

Anisotropia de fluorescência da sonda AHBA em lipossomas de misturas lipídicas e contendo colesterol

Fluorescence anisotropy of the AHBA probe in liposomes of lipid mixtures and in liposomes containing cholesterol

Bruna E. D. Mucke¹ , Cássia A. Marquezin¹ 

¹Instituto de Física / Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

Resumo

Sondas fluorescentes hidrofóbicas no estudo de membranas modelo têm sido amplamente utilizadas, pois apresentam dinâmicas rotacionais diferentes para diversos ambientes lipídicos, sendo capazes de monitorar a fluidez da bicamada lipídica e os mecanismos dependentes deste fator. Entretanto, a eficácia do uso de sondas fluorescentes anfipáticas deve ser avaliada uma vez que a localização dessas sondas na membrana pode causar uma falha no monitoramento do empacotamento das cadeias graxas. Foram apresentados, neste trabalho, resultados da fluorescência estática da sonda AHBA (2-Amino-N-hexadecilbenzamida) utilizada em estudos do comportamento de fase de vesículas lipídicas (lipossomas) formadas por misturas lipídicas e contendo colesterol. Foram variados, na produção dos lipossomas, o comprimento da cadeia hidrocarbônica dos lipídeos, bem como o tipo de cabeça polar: fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG). Parâmetros como intensidade de fluorescência, deslocamento espectral e anisotropia estática foram obtidos para o AHBA, inserido nas diferentes bicamadas lipídicas. A anisotropia estática se mostrou o parâmetro mais adequado no monitoramento da transição da fase gel para a fase fluida da bicamada, detectando ainda a presença de colesterol no sistema, enquanto os resultados de deslocamento espectral mostraram que o AHBA possui baixa sensibilidade a alterações de polaridade discretas no ambiente ao seu redor.

Palavras-chave: fluorescência; biofísica; lipossomas; misturas lipídicas; colesterol.

Abstract

Hydrophobic fluorescent probes have been widely used to study model membranes, as they present different rotational dynamics for different lipid environments, being able to monitor the fluidity of a lipid bilayer and the mechanisms dependent on this factor. However, the effectiveness of using amphipathic fluorescent probes must be evaluated since the location of these probes in the membrane can cause failure in monitoring the packing of the fatty chains. In this work, steady state fluorescence results from the AHBA probe (2-Amino-N-hexadecylbenzamide) were presented; AHBA was used to monitor the phase behavior of lipid vesicles (liposomes) formed by lipid mixtures and containing cholesterol. In the production of liposomes, the length of the hydrocarbon chain of lipids was varied, as well as the type of polar head: phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylglycerol (PG). Parameters such as fluorescence intensity, spectral shift and static anisotropy were obtained for AHBA, inserted into these several lipid bilayers. Static anisotropy proved to be the most appropriate parameter for monitoring the transition from the gel phase to the fluid phase of the bilayer, while also detecting the presence of cholesterol in the system. The spectral shift results showed that AHBA has low sensitivity to discrete polarity changes in the surrounding environment.

Keywords: fluorescence; biophysics; liposomes; lipid mixtures; cholesterol.

1. Introdução

A membrana celular regula o acesso das mais variadas substâncias ao interior de uma célula; é, ao mesmo tempo, flexível e resistente; de modo seletivo é permeável a solutos polares, comportando diversificada gama de proteínas transmembrana. Compreender seu funcionamento, do ponto de vista biológico e estrutural, é fundamental para a elucidação do mecanismo de ação de compostos com atividade anticâncer, antiparasitária, antiviral etc. bem como para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de atuar em membranas. Dada a complexidade natural das membranas celulares, sistemas modelos como micelas de surfactantes e vesículas fosfolipídicas são amplamente utilizados em estudos biofísicos e bioquímicos (1–5).

Vesículas fosfolipídicas (ou lipossomas) são constituídas de lipídeos, uma classe de moléculas insolúveis em água e que, em nosso organismo, desempenham papéis cruciais como cofatores

enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem radiação luminosa, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes e mensageiros intracelulares (5–8). Um lipossoma possui uma bicamada fosfolipídica, cuja formação e estrutura se devem à interação hidrofóbica entre os fosfolipídeos e à interação hidrofílica destes com o ambiente aquoso ao redor. A estrutura final é esférica e encerra água em seu interior.

A bicamada lipídica apresenta comportamento de fase em função da temperatura do meio (9). Na fase gel (fase ordenada) os fosfolipídeos se apresentam com maior ordenação, cabeças polares mais próximas umas das outras e caudas apolares bem compactadas; diz-se que a rigidez da bicamada é alta na fase gel. Ao superar determinada temperatura (temperatura de transição de fase), que depende do grupo existente na cabeça polar dos lipídeos, do comprimento das cadeias graxas e do grau de saturação destas, a bicamada passa para a fase líquido-cristalina (fase desordenada), onde a área

média por cabeça polar aumenta, a espessura da bicamada lipídica diminui e a fluidez é aumentada na região das cadeias graxas (10–12). Para alguns tipos de lipídeos a bicamada apresenta ainda uma fase assimétrica, chamada fase *ripple* (13–15), intermediária entre as fases ordenada e desordenada. Além do comportamento de fase, as bicamadas lipídicas sofrem alteração em sua fluidez na presença de pequenas moléculas na região das cadeias graxas ou mesmo na região das cabeças polares. Neste contexto, a molécula de colesterol tem sido amplamente utilizada neste tipo de estudo, pois altera as propriedades dinâmicas tanto da fase gel quanto da fase líquido-cristalina (7).

Inúmeras técnicas experimentais têm sido utilizadas no estudo das propriedades dinâmicas de bicamadas lipídicas (16–20), fornecendo informações sobre localização (21,22), organização (23–25) e deslocamento lateral (26,27) de pequenas moléculas na superfície do lipossoma, além de monitorar a fluidez do sistema (28,29). Dentre tais técnicas, temos a anisotropia de fluorescência, que informa acerca da fluidez da bicamada lipídica e monitora com precisão seu comportamento de fase (30).

A anisotropia consiste na excitação fotoseletiva de moléculas por luz polarizada. Tais moléculas absorvem preferencialmente fótons cujos vetores elétricos estão alinhados paralelamente ao seu momento de transição, o qual possui orientação definida em relação ao eixo molecular. A excitação seletiva resulta na emissão fluorescente também parcialmente polarizada.

O monitoramento da organização lipídica em lipossomas via anisotropia de fluorescência é possível a partir do conhecimento de propriedades de emissão de moléculas fluorescentes (fluoróforos) que dependem do ambiente em que estas se encontram. A anisotropia permite a análise do movimento rotacional de fluoróforos e de possíveis restrições a este movimento, geralmente impostas pelo próprio meio. Fluoróforos de diferentes estruturas, anfipáticos ou completamente apolares, têm sido empregados com sucesso no estudo de bicamadas fosfolipídicas (31–33). O difenil-hexatrieno (DPH) e seus análogos aniônicos e catiônicos são as sondas fluorescentes mais utilizadas em estudos da fluidez de bicamadas lipídicas, permitindo obter informações de diferentes profundidades na região das cadeias graxas (34,35).

Uma sonda fluorescente de membranas relativamente nova, o 2-amino-N-hexadecil-benzamida (AHBA), vem sendo bastante utilizada no estudo de propriedades dinâmicas de agregados anfifílicos, como micelas de surfactantes e lipossomas (25,32,36). Técnicas de fluorescência como transferência de energia por ressonância (FRET) e supressão de fluorescência mostram que a sonda se posiciona com seu anel benzeno entre as cabeças polares dos fosfolipídeos enquanto sua cadeia graxa de 16 carbonos se insere na região apolar da bicamada (16,24). O AHBA também é sensível a alterações no pH do meio, bem como

apresenta deslocamento espectral em solventes com diferentes polaridades (36).

Desta forma, com o objetivo de investigar melhor a eficiência da sonda AHBA no monitoramento do comportamento de fase de bicamadas lipídicas através da anisotropia de fluorescência, apresentamos neste trabalho resultados inéditos de experimentos contendo lipossomas produzidos com diferentes tipos de fosfolipídeos, puros e em misturas. Os resultados apresentados para o AHBA na literatura são sempre em presença de vesículas lipídicas produzidas com o fosfolipídeo 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocoline (DMPC) (24,32,36). Neste trabalho outros lipídeos foram utilizados, variando-se o comprimento da cadeia hidrocarbônica, no caso das fosfatidilcolinas, e também utilizando-se o 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho(1'-rac-glycerol) (DPPG), uma vez que os lipídeos contendo fosfatidilglicerol (PG) são os fosfolipídeos aniônicos mais abundantes na composição das membranas naturais de fungos e bactérias. Por fim, também foram feitos experimentos com a inserção de colesterol em lipossomas de DMPC, revelando baixa sensibilidade do AHBA no monitoramento das alterações na fluidez da região das cadeias graxas, sobretudo na fase desordenada das bicamadas.

2. Materiais e Métodos

Experimentos de fluorescência foram feitos em um espectrofluorímetro F-7000, da Hitachi, disponível no laboratório de Biofísica do Instituto de Física da UFG. A sonda fluorescente AHBA foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Amando S. Ito, da FFCLRP - USP de Ribeirão Preto e sua estrutura molecular é apresentada na Figura 1.

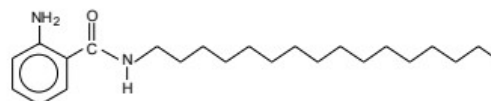


Figura 1. Estrutura molecular da sonda fluorescente AHBA.

Os lipídeos utilizados e o colesterol foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA) e são eles: 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocoline (DLPC); 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocoline (DPPC); 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocoline (DMPC); 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho(1'-rac-glycerol) (DPPG). O tampão HEPES foi adquirido da Sigma Aldrich.

Vesículas lipídicas foram preparadas segundo o método de extrusão (37), utilizando-se um *mini-extruder* da Avanti Polar Lipids. Os filmes lipídicos foram formados a partir de lipídeos dissolvidos em clorofórmio, num tubo de ensaio; nesta etapa também foram adicionados a sonda AHBA e o colesterol, quando pertinente. Com o tubo de ensaio sobre um agitador de tubos, utilizou-se um fluxo de nitrogênio para evaporação rápida do solvente. Após essa etapa, os filmes foram mantidos em atmosfera de pressão reduzida pelo tempo mínimo de oito horas, para eliminação completa do solvente utilizado. Em

seguida, os filmes lipídicos foram estocados em baixas temperaturas (-18 °C) até o momento do experimento. Para tanto, suspendeu-se o filme lipídico em uma solução tampão HEPES 10 mM (pH 7,4) utilizando-se um agitador de tubos promovendo, desta forma, a formação de vesículas multilamelares. A solução contendo as vesículas multilamelares foi filtrada (por 21 vezes) através de membranas de polycarbonato (da Millipore), resultando em vesículas unilamelares cujo diâmetro é de 0.1 µm (38–40). Este último processo se dá em temperaturas acima da temperatura de transição de fase dos lipídeos em questão.

Em todos os experimentos de fluorescência, o comprimento de onda de excitação foi $\lambda_{exc} = 330$ nm, correspondente ao máximo de absorção do AHBA inserido em bicamadas fosfolipídicas. Nos experimentos de anisotropia, a intensidade de fluorescência foi obtida em $\lambda_{em} = 402$ nm, correspondendo ao máximo de emissão do AHBA. Os valores de anisotropia apresentados neste trabalho equivalem à média de três valores.

2.1. Equações

A anisotropia estática r (30) foi obtida a partir de dados experimentais, conforme a equação (1) a seguir:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (1)$$

onde o fator de correção G é dado por:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2)$$

I_{VV} e I_{VH} são as intensidades de fluorescência com excitação polarizada na vertical e emissão na vertical e horizontal, respectivamente. I_{HV} e I_{HH} são as intensidades de fluorescência com excitação polarizada na horizontal e emissão na vertical e horizontal, respectivamente. O fator G é necessário para corrigir a diferente sensibilidade da fotomultiplicadora à luz polarizada na vertical e à luz polarizada na horizontal.

Valores de r maiores são observados para sondas fluorescentes com movimentação restrita, enquanto valores baixos de r representam alta mobilidade da molécula, situação em que esta despolariza quase completamente a luz polarizada proveniente da excitação.

3. Resultados e Discussão

Os experimentos foram realizados de modo a se ter diferentes proporções de fosfolipídeos compondo um mesmo lipossoma. Foram utilizadas misturas de dois tipos de fosfolipídeos, variando-se o comprimento da cadeia hidrocarbônica e/ou a cabeça polar. Diferentes comprimentos de cadeias hidrocarbônicas implicam em diferentes temperaturas de transição de fase. No caso do fosfolipídeo com carga negativa, o DPPG, este foi utilizado aqui pela grande importância de se estudar modelos de biomembranas carregados

negativamente, uma vez que a maioria das membranas naturais possuem carga líquida negativa.

São apresentados, na Figura 2, os resultados de anisotropia do AHBA incorporado em lipossomas produzidos com diferentes proporções dos fosfolipídeos DLPC e DPPC, que possuem, respectivamente, 12 e 16 carbonos na cadeia graxa.

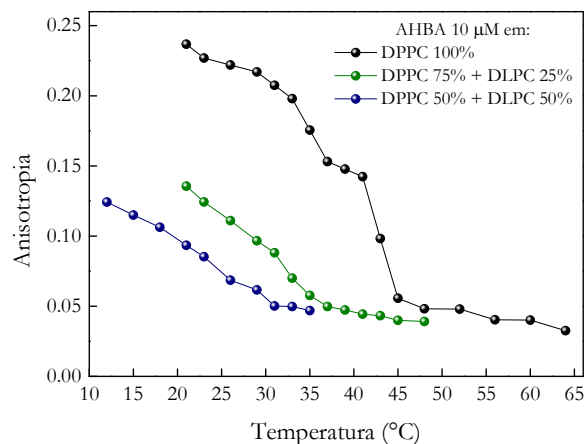


Figura 2. Gráfico da anisotropia do AHBA 10 µM em diferentes misturas de DLPC e DPPC na concentração de 0,5 mM.

As cabeças polares do DLPC e do DPPC são idênticas (fosfatidilcolina). A transição de fase do DLPC puro ocorre em 1°C, enquanto a transição de fase principal do DPPC puro ocorre em 41°C (41). É possível observar, em aproximadamente 35 °C, a transição da fase ordenada para a fase *ripple* do DPPC, evidenciando a eficiência da anisotropia do AHBA na detecção do comportamento de fase da bicamada (42). No caso das curvas verde e azul, a transição de fase não pode ser observada claramente. Devido às limitações experimentais do aparato utilizado nas medidas de anisotropia de fluorescência, não foi possível realizar medidas em temperaturas menores do que 12 °C, impossibilitando a obtenção da curva de transição de fase do DLPC puro.

Ao misturar-se 50% de cada lipídeo (curva azul), esperava-se que a temperatura de transição da mistura fosse observada em ~ 20 °C, ou seja, a média das temperaturas de transição de fase de ambos os lipídeos. A mesma situação ocorreu na mistura de 25% de DLPC e 75% de DPPC (curva verde). Na mesma linha de raciocínio, esperava-se uma transição de fase pronunciada em torno de ~ 31°C, considerando-se as proporções de cada lipídeo. No entanto, os resultados mostraram que o DLPC parece influenciar muito mais a temperatura de transição da mistura do que o DPPC, deslocando-a para temperaturas menores do que a média esperada. Observou-se ainda que o DLPC provocou fluidificação considerável da fase gel, sem alteração significativa dos valores de anisotropia na fase líquido-cristalina, ou seja, a presença de DLPC permite maior movimentação das caudas hidrocarbônicas da mistura na fase gel, diminuindo o empacotamento destas e aumentando a fluidez na região das cabeças polares, onde se localiza o AHBA. Além disso, misturas lipídicas binárias, onde as

cadeias graxas dos dois lipídeos possuem uma diferença de mais de 4 carbonos, chamadas misturas não ideais, apresentam transição de fase mais complexa, podendo se observar mais de uma transição (43–45). O fato da mistura DLPC/DPPC não ser ideal, torna demasiado complexa a detecção exata da região de transição de fase.

A próxima mistura estudada foi de fosfolipídeos com igual comprimento da cadeia carbônica (16 carbonos), mas com cabeças polares distintas. O gráfico da Figura 3 mostra a anisotropia do AHBA para misturas de DPPG (aniônico) e DPPC.

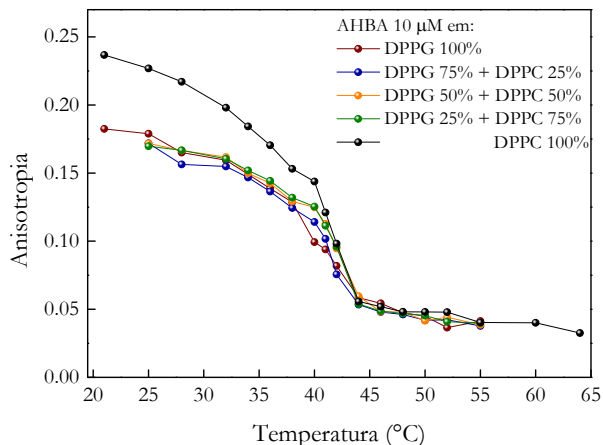


Figura 3. Gráfico da anisotropia do AHBA 10 µM em diferentes misturas de DPPG e DPPC em concentrações de 0,5 mM.

Devido à carga líquida negativa na cabeça polar do DPPG (fosfatidilglicerol), os valores de anisotropia do AHBA são menores na fase gel das misturas, em relação à curva do DPPC puro (curva preta), uma vez que as cabeças polares estão mais distantes umas das outras devido à repulsão Coulombiana. Maior espaçamento entre as cabeças polares implica em maior movimentação da sonda AHBA, diminuindo assim, sua anisotropia estática.

Observa-se, do gráfico da Figura 3, que todas as misturas entre os dois lipídeos, bem como o DPPG puro, apresentam transição de fase em temperaturas muito semelhantes, uma vez que as temperaturas de transição de cada lipídeo possuem valores muito próximos (41). Os resultados obtidos coincidem com os esperados pois a transição de fase do DPPC se dá na faixa dos 41°C bem como a transição de fase do DPPG (41,46). Na transição de fase do DPPC ($C_{40}H_{80}NO_8P$) e do DPPG ($C_{38}H_{74}O_{10}PNa$), assim como para outros lipídeos, as ligações C-C mudam de conformação, rotacionando 120°, ficando em estado relativamente desordenado na fase fluida. Na fase gel, as cadeias hidrocarbônicas rígidas (na conformação *trans*) são atraídas fortemente entre si pelas forças de interação de van der Waals, caracterizando alto empacotamento molecular. Na fase desordenada ocorre o afrouxamento do empacotamento molecular, atribuído fundamentalmente às isomerizações *trans* → *gauche* induzidas termicamente de ligações simples C-C ao longo das cadeias acil (41). Acima da transição de fase observa-se um equilíbrio entre conformações *gauche* e *trans*, e as flutuações lipídicas contribuirão

para um aumento da entropia, aumentando a mobilidade da sonda fluorescente inserida na bicamada.

Por fim, foram preparados lipossomas contendo somente fosfatidilcolinas como cabeça polar, com diferentes comprimentos de cadeias graxas. Os lipídeos utilizados foram DMPC (14 carbonos) e DPPC (16 carbonos). A Figura 4 mostra os resultados de anisotropia do AHBA para a transição de fase das diferentes misturas.

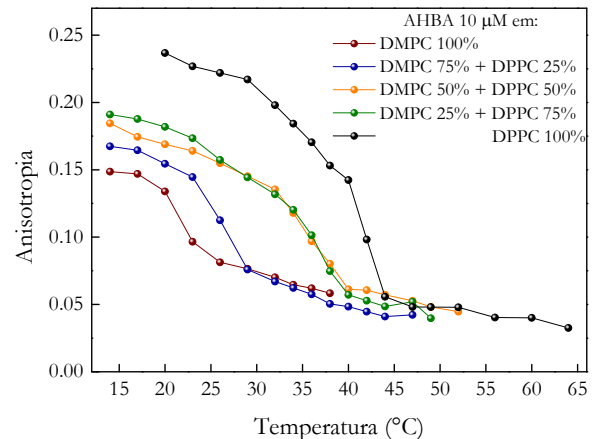


Figura 4. Gráfico da anisotropia do AHBA 10 µM em diferentes misturas de DMPC e DPPC em concentrações de 0,5 mM.

Os resultados obtidos estão em bom acordo com os resultados apresentados na literatura, uma vez que o DMPC tem a sua transição de fase em 23°C (12,47) e o DPPC em 41°C (41). As misturas lipídicas também se comportaram conforme o esperado, sendo a transição de fase mais próxima dos 41°C quando o lipídeo predominante foi o DPPC e mais próxima dos 23°C quando o lipídeo predominante foi o DMPC. Para a mistura contendo 50% de cada lipídeo, a transição de fase foi observada na média das duas temperaturas de transição, bem como a mistura DMPC 25% e DPPC 75%. Uma possível explicação para estas duas últimas curvas serem praticamente idênticas está relacionada com o 'vazio' provocado na região das cadeias graxas devido às regiões de DMPC agrupados, já acima de sua temperatura de transição de fase. O agrupamento das moléculas de DMPC ocorre quando a proporção molar de DMPC fica menor que 50% em relação ao DPPC; tais vazios (defeitos) permitem que as cadeias hidrocarbônicas alcancem maior mobilidade, e a temperatura de transição de fase da mistura fica menor do que a temperatura de transição do DPPC puro (48–50).

Durante a realização das medidas de anisotropia de fluorescência em função da temperatura, também foram obtidos os respectivos espectros de emissão do AHBA. No âmbito da fluorescência de estado estacionário, variações na intensidade de emissão e deslocamento espectral podem fornecer informações importantes a respeito do ambiente ao redor da sonda fluorescente (30). No entanto, como mostra o gráfico da Figura 5, o deslocamento no máximo de emissão

do AHBA em função da temperatura do meio não reflete a transição de fase da bicamada lipídica.

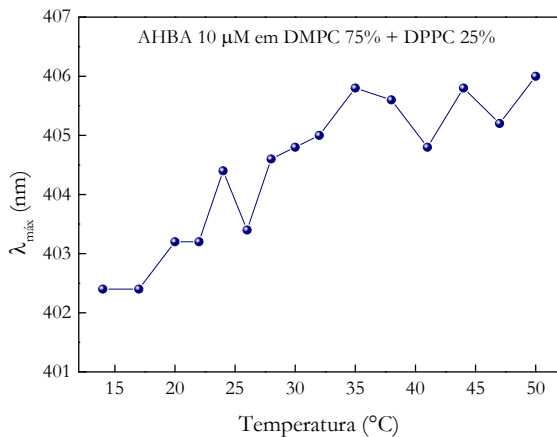


Figura 5. Deslocamento espectral na emissão do AHBA 10 μ M em mistura contendo 75% de DMPC e 25% de DPPC, na concentração de 0,5 mM.

Deslocamentos espectrais semelhantes foram obtidos para as demais misturas lipídicas estudadas neste trabalho (resultados não mostrados). Da mesma forma, as variações na intensidade de fluorescência não refletiram a transição de fase das bicamadas.

O deslocamento para o vermelho do máximo de emissão do AHBA em função do aumento da temperatura do sistema está de acordo com os resultados já apresentados na literatura para o AHBA em presença de solventes com polaridades distintas (32,36). Conforme aumenta-se a temperatura do sistema e aumenta-se a distância média entre as cabeças polares dos lipídeos na bicamada, moléculas de água acessam mais facilmente a região das cabeças polares; o aumento no número de moléculas de água nesta região torna o meio mais polar em relação à mesma região na fase gel, fazendo com que a emissão do AHBA se desloque para maiores comprimentos de onda com o aumento da temperatura.

A Tabela 1 mostra conjuntamente as temperaturas de transição de fase obtidas para cada mistura lipídica, bem como para as amostras de lipídeos puros. Cada temperatura de transição foi obtida por meio da derivação da curva da anisotropia em função da temperatura do sistema (51): o ponto de inflexão da curva é igual à temperatura de transição de fase.

Embora o AHBA se localize na região das cabeças polares dos fosfolipídeos, se mostrou bastante eficiente no monitoramento da transição de fase das misturas lipídicas estudadas, uma vez que os dados apresentados na tabela 1 são compatíveis com valores encontrados na literatura, obtidos com sondas fluorescentes posicionadas na região das cadeias graxas, como é o caso do DPH (34,35), ou ainda obtidos através da metodologia de marcadores de spin (21,35–37), amplamente utilizada através da técnica experimental de Ressonância de Spin Eletrônico (19).

Tabela 1. Temperatura de transição de fase das misturas lipídicas correspondentes ao ponto de inflexão da derivada da curva de anisotropia em função da temperatura

Misturas	Temperatura de transição	Inflexão da derivada
DMPC(100%)	23°C	-0,008585 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DMPC(75%)+DPPC(25%)	26°C	-0,01144 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DMPC(50%)+DPPC(50%)	35°C	-0,00952 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DMPC(25%)+DPPC(75%)	37°C	-0,01123 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DPPC(100%)	41°C	-0,02278 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DLPC(25%)+DPPC(75%)	33°C	-0,00762 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DPPG(100%)	42°C	-0,01186 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DPPG(75%)+DPPC(25%)	40°C	-0,01891 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DPPG(50%)+DPPC(50%)	41°C	-0,0178 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)
DPPG(25%)+DPPC(75%)	41°C	-0,01824 ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)

Fonte: as autoras (2024)

Conforme resultados de fluorescência com resolução temporal, o AHBA possui dois tempos de correlação rotacional (36). O tempo longo, que vai de 12,0 ns na fase gel para 4,5 ns na fase líquido cristalina, é associado ao movimento da sonda como um todo. O tempo curto, variando entre 0,1 ns e 0,3 ns é atribuído ao movimento individual do anel benzeno, que é o grupo fluorescente da molécula. Desta forma, é possível concluir que a inserção da cadeia graxa do AHBA na região das cadeias graxas da bicamada reflete, com confiabilidade, o grau de empacotamento e organização destas últimas, uma vez que a movimentação da cadeia graxa do AHBA contribui para os valores de anisotropia estática do grupo fluorescente da molécula.

Adição de colesterol nos lipossomas de DMPC

Prosseguindo com o objetivo de estudar a eficiência do AHBA no monitoramento da transição de fase de lipossomas e compará-la à eficiência de sondas fluorescentes já bem estabelecidas na literatura, foram realizados experimentos com adição de diferentes concentrações de colesterol em lipossomas unilamelares de DMPC a 0,5 mM. A molécula de colesterol é anfipática (7), possuindo como grupo polar uma hidroxila, e se insere na região das cadeias hidrocarbônicas; atua fluidificando a fase gel e enrijecendo a fase fluida (54,55), de modo que a diferença entre os valores de anisotropia de ambas as fases se torne menor com a adição de colesterol no sistema.

No gráfico da Figura 6 são mostrados os resultados de anisotropia do AHBA inserido em vesículas de DMPC com diferentes concentrações de colesterol.

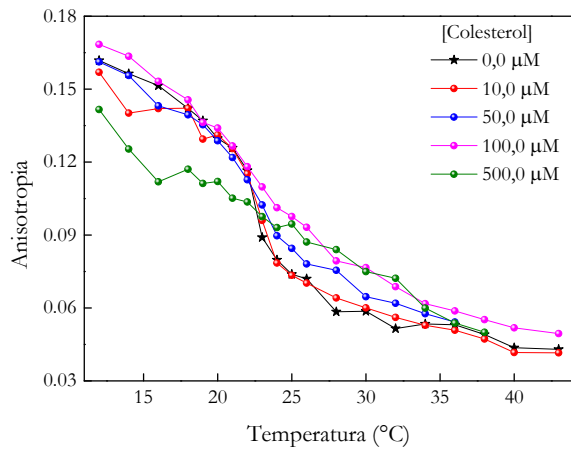


Figura 6. Gráfico da anisotropia do AHBA 10 μM em DMPC 0,5 mM com diferentes concentrações de colesterol.

Comparando as curvas com círculos coloridos à curva controle (estrela preta), observa-se o aumento dos valores de anisotropia na fase desordenada, a partir de 50 μM de colesterol no sistema. Já na fase ordenada, somente a maior concentração de colesterol diminuiu significativamente a anisotropia do AHBA, em relação ao controle. Analisando as curvas em todo o intervalo de temperatura estudado, é possível notar suavização na transição de fase, ou seja, a região de temperaturas em que ocorre a transição da fase gel para a fase líquido-cristalina sofre um alargamento. A suavização é leve, mas perceptível, para 50 μM de colesterol, e bem expressiva para as concentrações de 100 μM e 500 μM .

Analisando a posição em que o AHBA se insere na bicamada lipídica, é esperado que na fase líquido-cristalina sua sensibilidade à mobilidade das cadeias graxas seja maior, uma vez que a área por cabeça polar aumenta, abrindo espaço para a movimentação do AHBA. Já na fase gel, apesar da presença de moléculas de colesterol diminuindo a atração mútua entre as cadeias graxas, a região das cabeças polares ainda se mantém relativamente organizada, restringindo a movimentação do grupo fluorescente do AHBA e diminuindo sua sensibilidade à presença do colesterol.

Apresentamos, por fim, os espectros de fluorescência do AHBA em DMPC, obtidos em temperatura ambiente, para cada concentração de colesterol no sistema. A figura 7 mostra os espectros normalizados.

A normalização mostra que não há qualquer alteração espectral na emissão do AHBA quando da adição de colesterol nos lipossomas de DMPC, considerando uma temperatura fixa do sistema. Pode-se concluir que a adição de colesterol não altera a quantidade de moléculas de água na região das cabeças polares de modo suficiente a causar deslocamento espectral na emissão do AHBA. Tal deslocamento espectral somente é observado quando do aumento da temperatura do sistema.

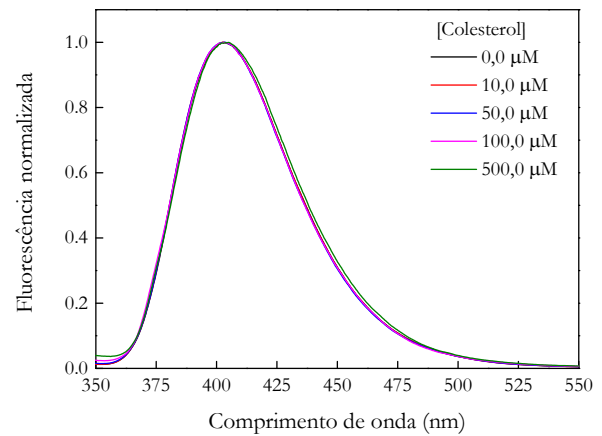


Figura 7. Espectros de emissão normalizados do AHBA 10 μM em DMPC 0,5 mM para diferentes concentrações de colesterol. O comprimento de onda de excitação foi 330 nm e a temperatura, 25 $^{\circ}\text{C}$.

Essa é uma característica específica do AHBA: baixa sensibilidade à polaridade do meio ao redor. Nesse sentido, sondas há que, posicionadas na região das cabeças polares, monitoram com precisão o comportamento de fase de bicamadas lipídicas através do deslocamento espectral na emissão e variações na intensidade de fluorescência (33,56–59), sendo, portanto, capazes de detectar a mínima alteração de polaridade no meio ao redor. Fica evidente que, dentre os parâmetros obtidos da fluorescência estática do AHBA, a anisotropia é o mais indicado e confiável para monitorar o comportamento de fase de lipossomas neutros, aniônicos, com incorporação de colesterol e de misturas lipídicas binárias, uma vez que variações na intensidade de emissão e deslocamento espectral não foram observadas ao longo do intervalo de temperaturas estudado neste trabalho.

4. Conclusões

Dos resultados expostos, concluímos que a sonda fluorescente AHBA, de caráter anfipático, monitora com boa confiabilidade a transição de fase de bicamadas lipídicas através de sua anisotropia de fluorescência estática. No entanto, a sensibilidade do grupo fluorescente da molécula, o anel benzeno, a alterações discretas na polaridade do meio ao redor não foi suficiente para provocar deslocamento espectral ou variações na intensidade capazes de refletir a transição de fase. Conforme já apresentado em trabalhos anteriores, o AHBA se localiza na região das cabeças polares dos fosfolípidios (24,32,36). Desta forma, a comparação dos resultados de anisotropia do AHBA inserido em lipossomas com diferentes grupos nas cabeças polares evidenciou sua localização nesta região da bicamada lipídica, uma vez que os valores de anisotropia na fase gel dos lipossomas constituídos de DPPG (aniônico) puro foram menores que os valores de anisotropia para os lipossomas constituídos de lipídeos do tipo PC, nos quais as cabeças polares não se repelem e estão mais compactadas, restringindo a movimentação do AHBA e, conseqüentemente, aumentando seus valores de anisotropia. A fluidificação aumentada da

bicamada lipídica devido à presença de lipídeos com cadeias hidrocarbônicas curtas (DLPC) foi bem percebida pelo AHBA, através da diminuição considerável dos seus valores de anisotropia. Nos lipossomas contendo diferentes concentrações de colesterol, o AHBA mostrou-se eficiente ao refletir com exatidão o alargamento da faixa de temperaturas onde ocorre a transição de fase. No entanto, somente para a concentração de 500 μM de colesterol, onde, devido à razão molar entre colesterol e DMPC, existe apenas uma fase, denominada fase líquido-ordenada, os valores de anisotropia foram significativamente menores nas temperaturas abaixo de 23 °C (60).

Agradecimentos

As autoras agradecem ao prof. Dr. Antonio Alonso do IF-UFG, à profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy, do IFUSP e à Universidade Federal de Goiás.

Referências

- Björnestad VA, Lund R. Pathways of Membrane Solubilization: A Structural Study of Model Lipid Vesicles Exposed to Classical Detergents. *Langmuir* [Internet]. 2023 Mar 21;39(11):3914–33. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.2c03207>
- Frallicciardi J, Melcr J, Siginou P, Marrink SJ, Poolman B. Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nat Commun* [Internet]. 2022 Mar 25;13(1):1605. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29272-x>
- Mardešić I, Boban Z, Subczynski WK, Raguz M. Membrane Models and Experiments Suitable for Studies of the Cholesterol Bilayer Domains. *Membranes (Basel)* [Internet]. 2023 Mar 10;13(3):320. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0375/13/3/320>
- Clifton LA, Campbell RA, Sebastiani F, Campos-Terán J, Gonzalez-Martinez JF, Björklund S, et al. Design and use of model membranes to study biomolecular interactions using complementary surface-sensitive techniques. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2020 Mar;277:102118. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868619304440>
- Chan Y-HM, Boxer SG. Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2007 Dec;11(6):581–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593107001457>
- Karaz S, Senses E. Liposomes Under Shear: Structure, Dynamics, and Drug Delivery Applications. *Adv NanoBiomed Res* [Internet]. 2023 Apr 5;3(4). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anbr.202200101>
- Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Sixth Edit. New York: artmed; 2014.
- Sharma A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm* [Internet]. 1997 Aug 26;154(2):123–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851739700135X>
- Heimburg T. *Thermal Biophysics of Membranes*. Thermal Biophysics of Membranes. Weinheim: Wiley; 2007. 1–361 p.
- Kučerka N, Nieh M-P, Katsaras J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2011 Nov;1808(11):2761–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273611002276>
- Pencer J, Nieh M-P, Harroun TA, Krueger S, Adams C, Katsaras J. Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: A small-angle neutron scattering study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2005 Dec;1720(1–2):84–91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273605003421>
- Katsaras J, Gutberlet T. *Lipid Bilayers: Structure and Interactions*. Berlin: Springer-Verlag Berlin; 2001.
- Davies M, Reyes-Figueroa AD, Gurtovenko AA, Frankel D, Karttunen M. Elucidating lipid conformations in the ripple phase: Machine learning reveals four lipid populations. *Biophys J* [Internet]. 2023 Jan;122(2):442–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349522009407>
- Akabori K, Nagle JF. Structure of the DMPC lipid bilayer ripple phase. *Soft Matter* [Internet]. 2015;11(5):918–26. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4SM02335H>
- Riske KA, Barroso RP, Vequi-Suplicy CC, Germano R, Henriques VB, Lamy MT. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(5):954–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2009.01.007>
- Marquezin CA, Lamy MT, de Souza ES. Molecular collisions or resonance energy transfer in lipid vesicles? A methodology to tackle this question. *J Mol Liq* [Internet]. 2021 Nov;341:117405. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732221021292>
- Sánchez JM, del V. Turina A, Perillo MA. Spectroscopic probing of ortho-nitrophenol localization in phospholipid bilayers. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2007 Nov;89(1):56–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134407001261>
- Nagle JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*. 2000.
- Marsh D. Electron spin resonance: spin labels. In: Grell E, editor. *Molecular biology biochemistry and biophysics: membrane spectroscopy*. New York: Springer Berlin Heidelberg; 1981. p. 51–142.
- Grell E, editor. *Membrane Spectroscopy* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1981. (Molecular Biology Biochemistry and Biophysics; vol. 31). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-81537-9>
- Singh MK, Khan MF, Shweta H, Sen S. Probe-location dependent resonance energy transfer at lipid/water interfaces: comparison between the gel- and fluid-phase of lipid bilayer. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2017;19(38):25870–85. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7CP03108D>
- Amaro M, Filipe HAL, Prates Ramalho JP, Hof M, Loura LMS. Fluorescence of nitrobenzoxadiazole (NBD)-labeled lipids in model membranes is connected not to lipid mobility but to probe location. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2016;18(10):7042–54. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CP05238F>
- Bagatolli LA, Ipsen JH, Simonsen AC, Mouritsen OG. An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog Lipid Res*. 2010;49(4):378–89.
- Marquezin CA, Ito AS, de Souza ES. Organization and dynamics of NBD-labeled lipids in lipid bilayer analyzed by FRET using the small membrane fluorescent probe AHBA as donor. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2019;1861(10):182995. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2019.05.017>
- Marquezin CA, de Oliveira CMA, Vandresen F, Duarte EL, Lamy MT, Vequi-Suplicy CC. The interaction of a thiosemicarbazone derived from R - (+) - limonene with lipid membranes. *Chem Phys Lipids* [Internet].

- 2021;234(September 2020):105018. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105018>
26. Tretiakova DS, Alekseeva AS, Galimzyanov TR, Boldyrev AM, Chernyadyev AY, Ermakov YA, et al. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2018 Nov;1860(11):2337–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273618301627>
 27. Loura L. Lateral Distribution of NBD-PC Fluorescent Lipid Analogs in Membranes Probed by Molecular Dynamics-Assisted Analysis of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) and Fluorescence Quenching. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Nov 8;13(12):14545–64. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/14545>
 28. Alonso L, Mendanha SA, Marquezin CA, Berardi M, Ito AS, Acuña AU, et al. Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. *Int J Pharm*. 2012;434(1–2):391–8.
 29. Mendanha SA, Marquezin CA, Ito AS, Alonso A. Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: A probe EPR and fluorescence spectroscopy study. *Int J Pharm* [Internet]. 2017 Oct;532(1):547–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317309122>
 30. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition, Joseph R. Lakowicz, editor. Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006. 2006. 954 p.
 31. Leung SSW, Brewer J, Bagatolli LA, Thewalt JL. Measuring molecular order for lipid membrane phase studies: Linear relationship between Laurdan generalized polarization and deuterium NMR order parameter. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2019 Dec;1861(12):183053. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273619301993>
 32. Vequi-Suplicy CC, Lamy MT, Marquezin C a. The new fluorescent membrane probe Ahba: A comparative study with the largely used Laurdan. *J Fluoresc*. 2013;23(3):479–86.
 33. Lúcio AD, Vequi-Suplicy CC, Fernandez RM, Lamy MT. Laurdan Spectrum Decomposition as a Tool for the Analysis of Surface Bilayer Structure and Polarity: a Study with DMPG, Peptides and Cholesterol. *J Fluoresc* [Internet]. 2010 Mar 17;20(2):473–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-009-0569-5>
 34. Poojari C, Wilkosz N, Lira RB, Dimova R, Jurkiewicz P, Petka R, et al. Behavior of the DPH fluorescence probe in membranes perturbed by drugs. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2019 Sep;223:104784. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308419300258>
 35. Lakowicz JR, Prendergast FG. Quantitation of hindered rotations of diphenylhexatriene in lipid bilayers by differential polarized phase fluorometry. *Science* (80-). 1978;200(4348).
 36. Marquezin CA, Hirata IY, Juliano L, Ito AS. Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes. *Biophys Chem* [Internet]. 2006 Nov;124(2):125–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462206002055>
 37. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *BBA - Biomembr*. 1985;812(1):55–65.
 38. Kunding AH, Mortensen MW, Christensen SM, Stamou D. A Fluorescence-Based Technique to Construct Size Distributions from Single-Object Measurements: Application to the Extrusion of Lipid Vesicles. *Biophys J* [Internet]. 2008 Aug;95(3):1176–88. Available from:
 39. McIntyre JC, Sleight RG. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* [Internet]. 1991 Dec 1;30(51):11819–27. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00115a012>
 40. Enoki TA, Henriques VB, Lamy MT. Light scattering on the structural characterization of DMPG vesicles along the bilayer anomalous phase transition. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2012 Dec;165(8):826–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000930841200120X>
 41. Huang C, Li S. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* [Internet]. 1999 Nov;1422(3):273–307. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273699000991>
 42. Kaasgaard T, Leidy C, Crowe JH, Mouritsen OG, Jørgensen K. Temperature-Controlled Structure and Kinetics of Ripple Phases in One- and Two-Component Supported Lipid Bilayers. *Biophys J* [Internet]. 2003 Jul;85(1):350–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349503744798>
 43. Bagatolli LA, Gratton E. A Correlation between Lipid Domain Shape and Binary Phospholipid Mixture Composition in Free Standing Bilayers: A Two-Photon Fluorescence Microscopy Study. *Biophys J* [Internet]. 2000 Jul;79(1):434–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500763053>
 44. Seeger HM, Fidorra M, Heimburg T. Domain Size and Fluctuations at Domain Interfaces in Lipid Mixtures. *Macromol Symp* [Internet]. 2005 Jan 10;219(1):85–96. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/masy.200550109>
 45. Almeida PFF. Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009 Jan;1788(1):72–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273608002459>
 46. Jacobson K, Papahadjopoulos D. Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. *Biochemistry* [Internet]. 1975 Jan 14;14(1):152–61. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00672a026>
 47. Marsh D. Handbook of lipids bilayers. Boca Raton: CRC; 1990.
 48. Andrich MP, Vanderkooi JM. Temperature dependence of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence in phospholipid artificial membranes. *Biochemistry* [Internet]. 1976 Mar 1;15(6):1257–61. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00651a013>
 49. Lee AG. Lipid phase transitions and phase diagrams II. Mixtures involving lipids. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* [Internet]. 1977 Nov;472(3–4):285–344. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304415777900016>
 50. POGHOSYAN AH, GHARABEKYAN HH, SHAHINYAN AA. MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF DMPC/DPPC MIXED BILAYERS. *Int J Mod Phys C* [Internet]. 2007 Jan 21;18(01):73–89. Available from: <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129183107010267>
 51. Joana Isabel Guerreiro Cristo. Análise por anisotropia de fluorescência em estado estacionário, de misturas lipídicas canônicas envolvidas na heterogeneidade de membranas modelo [Internet]. UNIVERSIDADE DO ALGARVE; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.1/3479>
 52. Hubbell WL, McConnell HM. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J Am Chem Soc*. 1971;93(2):314–26.

53. Rozenfeld JHK, Duarte EL, Oliveira TR, Lamy MT. Structural insights on biologically relevant cationic membranes by ESR spectroscopy. *Biophys Rev.* 2017;9(5):633–47.
54. Bhattacharya S, Haldar S. Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain–backbone linkage. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2000 Jul;1467(1):39–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273600001966>
55. Finean JB. Interaction between cholesterol and phospholipid in hydrated bilayers. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 1990 Jun;54(3–4):147–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000930849090008F>
56. Ma Y, Benda A, Kwiatek J, Owen DM, Gaus K. Time-Resolved Laurdan Fluorescence Reveals Insights into Membrane Viscosity and Hydration Levels. *Biophys J* [Internet]. 2018 Oct;115(8):1498–508. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349518310191>
57. De Vequi-Suplicy CC, Benatti CR, Lamy MT. Laurdan in Fluid Bilayers: Position and Structural Sensitivity. *J Fluoresc* [Internet]. 2006 May 9;16(3):431–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-005-0059-3>
58. Malacrida L, Gratton E. LAURDAN fluorescence and phasor plots reveal the effects of a H₂O₂ bolus in NIH-3T3 fibroblast membranes dynamics and hydration. *Free Radic Biol Med.* 2018;128.
59. Pérez HA, Disalvo A, Frías M de los Á. Effect of cholesterol on the surface polarity and hydration of lipid interphases as measured by Laurdan fluorescence: New insights. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2019 Jun;178:346–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776519301638>
60. Subczynski WK, Wisniewska A, Hyde JS, Kusumi A. Three-Dimensional Dynamic Structure of the Liquid-Ordered Domain in Lipid Membranes as Examined by Pulse-EPR Oxygen Probing. *Biophys J* [Internet]. 2007 Mar;92(5):1573–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349507709657>

Contato:

Cássia Alessandra Marquezin
Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás
Endereço: Avenida Esperança, s/n, *Campus*
Samambaia. CEP: 74690-900 – Goiânia/Goiás
E-mail: cassia_m@ufg.br