

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERAÇÃO DA UREASE DE *JACK BEAN* COM
LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE PLAQUETAS HUMANAS

YASMINE MIGUEL SERAFINI MICHELETTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

YASMINE MIGUEL SERAFINI MICHELETTO

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERAÇÃO DA UREASE DE *JACK BEAN* COM
LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE PLAQUETAS HUMANAS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira
Orientador

Profa. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientador

Porto Alegre, novembro 2010.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março de 2009 e novembro de 2010, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Nádyá Pesce da Silveira e Co-orientação da Professora Doutora Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy

Prof. Dr. Hugo Verli

Profa. Dra. Clara Ismérica Damiani Bica

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira

Profa. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Yasmine Miguel Serafini Micheletto

AGRADECIMENTOS

À Nádyá, pela orientação e confiança.

À Célia, pela co-orientação.

Ao Rafael pelo companheirismo e paciência.

Aos amigos queridos: Miriam, Rafael, Quelen, Aline, Gisele, Mauro, Gabriela e Felipe.

A todos os colegas queridos do laboratório LINDIM, pelos momentos inesquecíveis e por tornarem o laboratório um ambiente de trabalho tão agradável.

Ao Carlo, pelo auxílio nos experimentos.

À Silvia, pelo auxílio no Potencial Zeta.

À minha família pelo apoio de sempre.

À minha mãe por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. LIPOSSOMAS	3
2.2. LIPÍDIOS.....	6
2.3. FASES LIPÍDICAS	9
2.4. UREASES	10
2.5. UREASE DE <i>JACK BEAN</i>	11
2.6. PLAQUETAS.....	13
2.7. GANGLIOSÍDEOS	14
2.8. TRITON X-100	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. OBJETIVOS GERAIS	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. LIPÍDIOS.....	18
4.2. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE PLAQUETAS HUMANAS.....	18
4.3. PREPARAÇÃO DOS LM NA PRESENÇA DA UREASE	19
4.4. PREPARAÇÃO DOS LM NA PRESENÇA DO TRITON X-100.....	20
4.5. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO GANGLIOSÍDEOS.....	20
4.6. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (POM)	20
4.7. ESPALHAMENTO DE LUZ (LS).....	21
4.8. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)	22
4.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	24
4.10. POTENCIAL ZETA (PZ).....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1. ESTUDO DE TRANSIÇÃO DE FASE DOS LM	31

5.2. ESTUDO DOS LM NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA JBU E DO TRITON X-100	33
5.2.1. Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM)	33
5.2.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	35
5.2.3. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	45
5.2.4. Potencial Zeta (PZ)	54
5.3. ESTUDO PRELIMINAR DOS LM COM GANGLIOSÍDEOS (GG) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA JBU E DO TRITON X-100	55
5.3.1. Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM)	55
5.3.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	57
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ANEXOS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática de um fosfolípido. O círculo em amarelo representa a cabeça polar e as caudas em preto representam as cadeias carbônicas apolares do fosfolípido. 4
- Figura 2. Representação de um lipossoma constituído por uma única bicamada lipídica. Os círculos em amarelo representam as cabeças polares dos lipídios. O círculo em preto representa as caudas apolares dos lipídios. O círculo central em azul representa o núcleo aquoso do lipossoma. 4
- Figura 3. Representação de um lipossoma multilamelar. Os círculos em amarelo representam as cabeças polares dos lipídios. Os círculos em preto representam as caudas apolares dos lipídios. O círculo central em azul representa o núcleo aquoso do lipossoma. 5
- Figura 4. Estruturas químicas em: A) colesterol, B – F) Grupos polares da esquerda para a direita: fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. 7
- Figura 5. Representação de uma membrana em bicamada com o colesterol orientado com seu grupo hidroxila polar junto à fase aquosa e o anel esteróide hidrofóbico paralelamente com as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípídios e dos esfingolípídios. 8
- Figura 6. Representação das diferentes mesofases da bicamada lipídica e indicação da variação de repetição lamelar (*d*). 10
- Figura 7. Representação da forma hexamérica da JBU. Três monômeros são associados no modo triangular, gerando uma superfície planar na face do triângulo, enquanto que a outra face tem uma pequena saliência formada pelo domínio $\alpha\beta$ N-terminal. A vista do hexâmero no eixo cristalográfico é mostrada à direita. 12
- Figura 8. Estrutura química genérica de um esfingolípido. Quando x for constituído por: Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal, se trata do gangliosídeo GM₁; se x for composto por: Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal-NeuAc, se trata do gangliosídeo GT_{1b}; se x for composto por: Glc-Gal(NeuAc-NeuAc)-GalNAc-Gal, trata-se do gangliosídeo GD_{1b}; quando x for constituído por: Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal-NeuAc trata-se do gangliosídeo GD_{1a} e quando x for: Glc-Gal(NeuAc-NeuAc)-GalNAc-Gal(NeuAc-NeuAc) trata-se do gangliosídeo GQ_{1b}. 15

Figura 9. Estrutura química do gangliosídeo GM3.	15
Figura 10. Estrutura química do Triton X-100. O n representa o número médio de 10 unidades de óxido de etileno.	16
Figura 11. Representação esquemática do método de evaporação em fase reversa para a preparação dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas.	18
Figura 12. Representação esquemática de uma bicamada lipídica com uma distância de repetição d e um feixe de radiação incidente com comprimento de onda λ que forma um ângulo θ entre os planos ordenados.	25
Figura 13. Representação esquemática dos parâmetros de ajuste obtidos a partir do fator forma dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas.	27
Figura 14. Flutuações de bicamada descritas pelo modelo de Caillé modificada.....	28
Figura 15. Representação esquemática da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado.	29
Figura 16. Representação esquemática da superfície externa de uma vesícula lipossômica. A fase 1 representa as extremidades polares dos fosfolipídios que conferem uma superfície homogênea. A fase 2 representa uma superfície não homogênea. As fases podem ser relacionadas com I_s , em função da temperatura, e a temperatura de transição de fase corresponde ao ponto à meia altura da curva.	32
Figura 17. Intensidade de luz espalhada em função da temperatura para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas. A temperatura de transição de fase foi obtida por meio da intersecção das retas.	33
Figura 18. Micrografias de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM), indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de Malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolipídios (fase hexagonal H), após evaporação da água.	34
Figura 19. Micrografias de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μ M, indicando em: (a)	

vesículas com organização lamelar (cruzes de malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolípidios (fase hexagonal H), após evaporação da água.	34
Figura 20. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100 1%, indicando em: (a) uma textura típica da fase lamelar ($L\alpha$), (b) textura em mosaico com a presença de cruz de malta, caracterizando sistemas com organização lamelar, após a evaporação da água.	35
Figura 21. Função de correlação temporal obtida para uma amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) a 25°C.	36
Figura 22. Função de correlação temporal obtida para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,1 μM a 25°C.....	37
Figura 23. Variação de diâmetro em função do tempo da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1% a 25°C. A seta indica a medida de diâmetro dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas na ausência da JBU e do Triton X-100.....	39
Figura 24. Intensidade de luz espalhada (I_s) normalizadas em função do tempo para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1% a 25°C. A seta indica as medidas de I_s dos LM na ausência da JBU e do Triton X-100.	40
Figura 25. Índice de polidispersão (PD.I), em função do tempo para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1% a 25°C. A seta indica as medidas de PD.I dos LM na ausência da JBU e do Triton X-100.	41
Figura 26. Distribuição dos tempos de relaxação para a amostra contendo somente urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μM	42
Figura 27. Distribuição dos tempos de relaxação para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μM . ..	43
Figura 28. Distribuição dos tempos de relaxação para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença do Triton X-100 1%.	44

Figura 29. Representação sequencial esquemática dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100, mostrando o ataque do Triton X-100 na membrana lipossômica, interagindo com os fosfolipídios e levando a formação de vesículas lipossômicas menores e micelas constituídas de Triton X-100/fosfolipídios.	44
Figura 30. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) para o 1° pico (ombro) em (a) e curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha verde) para o 2° pico em (b) da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas. Nos gráficos abaixo estão representados os correspondentes fator forma (linha preta) e fator estrutura (linha vermelha em (a) e linha verde em (b)). As curvas de $S(q)$ foram multiplicadas por 3 para poderem ser visualizadas na mesma escala.	46
Figura 31. Representação esquemática da membrana lipossômica, mostrando a ondulação na bicamada lipídica que ocasiona uma flutuação na distancia entre bicamadas.	47
Figura 32. Representação esquemática da distância de repetição lamelar (d) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM).	47
Figura 33. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM). Em (b) LM na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μM no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos (e) no tempo de 40 minutos e (f) após 12 horas.	49
Figura 34. Curvas de SAXS para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μM a 25°C. A linha amarela representa a curva de SAXS para a amostra contendo somente a urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μM em solução.	49
Figura 35. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 μM em: (a) no tempo de 10 minutos e em (b) após 12 horas da preparação.	50
Figura 36. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM). Em (b) lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100 1% no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos (e) no tempo de 40 minutos e (f) após 12 horas.	51

Figura 37. Curva de SAXS para a mostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença e na ausência do Triton X-100 a 25°C.	52
Figura 38. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100 em: (a) no tempo de 10 minutos e em (b), após 12 horas da preparação.	52
Figura 39. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG), indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolipídios (fase hexagonal H), após a evaporação da água.....	56
Figura 40. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 µM, indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolipídios (fase hexagonal H), após a evaporação da água.	56
Figura 41. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença do Triton X-100 1%, indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de malta), (b) textura em mosaico com a presença de cruz de malta, caracterizando sistemas com organização lamelar, após a evaporação da água.	57
Figura 42. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG).	58
Figura 43. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG). Em (b) lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 µM no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos e (e) no tempo de 40 minutos.	59
Figura 44. Curvas de SAXS da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,5 µM a 25°C.....	60

Figura 45. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG). Em (b) lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença do Triton X-100 1% no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos (e) no tempo de 40 minutos e (f) após 12 horas. 60

Figura 46. Curvas de SAXS para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na ausência e na presença do Triton X-100 1% a 25°C. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Moléculas utilizadas para a preparação dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas e suas quantidades adicionadas.	19
Tabela II. Parâmetros de fator forma obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM).	48
Tabela III. Parâmetros de fator estrutura obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM).....	48
Tabela IV. Parâmetros de fator estrutura obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de jack bean (JBU) 0,5 µM.	50
Tabela V. Parâmetros de fator estrutura obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença do Triton X-100.....	53
Tabela VI. Parâmetros de fator forma obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100.	53
Tabela VII. Potenciais Zetas (PZ) e seus desvios padrões para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença e na ausência da urease de jack bean (JBU) 0,5 µM e do Triton X-100 a 25° C.....	55
Tabela VIII. Parâmetros de fator forma obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG).	58
Tabela IX. Variação de diâmetro (por meio do método Cumulante) no tempo de 28 minutos para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,1 e 0,5 µM e do Triton X-100 1%.....	69
Tabela X. Variação de intensidade de luz espalhada (<i>I_s</i>) normalizada no tempo de 26 minutos para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de <i>jack bean</i> (JBU) 0,1 e 0,5 µM e do Triton X-100 1%.....	69

Tabela XI. Variação de Índice de polidispersão (PD.I) no tempo de 28 minutos para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μ M e do Triton X-100 1%.....70

LISTA DE ABREVIATURAS

LM: lipossomas miméticos de plaquetas humanas

JBU: urease de *jack bean*

GG: gangliosídeos

MLV: lipossomas multilamelares

LUV: lipossomas unilamelares grandes

MVL: lipossomas multivesiculares

SUV: lipossomas unilamelares pequenos

GUV: lipossomas unilamelares gigantes

PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

PS: fosfatidilserina

PI: fosfatidilinositol

SM: esfingomielina

CHOL: colesterol

Tf: temperatura de transição de fase

Lc: mesofase subgel

L β : mesofase gel

P β ' : mesofase gel ondulado

L α : mesofase líquido-cristalino

I_s: intensidade de luz espalhada

HPU: *Helicobacter pylori* urease

LS: Espalhamento de Luz

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico

SAXS: Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

POM: Microscopia Óptica de Luz Polarizada

PZ: Potencial Zeta

PD.I: índice de polidispersão

D: diâmetro

GM₁: monossialogangliosídeo da série 1

GD_{1a}: dissialogangliosídeo da série 1

GD_{1b}: dissialogangliosídeo da série 1

GT_{1b}: triassialogangliosídeo da série 1

GM₃: monossialogangliosídeo da série 3

GD₃: dissialogangliosídeo da série 3

Glc: D-glicose

Gal: D-galactose

GalNAc: *N*-acetil-D-galactosamina

NeuAc: ácido siálico

R_h : raio hidrodinâmico

d : distância de repetição lamelar

M : massa molecular

dn/dc : incremento no índice de refração da solução em função da concentração de partículas

I_0 : intensidade de luz incidente

N_A : número de Avogadro

λ_0 : comprimento de onda da luz incidente

R : distância entre a amostra e o detector

Φ : ângulo formado entre a direção de propagação da luz espalhada com a luz incidente

q : vetor de espalhamento

k_i : vetor de onda da radiação incidente

k_e : vetor de onda da radiação espalhada

$g_{(2)}(\tau)$: função de correlação da intensidade

$g_{(1)}(\tau)$: função de correlação do campo elétrico

τ : tempo de retardo (*delay time*)

D_T : coeficiente de difusão translacional

D_0 : coeficiente de difusão a diluição infinita

U_E : mobilidade eletroforética

ϵ : constante dielétrica

ζ : potencial zeta

η : viscosidade

$f(ka)$: função de Henry

Γ : frequência de relaxação

μ_2 : segundo cumulante

RESUMO

O presente trabalho apresenta o estudo físico-químico da interação de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com a urease de *jack bean* (JBU), bem como a interação com o surfactante Triton X-100. Realizou-se, também, um estudo físico-químico preliminar de LM com gangliosídeos (GG) em sua composição e a interação com a JBU e com o Triton X-100. Os LM foram preparados pelo método de evaporação em fase reversa. A interação da JBU e do Triton X-100 com os LM foi analisada pelas técnicas de Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) e Velocimetria de Espalhamento de Luz (PZ). O estudo da interação de LM com a JBU revelou uma significativa mudança nas dimensões dos LM, que se mostrou mais pronunciada com uma maior concentração de JBU. Os dados de SAXS revelaram mudanças estruturais na membrana lipossômica, indicando que a JBU aumenta a distância de repetição lamelar, enquanto que o Triton X-100 diminui. Observou-se, também, uma mudança no potencial elétrico superficial dos LM na presença do JBU e do Triton X-100. Os LM com GG apresentaram um perfil de SAXS característico de lipossomas unilamerales, diferentemente dos LM sem GG, indicando que os GG foram incorporados na membrana. Os dados de SAXS sugerem que a JBU esteja interagindo com GG dos LM e não com a membrana lipossômica.

ABSTRACT

This work presents the physical-chemical study of platelets mimetic liposomes (LM) interaction with *jack bean* urease (JBU), as well as interaction with the surfactant Triton X-100. The preliminary physical-chemical study was carried out with LM content gangliosides (GG) in its composition and its interaction with JBU and Triton X-100. The LM were prepared by reverse phase evaporation. The interaction of JBU and Triton X-100 with LM was analyzed by Polarized Optical Microscopy (POM), Dynamic Light Scattering (DLS), Small Angle X-ray Scattering (SAXS) and Velocimetry Light Scattering (PZ). The study of the interaction of LM with JBU revealed a significant change in the LM dimensions, which was more pronounced with a higher concentration of JBU. The SAXS data indicate structural changes in the liposome membrane, indicating that the JBU cause an increase in the lamellar repeat distance, while the Triton X-100 decreases. The surface electric potential changed in the presence of JBU and Triton X-100 in the LM. The LM with GG showed a SAXS profile characteristic of unilameral liposomes, unlike of LM without GG, indicating that the GG were incorporated into the membrane. The SAXS data suggest that JBU interacts with GG of the LM.

1. INTRODUÇÃO

Lipossomas são estruturas coloidais contendo um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em solução aquosa.¹ Lipossomas têm sido muito aplicados como modelos de membranas biológicas, pois são constituídos por bicamadas lipídicas.^{2,3} A composição lipídica da membrana lipossômica varia muito, dependendo dos fosfolipídios que a constituem. Dessa forma, são possíveis alterações estruturais, o que permite a modificação de suas características físico-químicas.⁴

A estabilidade lipossômica é a chave para a sua aplicação na indústria farmacêutica e na pesquisa como um importante modelo de membrana celular.³ Assim, é possível o estudo da interação de lipossomas miméticos de células com moléculas biológicas de interesse, como a urease de *jack bean*.

Ureasas são enzimas níquel-dependentes, que catalisam a reação de hidrólise da uréia para formar dióxido de carbono e amônia. Bioquimicamente, a urease de planta mais bem caracterizada é de *jack bean (Canavalia ensiformis)*.⁵ A urease de *jack bean (JBU)* foi a primeira enzima a ser cristalizada, em 1926, por Summer, contribuindo para a demonstração da natureza protéica das enzimas.⁶

Estudos mostraram que a canatoxina, uma isoforma da JBU, desempenha várias propriedades biológicas independente da sua atividade ureolítica, tais como o efeito inseticida e ativação das plaquetas. A atividade inseticida sugere que a canatoxina esteja envolvida com o mecanismo de defesa das plantas e que depende de um peptídeo interno (pepcanatox), liberado por meio da hidrólise da proteína por catepsinas de insetos.^{7,8,9} Dessa forma, a canatoxina apresenta uma grande potencialidade para o desenvolvimento de biopesticidas ou plantas transgênicas resistentes a insetos que são pragas agrícolas.¹⁰ Entretanto, o mecanismo de ação da canatoxina ainda aguarda elucidação.

A canatoxina apresenta, *in vitro*, a potencialidade de indução de agregação e secreção de plaquetas e, assim como a canatoxina, a JBU também é capaz de ativar plaquetas, porém não apresenta efeito tóxico em camundongos quando administrada intraperitonealmente.⁷

Sendo assim, na busca de contribuir na compreensão do mecanismo de ação da canatoxina sobre membranas celulares, uma alternativa é a preparação de lipossomas e estudar sua interação com a urease de *jack bean (JBU)*. Em função de a JBU possuir a característica de interagir com plaquetas, foram preparados lipossomas constituídos por lipídios majoritariamente encontrados nas membranas plaquetárias.^{3,11} Assim, aspectos

estruturais e dimensionais da membrana lipossômica podem ser estudados por meio da interação de lipossomas miméticos de plaquetas humanas com a urease de *jack bean*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LIPOSSOMAS

Há aproximadamente 40 anos, Alec Bangham observou que fosfolipídios em solução aquosa podiam formar estruturas em bicamadas fechadas, que são os chamados lipossomas.^{12,13} Desde então, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com essas vesículas lipossômicas, que são compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso.¹⁴ Os lipossomas têm sido muito aplicados como modelos de membranas biológicas devido a sua constituição em bicamada lipídica.³ Além disso, eles são muito estudados e utilizados como sistemas carreadores de fármacos em função da capacidade de reter substâncias hidrofílicas no seu núcleo aquoso e substâncias hidrofóbicas entre as lamelas.¹⁵

A composição lipídica da membrana lipossômica varia muito, dependendo dos fosfolipídios que a constituem. Fosfolipídios, por sua vez, são lipídios de membranas celulares que contêm dois ácidos graxos e um grupo altamente polar ou carregado (grupo-cabeça polar), que está ligado à porção hidrofóbica por uma ligação fosfodiéster.¹⁶ Uma representação esquemática de um fosfolipídio pode ser visualizada na Figura 1, na qual o círculo em amarelo representa a cabeça polar e as caudas em preto representam as cadeias carbônicas apolares do fosfolipídio.

Os fosfolipídios são praticamente insolúveis em água. Assim, quando misturados com a água formam, espontaneamente, agregados lipídicos em fase separada da sua vizinhança aquosa. Para a formação da bicamada lipídica, as porções hidrofóbicas em cada monocamada lipídica interagem entre si, enquanto que os grupos hidrofílicos carregados interagem com a água na superfície da bicamada. Para que as regiões hidrofóbicas não fiquem em contato com a água, tornando a bicamada relativamente instável, ela se dobra para formar uma esfera oca, formando uma vesícula. Dessa forma, depois de formadas as vesículas, as bicamadas perdem suas regiões hidrofóbicas marginais, alcançando estabilidade máxima em seu ambiente aquoso.^{17,18,19}

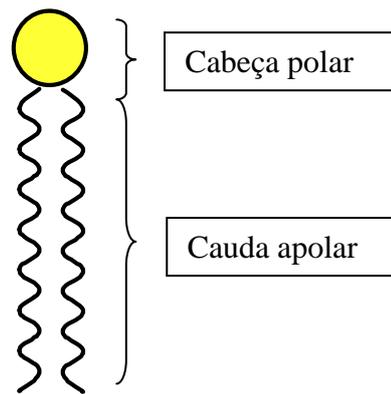


Figura 1. Representação esquemática de um fosfolípido. O círculo em amarelo representa a cabeça polar e as caudas em preto representam as cadeias carbônicas apolares do fosfolípido.

Existe uma grande variedade de lipossomas com diferentes composições lipídicas, estruturação e tamanhos.^{20,21} Os lipossomas são, usualmente, classificados em²²:

- a) Lipossomas unilamelares pequenos (SUVs): são lipossomas formados por uma única bicamada lipídica, com diâmetros variando entre 20 e 80 nm. A Figura 2 mostra uma representação esquemática de um lipossoma em bicamada;

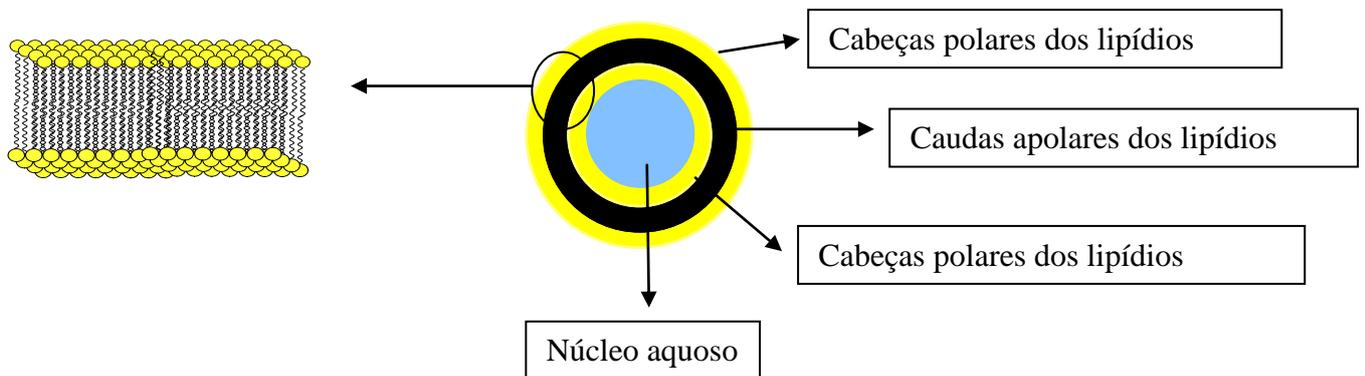


Figura 2. Representação de um lipossoma constituído por uma única bicamada lipídica. Os círculos em amarelo representam as cabeças polares dos lipídios. O círculo em preto representa as caudas apolares dos lipídios. O círculo central em azul representa o núcleo aquoso do lipossoma.

- b) Lipossomas unilamelares grandes (LUVs): são lipossomas formados por uma única bicamada lipídica e intermediários em tamanhos (diâmetro entre 80 nm e 1 μm);
- c) Lipossomas multilamelares (MLVs): são formados por várias bicamadas lipídicas dispostas de forma concêntrica, apresentando diâmetros entre 300 nm a alguns micrômetros. Uma representação esquemática de um MLV está apresentada na Figura 3;

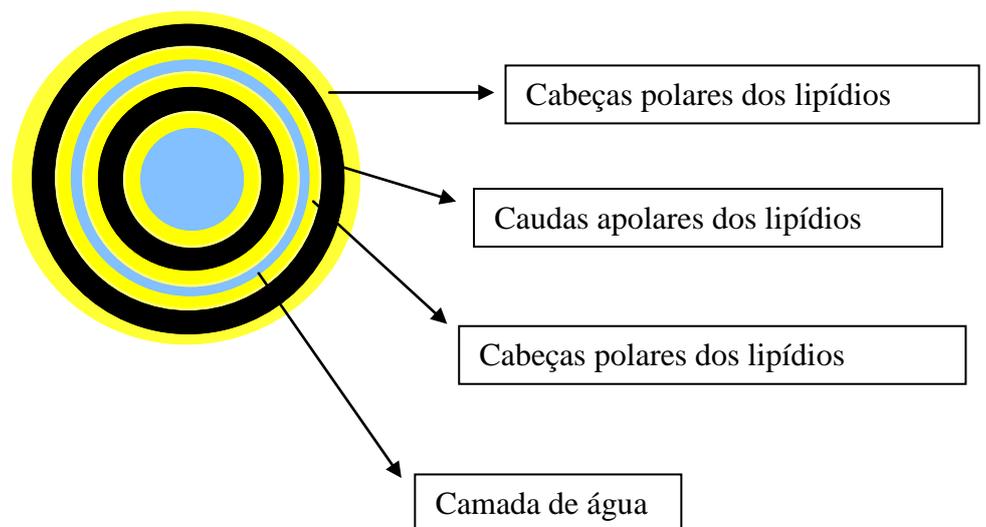


Figura 3. Representação de um lipossoma multilamelar. Os círculos em amarelo representam as cabeças polares dos lipídios. Os círculos em preto representam as caudas apolares dos lipídios. O círculo central em azul representa o núcleo aquoso do lipossoma.

- d) Lipossomas multivesiculares (MVLs): são formados por várias bicamadas lipídicas que não são concêntricas, contendo vários lipossomas encapsulados em um lipossoma de forma aleatória. A faixa de diâmetro varia entre 300 nm e alguns micrômetros;
- e) Lipossomas gigantes unilamelares (GUVs): são formados por uma bicamada lipídica com diâmetros superiores a 1 μm .

A estabilidade lipossômica é a chave para a sua aplicação na indústria farmacêutica e na pesquisa como um importante modelo de membranas celulares. A estabilidade física dos lipossomas pode ser entendida por meio da estabilidade coloidal, na qual os mais importantes aspectos dessa estabilidade são as mudanças de tamanho das partículas e a

distribuição de tamanhos. A variação de tamanho, num sistema coloidal, pode ocorrer devido a um desses fatores: as trocas moleculares ou a fenômenos de agregação, fusão, coacervação ou precipitação. No caso dos lipossomas, a agregação e a fusão são as principais fontes de instabilidade. O processo de agregação em lipossomas neutros se dá por meio de interações de van der Waals e é mais pronunciado em vesículas grandes. Uma alternativa para evitar a agregação é a introdução de cargas na mistura lipídica. Dessa forma, as repulsões eletrostáticas entre os lipossomas carregados são suficientes para a estabilização dos mesmos *in vitro*.^{3,23,24,25}

2.2. LIPÍDIOS

Apesar da grande variedade lipídica nas membranas celulares animais, constata-se que a fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidiletanolamina (PE) constituem as classes de fosfolipídios mais comuns nessas membranas. Fosfolipídios são também chamados de glicerofosfolipídios, pois são lipídios derivados do fosfato de glicerol. Nas biomembranas, os glicerofosfolipídios são todos derivados do estereoisômero L, denominado *sn*-glicero-3-fosfato.¹⁶

A PC possui um grupo colina e um grupo fosfato em seu grupo-cabeça polar ligado por meio de ligações ésteres com o glicerol.²⁶ A PE e a fosfatidilserina (PS) são aminofosfolipídios, contendo uma amina primária no grupo-cabeça polar. Outros glicerofosfolipídios comuns em biomembranas são o fosfatidilinositol (PI) e o fosfatidilglicerol.²⁷ Esses lipídios, normalmente, contêm uma cadeia acil esterificada saturada na posição *sn*-1 do glicerol.²⁸ Os esfingolipídios (SMs) são também indispensáveis para as células eucarióticas como, por exemplo, a esfingomielina (SM). SMs são esfingofosfolipídios que diferem dos glicerofosfolipídios no grupo hidrofóbico, que é uma ceramida. A ceramida pode ser vista como o resultado da condensação de um ácido graxo com uma amina de cadeia longa alifática hidroxilada.^{29,30,31} A Figura 4 mostra as estruturas químicas do colesterol, da PS, da SM, da PE, do PI e da PC.

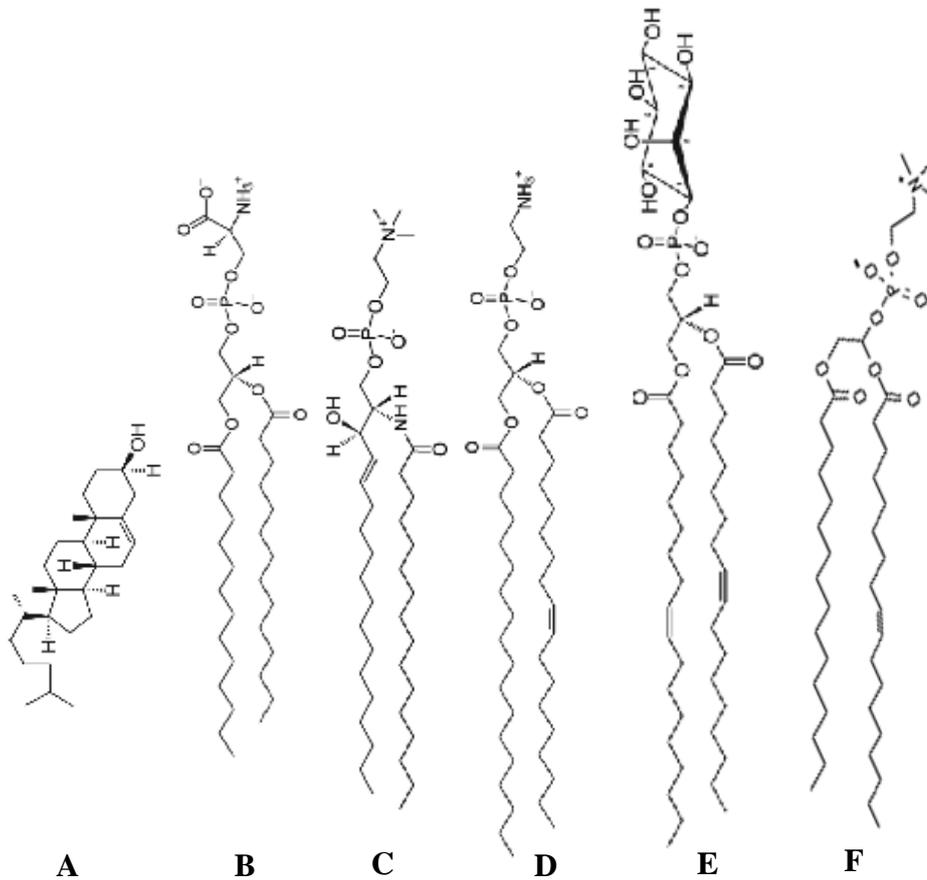


Figura 4. Estruturas químicas em: A) colesterol, B – F) Grupos polares da esquerda para a direita: fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilcolina.³²

Além dos fosfolipídios, o conteúdo Colestérico de algumas membranas é também significativo, podendo ser mais abundante do que qualquer classe individual de fosfolipídio. O colesterol (CHOL) é um lipídio (esterol) que difere de outras classes de lipídios, pois contém um anel rígido que se liga a uma hidroxila (cabeça polar) e a uma cadeia carbônica curta (cauda apolar).³³ Na membrana celular o colesterol está orientado com seu grupo hidroxila polar junto à fase aquosa e o anel esteróide hidrofóbico está orientado paralelamente às cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios e esfingolipídios³⁴ (Figura 5). O CHOL incorporado em membranas faz com que a estrutura da bicamada se torne intermediária entre um gel e um fluido, regulando a fluidez das cadeias hidrocarbonadas em diversas faixas de temperatura.^{35,36}

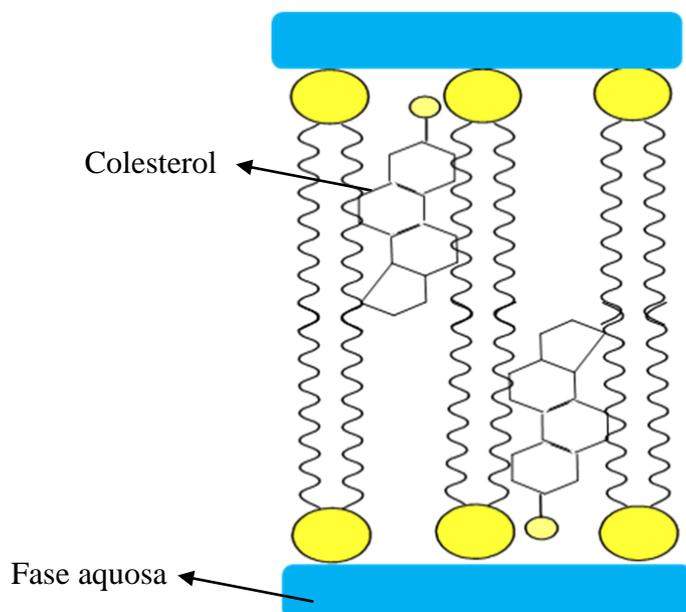


Figura 5. Representação de uma membrana em bicamada com o colesterol orientado com seu grupo hidroxila polar junto à fase aquosa e o anel esteróide hidrofóbico paralelamente com as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípídios e dos esfingolípídios.

As SMs são particularmente relevantes para a fisiologia celular devido à sua propriedade de se agregar com o colesterol na membrana. Esses domínios de CHOL/SM compõem a base das jangadas lipídicas nas biomembranas.^{37,38,39} Presume-se que as jangadas lipídicas desempenham funções importantes, incluindo sinalização, proteólise de superfície celular, polarização celular, entre outras.^{40,41}

Dentre os diferentes fosfolípídios existentes, há dois parâmetros estruturais importantes que variam dependendo de sua estrutura química. O primeiro é referente aos grupos polares dos fosfolípídios que podem ser carregados (aniônicos ou catiônicos) ou neutros (zwitteriônicos). O outro parâmetro é relativo às cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípídios que podem variar quanto ao número de carbonos que as constitui. Dessa maneira, com a variação desses parâmetros estruturais podem ser obtidas bicamadas que constituem membranas sintéticas ou biológicas de fluidez e características específicas ajustadas de acordo com a sua função.^{42,20}

Nas membranas naturais, as PCs ocorrem com cadeias curtas, sendo os principais componentes insaturados. As PEs existem com um teor bastante elevado de cadeias polinsaturadas e com cadeias longas. As PCs e PEs são zwitteriônicas em pHs fisiológicos. Já os fosfolípídios como a PS e o PI são aniônicos nas mesmas condições. A SM ocorre com um

conteúdo mais elevado de cadeias longas com uma ou nenhuma insaturação e é zwitteriônica em pHs fisiológicos.¹⁶

2.3. FASES LIPÍDICAS

A bicamada lipídica constitui uma estrutura dinâmica passível de sofrer deformações, de abrir e fechar poros, de sofrer fusões e permitir o deslocamento lateral de seu material estrutural.^{21,43}

As fases lipídicas são caracterizadas por diferentes ordenamentos dos lipídios e diversas mobilidades individuais dessas moléculas. As fases lipídicas dependem da temperatura de transição de fase dos lipídios (Tf), que por sua vez, depende principalmente do grupo-cabeça polar, do comprimento da cadeia hidrocarbonada e do grau de saturação. Cadeias lipídicas longas e saturadas têm altas Tf. Conforme há o aumento na Tf, as propriedades da membrana mudam significativamente.^{32,44}

As bicamadas lipídicas ou lamelas apresentam diferentes fases lamelares ou mesofases e essas transições de fases necessitam de energia para ocorrer.^{45,46} Considerando sistemas lamelares, bicamadas lipídicas, formados por lipídios puros de cadeias saturadas contendo de 15 a 22 átomos de carbono, submetidos ao aumento de temperatura, pode-se detectar pelo menos três transições de fases:^{21,46}

- a) Subtransição da mesofase Lc para as mesofases L β e L β ';
- b) Pré-transição da mesofase L β ' para mesofase P β ';
- c) Transição principal da mesofase P β ' para a mesofase L α .

A Figura 6 exemplifica as diferentes mesofases existentes em uma bicamada lipídica e suas transições de fases.

estruturas tridimensionais e mecanismos catalíticos semelhantes, sugerindo divergência a partir um único ancestral comum.⁴⁸

Ureases de fungos e plantas são proteínas homo-oligoméricas com subunidades de ~ 90 kDa, enquanto que ureases bacterianas são multímeros de duas ou três subunidades.^{48,49}

2.5. UREASE DE *JACK BEAN*

Bioquimicamente, a mais bem caracterizada urease de planta é de *jack bean* (*Canavalia ensiformis*).⁵⁰ A urease de *jack bean* (JBU) foi a primeira enzima a ser cristalizada, em 1926, por Summer, contribuindo para a demonstração da natureza protéica das enzimas.⁶ A JBU existe como homotrímeros que podem associar-se para formar hexâmeros, que consiste de dois trímeros interagindo de forma frontal, com idênticas subunidades de ~ 90 kDa, contendo dois íons de níquel por subunidade.^{51,52,53}

Até o ano de 2010, apenas as ureases bacterianas tinham sua estrutura cristalográfica 3D bem resolvida.⁴⁹ A alta heterogeneidade, a insolubilidade e alta polidispersão da JBU em solução podem estar relacionadas com o insucesso na determinação de estruturas cristalográficas de ureases de plantas.^{54,55,56} Em 2010, Balasubramaniam e Ponnuraj determinaram a estrutura da JBU por Cristalografia de Raios-X, sendo a primeira urease de planta a ter sua estrutura cristalografada.⁵⁷ A Figura 7 mostra a representação da forma hexamérica da JBU.

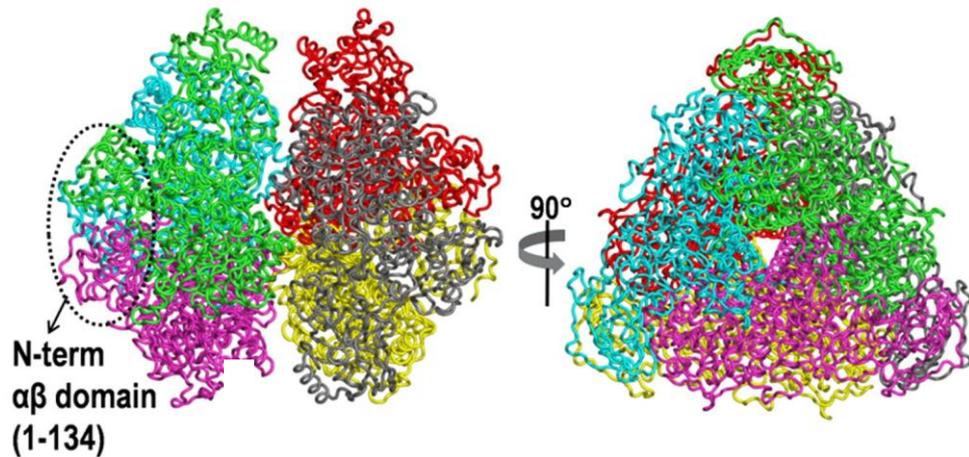


Figura 7. Representação da forma hexamérica da JBU. Três monômeros são associados no modo triangular, gerando uma superfície planar na face do triângulo, enquanto que a outra face tem uma pequena saliência formada pelo domínio $\alpha\beta$ N-terminal. A vista do hexâmero no eixo cristalográfico é mostrada à direita.⁵⁷

A *Canavalia ensiformis* é uma leguminosa muito resistente a insetos, e é fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, tais como: a lectina concavalina A, inibidores de tripsina, urease, e a canatoxina.^{58,59,60}

Estudos mostraram que a canatoxina, uma isoforma da JBU, desempenha várias propriedades biológicas independentes da sua atividade ureolítica, tais como: ativação de plaquetas, efeito pró-inflamatório e atividade inseticida. A atividade inseticida sugere que a canatoxina pode estar envolvida com a defesa da planta e depende de um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox), liberado através da hidrólise da proteína por catepsinas de insetos.^{7,61,62} Assim, para exercer sua ação inseticida a proteína precisa ser ingerida pelo inseto. Uma vez dentro do seu intestino médio, a proteína é clivada por enzimas digestivas e, então, o fragmento peptídico é liberado. O fragmento é, então, absorvido, a partir do intestino médio, circulando pela hemolinfa, atingindo outros tecidos, inclusive o sistema nervoso central, matando o inseto através de mecanismos que aguardam elucidação.⁶³ Dessa forma, a canatoxina apresenta uma grande potencialidade para o desenvolvimento de biopesticidas ou plantas transgênicas resistentes a insetos que são pragas agrícolas, por meio da expressão da proteína ou do peptídeo.¹⁰

A canatoxina, isolada da *C. ensiformis* em 1981 por Calini e Guimarães, possui aproximadamente 85% de identidade com a JBU, e corresponde a ~ 0,5% do peso seco da semente, com cerca de 30 - 40% da atividade ureolítica. Sua forma estrutural é um dímero de

cadeias polipeptídicas de ~ 95 kDa, contendo um íon de zinco e um de níquel em cada subunidade.^{7,64}

Tanto a canatoxina quanto a JBU são tóxicas para insetos que apresentam enzimas proteolíticas do tipo catepsina B e D.^{8,65} A canatoxina apresenta, *in vitro*, a potencialidade de indução de agregação e secreção de plaquetas. Assim como a canatoxina, a JBU também é capaz de ativar plaquetas, porém não apresenta efeito tóxico em camundongos quando administrada intraperitonealmente.^{7,66}

A canatoxina e JBU interagem com glicoconjugados mais complexos, como sialoproteínas e gangliosídeos.⁷ Essa propriedade de ligação com carboidratos possivelmente “direciona” as proteínas para a superfície de células ricas desses tipos de glicoconjugados.⁶⁶

Outra urease que interage com gangliosídeos é a urease microbiana da espiroqueta *Helicobacter pylori* (HPU), uma bactéria que coloniza a mucosa do estômago humano e pode se ligar com oligossacarídeos ou proteínas da matriz extracelular. A presença desta bactéria no estômago tem sido associada como o principal fator de risco no desenvolvimento de doenças tais como: úlcera estomacal, gastrite, carcinomas e linfomas, por meio de mecanismos ainda não bem entendidos. Recentemente, relatou-se que essa urease também induz a agregação de plaquetas de coelhos, de um modo semelhante à JBU. A propriedade da HPU de ativar plaquetas poderia contribuir para a alta incidência de doenças cardiovasculares associadas às patologias gástricas que afetam os portadores dessa bactéria.^{67,7}

2.6. PLAQUETAS

Plaquetas são partículas sanguíneas anucleadas que circulam pela corrente sanguínea no seu estado inativo. Quando as plaquetas entram em contato com áreas que apresentam danos endoteliais ou há ativação da coagulação, elas aderem a estas regiões, mudando sua forma e secretando substâncias ativas que promovem a ativação de outras plaquetas e a formação de agregados. Fisiologicamente, esse processo, ajuda a limitar a perda sanguínea. Contudo, a inadequada ou excessiva ativação das plaquetas resulta em aguda obstrução do fluxo sanguíneo. As funções das plaquetas não estão limitadas a prevenção de perda sanguínea, mas também têm sido associadas a muitos processos patológicos, incluindo a defesa do organismo, processos inflamatórios como artrite, síndrome respiratória e crescimento de tumores e metástases.⁶⁸

As plaquetas contribuem para o processo hemostático de duas maneiras diferentes. Primeiro, suas funções adesivas e coesivas levam a formação do plug hemostático. Segundo,

as plaquetas podem ativar o mecanismo de coagulação por meio da exposição de adequados fosfolipídios na superfície, atuando como um sítio catalítico para o desenvolvimento da formação da coagulação e da trombose. A trombose leva a formação da fibrose que consolidará o plug hemostático.^{3,69,70,71}

Nos últimos anos, a demanda de concentrados plaquetários tem aumentado progressivamente em função do desenvolvimento de inúmeras pesquisas utilizando essas células. A possibilidade de desenvolver substituintes plaquetários, que possam ser armazenados por um longo período e ao mesmo tempo com baixo risco de contaminação biológica, vem sendo explorado por diversos pesquisadores e indústrias.^{3,72}

Nesse contexto, o uso de lipossomas como modelo de membranas celulares pode ser uma alternativa segura, livre de contaminações biológicas e com uma alta estabilidade.^{3,73}

2.7. GANGLIOSÍDEOS

Gangliosídeos são lipídios de membrana de células eucarióticas, nos quais os grupos-cabeça polares são oligossacarídeos. As unidades terminais apresentam um ou mais resíduo de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico), um açúcar ácido com carga negativa.^{74,75}

Os gangliosídeos são abreviados pela letra G, seguido pela letra maiúscula M (Monossialo-) ou D (Dissialo-), ou T (Trissialo-) ou Q (Tetrassialo-) ou P (Pentassialo-), ou H (Hexassialo-), ou S (Heptassialo-) de acordo com o número de resíduos de ácido siálico. Em seguida vem o número que, por convenção, é a subtração da quantidade de resíduos de açúcares neutros do número 5, e logo após, letras minúsculas para distinguir as diferentes espécies de cada grupo mono, di, tri ou tetrassialo.^{76,77}

A cadeia oligossacarídica dos gangliosídeos liga-se por meio de uma ligação β -glicosídica a uma ceramida, que é constituída por uma cadeia de ácido graxo e uma esfingosina. A cadeia oligossacarídica pode ser formada por resíduos de glicose, galactose, fucose, *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilgalactosamina.⁷⁶

Os gangliosídeos encontram-se na camada externa de membranas celulares, sendo particularmente abundantes no sistema nervoso. No cérebro de mamíferos os gangliosídeos predominantes são o GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b} e o GQ_{1b}⁷⁸ e suas estruturas químicas encontram-se na figura 8.

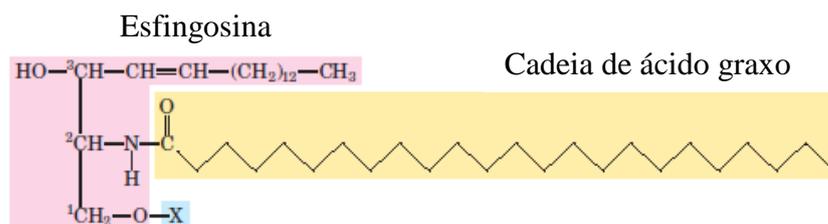


Figura 8. Estrutura química genérica de um esfingolípido.¹⁷ Quando x for constituído por: Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal, se trata do gangliosídeo GM₁; se x for composto por: Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal-NeuAc, se trata do gangliosídeo GT_{1b}; se x for composto por: Glc-Gal(NeuAc-NeuAc)-GalNAc-Gal, trata-se do gangliosídeo GD_{1b}; quando x for constituído por: Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal-NeuAc trata-se do gangliosídeo GD_{1a} e quando x for: Glc-Gal(NeuAc-NeuAc)-GalNAc-Gal(NeuAc-NeuAc) trata-se do gangliosídeo GQ_{1b}.

Nos tecidos humanos e animais, gangliosídeos desempenham um papel biológico fundamental relacionado com o crescimento celular, diferenciação, aderência, modulação da resposta imunológica e neoplasia. Nas doenças infecciosas, os gangliosídeos servem como receptores específicos para várias bactérias, vírus ou toxinas.⁷⁹

As plaquetas sanguíneas apresentam gangliosídeos em sua composição e, por causa da sua importância biológica, muitos estudos têm sido desenvolvidos na área de expressão de gangliosídeos em plaquetas humanas. Os gangliosídeos específicos identificados em plaquetas humanas são: hematosídeo GM₃ (monossialogangliosídeo da série 3) e o composto dissialo correspondente, o gangliosídeo GD₃. Nas plaquetas, os gangliosídeos desempenham funções biológicas importantes, tais como: diferenciação e ativação das plaquetas.⁷⁹ A Figura 9 mostra a estrutura química do gangliosídeo GM₃.

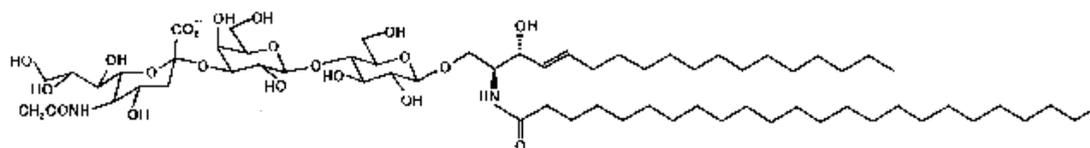


Figura 9. Estrutura química do gangliosídeo GM₃.

2.8. TRITON X-100

A transformação de vesículas em micelas induzidas pela adição de surfactantes nas vesículas lipídicas tem atraído o interesse de pesquisadores.^{80,81} Esse processo leva à solubilização de lipossomas, representando um bom modelo de solubilização de membranas celulares.⁸²

O Triton X-100, surfactante não-iônico, é um bom agente solubilizante de membranas lipídicas.^{83,84} Entretanto, muitos estudos têm sido realizados com intuito de elucidar o mecanismo de transformação dos lipossomas em micelas, causados pelo Triton X-100.

Estudos mostraram que a solubilização dos lipossomas pelo Triton X-100 é um processo direto, sem haver formação de complexos agregados intermediários.^{82,85} A Figura 10 mostra a estrutura química de uma molécula de Triton X-100.

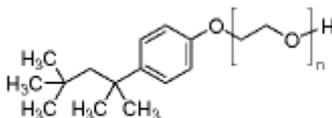


Figura 10. Estrutura química do Triton X-100. O n representa o número médio de 10 unidades de óxido de etileno.

O Triton X-100 é uma molécula anfifílica, na qual a cabeça hidrofílica é constituída por uma cadeia de polioxietileno (com um número médio de 10 unidades de oxido de etileno) e a cauda hidrofóbica é composta por um grupo p-t-octilfenil.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Estudar a interação da urease de *jack bean* (JBU) com membranas lipossômicas, verificando mudanças dimensionais e estruturais nas membranas de lipossomas preparados a partir de lipídios majoritariamente encontrados em plaquetas humanas. Foi utilizada essa composição lipossômica devido ao fato da JBU possuir a característica de interagir com plaquetas. Dessa forma, objetiva-se contribuir na compreensão do mecanismo de ação da JBU sobre membranas celulares.

Além disso, objetiva-se realizar um estudo preliminar da interação da JBU com lipossomas miméticos de plaquetas humanas contendo gangliosídeos em sua composição, devido ao fato da JBU possuir grande afinidade por gangliosídeos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as temperaturas de transições de fases nos LM por meio da técnica de Espalhamento de Luz;
- Investigar a interação físico-química de LM com a JBU, analisando a variação do diâmetro, por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS); a variação da espessura da bicamada lipídica, por meio do Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS); o potencial superficial elétrico, por meio do Potencial Zeta (PZ) e análise de texturas características, por meio de micrografias de Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM);
- Investigar a interação físico-química de LM com o surfactante Triton X-100, com intuito de verificar se a JBU apresenta o mesmo comportamento do Triton X-100 sobre as dimensões dos LM, utilizando-se as mesmas análises citadas acima;
- Incorporar gangliosídeos nos LM e caracterizar este sistema através das técnicas de SAXS e POM;
- Investigar a estabilidade físico-química do sistema lipossoma/gangliosídeos com a JBU e o Triton X-100 por meio das técnicas de SAXS e POM.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LIPÍDIOS

Todos os lipídios utilizados neste trabalho apresentam grau de pureza conhecido (L- α -fosfatidilcolina de gema de ovo ~ 99%; L- α -fosfatidiletanolamina de gema de ovo ~ 98%, L- α -fosfatidilserina de soja ~ 98%, L- α -fosfatidilinositol de soja ~ 50%, esfingomiéline de cérebro bovino ~ 97% e o colesterol ~ 99%) e foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

4.2. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE PLAQUETAS HUMANAS

Os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) foram preparados pelo método de evaporação em fase reversa^{26,21,86} como está representado na Figura 11.

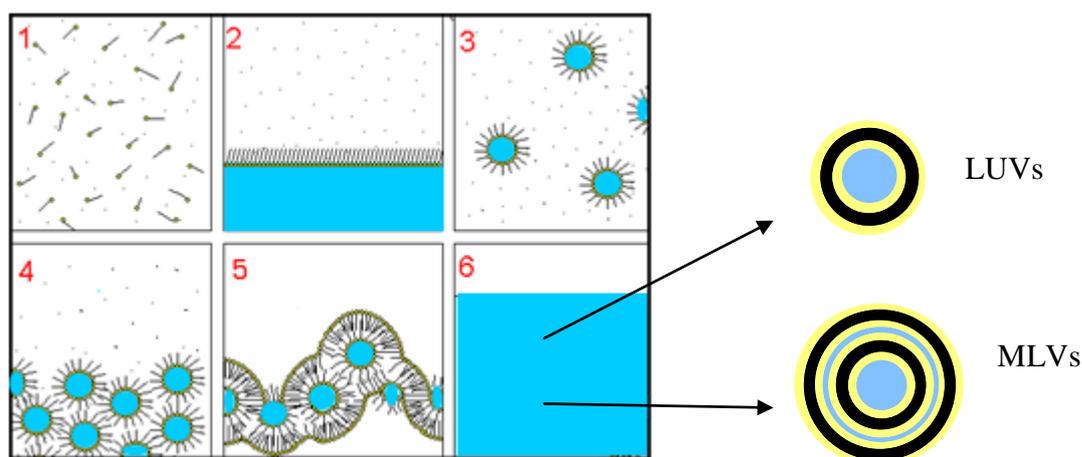


Figura 11. Representação esquemática do método de evaporação em fase reversa para a preparação dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas.²²

Esse método consiste de seis etapas. Primeiramente, quantidades específicas dos constituintes dos LM foram pesadas em balança analítica, cuja sensibilidade está na faixa de 0,1 a 0,0001 mg, conforme apresentado na Tabela I. Durante a pesagem as moléculas foram conservadas a uma temperatura de 0 °C.

Tabela I. Moléculas utilizadas para a preparação dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas e suas quantidades adicionadas.

Moléculas	Quantidade (mg)	Mol %
PC	10,3	34,1
CHOL	7,7	25,8
PE	7,3	24,3
SM	2,3	7,7
PS	1,8	6,1
PI	0,6	2,0
TOTAL	30,0	100

Em seguida, as moléculas foram transferidas para um balão de fundo redondo e dissolvidas em 5 mL de clorofórmio (etapa 1 da Figura 11). Após a dissolução das mesmas, uma porção de 100 μ L de água ultra-pura (18,2 M Ω .cm) foi adicionada (etapa 2 da Figura 11), ocorrendo a formação de duas fases: uma aquosa e outra contendo o solvente orgânico. A tendência dessas moléculas é de se encontrarem na interface água/solvente orgânico, devido às interações de polaridade das cabeças polares dessas moléculas com a água e as interações das caudas apolares das mesmas com o solvente orgânico. A mistura foi então submetida à sonicação por dois minutos (etapa 3 da Figura 11) em ultra-som, para a formação das micelas reversas. Na etapa 4 da Figura 11, o clorofórmio foi evaporado em um rotaevaporador. Após a sua total eliminação, ocorre a formação de um organogel que se deposita junto à parede do balão (etapa 5 da figura 11). Na etapa final (etapa 6 da Figura 11), foi adicionada água ultra-pura ao balão contendo o organogel, sob agitação, para a formação dos lipossomas, originando uma suspensão aquosa dos mesmos (suspensão mãe). A partir desse método, se obtém LUVs e MLVs em suspensão. As análises com os LM só foram realizadas após uma semana do seu preparo, para que ocorra a estabilidade dos lipossomas em suspensão.⁷³

4.3. PREPARAÇÃO DOS LM NA PRESENÇA DA UREASE

A urease utilizada foi tipo III, adquirida da empresa Sigma-Aldrich, obtida a partir de *jack bean* (*Canavalia ensiformis*). A JBU foi dissolvida e dialisada em tampão de Na₂HPO₄ 20 mM, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 5 mM, pH 7,0, objetivando a retirada do sal da solução em que estava armazenada a urease.

A JBU (0,75 mg/mL) foi armazenada em solução tampão (20 mM de fosfato de sódio, 1 mM de EDTA e 5 mM de 2-mercaptoetanol) no pH 7,0.

Para o estudo dos LM contendo a JBU, foi preciso diluir a suspensão mãe de LM em uma solução de NaCl 0,15 M e adicionar a JBU (0,75 mg/mL) para obtenção das concentrações finais de 0,5 μ M e 0,1 μ M. Esse procedimento foi necessário, uma vez que o meio biológico é salino.

4.4. PREPARAÇÃO DOS LM NA PRESENÇA DO TRITON X-100

O Triton X-100 foi adquirido da empresa INLAB. Para o estudo dos LM na presença do Triton X-100, diluiu-se a suspensão mãe de lipossomas em uma solução de NaCl 0,15 M e adicionou-se o Triton X-100 a 1%.

4.5. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO GANGLIOSÍDEOS

A preparação dos LM com gangliosídeos (GG) foi realizada por meio do método de evaporação em fase reversa, o qual foi descrito no item 4.2. Entretanto, na etapa 1 da Figura 11, dissolveu-se, juntamente com os fosfolipídios e o colesterol, 6,8 mg de uma mistura de gangliosídeos de cérebro bovino tipo III obtido da empresa Sigma-Aldrich (GM_1 , GD_{1a} , GD_{1b} e GT_{1b}).

Para o estudo dos LM com GG, foi preciso diluir a suspensão mãe de LM em uma solução de NaCl 0,15 M. No estudo dos LM com GG na presença da JBU e do Triton X-100, diluiu-se a suspensão mãe dos LM com GG em uma solução de NaCl 0,15 M e adicionou-se uma solução de JBU (0,75 mg/mL) para obtenção das concentrações finais de 0,5 μ M e 0,1 μ M e adicionou-se o Triton X-100 a 1%.

4.6. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (POM)

A Microscopia Óptica foi empregada para avaliar microscopicamente a presença de lipossomas pela observação de cruces de Malta, que indicam organização lamelar. Para tanto, utilizou-se um microscópio Olympus BX-43, sob luz polarizada, com aumento de 40X. As imagens foram registradas através de uma câmera fotográfica (Olympus PM20), com um controlador de tempo de exposição acoplado ao microscópio. As amostras de LM na ausência e na presença da JBU e do Triton X-100, foram preparadas diluindo-se duas gotas da suspensão mãe de LM em 1 mL de uma solução de NaCl 0,15 M e foi adicionado a JBU na

concentração final de 0,5 μM e o Triton X-100 1%. As amostras foram colocadas em uma lâmina de vidro com dimensões de 10x3 cm, recobertas com uma lamínula e observadas à temperatura ambiente (22 °C) e após uma semana do preparo. O objetivo da análise de POM após uma semana, quando a água presente no sistema evaporou, é observar as texturas que refletem a organização das moléculas que compõem os lipossomas. Dessa forma, verificar se a JBU e o Triton X-100 interferem em nível de organização dos lipídios.

4.7. ESPALHAMENTO DE LUZ (LS)

O princípio da técnica de espalhamento de luz consiste na interação da radiação visível com a matéria. A onda eletromagnética que incide sobre uma partícula pequena, quando comparada ao comprimento de onda da radiação, provoca um processo de polarização dos dipolos moleculares na direção do campo elétrico da onda incidente. Essa polarização oscila com a mesma frequência da radiação incidente, servindo, então, como uma fonte secundária que espalha pequenas quantidades de radiações em todas as direções.^{87,88}

A intensidade da luz espalhada (I_s) por uma partícula com dimensões muito menores que λ_0 é dada por:

$$I_s = \frac{4\pi^2 M^2 (\sin^2 \phi) (dn/dc)^2 I_0}{N_A^2 \lambda_0 R^2} \quad (1)$$

Onde M é a massa molecular; dn/dc é o incremento no índice de refração da solução em função da concentração de partículas; I_0 é a intensidade de luz incidente; N_A é o número de Avogadro; λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente; R é a distância entre a amostra e o detector; ϕ é o ângulo formado entre a direção de propagação da luz espalhada com a luz incidente.

A relação entre a luz espalhada e a dimensão do objeto pode ser acessada por meio do vetor de espalhamento q . O vetor de espalhamento é, portanto, a diferença vetorial entre o vetor de onda da radiação incidente (k_i) e o vetor de onda da radiação espalhada (k_e):

$$q = \vec{k}_e - \vec{k}_i \quad (2)$$

As magnitudes de k_i e k_e são respectivamente $2\pi n / \lambda_i$ e $2\pi n / \lambda_e$, sendo n o índice de refração do solvente. Como se trata de um espalhamento elástico, ou seja, o comprimento de onda da radiação incidente é igual ou muito próximo ao da radiação espalhada, tem-se:

$$|\vec{k}_e| \cong |\vec{k}_i| \quad (3)$$

A magnitude do vetor q pode ser calculada pela lei dos cossenos:⁸⁸

$$q = 2k_i \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4)$$

O vetor de espalhamento q possui uma relação inversa com a dimensão L do objeto. Quando se tem a condição de $qL > 1$, a radiação espalhada contém informações sobre a estrutura interna do objeto em estudo. Nas condições de $qL < 1$, a radiação espalhada contém informações sobre a região do espaço maior do objeto em estudo. Já em $qL \ll 1$, pode-se obter informações de vários objetos, como macromoléculas e partículas, bem como agregados ou conjunto de partículas. O vetor de onda pode ser modificado pela alteração do ângulo de observação, pelo índice de refração da solução ou pelo comprimento de onda do feixe de luz utilizado.²¹ As condições experimentais utilizadas neste trabalho referem-se a condição $qL < 1$.

Neste trabalho foram realizadas medidas de intensidade de luz espalhada (I_s) em função da variação de temperatura para a amostra de LM com intuito de determinar as temperaturas de transições de fases das bicamadas das vesículas lipossômicas. Nesse experimento, duas gotas da suspensão mãe de LM foram diluídas em 8 mL de uma solução de NaCl 0,15 M, a qual foi filtrada com filtro 0,45 μm de porosidade para dentro de uma cubeta óptica. O equipamento de espalhamento de luz dispõe de um sistema de circulação de água e um banho externo acoplado, o qual permite variar a temperatura numa faixa de 15 a 80° C. Dessa forma, as amostras foram aquecidas de 15 a 80° C seguindo uma rampa de 1° C/min com intervalos de 10 minutos a cada 2° C. As medidas foram obtidas no ângulo de 135°, para maximizar a contribuição da bicamada lipídica na luz espalhada.

4.8. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

No Espalhamento de Luz Dinâmico, são consideradas as pequenas variações de intensidade de luz espalhada, que são resultantes das flutuações do índice de refração na solução. Essas flutuações são resultantes, por sua vez, da difusão translacional das partículas em solução ou suspensão, chamado movimento Browniano. O número de fótons que entra no detector é registrado em um computador e analisado por meio de um correlador digital.^{89,88} O sinal da radiação é, assim, adquirido na forma de uma função de correlação temporal $g_{(2)}(\tau)$:

$$g_{(2)}(\tau) = \langle I(t)J(t+\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t)J(t+\tau) dt \quad (5)$$

Onde $I(t)$ e $J(t)$ são sinais que dependem do tempo; $2T$ é o período na qual a medida é realizada e τ é o tempo de retardo (*delay time*). A função $g_{(2)}(\tau)$ relaciona-se com a função de correlação do campo elétrico $g_{(1)}(\tau)$ por meio da relação de Siegert:⁸⁹

$$g_{(2)}(\tau) = 1 + \beta |g_{(1)}(\tau)|^2 \quad (6)$$

Onde β é o fator de coerência ótica que depende da ótica de detecção.

Como na maioria dos casos as soluções e dispersões de partículas são polidispersas, a $g_{(2)}(\tau)$ é definida por uma distribuição de exponenciais, que podem ser representadas como uma integral de Laplace:

$$g_{(2)}(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma \tau} d\Gamma \quad (7)$$

O Γ corresponde a uma frequência de relaxação e, a partir dele, pode-se calcular o coeficiente de difusão translacional (D_T) da partícula em solução:

$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (8)$$

Extrapolando-se D_T para concentração (c) zero (diluição infinita) e para ângulo (θ) igual a zero (onde não há interferência da luz espalhada por uma partícula sobre a luz espalhada por uma segunda partícula) obtém-se o coeficiente de difusão a diluição infinita (D_0). O D_0 possui uma relação linear com D_T a uma dada concentração $(D_T)_c$:

$$(D_T)_c = D_0(1 + k_D c) \quad (9)$$

Onde k_D é o coeficiente virial dinâmico relacionado com as interações termodinâmicas entre as partículas e o solvente.

Quando se relaciona a equação (9) com a temperatura (T) e a viscosidade (η_0) do solvente torna-se possível o cálculo do raio hidrodinâmico (R_h) da partícula através da relação de Stokes-Einstein, e conseqüentemente pode-se calcular o diâmetro das partículas em solução ou suspensão:^{88,89}

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R_h} \quad (10)$$

O R_h representa o raio médio da partícula dentro de sua dinâmica de difusão, considerando a camada de solvatação.

Neste trabalho, as amostras de LM foram preparadas diluindo-se duas gotas da suspensão mãe de LM em 8 mL de uma solução de NaCl 0,15 M. Para as amostras de LM com JBU e Triton X-100 diluíram-se duas gotas da suspensão mãe de LM em 8 mL de uma solução de NaCl 0,15 M e adicionou-se a JBU nas concentrações de 0,5 μ M e 0,1 μ M e Triton X-100 a 1%. As medidas de DLS foram realizadas de três em três minutos, até completar 30 minutos.

Todas as amostras foram filtradas com filtro de 0,45 μ m de porosidade para dentro de cubetas óticas. A temperatura de análise foi de 25°C. As amostras foram então analisadas em um espectrômetro do espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-900), com laser de He-Ne ($\lambda_0 = 632,8$ nm) como fonte de radiação. Para os experimentos de DLS, o volume de espalhamento “observado” pelo detector foi minimizado com uma abertura de 0,4 mm, e também utilizou-se um filtro de interferência entre o porta-amostras e a detecção do sinal na fotomultiplicadora. A luz espalhada foi coletada a um ângulo de 90° entre a radiação incidente na amostra e a radiação espalhada detectada (luz espalhada pelas partículas). As funções de correlação temporal foram obtidas em um modo denominado multi- τ , usando-se 224 canais.

As funções de correlação temporal foram analisadas utilizando-se o método dos cumulantes, disponibilizado pelo fabricante do equipamento (*software* Brookhaven Instruments) e por meio da transformada inversa de Laplace fornecida pelo software Gendist (REPES).⁸⁸

4.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

O experimento de SAXS consiste em um feixe de raios-X, com comprimento de onda na ordem de 1,5 Å, que incide sobre a amostra e interage com os elétrons e o espalhamento gerado é coletado na maioria das vezes por um detector bidimensional.⁹⁰

Os comprimentos de ondas espalhados por diferentes átomos combinam resultando em interferências construtivas e destrutivas, conforme as fases relativas. As interferências produzidas dependem das relativas posições atômicas. Assim, a amplitude e intensidade da

onda difratada em uma determinada direção estão relacionadas com a distribuição dos átomos no material.⁹¹

Quando o material é organizado em nível atômico, ocorre um espalhamento cooperativo, na qual todas as ondas espalhadas estão em fase. Dessa forma, produz-se um perfil de difração denominado de reflexões de Bragg. Ao contrário, quando não existe uma alta organização em nível atômico no material, o espalhamento é difuso e abrange uma ampla faixa angular.^{22,92}

Nos lipossomas, as bicamadas lipídicas, apresentam um sistema com relativo ordenamento atômico com unidades de repetição na ordem de angstroms.⁹³ A Figura 12 representa esquematicamente uma bicamada lipídica com certa distância de repetição d e um feixe de radiação incidente com comprimento de onda λ que forma um ângulo θ entre os planos ordenados.

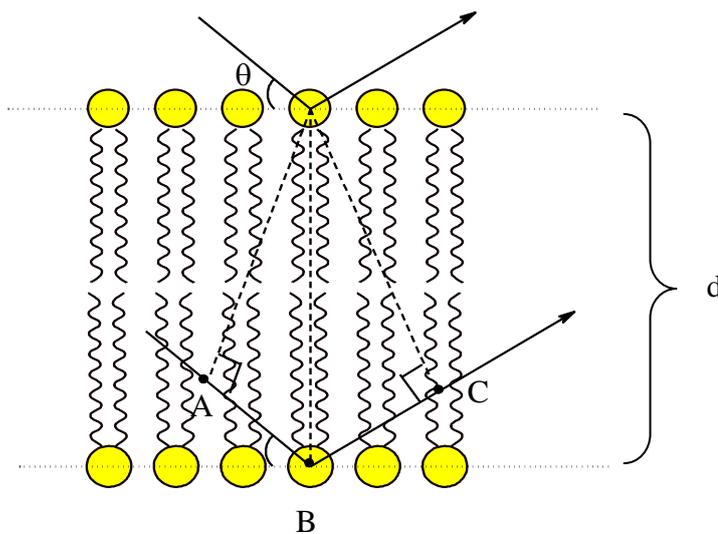


Figura 12. Representação esquemática de uma bicamada lipídica com uma distância de repetição d e um feixe de radiação incidente com comprimento de onda λ que forma um ângulo θ entre os planos ordenados.

A diferença de percurso entre dois feixes refletivos é dada por:

$$AB + BC = 2d \sin \theta \quad (11)$$

Quando as ondas refletidas interferem construtivamente, o caminho $AB + BC$ é igual a um comprimento de onda. Assim, uma reflexão deve ser observada quando o ângulo de

incidência com o plano satisfizer a lei de Bragg, ou seja, quando $2dsen\theta$ for igual a um número inteiro vezes o comprimento de onda:

$$n\lambda = 2dsen\theta \quad (12)$$

Para um determinado sistema, a intensidade de raios-X espalhada é resultado da multiplicação do fator forma $F(q)$ e do fator estrutura $S(q)$:⁹⁴

$$I(q) = NF(q)S(q) \quad (13)$$

Onde N é o número de partículas por unidade de volume.

O fator forma está relacionado com o espalhamento de uma partícula simples e isolada em um regime diluído, na qual o espalhamento total resulta da soma dos espalhamentos individuais de partículas que não interagem. Dessa forma, pode-se obter informações sobre a forma e o tamanho das partículas espalhantes. O fator estrutura é proveniente das interações entre as partículas. Assim, à medida que sistema se torna mais concentrado, a intensidade de espalhamento terá as contribuições de $F(q)$ e $S(q)$.⁹⁰

A partir do experimento de SAXS se obtêm uma imagem (figura bidimensional) de espalhamento que será convertida em um gráfico de intensidade de luz espalhada em função do vetor de espalhamento (q), por meio de um programa denominado Fit2D.

O SAXS foi empregado para determinação das distâncias de repetição lamelares dos lipossomas com o objetivo de verificar modificações causadas pela presença da JBU e do Triton X-100.

As amostras de LM, com e sem GG, foram preparadas a partir da diluição de 1 mL da suspensão mãe de LM, com e sem GG, em 1 mL de uma solução de NaCl 0,15 M. Para as amostras de LM com JBU e com o Triton X-100 adicionou-se 1 mL da suspensão mãe de lipossomas em 1 mL de uma solução de NaCl 0,15 M e adicionou-se a JBU nas concentrações de 0,5 μM e 0,1 μM e o Triton X-100 a 1%.

As medidas de SAXS foram realizadas na linha de luz SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). O tempo de exposição foi de 10 minutos. A temperatura foi mantida em 25°C. O comprimento de onda da radiação incidente foi de 1,48 Å e o detector linear (Princeton Instruments) foi posicionado a 1028,4 mm da amostra.

Os espectros de SAXS obtidos neste trabalho foram ajustados por meio do programa SASfit.⁹⁵ Para o ajuste do fator forma, $F(q)$, utilizou-se o modelo teórico de vesícula composta de bicamada lipídica, utilizando uma distribuição logarítmica normal:

$$I(q) = \left(\begin{array}{l} + K(q, R_C, \eta_{sol} - \eta_t) + K(q, R_C + t_t, \eta_t - \eta_h) \\ + K(q, R_C + t_t + t_h, \eta_h - \eta_t) + K(q, R_C + 2t_t + t_h, \eta_t - \eta_{sol}) \end{array} \right)^2 \quad (14)$$

Onde:

$$K(q, R, \Delta\eta) = \frac{4}{3} \pi R^3 \Delta\eta^3 \frac{\sin qR - qR \cos qR}{(qR)^3} \quad (15)$$

Os parâmetros obtidos nesse ajuste são: raio do núcleo micelar (R_c); a espessura dos grupos polares dos fosfolipídios (T_t); a espessura de duas caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios na bicamada interna (T_h); a densidade de espalhamento do solvente (η_{sol}); a densidade de espalhamento da parte externa da bicamada (η_h) e a densidade de espalhamento da parte interna da bicamada (η_t). A Figura 13 representa esquematicamente um lipossoma e os parâmetros de ajuste que serão determinados.

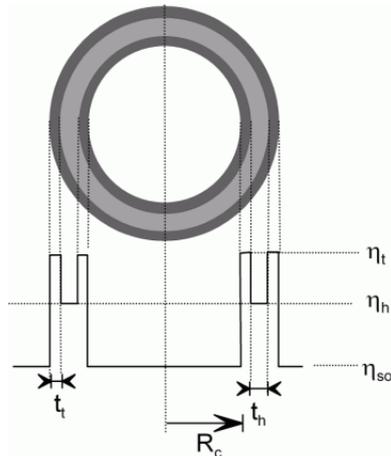


Figura 13. Representação esquemática dos parâmetros de ajuste obtidos a partir do fator forma dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas.⁹⁵

O fator estrutura, $S(q)$ foi ajustado por meio do modelo teórico, dado pela teoria de Caillé modificada⁹⁶ (Figura 14), utilizando uma aproximação monodispersa:

$$S_{MC}(q, R, d, \eta_1, \gamma) = \sum_{N_K=N-2\sigma}^{N+2\sigma} x_K S_{K,MC} \quad (16)$$

Onde:

$$S_{K,MC} = N_K + 2 \sum_{m=1}^{N_K+1} (N_K - m) \cos(mqd) e^{-\left(\frac{d}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta_1 \gamma} (\pi m) \left(\frac{d}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta_1 \quad (17)$$

Os parâmetros obtidos desse ajuste são: o número de lamelas presente em cada vesícula lipossômica (N); a distância de repetição lamelar (d), o parâmetro de Caillé (η) e a constante escalar de espalhamento difuso adicional (Nu).

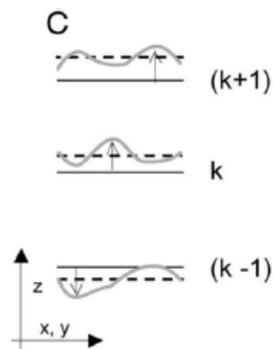


Figura 14. Flutuações de bicamada descritas pelo modelo de Caillé modificada.⁹⁵

4.10. POTENCIAL ZETA (PZ)

A presença de uma carga superficial, em partículas suspensas em um líquido, afeta a distribuição de íons que estão numa região muito próxima da partícula e o meio de suspensão, acarretando em acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula.

O potencial zeta é, portanto, a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a superfície da partícula, como está representado na Figura 15.

A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade coloidal de partículas em solução.

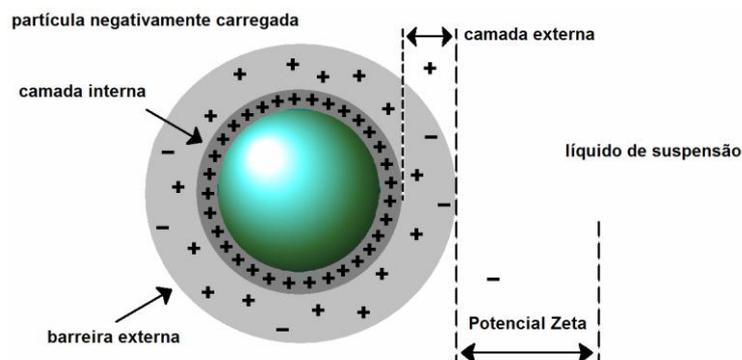


Figura 15. Representação esquemática da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado.⁹⁷

As partículas que apresentam valores altamente positivos ou altamente negativos de PZ irão se repelir umas às outras, evitando assim a agregação. Por sua vez, valores de PZ muito baixos ou próximos à zero, indicando ausência de carga superficial, podem levar a ocorrência de processos de floculação ou agregação.⁹⁷

A presença dessas cargas superficiais faz com que as partículas sofram os efeitos de um campo elétrico quando uma diferença de potencial é aplicada, denominados de efeitos eletrocinéticos. Por sua vez, a mobilidade eletroforética ou eletroforese é o movimento dessas partículas carregadas em relação ao líquido de suspensão, sob influência do campo elétrico. Assim, as partículas são atraídas pelo eletrodo de carga oposta as delas. Quando um equilíbrio de forças é estabelecido, as mesmas se movem com velocidade constante, a qual é denominada mobilidade eletroforética.⁹⁷

O PZ das partículas em suspensão é obtido pela aplicação da equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (18)$$

onde U_E representa a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta, η a viscosidade e $f(ka)$ a função de Henry.

A função de Henry pode assumir valores aproximados de 1,5 ou 1,0. Em meio aquoso com moderada concentração de eletrólito, emprega-se o valor de 1,5 nas determinações do potencial zeta. Neste caso, considera-se o modelo de Smoluchowski com partículas de tamanhos em torno de 200 nm ou mais. Para partículas menores, dispersas num meio de baixa constante dielétrica (geralmente meios não aquosos), utiliza-se o valor de 1,0, na qual se refere à aproximação de Huckel.²¹

No experimento de PZ, as amostras de LM foram diluídas (20 μ L da suspensão mãe de LM em 10 mL de uma solução aquosa de NaCl 1 mM), de forma a proporcionar um meio eletrolítico. As amostras de LM na presença da JBU e do Triton X-100 foram diluídas (20 μ L da suspensão de LM em 10 mL de uma solução aquosa de NaCl 1 mM) e adicionou-se a JBU na concentração de 0,5 μ M e o Triton X-100 a 1%. As amostras foram filtradas através de uma membrana com porosidade de 0,45 μ m, para evitar a presença de interferentes, tais como pó e agregados indesejados. A temperatura de análise foi de 25°C.

O equipamento utilizado para a realização da análise de potencial zeta foi o Zetasizer Malvern Instruments ZEN3500, que dispõe de uma célula contendo eletrodos de cargas opostas, um em cada face de um tubo porta-amostras. A metodologia de análise consiste na velocimetria (*Laser Doppler Velocimetria* – LDV), que neste caso utiliza um laser de comprimento de onda igual a 632,8 nm (He-Ne, 4,0 mV). Este equipamento dispõe de um detector que envia informações da luz espalhada num ângulo de 17° a um computador. No computador, um *software* produz um espectro de frequência e, após análise deste, calcula o potencial zeta resultante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. ESTUDO DE TRANSIÇÃO DE FASE DOS LM

A importância do estudo de transições de fases em lipossomas está no fato que, em lipídios termotrópicos, as transições de fases estão relacionadas com descontinuidades ou anomalias nas propriedades físicas macroscópicas tais como: estabilidade, fluidez ou permeabilidade de membranas.⁹⁸ Os lipossomas tornam-se altamente permeáveis em temperaturas próximas da temperatura de transição de fase da fase gel para a fase líquido-cristalino.⁹⁹

As transições de fases induzem modificações nas propriedades ópticas do sistema que refletem em mudanças de intensidade de luz espalhada (I_s) pelo sistema. Na temperatura de transição de fase (pré-transição ou temperatura da transição principal) podem ocorrer, na membrana lipossômica, modificações de difusão lateral, espessura da bicamada, permeabilidade, etc.¹⁰⁰ Essas alterações são produzidas ou correlacionadas com modificações conformacionais de compostos anfifílicos. Assim, as fases podem ser relacionadas com a intensidade de luz espalhada em função da temperatura, na qual o ponto a meia altura da curva corresponde à temperatura de transição de fase do sistema em estudo (Figura 16).

A intensidade de luz espalhada por partículas em suspensão ou solução pode mudar em função de uma das seguintes razões: alterações na estrutura da membrana das partículas (índice de refração), alterações no tamanho das partículas ou alterações na concentração das partículas.¹⁰¹ A concentração e o tamanho dos lipossomas não se alteram durante a medida de I_s ; portanto, a técnica de espalhamento de luz permite a determinação da temperatura de transição de fase nos casos onde não há uma significativa variação no diâmetro do objeto espalhante, como é o caso do sistema em estudo. Análises anteriores sobre a estabilidade dos LM indicaram que seu diâmetro se mantém estável após uma semana da preparação.⁷³

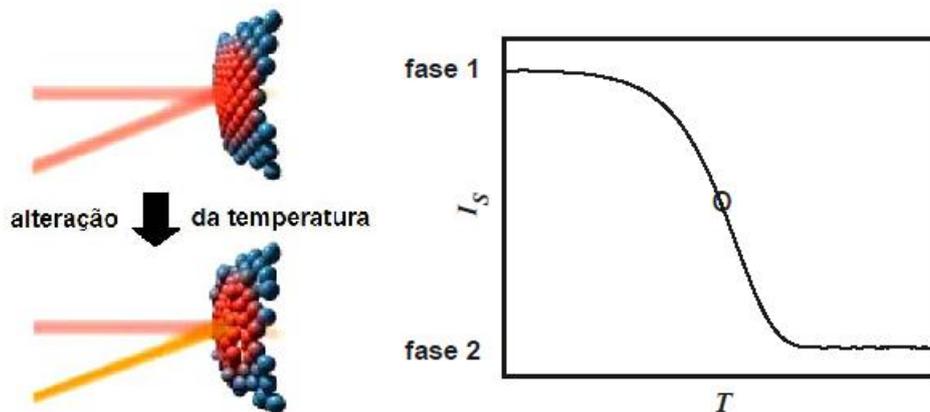


Figura 16. Representação esquemática da superfície externa de uma vesícula lipossômica. A fase 1 representa as extremidades polares dos fosfolipídios que conferem uma superfície homogênea. A fase 2 representa uma superfície não homogênea. As fases podem ser relacionadas com I_s , em função da temperatura, e a temperatura de transição de fase corresponde ao ponto à meia altura da curva.^{21,101}

Para o estudo das transições de fases nos LM foi realizado um acompanhamento de intensidade de luz espalhada em função da temperatura (15 - 80 °C), na amostra de LM em suspensão, após uma semana do preparo, na presença de 150 mM de NaCl.

Na Figura 17 pode-se observar a existência de pelo menos uma temperatura de transição de fase em 30 °C, obtida por meio da intersecção das retas, como apresentado na figura 17. Esta transição provavelmente refere-se à transição de fase principal da mesofase gel ondulado para a mesofase líquido-cristalino.^{5,19}

Portanto, na temperatura de 25 °C, na qual serão realizadas as análises neste trabalho, os LM estão na mesofase gel ondulado.

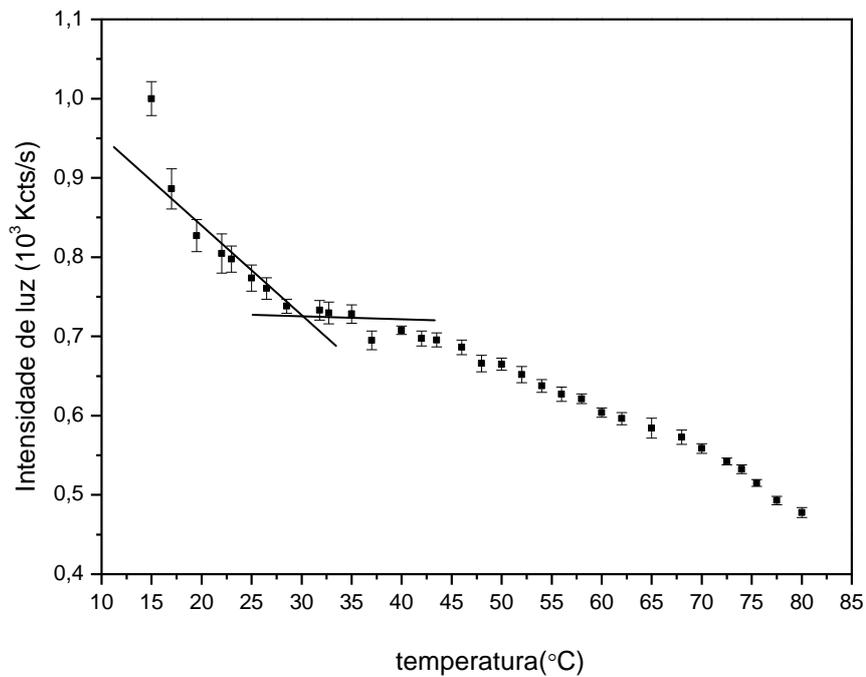


Figura 17. Intensidade de luz espalhada em função da temperatura para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas. A temperatura de transição de fase foi obtida por meio da intersecção das retas.

5.2. ESTUDO DOS LM NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA JBU E DO TRITON X-100

5.2.1. Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM)

A Microscopia Óptica foi empregada, na fase inicial deste trabalho, com intuito de verificar a presença de vesículas lipossômicas nas amostras de LM, LM na presença da JBU 0,5 μM e do Triton X-100 1%, por meio da visualização de cruces de Malta nas micrografias de POM. As cruces de Malta caracterizam um sistema com organização lamelar e, dessa forma, indicam a presença de lipossomas. As mesmas amostras foram analisadas por POM após uma semana, para verificar se a JBU e o Triton X-100 interferem na organização dos fosfolipídios e do colesterol depois da evaporação da água presente no sistema. Todas as análises foram realizadas na presença de 150 mM de NaCl à temperatura ambiente (22 °C).

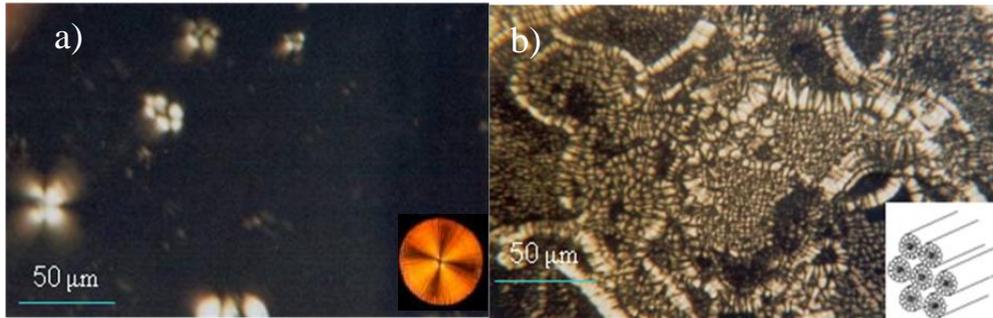


Figura 18. Micrografias de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM), indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de Malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolípidios (fase hexagonal H), após evaporação da água.

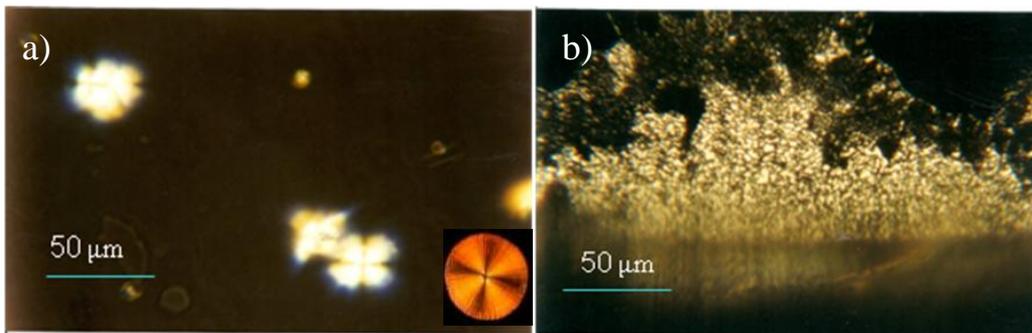


Figura 19. Micrografias de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5μM, indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolípidios (fase hexagonal H), após evaporação da água.

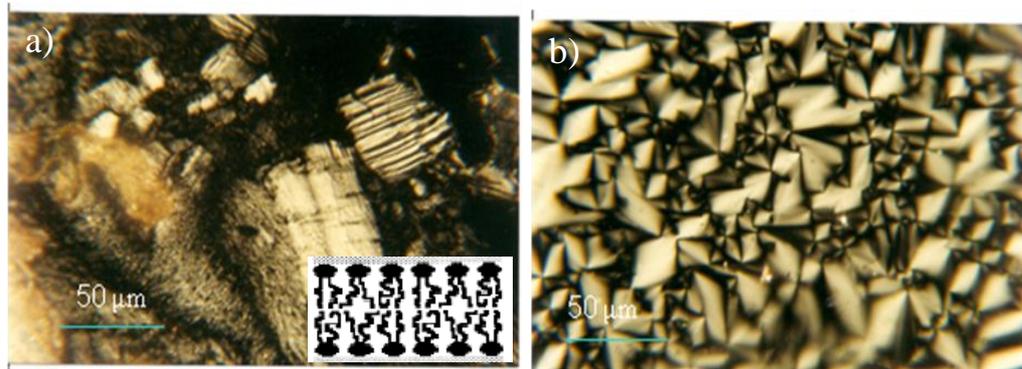


Figura 20. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100 1%, indicando em: (a) uma textura típica da fase lamelar (L_{α}), (b) textura em mosaico com a presença de cruz de malta, caracterizando sistemas com organização lamelar, após a evaporação da água.

Observa-se nas micrografias das amostras de LM na ausência e na presença da JBU (Figuras 18 e 19), cruces de Malta, indicando a existência de lipossomas em suspensão.^{102,103} Depois de uma semana, pode-se observar uma textura típica de organização hexagonal dos fosfolipídios.¹⁰⁴ A organização hexagonal ocorre porque os lipossomas perderam água e se desestruturaram e os lipídios se reorganizaram numa estrutura compacta, caracterizada pela fase hexagonal (H). Assim, como não houve mudanças nas texturas de POM, observadas para os LM na presença e na ausência da JBU, sugere-se que a JBU não interfere em nível de organização dos lipídios.

Foi analisado, também, o efeito do Triton X-100 sobre os LM, com o intuito de verificar se a JBU apresenta o mesmo comportamento do Triton X-100 sobre os LM. Para a amostra de LM na presença do Triton X-100 1% (Figura 20), observa-se, no primeiro momento, uma textura típica de fase lamelar (L_{α}) e após a evaporação da água presente no sistema, constata-se uma textura em mosaico, com a presença de cruces de Malta. Dessa forma, conclui-se que o Triton X-100 interfere na organização dos lipídios, diferentemente do que ocorre com a JBU.

5.2.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O experimento de DLS foi realizado com medidas de três em três minutos, até completar 30 minutos para as amostras de LM na ausência e na presença da JBU (0,1 e 0,5 μM) e do Triton X-100 1%. O estudo foi realizado neste tempo, pois se deduz que o

mecanismo de ação da JBU é rápido. Todas as medidas foram efetuadas na presença de 150 mM de NaCl a 25°C. Os parâmetros estudados, por meio desse experimento foram: diâmetro (D), de intensidade de luz espalhada (I_s) e de índice de polidispersão (PD.I), em função do tempo.

As funções de correlação temporal obtidas no experimento de DLS para a amostra de LM, durante o intervalo de tempo de 30 minutos, mostraram-se aparentemente unimodais (apresentando apenas uma função exponencial) e uma função representativa pode ser observada na Figura 21.

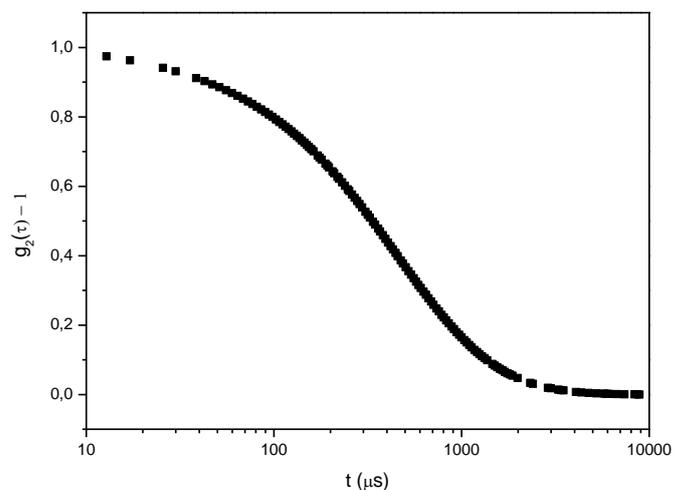


Figura 21. Função de correlação temporal obtida para uma amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) a 25°C.

As funções de correlação temporal obtidas para a mostra de LM na presença da JBU (0,1 e 0,5 μM) e na presença do Triton X-100 1%, também, são aparentemente unimodais e uma função representativa pode ser observada na Figura 22. Entretanto, os resultados das análises dessas funções por meio do REPES⁸⁸ indicaram a existência de dois tempos de relaxação a serem analisados em cada função (duas frequências que podem ser determinadas).

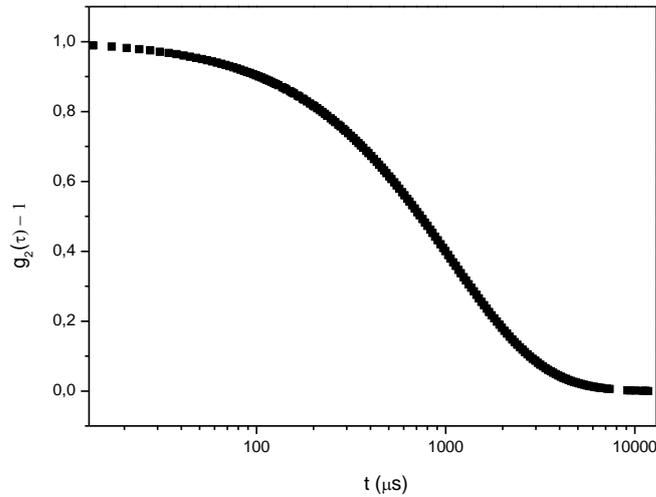


Figura 22. Função de correlação temporal obtida para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 μM a 25°C.

Primeiramente, para a obtenção dos diâmetros, as funções de correlação temporal foram tratadas por meio do método Cumulantes.⁸⁸ Esse método é utilizado no estudo de sistemas coloidais, porque a distribuição de tamanhos dos lipossomas pode ser estimada utilizando-se o segundo cumulante, a partir de um polinômio:

$$g_{(1)}(\tau) = A \exp(-\Gamma t) \left(1 + \frac{1}{2!} \mu_2 t^2 + \dots \right) \quad (19)$$

Onde “A” corresponde à amplitude de distribuição; Γ é a frequência de relaxação média e μ_2 é o denominado segundo cumulante ou segundo momento e corresponde a uma expectativa de ocorrência. Assim, a partir do segundo cumulante pode-se estimar a distribuição de tamanhos dos lipossomas e, medindo-se a largura dessa distribuição, o resultado é um índice de polidispersão (PD.I):

$$(PD.I) = \frac{\mu_2}{\Gamma^2} \quad (20)$$

Portanto, o PD.I está diretamente relacionado com variação de diâmetro, representando a distribuição de tamanhos das vesículas lipossômicas em suspensão.

A Figura 23 mostra a variação de diâmetro em função do tempo de 30 minutos para as amostras LM na ausência e na presença da JBU (0,1 μM e 0,5 μM) e do Triton X-100 1%. Observa-se que na amostra de LM houve uma pequena variação de diâmetro no intervalo de tempo de 30 minutos, apresentando um valor médio de 400 nm. Para a amostra de LM na presença da JBU 0,1 μM , constata-se que com a adição da JBU ocorre uma flutuação no valor do diâmetro. O diâmetro inicial dos LM, na ausência da JBU, é de 367 ± 42 nm e, depois de transcorridos trinta minutos da adição da JBU, o diâmetro apresentou um valor de 377 ± 30 nm.

No caso da amostra de LM, na presença da JBU 0,5 μM , ocorreu uma significativa diminuição do diâmetro dos LM em função da presença da JBU 0,5 μM no mesmo intervalo de tempo. O diâmetro inicial dos LM é de 376 ± 10 nm. Depois de transcorridos trinta minutos da adição da JBU 0,5 μM , o diâmetro dos LM tornou-se 213 ± 10 nm.

Uma comparação entre os resultados obtidos de variação de diâmetro nas amostras de LM na presença da JBU 0,1 μM e da JBU 0,5 μM sugere que o efeito da JBU sobre os lipossomas é dose-dependente, sendo mais rápido e pronunciado na concentração de 0,5 μM . Assim, a JBU na concentração de 0,5 μM será utilizada para as análises seguintes.

Como já dito anteriormente, foi analisado o efeito do Triton X-100 sobre os LM com intuito de verificar se a JBU apresenta o mesmo comportamento do Triton X-100 sob as dimensões dos LM, pois o Triton X-100 interage com lipossomas, causando a quebra da estrutura lamelar e levando a formação de micelas.⁸⁵ O diâmetro inicial dos LM na ausência do Triton X-100 foi de 367 ± 14 nm. Imediatamente, após a adição do Triton X-100, o diâmetro dos LM tornou-se 142 ± 15 nm. Essa diminuição de diâmetro sugere que houve a formação de micelas, que podem ser micelas de Triton X-100 ou Triton X-100/lipídios. Uma análise mais detalhada será realizada mais adiante, nesta sessão, por meio do REPES.⁸⁸

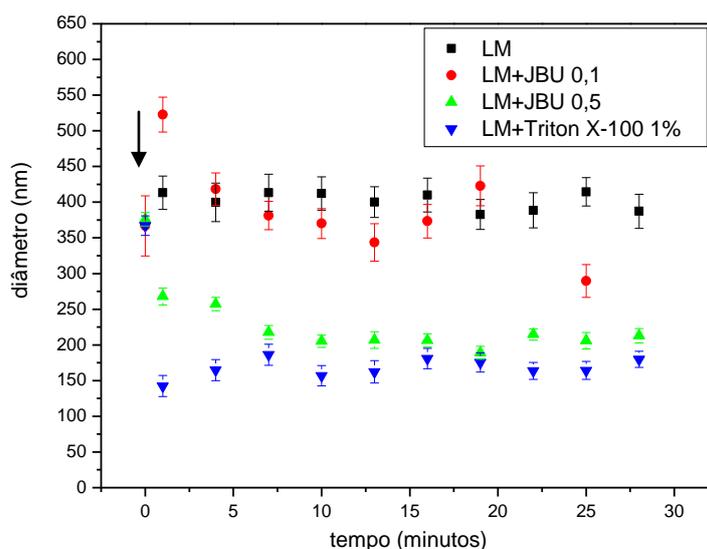


Figura 23. Variação de diâmetro em função do tempo da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1% a 25°C. A seta indica a medida de diâmetro dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas na ausência da JBU e do Triton X-100.

A Figura 24 mostra a variação de I_s , em função do tempo de 30 minutos para as amostras LM na ausência e na presença da JBU (0,1 e 0,5 μM) e do Triton X-100 1%.

A I_s para a amostra de LM não variou muito no intervalo tempo. Entretanto, a I_s dos LM na presença da JBU 0,1 μM aumentou com o tempo, devido à adição da JBU, uma segunda população de partículas que foi acrescentada ao sistema, e que provavelmente, não interagiu com os LM.

Já a I_s para a amostra de LM na presença da JBU 0,5 μM diminuiu com o tempo, possivelmente, porque a JBU esteja se inserindo na membrana lipossômica e provocando a diminuição de diâmetro.

Já o Triton X-100, quando adicionado ao sistema lipossômico, pode-se observar um na I_s devido ao aumento no número de partículas; haja vista que o Triton X-100 reduz a praticamente a metade o diâmetro inicial dos lipossomas.

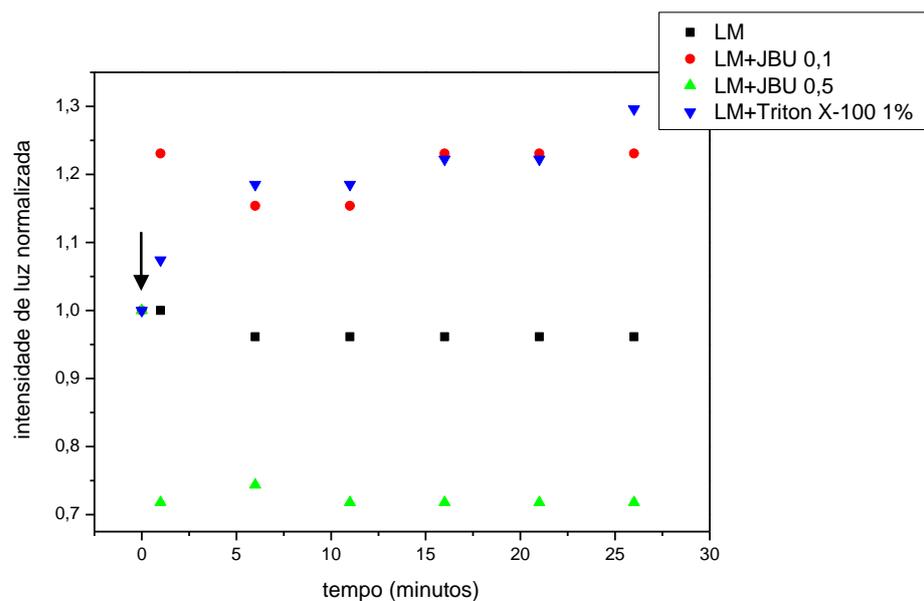


Figura 24. Intensidade de luz espalhada (I_s) normalizadas em função do tempo para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1% a 25°C. A seta indica as medidas de I_s dos LM na ausência da JBU e do Triton X-100.

A Figura 25 apresenta a variação de DP.I em função do tempo de 30 minutos para as amostras LM na ausência e na presença da JBU (0,1 e 0,5 μM) e do Triton X-100 1%. O PD.I, para a amostra de LM, apresentou um valor em torno de 0,3 no tempo de trinta minutos. Esse valor está dentro do esperado para sistemas sintetizados a partir de materiais biológicos, nos quais o PDI varia de 0,2 a 0,3.

Depois de transcorridos trinta minutos da adição da JBU 0,1 μM , o valor do PD.I é de $0,44 \pm 0,03$. Um valor de PD.I de 0,4 indica uma alta polidispersão, ou seja, há uma larga distribuição de tamanhos em torno de um valor médio de diâmetro, devido a adição de uma segunda população de partículas de tamanhos diferentes da primeira.

O mesmo comportamento de PD.I foi observado para a amostra de LM na presença da JBU 0,5 μM . Para a amostra de LM, após adição do Triton X-100, o PD.I ficou em torno do valor 0,5, indicando, também, uma alta polidispersão.

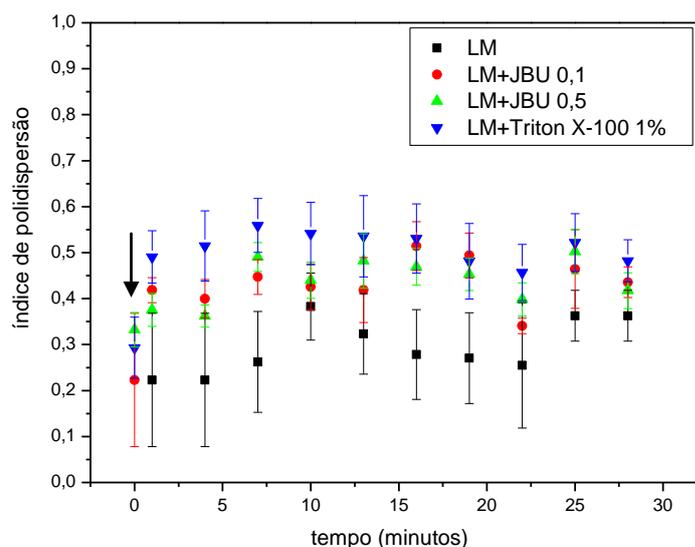


Figura 25. Índice de polidispersão (PD.I), em função do tempo para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1% a 25°C. A seta indica as medidas de PD.I dos LM na ausência da JBU e do Triton X-100.

Pelo fato dos PD.I serem superiores a 0,3 na maioria dos casos acima citados, faz-se necessário o uso de métodos não-lineares de análise, nos quais as funções de correlação temporal são classicamente tratadas aplicando-se a operação matemática transformada inversa de Laplace:

$$g_{(2)}(t)-1 = \beta \left[\int A(\tau) \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) dt \right]^2 \quad (21)$$

Essa transformação foi realizada por meio do algoritmo REPES⁸⁸ incorporado ao programa comercial *Gendist*. O resultado dessa transformação é uma distribuição de tempos de relaxação, que pode consistir de um pico ou mais picos, referentes à presença de uma única população de partículas ou a diferentes populações de partículas em uma mesma amostra. Dessa forma, cada população de partículas apresenta um determinado diâmetro.

Os dados obtidos no DLS para as amostras de LM na presença da JBU 0,5 μM , do Triton X-100 1% e com a amostra contendo somente a JBU na concentração de 0,5 μM , por um tempo de 30 minutos e após um dia foram analisados pelo REPES⁸⁸.

A Figura 26 mostra a distribuição dos tempos de relaxação para a amostra contendo somente a JBU 0,5 μM em solução. Observa-se um único tempo de relaxação, referente a uma única população de moléculas de JBU, na forma de hexâmeros em solução⁵⁶, com diâmetro de 20 nm. Após um dia, há o surgimento de dois tempos de relaxação, indicando que a JBU agrega em solução com o tempo.

Os resultados das análises das funções de correlação temporal obtidas no DLS para amostras de LM na presença da JBU 0,5 μM , indicam a presença de dois tempos de relaxação. A linha em preto da Figura 27 mostra a distribuição dos tempos de relaxação para os LM na ausência JBU, no qual se pode observar um único tempo de relaxação, referente a uma única população de partículas com diâmetro de 300 nm. Com a adição da JBU observa-se a presença de dois tempos de relaxação relacionados a duas populações de partículas com diferentes diâmetros. A população de partículas em tempos menores apresenta um diâmetro de 20 nm, provavelmente esta população seja de moléculas de JBU em solução. A segunda população de partículas, em tempos maiores, apresenta um diâmetro de 260 nm. É possível que essa população diga respeito à interação de LM com a JBU. Depois de um dia da preparação dos LM, na presença da JBU 0,5 μM (linha rosa, Figura 27), pode-se constatar que há uma significativa diminuição do diâmetro da população mais intensa, apresentando um valor de diâmetro de 140 nm. Além disso, pode-se observar um alargamento desta população e o desaparecimento da população de 20 nm (JBU) de diâmetro. Esse alargamento indica um aumento na distribuição de tamanhos das vesículas. Assim, sugere-se que a JBU esteja inserida na membrana ou, ainda, encapsulada nos LM.

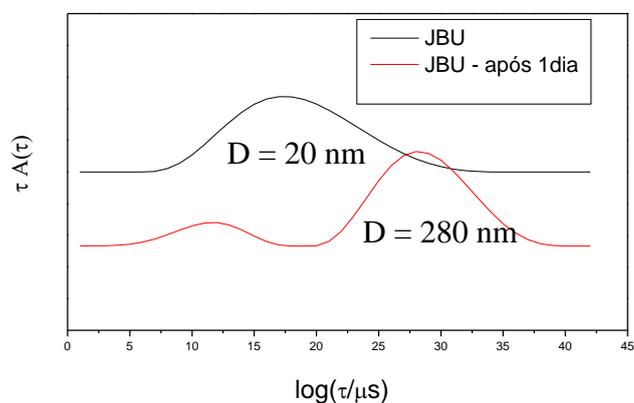


Figura 26. Distribuição dos tempos de relaxação para a amostra contendo somente urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM .

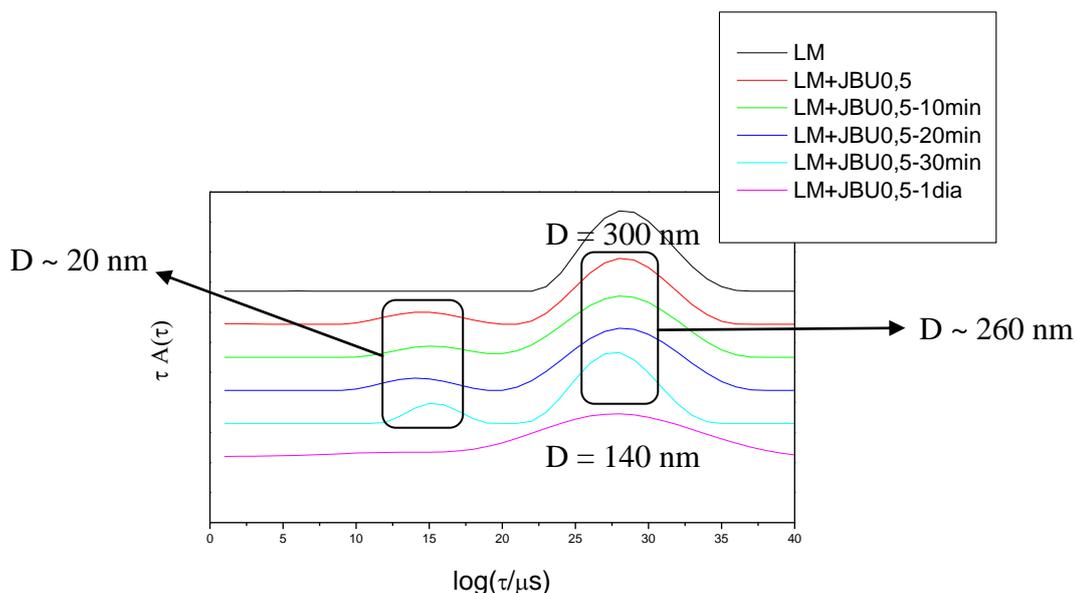


Figura 27. Distribuição dos tempos de relaxação para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM .

O valor de diâmetro obtido, por meio do REPES⁸⁸, para as micelas de Triton X-100 1% em NaCl 0,15 M é de 8 nm, com um único tempo de relaxação. Esse valor está de acordo com o diâmetro hidrodinâmico das micelas de Triton X-100 determinado por Espalhamento de Nêutrons a Baixo Ângulo (SANS).^{105,106} A concentração micelar crítica (CMC) do Triton X-100 é 0,015% ou 0,240 mM. Portanto, na concentração de Triton X-100 utilizada neste trabalho de 1%, o Triton X-100 está na condição acima da CMC.

A Figura 28 apresenta a distribuição dos tempos de relaxação para a amostra de LM na ausência e na presença do Triton X-100. Os LM (linha preta) apresentam um diâmetro de 310 nm. Com a adição do Triton X-100, observa-se o surgimento de dois tempos de relaxação com diâmetros de 7 nm e 240 nm, que persistiram durante os trinta minutos e após um dia. Acredita-se que a população de partículas com diâmetro de 240 nm seja de vesículas lipossômicas menores. A população de partículas com diâmetro de 7 nm está provavelmente relacionada com micelas de Triton X-100 ou ainda micelas de Triton X-100/fosfolipídios em solução^{85,82}. O mecanismo proposto encontra-se na Figura 29, no qual algumas micelas de Triton X-100 se inserem na membrana lipossômica (representado por um lipossomas unilamelar), interagindo com os fosfolipídios, o que leva a formação de duas populações de

partículas: uma de micelas formadas por Triton X-100/fosfolipídios e outra de vesículas menores.^{85,82}

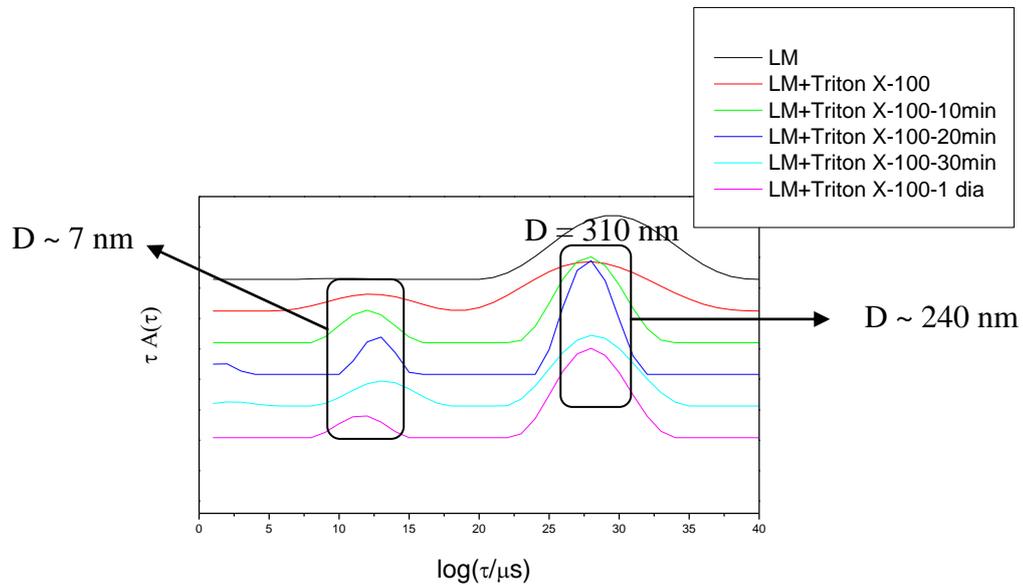


Figura 28. Distribuição dos tempos de relaxação para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença do Triton X-100 1%.

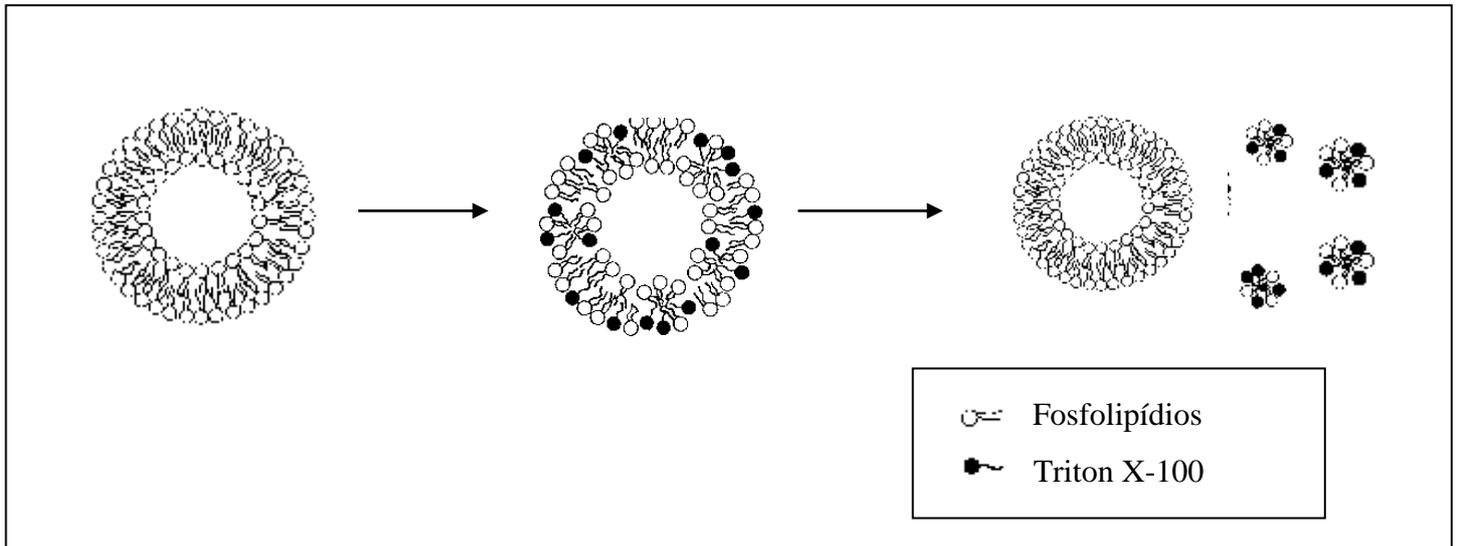


Figura 29. Representação seqüencial esquemática dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100, mostrando o ataque do Triton X-100 na membrana lipossômica, interagindo com os fosfolipídios e levando a formação de vesículas lipossômicas menores e micelas constituídas de Triton X-100/fosfolipídios.⁸²

5.2.3. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

O experimento de SAXS consiste num feixe de raios-X que incide sobre a amostra e o espalhamento gerado é coletado por um detector bidimensional. Dessa forma, obtêm-se uma imagem (figura bidimensional) de espalhamento que será convertida em um gráfico de intensidade de luz espalhada em função do vetor de espalhamento (q), por meio de um programa denominado Fit2D.⁹⁰

O SAXS é uma ferramenta fundamental no estudo de materiais biológicos, pois esse método permite a obtenção de informações estruturais sobre a organização de sistemas vesiculares.⁹³

Lipossomas unilamelares (LUVs) são biofisicamente mais adequados no estudo biológico, uma vez que suas topologias são similares a células biológicas e seu meio interior e exterior podem ser manipulados. Entretanto, amostras de LUVs são adequadas para o experimento de SAXS quando o sistema é suficientemente diluído, no qual as interações entre as vesículas são minimizadas ou completamente eliminadas, resultando em um fator forma contínuo. Todavia, sistemas de LUVs diluídos produzem fracos espalhamentos. Assim, lipossomas multilamelares (MLVs) são mais frequentemente usados nos experimentos de SAXS, pois as várias bicamadas lipídicas são mais organizadas e desta forma produzem um espalhamento mais coerente que resulta em picos bem definidos. Lipossomas multilamelares são mais organizados que lipossomas unilamelares, pois a sobreposição concêntrica de bicamadas requer uma maior organização. Além disso, a análise de dados de difração de MLVs, a partir do pico de Bragg, permite obter informações estruturais sobre os lipossomas multilamelares, tais como: a distância de repetição lamelar e o número médio de lamelas existente nos MLVs.¹⁰⁷

As medidas de SAXS foram realizadas para as amostras de LM na ausência e na presença da JBU 0,5 μM e do Triton X-100 1% de 10 em 10 minutos até 40 minutos, e após 12 horas, com tempo de exposição de 10 minutos. Todas as medidas foram realizadas na presença de 150 mM de NaCl a 25°C.

Figura 30 mostra a curva de SAXS e a curva de ajuste obtida para a amostra de LM. Na Figura 30 **b** observa-se a presença de um pico de Bragg em $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$, o qual é característico de estruturas multilamelares em suspensão, com um $d = 6,23 \text{ nm}$. Na Figura 30 **a** constata-se a presença de um pico de Bragg (ombro) emergente em $q \sim 0,6 \text{ nm}^{-1}$, com um $d = 11,38 \text{ nm}$. Esse pico pode ser relacionado com um tipo de ondulação na bicamada lipídica, causando uma flutuação na distância lamelar (Figura 31). Dessa forma, a presença de dois

picos de Bragg sugere a presença de duas organizações lamelares diferentes para os LM em suspensão.

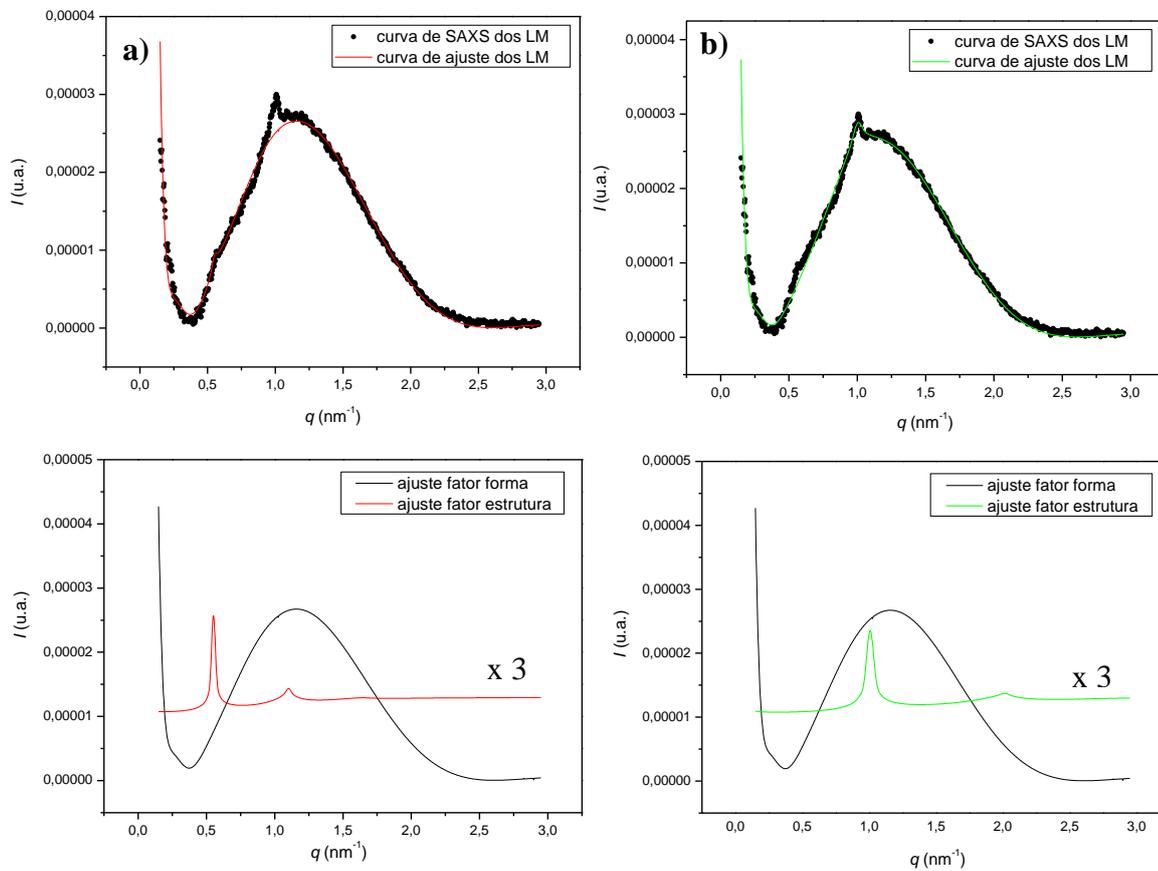


Figura 30. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) para o 1º pico (ombro) em (a) e curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha verde) para o 2º pico em (b) da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas. Nos gráficos abaixo estão representados os correspondentes fator forma (linha preta) e fator estrutura (linha vermelha em (a) e linha verde em (b)). As curvas de $S(q)$ foram multiplicadas por 3 para poderem ser visualizadas na mesma escala.

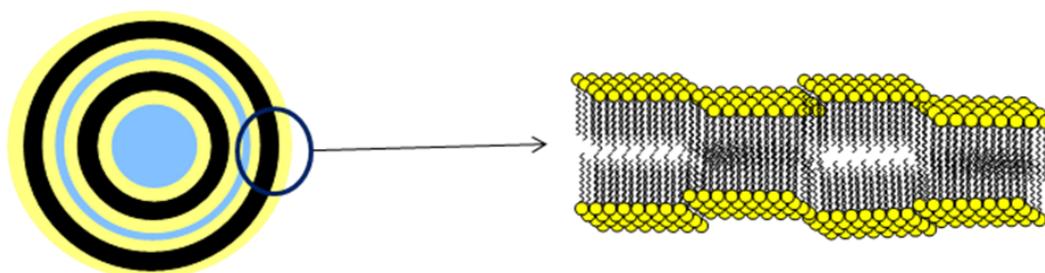


Figura 31. Representação esquemática da membrana lipossômica, mostrando a ondulação na bicamada lipídica que ocasiona uma flutuação na distancia entre bicamadas.

Os parâmetros de ajuste obtidos para o fator forma e fator estrutura estão apresentados nas Tabelas II e III, respectivamente. De acordo com a Tabela II, R_c teve seu valor fixado em 150 nm e, a partir dos valores obtidos do ajuste para T_t e T_h pode-se determinar a espessura da bicamada lipídica que apresenta um valor de 5,11 nm. A espessura da bicamada lipídica não leva em consideração a camada de água existente entre as bicamadas lipídicas nos lipossomas multilamelares, apenas considera a espessura das caudas hidrocarbonadas e das cabeças polares dos fosfolipídios. O parâmetro distância de repetição lamelar (d) é que considera a espessura da bicamada lipídica e camada de água¹⁰⁸ (Figura 32). Sendo assim, a partir da Tabela III, considerado o pico de Bragg mais intenso que possui uma de distância de repetição lamelar de 6,23 nm, pode-se calcular a camada de água existente entre bicamadas que apresenta um valor de 1,21 nm.

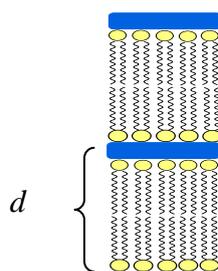


Figura 32. Representação esquemática da distância de repetição lamelar (d) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM).

Tabela II. Parâmetros de fator forma obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM).

F(q)	Rc (nm)	Tt (nm)	Th (nm)	η_{sol} (nm ⁻²)	η_h (nm ⁻²)	η_t (nm ⁻²)
LM	150,0	1,41	2,29	5,6592	5,6576	5,6607

O parâmetro Rc refere-se ao raio do centro dos lipossomas; Tt é a espessura das cabeças polares dos fosfolipídios; Th é a espessura de duas caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios na bicamada; η_{sol} é a densidade do comprimento de espalhamento do solvente; η_h é a densidade do comprimento de espalhamento da parte externa da bicamada e η_t é a densidade do comprimento de espalhamento da parte interna da bicamada.

Tabela III. Parâmetros de fator estrutura obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM).

S(q)	<i>N</i>	<i>d</i> (nm)	η	Nu
LM 1° pico (ombro)	13,73	11,38	0,76	69,16
LM 2° pico	13,73	6,23	0,96	69,16

O parâmetro *N* refere-se ao número de lamelas presente em cada vesícula lipossômica; *d* é a distância de repetição lamelar; η é o parâmetro de Caillé; Nu é a constante adicional do termo de espalhamento difuso.

A Figura 33 mostra a evolução nas imagens de espalhamento 2-D de SAXS referentes às intensidades de luz espalhadas para as amostras de LM na ausência e na presença da JBU 0,5 μ M. Em comparação com a imagem de espalhamento da amostra de LM (Figura 33 **a**), as imagens de LM na presença da JBU (Figura 33 **b**, **c**, **d**, **e**) revelam um aumento na intensidade de luz espalhada a baixos ângulos. Esse aumento se deve a adição de uma segunda população de partículas, que é a JBU. Após 12 horas (Figura 33 **f**), pode-se observar uma significativa diminuição na *I_s*, o qual sugere que a JBU esteja inserida na membrana lipossômica.

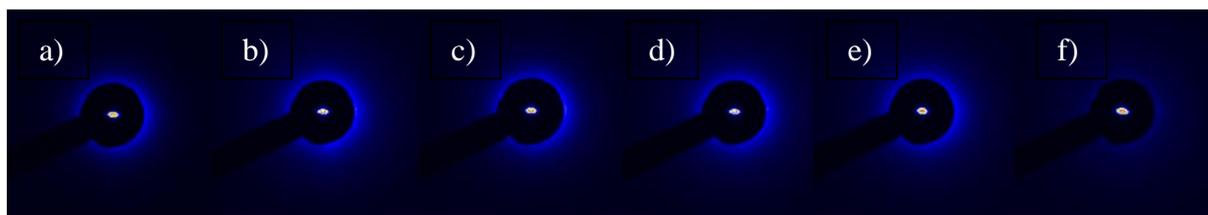


Figura 33. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM). Em (b) LM na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos (e) no tempo de 40 minutos e (f) após 12 horas.

A partir das imagens de espalhamento 2-D de SAXS se obtêm, por meio do Fit2D, as curvas de SAXS para a amostra de LM na presença da JBU 0,5 μM . A Figura 34 revela que a JBU causa uma desordem na membrana lipossômica no intervalo de tempo de 0 a 40 minutos, pois se observa uma diminuição na intensidade do pico de Bragg em $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ com o tempo. Visando maior entendimento da desordem causada pela JBU na membrana, parâmetros estruturais foram obtidos das curvas de SAXS, para as amostras de LM com JBU 0,5 μM no tempo de 10 minutos e 12 horas, por meio do programa SASfit (Figura 35). Os parâmetros de ajuste encontram-se na Tabela IV.

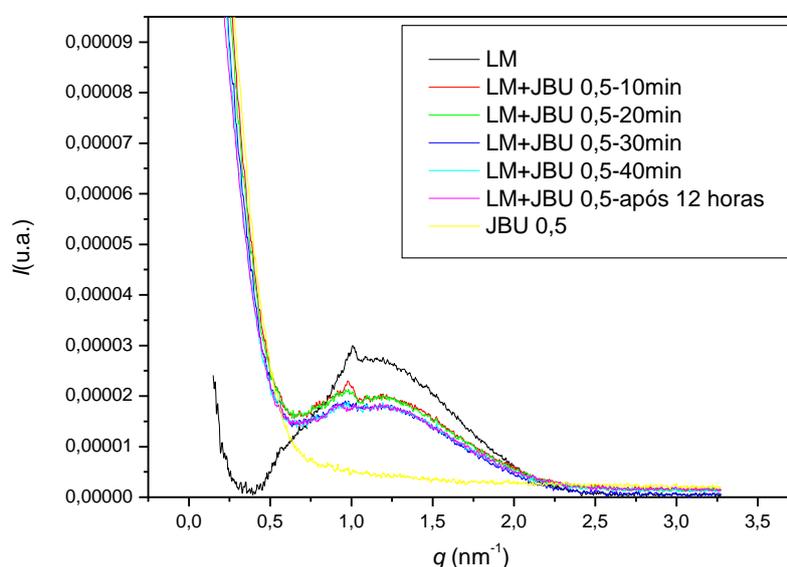


Figura 34. Curvas de SAXS para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM a 25°C. A linha amarela representa a curva de SAXS para a amostra contendo somente a urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM em solução.

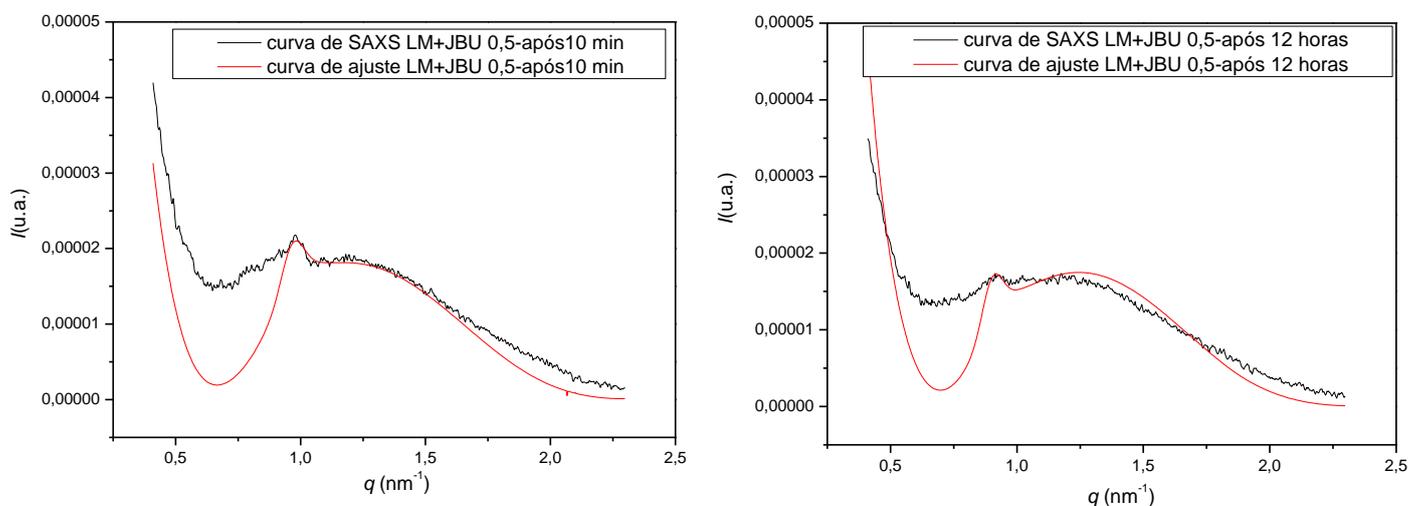


Figura 35. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM em: (a) no tempo de 10 minutos e em (b) após 12 horas da preparação.

Tabela IV. Parâmetros de fator estrutura obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM .

Amostra	N	d (nm)	η	Nu
LM	14	6,23	0,96	69
LM+JBU-10 min	7	6,48	0,64	10
LM+JBU -12 horas	7	6,98	0,53	9

O parâmetro N refere-se ao número de lamelas presente em cada vesícula lipossômica; d é a distância de repetição lamelar; η é o parâmetro de Caillé; Nu é à constante adicional do termo de espalhamento difuso.

De acordo com a Tabela IV, constata-se que há um aumento em d com a adição da JBU nos LM. Depois de transcorridos 12 horas da adição da JBU, d apresenta um valor ajustado de 6,98 nm, indicando que a JBU inserida na membrana lipossômica provoca um aumento na distância de repetição lamelar.

O número de lamelas presente nos LM (N) reduz-se a metade pela presença da JBU. Uma explicação para essa diminuição é que a JBU provoca a perda de lipídios e, posterior, reorganização das moléculas na membrana lipossômica. Além disso, houve, também, uma

redução no parâmetro de Caillé com o tempo, devido à presença da JBU. A redução desse parâmetro indica um aumento na rigidez da membrana causada pela JBU.

A Figura 36 mostra a evolução nas imagens de espalhamento 2-D de SAXS referentes as intensidades de luz espalhadas para as amostras de LM na ausência e na presença do Triton X-100 1%. As imagens revelam que há um aumento significativo na intensidade de luz espalhada a baixos ângulos com a adição do Triton X-100 (Figuras 36 **b**, **c**, **d**, **e**). Esse aumento é ocasionado pela adição de uma segunda população de partículas. Após 12 horas, observa-se uma significativa diminuição na I_s .

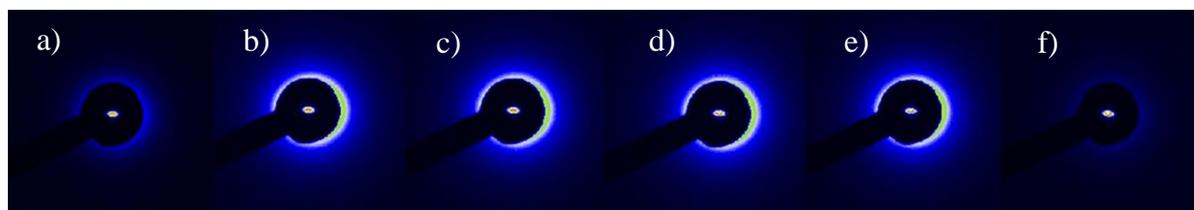


Figura 36. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM). Em (b) lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100 1% no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos (e) no tempo de 40 minutos e (f) após 12 horas.

As curvas de SAXS, obtidas para a amostra de LM na presença do Triton X-100 1%, encontram-se na Figura 37. A presença do Triton X-100 causa um deslocamento no pico de Bragg de $q \sim 1 \text{ nm}^{-1}$ para $q \sim 1,3 \text{ nm}^{-1}$. Dessa forma, provocando uma diminuição na distância de repetição lamelar nos LM, diferentemente do que ocorre com a presença da JBU. Além disso, observa-se um aumento na intensidade do pico de Bragg provocado pela presença do Triton X-100, indicando uma maior organização lamelar, durante os 40 minutos. Após 12, constata-se o desaparecimento do pico de Bragg, sinalizando somente a presença somente de vesículas unilamelares em suspensão.

As curvas de SAXS das amostras de LM na presença do Triton X-100, após 10 minutos e após 12 horas, foram ajustados pelo SASfit (Figura 38). Os parâmetros de ajuste do fator estrutura, após 12 horas, encontram-se na Tabela V, juntamente com os valores obtidos para a amostra de LM, e LM na presença da JBU, a fim de comparar todos os dados obtidos. Como a curva de SAXS da amostra de LM com Triton X-100 após 10 minutos não apresenta

pico de Bragg, foi realizado somente o ajuste do fator forma e os parâmetros obtidos estão na Tabela VI.

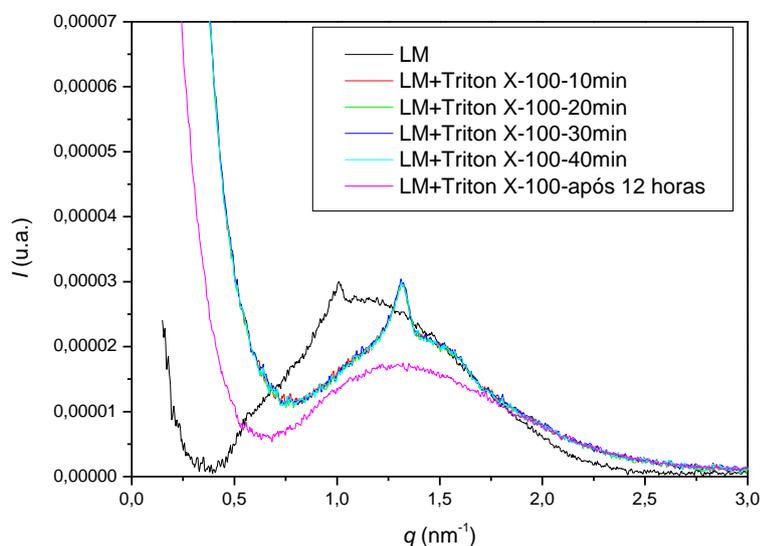


Figura 37. Curva de SAXS para a mostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença e na ausência do Triton X-100 a 25°C.

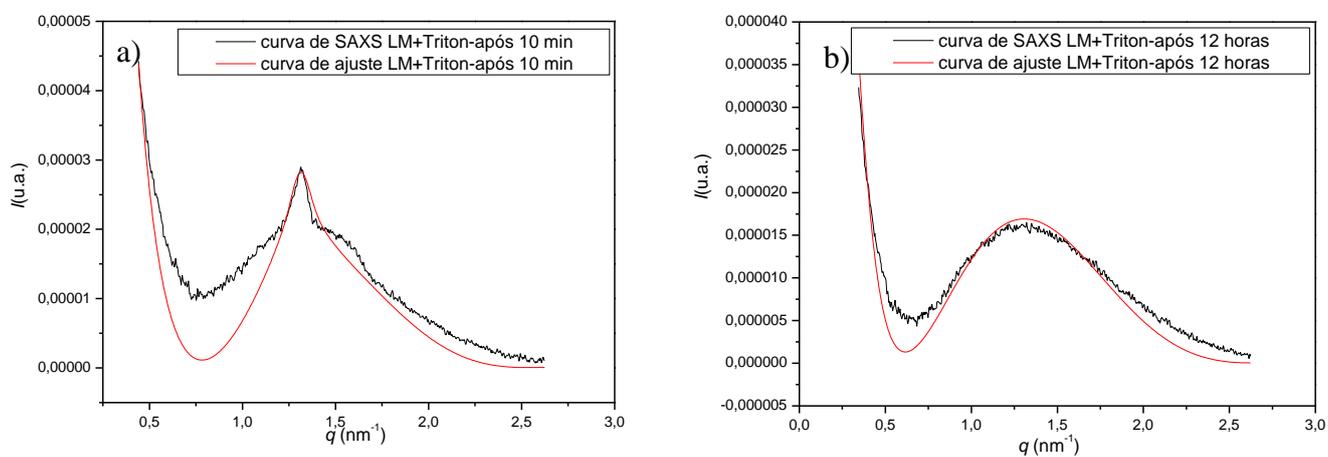


Figura 38. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100 em: (a) no tempo de 10 minutos e em (b), após 12 horas da preparação.

Tabela V. Parâmetros de fator estrutura obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença do Triton X-100.

Amostra	N	d (nm)	η	Nu
LM	14	6,23	0,96	69
LM+JBU-10 min	7	6,48	0,64	10
LM+JBU -12 horas	7	6,98	0,53	9
LM+Triton X-100- 10 min	10	4,75	0,9	5

O parâmetro N refere-se ao número de lamelas presente em cada vesícula lipossômica; d é a distância de repetição lamelar; η é o parâmetro de Caillé; Nu é a constante adicional do termo de espalhamento difuso.

Tabela VI. Parâmetros de fator forma obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença do Triton X-100.

F(q)	Rc (nm)	Tt (nm)	Th (nm)	η_{sol} (nm ⁻²)	η_h (nm ⁻²)	η_t (nm ⁻²)
LM+TritonX-100-12horas	150,0	1,40	2,25	5,6596	5,6576	5,6608

O parâmetro Rc refere-se ao raio do centro dos lipossomas; Tt é a espessura das cabeças polares dos fosfolipídios; Th é a espessura de duas caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios na bicamada; η_{sol} é a densidade do comprimento de espalhamento do solvente; η_h é a densidade do comprimento de espalhamento da parte externa da bicamada e η_t é a densidade do comprimento de espalhamento da parte interna da bicamada.

De acordo com a Tabela V, o valor de d ajustado para a amostra de LM com Triton X-100, é igual a 4,75 nm, indicando que houve uma diminuição na distância de repetição lamelar, devido à presença do Triton X-100. O parâmetro de Caillé apresenta um valor de 0,9, similar ao valor obtido para a amostra de LM.

Dessa forma, os dados obtidos pelo SAXS sugerem que o mecanismo de interação da JBU e do Triton X-100 nos LM é diferente. Os resultados de SAXS e DLS sugerem que o Triton X-100 interage com membrana dos LM, levando à formação de micelas (Triton X-100/lipídios) e, com isso, diminuindo o diâmetro e a distância de repetição lamelar das vesículas lipossômicas, que após 12 horas tornam-se unilamelares.

No caso da JBU, uma hipótese possível de mecanismo de interação com os LM é sua penetração na membrana lipossômica, podendo até ser encapsulada pelo lipossoma. Além disso, a JBU pode provocar a perda de lipídios da membrana e, assim, reduzir o tamanho dos

LM, como foi observado pelo DLS. Assim, a interação da JBU pode ocorrer por atração eletrostática entre as cargas positivas da JBU e as cargas negativas da superfície da membrana lipossômica. Em seguida, a porção hidrofóbica da JBU interagiria com a parte apolar dos lipídios (caudas hidrocarbonadas), enquanto a porção hidrofílica interagiria com as cabeças polares dos lipídios. Pode-se levantar a hipótese de formação de poros; haja vista que estudos de eletrofisiologia mostraram que a JBU é capaz de se inserir e formar canais iônicos em membranas lipídicas planares compostas por fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e colesterol.¹⁰⁹

5.2.4. Potencial Zeta (PZ)

O potencial zeta é um importante indicador de carga na superfície coloidal e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de sistemas coloidais. Valores elevados de potencial zeta indicam vesículas estáveis em suspensão devido a repulsão entre as partículas causada pela carga superficial, o que evita a agregação entre as vesículas.¹¹⁰

Foram realizadas medidas de PZ para as amostras de LM, na ausência e na presença da JBU 0,5 μM e do Triton X-100 1%, logo após a adição da JBU e do Triton X-100 e após 30 minutos. Todas as medidas foram realizadas na presença de 150 mM de NaCl a 25°C. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela VII.

O PZ obtido para os LM foi de -37 ± 3 mV. O valor negativo indica que as vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas, na qual os íons Na^+ , que estão presentes na suspensão, estão sendo atraídos pela carga superficial negativa dos lipossomas. Este valor de PZ pode ser explicado pela presença da PS e PI, que são fosfolípidios aniônicos.³ A PC e a PE são zwitteriônicas, e portanto neutras. O potencial elétrico superficial negativo dos LM indica relativa estabilidade coloidal em relação aos processos de agregação, ou seja, quando uma vesícula em difusão se encontra com outra na suspensão, elas irão se repelir, devido a carga superficial.

O valor de PZ, para a amostra de LM na presença da JBU, é de -28 ± 3 mV. Após 30 minutos, o valor de PZ tornou-se -17 ± 7 mV, indicando que a JBU causa alguma mudança no potencial superficial das vesículas lipossômicas neste intervalo de tempo. Esse aumento no potencial zeta pode estar relacionado com a exposição de aminoácidos carregados da JBU na camada externa da membrana lipossômica.

O valor de PZ, para os LM na presença do Triton X-100, diminuiu no tempo de 30 minutos, passando de seu valor inicial de -17 ± 1 mV para -29 ± 4 mV. Como o Triton X-100 é um surfactante não iônico, seu potencial zeta é por volta de zero. Assim, uma explicação possível para a diminuição do potencial zeta pode ser a formação de micelas de Triton X-100/lipídios, constituídas de PS e PI.

Tabela VII. Potenciais Zetas (PZ) e seus desvios padrões para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na presença e na ausência da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μ M e do Triton X-100 a 25° C.

Amostra	Medida inicial		Medida após 30 minutos	
	PZ (mV)	Desvio padrão	PZ (mV)	Desvio padrão
LM	-37	3	-37	3
LM+JBU	-28	3	-17	7
LM+Triton X-100	-17	1	-29	4

5.3. ESTUDO PRELIMINAR DOS LM COM GANGLIOSÍDEOS (GG) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA JBU E DO TRITON X-100

5.3.1. Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM)

A Microscopia Óptica de Luz polarizada foi empregada, inicialmente, com intuito de verificar se houve formação de vesículas lipossômicas nas amostras de LM com GG, LM com GG na presença da JBU 0,5 μ M e do Triton X-100 1%, por meio da visualização de cruces de Malta nas micrografias de POM. Todas as análises foram realizadas na presença de 150 mM de NaCl a 25°C à temperatura ambiente (22 °C). As amostras foram analisados imediatamente após a adição da JBU e do Triton X-100 e após uma semana.

Observa-se, que para todos os sistemas (Figuras 39 **a**, 40 **a** e 41 **a**) há a presença de cruces de Malta, indicando vesículas com organização lamelar, ou seja, ocorreu a formação de vesículas na presença de GG. Além disso, mesmo na presença da JBU e do Triton X-100, pode-se verificar a ocorrência de lipossomas.

Nas Figuras 39 **b** e 40 **b**, após a evaporação da água, constatam-se uma textura típica de organização hexagonal dos lipídios, indicando que a JBU não interfere na organização dos lipídios e gangliosídeos depois da evaporação da água.

Já na amostra de LM com GG na presença do Triton X-100, Figura 41 **b**, após a evaporação da água, verificou-se uma textura em mosaico com a presença de cruces de Malta, caracterizando sistemas com organização lamelar. Assim, o Triton X-100 modifica a organização dos lipídios e dos GG, provocando o surgimento de outra textura, que não a de fase hexagonal, após uma semana do preparo. Conclui-se, por fim, que o Triton X -100 e a JBU interagem diferentemente com os LM, depois da evaporação da água existente no sistema.

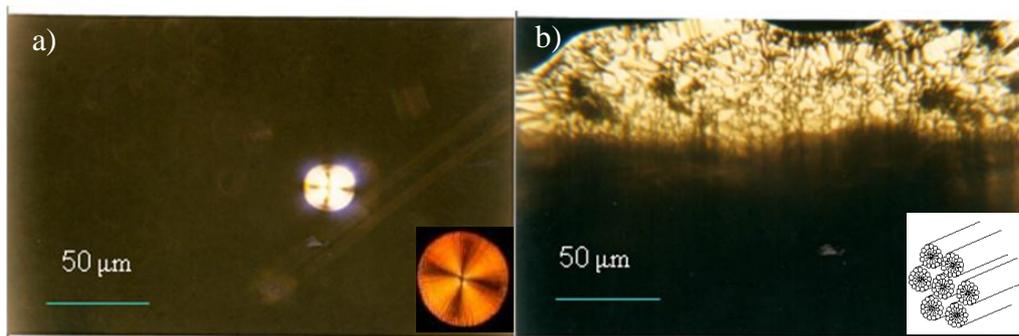


Figura 39. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG), indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de Malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolipídios (fase hexagonal H), após a evaporação da água.

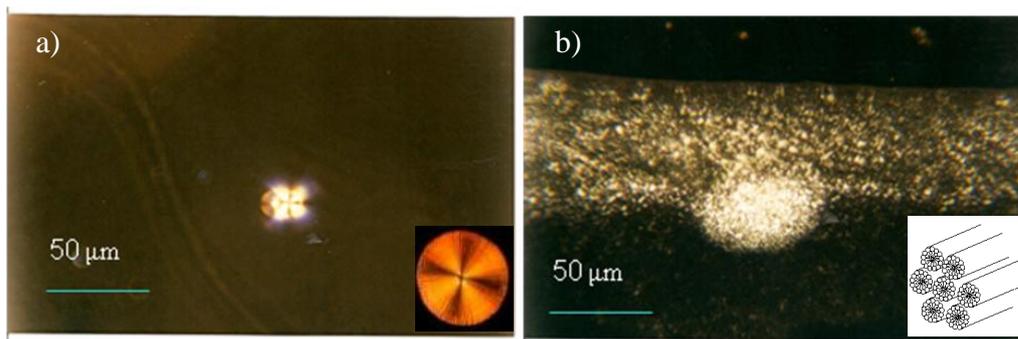


Figura 40. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM, indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de Malta), (b) textura típica de organização hexagonal dos fosfolipídios (fase hexagonal H), após a evaporação da água.

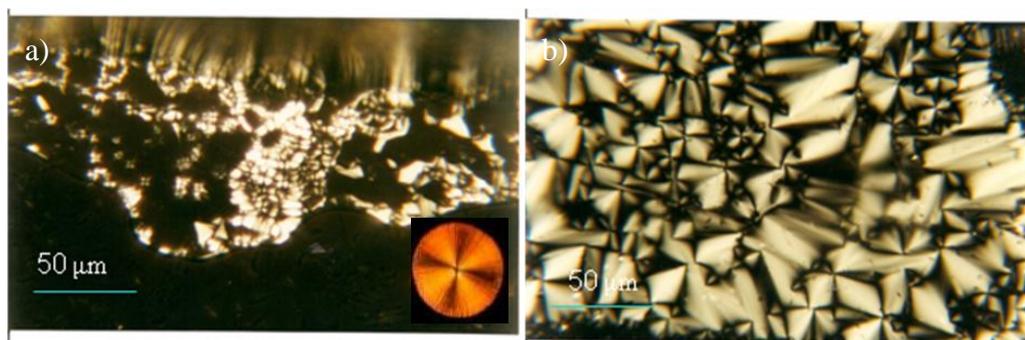


Figura 41. Micrografia de Microscopia Óptica da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença do Triton X-100 1%, indicando em: (a) vesículas com organização lamelar (cruzes de malta), (b) textura em mosaico com a presença de cruz de malta, caracterizando sistemas com organização lamelar, após a evaporação da água.

5.3.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas para as amostras de LM com GG, LM com GG na presença da JBU 0,5 μM e do Triton X-100 1%. Todas as medidas foram realizadas na presença de 150 mM de NaCl a 25°C; de 10 em 10 minutos até 40 minutos, com tempo de exposição de 10 minutos.

A curva de SAXS obtida para a amostra de LM com GG foi ajustada pelo programa SASfit (Figura 42). Os parâmetros de ajuste para o fator forma estão apresentados na Tabela VIII. A Figura 42 apresenta, portanto, somente a contribuição do fator forma, indicando unicamente a presença de lipossomas unilamelares em suspensão. A formação de lipossomas unilamelares na presença dos GG, e não multilamelares como nos LM sem GG pode ser um indício de que os gangliosídeos foram incorporados na membrana. Além disso, a ocorrência de apenas lipossomas unilamelares na presença de GG pode ser explicada pela formação de uma camada extra na superfície dos lipossomas constituída por cadeias de polissacarídeos dos GG, enquanto que as caudas hidrocarbonadas interagem com a camada lipídica. Os GG são lipídios de membrana constituídos por grupos-cabeça polares, que são oligossacarídeos, e uma cauda hidrocarbonada apolar. Assim, a camada externa formada de polissacarídeos impede a formação de uma segunda camada lipídica nos lipossomas, formando apenas lipossomas unilamelares em suspensão.^{111,112}

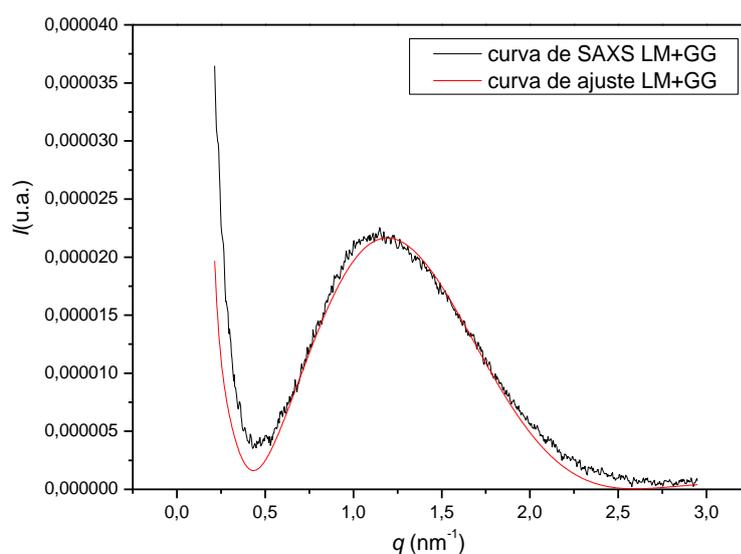


Figura 42. Curva de SAXS (linha preta) e curva de ajuste (linha vermelha) da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG).

Tabela VIII. Parâmetros de fator forma obtidos do ajuste da curva de SAXS para os lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG).

F(q)	Rc (nm)	Tt (nm)	Th (nm)	η_{sol} (nm ⁻²)	η_h (nm ⁻²)	η_t (nm ⁻²)
LM	150,0	1,39	2,31	5,6592	5,6575	5,6607

O parâmetro Rc refere-se ao raio do centro dos lipossomas; Tt é a espessura das cabeças polares dos fosfolipídios; Th é a espessura de duas caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios na bicamada; η_{sol} é a densidade do comprimento de espalhamento do solvente; η_h é a densidade do comprimento de espalhamento da parte externa da bicamada e η_t é a densidade do comprimento de espalhamento da parte interna da bicamada.

De acordo com a Tabela VIII, Tt apresenta um valor ajustado de 1,39 nm e Th um valor de 2,31 nm. Dessa forma, a espessura da bicamada lipídica dos LM com GG apresenta um valor de 5,09 nm, similar ao encontrado para os LM sem GG.

A Figura 43 mostra a evolução nas imagens de espalhamento 2-D de SAXS das intensidades de luz espalhadas para as amostras de LM com GG na ausência e na presença da JBU 0,5 μ M. Em comparação com a imagem de espalhamento dos LM com GG (Figura 43 a), as imagens ao longo do tempo, das amostras de LM com GG na presença da JBU (Figuras 43 a, b, c, d, e), revelam que há um pequeno aumento na I_s a baixos ângulos. Esse aumento deve-se a adição da JBU no sistema.

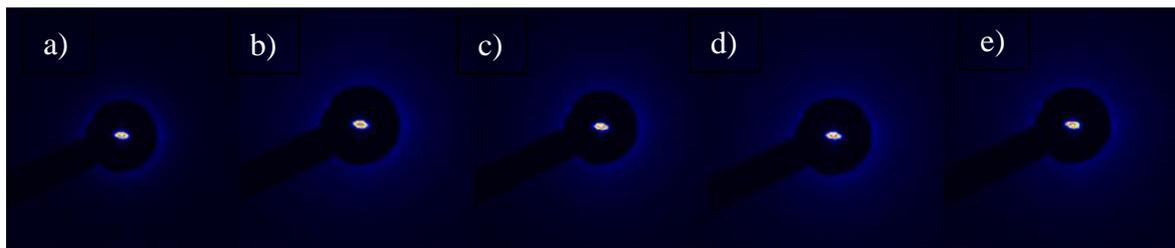


Figura 43. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG). Em (b) lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos e (e) no tempo de 40 minutos.

A partir das curvas de SAXS (Figura 44), obtidas para a amostra de LM com GG na presença da JBU, observou-se que todas as curvas sobrepõem-se e não há deslocamento nem para a esquerda nem para a direita, indicando que não há alteração no valor de d no intervalo de tempo de 40 minutos. Além disso, não há picos de Bragg, o que indica haver somente lipossomas unilamelares.

Estudos mostraram que a JBU e canatoxina comportam-se como uma lectina monovalente (hemilectina), ligando-se a glicoconjugados complexos (gangliosídeos) e sialoproteínas (fetuína).^{7,10} Assim, os GG incorporados na membrana dos LM podem estar interagindo com a JBU, impedindo que esta se insira na membrana.

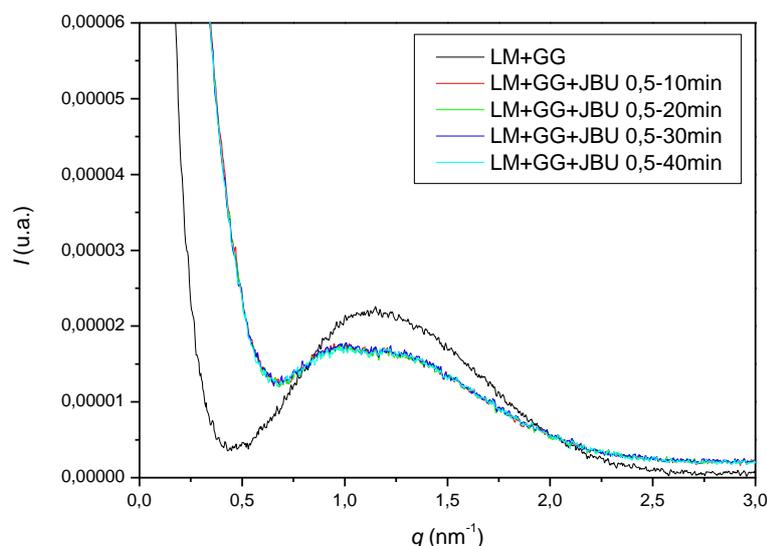


Figura 44. Curvas de SAXS da amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,5 μM a 25°C.

A Figura 45 mostra a evolução nas imagens de espalhamento 2-D de SAXS das intensidades de luz espalhadas, para as amostras de LM com GG na ausência e na presença do Triton X-100 1%. Observa-se, que há um aumento na I_s a baixos ângulos nas imagens de espalhamento dos LM com GG com a adição do Triton X-100, durante o tempo de 40 minutos.

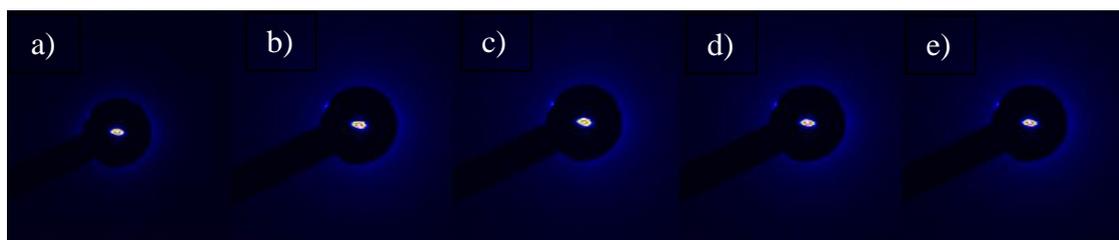


Figura 45. Imagens 2-D de espalhamento de SAXS em (a) dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG). Em (b) lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na presença do Triton X-100 1% no tempo de 10 minutos, (c) no tempo de 20 minutos, (d) no tempo de 30 minutos (e) no tempo de 40 minutos e (f) após 12 horas.

Observa-se, a partir da Figura 46, que as curvas de SAXS para a amostra de LM com GG na presença do Triton X-100, sobrepõem-se e não apresentam picos de Bragg. Entretanto, há um deslocamento nos espectros de SAXS para a direita, devido à presença do Triton X-100, indicando que o Triton X-100 interage com a membrana lipossômica, provavelmente diminuindo a espessura da bicamada lipídica.

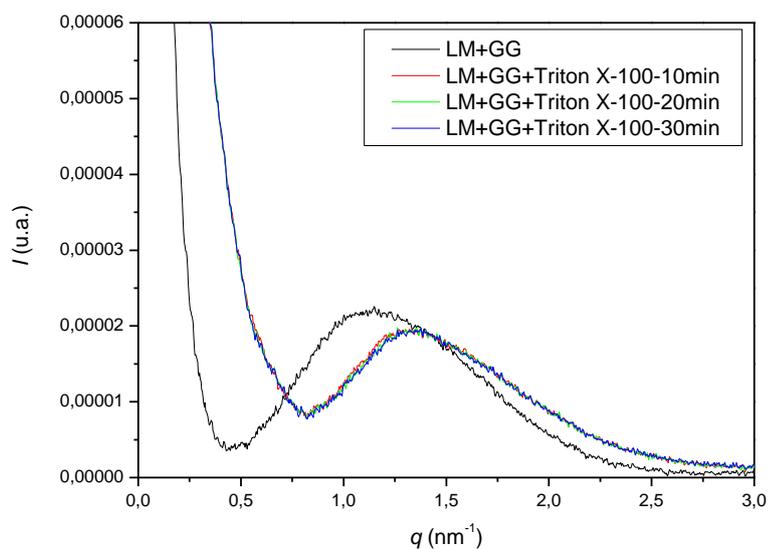


Figura 46. Curvas de SAXS para a amostra de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) com gangliosídeos (GG) na ausência e na presença do Triton X-100 1% a 25°C.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram preparados lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM), por meio do método de evaporação em fase reversa, com intuito de utilizá-los como modelo de membrana celular para o estudo da interação com a urease de *jack bean* (JBU). Além disso, estudou-se a interação dos LM com o surfactante Triton X-100, visando comparar o mecanismo de interação deste e da JBU com a membrana lipossômica.

O estudo realizado para determinação de temperaturas de transições de fases dos LM indicou que na temperatura das análises de SAXS e DLS (25 °C) os LM encontram-se na fase gel ondulado.

A análise da interação dos LM com a JBU permitiu observar uma significativa mudança nas dimensões dos LM durante o tempo de 30 minutos, que se mostrou mais pronunciada com uma maior concentração de JBU. Além disso, foi possível dimensionar a JBU em solução (diâmetro de 20 nm), o Triton X-100 em solução (diâmetro de 8 nm) e os LM em suspensão (diâmetro de 300 nm). A técnica de SAXS e os ajustes feitos pelo *software* SASfit revelaram mudanças estruturais na membrana, indicando que a JBU aumenta a distância de repetição lamelar dos LM, enquanto que o Triton X-100 diminui no tempo de 40 minutos. Foi observada também, uma mudança no potencial elétrico superficial dos LM na presença do JBU e do Triton X-100. A JBU causa um aumento no potencial elétrico superficial dos LM, enquanto que o Triton X-100 causa a diminuição no tempo de 30 minutos. Portanto, os dados obtidos sugerem que a JBU penetre na membrana lipossômica, provocando um aumento na distância de repetição lamelar e reduzindo o tamanho dos LM, ocasionado, provavelmente, por meio da perda de lipídios das vesículas. Já o Triton X-100 interage com a membrana dos LM, levando a formação de micelas e acarretando na diminuição do diâmetro e da distância de repetição lamelar das vesículas lipossômicas.

O estudo físico-químico preliminar de LM com gangliosídeos (GG) revelou um perfil de curva de SAXS característico de lipossomas unilamelares, diferentemente do observado para os LM sem GG, indicando que os GG foram incorporados na membrana lipossômica. Os dados de SAXS para os LM com GG na presença da JBU sugerem que esta interage com os GG, e não com a membrana; entretanto, o Triton X-100 interage com os LM, diminuindo a espessura da bicamada lipídica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Polozova, A.; Yamazaki, A.; Brash, J.L.; Winnik, F.M. *Colloids and surfaces A*. **1999**, *147*, 17.
- ² Lasic, D.D.; Papahadjopoulos, D. *Science*. **1995**, *267*, 1275.
- ³ Casal, E.; Galan, A.M.; Escolar, G.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2003**, *125*, 139.
- ⁴ Soppimath, S.K.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. *Journal of Controlled Release*. **2001**, *70*, 1.
- ⁵ Wang, J.H.; Tarr, D.A. *Journal of the American Chemical Society*. **1955**, *77*, 6205.
- ⁶ Sumner, J.B. *Journal of Biological Chemistry*. **1926**, *69*, 435.
- ⁷ Follmer, C.; Barcellos, G.B.; Zingali, R.B.; Machado, O.L.; Alves, E.W.; Barja-Fidalgo, C.; Guimaraes, J.A.; Carlini, C.R. *Biochemical Journal*. **2001**, *360*, 217.
- ⁸ Carlini, C.R.; Oliveira, A.E.; Azambuja, P.; Xavier-Filho, J.; Wells, M.A. *Journal of Economic Entomology*. **1997**, *90*, 340.
- ⁹ Carlini, C.R.; Grossi-de-Sa, M.F. *Toxicon*. **2002**, *40*, 1515.
- ¹⁰ Guerra, R.R. *Aspectos Biológicos e Estruturais das uréases de Canavalia ensiformis*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2007**.
- ¹¹ Soares, J.C.; Dippold, C.S.; Wells, K.F.; Houck, P.; Mallinger, A.G. *Psychiatry Research*. **1999**, *86*, 107.
- ¹² Torchilin, V.P. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2005**, *4*, 145.
- ¹³ Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. *Journal of Molecular Biology*. **1965**, *13*, 238.
- ¹⁴ Batista, C.M.; Carvalho, C.M.B.; Magalhães, N.S.S. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. **2007**, *43*, 167.
- ¹⁵ Hernández-Borrell, J. *International Journal of Pharmaceutics*. **1998**, *47*, 129.
- ¹⁶ Loura, L.M.S.; Almeida, R.F.M. *Tópicos de Biofísica de Membranas*. (1ª ed). Lisboa: Lidel, **2004**.
- ¹⁷ Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. (3rd Ed). São Paulo: Sarvier, **2002**.
- ¹⁸ Lasic D.D. *Liposomes: from Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier, **1993**.

-
- ¹⁹ Pautot, S.; Frisken, B. J.; Weitz, D. A. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América*. **2003**, *100*, 10718.
- ²⁰ Delattre, J., Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.R.; Shuber, F. *Les Lipossomes*. Paris: Inserm, **1993**.
- ²¹ Mertins, O. *Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
- ²² Mertins, O. *Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2004**.
- ²³ Mertins, O.; Cardoso, M.B.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2006**, *6*, 2425.
- ²⁴ New, R.R.C. *Liposomes: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, **1990**.
- ²⁵ Lasic, D.D. *Trends in Biotechnology*. **1998**, *16*, 307.
- ²⁶ Mertins, O.; Sebben, M.; Schneider, P.H.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. *Química Nova*. **2008**, *31*, 1856.
- ²⁷ Cullis, P.R.; Fenske, D.B.; Hope, M.J. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Amsterdam: Elsevier Science, **1996**.
- ²⁸ Hanada, K.; Nishijima, M.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Fujita, S.; Ogawa, T. *Journal of Biological Chemistry*. **1992**, *267*, 2352.
- ²⁹ Voelker, D.R.; Kennedy, E.P.; *Biochemistry*. **1982**, *21*, 2753.
- ³⁰ Marggraf, W.D.; Kanfer, J.N. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1987**, *897*, 57.
- ³¹ Kolesnick, R.N. *Progress in Lipid Research*. **1991**, *30*, 1.
- ³² Knorr, R.L. *Giant vesicles - influence of phase state, composition and electric pulses*. Dissertação de Mestrado. Potsdam: Universitat Potsdam, **2010**.
- ³³ Edwards, P.A.; Davis, R. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Amsterdam: Elsevier Science, **1996**.
- ³⁴ Maulik, P.R.; Shipley, G.G. *Biophysical Journal*. **1996**, *70*, 2256.
- ³⁵ Demel, R.A.; de Kruijff, B. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1976**, *457*, 109.
- ³⁶ Ohvo-Rekila, H.; Ramstedt, B.; Leppimäki, P.; Slotte, J.P. *Progress in Lipid Research*, **2002**, *41*, 66.
- ³⁷ Chen, X.; Niu, L.; Shi, H. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2008**, *65*, 203.
- ³⁸ Sankaram, M.B.; Thompson, T.E. *Biochemistry*. **1990**, *29*, 10670.

-
- ³⁹ Brown, D.A.; London, E. *Biological Chemistry*. **2000**, 275, 17221.
- ⁴⁰ Simons, K.; Ikonen, E. *Nature*. **1997**, 387, 569.
- ⁴¹ Brown, D.A.; London, E. *Annual Review of cell and Developmental Biology*. **1998**, 14, 111.
- ⁴² Fa, N. *Micro-rheologie de vésicules géantes*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2003**
- ⁴³ Haibel, A.; Nimtz, G.; Pelster, R.; Jaggi, R. *Physical Review E*. **1998**, 57, 4838.
- ⁴⁴ Dimova, R.; Aranda, S.; Bezlyepkina, N.; Nikolov, V.; Riske, K.; Lipowsky, R. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **2006**, 18, 1151.
- ⁴⁵ Tardieu, A.; Luzzati, V.; Rennan, F.C. *Journal of Molecular Biology*. **1973**, 75, 711.
- ⁴⁶ Koynova, R.; Caffrey, M. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1998**, 1376, 91.
- ⁴⁷ Cavalcanti, L.P. *Estudo Estrutural de Membranas Modelo Utilizando Radiação Síncrotron*. Tese de Doutorado, Campinas: UNICAMP, **2001**.
- ⁴⁸ Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P. *Microbiological Review*. **1955**, 59, 451.
- ⁴⁹ Sirko, A., Brodzik, R. *Acta Biochimica Polonica* **2000**, 47, 1189.
- ⁵⁰ Zerner, B. *Bioorganic Chemistry*. **1991**, 19, 116.
- ⁵¹ Follmer, C. *Phytochemistry*. **2008**, 69, 18.
- ⁵² Dixon, N.E.; Hinds, J.A.; Fihelly, A.K.; Gazzola, C.; Winzor, D.J.; Blakeley, R.L.; Zerner, B. *Journal of Biochemistry*. **1980**, 58, 1323.
- ⁵³ Takishima, K.; Suga, T.; Mamiya, G. *Journal of Biochemistry*. **1988**, 175, 151.
- ⁵⁴ Fishbein, M.N. *Annals of New York Academy of Science*. **1969**, 147, 857.
- ⁵⁵ Fishbein, W.N., Nagarajan, K. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1971**, 144, 709.
- ⁵⁶ Follmer, C., Pereira, F.V., Silveira, N.P., Carlini, C.R. *Biophysical Chemistry*. **2004**, 111, 79.
- ⁵⁷ Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K. *Journal of Molecular Biology*. **2010**, 400, 274.
- ⁵⁸ Summer, J.B.; Howell, S.F. *The Journal of Bacteriology*. **1936**, 32, 227.
- ⁵⁹ Ubatuba, F.B. *Revista Brasileira de Biologia*. **1955**, 15, 1.
- ⁶⁰ Carlini, C.R., Guimarães, J.A. *Toxicon*, **1981**, 19, 667.
- ⁶¹ Carlini, C.R.; Grossi-de-As, M.F. *Toxicon*. **2002**, 40, 1515.
- ⁶² Polacco, J.C.; Holland, M.A. *International Review of Cytology*. **1993**, 154, 65.
- ⁶³ Carlini, C.R.; Polacco, J.C. *Crop Science Society of America* **2008**, 48, 1665.
- ⁶⁴ Follmer, C., Carlini, C.R., Yoneama, M.L., Dias, J.F. *Nuclear Instrumentation and Methods in Physics Research Part B*. **2002**, 189, 482.

-
- ⁶⁵ Ferreira-DaSilva, C.T.; Gombarovis, M.E.C.; Masuda, H.; Carlini, C.R. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **2000**, *44*, 62.
- ⁶⁶ Piovesan, A.R. *Urease de Canavalia ensiformis: Processamento diferencial por ninfas e adultos de Dysdercus peruvianus e formação de canal in vitro*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2009**.
- ⁶⁷ Olivera-Severo, D.; Wassermann, G.E.; Carlini, C.R. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2006**, *452*, 149.
- ⁶⁸ Quinn, M.; Fitzazgerald, D. *Platelet Function: Assessment, Diagnosis and treatment*. (1^a ed). Totowa: HUMAN PRESS, **2005**.
- ⁶⁹ Lee, L.H.; Baglin, T. *Journal of Haematology*. **1995**, *89*, 131.
- ⁷⁰ Williamson, P.; Bevers, E.M.; Smeets, E.F.; Comfurius, P.; Schlegel, R.A.; Zwaal, R.F.A.; *Biochemistry*. **1995**, *34*, 10448.
- ⁷¹ Solum, N.O. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. **1999**, *19*, 2841.
- ⁷² Alving, B.M. *Vox Sanguinis*. **2002**, *83*, 287.
- ⁷³ Micheletto, Y.M.S. *Preparação e caracterização físico-química de lipossomas de plaquetas humanas*. Trabalho de Conclusão. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
- ⁷⁴ Mandic, R.; Opper, C.; Krappe, J.; Wesemann, W. *Thrombosis Research*, **2002**, *106*, 137.
- ⁷⁵ Gugliemone, H.A.; Daniele, J.J.; Bianco, I.D.; Fernandez, E.J.; Fidelio, G.D. *Thrombosis Research*. **2000**, *98*, 51.
- ⁷⁶ Furian, A. F. *Papel do óxido nítrico e de canais potássio na vasodilatação induzida pelo gangliosídeo GM1*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2009**.
- ⁷⁷ Svennerholm, L. *Acta Chemica Scandinavica*. **1963**, *17*, 239.
- ⁷⁸ Ando, S.; Chang, N.C.; Yu, R.K. *Analytical Biochemistry*. **1978**, *89*, 437.
- ⁷⁹ Cooling, L.L.W.; Zhang, D.; Koerner, T.A.W. *Transfusio*. **2001**, *41*, 504.
- ⁸⁰ Paternostre, M.; Meyer, O.; Grabielle-Madelmont, C.; Lesieur, nS.; Ghanam, M.; Ollivon, M. *Biophysical Journal*. **1995**, *69*, 2476.
- ⁸¹ Polozova, A.I.; Dubachev, G.E.; Simonova, T.N.; Barsukov, L.I. *FEBS Letters*. **1995**, *358*, 17.
- ⁸² Loèpez O.; la Maza A.; Coderch, L.; Lopez-Iglesias C.; Wehrli, E.; Parra, J.L. *FEBS Letters*. **1998**, *426*, 314.
- ⁸³ Partearroyo, M.A.; Alonso, A.; Goni, F.M.; Tribout, M.; Paredes, S. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1996**, *178*, 156.

-
- ⁸⁴ Edwards, K., Almgren, M., Bellare, J.; Brown, W. *Langmuir*. **1989**, *5*, 473.
- ⁸⁵ Lopez, O.; Cocera, M.; Pons, R.; Azemar, N.; Lopez-Iglesias, C.; Wehrli, E.; Parra, J.L.; La Maza, A. *Langmuir*. **1999**, *15*, 4678.
- ⁸⁶ Szoka, F.C.; Papahadjopoulos, D. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América*. **1978**, *140*, 4194.
- ⁸⁷ Silveira, N.P. *Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia*. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
- ⁸⁸ Pecora, R.; Berne, B.J. *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics*. New York: Dover Publications, **2000**.
- ⁸⁹ Chu, B. *Laser Light Scattering. Basic Principles and Practice*. São Diego: Academic Press, **1991**.
- ⁹⁰ Giacomelli, F.C. *Estruturação e comportamento físico-químico de sistemas coloidais sob efeito de campo elétrico externo como perspectiva para a ciência macromolecular*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2009**.
- ⁹¹ Guinier, A. *X-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*. New York: Dover Publications, **1994**.
- ⁹² Davidson, P. *Selected Topics in X-Ray by Liquid Crystalline Polymers*. Berlin: Springer, **1999**.
- ⁹³ Bouwstra, J.A.; Gooris, G.S.; Bras, W.; Talsma, H. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1993**, *63*, 83.
- ⁹⁴ Pedersen, J.S. *Advances in Colloid and Interface Science*, **1997**, *70*, 171.
- ⁹⁵ Kohlbrecher J. *SASfit: A program for fitting simple structural models to small angle scattering*. <http://kur.web.psi.ch/sans1/SASANSSoft/sasfit.html>, **2009**.
- ⁹⁶ Zhang, R.; Suter, R.M.; Nagle, J.F. *Physical Review E*. **1994**, *50*, 5047.
- ⁹⁷ Zetasizer Nano Series. *User Manual*. England: Malvern Instruments, **2004**
- ⁹⁸ Mouritsen, O.G., Jorgensen, K. *Molecular Membrane Biology*. **1995**, *12*, 15.
- ⁹⁹ Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., Isaac, T. *Biochim. Biophys. Acta*. **1973**, *311*, 330.
- ¹⁰⁰ Jutila, A. *Lateral heterogeneity in model membranes – inducements and effects*. Academic Dissertation. Finland: University of Helsinki, **2001**.
- ¹⁰¹ Michel, N.; Fabiano, A.; Polidori, A.; Jack, R.; Pucci, B. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, *139*, 11.
- ¹⁰² Caboi, F.; Amico, G.S.; Pitail, P.; Monduzzi, M.; Nylander, T.; Lersson, K. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2001**, *190*, 47.

-
- ¹⁰³ Nieh, M.; Raghunathan, V.A.; Glinka, C.J.; Harroun, T.A.; Pabst, G.; Katsaras, J. *Langmuir*. **2004**, *20*, 7893.
- ¹⁰⁴ Inoue, T.; Dong, B.; Zheng, L.Q. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2007**, *307*, 578.
- ¹⁰⁵ Crooks, E.R.; Eastoe, J.; Beeby, A. *Journal of Chemical Society. Faraday Trans.* **1997**, *93*, 4131.
- ¹⁰⁶ Goyal, P.S.; Menon, S.V.G.; Dasannacharya, B.A.; Thiyagarajan, P. *Physical Review E*. **1995**, *51*, 2308.
- ¹⁰⁷ Kucerka, N.; Pencer, J.; Sachs, J.N.; Nagle, J.F.; Katsaras, J. *Langmuir*. **2007**, *23*, 1292.
- ¹⁰⁸ Fernandez, R.M.; Riske, K.A.; Amaral, L.Q.; Itri, R.; Lamy, M.T. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2008**, *1778*, 907.
- ¹⁰⁹ Piovan, A.R. *Urease de Canavalia ensiformis: processamento diferencial por ninfas e adultos de Dysdercus peruvianus e formação de canal in vitro*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2009**.
- ¹¹⁰ Guo, C.; Liu, S.; Dai, Z.; Jiang, C.; Li, W. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2010**, *76*, 362.
- ¹¹¹ Ristori, S.; Cola, E.D.; Lunghi, C.; Richichi, B.; Nativi, C. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2009**, *1788*, 2518.
- ¹¹² Zanina, M.H.A.; Torriani, I.C.L.; Zollner, R.L.; Santana, M.H.A. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*. **2004**, *251*, 175.

8. ANEXOS

8.1 TABELAS DE VARIAÇÃO DE DIÂMETRO, INTENSIDADE DE LUZ ESPALHADA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO PARA AS AMOSTRAS DE LIPOSSOMAS MIMÉTICOS DE PLAQUETAS HUMANAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DO UREASE DE *JACK BEAN* E DO TRITON X-100.

Tabela IX. Variação de diâmetro (por meio do método Cumulantes) no tempo de 28 minutos para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1%.

Tempo	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)
	LM	LM+JBU 0,1	LM+JBU 0,5	LM+Triton X-100
Medida dos LM na ausência de JBU e Triton X-100	399 \pm 20	367 \pm 42	376 \pm 10	367 \pm 14
1	413 \pm 23	523 \pm 25	268 \pm 12	142 \pm 15
4	399 \pm 27	418 \pm 23	257 \pm 10	165 \pm 15
7	413 \pm 26	381 \pm 20	218 \pm 10	186 \pm 15
10	412 \pm 23	370 \pm 21	205 \pm 9	157 \pm 15
13	400 \pm 21	344 \pm 26	207 \pm 12	162 \pm 16
16	410 \pm 24	373 \pm 24	206 \pm 10	181 \pm 15
19	383 \pm 21	423 \pm 28	189 \pm 10	176 \pm 14
22	389 \pm 25	289 \pm 23	215 \pm 8	164 \pm 12
25	415 \pm 20	378 \pm 30	206 \pm 12	164 \pm 13
28	387 \pm 24	377 \pm 30	213 \pm 10	180 \pm 12

Tabela X. Variação de intensidade de luz espalhada (I_s) normalizada no tempo de 26 minutos para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1%.

	I_s (cts/s)	I_s (cts/s)	I_s (cts/s)	I_s (cts/s)
Tempo	LM	LM+JBU 0,1	LM+JBU 0,5	LM+Triton X-100
Medida dos LM na ausência de JBU e Triton X-100	1	1	1	1
1	0,96154	1,23077	0,71795	1,07407
6	0,96154	1,15385	0,74359	1,18519
11	0,96154	1,15385	0,71795	1,18519
16	0,96154	1,23077	0,71795	1,22222
21	0,96154	1,23077	0,71795	1,22222
26	0,96154	1,23077	0,71795	1,2963

Tabela XI. Variação de Índice de polidispersão (PD.I) no tempo de 28 minutos para as amostras de lipossomas miméticos de plaquetas humanas (LM) na ausência e na presença da urease de *jack bean* (JBU) 0,1 e 0,5 μM e do Triton X-100 1%.

	PD.I	PD.I	PD.I	PD.I
Tempo	LM	LM+JBU 0,1	LM+JBU 0,5	LM+Triton X-100
Medida dos LM na ausência de JBU e Triton X-100	0,22±0,10	0,22±0,14	0,33±0,04	0,29±0,07
1	0,22±0,14	0,42±0,03	0,38±0,04	0,49±0,06
4	0,26±0,11	0,40±0,04	0,36±0,02	0,51±0,08
7	0,38±0,07	0,40±0,04	0,49±0,03	0,56±0,06
10	0,32±0,08	0,43±0,05	0,44±0,04	0,54±0,07
13	0,28±0,09	0,42±0,07	0,48±0,06	0,54±0,09
16	0,27±0,09	0,51±0,05	0,47±0,04	0,53±0,08
19	0,25±0,13	0,49±0,05	0,45±0,03	0,48±0,08
22	0,36±0,05	0,34±0,02	0,40±0,04	0,46±0,06
25	0,36±0,05	0,46±0,08	0,50±0,05	0,52±0,06
28	0,22±0,14	0,44±0,03	0,42±0,04	0,48±0,05

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](#)