



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



IMPORTÂNCIA DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DE UM
CALORÍMETRO DIFERENCIAL DE VARREDURA NO ESTUDO DE
MULTIBICAMADAS LIPÍDICAS.

ANA AMÁLIA COELHO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PÓLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE

2016



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



IMPORTÂNCIA DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS DE UM
CALORÍMETRO DIFERENCIAL DE VARREDURA NO ESTUDO DE
MULTIBICAMADAS LIPÍDICAS

ANA AMÁLIA COELHO

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.

Orientadora: Maria Lúcia Bianconi

ORIENTADORA: MARIA LÚCIA BIANCONI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Coelho, Ana Amália

Titulo. Campo Grande, 2016. 41 f. il: 24

Orientadora: Maria Lúcia Bianconi

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2016.

Referencias bibliográfica: f.43

1. Palavras Chaves: Vesículas multilamelares; Calorimetria Diferencial de Varredura;DSC; DPPC

I. BIANCONI, Maria Lúcia

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Importância dos Parâmetros Experimentais de um Calorímetro Diferencial de Varredura no Estudo de Multibicamadas Lipídicas

Dedico este trabalho aos meus filhos Leandro e Bruno, que são minha inspiração eterna, e a você, Antônio, pelo apoio necessário para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora Professora Maria Lúcia Bianconi que me fez solidificar em meu aprendizado a beleza do saber, da Ciência e do aprender cada vez mais, e principalmente do fazer com zelo. Agradeço por ter sido mais que orientadora, por ter sido minha amiga. Agradeço pela paciência e por todas as horas de dedicação e trabalho.

Agradeço a meus pais pela educação que me proporcionaram e pela influência na minha vontade de superação e determinação sempre. Agradeço a minha irmã que foi a principal incentivadora para que eu fizesse o curso pelo CEDERJ, o que foi fundamental para que eu estivesse realizando esse objetivo. Ao meu irmão que me incentivou em vários momentos. A meus filhos pela compreensão da falta de tempo. E agradeço também a todos os professores e amigos de jornada durante esses cinco anos.

Por fim, agradeço a Deus, por todas as coisas que citei acima, e que me foram concedidas por ele, tão somente. Agradeço a toda a espiritualidade que me acompanha desde o meu nascimento, e que me amparam nos momentos mais difíceis. Gratidão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de Membrana.....	14
Figura 2. Esquema de um Fosfolípido.....	15
Figura 3. Representação esquemática de diferentes vesícula.....	16
Figura 4. Micrografia de criofratura de MLV e FAMLV.....	17
Figura 5. Micrografia de criofratura de LUVs.....	17
Figura 6: Representação esquemática das fases lipídicas.....	18
Figura 7: Efeito do tamanho das vesículas de mesma composição lipídica na transição de fase gel-líquido cristalina.....	21
Figura 8: Esquema das celas no DSC no Calorímetro VP-DSC.....	25
Figura 9: Painel de controle do DSC.....	26
Figura 10: Efeito nos picos da pré-transição e transição principal, em função do aumento das velocidades de varredura.....	30
Figura 11: Efeito da velocidade de varredura na pré-transição (A) e na transição principal (B).....	30
Figura 12: Variação de $\Delta T_{1/2}$ ($\Delta\Delta T_{1/2}$) em função da velocidade de varredura.....	32
Figura 13: Efeito nos picos de Pré-transição e Transição Principal, em função de diferentes feedbacks.....	34

Figura 14: Efeito nos padrões termodinâmicos da amostra de DPPC em função da variação de filtro.....	36
Figura 15 Tempo necessário para Equilíbrio da DP em função da Temperatura Inicial do calorímetro até a Temperatura inicial para a varredura da amostra.....	37
Figura 16: Sobreposição da primeira varredura e da sétima (última) varredura de uma mesma amostra à 10 °C/h.....	39
Figura 17: Varreduras de uma mesma amostra com 1, 3 e 6 dias de armazenagem em geladeira.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tamanho das vesículas.....	18
Tabela 2: Efeito do comprimento e grau de insaturação e da composição da cabeça polar na temperatura de transição da fase gel para líquido cristalina (T_m)*.....	20
Tabela 3: Efeito do tamanho das vesículas nos parâmetros termodinâmicos de transições de fases de vesículas DPPC:DPPG (1:1).....	21
Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos da pré-transição e da transição principal em função de diferentes velocidades de varredura.....	31
Tabela 5: largura dos picos da Pré-transição e da Transição Principal ($\Delta T_{1/2}$) em função de diferentes velocidades de varredura.....	31
Tabela 6 Efeito da velocidade de varredura no número de lipídios na unidade cooperativa durante a transição de fase de MLVs de DPPC.....	33
Tabela 7: Valores termodinâmicos e função das variações de feedback.....	34
Tabela 8: Valores termodinâmicos em função das variações de filtro.....	38
Tabela 9: Tempo necessário para equilíbrio e varredura das amostras.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHCl₃ Clorofórmio

CL Cardioplipina

Cp Power Capacity

DSC Differential Scanning Calorimeter

DLPC Dilinoleilfosfatidilcolina

DMPC Dimiristoilfosfatidilcolina

DOPC Dioleilfosfatidilcolina

DP Differential Power

RP Referential Power

DPPC Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPE Dipalmitoilfosfatidiletanolamina

DPPG Dipalmitoilfosfatidilglicerol

DPPS Dipalmitoilfosfatidilserina

DSPC Di-estearoilfosfatidilcolina

POPC Palmitoil-oleilfosfatidilcolin

FATMLV Frozen and Thowed Large Unilamellar Vesicle

GUV Giant Unilamellar Vesicle

LUV Large Unilamellar Vesicle

MLV Large Multilamellar vesicle

NBR Norma Brasileira Registrada

PA Ácido Fosfatídico

PC Fosfatidilcolina

PE Fosfatidiletanolamina

PG Fosfatidilglicerol

PI Fosfatidilinositol

PS Fosfatidilserina

SiBI Sistema de Bibliotecas e Informação

SUV Small Unilamellar vesicle

Tp Pretransition

Tm Main transition

UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro

RESUMO

Importância dos Parâmetros Experimentais de um Calorímetro Diferencial de Varredura no Estudo de Multibicamadas Lipídicas.

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) tem sido utilizada na caracterização das propriedades de bicamadas lipídicas há mais de quatro décadas. Mais recentemente, os equipamentos de DSC foram reformulados para permitir o estudo de amostras aquosas e diluídas. Este trabalho tem por objetivo o estudo dos parâmetros de obtenção de dados de um equipamento específico, o VP-DSC, no estudo de amostras de vesículas lipídicas multilamelares (MLVs) de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Foi observado que a transição de fase gel-líquido cristalina de MLV de DPPC é altamente cooperativa, o que se reflete num pico calorimétrico estreito. Foi analisada a variação dos parâmetros experimentais, como velocidade de varredura, filtro de aquisição de dados e feedback. Nossos resultados mostraram que as melhores condições experimentais para obtenção de termogramas de MLVs de DPPC são (i) baixa velocidade de varredura, de 10 a 12 °C/h, (ii) alto feedback e (iii) filtro de aquisição de dados de 2 segundos. Foi observado que as amostras permaneceram estáveis durante a longa duração dos experimentos (8 a 9 horas).

Palavras-chave: Vesículas multilamelares; Calorimetria Diferencial de Varredura; DSC; DPPC.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Membranas Biológicas

As membranas biológicas são estruturas celulares presentes em todas as células, sejam elas procariontes ou eucariontes, delimitando os meios intracelular e extracelular, assim como as organelas. As membranas celulares são constituídas, principalmente, por lipídios (das classes dos fosfolipídios e esfingolipídios) e proteínas, além de esteróis, como o colesterol, e de carboidratos. Os carboidratos, quando presentes, encontram-se ligados a lipídios ou proteínas, sempre voltados para a face externa da membrana ligados a lipídios ou proteínas (BERG *et al.*, 2014).

As membranas celulares têm por função a preservação do conteúdo interno, proteção contra possíveis microrganismos invasores e o controle da permeabilidade celular, com vistas à manutenção das funções celulares (BERG *et al.*, 2014).

Várias foram as pesquisas na tentativa de desvendar a estrutura das membranas biológicas, começando com Irving Langmuir em 1917 que produziu membranas artificiais adicionando fosfolipídios à água (HEIMBURG, 2007). Langmuir demonstrou, então, que os mesmos têm comportamento anfipático, ou seja, suas caudas hidrofóbicas se aproximam e ficam em contato com o ar e suas cabeças polares mantêm contato com a água. Em 1925, Gortel e Grendel, ironicamente, a partir de erros experimentais, trabalhando na tentativa de elucidar a organização dos lipídios em uma membrana, os quais foram isolados de hemácias, chegaram à conclusão de que os lipídios só poderiam estar organizados em bicamadas (HEIMBURG, 2007). Mais tarde, Singer e Nicholson (1972) a partir de pesquisa baseada em vários estudos anteriores, propuseram o modelo do “mosaico fluido” (Figura 1), o qual é aceito até os dias atuais. Nesse modelo, os lipídios, mais precisamente os fosfolipídios, formam uma bicamada constituída de duas monocamadas, onde as proteínas encontram-se inseridas, formando um mosaico (SINGER & NICOLSON, 1972).

As bicamadas lipídicas apresentam uma fluidez característica, proporcionada pela movimentação constante dos fosfolipídios, por isso a denominação de mosaico fluido. Existem regiões de maior e menor fluidez por apresentarem uma composição variada, podendo conter fosfolipídios com ácidos graxos saturados e/ou insaturados e uma quantidade variável de colesterol, além de diferentes classes de proteínas.

As proteínas que compõem as bicamadas lipídicas podem ser classificadas em dois grupos: proteínas integrais e proteínas periféricas (Figura1). As proteínas integrais se caracterizam por estarem inseridas na parte hidrofóbica da membrana. As proteínas periféricas, por sua vez, interagem apenas com as cabeças polares dos fosfolipídios.

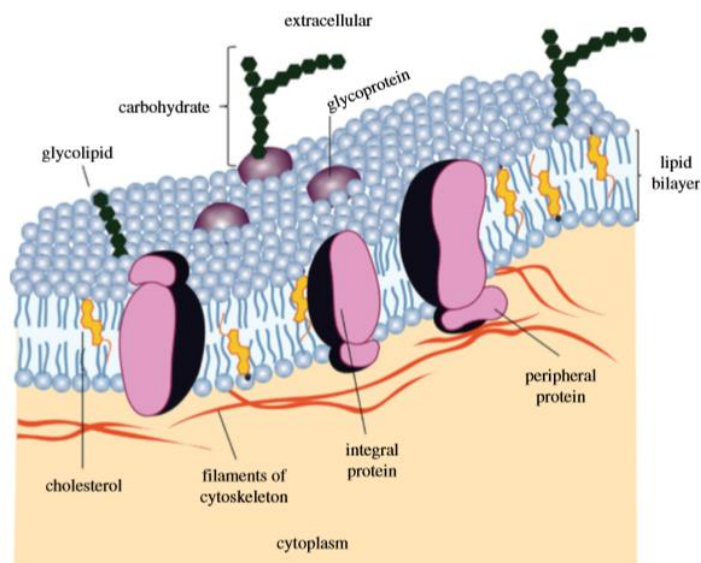


Figura 1: Modelo de membrana. Esquema de mosaico fluido com proteínas inseridas às bicamadas lipídicas, disponível em <http://rsif.royalsocietypublishing.org>.

Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas por apresentarem uma região polar e outra apolar. Os fosfolipídios são formados por um esqueleto de glicerol contendo dois ácidos graxos ligados aos carbonos C1 e C2 através de ligações ésteres. O terceiro carbono do glicerol se liga um grupamento fosfato, dando origem ao ácido fosfatídico (PA). Ao grupo fosfato do PA, podem-se ligar outros grupos químicos (neutros ou carregados positivamente), tais como colina (PC), inositol (PI), etanolamina (PE), serina (PS) ou glicerol (PG), como mostrado na Figura 2. Essa última ligação é chamada de fosfodiéster. A região apolar corresponde às suas caudas, formadas pelas duas cadeias de ácidos graxos, e a região polar corresponde à sua cabeça, composta pelo grupo fosfato e grupos funcionais a ele ligados.

As cadeias de ácidos graxos apresentam mais comumente entre 14 e 24 carbonos (BERG *et al.*, 2014), mas existem cadeias com 12, com diferentes graus de insaturação.

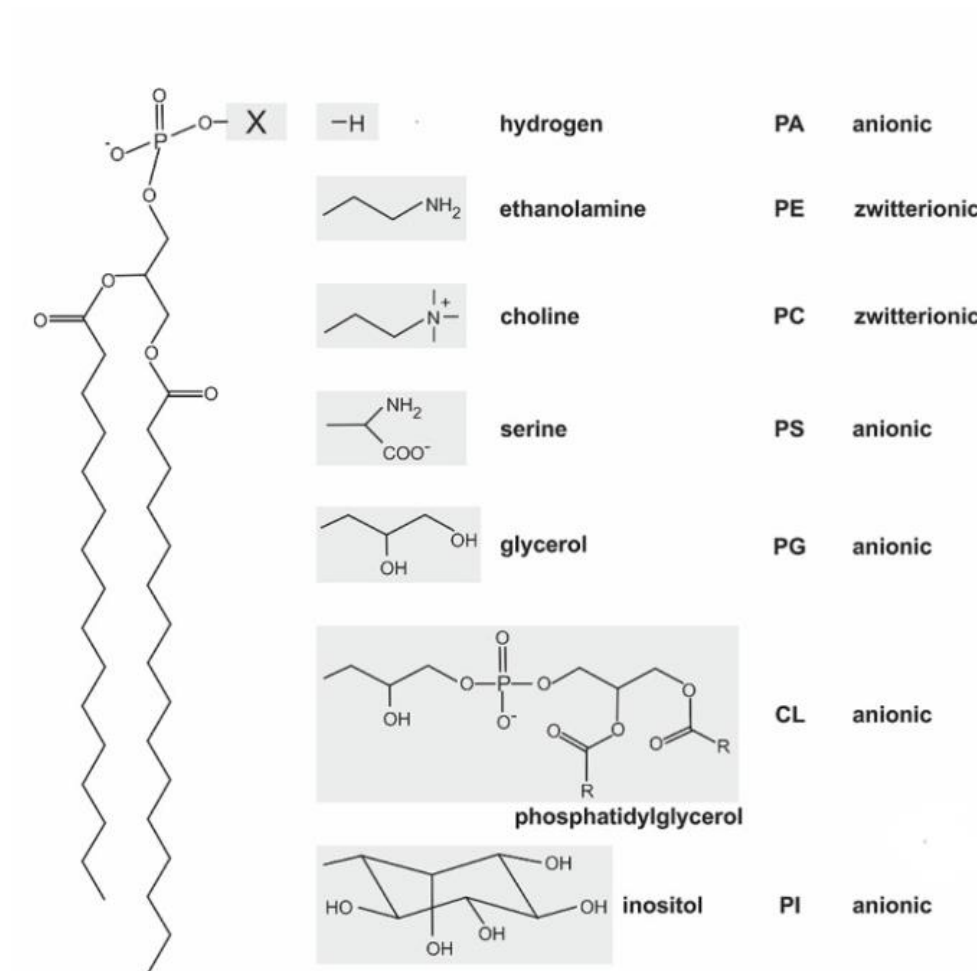


Figura 2. Esquema de um fosfolípido. Estrutura básica de um fosfolípido e grupos químicos substituintes que podem se ligar ao grupo fosfato, dando origem a diferentes fosfolípidos: ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilinositol (PI).

1.2 Sistemas Biomiméticos

Muitos processos celulares dependem das propriedades das bicamadas lipídicas, e de interações que ocasionam variações nas propriedades termodinâmicas do sistema. Os sistemas biomiméticos procuram reproduzir as membranas biológicas em sua estrutura, com vistas a criar condições para vários estudos, neste caso, o comportamento de membranas biológicas *in vitro*, de seus elementos constituintes, ou seja, de interações entre eles e desses com outras substâncias ali introduzidas.

Esses sistemas são particularmente importantes para estudos farmacológicos e biológicos, como, por exemplo, o desenvolvimento de drogas, através da análise de sua interatividade quanto à absorção na membrana.

Os sistemas biomiméticos são constituídos por micelas ou vesículas. As micelas são sistemas mais simples e dinâmicos, nem sempre sendo adequados como modelo de membrana. As vesículas são modelos de membrana mais estáveis e podem ser classificadas em multilamelares (MLV¹) ou unilamelares (LUV¹), estas podendo ser pequenas (SUV¹), grandes (LUV¹) ou gigantes (GUV¹), dependendo do diâmetro (Figura 3). As MLVs consistem em multibicamadas concêntricas separadas por um meio aquoso, as quais podem dar origem às FATMLVs após sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento, as quais se caracterizam por apresentarem uma vesícula grande, contendo outras vesículas menores de tamanhos diversos (Figuras 3 e 4B).

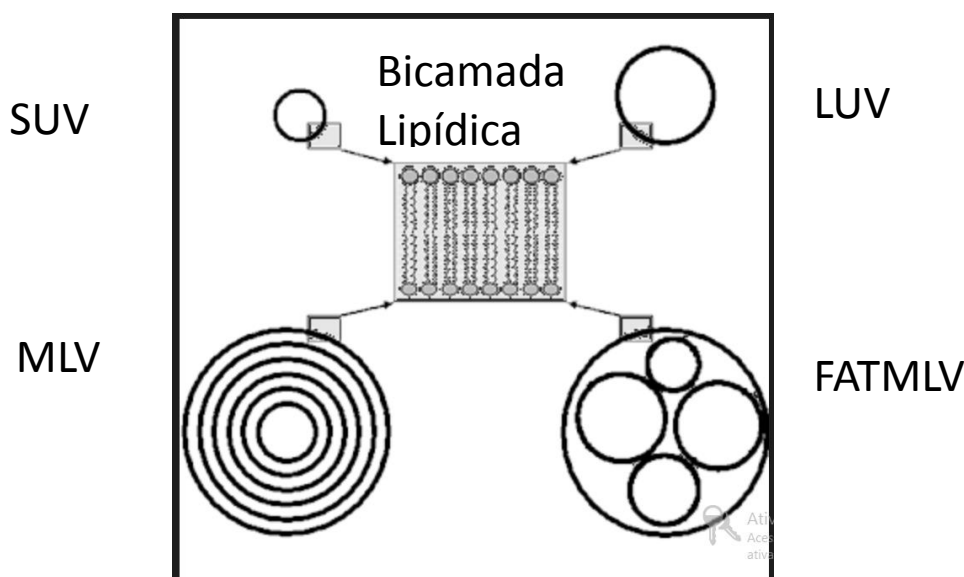


Figura 3: Representação esquemática de diferentes vesículas. Avesícula multilamelar (MLV) apresenta multibicamadas concêntricas separadas por um meio aquoso. Após ser submetida a ciclos de congelamento/descongelamento dá origem à FATMLV². Avesícula unilamelar grande (LUV) pode ser obtida por extrusão e a vesícula unilamelar pequena (SUV), a partir de sonicação com probe de titânio.

As SUVs são obtidas a partir da sonicação de MLVs com sonda de titânio. As LUVs são formadas a partir de MLVs, as quais passam por ciclos de congelamento/descongelamento e posterior extrusão (HOPE *et al.*, 1986).. O tamanho das LUVs depende do tamanho do poro do filtro utilizado na extrusão (Figura 5). As GUVs são formadas espontaneamente através da hidratação de filmes lipídicos de determinada

¹MLV:Multilamellar Vesicle; SUV: Small Unilamellar Vesicle; LUV: Large Unilamellar Vesicle; GUV=Giant Unilamellar vesicle.

composição lipídica (MOSCHO *et al.*, 1996). As vesículas unilamelares podem ser formadas a partir de várias técnicas e podem apresentar diferentes diâmetros (Tabela 1), sendo as SUVs as menores em diâmetro e as GUVs, as maiores.

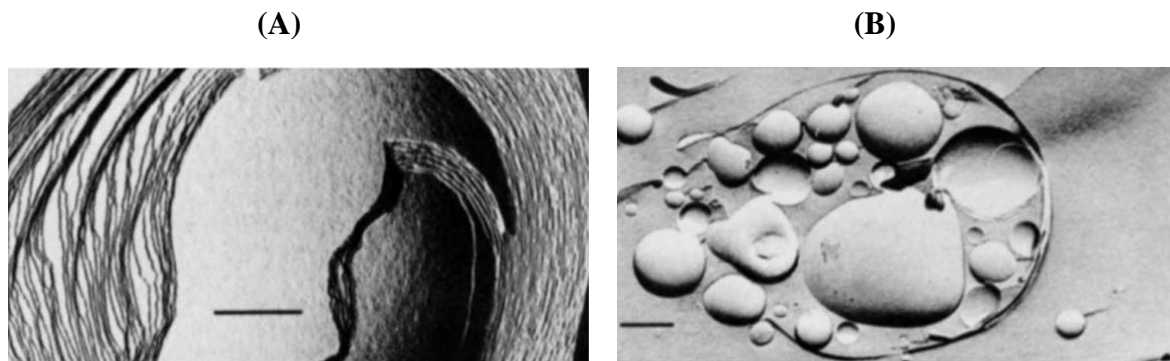


Figura 4: Micrografia de criofratura de MLV e FATMLV. As vesículas foram preparadas com fosfatidilcolina de ovo na concentração de 50 mg/mL em 150 mL de NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4. (A) MLV e (B) FATMLVs, estas obtidas a partir de MLVs que passaram por 5 ciclos de congelamento e descongelamento (adaptado HOPE *et al.*, 1986).

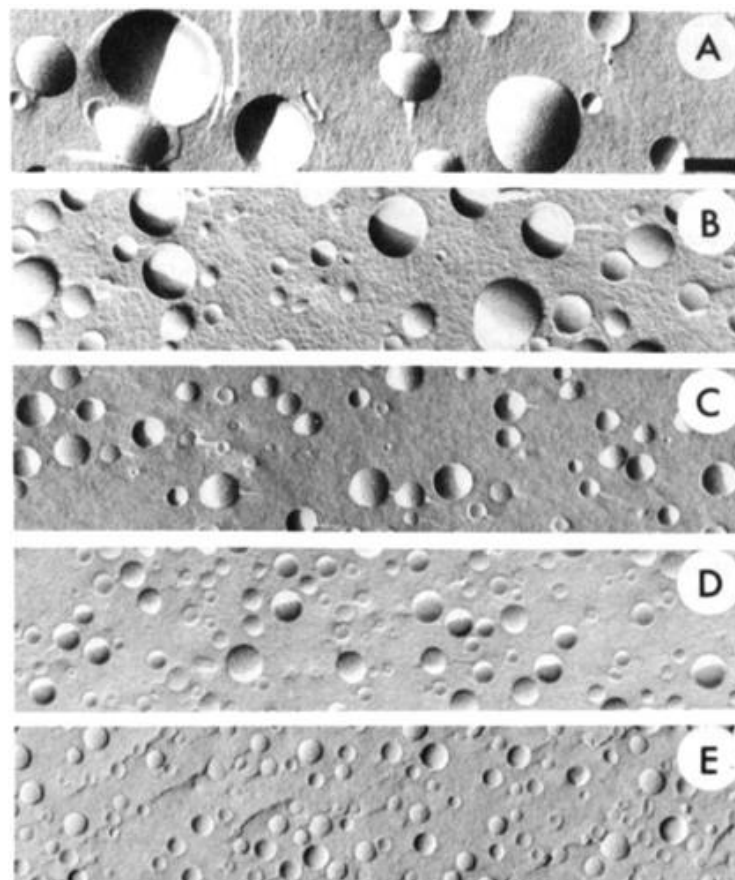


Figura 5: Micrografia de criofratura de Vesículas Unilamelares. As vesículas foram obtidas a partir de FATMLVs passadas 20 vezes através de vários tamanhos de filtros de poros: 400 nm (A), 200 nm (B), 100 nm (C), 50 nm (D) e 30 nm (E). As FATMLVs foram preparadas com fosfatidilcolina de ovo. (Adaptado de HOPE *et al.*, 1986).

Tabela1: Tamanho das vesículas

Vesículas	Tamanho (nm)
SUV	25 a 50
LUV	100 a 200
MLV e FATMLV	1.000 a 10.000
GUV	100.000

1.4. Transições de fases lipídicas

As bicamadas lipídicas podem apresentar duas fases distintas de fluidez. Uma delas, denominada fase gel, apresenta menor fluidez devido à restrição nos movimentos dos fosfolipídios, e a outra fase, denominada líquido-cristalina, se apresenta mais fluida. Essa maior fluidez é devida a um maior movimento das cadeias acila, devido a mudanças na configuração das ligações carbono-carbono (*cis/trans*).

A espessura da bicamada é maior na fase gel que na líquido cristalina, pois as cadeias acila estão todas em configuração *trans*. Entre as fases gel e líquido cristalina, acontece uma coexistência de fases na denominada de fase Ripple, gerando ondulações na superfície da bicamada devido à diferença de espessura da bicamada em cada fase (Figura 6).

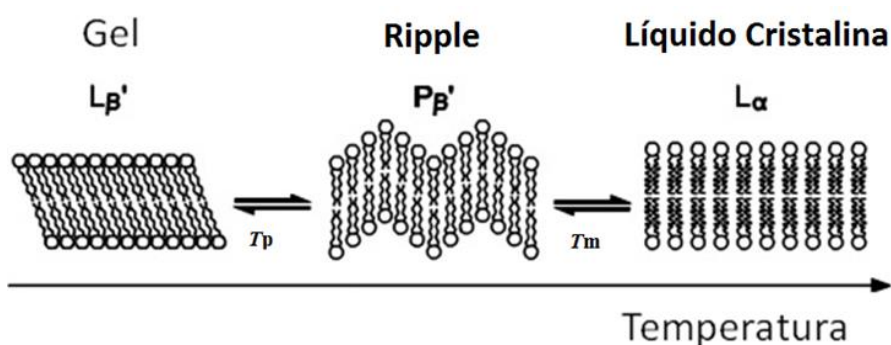


Figura 6: Representação esquemática das fases lipídicas. As transições entre as fases gel (L_{β}), fase ripple (P_{β}) e fase líquido cristalina (L_{α}) estão representadas em equilíbrio, onde T_p é a temperatura de pré-transição e T_m , a de transição principal. Fonte: <http://avantilipids.com>

A calorimetria diferencial de varredura, conhecida como DSC, é uma técnica muito utilizada para estudar transições de fases lipídicas. Essa técnica determina a variação da capacidade calorífica (C_p) de uma amostra em função da temperatura. Esta variação de temperatura pode ser crescente ou decrescente.

No caso de bicamadas lipídicas, quando a amostra é submetida a um aumento de temperatura, ocorre a transição da fase gel para a fase líquida cristalina, ocorrendo o inverso quando a amostra é submetida a uma diminuição de temperatura. Essa transição é caracterizada por parâmetros termodinâmicos que refletem a estabilidade da membrana. Esses parâmetros são a temperatura, na qual irá ocorrer 50% da transição de fase (T_m), a variação de entalpia, determinada calorimetricamente (ΔH^{cal}), e a largura à meia altura ($\Delta T_{1/2}$). ΔH^{cal} reflete a quantidade de energia necessária para a transição de fases e o $\Delta T_{1/2}$, representa a cooperatividade da transição. Essa cooperatividade reflete a organização das moléculas que estão prestes a sofrer uma transição de fases. Um pouco antes da transição, as moléculas de lipídios ganham maior liberdade de movimento; em processos cooperativos, as moléculas próximas umas das outras cooperam entre si, ou seja, há uma troca da energia cinética relacionada ao grau de liberdade de movimento, de forma que o movimento de uma molécula favoreça o de outra, próxima a ela. Na verdade, podemos dizer que a cooperatividade reflete o número de lipídios que estão sofrendo transição ao mesmo tempo. Durante a transição, ocorre uma coexistência das fases gel e líquido cristalina, dando origem a domínios lipídicos. O número médio de lipídios que fazem parte desses domínios pode ser calculado em termos de “unidade cooperativa” (U.C.), de acordo com a equação 1 (STURTEVANT, 1987):

$$U.C. = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} \quad \text{eq. 1}$$

ΔH_{vH} é a entalpia de vant'Hoff, obtida pela equação 2:

$$\Delta H_{vH} = 2 \cdot R^{1/2} \cdot T_m \cdot C_p \quad \text{eq. 2}$$

onde R é a constante universal dos gases e C_p é a capacidade calorífica molar máxima, obtida na T_m .

A T_m varia de acordo com o tamanho da cadeia acila, o grau de instauração, o tipo e cabeça polar (Tabela 2) e o tipo de lipossomo/vesícula, além de outros fatores, como, por exemplo, a interação de drogas (AKBARZADEH *et al.*, 2013) ou a presença de colesterol (MONTEIRO *et al.*, 2016).

O aumento do comprimento das cadeias acila gera uma maior estabilidade na bicamada e isso é refletido no aumento da temperatura de transição de fases.

Quanto maior o grau de insaturação, menor será a T_m . Isso se deve ao fato de que a configuração *cis* é mais fácil de ser encontrada nessas cadeias que a configuração *trans*. A configuração *cis* promove o afastamento das cadeias acila, favorecendo a formação da fase líquido cristalina e, portanto, a diminuição da T_m .

O efeito das cabeças polares na temperatura de transição da fase gel para líquido cristalina é complexo e depende da geometria das mesmas e interações não covalentes que ocorrem nessa região da bicamada. Por exemplo, apesar de DPPC e DPPE serem zwitteriônicos, as T_m s desses lipídios diferem em 22 °C (Tabela 2). De forma semelhante, DPPG e DPPS são aniônicos e apresentam T_m s distintas (Tabela 2). Por outro lado, DPPC (zwitteriônico), e DPPG (aniônico), apresentam a mesma T_m (Tabela 2). Isso exemplifica a complexidade dos efeitos causados pela cabeça polar.

Além da composição lipídica, outros fatores influenciam a T_m , como, por exemplo, o tipo de vesícula utilizada (Figura 7). As MLVs apresentam alta cooperatividade na transição devido ao seu diâmetro. Isso se reflete em transições com picos estreitos (Figura 7C), ou seja, que ocorrem em uma estreita faixa de temperatura. As LUVs e SUVs apresentam picos mais alargados, devido à menor cooperatividade na transição de fases, em comparação às MLVs. Além disso, as LUVs e SUVs apresentam uma diminuição na T_m e no ΔH^{cal} (Figura 7 e Tabela 3).

Tabela 2: Efeito do comprimento e grau de insaturação das cadeias acila e da composição da cabeça polar na temperatura de transição da fase gel para líquido cristalina (T_m)*

Fosfolipídio	Sigla	Composição de ácidos graxos	T_m (°C)
Dimiristoilfosfatidilcolina	DMPC	14:0	24
Dipalmitoilfosfatidilcolina	DPPC	16:0	41
Di-estearoilfosfatidilcolina	DSPC	18:0	55
Di-oleoilfosfatidilcolina	DOPC	18:1	-17
Dilinoleoilfosfatidilcolina	DLPC	18:2	-57
Palmitoil-oleoilfosfatidilcolina	POPC	16:0; 18:1	-2
Dipalmitoilfosfatidilglicerol	DPPG	16:0	41
Dipalmitoilfosfatidiletanolamina	DPPE	16:0	63
Dipalmitoilfosfatidilserina	DPPS	16:0	54

* Fonte: <http://avantilipids.com>

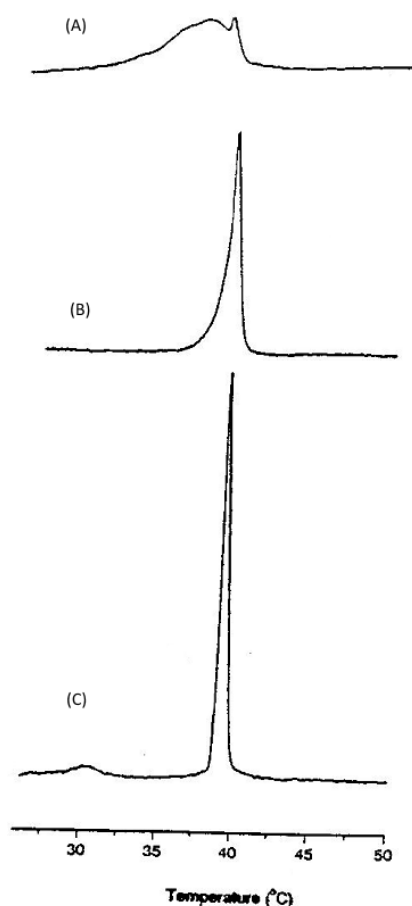


Figura7: Efeito do tamanho das vesículas de mesma composição lipídica na transição de fase gel-líquido cristalina. Termogramas obtidos no calorímetro MCS-DSC (Micro Cal) obtido com SUV (A), LUV (B) e MLV (C) de DPPC: DPPG (1:1) 2 mM em HEPES 10mM contendo NaCl 100 mM e EDTA 0,1 M, pH 7.5. Dados obtidos na School of Biological Sciences/UMKC e cedidos por M.L. Bianconi.

Tabela 3: Efeito do tamanho das vesículas nos parâmetros termodinâmicos de transições de fase de vesículas DPPC:DPPG (1:1).

Vesícula	ΔH	$\Delta T_{1/2}$	T_m
MLV	8,71	0,478	40,7
LUV	8,45	0,729	39,7
SUV	4,55	3,640	38,7

As MLVs apresentam uma pré-transição, além da transição principal (Figura 7C). A pré-transição corresponde às primeiras mudanças estruturais observadas na bicamada, ou seja, a passagem da fase gel para a fase “ripple” (Figura 6). Esse processo

é pouco cooperativo, o que é refletido tanto na largura do pico quanto na energia necessária para que ocorra a transição (Tabela 3). Ao contrário, a transição principal, que ocorre entre as fases “ripple” e líquido-cristalina, apresenta pico bem estreito, indicando a alta cooperatividade do sistema (Figura 7C e Tabela 3). Cooperatividade de transição de fases lipídicas pode ser explicada como a expressão da quantidade de lipídios que se encontram em transição num mesmo momento e localização, ou seja, em um domínio (HEIMBURG, 2007). A alta cooperatividade das vesículas multilamelares se deve ao fato das mesmas apresentarem um pequeno raio de curvatura.

A pré-transição de fases não é observada nas vesículas unilamelares (Figuras 7A e 7B) e a transição principal ocorre em temperaturas menores, quando comparadas às MLVs (Tabela 3). Além disso, a transição principal é alargada, devido maior raio de curvatura, quando comparado ao de MLVs. As vesículas pequenas (SUVs) são, particularmente, menos instáveis que as LUVs e MLVs, o que pode ser observado pelos valores menores de T_m e ΔH^{cal} (Tabela 3).

Neste trabalho, estudamos o efeito da variação dos parâmetros experimentais do Calorímetro Diferencial de Varredura VP-DSC na transição de fases gel/líquido cristalina de MLV de Dipalmitoilfosfatidilcolina, haja vista que essas condições experimentais influenciam a forma dos picos de varredura, o que, por sua vez, pode alterar os parâmetros termodinâmicos da pré-transição e da transição principal. Essas variações podem levar a conclusões distorcidas sobre o sistema estudado.

Um dos fatores essenciais para o estudo de membranas é a dependência entre a largura dos picos de transição e a velocidade de varredura utilizada. BILTONEN & LICHTENBERG (1993) destacam que é muito difícil, senão impossível, comparar experimentos realizados em diferentes velocidades de varredura ou em diferentes equipamentos. Esses autores sugerem que as condições experimentais sejam bem definidas como um dos critérios de controle de qualidade de uma pesquisa com DSC, especificamente, no caso de transições cooperativas como ocorre com lipídios. Sendo assim, consideramos as análises feitas nesse estudo de suma importância, já que as mesmas fornecem informações seguras quanto a escolhas das melhores condições experimentais para termogramas de DPPC através do DSC.

Dessa forma, neste trabalho mostramos o efeito da velocidade de varredura, bem como de outros parâmetros do DSC que influenciam a largura dos termogramas, em bicamadas lipídicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da variação dos parâmetros experimentais do equipamento Calorímetro Diferencial de Varredura VP-DSC na transição de fases de MLVs de Dipalmitoilfosfatidilcolina.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito da velocidade de varredura.
- Estudar o efeito do filtro de aquisição de dados.
- Estudar o efeito do “feedback”.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O lipídio utilizado em todos os experimentos foi dipalmitoilfosfatidilcolina, (DPPC, Figura 2) obtido da Avanti Polar Lipids. Para a preparação de tampões, foram utilizadas glicina e tris base da Fisher Scientific, fosfato e citrato da Vetec Química Fina Ltda., e ácido bórico da Merck. Todos os reagentes eram grau P.A.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação de Vesículas Multilamelares (MLVs)

Para a obtenção dos filmes lipídicos, o DPPC foi pesado e colocado em um béquer, no qual foi adicionado 100 mL de clorofórmio (CHCl_3) em 0,000734g de DPPC para sua total solubilização. Após a solubilização, as amostras foram alíquotadas em tubos. Em seguida, passaram por secagem do clorofórmio com fluxo de nitrogênio gasoso. Posteriormente, esses tubos foram fechados com Parafilm[®] e colocados no freezer a 8 °C, podendo ser utilizados após 4 dias de estocagem para garantir a completa evaporação do clorofórmio. Após esse período, os filmes foram hidratados com um tampão no pH escolhido (ver detalhes na sec. 4), por 30 minutos em banho-maria a 46 °C, e depois foram submetidos à agitação no vórtex (AP56 da Phoenix) por 5 minutos, gerando, então, as MLVs. As amostras foram preparadas em concentrações iniciais de 1 mM ou 10 mM, em volume final de 1 mL.

3.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A transição de fase gel para fase líquido cristalina das vesículas de DPPC (MLV) foi analisada no microcalorímetro diferencial de varredura VP-DSC (Microcal, Llc).

O DSC mede a capacidade calorífica (C_p) de uma amostra, em relação a uma referência, quando a mesma é aquecida ou resfriada a uma taxa constante, controlada pelo equipamento.

O VP-DSC apresenta duas celas, uma denominada “referência” e a outra “amostra” (Figura 8), ambas confeccionadas com “Tantaloy”, uma liga metálica de excelente propriedade de troca de calor e alta resistência à temperatura e a ácidos fortes. Como o nome diz, na cela de amostra coloca-se a amostra a ser analisada e na de referência, o solvente onde essa amostra foi preparada. Caso na cela de amostra, por

exemplo, seja colocada uma amostra de MLV, na cela de referência é colocado somente o tampão utilizado para preparar a mesma. Assim, podemos obter as propriedades termodinâmicas dos lipídios, pois a medida de C_p se dá de forma “diferencial”, ou seja, mede-se a capacidade calorífica da amostra descontando-se aquela da referência,

Para essas medidas, o VP-DSC possui quatro resistências. Duas delas operam de forma contínua, mudando a temperatura do sistema em uma taxa controlada (ver abaixo a descrição de *scan rate*). As pequenas variações, na faixa de micro e nanocalorias, são compensadas por outras duas resistências, a DP (Differential Power) e a RP (Reference Power). As celas não se intercomunicam e, portanto, não trocam calor entre si. Portanto, DP e RP variam de forma distinta, já que as celas contêm amostras diferentes, mas de forma compensatória, a fim de manter a mesma temperatura em ambas as celas. Ou seja, a DP compensa a variação de temperatura entre as duas celas que ocorre devido à absorção ou liberação de calor pela amostra durante as transições.

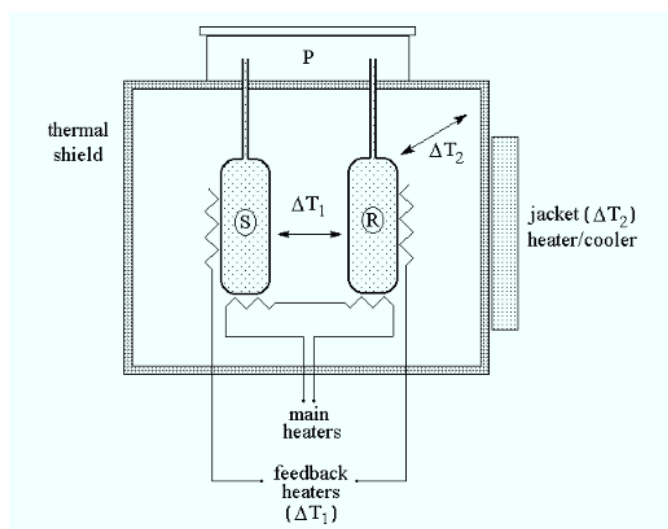


Figura 8: Esquema das celas no DSC no calorímetro VP-DSC. As celas de amostra (S) e de referência (R) estão contidas numa caixa quase-adiabática, tendo as resistências auxiliares (feedback heaters) e principais (main heaters) em contato com as mesmas. Cooper et al. (2000).

O painel de controle do VP-DSC (Figura 9) é o principal ponto de acesso para operação do instrumento. Esse equipamento realiza as varreduras de forma controlada por esses parâmetros disponíveis na janela de controles, os quais irão variar conforme se deseja alterar o modo de operação. Abaixo, encontra-se a descrição dos parâmetros, adaptada do manual de instrução do VP-DSC, pois os mesmos são o objeto desta pesquisa.

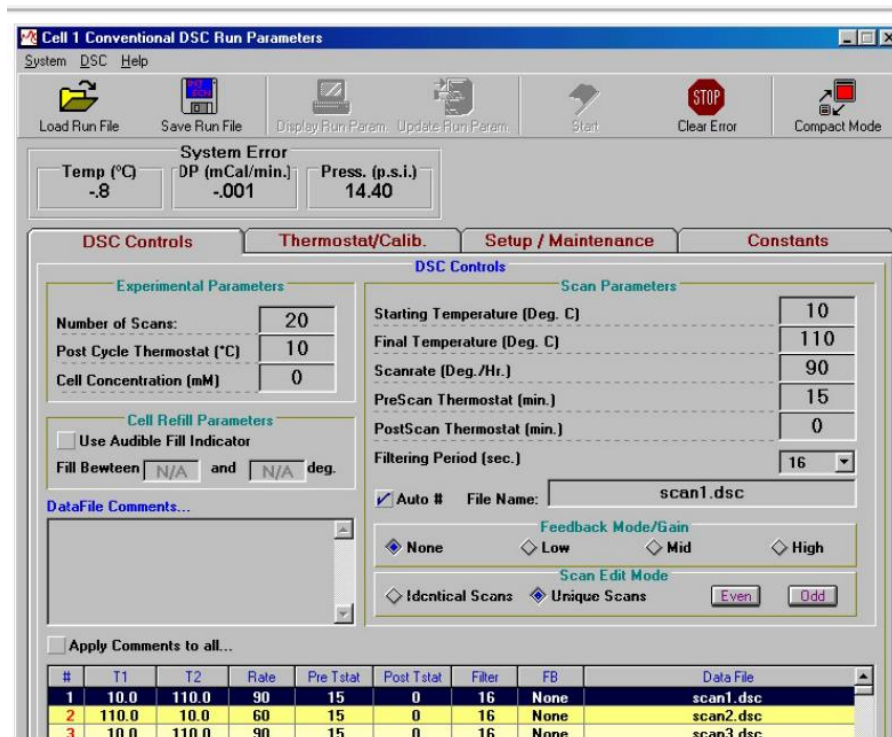


Figura 9: Painel de controle do DSC. Fonte: Manual do usuário do VP-DSC MicroCalorimeter.

O **número de varreduras** determina o número de corridas em cada série, que podem ser entre uma e duzentas, compreendendo varreduras de aquecimento (*upscans*) ou resfriamento (*downscans*). Quando é programado uma série de varreduras, todas serão iniciadas automaticamente, de forma sucessiva. O **termostato de pós-ciclo** indica a temperatura a qual o VP-DSC irá manter após a última corrida da série. No campo **concentração na cela**, incluímos a concentração (em mM) da solução na cela de amostra. O valor é armazenado nos dados dos arquivos e usado pelo programa de análise de dados nos vários cálculos analíticos disponíveis, como, por exemplo, na normalização dos dados. Esse valor é usado somente durante a análise de dados e não é necessário ser incluído se não estiver sendo analisada a performance da amostra, por exemplo, em corridas água/água e corridas para calibração. Se a concentração não for informada ou for informada incorretamente, poderá ser alterada no programa de análises.

No caso de ser selecionado o modo **“identical scans”**, todas as corridas terão os mesmos parâmetros daquela selecionada e no modo **“unique scans”**, é possível determinar parâmetros de varredura distintos em cada corrida. Ou seja, é possível realizar uma série de corridas idênticas ou diferentes. Nomesmo campo, é possível

selecionar os botões “**even**” e “**odd**” que permitem configurar facilmente o instrumento para alternar entre corridas de aquecimento ou resfriamento.

No campo “**scan parameters**” são determinadas as temperaturas inicial e Final da corrida. Se a temperatura inicial de uma corrida é menor que a sua temperatura final, a amostra irá aquecer e a varredura será um *upscan*. Caso contrário, a amostra irá resfriar e a varredura será um *downdscan*.

O **termostato pré-corrida** indica o tempo no qual será mantida a temperatura inicial antes de efetivamente iniciar-se a corrida, permitindo o equilíbrio do VP-DSC. Esse parâmetro pode afetar a repetitividade e a forma da linha de base, sendo o tempo mínimo recomendado, de 15 minutos. O **termostato pós-corrida** é o tempo no qual será mantida a temperatura até iniciar-se a próxima corrida. Esse tempo é tipicamente usado com propósitos específicos de modo a manter a as celas do DSC a uma alta temperatura por um período de tempo específico. Em geral, não há ganho na performance por ter se utilizado um termostato específico pós corrida durante a operação normal do DSC.

Os parâmetros mais importantes para este projeto são a **velocidade de varredura** e o **período de filtragem dos dados**. A velocidade de varredura é a taxa de variação de temperatura num intervalo de tempo, dado em graus por hora. Esse parâmetro aceita apenas valores positivos, sendo os *upscans* e *downdscans* distinguidos apenas por seus valores iniciais e finais de temperatura. Porém, é recomendável o máximo de 90 °C/h para *upscans* e 60 °C/h para *downdscans* para bons resultados.

O VP-DSC utiliza um filtro eletrônico do tipo Analógico-digital para o processamento e aquisição dos dados. O período de filtragem é o período de tempo utilizado no cálculo da média de um número de pontos do sinal gerado durante o mesmo, ou seja, o DSC gera constantemente uma corrente elétrica do DP. Porém, os dados são coletados em um intervalo de tempo definido pelo filtro. Por exemplo, caso o filtro seja de 10 s, o DSC calculará a média dos dados desse período, gerando um único ponto que será armazenado.

O **ganho (feedback)**, outro parâmetro avaliado neste projeto, determina o método e a magnitude de compensação cela-cela usada para o equilíbrio térmico entre a cela de amostra e a cela de referência. Cada um dos 4 modos de *ganho* é precalibrado. Quando o modo passivo (none) é escolhido, não haverá ativação da compensação cela-cela em resposta a diferentes temperaturas entre as celas de amostra e referência. O

equilíbrio das celas será ativado passivamente através da condução térmica e convecção. Apesar deste método fornecer a melhor sensibilidade (pouco ruído), ele também oferece a resposta mais lenta ao sinal de DP. Esse modo de feedback é mais apropriado para estudos com proteínas, pois apresentam picos alargados. Porém, é pouco utilizado.

Quando os modos *baixo* (low), *médio* (mid) ou *alto* (high) são escolhidos, esses irão ativar a compensação das celas em resposta a diferenças de temperatura entre elas. A cela mais fria sempre receberá (ganhará) a compensação e o montante compensatório de calor a partir de uma diferença de temperatura que irá depender do modo de feedback escolhido. Um ganho baixo fornecerá (gerará) menor compensação que um ganho médio. O alto ganho irá fornecer (produzir, gerar) o maior montante de compensação das celas, seja qual for a diferença de temperatura entre elas a partir da temperatura fornecida ao sistema. O resultado, quando se trabalha com o modo de ganho alto de feedback, será um tempo rápido de resposta, porém, com alto ruído nos dados de DP. Esse modo, e sua resposta, é necessário, normalmente, quando estudamos transições térmicas com picos muito estreitos. Os modos de baixo e médio feedback fornecem níveis intermediários de sensibilidade e tempos de resposta característicos, quando comparados aos modos de feedback “none/nenhum” e “high/alto”.

Por fim, podem ser adicionadas observações e comentários aos dados de cada corrida no campo “**comentários**”. Esses comentários serão salvos no arquivo dos dados e poderão ser vistos a partir do programa de análises ou a partir de qualquer editor de texto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito dos parâmetros experimentais na transição de fases de MLVs de DPPC foi estudado por calorimetria diferencial de varredura no equipamento VP-DSC da Microcal. Os parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das varreduras das vesículas estudadas foram as temperaturas de pré-transição (T_p) e de transição principal (T_m) além da entalpia calorimétrica da transição (ΔH^{cal}). Os parâmetros T_p e T_m , bem como a largura na meia altura dos picos de transição ($\Delta T_{1/2}$), são obtidos pela integração de cada um dos picos, separadamente.

A análise dos termogramas de transição de fases lipídicas foi realizada de acordo com Riske e colaboradores (2009), ou seja, a entalpia calorimétrica foi calculada pela área total da transição considerando os dois picos, de pré-transição e de transição principal.

4.1 Efeito da velocidade de varredura nas transições de fase de MLV de DPPC

Foram estudadas diferentes velocidades de varredura, a saber: 10, 12, 20, 30, 45, 60 e 90 °C/h, sempre no modo “upscan”. Todas as varreduras obedeceram a um equilíbrio (pré-termostato) de 15 minutos a 25 °C. Fez-se também uma última corrida, retornando-se à primeira velocidade utilizada, ou seja, 10 ou 12 °C/h, dependendo do experimento, de modo a averiguar a estabilidade da bicamada. Durante o estudo do efeito da variação nas velocidades de varredura, todos os outros parâmetros foram mantidos constantes. Considerando que os picos de transição de multibicamadas lipídicas, são normalmente estreitos, mantivemos um alto feedback e utilizamos filtro de 2 segundos. Foram utilizadas amostras com concentrações de 1 mM e 5mM.

A Figura 10 mostra o efeito da velocidade de varredura na transição de fases de MLV de DPPC. As vesículas multilamelares, como já descrito anteriormente, apresentam pré-transição e transição principal (Figura 7) e pode-se observar um gradual alargamento dos picos de transição à medida que se aumenta a velocidade de varredura. Esse efeito (alargamento) ocorre tanto na pré-transição quanto na transição principal e pode ser observado com maiores detalhes na Figura 11.

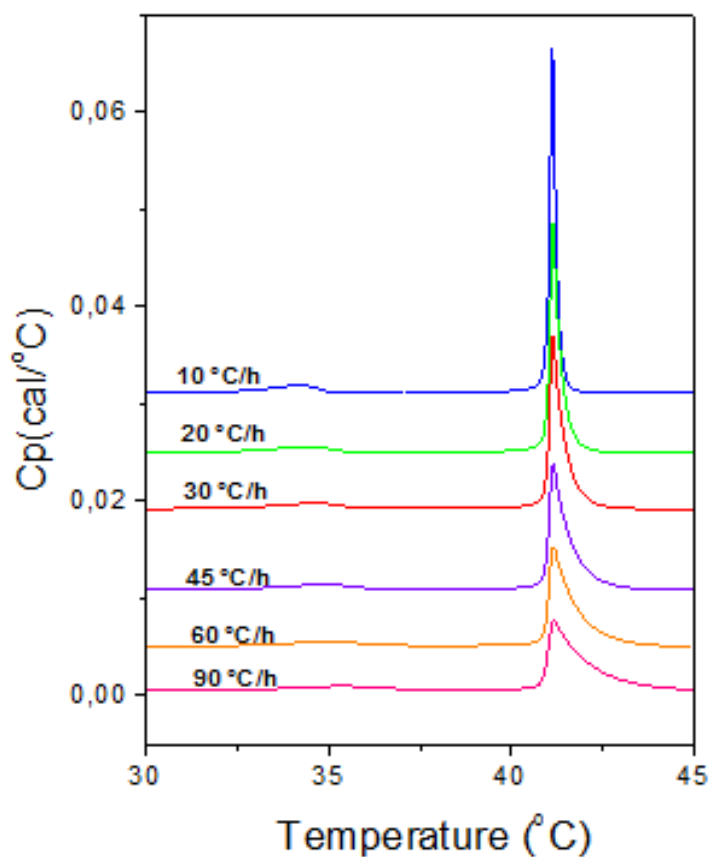


Figura 10: Efeito nos picos da pré-transição e da transição principal, em função do aumento das velocidades de varredura. Parâmetros de DSC: alto feedback e filtro de 2 segundos.

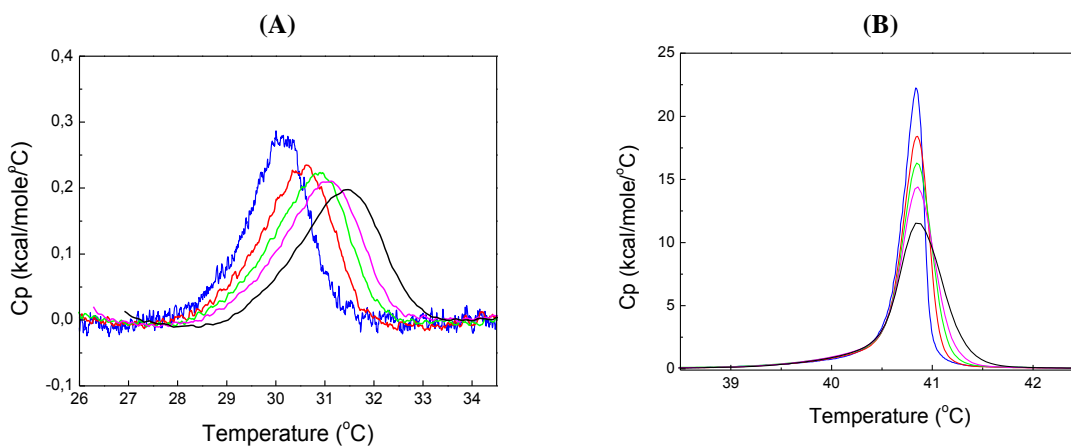


Figura 11: Efeito da velocidade de varredura na pré-transição (A) e transição principal (B) de DPCC. As varreduras foram obtidas em 12 (—), 30 (—), 45 (—), 60 (—) e 90 (—) °C/h, com alto feedback e filtro de 2 segundos.

O alargamento dos picos de transição ocorre com concomitante diminuição na altura dos mesmos. Consequentemente, a área dos picos da pré-transição e da transição principal praticamente não se alteram (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros termodinâmicos da pré-transição e da transição principal em função de diferentes velocidades de varredura

Velocidade de Varredura (°C/h)	ΔH^{cal} (kcal/mol)	Temperatura	
		Pré-transição	Transição Principal
10	8,07	30,00	40,83
20	8,02	30,62	40,85
30	8,33	30,90	40,84
45	8,18	31,11	40,85
60	8,08	31,47	40,83
90	7,83	30,14	40,81

Porém, a largura dos picos e, consequentemente, o $\Delta T_{1/2}$, sofre alterações consideráveis (Tabela 5). Observa-se que o efeito da velocidade de varredura na pré-transição e ocorre em ambas as transições, sendo que esse é muito mais evidente na transição principal. Na pré-transição há uma variação do $\Delta T_{1/2}$ ($\Delta \Delta T_{1/2}$) de até cerca de duas vezes e meia de seu valor inicial. Chamamos a atenção para o fato de que na transição principal, a variação do $\Delta T_{1/2}$ ($\Delta \Delta T_{1/2}$) chega a cerca de aproximadamente 5 vezes o valor inicial da mesma (Figura 12). Esse fato demonstra que o efeito da velocidade de varredura é muito maior na transição principal, evidenciando a diferença entre as mesmas.

Tabela 5: Largura dos picos da Pré-transição e da Transição Principal ($\Delta T_{1/2}$) em função de diferentes velocidades de varredura

Velocidade de Varredura (°C/h)	Pré-transição (°C)	Transição Principal (°C)
10	1,505	0,173
20	1,907	0,266
30	2,154	0,316
45	2,276	0,498
60	2,401	0,630
90	2,562	0,843

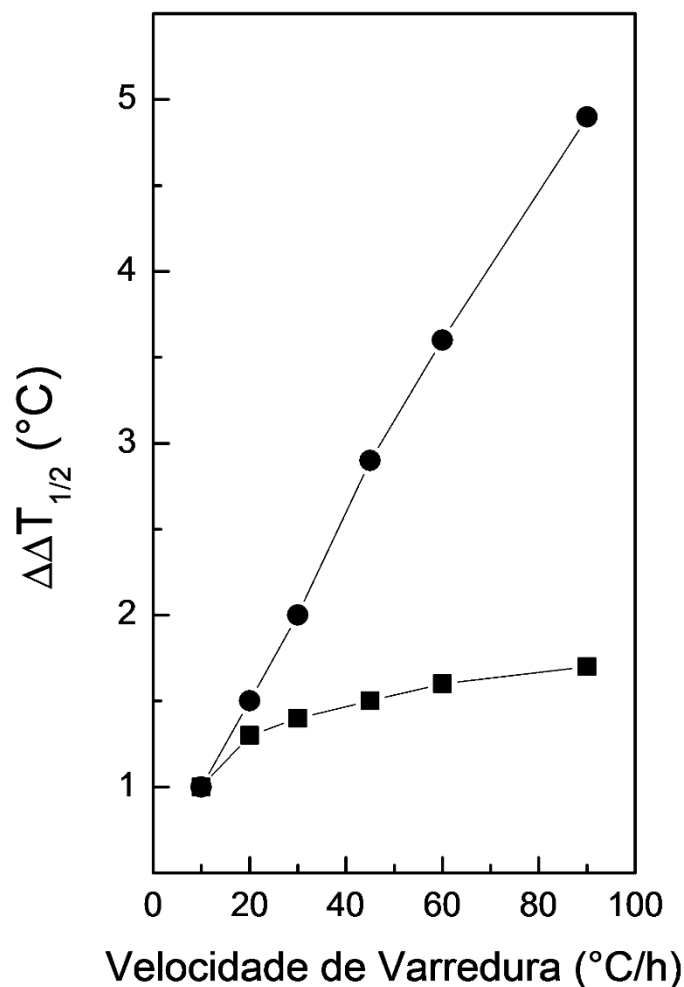


Figura 12: Variação de $\Delta T_{1/2}$ ($\Delta\Delta T_{1/2}$) em função da velocidade de varredura. Variação de $\Delta T_{1/2}$ em função da velocidade de varredura na pré-transição (■) e na transição principal (●).

Como comentado na Introdução (sec. 1.4), a largura dos picos está diretamente relacionada à cooperatividade da transição e a partir dos dados experimentais obtidos em DSC, é possível calcular a “unidade cooperativa” (equação 1), ou seja, o número de moléculas de lipídios que sofrem transição de fase simultaneamente. Podemos observar que o valor da unidade cooperativa, ou U.C., muda drasticamente com a mudança da velocidade de varredura (Tabela 6). O valor obtido em 12 °C/h é semelhante ao encontrado por Mabrey e Sturtevant (1976) de 260 lipídios na unidade cooperativa de DPPC.

Tabela 6: Efeito da velocidade de varredura no número de lipídios na unidade cooperativa durante a transição de fase de MLVs de DPPC

Velocidade de Varredura (°C/h)	Unidade Cooperativa	
	Pré-transição	Transição Principal
12	29	244
30	24	196
45	23	175
60	22	157
90	22	130

Foi observado o mesmo perfil nas amostras com varredura em 10 ou 12°C/h, sendo estas as condições ideais de estudo da transição principal de MLVs. Dessa forma, nos estudos do efeito de feedback e de intervalo de filtro, descritos a seguir, utilizamos 12 °C/h como velocidade de varredura padrão.

4.2 Feedback

O Feedback determina a magnitude de compensação cela-cela, usada para o equilíbrio térmico entre a cela de amostra e a cela de referência.

O VP-DSC apresenta 4 modos de feedback pré calibrados pelo fabricante. Quando o modo “none” (nenhum), ou passivo, de feedback é escolhido, não haverá ativação da compensação cela-cela em resposta à diferença de temperatura entre as celas de amostra e referência. O equilíbrio das celas será atingido “passivamente” através da condução e convecção térmica. Apesar de esse modo fornecer a melhor sensibilidade (pouco ruído), leva a uma resposta mais lenta do sinal de DP. Esse modo de feedback é apropriado para quase a totalidade dos estudos com proteínas que apresentam uma transição larga.

Quando os modos baixo (“low”), médio (“mid”), e alto (“high”) são escolhidos, esses irão ativar a compensação das celas em resposta à diferença de temperatura entre elas. A cela mais fria sempre receberá (ganhará) a compensação, sendo o montante compensatório de calor necessário para corrigir uma diferença de temperatura, dependendo do modo de feedback escolhido.

Um ganho baixo fornecerá (gerará) menos compensação que um ganho médio. O alto ganho(modos “high”), de feedback, irá fornecer (produzir, gerar) o maior montante de compensação das celas, seja qual for a diferença de temperatura entre as celas, a partir

da temperatura fornecida ao sistema. O resultado, quando se trabalha com o modo de ganho alto de feedback será um tempo rápido de resposta, porém com alto nível de ruído nos dados de DP. Esse modo, e sua resposta rápida são necessários, normalmente, quando estudamos transições térmicas com picos muito estreitos.

Os modos de feedback de baixo e médio ganhos fornecerão níveis intermediários de sensibilidade e tempo de resposta característicos, quando comparados aos modos de feedback “none” e “high”.

No estudo do parâmetro “feedback”, não observou-se alteração nos parâmetros termodinâmicos da pré-transição e da transição principal, mantendo-se estáveis os valores de T_p , T_m e ΔH^{cal} (Tabela 7). A variação do feedback praticamente não variou o perfil da pré-transição. Porém, apesar de não ter sido tão pronunciado como o observado com a variação da velocidade de varredura, houve um alargamento do pico da transição principal, como pode ser observado na Tabela 7 e Figura 13.

Tabela 7: Valores termodinâmicos em função das variações de feedback.

Fb	T_p (°C)	T_m (°C)	ΔH^{cal} (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
H	34,08	41,18	9,85184	0,1132
M	34,04	41,19	9,72058	0,1347
L	34,07	41,20	9,62046	0,1565
N	34,12	41,21	9,95293	0,2154

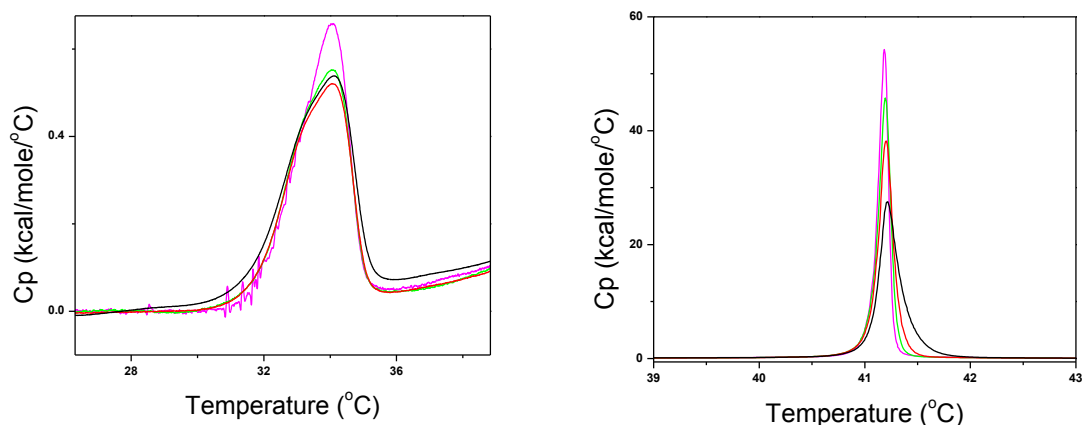


Figura 13: Efeito nos picos de pré-transição e transição principal, em função de diferentes feedbacks. Amostra com 5 mM de DPPC, pH 7.4 Tris, upscan, velocidade de varredura de 12 °C/h, filtro de 2 segundos. As varreduras foram obtidas com feedback em none (—), low (—), mid (—), high (—).

4.3 Intervalo de Filtro

O filtro define o período de tempo no qual é calculada a média dos dados medidos. Corresponde ao intervalo de tempo de aquisição de dados, ou seja, de transformação do dado analógico (constante) em um dado digital (média). O ponto gerado corresponde à média de todas as medidas no intervalo de tempo definido pelo filtro. Para transições alargadas, como ocorre com a desnaturação de proteínas, um intervalo de filtro entre 10 e 20 segundos é usualmente apropriado.

Foram analisados os filtros de 2, 8, 16 e 30 segundos. Apesar da variação de filtro não alterar os parâmetros termodinâmicos de forma significativa (Tabela 8), com o aumento gradativo do filtro, o pico perde, gradualmente, a resolução (Figura 14). A forma do pico de transição fornece informações importantes sobre a mesma, como, por exemplo, a cooperatividade do sistema, formação de domínios, entre outros. Portanto, não apenas os parâmetros termodinâmicos devem ser levados em conta ao analisarmos transições de fases lipídicas. Dessa forma, a escolha correta do filtro está correlacionada à uma resposta fiel ao comportamento da substância em análise.

Tabela 8: Valores termodinâmicos em função das variações de filtro.

F	T _P (°C)	T _m (°C)	ΔH _{cal} (kcal/mol)	ΔT _{1/2} (°C)
2	34,08	41,18	9,85	0,11
8	34,28	41,18	9,02	0,11
16	34,09	41,17	9,01	0,11
30	34,06	41,19	9,34	0,20

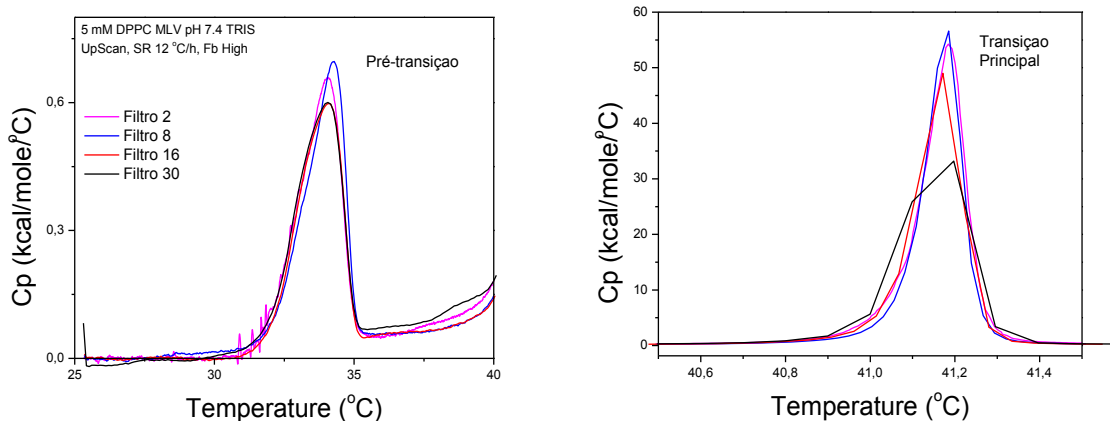


Figura 14: Efeito nos padrões termodinâmicos da amostra de DPPC em função da variação de filtro. O efeito de diversos filtros na pré-transição e transição principal. Os filtros de aquisição de dados utilizados foram 2 (—), 8 (—), 16 (—) e 30 (—).

4.4 Estabilidade das vesículas

Visto que nos experimentos feitos nesse estudo, principalmente quando estudamos a velocidade de varredura, uma mesma amostra é aquecida, resfriada e reauecida inúmeras vezes (de 4 a 7 vezes), foi necessário avaliar a estabilidade das MLVs. Nos experimentos onde o efeito da velocidade de varredura foi estudado, nos quais as amostras foram submetidas às velocidades de 10 a 90 °C/h, uma mesma amostra permanecia em torno de 6h no calorímetro (Tabela 8).

O calorímetro tem um sistema de termostato que trabalha para o equilíbrio térmico do sistema, o qual deve ser atingido antes do início do experimento. Isso ocorre em duas etapas de cerca de 1800 segundos (Figura 15).

A primeira etapa, relacionada ao equilíbrio eletro-eletrônico, tem duração de 15 a 20 minutos, dependendo da temperatura das celas antes do equilíbrio e da temperatura inicial do experimento. Durante essa etapa, ocorre a estabilização da temperatura do ambiente quase adiabático (Jacket). Assim que o equipamento atinge a temperatura inicial do experimento, inicia-se a etapa de equilíbrio do DP – ou seja, da corrente elétrica correspondente ao equilíbrio de temperatura da cela de amostra. A corrente elétrica do DP é “traduzida” em mili-calorias por minuto (Figura 16). Após essas duas etapas iniciam-se a varreduras da amostra. Essa estabilização é de extrema importância para que o sistema entre em equilíbrio, pois como dito acima, o mesmo é quase adiabático, e não totalmente, podendo sofrer, portanto, influencia da variação de

temperatura no ambiente físico onde se encontra. A segunda etapa, referente ao equilíbrio do DP, é importantíssima, visto ser necessária à estabilização da temperatura da amostra à temperatura na qual se iniciará o experimento.

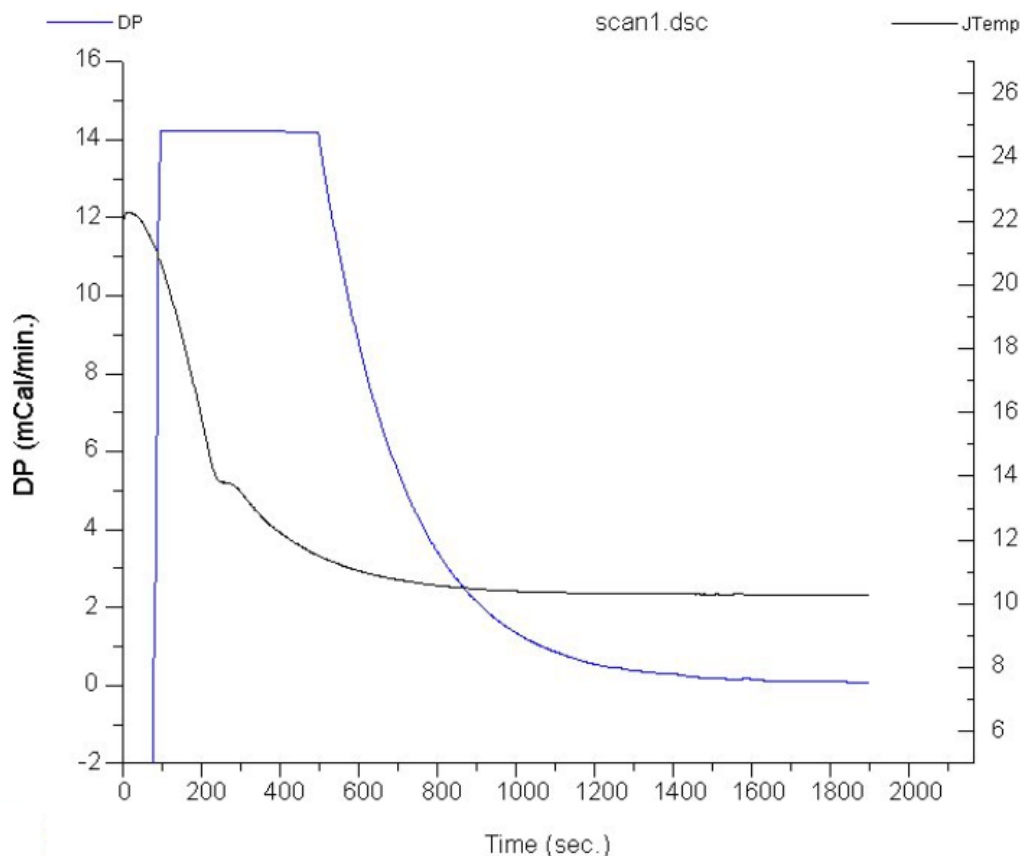


Figura 15: Tempo necessário para o equilíbrio da DP em função da temperatura inicial do calorímetro até a temperatura inicial para a varredura da amostra. A temperatura inicial do sistema (—) era cerca de 22 °C. Durante a variação de temperatura, o DP (—) manteve-se constante. A estabilização do DP iniciou assim que as celas atingiram a temperatura inicial do experimento, no caso, 10 °C. Fonte: Manual do usuário do VP-DSC calorimeter. DP e Temperatura.

Na figura 15, a temperatura inicial foi determinada em 10 °C. Podemos observar que foram necessários cerca de 20 minutos (1200 segundos) para atingir essa temperatura. Próximo a esse equilíbrio, observa-se uma variação significativa em DP. Em cerca de 11 °C, a DP diminui e em cerca de 30 minutos, tanto a temperatura quanto a DP estão equilibrados. Portanto, é necessário considerar que as amostras estarão na cela do calorímetro por cerca de 30 minutos antes do início da varredura em si.

No exemplo ilustrado na Figura 11, onde se estudou o efeito da velocidade de varredura, por exemplo, as amostras foram analisadas no intervalo de 25 a 45 °C, em

seis varreduras subsequentes, obtidas de 10 a 90°C/h. Todas as varreduras iniciaram após 15 minutos de pré-termostato a 25 °C. Considerando que o tempo de equilíbrio térmico do jacket e do DP pode variar de 20 a 30 minutos, foi necessário de 8 a 9 horas para que o experimento se completasse. Se considerarmos o tempo de resfriamento das amostras, o que ocorre entre cada varredura, o tempo total do experimento pode chegar a 10 horas.

Além do tempo longo de experimento, as amostras mudaram de fase (gel/líquido cristalino) em cada varredura. Isso poderia levar a mudanças estruturais das vesículas estudadas, como, por exemplo, no caso de ocorrer a fusão das mesmas. Dessa forma, ao final de cada estudo, foi realizada uma última varredura nas mesmas condições da primeira, a fim de averiguar a integridade das amostras.

Tabela 8: Tempo necessário para equilíbrio e varredura das amostras.

Velocidade de Varredura (°C/h)	Equalização Inicial (min)*	Pré-Termostato (min)	Tempo de Varredura (min)	Tempo total
10	20 a 30	15	120	
20	20 a 30	15	60	
30	20 a 30	15	40	
45	20 a 30	15	26,6	
60	20 a 30	15	20	
90	20 a 30	15	13,3	
Totais	120 a 180	90	279,9	8:10 h a 9:08 h

*20 a 30 minutos, dependendo da Temperatura Inicial da amostra.

As vesículas multilamelares se apresentaram estáveis, sem mudanças significantes nos parâmetros termodinâmicos estudados nesse trabalho, o que sugere sua estabilidade dentro dessa faixa de tempo, como mostrado na figura 16. Podemos observar neste exemplo que os termogramas obtidos na primeira e na última varredura, ambas em 12 °C/h se sobrepõem, indicando a estabilidade da amostra.

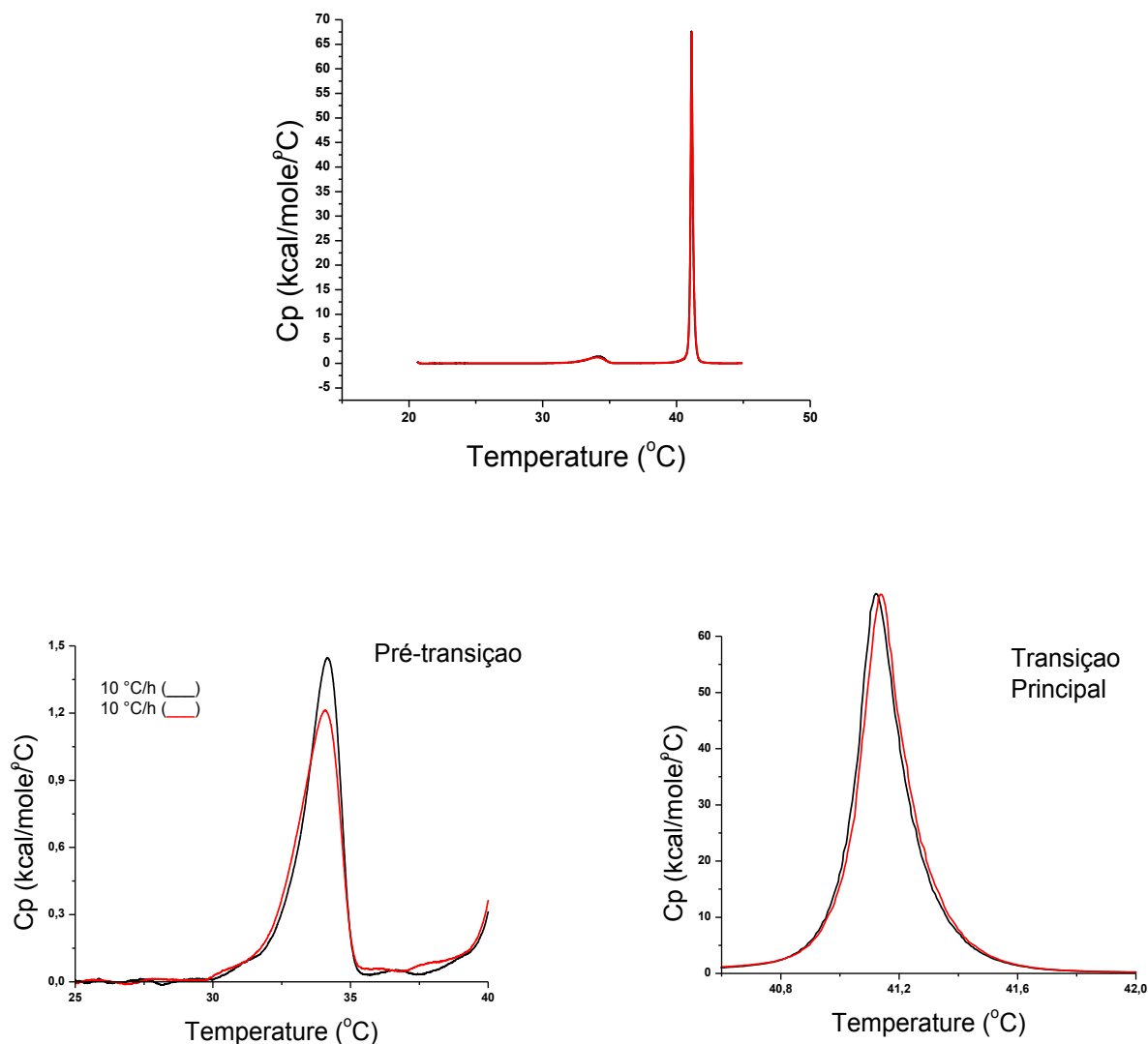


Figura 16: Sobreposição da primeira varredura e da sétima (última) varredura de uma mesma amostra. Abaixo em destaque a Pré-transição e a Transição Principal. As amostras foram analisadas a 10 °C/h, com filtro de 2 segundos e alto feedback. Primeira varredura (—) e última varredura (—).

Foi, também, analisada a estabilidade de MLVs de DPPC após o armazenamento na geladeira (8 °C) por um período de até seis dias (Figura 17). Nesse caso, foi observada uma mudança no perfil do termograma, com a perda da pré-transição e com a diminuição da altura do pico principal, devido a um alargamento do mesmo. Esses dados sugerem que as MLVs sofreram uma mudança estrutural, tornando-se semelhantes às vesículas unilamelares grandes, como mostrado na Figura 3.

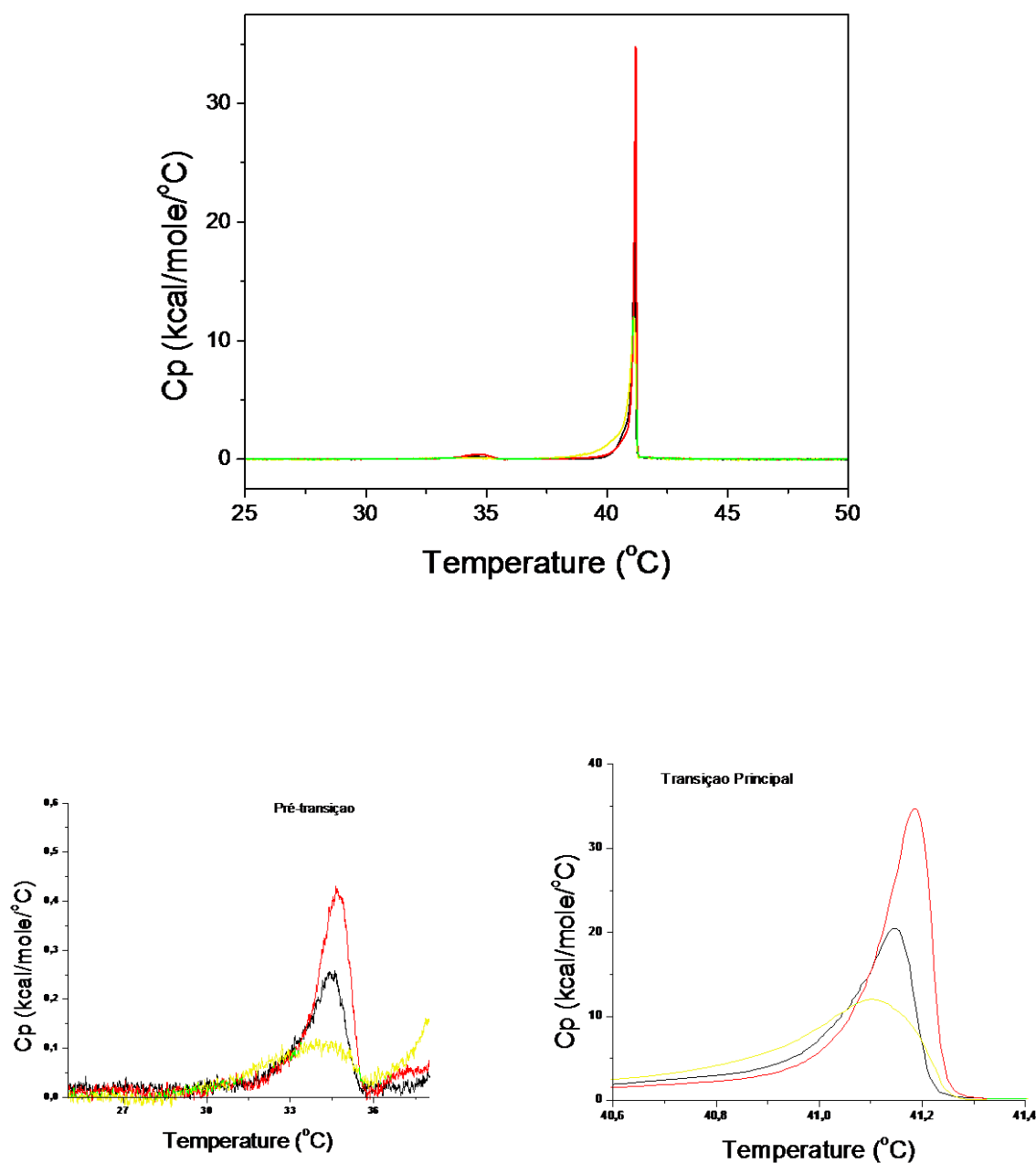


Figura 17: Varreduras de uma mesma amostra com diferentes dias de armazenamento em geladeira. Em destaque pode-se observar o efeito e diferentes dias de armazenamento na Pré-transição e na Transição Principal. Os termogramas foram obtidos no dia de preparo da amostra (—) e após 3 dias (—) ou 6 dias (—) de armazenamento na geladeira, a 8 °C. Os parâmetros do DSC foram: velocidade de varredura 10 °C/h, filtro de 2 segundos e feedback alto.

6. CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da variação dos parâmetros experimentais do Calorímetro Diferencial de Varredura VP-DSC na transição de fases de MLVs, mais especificamente, quanto ao efeito da velocidade de varredura, do efeito do filtro de aquisição de dados e quanto ao efeito do feedback. Este estudo permitiu concluir que:

- As velocidades de varredura de 10 ou 12 °C/h é a ideal para o estudo de transição de fases de gel para líquido cristalina das MLVs de DPPC, pois ambas apresentam os mesmos valores dos parâmetros analisados.
- As amostras de MLV de DPPC se mostraram estáveis após um ciclo de 8 a 9 horas de varreduras em diferentes velocidades.
- O alto feedback, apesar desse gerar mais ruído, foi o que apresentou a melhor condição para o estudo de picos estreitos para T_m , como os que são obtidos quando trabalhamos com MLV de DPPC.
- Foi possível observar, que apesar de não haver alterações significantes nos parâmetros termodinâmicos das amostras estudadas, o aumento no filtro de aquisição de dados levou a uma perda na definição do pico.

A partir deste estudo, apesar de ter sido realizado com um único lipídio (DPPC), mostra a importância da necessidade de se planejar, de forma bem elaborada, os parâmetros que serão utilizados para a obtenção de termogramas de DSC que ofereçam as melhores condições, a fim de se obter resultados que demonstrem os reais comportamentos dos mesmos.

Referências Bibliográficas

AKBARZADEH, A.; SADABADY, R.R.; DARAVAN, S.; JOO, S.W.; ZARGHAMIL, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; KOSHKIL, K.N. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* **8**, 102-110, 2013.

BERG, J.M.; TYMOCZO, J.L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 7ª edição-Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

BILTONEN, R.L. & LICHTENBERG D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids* **64**, 129-142, 1993.

HEIMBURG, T. *Thermal Biophysics of Membranes*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2007.

HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; JANOFF, A.S.; CULLIS, P.R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.40, p.89-107, (1986).

IBARGUREN, M.; LÓPEZ, D.J.; ESCRIBA, P.V. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochimica et Biophysica Acta*, Spain. *Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell's Physiology, Pathology and Therapy*, p.1518-1528, 2014.

MONTEIRO, N.; MARTINS, A.; REIS, R.L.; NEVES, N.M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the Royal Society –Interface*, November, 2016.

MOSCHO, A.; ORWAR, O.; CHIU, D.T.; MODI, B.P.; ZARE, R.N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles (liposomes/encapsulation/proteoliposomes/transport). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 11443-11447, October 1996.

STUTERVANT, J.M. *Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry*. *Annual Reviews Physical Chemistry*, (38), p.463-488, 1987