



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

“Influência da Temperatura e de Aditivos na Matriz Fosfolipídica  
usada para incorporação de Fosfatases Alcalinas pela técnica de  
Langmuir-Blodgett”.

César Vanderlei Nascimento

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:  
**Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

“Influência da Temperatura e de Aditivos na Matriz fosfolipídica  
usada para incorporação de Fosfatases Alcalinas pela técnica de  
Langmuir-Blodgett”.

César Vanderlei Nascimento

Orientadora: Maria Elisabete Darbello Zaniquelli

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:  
**Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2007

Nascimento, César Vanderlei  
“Influência da temperatura e de aditivos na matriz fosfolipídica usada para incorporação de Fosfatases Alcalinas pela técnica de Langmuir-Blodgett”.

Páginas p61: il. ; 30cm  
Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Zaniquelli, Maria Elisabete Darbello

1. filmes Langmuir-Blodgett. 2. trealose. 3. fosfatase alcalina

À DEUS, pela vida.

Ao meu pai (*in memoriam*), por tudo que fez, mais que um pai era um amigo.

À minha mãe, pelo amor e pela dedicação.

À minha esposa, pela compressão e companheirismo.

À minha filha, por todos os momentos de alegria que me proporciona.

Aos meus irmãos, por tudo que já passamos e vamos passar juntos.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli, pela oportunidade e pela ótima orientação sempre que precisei.

À professora Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel, ao professor Dr. Francisco de Assis Leone e ao Douglas Masui pelos experimentos de cinética enzimática e pelas enzimas cedidas.

Aos grandes amigos de laboratório, Diego, Thais, Mario, Rafael, Walter, Stopa, Tchou, Tati e Thaty. Em especial ao Luciano, pelos meus primeiros passos nos experimentos com a Cuba e a Ana pela boa convivência e pelo tempo comigo gasto.

Aos amigos da moradia e da minha turma de calouro.

À PCARP pela moradia e alimentação na época de graduação.

À Capes pelo financiamento.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS .....	1
1.2. SISTEMAS BIOMIMÉTICOS DE MEMBRANAS .....	4
1.3. MICELAS .....	4
1.4. LIPOSSOMOS .....	5
1.5. MONOCAMADAS .....	6
1.5.1. ISOTERMAS DE PRESSÃO DE SUPERFÍCIE .....	7
1.5.2. FILMES DE LANGMUIR –BLODGETT E MICROBALANÇA A CRISTAL DE QUARTZO.....	10
1.5.3. EFEITO DA TEMPERATURA EM MONOCAMADAS DE LANGMUIR .....	13
1.5.4. EFEITO DE ELETRÓLITOS .....	15
1.5.5. EFEITO DE AÇÚCARES .....	16
1.5.6. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM MONOCAMADAS DE FOSFOLIPÍDIOS .....	16
1.6. FOSFATASES ALCALINAS .....	18
1.6.1. FOSFATASE ALCALINA EXTRAÍDA DE PLACA ÓSSEA DE RATOS .....	19
1.6.2. FOSFATASE ALCALINA EXTRAÍDA DE FUNGO .....	21
1.7. TREALOSE .....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. GERAIS .....	26
2.2. ESPECÍFICOS .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS FOSFATASES ALCALINAS .....	27
3.2. PURIFICAÇÃO DA TREALOSE .....	27
3.3. CURVAS DE PRESSÃO SUPERFICIAL .....	28
3.4. PREPARO DE FILMES LB .....	30
3.4.1. PREPARO DE FILMES LB DE DMPA .....	30
3.4.2. PREPARO DE FILMES LB MISTOS DMPA/PROTEÍNA.....	30
3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES E MEDIDAS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1. ISOTERMAS SUPERFICIAIS PARA MONOCAMADAS DE DMPA FORMADA SOBRE ÁGUA PURA E ÍONS ZINCO .....	32
4.2. ISOTERMAS SUPERFICIAIS FORMADAS SOBRE TREALOSE.....	36
4.3. ISOTERMAS SUPERFICIAIS PARA MONOCAMADAS MISTAS DMPA/PROTEÍNA .....	44
4.4. INCORPORAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA EM FILMES LB DE DMPA.....	49
4.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	54
4.5.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA PARA A DSAP .....	54
4.5.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA PARA A CNCAP .....	56

<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação simplificada de uma molécula anfifílica	1
Figura 2: Modelo simplificado para uma membrana biológica mostrando os lipídios e as proteínas de membrana	3
Figura 3: Estrutura de uma micela esférica	5
Figura 4: Estrutura de um lipossomo	5
Figura 5: Representação de uma monocamada	6
Figura 6: Esquema de um experimento na cuba de Langmuir	8
Figura 7: Ilustração esquemática do método de Langmuir-Blodgett para a fabricação de filmes.	10
Figura 8: Filmes tipos X,Y e Z obtidos pelo método de Langmuir-Blodgett	11
Figura 9: Esquema de um cristal de quartzo recoberto com ouro (eletrodos) usado para nanogravimetria.	11
Figura 10: Ilustração comparando isotermas PV entre os estados gasoso e líquido e isotermas $\pi$ -A entre os estados líquido-expandido e líquido condensado	14
Figura 11: Alguns exemplos de fosfolipídios	17
Figura 12: Estrutura proposta para a fosfatase alcalina de placenta humana	19
Figura 13: Obtenção das duas formas da fosfatase alcalina extraída de placa óssea de ratos	20
Figura 14: Estrutura da $\alpha,\alpha$ -1,1- trealose	22
Figura 15: Esquema da Cuba de Langmuir usada nesta Dissertação	29
Figura 16: Formação de Filmes LB mistos: Monocamada mista (A) e recobrimento por imersão (B)	31

Figura 17: Curvas de pressão superficial para monocamadas de DMPA preparadas sobre água pura, a várias temperaturas: 10°C ( $\Delta$ ), 15°C ( $\square$ ) e 25°C ( $\circ$ )	32
Figura 18: Curvas de pressão superficial para monocamadas de DMPA preparadas sobre solução de íons zinco ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a várias temperaturas: 10°C ( $\circ$ ), 15°C ( $\Delta$ ) e 25°C ( $\square$ )	34
Figura 19: Comparação das isotermas para monocamadas de DMPA obtidas a 10°C na presença ( $\square$ ) e ausência de íon divalente ( $\circ$ )	34
Figura 20: Efeito da presença de TRnp ( $10 \text{ mmol. L}^{-1}$ ) na subfase das monocamadas de DMPA formadas a várias temperaturas: 25°C ( $\square$ ), 15°C ( $\circ$ ) e 10°C ( $\Delta$ )	36
Figura 21: Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA formadas sobre e soluções aquosas de: TRnp ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) ( $\circ$ ) e $\text{Zn}^{2+}$ ( $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) ( $\square$ )	38
Figura 22: Isotermas superficiais em subfase para o DMPA a 25 °C em subfase: água ( $\square$ ) e trealose purificada ( $\circ$ )	40
Figura 23: Isotermas superficiais em subfase água para: impureza da trealose (Sigma) ( $\square$ ), DMPA/impureza ( $\circ$ ) e DMPA em subfase TRnp ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) ( $\Delta$ ), todas a 25°C	40
Figura 24: Espectro na região do infravermelho por transmissão para a impureza extraída da trealose	42
Figura 25: Espectro de infravermelho por usando pastilhas de $\text{CaCl}_2$ para trealose purificada	43
Figura 26: Efeito da adição de DSAP ( $7,6 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) ( $\circ$ ) na subfase da monocamada de DMPA ( $\square$ ) a 25°C. A razão molar fosfolipídio: proteína é de 15000:1	44
Figura 27: Efeito da temperatura na monocamada mista DMPA/DSAP: 25°C ( $\circ$ ) e 10°C ( $\square$ )	45
Figura 28: Efeito da temperatura na isoterma da DSAP :25°C ( $\circ$ ), 15°C ( $\Delta$ ) e 10°C ( $\square$ )	46

Figura 29: Efeito da adição de TRnp (10 mmol.L <sup>-1</sup> ) (□) na subfase de DMPA/DSAP (○) à 25 <sup>0</sup> C	47
Figura 30: Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA/DSAP:em subfase de TRnp (10mmol L <sup>-1</sup> ) a 25°C (Δ) e 10°C (▼) e em água a 25°C (□) e 10°C (○)	47
Figura 31: Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA/CNCAP:em subfase de TRnp (10mmol L <sup>-1</sup> ) a 25°C (□) e 8°C (○) e em água a 25° (▼) e 8°C (Δ)	48
Figura 32: Efeito da temperatura na massa total depositada para filmes LB: DMPA/TRnp a 25°C (▲) e 10°C(▼), DMPA/Zn <sup>2+</sup> a 25°C (■) e 10°C (●)	50

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de valores característicos para monocamadas de DMPA formadas sobre diferentes subfases e a 25°C	39
Tabela 2: Massas depositadas das enzimas DSAP e CNCAP immobilizadas sobre filmes LB de DMPA, contendo íons zinco ou TRnp na subfase, em diferentes temperaturas	53
Tabela 3: Atividade enzimática da fosfatase alcalina DSAP na hidrólise do PNPP a 37°C	55
Tabela 4: Atividade enzimática da fosfatase alcalina CNCAP na hidrólise do PNPP a 37°C	57

## RESUMO

As fosfatases alcalinas são enzimas que participam da atividade catalítica na hidrólise de ésteres fosfóricos. Nesta Dissertação, investigou-se a sua adsorção em monocamadas de Langmuir e também em filmes do tipo Langmuir-Blodgett (LB) de fosfolipídios em diferentes temperaturas. Esses sistemas são considerados como modelos para membranas biológicas. O efeito de um dissacarídeo (trealose), bem como as impurezas contidas na amostra do açúcar, foi testado na subfase que suporta a monocamada. Constatou-se que a trealose não purificada altera a isoterma superficial de monocamadas do sal de sódio do ácido dimiristoilglicerofosfatídico, DMPA, e atua como um bom agente de ligação entre camadas sucessivas do fosfolipídio para a obtenção de filmes LB. Já para trealose purificada não se observaram esses efeitos. A caracterização das impurezas foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho e por absorção atômica, detectando-se a presença de moléculas anfífilas e de íons metálicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), respectivamente. Dois tipos de fosfatases alcalinas foram usadas: uma purificada de placa óssea de ratos por extração com tensoativo não-iônico, chamada de DSAP e outra purificada de conídia de *Neurospora crassa*, denominada CNCAP. As interações com o fosfolipídio foram estudadas por meio das mudanças nas curvas  $\pi$ -A e a adsorção em filmes LB de DMPA/ $\text{Zn}^{2+}$  e DMPA/trealose, por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo (QCM). A presença das enzimas nos filmes foi também comprovada pela detecção de suas atividades catalíticas na hidrólise do PNPP (*p*-nitrofenilfosfato). Para a DSAP, a melhor atividade foi obtida quando a imobilização da proteína ocorreu à baixa temperatura (10° C).

## ABSTRACT

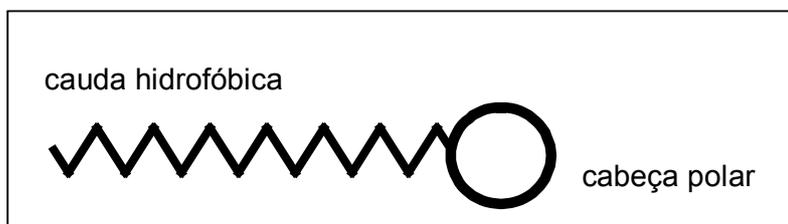
Alkaline phosphatases (AP) are unspecific enzymes that hydrolyze phosphate esters. In this Dissertation we have studied the adsorption of two forms of AP in phospholipid Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films, considered as biomembrane models, at different temperatures. Further, the effect of the presence of a disaccharide, trehalose, as well as some impurities present in its commercial form, in the subphase of the monolayers was tested. We concluded that the use of trehalose without further purification alters the surface pressure-area ( $\pi$ -A) curves of the monolayers. In addition, it acts as a good linking agent between successive layers in the Langmuir-Blodgett films of the sodium salt of 1,2 dimirystoyl-sn-glicero-3-phosphate acid, DMPA. In the presence of purified trehalose instead, these effects were not observed. No difference was noticed in the  $\pi$ -A curves of DMPA for trehalose concentrations between  $10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> to 0.1 mmol L<sup>-1</sup>. The characterization of the impurities by atomic absorption and infrared spectroscopy reveal the presence of amphiphilic compounds as well as electrolytes such as: sodium, magnesium, calcium and potassium. Two forms of AP were used: one purified from rat osseous plates using detergent solubilization, named DSAP, and the other from *Neurospora crassa* conidia, CNCAP. Enzyme interaction with phospholipids was followed by changes in  $\pi$ -A curves, and their adsorption on DMPA/Zn<sup>2+</sup> or DMPA/trehalose LB films using the quartz crystal microbalance technique, QCM. Their presence within the films was also monitored by catalytic activity assays, using PNPP (p-nitrophenylphosphate) as hydrolysis substrate. For DSAP, the highest enzymatic activity was observed when the immobilization was carried out at low temperature (10° C).

## 1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação apresentará um estudo sobre a influência da temperatura e de aditivos na matriz fosfolipídica onde fosfatases alcalinas são incorporadas. A matriz consiste de monocamadas líquidas que são transferidas para suportes sólidos formando filmes finos e orientados. Estes constituem sistemas biomiméticos de membranas biológicas. Apresentaremos nesta Introdução alguns conceitos básicos e uma descrição do sistema estudado. A relevância desse trabalho está ligada aos inúmeros sistemas usados industrialmente como bio-reatores ou biosensores que empregam enzimas imobilizadas.

### 1.1. Membranas Biológicas

Os maiores componentes de uma membrana celular são proteínas e lipídios, sendo que os lipídios são organizados em camadas duplas e as proteínas inserem-se ou ligam-se de diferentes maneiras a essa bicamada. De uma maneira bastante fundamental, a força motriz para a formação dessas estruturas é o chamado efeito hidrofóbico (Israelachvili 1985), de natureza entrópica, que ocorre sempre que temos, em ambiente aquoso, a presença de moléculas anfifílicas, ou seja, aquelas com partes polar e apolar separadas em sua estrutura.



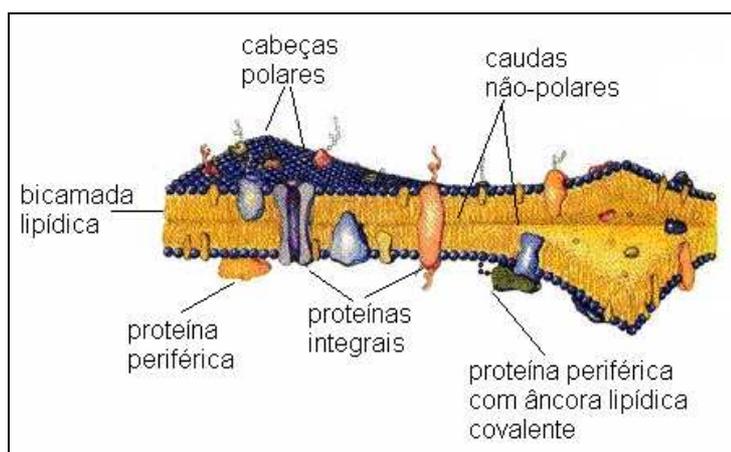
**Figura 1: Representação simplificada de uma molécula anfifílica.**

Todas as membranas possuem estrutura similar (Figura 2), com o interior hidrocarbônico (baixa densidade eletrônica) e a superfície da membrana (face extracelular) contendo os grupos polares. A composição depende do organismo, mas sempre a quantidade de lipídios é maior, os tipos de lipídios de membranas são diversos, os mais comuns são os fosfolipídios, glicerolipídios e esfingolipídios. Um modelo para a estrutura de uma biomembrana, que ainda é aceito atualmente, foi proposto em 1972 (Singer et al 1972,), nomeado de “mosaico fluido”. Esse tipo de modelo propõe que as proteínas integrais de membrana possuam grupos laterais de aminoácidos hidrofóbicos na sua superfície, o que as forçaria a “dissolverem” na porção hidrofóbica central da bicamada. Por outro lado, o modelo propõe que as proteínas periféricas ou extrínsecas das membranas tenham essencialmente os seus grupos laterais hidrofílicos na superfície, ligados por atração eletrostáticas às cabeças polares eletricamente carregadas dos lipídios da bicamada. As proteínas integrais de membrana podem se tornar inativas quando fora da matriz hidrofóbica da bicamada a qual confere a conformação tridimensional apropriada para sua atividade.

O modelo do mosaico fluido admite ainda que as proteínas da membrana se movam lateralmente. As proteínas periféricas flutuam na superfície da bicamada, enquanto as proteínas integrais estão quase completamente inseridas ou submersas na base hidrocarbonada. Entretanto, a liberdade das proteínas de membrana de se moverem lateralmente na bicamada de lipídios pode ser restrita pela atração entre proteínas funcionalmente relacionadas, formando aglomerados. Dessa forma, forma-se um mosaico, ou padrão de superfície, das proteínas da membrana no fluido da bicamada de lipídio. Mais recentemente sugeriu-se que os aglomerados de proteínas da membrana possam se mover

lateralmente na bicamada, o que explicaria o fato que no ciclo de vida de alguns organismos celulares, certas proteínas de membrana sejam encontradas em zonas específicas da membrana. Estudos recentes sobre membranas biológicas (Engelman 2005) mostrou que proteínas e lipídios tendem a se reorganizar constantemente para melhor favorecer suas interações e que possíveis distorções na estrutura podem ocorrer implicando em diferentes tipos de recobrimento da membrana pelas proteínas, espessura variável e alta fluidez das proteínas como dos lipídios.

As interações entre proteínas e lipídios de membrana podem ser de diversos tipos: eletrostáticas, de Van der Waals, ligação de hidrogênio ou ainda, covalente. Mais recentemente um tipo de enzima que vem sendo estudado cada vez mais corresponde às proteínas que se ligam à membrana por meio de uma âncora hidrofóbica, que se insere na bicamada lipídica, enquanto que a estrutura peptídica permanece solvatada e voltada para o meio extra ou intra-celular, dependendo da enzima, como é o caso de algumas formas de *fosfatase alcalina* que se ligam aos lipídios da membrana por meio de uma âncora constituída de uma porção polissacarídica e outra hidrofóbica.



**Figura 2: Modelo simplificado para uma membrana biológica mostrando os lipídios e as proteínas de membrana (adaptado de Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.;**

**Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p. Tradução de: Principles of Biochemistry 1)**

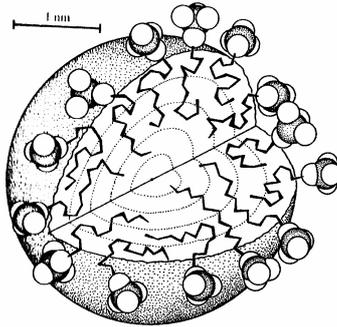
## **1.2. Sistemas biomiméticos de membranas**

Da mesma forma que na natureza, *in vitro* moléculas anfifílicas sofrem processo de auto-organização, fornecendo diferentes estruturas como micelas, lipossomos, monocamadas e bicamadas suportadas. Estas estruturas (**Fendler et al 1995**) podem mimetizar vários aspectos de uma biomembrana, permitindo o estudo da organização molecular e de como a mesma influencia em certas funções como: reconhecimento molecular, atividade catalítica, etc.

Essa Dissertação está relacionada com monocamadas formadas na interface líquido/ar e multicamadas suportadas em sólidos, mas vamos apresentar aspectos básicos dos outros tipos de agregados.

## **1.3. Micelas**

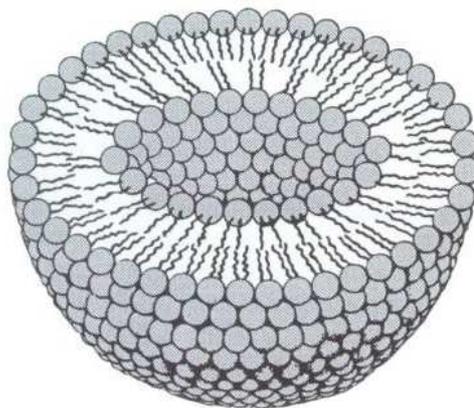
Formam-se quando moléculas anfifílicas são solubilizadas em água; a parte polar interage fortemente com a água e mantém a porção hidrofílica preferencialmente em contato com a água, excluindo o contato da parte hidrofóbica com o solvente. O resultado é um agregado globular que pode evoluir para cilíndrico. A geometria do agregado formado depende das interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, eletrostáticas e de Van der Waals) e de alguns parâmetros geométricos das moléculas.



**Figura 3: Estrutura de uma micela esférica**

#### **1.4. Lipossomos**

São definidos como uma estrutura de bicamadas de lipídios ou fosfolipídios, que formam uma vesícula contendo um compartimento interno aquoso. O estado físico e a composição lipídica dependem do processo de preparação, sendo possível obter vesículas de diferentes tamanhos. Vários métodos são usados para preparar lipossomos, um passo comum entre todos eles consiste na evaporação do solvente orgânico no qual os lipídios são geralmente dissolvidos.

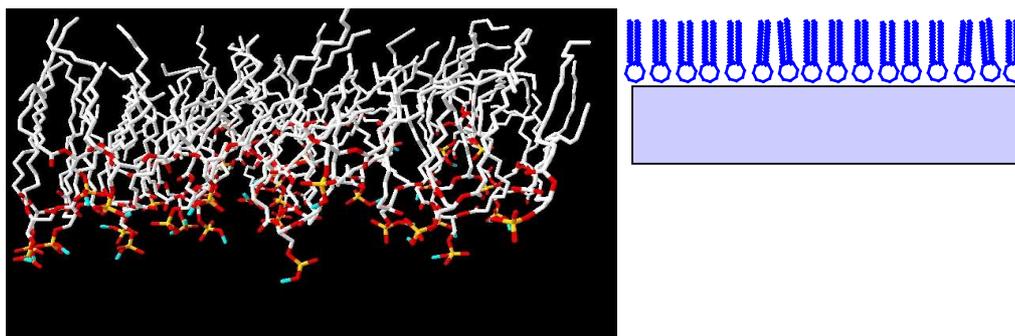


**Figura 4: Estrutura de um lipossomo**

### 1.5. Monocamadas

Muitos tipos de moléculas anfifílicas (insolúveis) podem se orientar na interface ar-água, as cadeias dos hidrocarbonetos são hidrofóbicas e as cabeças polares são hidrofílicas, fazendo com que a interação hidrofóbica induza a uma associação molecular com a exposição das cabeças polares para a fase aquosa, posicionando a parte apolar em contato com o ar, orientando-se dessa forma na interface para diminuir sua energia livre, por isso essas moléculas são também chamadas de tensoativas (ativas na superfície).

Geralmente são usados ácidos graxos e fosfolipídios de cadeia longa (mais que doze carbonos), essas monocamadas insolúveis são denominadas monocamadas de Langmuir (Langmuir 1917) que podem ser estudadas utilizando-se da técnica desenvolvida por Irving Langmuir, que consiste em um compartimento revestido internamente de um material hidrofóbico (Cuba de Langmuir) que é preenchido com água ou solução aquosa, sobre a qual se espalha a substância tensoativa em pequenas concentrações ( $1 \cdot 10^{-4}$  a  $2 \cdot 10^{-3}$  M) dissolvida em solvente orgânico. Após evaporação do solvente, ocorrerá a formação de um filme de espessura monomolecular (Ariga et al 2006).



**Figura 5: Representação de uma monocamada (adaptado de Tieleman et al 2000)**

Monocamadas de fosfolipídios têm sido tradicionalmente estudadas como modelos de membranas biológicas (McConnell et al 1991; Mohwald et al 1990; Caseli et al 2005). Uma biomembrana pode ser considerada como duas monocamadas fracamente acopladas. Investigações sobre monocamadas indicam que fosfolipídios espalhados em uma interface ar/água podem consistir um bom modelo para descrever diferentes aspectos. Como vantagem, neste tipo de sistema, a densidade molecular bidimensional e as condições iônicas da subfase podem ser mudadas, bem como a temperatura e sua composição.

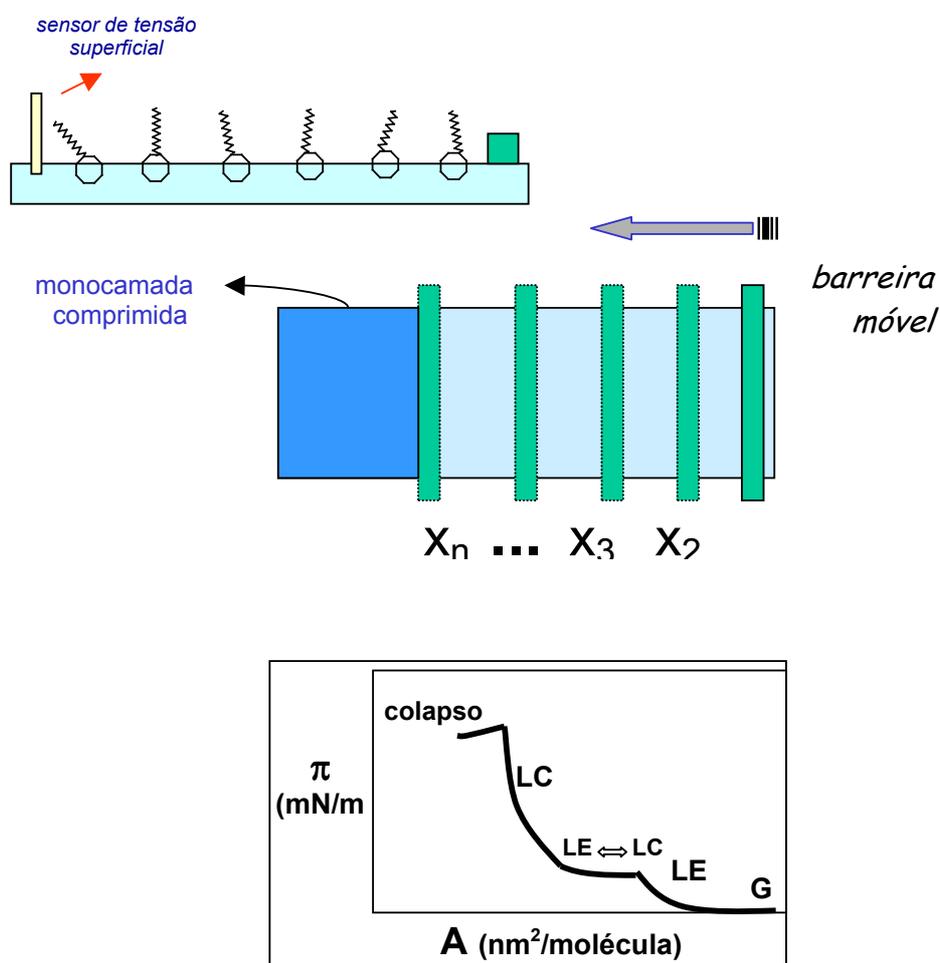
Interações das moléculas anfífilas formadoras das monocamadas com substâncias presentes na subfase, tais como: sais, peptídeos, açúcares, podem ser estudadas. Pode-se preparar monocamadas mistas (fosfolipídios e proteínas) espalhando-se uma solução orgânica que contenha o fosfolipídio e a proteína de interesse, no entanto esse método pode proporcionar a desnaturação da estrutura protéica. Um outro método consiste no espalhamento de uma solução orgânica contendo apenas o fosfolipídio, seguido da injeção da solução aquosa de proteína na subfase; após essa etapa a proteína, por difusão, irá à interface.

### **1.5.1. Isotermas de pressão de superfície**

Ao espalhar alguma substância tensoativa sobre uma solução aquosa, com uma tensão superficial  $\gamma_0$ , esta poderá ser reduzida a  $\gamma$ . A diferença entre a tensão superficial sem a monocamada e a tensão superficial com a cobertura da monocamada fornece uma pressão de superfície,  $\pi$ .

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

Sabendo a concentração e o volume da solução de tensoativo espalhada sobre uma conhecida área da superfície da solução aquosa, é possível determinar a área disponível por molécula. Assim com o deslocamento de uma barreira móvel comprimindo a monocamada formada, é possível determinar a variação da pressão de superfície com a diminuição da área média disponível por molécula. Desta forma, a uma temperatura constante, o gráfico de pressão de superfície contra a área disponível por molécula representa uma isoterma de pressão superficial ou, simplesmente, isoterma superficial.



**Figura 6:** Esquema de um experimento na cuba de Langmuir, *topo*: vista lateral da cuba, mostrando as moléculas do tensoativo formando a monocamada; *meio*: vista de cima da cuba, evidenciando a compressão da monocamada com a

**barreira móvel e, por último um exemplo de isoterma  $\pi \times A$ , mostrando os estados superficiais nos diferentes estágios de compressão da monocamada: G= gasoso, LE= líquido expandido e LC = líquido-condensado**

Dependendo do estágio de compressão, podemos observar diversos comportamentos relacionados com os diferentes estados físicos bidimensionais (de forma análoga aos estados tridimensionais em uma isoterma pressão-volume). Dessa forma associa-se cada estágio a um estado físico. Quando a pressão de superfície está em torno de zero, a interação entre as moléculas é pequena e o número de graus de liberdade elevado, devido a grande área disponível por molécula, tendo-se então o estado gasoso (G). Conforme se diminui a área por molécula, ocorre um aumento na pressão e atinge-se o estado líquido expandido (LE) e, quando esse aumento começa a ficar mais brusco, tem-se seqüencialmente os estados líquido condensado (LC) e sólido. Também é possível observar regiões onde a pressão de superfície permanece constante com a compressão, essa região corresponde à transição de fases, líquido-expandido para líquido condensado (LE-LC) por exemplo, onde as duas fases coexistem.

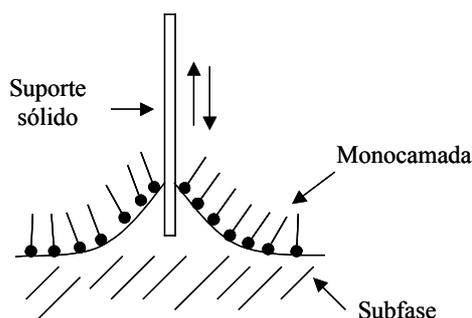
Após o estado sólido, chega-se a um ponto que a compressão da monocamada não consegue mais provocar a elevação da pressão superficial, sendo que essa permanece constante ou cai abruptamente quando sujeita a compressão adicional, esse ponto denomina-se colapso, que seria o “desmanche” da monocamada e o começo da formação de bicamadas ou multicamadas desordenadas.

Um parâmetro bastante utilizado para caracterizar monocamadas líquidas é a compressibilidade isotérmica de superfície,  $C_s$ , também definida de maneira análoga ao caso tridimensional,  $C_s = -A (\partial A / \partial \pi)_T$  ou o seu inverso, o módulo compressional,  $C_s^{-1}$ ,

que tem unidades de ( $\text{mN m}^{-1}$ ) e é identificado com a elasticidade dilatacional de equilíbrio de uma interface ou ao módulo de Young de monocamadas.

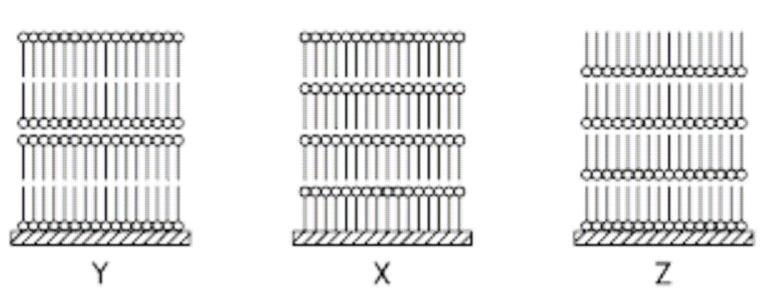
### 1.5.2. Filmes de Langmuir –Blodgett e microbalança a cristal de quartzo

A imersão ou emersão vertical de substratos sólidos através da monocamada no estado condensado forma os filmes de Langmuir-Blodgett ou filmes LB (Blodgett et al 1964), de tal forma que, cada imersão ou emersão proporciona a deposição de uma camada em cada lado do substrato.



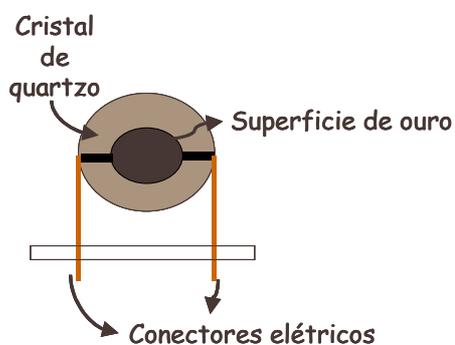
**Figura 7: Ilustração esquemática do método de Langmuir-Blodgett para a fabricação de filmes.**

Assim pode-se ter um controle na espessura do filme através do número de camadas transferidas. Dependendo do tipo de transferência obtêm-se três tipos de deposição: X, Y e Z (Figura 8). A emersão do substrato provoca a transferência preferencial pela parte polar (cabeça hidrofílica) e a imersão pela parte apolar (cauda hidrofóbica).



**Figura 8: Filmes tipos X,Y e Z obtidos pelo método de Langmuir-Blodgett.**

Um tipo de substrato que pode ser usado para preparação de filmes LB são cristais de quartzo (Figura 9) recobertos por eletrodos metálicos em ambas as faces, usado na técnica de microbalança a cristal de quartzo (QCM). Esta microbalança é um detector de massa sensível, baseado no efeito piezelétrico. Sua vantagem está na alta sensibilidade ( $\text{ng cm}^{-2}$ ).



**Figura 9: Esquema de um cristal de quartzo recoberto com ouro (eletrodos) usado para nanogravimetria.**

A montagem de uma QCM compreende: um cristal de quartzo recoberto de filmes metálicos (ouro), que funcionam como eletrodos através dos quais é aplicada uma diferença de potencial. Esta diferença de potencial provoca uma vibração do cristal de quartzo e a frequência pode ser medida através de um freqüencímetro.

O fundamento desta técnica está relacionado com a proporcionalidade entre a variação de frequência de ressonância do cristal e a massa depositada sobre ele. A frequência de vibração diminui com uma pequena quantidade de material aderido sobre ele.

Como uma técnica para caracterizar filmes LB, a QCM tem sido empregada (Vikholm et al 1998; Girard et al 2005, Chudinova et al 1997) para confirmar a quantidade de filme transferida da monocamada para o substrato. A relação entre a variação de frequência  $\Delta F$  (Hz) resultante de uma mudança na massa é dada pela equação de Sauerbrey (Sauerbrey 1959):

$$\Delta F = [2(F_0)^2 \Delta M] [\mu_q \rho_q]^{-1/2} \quad (2)$$

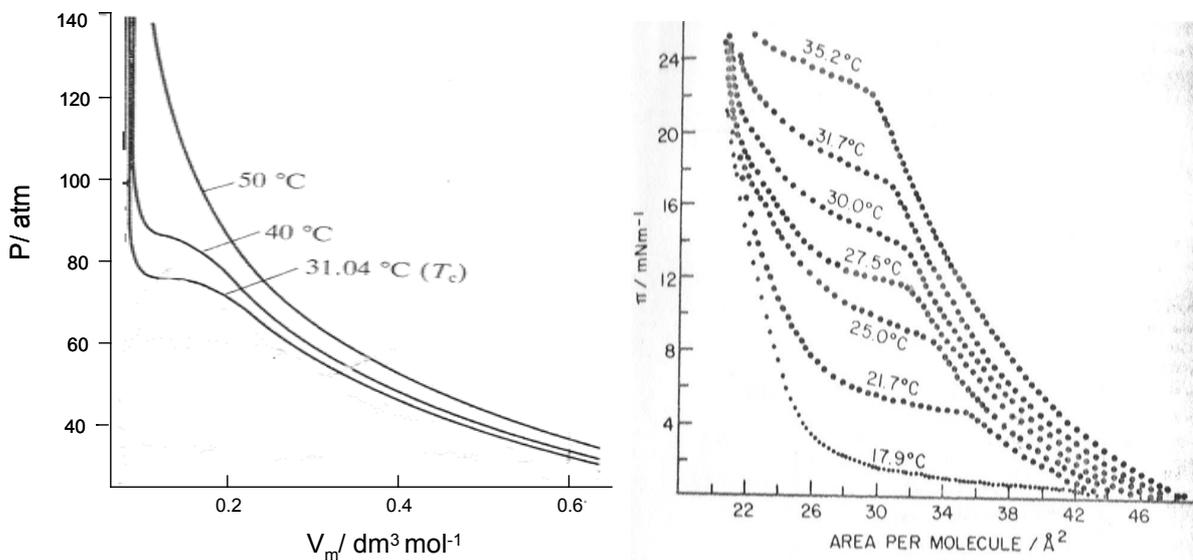
Onde  $F_0$  é a frequência inicial,  $\mu_q$  é o módulo de cisalhamento do quartzo,  $\rho_q$  a densidade do quartzo,  $\Delta F$  a variação de frequência e  $\Delta M$  é a massa total depositada em ambas faces do cristal. Assim, substituindo-se os valores dos parâmetros para o quartzo, corte AT, usado nesta técnica, chega-se à expressão:  $\Delta M = 146 \Delta F / F_0^2$ , ou seja para uma variação de 1 Hz em frequência, considerando  $F_0 = 10$  MHz, tem-se uma variação de massa de 1,46 ng.

Curvas de  $\Delta M$  em função do tempo a uma dada temperatura fornecem as isotermas de adsorção e podem adquirir diversos formatos. Caso típico é quando se acompanha a adsorção de proteínas a filmes LB; a estrutura organizada do filme cria uma matriz na qual proteínas podem ser incorporadas (Dubrovsky et al 1996; Bhang et al 1998). Esse conjunto de bicamada + proteínas se aproxima do modelo da bicamada lipídica para membranas biológicas. Isotermas de adsorção de proteínas em monocamadas de Langmuir ou em filmes

LB podem fornecer informações sobre o mecanismo do processo de interação da proteína com o fosfolípido (Bader et al 1984; McConnell et al 1985; Brockman et al 1999)

### **1.5.3. Efeito da temperatura em Monocamadas de Langmuir**

A variação de temperatura na subfase que contém a monocamada modifica as isotermas superficiais, pois a compressibilidade ou fluidez da monocamada é diretamente afetada pela variação da temperatura, bem como as interações entre as moléculas e os fatores entrópicos envolvidos quando a monocamada é submetida a uma compressão. Da mesma forma que é possível observar o estado crítico no estado tridimensional quando diferentes isotermas são traçadas na região que compreende a transição entre o estado gasoso e o líquido, no caso bidimensional também podem ser observadas um conjunto análogo de isotermas (Fig.10).



**Figura 10: Ilustração comparando isothermas PV entre os estados gasoso e líquido e isothermas  $\pi$ -A entre os estados líquido-expandido e líquido condensado. (De acordo com Atkins PW 1996 e Knobler CM 1990).**

A temperatura também influencia tanto na deposição da monocamada sobre substratos sólidos quanto na adsorção de proteínas sobre os filmes LB, na organização do filme e no “empacotamento” adquirido, que pode se dar de diferentes formas. Apesar do efeito da temperatura sobre as isothermas superficiais ter sido bastante explorado (Lambruschini et al 2000), o mesmo não ocorre com relação a estudos envolvendo características de deposição, principalmente em sistemas envolvendo proteínas. A possibilidade de alterar a fluidez da monocamada na qual a proteína estivesse sendo incorporada, por meio de variações de temperatura, motivaram o estudo desse aspecto nessa Dissertação, como será colocado mais adiante.

#### **1.5.4. Efeito de eletrólitos**

Na ausência de íons na subfase que contém a monocamada, mudanças na curva de pressão superficial são ocasionadas pela aproximação lateral das moléculas tensoativas e interações entre as cabeças polares, exceto para monocamadas expandidas, onde existe grande liberdade para movimentação das moléculas. Entretanto ao se adicionar eletrólitos (ácidos, bases ou sais) na solução que contém a monocamada, mudanças no grupo polar do tensoativo ocorrem devido, p.e., à ionização causada pela mudança de pH, que proporciona repulsões mútuas entre as cargas, ou a efeitos de blindagem provocados pelo contra-íon do grupo polar eletricamente carregado, que acabam por levar a mudanças na transição de fases durante a compressão (Shapovalov et al 1997; Yasdanian et al 1990). Mesmo a baixas pressões superficiais a adição de eletrólitos pode causar expansão ou condensação da monocamada, dependendo do tipo de cabeça polar e do tipo de eletrólito, que pode interagir apenas eletrostaticamente ou apresentar certa especificidade.

Tratando-se da deposição de monocamadas em substratos sólidos, adição de íons na subfase da solução que suporta os lipídios na interface pode fornecer a interação necessária entre as extremidades polares para que ocorra a formação do filme. Esse é o caso da adição de íons metálicos multivalentes capazes de promover interações específicas entre as moléculas dos lipídios. O íon metálico faz a “ponte” entre as cabeças do fosfolipídio, neutralizando as cargas existentes, ligando as moléculas e promovendo a formação do filme (Girard et al 1998).

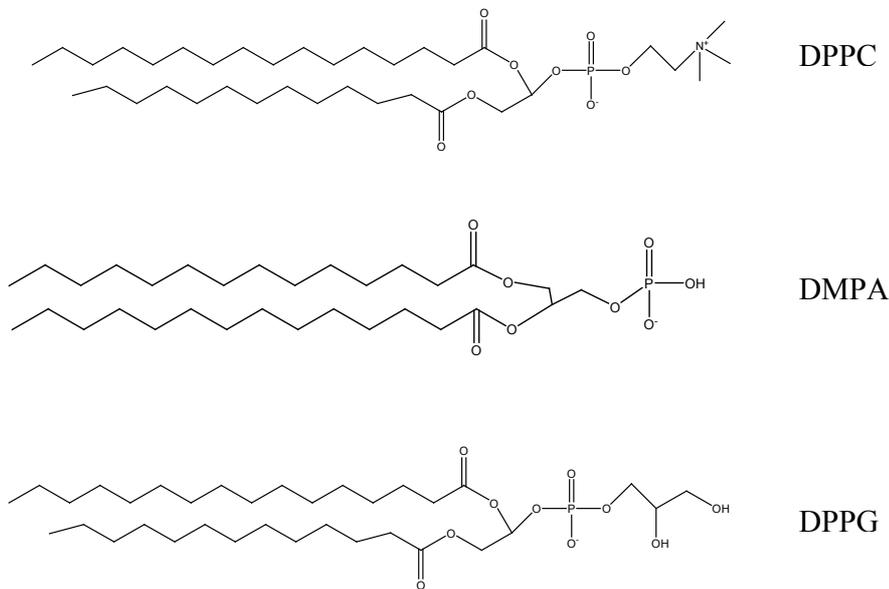
### **1.5.5. Efeito de açúcares**

Os fosfolipídios são os principais constituintes da membrana biológica e as interações entre as moléculas lipídicas e os solutos, que circundam a fase líquida, são responsáveis por muitos processos que ocorrem na superfície da membrana. Açúcares possuem grande ocorrência em organismos vivos e as interações entre eles e fosfolipídio ocorrem vias de regra por meio da interação de grupos hidroxilas do açúcar e cabeça polar do fosfolipídio. Mudanças na transição de fases e expansão de isothermas superficiais (Krasteva et al 2001) podem ocorrer ao adicionar sacarídeos na subfase que contém o fosfolipídio, dependendo da concentração empregada, como observado para monocamadas de DMPC (Lambruschini et al 2000) onde a transição de fases líquido-expandido/líquido-condensado é extinta na presença de trealose e a área/molécula de colapso é aumentada em torno  $6,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  quando o dissacarídeo esta na subfase.

### **1.5.6. Adsorção de proteínas em monocamadas de fosfolipídios**

Atualmente, a preparação de filmes de fosfolipídio e proteínas na interface líquida e sua subsequente transferência para substratos sólidos (filmes LB) tem despertado interesse crescente (Caseli 2005) pela importância do entendimento: das propriedades de proteínas imobilizadas para o desenvolvimento de biossensores ou bioreatores (Aizawa et al 1989; Nicolini 1997), da influência da composição da biomembrana na atividade catalítica da enzima (Ronzom et al 2002) e outros processos biofísicos.

Os fosfolipídios consistem de duas cadeias alifáticas conectadas por grupos fosfatos. Alguns exemplos aparecem na Figura 11.



**Figura 11: Alguns exemplos de fosfolipídios**

Nos primeiros trabalhos relatados na década de 30 sobre a atividade superficial de proteínas, foram abordados estudos comparativos sobre as propriedades de espalhamento de proteínas nativas e desnaturadas em interfaces líquido/ar e, também, os efeitos de diferentes subfases.

Atualmente, os estudos sobre a formação de filmes LB com proteínas visam principalmente aspectos de reconhecimento molecular e estudos de modelos de membranas biológicas. Os estudos envolvem na maior parte dos casos aspectos básicos de adsorção, interação e morfologia de monocamadas contendo fosfolipídios (Dubrovsky et al 1996; Bhang et al 1998)

Como visto, uma forte motivação para o estudo de monocamadas de fosfolipídios é o seu uso como modelo de membranas bem definidas (McConnell 1991; Mohwald 1990). Devido às funções da membrana dependerem fortemente da ação de proteínas, é de suma importância o estudo de suas interações com o ambiente lipídico. A forma mais simples de estudo envolve o preparo de monocamadas, adição de uma proteína e detecção de mudanças na pressão ou potencial de superfície. Estas medidas têm servido para caracterizar a presença da proteína na interface, mas informações estruturais podem ser deduzidas somente indiretamente. Aliadas a estas técnicas mais básicas são empregadas também diversas técnicas microscópicas e espectroscópicas.

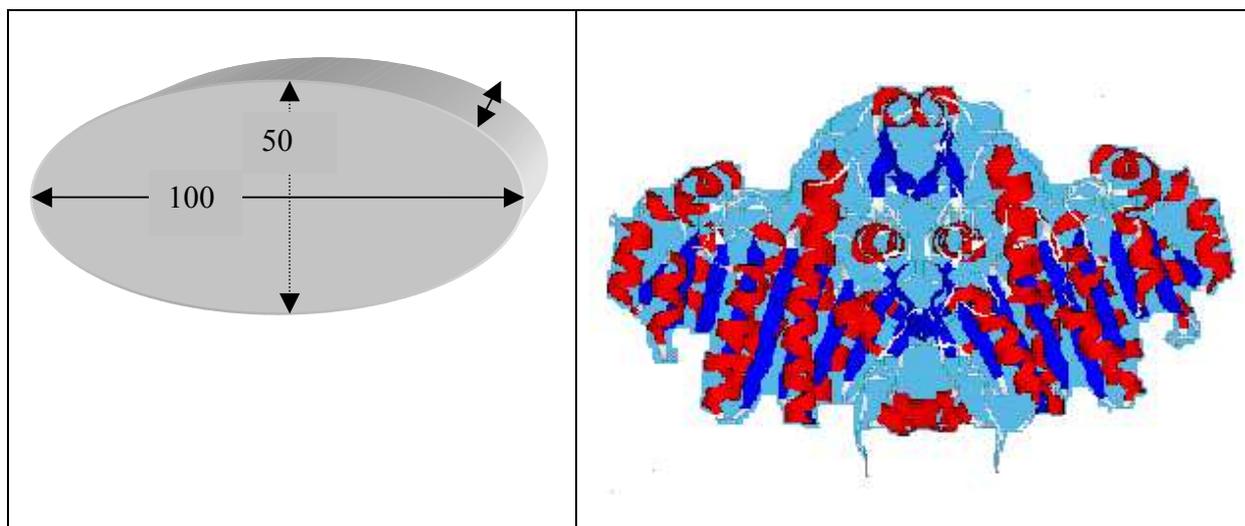
Em resumo, nos últimos anos uma série de estudos em monocamadas de Langmuir vêm sendo relatadas na literatura (Steineann et al 1971; Peschke et al 1987; McConnell et al 1985; Bader et al 1984; Caseli et al 2004), para se estudar tanto interações específicas (antígeno/anti-corpo; enzima/substrato, proteína/princípio ativo, etc), como interações não específicas.

## **1.6. Fosfatases alcalinas**

As fosfatases alcalinas formam uma família de proteínas comum a todos os organismos vivos. São amplamente distribuídas e encontradas em: vertebrados, fungos, bactérias e inúmeros outros organismos com funções igualmente diversas. A maioria são diméricas e fosfomonohidrolases, catalisando a hidrólise de ésteres de fosfato, tendo uma provável atuação no processo de biomineralização (Leone et al 1997).

### 1.6.1. Fosfatase alcalina extraída de placa óssea de ratos

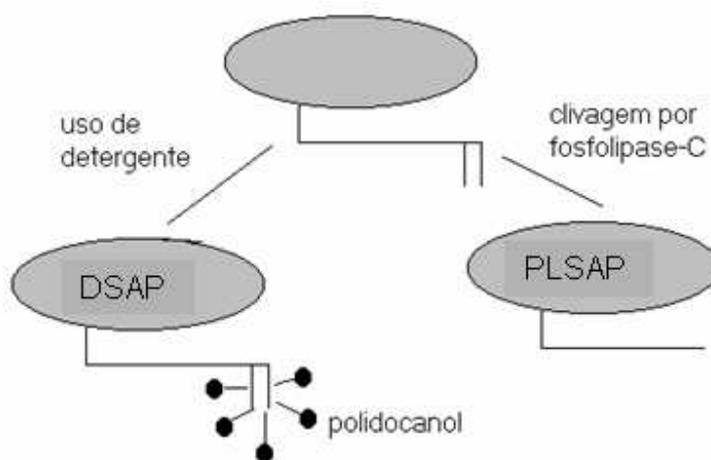
A fosfatase alcalina de placa óssea de ratos possui 486 aminoácidos por monômero e uma âncora (glicosilfosfatidilinositol, GFI) que liga o resíduo de aminoácido carboxi-terminal da proteína até as cadeias de fosfolipídio enterrada na membrana. Além disso, ela possui estruturas  $\beta$ -folha no centro do monômero, envolvidas por estruturas  $\alpha$ -hélice que estão orientadas na mesma direção. A massa molecular da proteína foi calculada em cerca de 130kDa, possuindo um formato tridimensional alongado, de forma que a mesma pode ser considerada uma elipsóide (Figura 12) com eixos medindo 100, 50 e  $50\text{\AA}^2$  aproximadamente (Le Du et al 1997).



**Figura 12: Estrutura proposta para a fosfatase alcalina de placenta humana (Le Du et al 1997).**

Especificamente para a fosfatase alcalina de osso de rato, o processo de extração e purificação da enzima consiste em um método de dois passos (filtração em coluna, seguida por centrifugação com gradiente de sacarose) (Ciancaglini et al 1990) levando a duas

formas. A primeira, solubilizada por meio de um tensoativo não iônico mantendo a âncora GFI intacta. A segunda é extraída da membrana, através da clivagem enzimática por fosfolipase-C, e que remove a ancora hidrofóbica (ver Fig. 13). Nesse trabalho, a primeira forma será chamada de DSAP (fosfatase alcalina solubilizada com detergente) e a segunda de PLSAP (fosfatase alcalina clivada através de uma fosfolipase específica). Recentemente demonstrou-se (Caseli et al 2005) em nosso laboratório que as condições de empacotamento e orientação superficial, bem como densidade superficial da enzima, influenciam sobremaneira a atividade catalítica da fosfatase alcalina. “*RonzonF*” (Ronzon et al 2006) também demonstraram que uma fosfatase alcalina de placenta humana pode ligar-se a monocamadas DPPC e que nesses trabalhos, mostrou-se que a enzima incorpora-se à interface ar/água na ausência ou presença do lipídio e independente do lipídio estudado. Nesse caso, a proteína não mudou significativamente sua estrutura secundária, mesmo a um alto estágio de empacotamento superficial.



**Figura 13: Obtenção das duas formas da fosfatase alcalina extraída de placa óssea de ratos.**

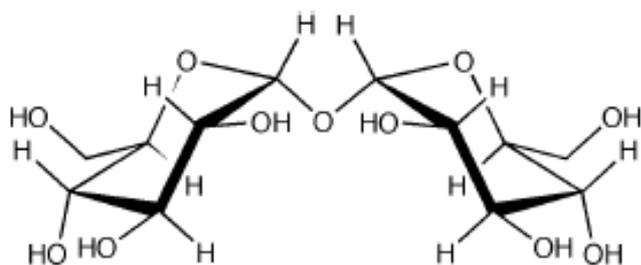
### 1.6.2. Fosfatase alcalina extraída de fungo

É uma proteína extraída da conídia de *Neurospora Crassa* (CNCAP), possui massa molecular de 145 kDa e 110 kDa quando purificada por filtração em gel na presença e ausência de íons magnésio, respectivamente. Essa diferença é atribuída (Say et al 1996) a mudanças conformacionais quando na presença de íons metálicos. Sua estrutura ainda não é bem elucidada, mas sabe-se que é tetramérica, com ponto isoelétrico igual a 4,0. A CNCAP é uma glicoproteína possuindo uma porção altamente glicosilada com cerca de 40% (p/p) da estrutura constituída de carboidratos

### 1.7. Trealose

A estabilidade de estruturas biológicas, bem como a forma nativa e desnaturada de proteínas podem ser moduladas pela presença de co-solutos na fase aquosa, assim como pelas propriedades do solvente. A trealose, (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>) é um dissacarídeo não redutor no qual duas unidades de glicose são ligadas através de ligações glicosídicas. São possíveis três formas anoméricas deste açúcar,  $\alpha,\beta$ -1,1;  $\beta,\beta$ -1,1; e  $\alpha,\alpha$ -1,1. Porém, somente a  $\alpha,\alpha$  trealose (Figura 14) ocorre naturalmente, estando presente em células vegetais, animais e de microorganismos.

As funções da trealose estão relacionadas à fonte de energia e carbono, bem como na proteção de membranas celulares contra uma variedade de perturbações a que elas podem ser submetidas, entre elas a desidratação, aquecimento, resfriamento e oxidação.



**Figura 14: Estrutura da  $\alpha,\alpha$ -1,1- trealose.**

Existem vários caminhos descritos (Elbein et al 2003) para a biossíntese da trealose, um deles envolve a transformação de glicose pela UDP- glicose em glicose 6-fosfato com posterior liberação de trealose-6-fosfato. A reação é catalisada pela enzima trealose P-sintase (TPS), esse caminho usualmente requer o uso de trealose-P-fosfatase (TPP) que converte a trealose-6-fosfato em trealose. Outro caminho envolve o rearranjo intramolecular da maltose para a conversão em trealose, sendo catalisada pela enzima chamada trealose sintase.

O interesse no estudo da trealose está relacionado às aplicações desse sacarídeo em processos tecnológicos, que envolvam a estabilização de proteínas, membranas, lipossomos, vesículas e vacinas (Crowe et al 2001; Zavaglia et al 2003). Outros sacarídeos podem ser também empregados na estabilização de estruturas biológicas, porém a trealose é um protetor efetivo e é amplamente estudado. Estudos sobre o metabolismo de plantas e bactérias (Westh et al 1991) mostraram que eles acumulam grandes quantidades de trealose durante processos de auto-aquecimento e estresse osmóticos, estabilizando a bioestrutura de membranas e proteínas em condições não favoráveis.

Estudos teóricos e experimentais relatam controvérsias na literatura sobre a interação de trealose com monocamadas e bicamadas de fosfolipídios e várias teorias e

mecanismos são descritos para exemplificar esses efeitos de estabilização (Crowe et al 1984; Tsvetkova et al 1988). Alguns trabalhos atribuíram o efetivo protetor contra desidratação de células em condições extremas de temperatura às denominadas propriedades cosmotrópicas (Collins et al 1985), que podem ser entendidas como aquelas que estabilizam estruturas por efeito do aumento das interações hidrofóbicas intra e intermoleculares, via mudanças na estrutura da água na região vizinha a bicamada lipídica (Alonso et al 1989). Outros estudos feitos (Skibinsky et al 2005; Kiselev et al 2005) mostraram que a trealose interage diretamente com a cabeça polar do fosfolípido, afetando a formação de ligações de hidrogênio. “Pereira C.S” (Pereira et al 2004) trazem uma revisão das hipóteses para explicar o efeito protetor do açúcar. São três as hipóteses propostas: a primeira chamada de hipótese *de troca de água* sugere que moléculas de água podem ser trocadas por moléculas de açúcar (geralmente por formação de ligação de hidrogênio) ao redor da cabeça polar do fosfolípido presente na membrana, tendendo a estabilizar sua estrutura nativa quando na ausência de água (Crowe et al 1998). A segunda chamada de hipótese de *entrapamento*, em contraste, propõe que moléculas de água da camada de solvatação são presas à bioestrutura devida a presença do açúcar, preservando assim a extensão da camada de solvatação e mantendo as propriedades nativas (Lins et al 2004). A terceira, chamada de hipótese da *vitrificação* sugere que açúcares agem como um bom agente vitrificante, proporcionando uma estruturação da água como se fosse de um “vidro amorfo”, reduzindo a flutuação de estruturas e prevenindo desnaturações (Sun et al 1997).

“Perreira C.S” (Pereira et al 2004) fazendo estudos de simulação por dinâmica molecular de DPPC, em mono e bicamadas, com trealose em duas concentrações (1 e 2 molal, correspondentes a razões DPPC/trealose/água de 1:64:28 e 1:128:28) e em duas

temperaturas (325 e 475K) mostraram que a área molecular do DPPC é aumentada na presença de trealose nas duas concentrações estudadas, quando comparada à situação na qual a trealose é ausente. Essa expansão da membrana foi atribuída à penetração de moléculas de trealose entre as cabeças polares do fosfolípido, mostrando clara afinidade da trealose pela superfície da membrana via ligações de hidrogênio e aumentando o espaçamento entre as caudas apolares. Eles também concluíram que a presença de trealose afeta a mobilidade do fosfolípido e da água, sendo que a da água diminui com o aumento da concentração do dissacarídeo. Observou-se também uma distribuição mais homogênea do açúcar ao redor da parte polar do fosfolípido na simulação realizada com maior concentração de trealose (2 molal), indicando que a membrana alcançou saturação entre as duas concentrações. Os resultados obtidos à 325K mostraram que moléculas de água não são excluídas da superfície da membrana com o recobrimento das moléculas de trealose. No entanto, os estudos realizados por “*Villarreal M.A*” (Villarreal et al 2004), também por simulação molecular para bicamadas de DPPC usando quatro relações DPPC: trealose: água (8:1:393; 3,5:1:122; 8:1:224; 1:0:25), mostraram que a aproximação da trealose à membrana não é suficiente para estabelecer uma condição de ligação efetiva e a ligação requer que moléculas de água ligadas ao lipídio sejam removidas, existindo assim uma barreira de ativação para se efetuar a ligação, que está relacionada com a energia necessária para se remover a água. A trealose se liga aos grupos carbonila e fosfato do lipídio e promove a troca de moléculas de água, afetando o potencial superficial da membrana, sem entretanto mudar o número de ligações de hidrogênio que os lipídios estabelecem com a vizinhança, sendo ela água ou trealose. Assim, a ligação do açúcar não afeta a área ocupada por lipídio na interface, sendo que os estudos não revelaram nenhuma contração ou expansão da membrana. Desta forma, as propriedades de preservação da estrutura da

membrana pela trealose foram atribuídas à sua capacidade em substituir as moléculas de água na interface sem afetar o número de ligações de hidrogênio. Estes resultados concordam com os obtidos por “*Sum AK*” (Sum et al 2003) que concluíram que a trealose intercala na região da cabeça polar, formando aproximadamente o mesmo número de ligações de hidrogênio que a água (trocada) fazia com os lipídios e mantendo uma relativa preservação da estrutura.

Se, por um lado, existem aparentes contradições nos resultados de estudos por simulação molecular, os relatos de estudos experimentais sobre a interação da trealose com monocamadas de fosfolipídios também são contraditórios. “*Lambruschini C.*” (Lambruschini et al 2000) constatou experimentalmente expansão e deslocamento das transições de fases nas isotermas superficiais para monocamadas de DPPC formadas sobre solução de trealose 0,1M, atribuindo esse resultado ao maior espaçamento das caudas hidrofóbicas do lipídio adquiridas à medida que a trealose se liga na cabeça polar do mesmo. Já (Arnett et al 1986) demonstra que trealose não afeta a isoterma de DMPC em concentrações de 0,16 M.

A presença de impurezas nas amostras do dissacarídeo adquirida comercialmente pode ser uma das causas dos diferentes resultados obtidos, pois esses açúcares podem ser fornecidos sem a purificação necessária para os tipos de análises realizadas. “*Villareal MA*” concluiu que ainda sendo eliminadas as impurezas que são adsorvidas na interface ar-água (moléculas anfifílicas insolúveis) as expansões observadas nas áreas moleculares dos lipídios podem ser devida às impurezas que não adsorvem na interface ar-água, mas sim as que adsorvem na interface lipídio-água e que as conclusões devem ser consideradas com cautela e não necessariamente possuem uma aplicação geral.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais**

Estudar os efeitos da temperatura e de aditivos sobre as características de monocamadas do ácido dimiristoilfosfatídico, usadas para imobilizar diferentes formas de fosfatase alcalina. Verificar o efeito desses parâmetros: na massa depositada por monocamada, massa de enzima imobilizada e atividade enzimática.

### **2.2. Específicos**

1) Investigar efeitos de mudanças de temperaturas nas isotermas de DMPA na presença da fosfatase alcalina.

2) Investigar as interações entre trealose/fosfolipídio e trealose/fosfatase alcalina em diferentes temperaturas e sua influência na formação de filmes LB, por meio do levantamento de isotermas superficiais e massas transferidas para suportes sólidos como filmes Langmuir-Blodgett, usando a técnica de microbalança a cristal de quartzo, usando trealose de diferentes procedências e níveis de purificação.

3) Estudar como as mudanças estruturais das monocamadas e, conseqüentemente dos filmes LB, ocasionados por mudanças de temperatura e/ou interações com o aditivo na subfase podem influenciar na atividade catalítica da fosfatase alcalina.

4) Estudar os efeitos das impurezas contidas nas amostras de trealose nas isotermas superficiais, formação do filme LB e na imobilização da proteína sobre o filme.

5) Estudar comparativamente a adsorção de duas enzimas (DSAP e CNCAP) em sistemas modelo para membrana biológica: monocamada de Langmuir e filmes LB de fosfolipídios,

6) Acompanhar a cinética enzimática frente ao *p*-nitrofenil fosfato, na presença das enzimas imobilizadas em diferentes temperaturas e matrizes fosfolipídicas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Extração e purificação das fosfatases alcalinas**

Os processos de isolamento das fosfatases alcalinas foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Enzimas e Membranas Biológicas dos Professores Dr. Francisco de Assis Leone e Rosa dos Prazeres Melo Furriel e as enzimas gentilmente cedidas. O tensoativo não iônico, C<sub>12</sub> (EO)<sub>9</sub>, polidocanol foi usado para solubilizar a forma DSAP da fosfatase alcalina extraída de placa óssea de ratos.

#### **3.2. Purificação da trealose**

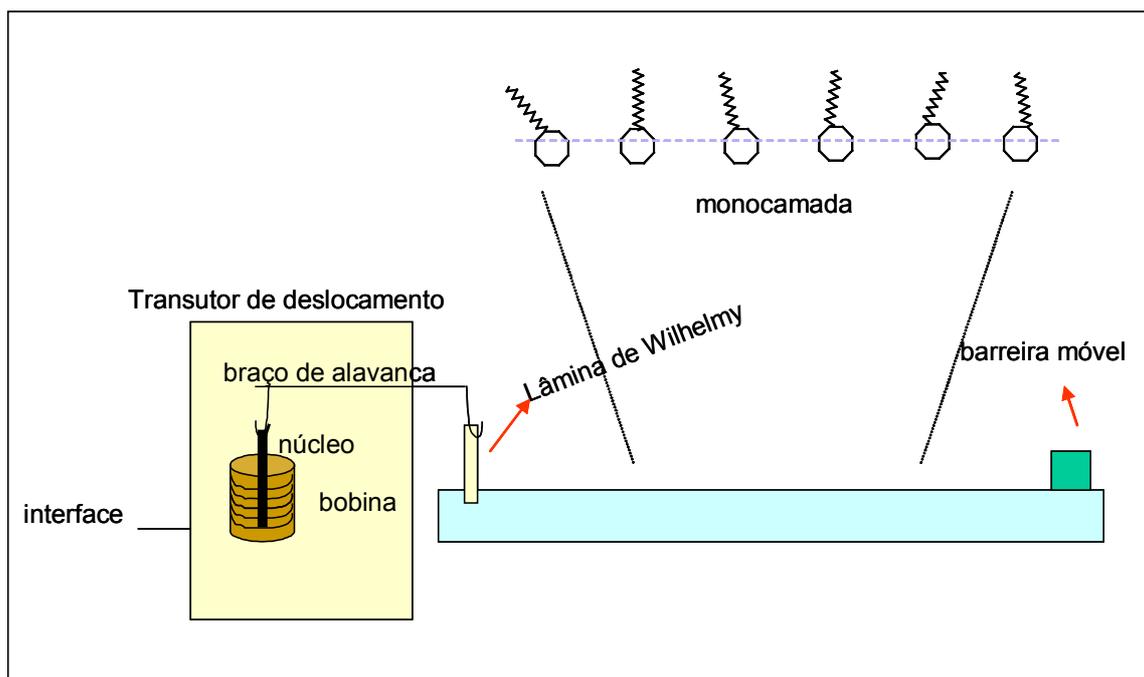
Dois tipos de trealose foram usadas:  $\alpha,\alpha$  trealose (PM: 342,3, Calbiochem, lotes: 25 e 625, pureza:99,7%) e  $\alpha,\alpha$  trealose dihidratada (PM:378,3, Sigma, lote: T5251, pureza: 98,5%).

A trealose adquirida comercialmente (Sigma) foi purificada usando o método de extração por solvente, adicionando o açúcar (10g) em uma mistura água/hexano 4:1 contida em funil de separação (250 ml). Após agitação por 5 minutos, a fração polar da mistura foi isolada da fração apolar para posterior análises. As duas frações foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho.

### 3.3. Curvas de pressão superficial

As isotermas de pressão superficial foram levantadas em diferentes temperaturas numa Cuba de Langmuir construída em uma peça de Teflon (219,5x98,5x8,5)mm<sup>3</sup> (Insigth, Brasil) com utilização do método de Wilhelmy, usando um transdutor linear de deslocamento para determinação da pressão superficial (Fig. 15). A cuba mantém o controle de temperatura através de entradas laterais para um banho termostático (Tecnal, Brasil, TE-184).

A barreira móvel que também é revestida por teflon<sup>R</sup>, desliza na interface ar/água sendo acionada quando necessário iniciar a compressão da monocamada. Sabendo-se as dimensões da cuba, o volume e a concentração do tensoativo espalhado e o espaço que a barreira percorre, podemos relacionar a pressão superficial com a área disponível por molécula de tensoativo, obtendo-se as isotermas de pressão superficial (ver Fig.6, Introdução).



**Figura 15: Esquema da Cubra de Langmuir usada nesta Dissertação.**

As monocamadas de DMPA (1,2 Dimyristotoyl-sn-glycero-3-phosphate monosodium salt-Sigma) foram formadas através do espalhamento de suas soluções ( $1\text{mmol L}^{-1}$ ) em clorofórmio (Merck) e metanol (Carlo Erba) na proporção 3:1 respectivamente. A velocidade de compressão foi variada de  $0,58$  a  $1,1\text{ mm s}^{-1}$ . Soluções de acetato de zinco  $0,1\text{ mmol L}^{-1}$  (Merck) e de Trealose  $10\text{ mmol L}^{-1}$  (Calbiochem, Sigma-purificada e não purificada) foram usadas como subfase. Em todos os preparos de soluções usou-se água ultrapurificada (Milli-Q<sup>®</sup> da Millipore). As soluções de proteína foram feitas com o uso de tampão Tris (Sigma)-HCl contendo  $2\text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$ , com pH mantido a  $7,5$  que melhor conserva a atividade enzimática.

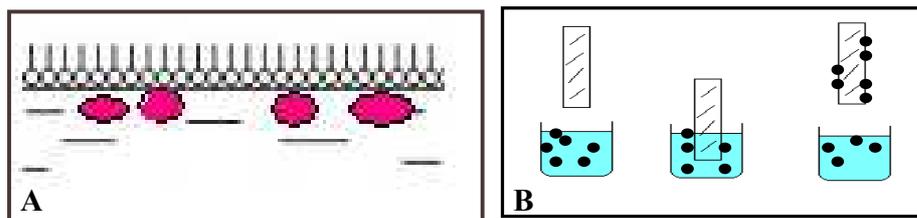
### **3.4. Preparo de filmes LB**

#### **3.4.1. Preparo de filmes LB de DMPA**

Filmes LB de DMPA foram preparados através da transferência das monocamadas de DMPA formadas sobre soluções de acetato de zinco  $1\text{mmol.L}^{-1}$  ou de trealose  $10\text{mmol.L}^{-1}$  sob uma velocidade de emersão/imersão de  $0,038\text{mm.s}^{-1}$  do substrato sólido, mantendo-se a pressão superficial constante em  $(30\pm 1)\text{mN.m}^{-1}$ , a várias temperaturas.

#### **3.4.2. Preparo de filmes LB mistos DMPA/proteína**

Filmes LB mistos de DSAP e CNCAP foram preparados por dois diferentes procedimentos. Para a incorporação da DSAP ao filme foi usado o método de se injetar, a enzima na subfase que contém a monocamada no estado expandido (Figura 16A), a poucos milímetros da interface. Primeiramente três monocamadas de DMPA formadas sobre solução de zinco ou trealose foram depositadas (final hidrofóbico), com a primeira sendo iniciada pela emersão. Na seqüência, foi injetada a solução de enzima ( $7,6\text{mg.L}^{-1}$ ) na subfase da cuba, a monocamada foi novamente comprimida até a pressão de  $30\text{mN.m}^{-1}$  e procedeu-se a imersão do substrato contendo as três monocamadas de DMPA com a seqüente transferência da monocamada mista ao substrato. A adsorção da CNCAP foi realizada pelo método de recobrimento por imersão, que consiste em imergir um filme LB de DMPA pré-preparado com quatro monocamadas DMPA (final hidrofílico) em uma solução da proteína (Figura 16B).



**Figura 16: Formação de Filmes LB mistos: Monocamada mista (A) e recobrimento por imersão (B)**

### 3.5. Caracterização dos filmes e medidas de atividade enzimática

Para medir a massas dos filmes depositadas e a densidade superficial protéica nos filmes, foram usados cristais de quartzo da ICM (International Crystal Manuf. Inc.- EUA) recobertos com ouro, com área ativa de  $0,662 \text{ cm}^2$ , frequência nominal de 10 MHz, como substratos sólidos. A massa depositada é obtida pela variação de frequência medida em um freqüencímetro (Lutron-modelo FC 2700 TCXO), com a oscilação do cristal promovida por um oscilador ICM (Lever Oscillator 35366).

Para medir a atividade catalítica das fosfatases alcalinas imobilizadas sobre filmes LB, foram utilizadas lâminas de vidro como substratos sólidos, que foram previamente limpas com clorofórmio e etanol, com posterior aquecimento ( $75^{\circ}\text{C}$ ) em soluções de peróxido de hidrogênio/hidróxido de amônio e peróxido de hidrogênio/ ácido clorídrico durante 20 e 15 minutos respectivamente, seguido de enxágüe abundante com água pura.

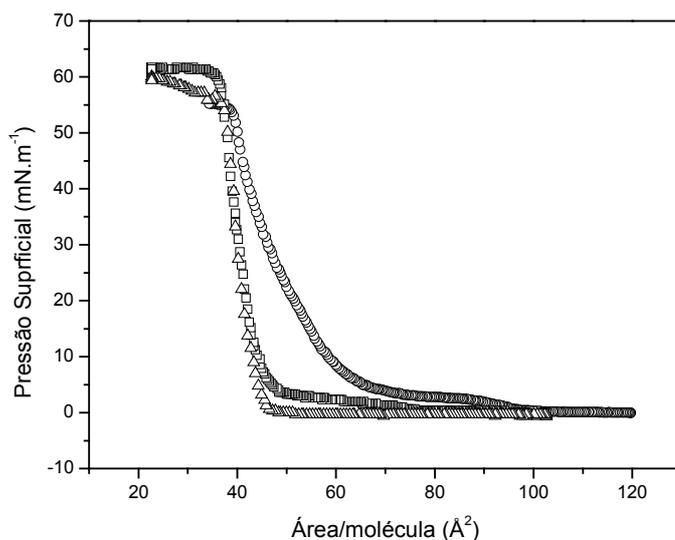
A lâmina contendo o filme misto DMPA/enzima foi colocada em uma cubeta contendo *p*-nitrofenilfosfato (PNPP) (1mM) com tampão Ampol (10mM) (2-amino-2-metil-1-propanol) e  $\text{MgCl}_2$  (2mM) mantendo o pH em torno de 9,4 e a temperatura de

37°C; onde a atividade catalítica para a fosfatase alcalina em meio homogêneo é máxima. As medidas foram feitas através do método de cinética contínua de medidas de absorvância (410nm) em um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu-modelo UV-2401 PC) acompanhando a liberação de *p*-nitrofenolato (coeficiente de absorvidade  $\epsilon = 17600 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA formada sobre água pura e íons zinco

Antes de iniciar os estudos da adsorção da fosfatase alcalina sobre monocamadas de DMPA, foram levantadas as isotermas de pressão superficial para esse fosfolipídio em diversas subfases e temperaturas. A Figura 17 apresenta as curvas de pressão superficial para monocamadas de DMPA em água pura a várias temperaturas.

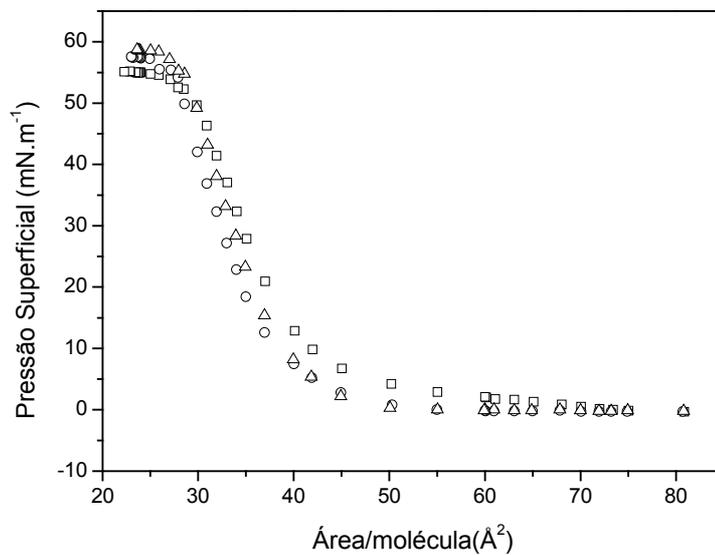


**Figura 17:** Curvas de pressão superficial para monocamadas de DMPA preparadas sobre água pura, a várias temperaturas: 10°C ( $\Delta$ ), 15°C ( $\square$ ) e 25°C ( $\circ$ ).

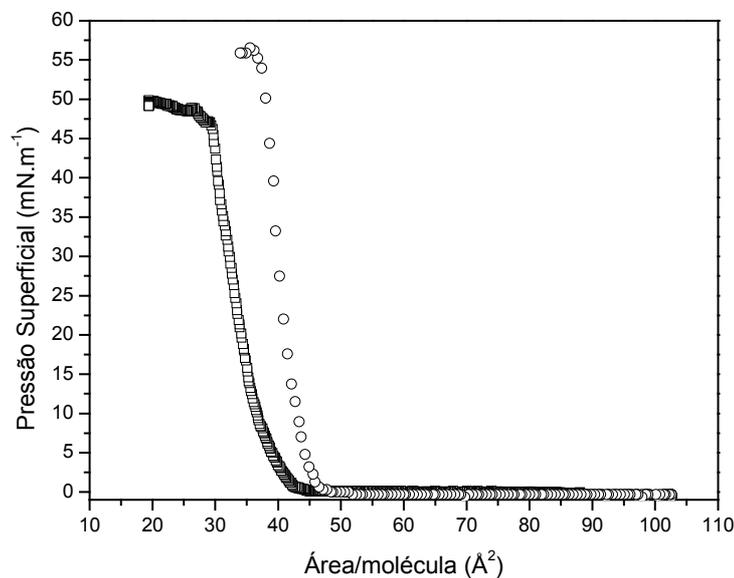
Na temperatura de 25° C a região de transição entre os estados líquido-expandido e líquido-condensado é nítida e caracterizada por um patamar que se estende de 88 a 72 Å<sup>2</sup> e ocorre em torno de 4mN m<sup>-1</sup>. Já para a temperatura de 15° C ocorre deslocamento da transição líquido-expandido e condensado para menor pressão (2,8 mN.m<sup>-1</sup>) e a região de coexistência de fases estende-se de 68 a 49 Å<sup>2</sup> por molécula. O deslocamento da região de equilíbrio entre fases é esperado e esse resultado é semelhante àquele ilustrado (ver Figura 10B) para as isotermas do ácido pentadenóico (PDA) obtidas com variação de temperatura (Knobler 1990). Para a curva obtida a 10° C observa-se a extinção da região de transição de fases, ou seja, ocorre transição direta para o estado condensado assim como já observado para a transição de fases de outros fosfolipídios (Harkins et al 1941). A área de colapso (região de pressão constante devido ao desmanche da monocamada com formação de multicamadas) ocorre em torno de 55-60 mN.m<sup>-1</sup> para todas as isotermas.

Essas diferenças observadas ao abaixarmos a temperatura são devidas ao favorecimento das interações entre as moléculas do tensoativo mesmo a baixas pressões e mais nítidas à medida que se comprime a monocamada.

Ao adicionar íons na subfase (Figura 18), observa-se a extinção das transições de fases para todas as temperaturas estudadas.



**Figura 18: Curvas de pressão superficial para monocamadas de DMPA preparadas sobre solução de íons zinco ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a várias temperaturas:  $10^\circ\text{C}$  (○),  $15^\circ\text{C}$  (Δ) e  $25^\circ\text{C}$  (□).**



**Figura 19: Comparação das isothermas para monocamadas de DMPA obtidas a  $10^\circ\text{C}$  na presença (□) e ausência (○) de íon divalente.**

O íon zinco foi escolhido devido a estudos já realizados (Caseli et al 2005), que comprovaram sua eficiência como ativador da fosfatase alcalina em meio homogêneo, além de permitir a deposição de multicamadas do fosfolípido, por promover a interação entre os grupos fosfato do mesmo. Assim antes de analisar a adsorção da proteína na presença de zinco, foi feito um estudo sistemático sobre o efeito da temperatura no comportamento da monocamada do fosfolípido formada sobre soluções contendo íons zinco.

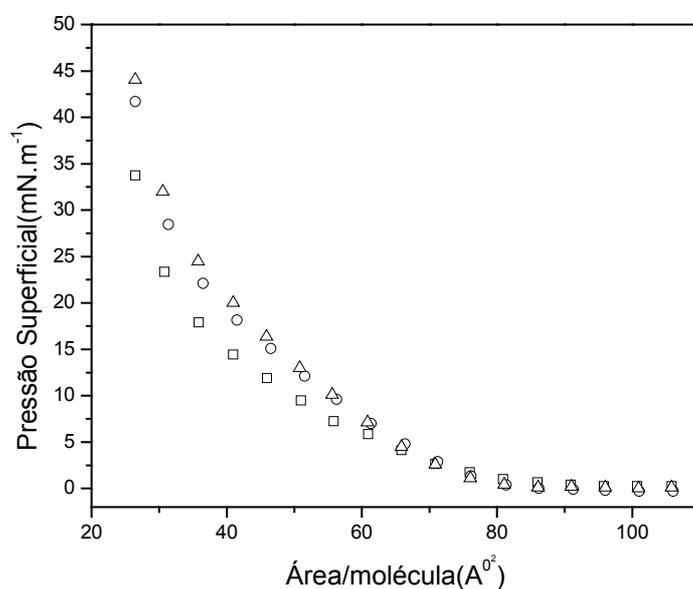
O desaparecimento da transição de fases entre os estados líquido-expandido e condensado atribui-se à magnitude da redução da repulsão eletrostática entre os grupos polares negativamente carregados decorrente da presença desse íon, que mantém a pressão superficial em torno de zero até altos estágios de compressão. Observa-se que para a curva a 25 °C começa a haver uma elevação significativa na pressão superficial somente a partir de 70 Å<sup>2</sup>/molécula; para a curva a 15°C, a partir de 50 Å<sup>2</sup> e a partir de 40 Å<sup>2</sup> para a curva à 10°C.

Uma análise comparativa sobre o efeito de íons zinco na subfase de monocamadas preparadas à temperatura de 10° C pode ser feita observando-se a Figura 19, que mostra que a presença de zinco na subfase causa uma maior inclinação da curva e conseqüentemente um maior módulo compressional da monocamada,  $C_s^{-1}$  dado por:  $-A (\partial\pi/\partial A)_T$ . Deve-se observar que quanto menor a tangente da curva, menos condensada encontra-se a monocamada e maior será sua compressibilidade ( $C_s$ ). Efeito inverso é obtido na temperatura de 25° C.

#### 4.2. Isotermas superficiais formadas sobre trealose

Para as monocamadas de DMPA formadas sobre subfase contendo trealose (Calbiochem e Sigma purificada) não se observaram variações nas isotermas superficiais comparadas com as obtidas para as monocamadas obtidas sobre subfase contendo apenas água pura, portanto serão apresentadas apenas as isotermas formadas em subfase trealose não purificada (Sigma), que a partir de agora será chamada de TRnp.

Nesses experimentos também se investigou o efeito causado pela variação de temperatura nas isotermas superficiais; as curvas obtidas estão na Figura 20. As isotermas foram obtidas em duplicata e não se observaram variações maiores que  $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

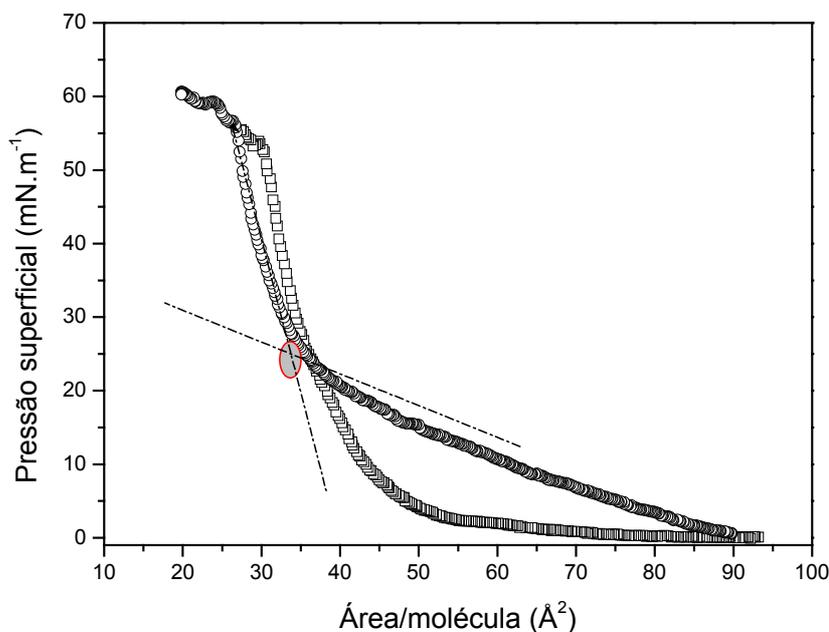


**Figura 20:** Efeito da presença de TRnp ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) na subfase das monocamadas de DMPA formadas a várias temperaturas:  $25^\circ\text{C}$  (□),  $15^\circ\text{C}$  (○) e  $10^\circ\text{C}$ (△).

Assim como os íons divalentes, a presença da trealose causa a extinção das transições de fases. Nesse caso, porém, ao invés de ocorrer uma condensação das monocamadas à medida que a temperatura é reduzida ocorre uma expansão, ou seja, há um aumento na compressibilidade das monocamadas, visualizada pela diminuição nas tangentes dos gráficos apresentados na Figura 20, conforme se vai de 25 para 10°C. Esse efeito, contrário ao observado quando a subfase contém apenas água pura ou íons zinco, deve-se ao fato de que ao passo que na presença de íons zinco ocorre uma diminuição na repulsão eletrostática entre os grupos fosfato da cabeça polar do fosfolípido, as moléculas de trealose ou impurezas presentes na TRnp podem interagir por meio de ligações de hidrogênio (Villarreal et al 2004; Lambruschini et al 2000) (ver estrutura na Fig.14, Introdução).

Pode ocorrer que essas ligações sejam dificultadas com o aumento da temperatura, de maneira análoga ao que ocorre na solvatação de grupos polares de tensoativos não iônicos. Por outro lado, a expansão da monocamada em valores elevados de área por molécula pode ser devida a uma menor aproximação entre os grupos fosfato e, conseqüentemente, um menor empacotamento das caudas hidrofóbicas. Dessa forma, um abaixamento da temperatura nesse caso não causará um maior alinhamento das mesmas, com reflexo no aumento da pressão superficial à medida que a temperatura é diminuída. A taxas elevadas de compressão, a área por molécula sobre solução de TRnp é inferior àquela obtida sobre solução contendo íons zinco. Comparando-se o efeito do dissacarídeo e dos íons zinco na isoterma do DMPA à mesma temperatura (Figura 21), percebemos um deslocamento da isoterma para maiores pressões quando a TRnp está presente: a transição para o estado condensado ocorre em torno de 4 mN/m sobre solução de zinco (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>) e desloca-se para 22 mN/m (área circulado no gráfico da Figura 21) na presença de TRnp

10 mmol.L<sup>-1</sup>, ou seja, necessita-se uma maior energia para orientar as cadeias do fosfolípido na presença deste aditivo em comparação à presença de íons zinco.



**Figura 21: Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA formadas sobre e soluções aquosas de: TRnp (10 mmol.L<sup>-1</sup>) (○) e Zn<sup>2+</sup> (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>) (□).**

Medidas de condutividade elétrica de soluções da TRnp forneceram o valor de 1,12  $\mu\text{S/cm}$ , contra uma condutividade de 17,48  $\mu\text{S/cm}$  para uma solução de  $\text{ZnCl}_2$  0,1 mM. Análise por absorção atômica mostrou a presença de íons sódio, potássio, cálcio e magnésio, em concentrações da ordem de 0,058, 0,0023, 0,03 e 0,0074 mM respectivamente. Uma solução contendo apenas esses íons e nessas concentrações forneceria uma condutividade da ordem de 2,75  $\mu\text{S/cm}$ , o que demonstra que não devemos ter outros íons multivalentes em concentrações consideráveis. A TRnp pode interagir com a parte polar do fosfolípido, e poderia certamente influenciar nas formações de ligações de

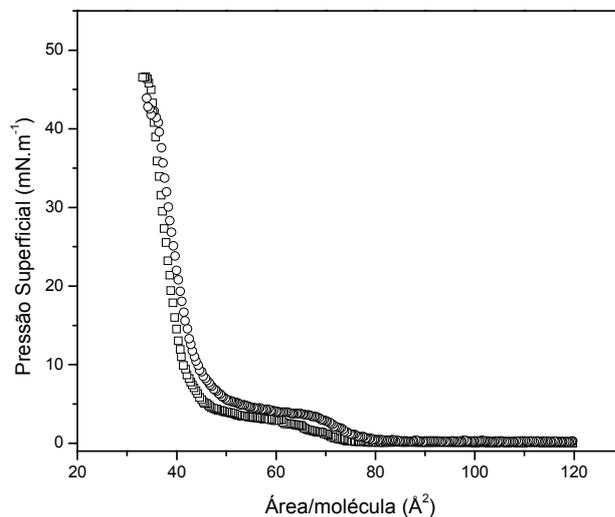
hidrogênio entre o tensoativo e a água. As áreas mínimas por molécula ocorrem em valores relativamente próximos para as curvas obtidas na presença de íons zinco ou da TRnp (ver Fig.21 e Tabela 1), mas que difere daquela obtida sobre água pura. Esse conjunto de dados, acrescido das análises de condutividade elétrica das soluções e isoterma para monocamadas de DMPA sobre solução de trealose purificada (ver Fig. 22), permite inferir que quem modifica a isoterma de DMPA não devem ser a moléculas de trealose elas próprias, porém as impurezas presentes, e, no caso da TRpn (procedência Sigma) os próprios íons.

**Tabela 1:** Comparação de valores característicos para monocamadas de DMPA formadas sobre diferentes subfases e a 25°C.

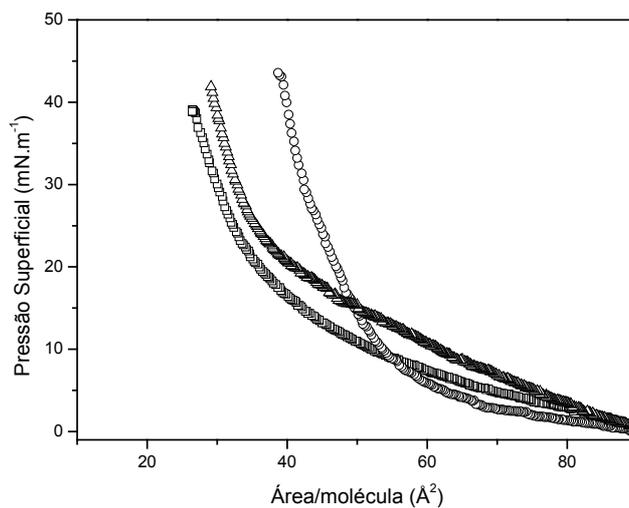
Subfase	Área Mínima por molécula ( $\text{Å}^2$ )	Pressão de Transição LE-LC (mN/m )	Pressão de Colapso (mN/m)
Água pura	49	4	55
Zn <sup>2+</sup>	41	X	54
TRnp	39	X	59

A Figura 23 mostra as isotermas superficiais para a impureza extraída da trealose (Sigma) e o efeito da impureza na isoterma do DMPA. A monocamada da impureza foi obtida espalhando-se um volume de 40  $\mu\text{L}$  do extrato em hexano obtido da extração de 10g de TRpn. Para controle, igual volume de hexano puro foi espalhado sobre água e a variação de pressão superficial foi inferior a 1 mN/m. A isoterma mista, DMPA/impureza foi obtida espalhando-se um volume total de 70  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 30  $\mu\text{L}$  de DMPA 1 mM

e 40  $\mu\text{L}$  do extrato de hexano. A abscissa das isotermas é apresentada em termos da área por molécula do fosfolipídio, DMPA.



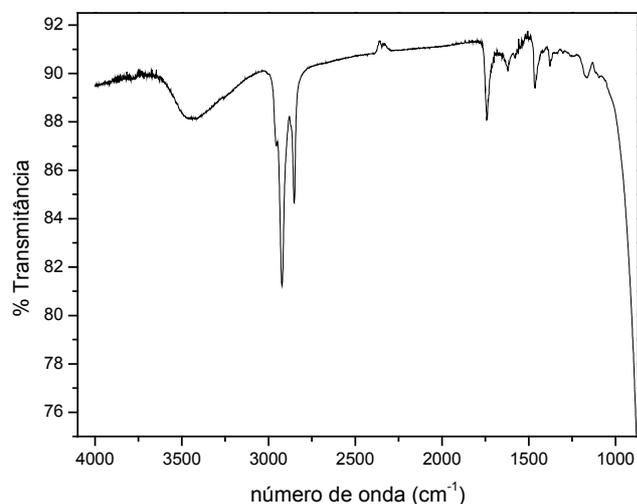
**Figura 22: Isotermas superficiais em subfase para o DMPA a 25 °C em subfase: água ( $\square$ ) e trealose purificada ( $\circ$ ).**



**Figura 23: Isotermas superficiais em subfase água para: impureza da trealose (Sigma) ( $\square$ ), DMPA/impureza ( $\circ$ ) e DMPA em subfase TRnp (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ( $\Delta$ ), todas a 25°C.**

O fato da impureza da trealose extraída com hexano apresentar atividade superficial indica que não apenas íons presentes na TRpn podem influenciar no comportamento de fosfolipídios na interface, mas que existe também uma contribuição dessa impureza anfifílica. Foram feitas medidas complementares de tensão superficial para soluções aquosas de TRnp na mesma concentração usada na Cuba, detectando-se um considerável abaixamento na tensão superficial da água ( $72,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para aproximadamente  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ), o que confirma a natureza anfifílica da impureza.

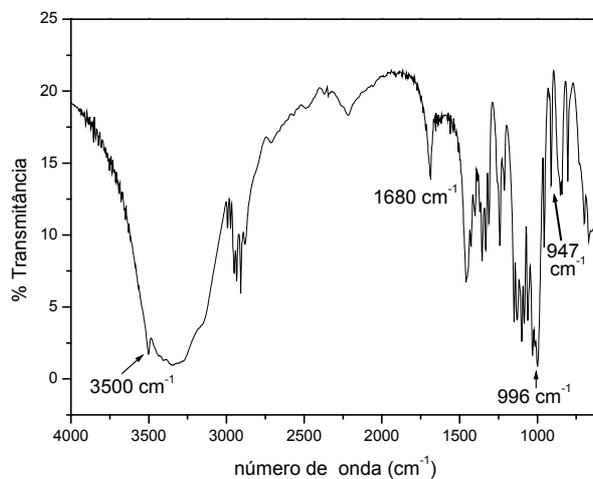
A fim de tentar identificar a natureza química dessa impureza, registrou-se um espectro na região do infravermelho. Este foi obtido por gotejamento do extrato em hexano sobre uma janela de fluoreto de bário. O branco foi obtido gotejando-se o mesmo volume de hexano puro. O espectro obtido é apresentado na Figura 24. Deve-se observar que mesmo havendo relatos na literatura (Villarreal et al 2004; Arnett et al 1986) que afirmam que os efeitos de trealose sobre isotermas de fosfolipídio devem-se a impurezas, os mesmos não identificam a natureza das mesmas. Enquanto que outros afirmam que o efeito seja devido à própria trealose (Lambruschini et al 2000).



**Figura 24: Espectro na região do infravermelho por transmissão para a impureza extraída da trealose.**

O espectro da Figura 24 apresenta bandas em 2916 e 2838  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem ao estiramento das ligações C-H, e a em 1744  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da carbonila C=O, a banda em torno de 3400  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento O-H da água.

A identificação de bandas relativas ao grupo  $\text{CH}_2$  apontam para um grupo hidrofóbico apolar saturado. A extremidade polar, entretanto não pode ser definida. Não são observadas vibrações devido ao grupo fosfato (banda forte entre 1350 e 1150  $\text{cm}^{-1}$ ) que identificariam a presença de um fosfolípido, p.e., também não identificou-se ácido carboxílico que deveria apresentar banda característica entre 1725 e 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Se por outro lado tivéssemos fragmentos de proteínas as bandas amida I em 1690 a 1670  $\text{cm}^{-1}$  e amida II em 1620 a 1590  $\text{cm}^{-1}$  deveriam estar presentes no espectro.



**Figura 25: Espectro de infravermelho por usando pastilhas de  $\text{CaCl}_2$  para trealose purificada.**

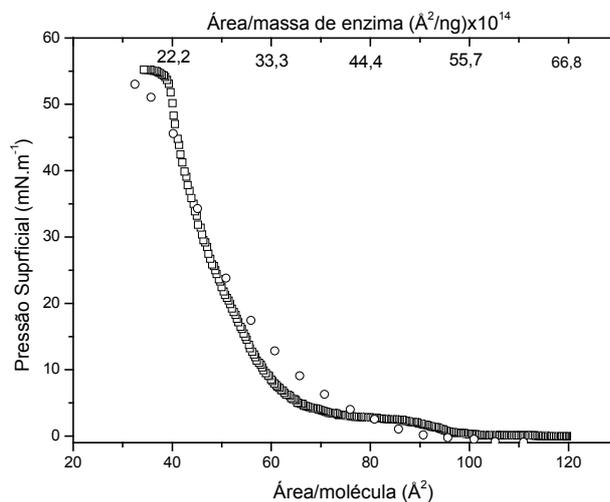
A Figura 25 mostra o espectro na região do infravermelho para a trealose purificada. O pico em  $3500 \text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento O-H da trealose, a banda em  $1680 \text{ cm}^{-1}$  corresponde à banda de combinação da água, os picos em  $996$  e  $947 \text{ cm}^{-1}$  correspondem aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-O-C; em  $2905 \text{ cm}^{-1}$  tem-se a banda do estiramento da ligação C-H. Essas atribuições foram feitas de acordo com “*Akao K*” (Akao et al 2001).

÷

### 4.3. Isotermas superficiais para monocamadas mistas DMPA/proteína

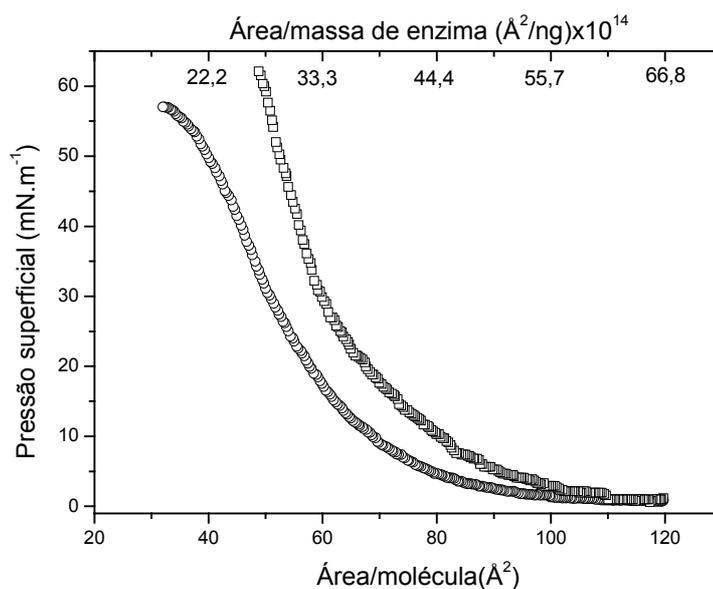
Antes de iniciar o estudo da deposição da fosfatase alcalina imobilizada sobre filmes LB, foram levantadas as isotermas do fosfolipídio na presença das proteínas injetadas na subfase. A Figura 26 mostra como a enzima DSAP exerce influência sobre a isoterma do DMPA em solução de zinco ( $0,1\text{mmol.L}^{-1}$ ), indicando a ocorrência de uma adsorção conjunta da enzima e do fosfolipídio na interface como já observado anteriormente .

Observa-se que área mínima por molécula é praticamente a mesma para a monocamada de fosfolipídio puro e para a monocamada mista com a enzima. Isto ocorre devido à inserção da âncora hidrofóbica na interface, enquanto que o corpo polipeptídico permanece abaixo da interface, conforme já discutido em trabalho anterior (Caseli et al 2005). Desta forma não há como estimar a área por molécula referente apenas à enzima a partir das isotermas apresentadas na Figura 26.



**Figura 26:** Efeito da adição de DSAP ( $7,6\text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) ( $\circ$ ) na subfase da monocamada de DMPA ( $\square$ ) a  $25^{\circ}\text{C}$ . A razão molar fosfolipídio: proteína é de 15000:1.

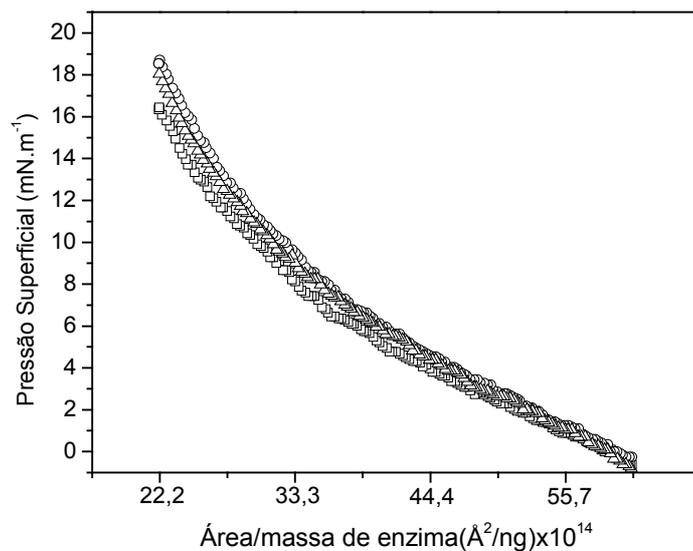
A curva mostra que a enzima aumenta a compressibilidade da monocamada do fosfolípido, que pode ser explicado pelas interações dos grupos polares do DMPA com a proteína, como também pelo fato da âncora hidrofóbica penetrar na interface dificultando o empacotamento das moléculas do fosfolípido, tornando a monocamada mais expandida.



**Figura 27: Efeito da temperatura na monocamada mista**

**DMPA/DSAP: 25°C(○) e 10°C(□)**

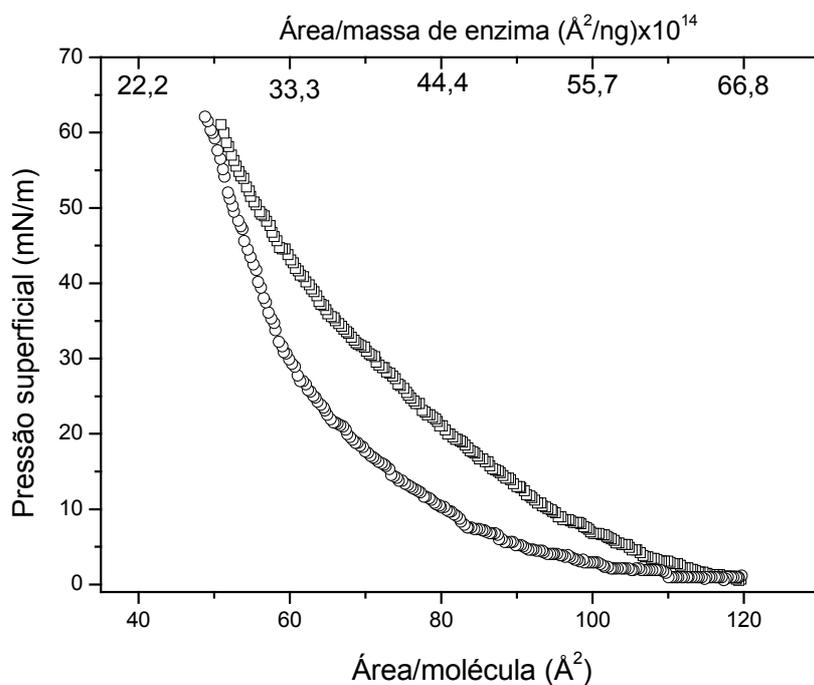
O efeito da diminuição da temperatura no sistema que contém DMPA/DSAP é bastante pronunciado, e evidencia-se a maiores compressões da monocamada (Figura 27). Esse comportamento pode ser devido: ao aumento das interações tensoativo/DSAP a baixas temperaturas, ao maior grau de organização e compactação da monocamada mista.



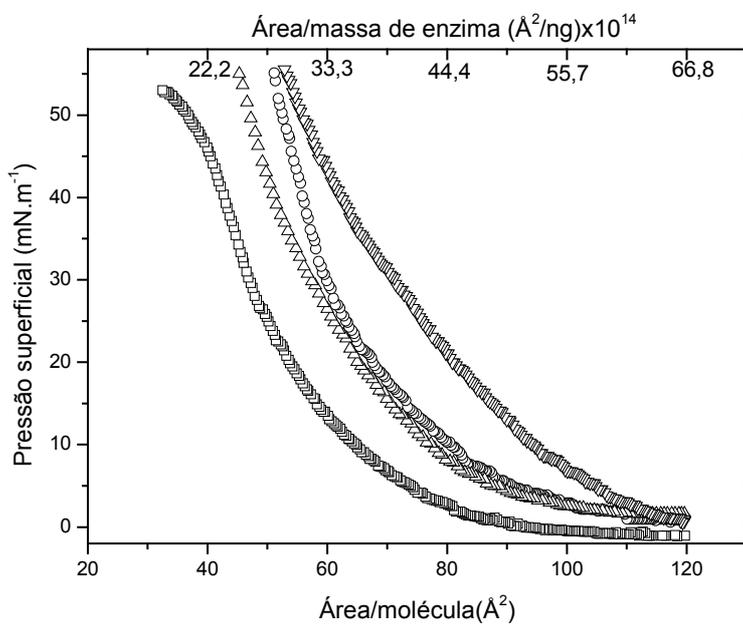
**Figura 28: Efeito da temperatura na isoterma da DSAP :25°C (○), 15°C (Δ) e 10°C (□).**

A Figura 28 mostra o caráter anfifílico da DSAP, que exibe atividade superficial, evidenciada pela obtenção da isoterma para a monocamada formada apenas pela enzima. Observa-se que a monocamada alcança altas pressões superficiais devido à presença da âncora hidrofóbica na interface, porém a temperatura tem um efeito pouco pronunciado.

A adição de TRnp na subfase afeta também a monocamada mista DMPA/DSAP (Figura 29), seguindo a mesma tendência do efeito sobre a monocamada de DMPA puro. Como resultado, a monocamada mista DMPA/DSAP formada sobre solução de TRnp e à temperatura de 10° C é aquela que apresenta maior compressibilidade e maior área mínima média por molécula (Figura 30).

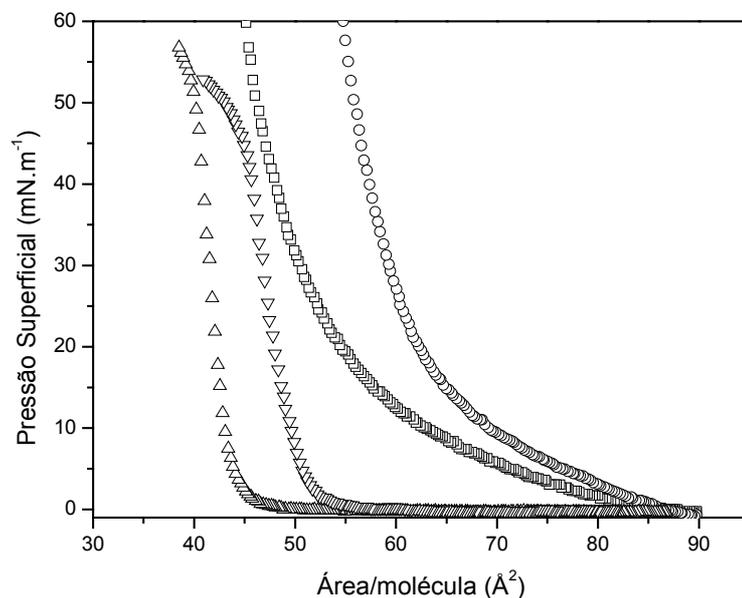


**Figura 29: Efeito da adição de TRnp (10 mmol.L<sup>-1</sup>) (□) na subfase de DMPA/DSAP (○) à 25<sup>0</sup>C**



**Figura 30: Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA/DSAP: em subfase de TRnp (10mmol L<sup>-1</sup>) a 25°C (Δ) e 10°C (∇) e em água a 25°C (□) e 10°C (○).**

As isotermas para as monocamadas mistas DMPA/CNCAP mostraram-se semelhantes às obtidas para DMPA, quando à mesma temperatura. Constatou-se que a enzima não exerce influência sobre a isoterma do fosfolípido, o que comprova que a CNCAP não possui atividade superficial e pouco interage com as cabeças polares do fosfolípido, permanecendo solúvel em solução aquosa, esse dado ajuda a elucidar a não formação de filme LB misto DMPA/CNCAP na ausência de TRnp e ressalta a importância da âncora GFI da enzima DSAP na interação com a monocamada de fosfolípido. Na Figura 31 são mostrados os efeitos da temperatura e da adição de TRnp nas isotermas para o DMPA/CNCAP.



**Figura 31: Isotermas superficiais para monocamadas de DMPA/CNCAP: em subfase de TRnp (10mmol L<sup>-1</sup>) a 25°C (□) e 8°C (○) e em água a 25° (▽) e 8°C (Δ).**

Para a monocamada DMPA/CNCAP o efeito da temperatura é semelhante ao observado para a monocamada de DMPA pura, onde o abaixamento da temperatura intensifica as interações entre as moléculas do fosfolipídio, refletindo na expansão da isoterma. Com a adição de TRnp, muito provavelmente a parte sacarídea da proteína interage com o açúcar contido na subfase, resultando em uma monocamada menos condensada à medida que a temperatura é diminuída.

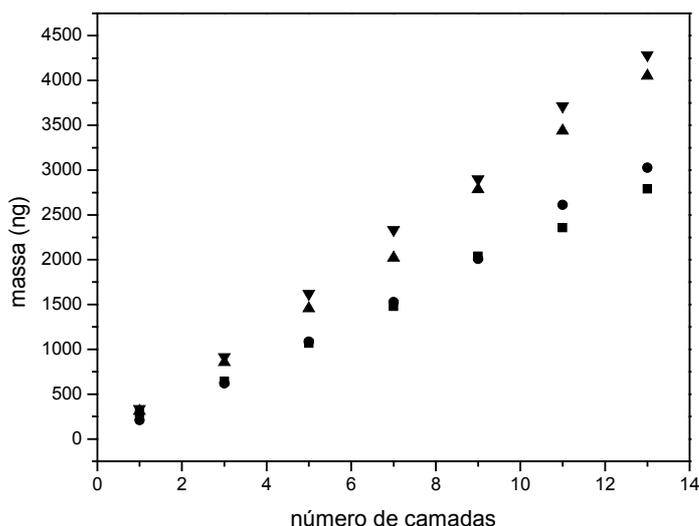
#### **4.4. Incorporação da fosfatase alcalina em filmes LB de DMPA**

Conforme foi citado na introdução do relatório, monocamadas líquidas de fosfolipídio, bem como os filmes LB correspondentes, constituem-se sistemas modelo para membranas biológicas. Em trabalhos prévios do Laboratório (Caseli et al 2004) foi demonstrado que enzimas presentes em monocamadas mais expandidas forneciam atividade enzimática mais elevada. Com o intuito tentar obter a expansão das monocamadas por meio de variações de temperatura, estudou-se o efeito da temperatura na imobilização da fosfatase alcalina sobre filmes LB de DMPA. Estudou-se a adsorção de ambas enzimas, DSAP e CNCAP, sobre filmes LB de DMPA. A adsorção das proteínas foi caracterizada pela técnica da microbalança a cristal de quartzo.

Não obtemos êxito na transferência de monocamadas de DMPA formadas em subfase contendo trealose da Calbiochem e Sigma purificada, nas concentrações de 10 mM. Portanto os resultados sobre o efeito da temperatura na imobilização de fosfatases alcalinas

em filmes LB serão apresentados apenas quando íons zinco e TRnp foram utilizados nas subfases das monocamadas ou nas soluções da proteína.

Para verificar a qualidade da matriz fosfolipídica preparada a partir da técnica LB, traçaram-se os gráficos de massa depositada em função do número de camadas depositadas (Figura 32). A linearidade dos gráficos atesta a estrutura de camadas e a tangente dos gráficos permite estimar a massa depositada por camada nas diferentes temperaturas e na presença de íons zinco ou TRnp.



**Figura 32: Efeito da temperatura na massa total depositada para filmes LB:**

**DMPA/TRnp a 25°C (▲) e 10°C(▼), DMPA/Zn<sup>2+</sup> a 25°C (■) e 10°C (●).**

O método usado para a imobilização de DSAP consistiu na injeção de um volume da solução aquosa da enzima a poucos milímetros da interface contendo a monocamada de DMPA no estado expandido. Um filme LB de DMPA com três camadas, terminado em

extremidade hidrofóbica, é então imerso através da monocamada mista comprimida depositando a quarta camada como DMPA/DSAP, terminando com a extremidade hidrofílica para expor adequadamente o sítio ativo da enzima nos testes de atividade catalítica.

Para a imobilização da CNCAP, usou-se adsorção a partir de uma solução aquosa contendo CNCAP 7,9 mg/L, imergindo um filme DMPA com quatro camadas, expondo ao final as extremidades polares das moléculas do fosfolipídio. As massas depositadas informadas na Tabela 2 correspondem a um tempo de adsorção de 5 minutos. Os efeitos da temperatura e da matriz fosfolipídica usada na adsorção das proteínas sobre a massa depositada em cada sistema estão resumidos na Tabela 2.

Constata-se por meio das condições 3 e 4 da Tabela 2 que TRnp consiste em um bom agente de ligação entre as camadas sucessivas de DMPA depositadas usando a técnica LB. Geralmente usam-se íons divalentes com essa função, porém, tendo em vista as impurezas contidas na amostra de trealose (Sigma) podem ser esses os causadores da formação do filme LB, uma vez que trealose purificada ou de maior pureza não conseguiram promover a ligação entre camadas sucessivas de fosfolipídio/proteína no filme.

A tendência observada na Tabela 2, com relação ao efeito da temperatura sobre as massas médias depositadas de DMPA para as condições 1 e 2, segue a esperada qualitativamente a partir das isotermas registradas para DMPA a 8 e a 25° C (Fig.18), pois a 25° C tem-se uma maior área ocupada por molécula e, portanto, uma menor densidade superficial para o fosfolipídio na interface líquido/ar. Levando-se em consideração os valores de densidades superficiais extraídos das isotermas da Figura 18, a área de depositada sobre o suporte sólido e, assumindo ainda, que o número de íons zinco por

molécula de DMPA (1:2) permaneça o mesmo independente da temperatura de deposição pode-se estimar os valores que deveriam ser depositados. Nesse caso os valores estimados a partir das isotermas para as massas de DMPA/ $Zn^{2+}$  depositadas a 10° C e a 25° C, são de respectivamente 189 ng e 171 ng, contra 238,5 e 212 ng obtidos experimentalmente (Tabela 2). A grande diferença observada deve estar relacionada à adsorção conjunta de moléculas de água. Teríamos então um valor de 1 molécula de água por 10 moléculas de DMPA. Nessa mesma linha de raciocínio podemos avaliar as diferenças entre os valores de massa depositados na presença de TRnp (condições 3 e 4). Porém nesse caso, a presença de impurezas e a identificação não conclusiva sobre o agente de ligação entre as camadas não permite o cálculo de estequiometrias ou número de moléculas de trealose que porventura estariam fazendo parte do filme. De qualquer forma, as informações relevantes até esse ponto são: TRnp promove a ligação entre as camadas de DMPA e a massa total depositada é superior àquela obtida quando íons zinco são utilizados para promover a ligação. Esse resultado pode ser devido à presença de íons mono e divalentes como impurezas, à presença da impureza anfifílica ou, ainda, à parcial ou total substituição de moléculas de água por moléculas de trealose (Pereira et al 2004.)

**Tabela 2: Massas depositadas das enzimas DSAP e CNCAP imobilizadas sobre filmes LB de DMPA, contendo íons zinco ou TRnp na subfase, em diferentes temperaturas**

Condição	Filme	Temperatura $\pm 0.5$ °C	Massa total depositada ( $\pm 1.4$ ng)
1	DMPA/ $Zn^{2+}$	10	238.5
2	DMPA/ $Zn^{2+}$	25	212.0
3	DMPA/TRnp	10	334.3
4	DMPA/TRnp	25	316.4
5	DMPA/ $Zn^{2+}$ + CNC	10	225.6
6	DMPA/ $Zn^{2+}$ + CNC	25	236.9
7	LB (DMPA/ TRnp) + CNC	10/25	1836.9
8	LB (DMPA/TRnp) + CNC	25/25	2968.8
9	DMPA/DSAP	10	255.3
10	DMPA/DSAP	25	484.0
11	DMPA/DSAP/TRnp	10	934.7
12	DMPA/DSAP/TRnp	25	977.3

As massas depositadas para as condições 5 e 6 da Tabela 2 demonstram que não é possível depositar CNCAP a partir de solução sobre filme LB pré-formado de DMPA/ $Zn^{2+}$ . A massa média depositada é da mesma ordem de grandeza que a massa média por camada de DMPA/ $Zn^{2+}$  confirmando que CNCAP não interage diretamente com as cabeças polares do fosfolípido. Entretanto, a massa depositada na presença de TRnp é bastante elevada, indicando que esse aditivo além de promover a ligação entre camadas sucessivas do fosfolípido no filme LB, também promove a ligação da enzima, CNCAP, ao filme LB de DMPA. Como se tem apenas informação da massa total, não há como estimar a massa de

enzima depositada. Há necessidade de uma análise química do conteúdo de fosfolipídio e de TRnp presentes no filme.

Análises das massas depositadas para as condições 9 a 12 ajudam no entendimento da forma de deposição da enzima DSAP. Na ausência de TRnp a enzima praticamente não é incorporada ao filme de DMPA à temperatura de 10° C. A causa para esse resultado pode ser a baixa compressibilidade da isoterma nesse caso que pode impedir que as caudas hidrofóbicas de DSAP penetrem na monocamada do fosfolipídio. A 25°C, entretanto, a fluidez da monocamada é maior e a penetração é permitida. Em presença de TRnp (condições 11 e 12) a massa total depositada é praticamente triplicada nas temperaturas estudadas, condições nas quais, na ausência de TRnp não se observava a incorporação da enzima. Novamente, ainda não há como estimar apenas a massa da enzima incorporada, mas pode-se inferir que, devido às características químicas da molécula de TRnp, essa não deva auxiliar na interação de DMPA com DSAP por meio das caudas hidrofóbicas da âncora. Assim sendo, o que deve estar ocorrendo é uma ligação da enzima às monocamadas de DMPA por meio das regiões hidrofílicas da enzima.

## **4.5. Cinética Enzimática**

### **4.5.1. Cinética Enzimática para a DSAP**

Experimentos de cinética enzimática foram realizados para a enzima DSAP sobre filmes de DMPA/ $Zn^{2+}$  (4 camadas) sendo o ultima camada mista com a enzima obtida na própria cuba

Os resultados das medidas de cinética enzimática são apresentados na Tabela 3. Maior atividade frente à hidrólise do PNPP a 37 °C foi obtida para o filme depositado à

menor temperatura, que corresponde àquele com a menor densidade superficial para a enzima, confirmando resultado anteriormente obtido na interface líquido/ar (Caseli et al 2005) A detecção da atividade enzimática indica que a enzima mantém a atividade catalítica quando adsorvida no filme LB a baixa temperatura. Os dados de densidade superficial da enzima foram obtidos pela técnica da QCM, assumindo que a adsorção sobre a placa de vidro seja análoga à adsorção sobre os cristais de quartzo/ouro, ambos recobertos com filmes LB, e que a massa de polidocanol usada para solubilizar a enzima seja desprezível em relação à massa da enzima. Essas premissas são válidas uma vez que a deposição da monocamada mista contendo a enzima se dá sobre o filme LB de DMPA-Zn<sup>2+</sup>, em ambos os casos; desta forma a interação se dá entre caudas hidrofóbicas das moléculas do fosfolipídio e também da enzima. Além disso, a pequena razão enzima/fosfolipídio e a diluição da solução de enzima quando injetada garantem que a quantidade de polidocanol no filme seja desprezível.

**Tabela 3:** Atividade enzimática da fosfatase alcalina DSAP na hidrólise do PNPP a 37<sup>o</sup>C

Filme LB	Temperatura de deposição (° C)	Densidade superficial da DSAP (ng.cm <sup>-2</sup> )	Atividade em relação ao meio homogêneo (%)
DMPA/Zn <sup>2+</sup>	25	339,1	10,3
DMPA/Zn <sup>2+</sup>	08	53,4	27,1

A atividade específica (U/mg) da enzima no filme foi calculada em relação à atividade específica da enzima no meio homogêneo. A diminuição da atividade enzimática é atribuída à: mudança conformacional da fosfatase alcalina quando incorporada ao filme LB. Diminuição da atividade catalítica é registrada em outros trabalhos (Ronzon et al 2002)

sobre atividade catalítica de enzimas imobilizadas. Em solução a proteína está homogeneamente distribuída e pode interagir em todas direções, ao passo que, em meio heterogêneo (com a placa submersa na solução) a reação ocorre somente nas proximidades do filme LB; no caso de haver agregação pode ocorrer superposição das proteínas sobre o filme, dificultando a acessibilidade aos sítios catalíticos.

Mas, ainda assim, o fato relevante é a quase que duplicação da atividade quando o filme é depositado à menor temperatura. Constata-se que com uma menor massa depositada e conseqüentemente uma menor densidade superficial da enzima adsorvida à 8<sup>o</sup>C, obtém-se a maior atividade enzimática. Pode-se atribuir esse efeito ao empacotamento e orientação da proteína no filme, que possivelmente expandiu com a elevação da temperatura (medidas de cinética enzimática foram feitas à 37<sup>o</sup>C), posicionando e expondo os sítios catalíticos mais favoravelmente para a aproximação do substrato.

#### **4.5.2. Cinética Enzimática para a CNCAP**

A imobilização da CNCAP foi realizada sobre filmes de DMPA/TRnp (4 camadas) pela técnica de recobrimento por imersão em solução de 1,98 mg/L de enzima em dois tempos diferentes de adsorção (5 e 10 minutos) à temperatura de 25°C. Os resultados estão na Tabela 4, onde se observa que o tempo de adsorção da proteína praticamente não exerce influência sobre a atividade catalítica da enzima imobilizada.

**Tabela 4:** Atividade enzimática da fosfatase alcalina CNCAP na hidrólise do PNPP a 37°C

Filme LB	Tempo de deposição (min.)	Densidade superficial da CNCAP (ng.cm <sup>-2</sup> )	Atividade em relação ao meio homogêneo (%)
DMPA/TRnp	5	459	3,2
DMPA/TRnp	10	515	2,8

A pequena atividade catalítica comparada ao meio homogêneo pode ser atribuída à interação do açúcar com a parte sacarídea da enzima e também à grande quantidade de proteína adsorvida sobre o filme com a possível formação de multicamadas de proteínas que impediria a aproximação do substrato às moléculas da enzima.

## 5. CONCLUSÕES

Essa Dissertação permite concluir de maneira definitiva que são as impurezas contidas na trealose as responsáveis pela expansão nas isotermas superficiais para o fosfolipídio DMPA. Que a ligação entre camadas sucessivas do fosfolipídio usando trealose na subfase deve também ser atribuída às impurezas.

A temperatura afeta diretamente tanto a isoterma superficial do fosfolipídio quanto à deposição da proteína sobre o filme, refletindo na atividade das enzimas em filmes mistos com fosfolipídios, pois o empacotamento, a organização superficial bem como a exposição do sitio catalítico da enzima devem ser afetadas. No caso particular de se usar íons zinco como agente de ligação entre as camadas sucessivas, o efeito de expansão do filme a uma menor temperatura leva ao efeito desejado de se obter uma menor densidade superficial da enzima para filmes depositados a um mesmo valor de pressão superficial ( 30 mN m<sup>-1</sup>).

Para a formação do filme misto DMPA/CNCAP, a enzima só adere ao filme usando o método de recobrimento do filme por imersão em uma solução da proteína, quando o filme de DMPA foi formado na presença de TRnp.

## 6. REFERÊNCIAS

- Aizawa, M. et al., *Thin Solid Films*, 180, **1989** 227
- Akao, K.; Okubo, Y.; Asakawa N.; Inoue, Y.; Sakurai, M. *Carbohydrate Research* 334, **2001** 233
- Alonso, R.S.; Biondi, A.C.; Disalvo, E.A. *J. Membr. Biol.*108, **1989** 1
- Ariga, K.; Nakanishi, T.; Michinobu, T.; *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (8), **2006** 2278
- Arnett, M.E.; Harvey, N.; Johnson, E.A.; Johnston, D.S.; Chapman, D. *Biochemistry*, 25, **1986** 5239
- Atkins, P.W. *Physical Chemistry* 3<sup>o</sup>ed, Inglaterra **1996**
- Bader, H.; Van Wagenen, R.; Andrade, J.D.; Ringsdorf, H.; *J. Coll. Interface Sci.*, 101, **1984** 246
- Bhang, M.K.; Cho, N.J.; Park, J.S.; Kim, K. *Langmuir*, 14,**1998** 476
- Blodgett, K.B. *J. Am. Chem. Soc.*, 57, **1935** 1007
- Blodgett, K.B.; Langmuir, I. *Phys. Rev.*, 51,**1937a** 964
- Brockman, H. *Curr. Opin. Sctruc. Biol.*, 9, **1999** 438
- Caseli, L.; Oliveira, R.G.; Masui, D.;C, Leone, F.A.;Furriel R.P.M.; Zaniquelli, M.E.D. *Langmuir*, 21 (9), **2005** 4090
- Caseli,L.; Furriel, R.P.M.; de Andrade, J.F.; Leone, F.A.; Zaniquelli, M.E.D. *J.Colloid and Interface Science*, 275, **2004** 123

- Chudinova, G.K.; Chudinov, A.V.; Savransky, V.V.; Prokhorov, A.M. *Thin Solid Films*, 307, **1997** 294
- Ciancaglini, J.M.; Pizauro, A.A.; Rezende, A.A.; Rezende, L.A.; Leone, F.A. *Int. J. Biochem.*, 22, **1990** 385
- Collins, K.D.; Washabaugh, M.W. *Q. Rev. Biophys.*, 18, **1985** 323
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Chapman, D. *Science*, 223, **1984** 701
- Crowe, J.H.; Carpenter, J.F.; Crowe, L.M. *Annu. Rev. Physiol.* 60, **1998** 73
- Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Oliver, A.E.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F. *Cryobiology*, 43, **2001** 89
- Dubrovsky, T.; Tronin, A.; Dubrovskaya, S.; Guryev, O.; Nicolini, C. *Thin Solid Films*, 698, **1996** 284
- Elbein, A.D.; Pan, Y.T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. *Glycobiology*, 13(4), **2003** 17R
- Fendler, J.H.; Meldrum, F.C. *Adv. Mater.*, 7, **1995** 607
- Girard-Egrot, A.P.; Godoy, S.; Blum, L.J. *Advances in Colloid and Interface Science* 116, **2005** 205
- Girard-Egrot, A.P.; Moréllis, R.M.; Coulet, P.R. *Langmuir*, 14, **1998** 476
- Harkins, W.D.; Boyd, E. *J. Phys. Chem.*, 45, **1941** 20
- Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces, with Applications to Colloidal and Biological Systems*, Academic Press, London, **1985** 251
- Kiselev, M.A.; Zbytovska, J.; Matveev, D.; Wartewig, S.; Gapienko, I.V.; Perez, J. *Colloids and Surfaces A*, 256, **2005** 1
- Knobler, C.M. *Advances in Chemical Physics*, JohnWiley ed. EUA, 87 **1990**
- Krasteva, N.; Vollhardt, D.; Brezesinski, G.; Mohwald, H. *Langmuir* 17, **2001** 1209

Lambruschini, C.; Relini, A.; Ridi, A.; Cordone, L.; Gliozzi, A. *Langmuir*, 16, **2000** 5467

Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, **1917** 1848

Le Du et al., *J. Biol. Chem.*, 276, **1997** 145

Leone, F.A.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. *Trends in Comparative Biochem. Physiol.*, 3, **1997** 57

Lins, R.D.; Pereira, C.S.; Hunenberger, P.H. *Proteins*, 55, **2004** 177

McConnell, H.; Watts, T.H.; Weis, R.M.; Briam, A.A. *Biochim. Biophys.* 864, **1985** 95

McConnell, H.M. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 42, **1991** 171

Mohwald, H. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41, **1990** 441

Nicolini, C. *Trends Biotechnol.*, 15 (10), **1997** 395

Pereira, C.S.; Lins, R.D.; Chandrasekhar, I.; Freitas, L.C.G.; Hunenberger, P.H. *Biophysical Journal*, 86, **2004** 2273

Ronzon, F.; Desbat, B.; Chauvet, J.P.; Roux, B. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1560 (1-2), **2002** 1

Ronzon, F.; Rieu, J.P.; Chauvet, J.P. *Journal of Colloid and Interface Science* 301 (2), **2006** 493

Say, J.C.; Furriel, R.P.M.; Ciancaglini, P.; Jorge, J.A.; Lourdes, M.; Polizeli, T.M.; Pizauro J.M. *Phytochemistry*, 41, **1996** 71

Sauerbrey, G.Z. *Phys.*; 15, **1959** 206

Shapovalov, V.; Tronin, A. *Langmuir*, 13, **1997** 4870

Singer, S.J.; Nicolson, G.L. *Science*, 175, **1972** 720

Skibinsky, A.; Venable, R.M.; Pastor R.W. *Biophysical Journal*, 89, **2005** 4111

Sum, A.K. ; Faller, R. ; de Pablo, J.J. *Biophysical Journal*, 85, **2003** 2830

Sun, W.Q. Leopold, A.C. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A, **1997** 327

- Terenzi HF, Leone FA, *Phytochemistry*, 41(1996) 71
- Tieleman, D.P.; van der Spoel, D.; Berendsen, H.J.C. *J. Phys. Chem. B*, 104, **2000** 6380
- Tsvetkova, N.; Tenchov, B.; Tsonev, L.; Tsetkov, T. *Cryobiology*, 25, **1988** 256
- Vikholm, I.; Valimaki, W.V.; Helle, H. *Thin Solids Films*, 643, **1998** 623
- Villarreal, M.A.; Díaz, S.B.; Disalvo, E.A.; Montich, G.G. *Langmuir*, 20, **2004** 7844
- Westh, P.; Ramlov, H. *J. Exp. Zool.*, 258, **1991** 303
- Yasdanian, M.; Yu, H.; Zografí, G. *Langmuir*, 6, **1990** 1093
- Zavaglia, A.G.; Tymczyszyn, E.; De Antoni, G.; Disalvo, E.A. *Journal of Applied Microbiology*, 95, **2003** 1315

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)