado de transição e o estado inicial.

Esta teoria postula que, para uma partícula passar de um estado inicial para um estado final tem que ultrapassar a região de maior energia potencial, chamada de estado de transição (Arnaut, Formosinho et al. 2007). O modelo aceite para o estado de transição no processo de translocação, corresponde ao passo em que a região polar da anfifíla se encontra no centro da bicamada, orientada paralelamente ao seu plano (figura 28).



**Figura 28:** Representação esquemática do passo de translocação de uma anfifila numa bicamada.

Para anfifilas muito polares, o trabalho correspondente a este passo é correlacionado com a energia de Bohr, que corresponde ao trabalho que é necessário realizar para fazer passar a região polar da molécula no centro apolar da bicamada.

Fazendo um gráfico de  $\ln(k_f)$  em função de  $1/T$  podemos obter, através do ajuste da equação na ferramenta *solver* do *excel*<sup>®</sup>, os valores experimentais para o  $\Delta S^{0\ddagger}$  e  $\Delta H^{0\ddagger}$ . A variação da energia livre de Gibbs,  $\Delta G^{0\ddagger}$ , é obtida pela equação:

$$\Delta G^{0\ddagger} = \Delta H^{0\ddagger} - T\Delta S^{0\ddagger} \quad (22)$$

Destas equações obtemos todos os parâmetros termodinâmicos da translocação da anfifila através da bicamada lipídica, que serão de seguida apresentados.

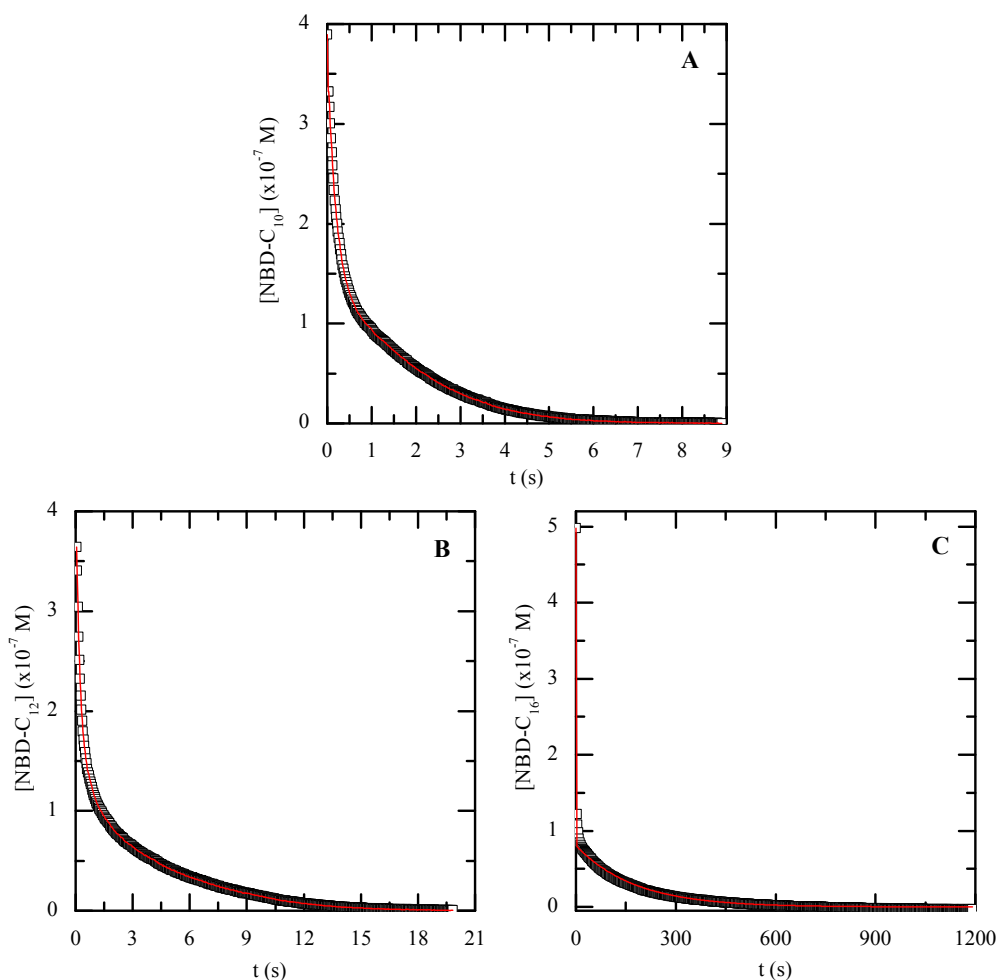
## 2.2. Translocação do NBD- $C_n$ em bicamada de POPC:Col (1:1)

Quando o ditionito é adicionado aos LUVs de POPC:Col (1:1) com NBD- $C_n$ , ocorre uma rápida diminuição da fluorescência, que corresponde à reacção de redução do ditionito com o NBD- $C_n$ , figura 16 (pág. 36), que se encontra em solução aquosa e na monocamada externa. Desta reacção podemos obter a constante cinética,  $k_R$ , que corresponde à constante de velocidade de reacção do ditionito com o NBD- $C_n$ .

Dos valores do  $k_R$  obtidos para o NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) observamos que a velocidade de reacção do ditionito com o NBD não era dependente do tamanho da cadeia. Comparativamente com os resultados do  $k_R$  obtidos para o NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC verificamos que a velocidade de reacção do ditionito com o grupo NBD em POPC:Col (1:1) é superior,  $\approx 1$  ordem de grandeza, para as cadeias mais curtas (NBD- $C_{10}$  e NBD- $C_{12}$ ), sendo que esta

diferença diminui para o NBD- $C_{14}$ , sendo muito semelhante para o NBD- $C_{16}$ . Desta diferença podemos estimar que a posição do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) é mais à interface relativamente à sua posição em bicamadas de POPC.

As anfífilas que inicialmente estão na monocamada interna, são reduzidas mais lentamente, porque têm de translocar para a monocamada externa, para assim, reagirem com o ditonito. O passo de permeação do ditonito para o interior dos LUVs foi estudado por este grupo de investigação (Moreno et al, 2006) e verificou-se que apenas uma quantidade desprezável de ditonito permeia a membrana de POPC:Col (1:1) para o interior dos LUVs durante o tempo das experiências aqui reportadas.



**Figura 29:** Decréscimo da intensidade de fluorescência devido à reacção do ditonito com o NBD- $C_{10}$  (A), NBD- $C_{12}$  (B) e NBD- $C_{16}$  (C) a 25°C. As linhas na figura, a vermelho, representam o melhor ajuste das equações diferenciais obtidas por Moreno et al. 2006, do qual se obteve  $k_f \approx 0.65 \text{ s}^{-1}$  para o NBD- $C_{10}$ ,  $k_f \approx 0.26 \text{ s}^{-1}$  para o NBD- $C_{12}$  e  $k_f \approx 0.0051 \text{ s}^{-1}$ .

O ajuste à curva da concentração de NBD- $C_n$  em função do tempo foi realizado através de uma integração numérica das seguintes equações diferenciais:

$$\frac{d[NBD_0]_{V_T}}{dt} = -k_R^0[NBD_0]_{V_T}[T_0]_{V_0} - k_f\{[NBD_0]_{V_T} - [NBD_i]_{V_T}\} \quad (23)$$

$$\frac{d[NBD_i]_{V_T}}{dt} = -k_R^i[NBD_i]_{V_T}[T_i]_{V_i} + k_f\{[NBD_0]_{V_T} - [NBD_i]_{V_T}\} \quad (24)$$

$$\frac{d[T_0]_{V_T}}{dt} = -k_R^0[NBD_0]_{V_T}[T_0]_{V_0} - P\frac{S_T}{V_0}\{[T_0]_{V_0} - [T_i]_{V_i}\} \quad (25)$$

$$\frac{d[T_i]_{V_i}}{dt} = -k_R^i[NBD_i]_{V_i}[T_i]_{V_i} - P\frac{S_T}{V_i}\{[T_i]_{V_i} - [T_0]_{V_0}\} \quad (26)$$

onde  $T_0$  e  $T_i$  representam a concentração de ditonito no exterior e no interior dos LUVs, respectivamente,  $P$  é o coeficiente de permeabilidade do ditonito,  $V_T$ ,  $V_0$  e  $V_i$  são o volume total, o volume externo e o volume interno dos LUVs, respectivamente,  $S_T$  é a área de superfície total da membrana e  $k_R$  é a constante de velocidade da reacção com o ditonito.

A partir dos resultados da diminuição da concentração de NBD devido à reacção com o ditonito, representados na figura 29, obteve-se as constantes de velocidade de translocação para a série homóloga do NBD- $C_n$  ( $n=10-16$ ).

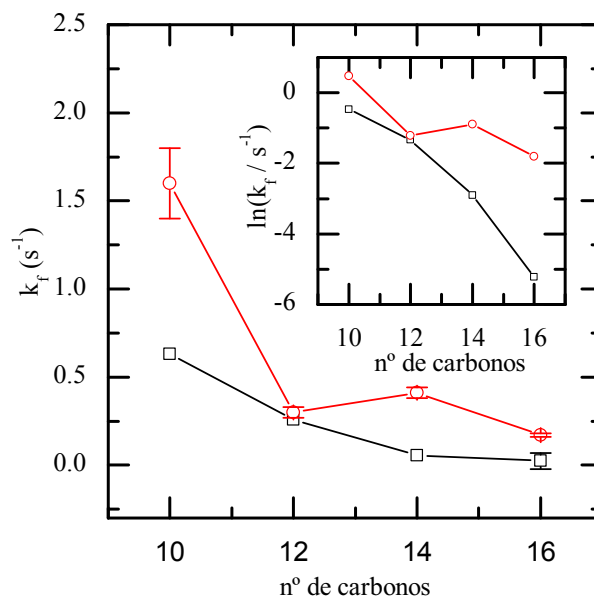
A constante de velocidade de translocação para o NBD- $C_8$  não foi possível medir pois a velocidade de translocação é comparável à velocidade de reacção entre o ditonito e o NBD na monocamada externa dos LUVs ( $> 0.2 \text{ M s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ ), observando-se uma diminuição mono-exponencial da concentração do NBD.

Os resultados obtidos para as constantes de velocidade do NBD- $C_n$  em bicamadas de POPC:Col (1:1) e bicamadas de POPC, a  $25^\circ\text{C}$ , estão representados na figura 30. Em bicamadas de POPC:Col (1:1) observa-se um decréscimo na constante de velocidade da translocação com o aumento da cadeia acilo ( $n$ ) sendo que a diminuição é tanto maior quanto maior o valor de  $n$ . A constante de velocidade de translocação do NBD- $C_{10}$  é aproximadamente uma ordem de grandeza superior à constante de velocidade de translocação do NBD- $C_{16}$ .

É de referir que para as anfifílas NBD- $C_{10}$ ,  $C_{12}$  e  $C_{14}$ , os resultados são ainda preliminares pois foram efectuadas apenas 3 ensaios não independentes (mesma preparação de LUVs) a cada temperatura. Os resultados apresentados para o



NBD-C<sub>16</sub> correspondem a 3 amostras independentes, cada uma caracterizada através de 2 a 4 ensaios.



**Figura 30:** Representação da constante de velocidade de translocação,  $k_t$  em função do número de carbonos da cadeia acilo para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) (□) e em bicamadas de POPC (○), a 25°C. *Inset* está representado o gráfico do logaritmo natural do  $k_t$  em função do número de carbonos.

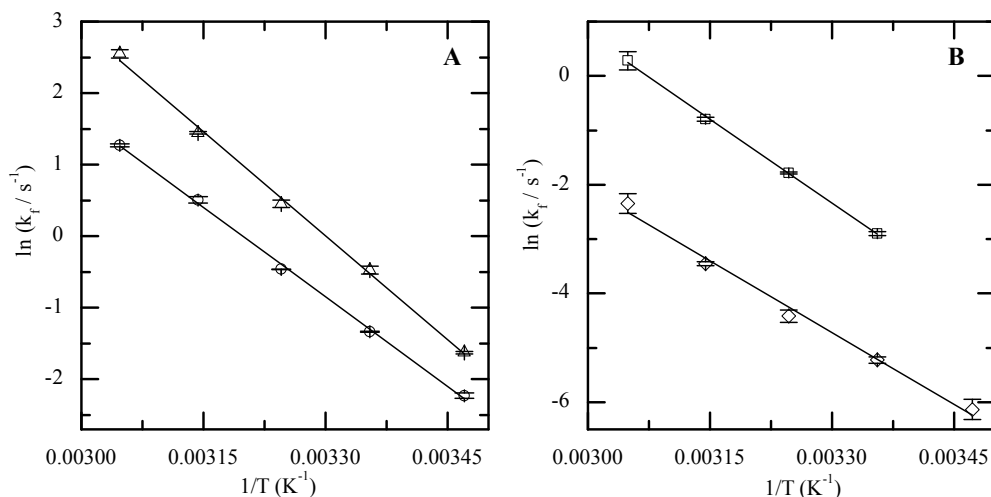
Comparativamente com os valores obtidos para a constante de velocidade da translocação da mesma série homóloga em bicamadas de POPC, observa-se uma menor velocidade de translocação para o NBD-C<sub>10</sub>, C<sub>14</sub> e C<sub>16</sub> em bicamada de POPC:Col (1:1), sendo que, esta diferença é máxima para o NBD-C<sub>16</sub>. Relativamente ao NBD-C<sub>12</sub>, este apresenta uma constante de velocidade de translocação semelhante em bicamadas de POPC e POPC:Col (1:1). Esta semelhança da velocidade de translocação das anfífilas de cadeia mais curta pode estar relacionada com a heterogeneidade lateral da membrana. Segundo os diagramas de fase disponíveis na literatura para misturas de POPC:Col (Mateo, Acuna et al. 1995; de Almeida, Fedorov et al. 2003), é de esperar que na proporção utilizada neste trabalho, (1:1), a bicamada se encontre exclusivamente na fase líquido ordenado. Esta informação tem no entanto sido posta em causa, nomeadamente por este grupo de investigação que propôs a existência de micelas bidimensionais (Estronca, Moreno et al. 2007). A existência na bicamada de regiões enriquecidas em POPC (mais fluidas) ou em colesterol (mais ordenadas) pode conduzir a uma distribuição não homogênea das anfífilas na membrana

sendo de esperar uma maior partição para as regiões ordenadas com o aumento do comprimento da cadeia acilo.

Moreno et al. realizou o estudo da velocidade de translocação com derivados de fosfolípidos marcados com o grupo NBD, o NBD-LysoMPE e o NBD-DMPE, e verificou que a constante de velocidade de translocação era maioritariamente dependente do trabalho necessário para fazer passar a região polar no centro da bicamada, sendo que esta era pouco sensível ao tamanho da região apolar da anfifíla (Moreno et al. 2006). No entanto, o presente estudo da série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC e POPC:Col (1:1), verificou-se que a constante de velocidade de translocação é fortemente dependente do número de carbonos da cadeia acilo e que esta dependência é particularmente acentuada na membrana mais ordenada. Este comportamento distinto está relacionado com o facto do grupo NBD das aminas gordas ser menos polar relativamente à fosfatidiletanolamina marcada com o grupo NBD. A presença do grupo fosfato carregado negativamente torna o processo de translocação tão lento,  $k_f \approx 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , (a energia necessária para colocar o grupo no centro da bicamada é tão grande) que este se torna insensível a pequenas variações na região apolar da anfifíla.

Para as anfifílas atingirem o estado de transição, estas têm de descrever um movimento lateral com uma amplitude angular  $\theta$ . A distância percorrida pela região polar, da interface da bicamada até ao centro da bicamada, assim como o trabalho necessário para a anfifíla realizar este processo, aumenta com o tamanho da cadeia acilo da anfifíla, logo, uma menor velocidade de translocação é esperada para anfifílas com cadeias acilo mais longas. Este facto pode ser visto na figura 31, na qual se verifica que a velocidade de translocação para o NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC:Col (1:1) diminui com o aumento do tamanho da cadeia acilo

A determinação da constante de velocidade de translocação foi realizada a diferentes temperaturas de modo a obter os diferentes parâmetros termodinâmicos correspondentes ao estado de transição e assim observar a sua dependência com o aumento do tamanho da cadeia acilo nas bicamadas de POPC:Col (1:1).



**Figura 31:** Gráficos do tipo Arrhenius do processo de translocação para a série homóloga das aminas gordas; **Painel A:** NBD-C<sub>10</sub> (Δ) e NBD-C<sub>12</sub> (○); **Painel B:** NBD-C<sub>14</sub> (□) e NBD-C<sub>16</sub> (◇). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação dada pela teoria do estado de transição.

Na tabela 3 estão representados os valores da constante de velocidade de translocação e os parâmetros termodinâmicos para a série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> em bicamadas de POPC e POPC:Col (1:1) a 25°C.

**Tabela 3:** Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da translocação da série homóloga do NBD-C<sub>n</sub> através das bicamadas de POPC:Col (1:1) e bicamadas de POPC, a 25°C.

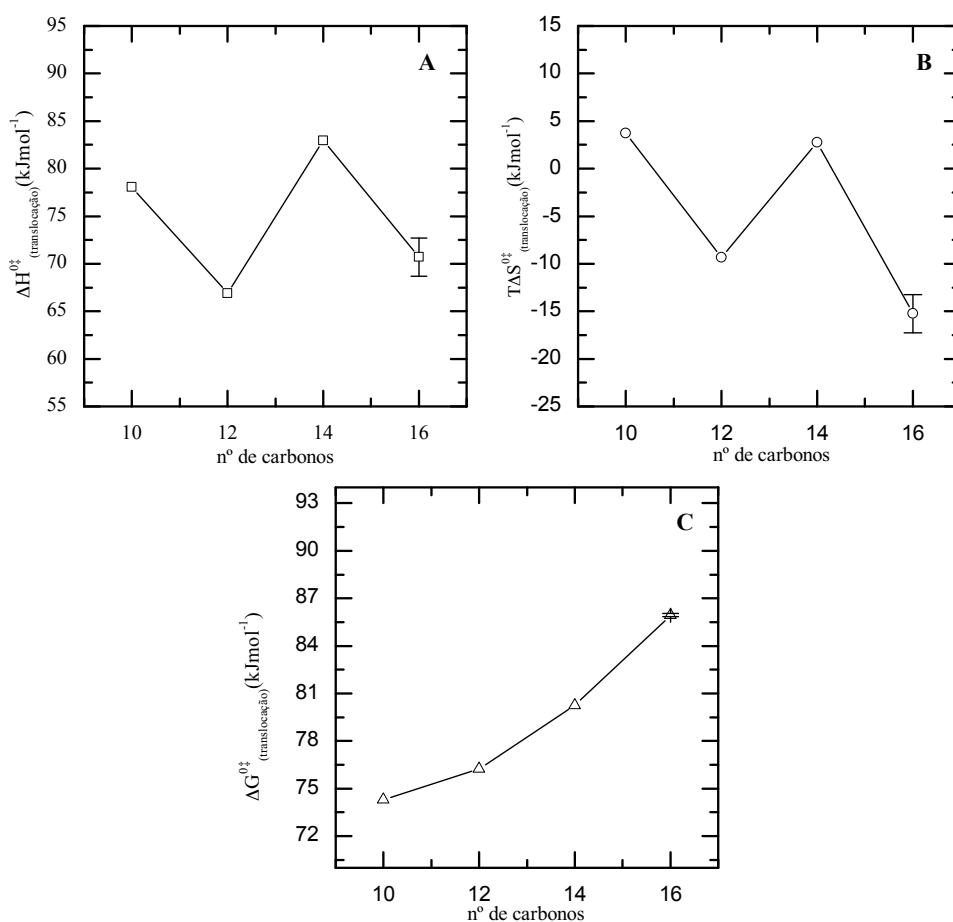
T = 25°C		NBD-C <sub>10</sub>	NBD-C <sub>12</sub>	NBD-C <sub>14</sub>	NBD-C <sub>16</sub>
	$k_t(s^{-1})$	1.6±0.30	(3.0±0.3)×10 <sup>-1</sup>	(4.1±0.3)×10 <sup>-1</sup>	(1.7±0.1)×10 <sup>-1</sup>
POPC <sup>(a)</sup>	$\Delta H^{0\ddagger}_{trans} (kJ mol^{-1})$	93 (±4)	80 (±4)	62 (±2)	77 (±2)
	$T\Delta S^{0\ddagger}_{trans} (kJ mol^{-1})$	21 (±4)	4 (±4)	-13 (±2)	0 (±2)
	$k_t(s^{-1})$	6.3×10 <sup>-1</sup>	2.6×10 <sup>-1</sup>	5.5×10 <sup>-2</sup>	(2.4±4.5)×10 <sup>-2</sup>
POPC:Col (1:1)	$\Delta H^{0\ddagger}_{trans} (kJ mol^{-1})$	78	67	83	71 (±2)
	$T\Delta S^{0\ddagger}_{trans} (kJ mol^{-1})$	4	-9	3	-15(±2)

(a) Dados obtidos da referência Cardoso et al.

Os parâmetros termodinâmicos da translocação, representados na figura 32, foram obtidos tendo em conta a Teoria do Estado de Transição de Eyring dada pela equação 21 (pág. 53).

Para a série homóloga de anfifilas estudadas em bicamadas de POPC:Col (1:1) verificamos que o trabalho necessário para estas passarem pelo estado de transição é dependente do número de carbonos que constitui a cadeia acilo.

Nota-se que, apesar de uma variação sistemática na energia livre de Gibbs associada à formação do estado de transição com o comprimento da cadeia acilo, a contribuição entálpica e entrópica para o processo não varia de uma forma monotónica. Este resultado deve-se a uma compensação entrópica/entálpica que ocorre principalmente no estado em que a sonda está inserida na membrana, sendo que quando a interação é mais forte a entalpia do sistema é menor e isso corresponde também a um estado com uma menor entropia. A interpretação dos resultados obtidos para a translocação da série NBD- $C_n$  em membranas de POPC foi possível graças ao estudo efectuado por Dinâmica Molecular (Filipe, Moreno et al. 2011) e indicou que as diferentes contribuições entálpicas/entrópicas estão relacionadas com a posição da anfifila na bicamada lipídica.



**Figura 32:** Parâmetros termodinâmicos do processo de translocação em função do tamanho da cadeia acilo da série homóloga de aminas gordas estudadas, em bicamadas de POPC:Col (1:1) a 25°C; variação entálpica (□) (A); variação entrópica (o) (B); energia livre de Gibbs (Δ) (C).

A variação observada nos parâmetros termodinâmicos da formação do estado de transição depende fortemente das interações entre o grupo polar NBD e as moléculas de água/lípidos na interface da bicamada. Os resultados obtidos reflectem diferenças da posição do grupo NBD relativamente à interface da bicamada, sendo que esta alteração da posição aumenta ou diminui as interações do grupo NBD com as regiões polares dos lípidos e com as moléculas de água. Os resultados aqui apresentados para a translocação em bicamadas de POPC:Col (1:1) são ainda preliminares e não permitem uma interpretação detalhada. Podemos no entanto especular que com o aumento da cadeia hidrocarbonada, o NBD-C<sub>n</sub> se vai localizando mais perto do centro da bicamada, com excepção para o NBD-C<sub>14</sub>. É semelhante do que já tinha sido observado nos estudos em POPC, o NBD-C<sub>14</sub> apresenta um comportamento fora da tendência esperada pelos resultados das restantes anfifílas da série (Cardoso, Martins et al. 2011).

Relativamente à energia livre de Gibbs calculada, verificamos que o trabalho que é necessário realizar para levar a anfifíla para o estado de transição aumenta com o aumento da cadeia hidrocarbonada de forma aproximadamente linear até uma cadeia hidrocarbonada de 14 carbonos, sendo que para 16 carbonos o valor é superior à tendência linear. Comparativamente, a mesma série em POPC mostrou uma energia livre de Gibbs independente do comprimento da cadeia acilo para  $n \geq 12$  e valores muito semelhantes aos obtidos em POPC:Col (1:1) para as anfifílas de cadeia mais curta (C<sub>10</sub> e C<sub>12</sub>). Como foi já referido, este comportamento pode reflectir a presença de heterogeneidade lateral na bicamada de POPC:Col (1:1).



## Conclusão

---

As propriedades fotofísicas obtidas para a série homóloga NBD-C<sub>n</sub> inserida em bicamadas de POPC:Col (1:1) mostram que o grupo NBD se encontra num ambiente mais polar do que quando inserido em bicamadas de POPC – menor rendimento quântico de fluorescência, menor valor de pK<sub>a</sub> e tempos de vida de fluorescência mais curto. A velocidade da reacção entre o ditionito e o grupo NBD é mais rápida quando as anfifílas se encontram inseridas em POPC:Col (1:1) evidenciando a maior exposição do grupo NBD ao solvente aquoso. De uma forma geral, as diferenças entre as propriedades das anfifílas inseridas nas duas membranas são maiores para as cadeias acilo de comprimento intermédio (C<sub>10</sub> e C<sub>12</sub>) sendo menores no caso do NBD-C<sub>16</sub>.

Os estudos por dinâmica molecular efectuados para o NBD-C<sub>n</sub> inserido em bicamadas de POPC mostraram que o grupo amina do NBD se encontra na interface entre as cadeias acilo e o glicerol do POPC, estabelecendo ligações por ponte de hidrogénio com os oxigénios dos grupos éster. Da comparação entre as propriedades fotofísicas das anfifílas inseridas em POPC:Col (1:1) e em POPC prevê-se que o grupo NBD se encontre numa localização mais próxima da região polar dos lípidos e mais exposto à fase aquosa quando inserido nas membranas de POPC:Col. Este comportamento está de acordo com o esperado pois bicamadas enriquecidas em colesterol apresentam uma estrutura mais ordenada – com menor volume livre – tendendo a excluir grupos volumosos.

De notar que a razão sinal/ruído conseguida para as medições realizadas não é muito boa pois foi necessário utilizar uma concentração de lípido elevada (conduzindo a uma grande dispersão de luz) para garantir que uma fracção significativa das anfifílas se encontra inserida na membrana. Adicionalmente, a concentração total de sonda teve que ser baixa (razão sonda/lípido geralmente inferior a 1:400) pois foi observado que a concentrações superiores ocorria agregação da anfifíla na membrana. Como consequência temos um desvio padrão significativo associado aos parâmetros o que torna difícil a comparação entre os mesmos ao longo da série. É no entanto seguro concluir que o aumento do comprimento da cadeia acilo entre 10 e 16 carbonos conduz a uma inserção do

grupo NBD num ambiente menos polar e com menor exposição à fase aquosa. O comportamento observado para o NBD- $C_8$  não segue a tendência o que se pode dever a uma partição muito pouco eficiente para as bicamadas de POPC:Col (1:1).

Os resultados obtidos para a translocação da série NBD- $C_n$  mostram que a presença de colesterol na bicamada diminui muito significativamente a velocidade deste processo para as anfífilas de cadeia acilo muito longa ( $C_{14}$  e  $C_{16}$ ) não apresentando um efeito significativo no comportamento das anfífilas de cadeia acilo mais curta. Este comportamento pode reflectir heterogeneidade lateral nas bicamadas formadas por POPC:Col com uma localização distinta das anfífilas dependente do comprimento da sua cadeia acilo. Esta conclusão é apenas preliminar e tem que ser verificada com a obtenção de mais resultados experimentais.



## Bibliografia

---

1. Abbott, N. J. (2004). "Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models." *Drug Discovery Today: Technologies* 1(4): 407-416.
2. Abbott, N. J., A. A. Patabendige, et al. (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." *Neurobiol Dis* 37(1): 13-25.
3. Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nat Rev Neurosci* 7(1): 41-53.
4. Abreu, M. S., M. J. Moreno, et al. (2004). "Kinetics and thermodynamics of association of a phospholipid derivative with lipid bilayers in liquid-disordered and liquid-ordered phases." *Biophys J* 87(1): 353-365.
5. Almeida, P. F., W. L. Vaz, et al. (1992). "Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis." *Biochemistry* 31(29): 6739-6747.
6. Arnaut, L. G., S. J. Formosinho, et al. (2007). *Chemical Kinetics: From Molecular Structure to Chemical Reactivity*, Elsevier Science.
7. Arvinte, T., A. Cudd, et al. (1986). "Fluorescence studies of the incorporation of NBD labeled phosphatidylethanolamines into liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 860(2): 215-228.
8. Bartlett, G. R. (1959). "Phosphorus assay in column chromatography." *J Biol Chem* 234(3): 466-468.
9. Blume, A. (1983). "Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion. Effects of chain length and head group structure." *Biochemistry* 22(23): 5436-5442.
10. Brockman, H. (1994). "Dipole potential of lipid membranes." *Chem Phys Lipids* 73(1-2): 57-79.
11. Cardoso, F. L., D. Brites, et al. (2010). "Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches." *Brain Res Rev* 64(2): 328-363.
12. Cardoso, R. M., H. A. Filipe, et al. (2010). "Chain length effect on the binding of amphiphiles to serum albumin and to POPC bilayers." *J Phys Chem B* 114(49): 16337-16346.

13. Cardoso, R. M., P. A. Martins, et al. (2011). "Chain-length dependence of insertion, desorption, and translocation of a homologous series of 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled aliphatic amines in membranes." *J Phys Chem B* 115(33): 10098-10108.
14. Chattopadhyay, A. (1990). "Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes." *Chem Phys Lipids* 53(1): 1-15.
15. Chattopadhyay, A. and E. London (1988). "Spectroscopic and ionization properties of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids in model membranes." *Biochim Biophys Acta* 938(1): 24-34.
16. Coolbear, K. P., C. B. Berde, et al. (1983). "Gel to liquid-crystalline phase transitions of aqueous dispersions of polyunsaturated mixed-acid phosphatidylcholines." *Biochemistry* 22(6): 1466-1473.
17. de Almeida, R. F. M., A. Fedorov, et al. (2003). "Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts." *Biophysical Journal* 85(4): 2406-2416.
18. Denniston, K., T. Joseph, et al. (2007). *General, Organic & Biochemistry*, McGraw-Hill Science.
19. Devaux, P. F. (1991). "Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes." *Biochemistry* 30(5): 1163-1173.
20. Disalvo, E. A., F. Lairion, et al. (2008). "Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces." *Biochim Biophys Acta* 1778(12): 2655-2670.
21. Essmann, U. and M. L. Berkowitz (1999). "Dynamical properties of phospholipid bilayers from computer simulation." *Biophys J* 76(4): 2081-2089.
22. Estronca, L. M., M. J. Moreno, et al. (2002). "Solubility of amphiphiles in membranes: influence of phase properties and amphiphile head group." *Biochem Biophys Res Commun* 296(3): 596-603.
23. Estronca, L. M., M. J. Moreno, et al. (2007). "Kinetics and thermodynamics of the association of dehydroergosterol with lipid bilayer membranes." *Biophys J* 93(12): 4244-4253.
24. Feigenson, G. W. (1997). "Partitioning of a fluorescent phospholipid between fluid bilayers: dependence on host lipid acyl chains." *Biophysical Journal* 73(6): 3112-3121.

- 25.** Feryforques, S., J. P. Fayet, et al. (1993). "Drastic Changes in the Fluorescence Properties of NBD Probes with the Polarity of the Medium - Involvement of a Tict State." *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 70(3): 229-243.
- 26.** Filipe, H. A., M. J. Moreno, et al. (2011). "Interaction of 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled fatty amines with 1-palmitoyl, 2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayers: a molecular dynamics study." *J Phys Chem B* 115(33): 10109-10119.
- 27.** Filippov, A., G. Oradd, et al. (2003). "The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers." *Biophys J* 84(5): 3079-3086.
- 28.** Flewelling, R. F. and W. L. Hubbell (1986). "The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes." *Biophys J* 49(2): 541-552.
- 29.** Franklin, J. C. and D. S. Cafiso (1993). "Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles." *Biophys J* 65(1): 289-299.
- 30.** Gawrisch, K., D. Ruston, et al. (1992). "Membrane Dipole Potentials, Hydration Forces, and the Ordering of Water at Membrane Surfaces." *Biophysical Journal* 61(5): 1213-1223.
- 31.** Gennis, R. B. (1988). *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York, Springer-Verlag.
- 32.** Gorter, E. and F. Grendel (1925). "On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood." *J Exp Med* 41(4): 439-443.
- 33.** Habgood, M. D., D. J. Begley, et al. (2000). "Determinants of passive drug entry into the central nervous system." *Cellular and Molecular Neurobiology* 20(2): 231-253.
- 34.** Hiemenz, P. C. and R. Rajagopalan (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry* CRC Press.
- 35.** Ipsen, J. H., G. Karlstrom, et al. (1987). "Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system." *Biochim Biophys Acta* 905(1): 162-172.
- 36.** Ipsen, J. H., O. G. Mouritsen, et al. (1990). "Relationships between Lipid-Membrane Area, Hydrophobic Thickness, and Acyl-Chain Orientational Order - the Effects of Cholesterol." *Biophysical Journal* 57(3): 405-412.
- 37.** Jansen, M. and A. Blume (1995). "A comparative study of diffusive and

osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains." *Biophys J* 68(3): 997-1008.

**38.** John, K., S. Schreiber, et al. (2002). "Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: Implications for rapid flip-flop in biological membranes." *Biophysical Journal* 83(6): 3315-3323.

**39.** Johnson, P. and P. B. Garland (1983). "Carbocyanine Dyes Used as Fluorescent Triplet Probes for Measuring Slow Rotational Diffusion of Lipids in Membranes." *Febs Letters* 153(2): 391-394.

**40.** Jovin, T. M. and W. L. Vaz (1989). "Rotational and translational diffusion in membranes measured by fluorescence and phosphorescence methods." *Methods Enzymol* 172: 471-513.

**41.** Kiessling, V., C. Wan, et al. (2009). "Domain coupling in asymmetric lipid bilayers." *Biochim Biophys Acta* 1788(1): 64-71.

**42.** Kol, M. A., A. I. de Kroon, et al. (2001). "Membrane-spanning peptides induce phospholipid flop: a model for phospholipid translocation across the inner membrane of *E. coli*." *Biochemistry* 40(35): 10500-10506.

**43.** Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer.

**44.** Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (1997). *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers.

**45.** Lewis, R. N. A. H., B. D. Sykes, et al. (1988). "Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing cis-monounsaturated acyl chain homologs of oleic acid: differential scanning calorimetric and phosphorus-31 NMR spectroscopic studies." *Biochemistry* 27(3): 880-887.

**46.** Lin, S. and W. S. Struve (1991). "Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole-aminohexanoic acid: effect of intermolecular hydrogen-bonding on non-radiative decay." *Photochem Photobiol* 54(3): 361-365.

**47.** Lodish, H., A. Berk, et al. (2003). *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman.

**48.** Luckey, M. (2008). *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations*, Cambridge University Press.

**49.** Mabrey, S. and J. M. Sturtevant (1976). "Investigation of Phase-Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(11): 3862-3866.

- 50.** Marsh, D. (2010). "Molecular volumes of phospholipids and glycolipids in membranes." *Chem Phys Lipids* 163(7): 667-677.
- 51.** Mateo, C. R., A. U. Acuna, et al. (1995). "Liquid-Crystalline Phases of Cholesterol Lipid Bilayers as Revealed by the Fluorescence of Trans-Parinaric Acid." *Biophysical Journal* 68(3): 978-987.
- 52.** Mazères, S., V. Schram, et al. (1996). "7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-labeled phospholipids in lipid membranes: differences in fluorescence behavior." *Biophysical Journal* 71(1): 327-335.
- 53.** McIntyre, J. C. and R. G. Sleight (1991). "Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry." *Biochemistry* 30(51): 11819-11827.
- 54.** McMullen, T. P. W., R. N. A. H. Lewis, et al. (2004). "Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8(6): 459-468.
- 55.** Meyers, H. W., R. Jurss, et al. (1983). "Synthesis and properties of NBD-n-acylcholines, fluorescent analogs of acetylcholine." *Eur J Biochem* 137(3): 399-404.
- 56.** Missner, A. and P. Pohl (2009). "110 years of the Meyer-Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds." *Chemphyschem* 10(9-10): 1405-1414.
- 57.** Moncelli, M. R., L. Becucci, et al. (1994). "The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes." *Biophysical Journal* 66(6): 1969-1980.
- 58.** Moore, P. B., C. F. Lopez, et al. (2001). "Dynamical properties of a hydrated lipid bilayer from a multiananosecond molecular dynamics simulation." *Biophys J* 81(5): 2484-2494.
- 59.** Moran, L. A., R. Horton, A., et al. (2011). *Principles of Biochemistry*, Prentice Hall.
- 60.** Moreno, M. J., L. M. Estronca, et al. (2006). "Translocation of phospholipids and dithionite permeability in liquid-ordered and liquid-disordered membranes." *Biophys J* 91(3): 873-881.
- 61.** Nagle, J. F. (1980). "Theory of the Main Lipid Bilayer Phase Transition." *Annual Review of Physical Chemistry* 31(1): 157-196.

- 62.** Nichols, J. W. and D. W. Deamer (1980). "Net Proton-Hydroxyl Permeability of Large Unilamellar Liposomes Measured by an Acid-Base Titration Technique." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 77(4): 2038-2042.
- 63.** Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, et al. (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." *Progress in Lipid Research* 41(1): 66-97.
- 64.** Op den Kamp, J. A. (1979). "Lipid asymmetry in membranes." *Annu Rev Biochem* 48: 47-71.
- 65.** Paula, S., A. G. Volkov, et al. (1998). "Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism." *Biophysical Journal* 74(1): 319-327.
- 66.** Paula, S., A. G. Volkov, et al. (1996). "Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness." *Biophysical Journal* 70(1): 339-348.
- 67.** Peterson, U., D. A. Mannock, et al. (2002). "Origin of membrane dipole potential: contribution of the phospholipid fatty acid chains." *Chem Phys Lipids* 117(1-2): 19-27.
- 68.** Quinn, P. J. (2002). "Plasma membrane phospholipid asymmetry." *Subcell Biochem* 36: 39-60.
- 69.** Roach, C., S. E. Feller, et al. (2004). "Comparison of cis and trans fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties." *Biochemistry* 43(20): 6344-6351.
- 70.** Rukmini, R., S. S. Rawat, et al. (2001). "Cholesterol organization in membranes at low concentrations: Effects of curvature stress and membrane thickness." *Biophysical Journal* 81(4): 2122-2134.
- 71.** Sampaio, J. L., M. J. Moreno, et al. (2005). "Kinetics and thermodynamics of association of a fluorescent lysophospholipid derivative with lipid bilayers in liquid-ordered and liquid-disordered phases." *Biophys J* 88(6): 4064-4071.
- 72.** Schroeder, F., G. Nemezc, et al. (1991). "Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1066(2): 183-192.
- 73.** Simon, S. A. and T. J. McIntosh (1989). "Magnitude of the solvation pressure depends on dipole potential." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23): 9263-9267.

- 74.** Simons, K. and W. L. Vaz (2004). "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33: 269-295.
- 75.** Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(4023): 720-731.
- 76.** Stryer, L. (1988). *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company.
- 77.** Sun, W., R. M. Suter, et al. (1994). "Order and disorder in fully hydrated unoriented bilayers of gel-phase dipalmitoylphosphatidylcholine." *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 49(5): 4665-4676.
- 78.** Sun, W. J., S. Tristram-Nagle, et al. (1996). "Structure of gel phase saturated lecithin bilayers: temperature and chain length dependence." *Biophys J* 71(2): 885-891.
- 79.** Sun, W. J., S. Tristram-Nagle, et al. (1996). "Structure of the ripple phase in lecithin bilayers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7008-7012.
- 80.** Tanford, C. (1991). *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Krieger Publishing Company.
- 81.** Taylor, R. P., A. V. Broccoli, et al. (1978). "Enzymatic and colorimetric determination of total serum cholesterol. An undergraduate biochemistry laboratory experiment." *J Chem Educ* 55(1): 63-64.
- 82.** Thewalt, J. L. and M. Bloom (1992). "Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams." *Biophys J* 63(4): 1176-1181.
- 83.** Tsui, F. C., D. M. Ojcius, et al. (1986). "The Intrinsic Pka Values for Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in Phosphatidylcholine Host Bilayers." *Biophysical Journal* 49(2): 459-468.
- 84.** Vaz, W. L. C. (2008). *Properties of Lipid Bilayers*. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- 85.** Vaz, W. L. C. and D. Hallmann (1983). "Experimental-Evidence against the Applicability of the Saffman-Delbruck Model to the Translational Diffusion of Lipids in Phosphatidylcholine Bilayer-Membranes." *Febs Letters* 152(2): 287-290.
- 86.** Voet, D. V., Judith G.; Pratt, Charlotte W. (2008). *Fundamentals of Biochemistry: Life at The Molecular Level*, Wiley.
- 87.** Volkov, A. G., S. Paula, et al. (1997). "Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers."

Bioelectrochemistry and Bioenergetics 42(2): 153-160.

**88.** Walter, A. and J. Gutknecht (1986). "Permeability of Small Nonelectrolytes through Lipid Bilayer-Membranes." *Journal of Membrane Biology* 90(3): 207-217.

**89.** Wang, L. (2012). "Measurements and implications of the membrane dipole potential." *Annu Rev Biochem* 81: 615-635.

**90.** Wong, H. L., X. Y. Wu, et al. (2012). "Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* 64(7): 686-700.

**91.** Yeagle, P. L. (2005). *The Structure of Biological Membranes*, CRC Press.

**92.** Ziegler, A. (2008). "Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans." *Adv Drug Deliv Rev* 60(4-5): 580-597.