



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA



*Sebastião Antônio Mendanha Neto*

**Interações de terpenos com membranas de eritrócito,  
fibroblasto, estrato córneo e membrana modelo e  
interações de uma nanopartícula de ouro com  
membranas modelo**

GOIÂNIA  
2014

*Sebastião Antônio Mendanha Neto*

**Interações de terpenos com membranas de eritrócito,  
fibroblasto, estrato córneo e membrana modelo e  
interações de uma nanopartícula de ouro com  
membranas modelo**

*Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Física.*

*ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Alonso*

*CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Félix M Goñi*

GOIÂNIA

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

M537i Mendanha Neto, Sebastião Antônio.  
Interações de terpenos com membranas de eritrócito, fibroblasto, estrato córneo e membrana modelo e interações de uma nanopartícula de ouro com membranas modelo [manuscrito] / Sebastião Antônio Mendanha-Neto. - 2014. 210 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Félix M. Goñi.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de abreviaturas, figuras e tabelas.

1. Membranas biológicas – Ressonância paramagnética eletrônica 2. Espectroscopia de ressonância magnética. 3. Nanopartículas magnéticas – Ouro I. Título.

CDU: 543.429.22

*A meus pais, Raul Antônio Mendanha e  
Ana Cândida da Silva Moreira Mendanha  
(in memoriam).*

# Agradecimentos

- Ao professor Dr. Antonio Alonso, pelo tempo dedicado à orientação, por todos os ensinamentos científicos e pessoais, pela confiança e liberdade durante os últimos oito anos;
- Ao professor Dr. Félix M. Goñi, pela oportunidade, pelo tempo dedicado à orientação e pela confiança durante meu período de estágio em seu laboratório;
- A professora Dr<sup>a</sup>. Cássia A. Marquezin pela supervisão durante a realização de parte deste trabalho;
- Aos amigos do Laboratório de Biofísica, Dr. Jorge Luiz V. dos Anjos, Kelly S. Fernandes e Rodrigo A. Moreira pela ajuda na realização deste trabalho;
- Aos amigos da *Unidad de Biofísica* pela ajuda durante meu período de estágio na *Universidad del País Vasco*. Em especial, ao Dr. Jesús S. Sot e a Aritz A. García e Ibai Artexte pela ajuda durante a realização de parte deste trabalho;
- Aos amigos Marcus C. dos Santos e Dr. César Castromonte pela ajuda inestimável com a preparação de algumas figuras inseridas neste trabalho;
- A meus pais, por sempre terem acreditado em meus ideais e proporcionado a realização deste trabalho;
- A minha namorada Larissa Rossi, por sua dedicação e companheirismo;
- A meus familiares, que mesmo com dificuldades em compreender o verdadeiro significado deste trabalho, sempre me incentivaram a seguir em frente;
- Aos professores do Instituto de Física (IF) da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela dedicação e atenção durante o curso de pós-graduação;
- Aos meus colegas do IF-UFG, pela amizade e apoio;
- Ao Prof. Dr. Fernando Pelegrini, por ceder gentilmente o laboratório de Ressonância Eletrônica;

- Ao Prof. Dr. Jesiel F. Carvalho, por ceder gentilmente o laboratório de Física dos Materiais;
- Ao Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) e ao Hemolabor, por cederem as amostras de sangue usadas neste trabalho;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche além de outros suportes financeiros;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e a UFG, pelo suporte financeiro.

*“Quando atingimos o objetivo, convencemo-  
nos de que seguimos o bom caminho.”*

*Paul Valéry*

# Conteúdo

---

<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xx</b>
<b>Prefácio</b>	<b>xxii</b>
<b>Resumo</b>	<b>xxiv</b>
<b>Abstract</b>	<b>xxv</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Biofísica de Membranas Biológicas . . . . .	2
1.1.1 Composição Lipídica das Membrana Biológicas . . . . .	2
1.1.2 Poliformismo e Movimentação dos Lipídios . . . . .	4
1.1.3 Domínios Lipídicos . . . . .	9
1.2 Membranas Modelo . . . . .	14
1.3 Membranas de Eritrócito . . . . .	17
1.4 Membranas de Fibroblastos . . . . .	20
1.5 Membranas de Estrato Córneo . . . . .	21
1.6 Facilitadores da Permeação . . . . .	25
1.7 Nanopartículas Aurora . . . . .	28
<b>2 Técnicas Experimentais</b>	<b>30</b>
2.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica Aplicada a Sistemas Biológicos . . . . .	31
2.1.1 Teoria Geral . . . . .	31
2.1.2 O Método dos Marcadores de Spin . . . . .	38

2.2	Espectroscopia e Microscopia de Fluorescência Aplicadas a Sistemas Biológicos . . . . .	48
2.2.1	Teoria Geral . . . . .	48
2.2.2	Espectroscopia de Fluorescência . . . . .	52
2.2.3	Microscopia Confocal . . . . .	63
2.3	Microscopia de Força Atômica Aplicada a Sistemas Biológicos . . . . .	65
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>Efeitos de Terpenos Sobre as Componentes Espectrais de Marcadores de Spin Incorporados em Membrana Modelo</b>	<b>75</b>
4.1	Motivação . . . . .	76
4.2	Materiais e Métodos . . . . .	76
4.2.1	Químicos . . . . .	76
4.2.2	Preparação e Marcação das Membranas de DPPC . . . . .	77
4.2.3	Espectroscopia de RPE . . . . .	78
4.2.4	Simulação Espectral . . . . .	78
4.3	Resultados . . . . .	79
4.3.1	Análise das Componentes Espectrais . . . . .	79
4.3.2	Dinâmica e Perfil Termodinâmico das Componentes Espectrais . . . . .	84
4.4	Discussão . . . . .	90
4.5	Conclusões . . . . .	93
<b>5</b>	<b>Toxicidade de Terpenos em Células de Fibroblastos Comparada com seu Potencial Hemolítico e o Aumento da Fluidez das Membranas de Eritrócito e de Fibroblastos</b>	<b>95</b>
5.1	Motivação . . . . .	96
5.2	Materiais e Métodos . . . . .	96
5.2.1	Químicos . . . . .	96
5.2.2	Cultura Celular . . . . .	96
5.2.3	Processamento do Sangue . . . . .	97
5.2.4	Indução da Hemólise . . . . .	97
5.2.5	Marcação das Membranas de Eritrócito e de Fibroblastos e Tratamento com Terpenos . . . . .	98
5.2.6	Espectroscopia de RPE . . . . .	98
5.2.7	Simulação Espectral . . . . .	99

5.3	Resultados . . . . .	99
5.3.1	Citotoxicidade dos Terpenos . . . . .	99
5.3.2	Efeito Hemolítico dos Terpenos . . . . .	100
5.3.3	Alteração na Fluidez da Membrana . . . . .	101
5.4	Discussão . . . . .	104
5.5	Conclusões . . . . .	107
<b>6</b>	<b>Efeitos do Nerolidol em Membrana Modelo e de Estrato Córneo Estudados pela Anisotropia da Fluorescência de Sondas Lipofílicas</b>	<b>109</b>
6.1	Motivação . . . . .	110
6.2	Materiais e Métodos . . . . .	110
6.2.1	Químicos . . . . .	110
6.2.2	Preparação das Membranas de EC . . . . .	112
6.2.3	Marcação e Tratamento das Membranas de EC . . . . .	112
6.2.4	Preparação e Tratamento das vesículas de DPPC . . . . .	112
6.2.5	Medidas da Anisotropia da Fluorescência . . . . .	113
6.3	Resultados . . . . .	114
6.3.1	Validação do Arranjo Experimental . . . . .	114
6.3.2	Anisotropia da Fluorescência . . . . .	116
6.4	Discussão . . . . .	119
6.5	Conclusões . . . . .	122
<b>7</b>	<b>Interação de Nanopartículas de Ouro AURORA-DSG com Membranas Modelo</b>	<b>123</b>
7.1	Motivação . . . . .	124
7.2	Materiais e Métodos . . . . .	124
7.2.1	Químicos . . . . .	124
7.2.2	Manipulação da AURORA-DSG . . . . .	125
7.2.3	Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes . . . . .	125
7.2.4	Microscopia Confocal . . . . .	126
7.2.5	Preparação das Vesículas Multilamelares . . . . .	126
7.2.6	Medidas da Anisotropia da Fluorescência . . . . .	127
7.2.7	Preparação das Bicamadas Planas Suportadas . . . . .	127
7.2.8	Microscopia de Força Atômica . . . . .	128
7.3	Resultados . . . . .	129

7.3.1	Efeito da AURORA-DSG sobre a Morfologia dos Domínios Lipídicos . . .	129
7.3.2	Visualização das Nanopartículas AURORA-DSG . . . . .	133
7.4	Discussão . . . . .	137
7.5	Conclusões . . . . .	139
<b>8</b>	<b>Conclusões Gerais</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>143</b>
<b>A</b>	<b>Interações Magnéticas</b>	<b>145</b>
A.1	Interação Zeeman . . . . .	146
A.2	Interação com o Campo de Micro-ondas . . . . .	151
A.3	Interação Hiperfina . . . . .	153
<b>B</b>	<b>Simulação de Espectros de RPE</b>	<b>158</b>
B.1	Teoria Geral . . . . .	159
B.2	Difusão Rotacional Browniana . . . . .	164
B.3	Software <i>NLLS</i> . . . . .	167
<b>C</b>	<b>Radiação de um Fluoróforo</b>	<b>172</b>
<b>D</b>	<b>Material Suplementar 1</b>	<b>179</b>
<b>E</b>	<b>Material Suplementar 2</b>	<b>186</b>
<b>F</b>	<b>Publicações</b>	<b>189</b>
	<b>Referências</b>	<b>191</b>

# Lista de Abreviaturas

---

$l$	Fase Líquida
$l_d$	Fase Líquida-Desordenada/Líquida-Cristalina
$l_o$	Fase Líquida-Ordenada
$s_o$	Fase Sólida-Ordenada/Gel
10-PC	1-palmitoil-2-estearoil-(10-doxil)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
12-DSA	12-doxil estearato
16-DMS	16-metil estearato
2,6-ANS	2-anilinaftaleno-6-sulfônico
5-DMS	5-metil estearato
5-DSA	5-doxil estearato
6-NBD-PC	1-palmitoil-2-6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AHBA	2-amino-N-hexadecil benzamida
AURORA-DSG	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-(Nanopartículas Aurora)
AZT	Zidovudine
C1	Componente Espectral 1
C2	Componente Espectral 2
C3	Componente Espectral 3

CaCl<sub>2</sub> Cloreto de Cálcio

CO<sub>2</sub> Dióxido de Carbono

col Colesterol

DHE Dehidroergosterol

DLVO Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMPC 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DNA *Deoxyribonucleic Acid*

DNS-Cl Cloreto de Dansilo

DOPC 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DPH 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

DPPC 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DSPC 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DTBN Di-*tert*-butil nitróxido

EB Estrato Basal

EC Estrato Córneo

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EE Estrato Espinhoso

EG Estrato Granuloso

GUV's *Giant Unilamellar Vesicles*

HEPES *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

IC<sub>50</sub> Concentração que Mata 50% das Células

Liso-NBD-PC 1-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina

Liss-Rho-PE 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil)

LUV's *Large Unilamellar Vesicles*

MAL-5 3-maleimida proxil

MLV's *Multilamellar Vesicles*

NaCl Cloreto de Sódio

NAP Nafto[2,3-a]pireno

NLLS *Nonlinear-Least-Squares*

O<sub>2</sub> Oxigênio Molecular

PFA *PerFluoroAlkoxy*

Pireno-PE 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(1-pirenosulfonil) (sal de amônio)

PIPES *Piperazine-N,N-bis(2-ethanesulfonic acid)*

POPC 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

PSA *Molecular Polar Surface Area*

pSM N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina

RPE Ressonância Paramagnética Eletrônica

SPB's *Supported Planar Bilayers*

SUV's *Small Unilamellar Vesicles*

TEMPO 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina 1-oxil

TEMPO-PC 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo(tempo)colina

TOAC 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxil

# Lista de Figuras

---

1.1	Estruturas moleculares das principais classes de lipídios que compõem as membranas das células eucarióticas. Esteróis são baseados em uma estrutura de quatro anéis, com o colesterol sendo a forma presente em mamíferos. Glicero-fosfolipídios são baseados no diacilglicerol e, tipicamente tem cadeias acila de 16-18 átomos de carbono, uma das quais contém uma ligação dupla cis. O grupo radical (R) pode ser neutro (serina ou inositol) ou positivo (etanolamina ou colina). Esfingolipídios são baseados na ceramida e, em mamíferos, o grupo (R) pode ser a colina (esfingomiéline) ou no caso dos glicosfingolipídios a glicose. A cadeia acila ligada à base esfingóide é tipicamente saturada, variando entre 16-26 átomos de carbonos. Nos esfingolipídios verifica-se a presença de doadores (grupos hidroxila) e aceptores (grupos carbonil) de ligações de hidrogênio enquanto nos glicerofosfolipídios verifica-se a presença apenas de aceptores (grupo carbonil). Figura adaptada de <i>Lipid Rafts: Elusive or Illusive?</i> [6]. . . . .	3
1.2	Poliformismo lipídico de acordo com a estrutura geométrica de cada tipo de molécula. . . . .	5
1.3	Fases das bicamadas lipídicas. Bicamadas lipídicas que estão abaixo da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) formam uma fase sólido ordenada (gel) que acima da $T_m$ passa a ser fase líquida-desordenada ( $l_d$ ) (também conhecida como líquida-cristalina). A presença de colesterol (estruturas ovais) ordena as cadeias acila da fase $l_d$ , criando a fase líquida-ordenada ( $l_o$ ). Figura adaptada de <i>Lipid Rafts: Elusive or Illusive?</i> [6]. . . . .	6
1.4	Tipos de movimento realizados pelos lipídios nas bicamadas. . . . .	9

1.5	(1) Representação da reação de troca entre dois pares de lípidos semelhantes que produz dois pares de lípidos contrários. Esta reação define a energia livre de Gibbs de interação, $\omega_{AB}$ . (2) Reação de troca entre dois lípidios. A diferença de energia livre entre as configurações inicial e final é um múltiplo de $\omega_{AB}$ . Figura adaptada de <i>Thermodynamics of membrane domains</i> [23]. . . . .	11
1.6	Diagrama de fases construído por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência para composição lipídica esfingomiéline:1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfolina:colesterol (POPC:pSM:col) a 23 °C. O ponto púrpura marca a composição 1:1:1 enquanto o ponto verde marca a composição 2:1:1. A linha pontilhada horizontal ( $x_{col}=0,66$ ) representa o limite da solubilidade do colesterol na bicamada lipídica. Figura adaptada de <i>Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts</i> [27]. . .	13
1.7	Representação (em escala de comparação) dos tipos de vesículas utilizadas neste trabalho. . . . .	15
1.8	Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a formação SPB's através da adsorção de lipossomas em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. Os desenhos não estão em escala. Os lípidios estão ampliados cerca de 50 vezes em relação aos lipossomas. (A) adsorção de vesículas em uma superfície hidrofílica na qual a orientação das monocamadas é invertida; (B) adsorção de vesículas em uma superfície hidrofóbica; (C) adsorção de vesículas em uma superfície hidrofílica na qual a orientação das monocamadas é preservada. Figura retirada de <i>Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes - factors of importance for kinetics and stability</i> [37]. . . . .	17
1.9	Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos normais mostrando sua forma de disco bicôncavo (Créditos da imagem: Annie Cavanagh, Wellcome Images [43]). . . . .	18
1.10	Modelo esquemático da bicamada lipídica e das proteínas integrais, ancoradas e do citoesqueleto que constituem a membrana do eritrócito. Proteínas integrais; B3: banda 3, Gf-A: glicoforina A e Gf-C: glicoforina-C. Proteínas ancoradas; Anq: anquirina e P4.2: proteína 4.2. Proteínas do citoesqueleto; $\alpha$ -Spc: $\alpha$ -espectrina, $\beta$ -Spc: $\beta$ -espectrina, Adc: aductina, Tms: tropomiosina e Tmd: tropomodulina (Figura adaptada de <i>Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model</i> [41]). . . . .	19

1.11	Micrografia confocal de uma célula de fibroblastos 3T3 antes da divisão em cultura. O núcleo foi marcado de azul, enquanto os microfilamentos de actina que fazem parte do citoesqueleto foram marcados de vermelho. O citoesqueleto forma a estrutura interna da célula, dando-lhe forma. (Créditos da imagem: David Becker, Wellcome Images [46]). . . . .	21
1.12	Micrografia eletrônica de varredura de uma seção transversal da pele humana que mostra o estrato córneo. (Créditos da imagem: Veronika Burmeister, Visuals Unlimited Inc. [50]). . . . .	22
1.13	Desenho esquemático de um corte transversal da pele. Na camada basal da epiderme as células começam a se diferenciar até alcançarem a superfície da pele. Na interface entre o EC e o EG ocorre a diferenciação final onde os queratinócitos são transformados em corneócitos. Substâncias permeiam a pele principalmente pelo tortuoso caminho entre a região lamelar. C = corneócito, escala = 100 nm. Figura adaptada de <i>Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations</i> [51]. . . . .	23
1.14	Modelo molecular para o padrão largo-estrito-largo visualizado entre as extremidades adjacentes dos corneócitos. As caixas hachuradas representam as regiões eletricamente densas onde os lipídios podem estar covalentemente ligados à superfície exterior dos envelopes proteicos dos corneócitos (representados pelos grupos R). Figura adaptada de <i>Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum</i> [62]. . . . .	25
1.15	Estrutura molecular das nanopartículas AURORA-DSG (Painel esquerdo). O conjugado possui forma molecular $Au_{55}C_{262}H_{265}P_{12}NO_7$ e peso molecular 14745,27 g/mol. O painel da direita mostra uma micrografia eletrônica na qual as várias camadas de vesículas multilamelares são identificadas graças ao contraste conferido pela incorporação de 0,1% de AURORA-DSG. Imagens retiradas de <a href="http://www.avantilipids.com/">http://www.avantilipids.com/</a> . . . . .	29
2.1	Curva Lorentziana e sua primeira derivada. . . . .	35
2.2	Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) na presença de um campo magnético aplicado. O painel A mostra os níveis energéticos sem a interação com o spin nuclear do átomo de nitrogênio; o painel B mostra os níveis energéticos desdobrados pela interação nuclear hiperfina. . . . .	37

2.3	Espectro de RPE de uma espécie magnética com $I = 1$ ; $g$ define a posição da linha central e $a$ é a constante de desdobramento hiperfino definida no Apêndice A. . . . .	38
2.4	Estrutura molecular geral do radical nitróxido. $R_1$ e $R_2$ representam os grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin. . . . .	39
2.5	Estrutura química de alguns marcadores de spin frequentemente usados no estudo de membranas lipídicas e proteínas. (a) 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-(tempo)colina (TEMPO-PC), (b) 1-palmitoil-2-estearoil-(10-doxil)- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (10-PC), (c) 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxil (TOAC) e (d) 3-maleimida proxil (MAL-5). Os marcadores TEMPO-PC e 10-PC se estruturam nas bicamadas lipídicas através das interações hidrofóbicas. O marcador TOAC é diretamente incorporado nas cadeias laterais das proteínas através das ligações peptídicas e o marcador MAL-5 se liga covalentemente aos grupos sulfidril da cisteína. . . . .	40
2.6	Estrutura química dos marcadores lipídicos usados neste trabalho. (a) 5-metil estearato (5-DMS), (b) 5-doxil estearato (5-DSA), (c) 16-doxil estearato (16-DSA) e (d) 12-doxil estearato (12-DSA). . . . .	41
2.7	Espectros de RPE obtidos com o campo magnético estático aplicado paralelamente aos eixos moleculares $x$ , $y$ e $z$ do nitróxido. . . . .	42
2.8	Espectros de RPE de nitróxidos com diferentes tempos de correlação rotacional $\tau_c$ . Os espectros foram obtidos através de simulação utilizando o software <i>easyspin</i> com a opção <i>chili</i> . Parâmetros da simulação: $\mathbf{g}$ , (2,008 2,006 2,003); $\mathbf{A}$ , (20 20 85); alargamento lorentziano, 0,3; e frequência, 9,5 GHz. . . . .	43
2.9	Diagrama de blocos simplificado de um espectrômetro de RPE. Figura adaptada de <i>Quantitative EPR</i> [129]. . . . .	47
2.10	Diagrama de Jablonski ilustrando as transições responsáveis pela fluorescência e fosforescência. Figura adaptada de <i>Principles of Fluorescence Spectroscopy</i> [131].	50
2.11	Diagrama de Jablonski simplificado ilustrando o significado de tempo de vida e de rendimento quântico. Figura adaptada de <i>Principles of Fluorescence Spectroscopy</i> [131]. . . . .	51
2.12	Movimento rotacional incluindo despolarização da fluorescência. $\mathbf{d}_A$ e $\mathbf{d}_E$ representam os momentos de transição de absorção e emissão respectivamente. Figura adaptada de <i>Molecular Fluorescence: Principles and Applications</i> [134]. . . . .	53

2.13	Estrutura química de algumas sondas fluorescentes frequentemente usadas no estudo de membranas lipídicas e proteínas. (a) cloreto de dansilo (DNS-Cl), (b) 2-anilinaftaleno-6-sulfônico (2,6-ANS), (c) dehidroergosterol (DHE), (d) 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina- <i>N</i> -(1-pirenosulfonil) (sal de amônio) (Pireno-PE) e (e) 1-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil-2-hidroxi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (Liso-NBD-PC). As sondas DNS-Cl e 2,6-ANS se ligam covalentemente e não covalentemente as proteínas, respectivamente. As sondas DHE, Pireno-PE e Liso-NBD-PC se estruturam nas bicamadas lipídicas através das interações hidrofóbicas. . . . .	54
2.14	Estrutura química das sondas lipofílicas usadas neste trabalho. (a) 1-palmitoil-2-6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (6-NBD-PC), (b) 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e (c) 2-amino- <i>N</i> -hexadecil benzamida (AHBA). . . . .	55
2.15	Diagrama esquemático para a medida da anisotropia da fluorescência. Figura adaptada de <i>Principles of Fluorescence Spectroscopy</i> [144]. . . . .	56
2.16	Intensidades emitidas para um único fluoróforo em um sistema de coordenadas. Figura adaptada de <i>Principles of Fluorescence Spectroscopy</i> [144]. . . . .	57
2.17	Definição dos ângulos $\alpha$ , e $\psi$ para a situação onde os momentos de transição de absorção ( $\mathbf{d}_A$ ) e de emissão ( $\mathbf{d}_E$ ) não são paralelos. . . . .	59
2.18	Diagrama de blocos de um espectrofluorímetro convencional. Figura adaptada de <i>Molecular Fluorescence: Principles and Applications</i> [134]. . . . .	61
2.19	Diagrama esquemático para a medida da anisotropia da fluorescência no arranjo tipo L. Figura adaptada de <i>Principles of Fluorescence Spectroscopy</i> [144]. . . . .	62
2.20	Principais componentes dos microscópios de epifluorescência e de fluorescência confocal. No arranjo de epifluorescência, luz proveniente de vários planos ao longo da espessura da amostra chega ao detector enquanto no arranjo confocal apenas a luz proveniente do plano focal chega o detector. . . . .	64
2.21	Micrografia confocal de uma vesícula unilamelar gigante composta de 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina. A imagem 3-D é construída através da superposição de diversas imagens adquiridas entre os planos polar e equatorial. . . . .	66
2.22	Princípio básico de uma medida de microscopia de força atômica. Figura adaptada de <a href="http://www.jpk.com/">http://www.jpk.com/</a> . . . . .	67

2.23	Imagem topográfica (altura) de bicamadas planas suportadas compostas de 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina:N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina:colesterol (2:1:1). As estruturas identificadas com maior altura relativa à bicamada (fase $l_d$ ) são os domínios ricos em N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina:colesterol (fase $l_o$ ), regiões claras na imagem, e as regiões negras representam o substrato de mica onde as bicamadas não foram adsorvidas. . . . .	72
4.1	Estrutura química do lipídio, dos marcadores de spin e dos terpenos utilizados neste trabalho. . . . .	77
4.2	Representação esquemática das configurações propostas para o marcador de spin 5-DMS em membranas de DPPC e suas respectivas linhas espectrais. Os marcadores de spin da componente 1 (verde) estão localizados principalmente na região mais superficial da bicamada (onde se pode formar ligações de hidrogênio com maior facilidade) enquanto os marcadores de spin da componente 2 (azul) estão inseridos mais profundamente na membrana (realizando principalmente interações hidrofóbicas). Os marcadores de spin da componente 3 (cinza) estão fora da bicamada (dissolvidos no solvente). . . . .	80
4.3	Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC nos intervalos de temperatura $\alpha=0-20$ °C, $\beta=20-45$ °C e $\gamma=45-80$ °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2 respectivamente. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G. . . . .	81
4.4	Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,8:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura $\alpha=0-20$ °C, $\beta=20-45$ °C e $\gamma=45-80$ °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2, respectivamente. A linha cinza representa o sinal dos marcadores incorporados nas micelas dos terpenos (componente 3). A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B, $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . .	82
4.5	Espectros de RPE dos marcadores 5-DMS, 16-DMS, 5-DSA e 12-DSA incorporados em vesículas de DPPC tratadas com (+)-limoneno a 10 °C. As setas indicam a posição do campo magnético onde as linhas da componente 3 estão claramente resolvidas. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G. . . . .	83

4.6	Melhor ajuste dos espectros de RPE do marcador 5-DMS dissolvido em micelas de 1,8-cineol, (+)-limoneno, $\alpha$ -terpineol e nerolidol a 10 °C (Painel esquerdo) e o comportamento dos respectivos tempos de correlação rotacional como função da temperatura (Painel direito). . . . .	84
4.7	Tempo de correlação rotacional, $\tau_c$ , para o marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,8:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura $\alpha=0-20$ °C, $\beta=20-45$ °C e $\gamma=45-80$ °C. Os símbolos fechados referem-se a componente 1 e os símbolos abertos as componentes 2 ou 3. Os asteriscos representam os tempos de correlação rotacional dos marcadores dissolvidos nas micelas de terpeno. Os quadrados representam os tempos de correlação rotacional da amostra controle. As setas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$ °C) da amostra controle (sem terpeno). Painéis: A, 1,8-cineol; B, $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . .	85
4.8	Espectros do marcador 5-DMS incorporado em membranas de DPPC tratadas com os terpenos nas razões (0,6:1) e (0,8:1) terpeno:lipídio. Os espectros apresentados são aqueles que mais se assemelham ao espectro controle (DPPC sem terpeno a 42 °C). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B, $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . .	87
4.9	Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio, $K_e = (N_2/N_1)$ , calculado com base nas populações $N_1$ e $N_2$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC como função da temperatura absoluta. . . . .	88
4.10	Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio, $K_e$ , calculado com base nas populações $N_1$ , $N_2$ , e $N_3$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com terpenos na razão (0,8:1) terpeno:lipídio como função da temperatura absoluta. Os símbolos abertos equivalem a $K_e = (N_3/N_1)$ e os símbolos fechados a $K_e = (N_2/N_1)$ . Painéis: A, 1,8-cineol; B, $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . .	89
5.1	Estrutura química dos terpenos e do marcador de spin utilizados neste trabalho.	97
5.2	Teste citotóxico Balb/c 3T3-A31 NRU após uma exposição das células aos terpenos mais (nerolidol) e menos (1,8-cineol) citotóxicos durante 48 h. Os dados representam a viabilidade celular média (%) $\pm$ desvio padrão (DP) para três experimentos independentes. . . . .	100

5.3	Níveis hemolíticos induzidos após incubar uma suspensão de eritrócitos contendo um hematócrito de 50% com diferentes concentrações de etanol durante 1,5 h (Painel A). Níveis hemolíticos induzidos após incubar uma suspensão de eritrócitos contendo um hematócrito de 50% com diferentes concentrações de 1,8-cineol e nerolidol durante 1,5 h (Painel B). . . . .	101
5.4	Correlação entre as concentrações dos terpenos requeridas para provocar 50% de hemólise e para obter o $IC_{50}$ de viabilidade celular. Cada ponto no gráfico corresponde a um terpeno (Tabelas 5.1 e 5.2). O valor obtido para o coeficiente de correlação (R) foi de 0,61. . . . .	102
5.5	Espectros do marcador de spin 5-DSA (linhas negras) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) incorporado nas membranas de eritrócito para a amostra controle e para amostras incubadas por 90 minutos com 1,8-cineol e nerolidol na razão terpeno:célula de $12,7 \times 10^9 : 1$ . O melhor ajuste para cada espectro foi obtido usando o programa <i>NLLS</i> com um modelo de duas componentes espectrais. Os valores do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ) obtidos em cada ajuste estão indicados. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G. . . . .	103
5.6	Tempo de correlação rotacional $\tau_c$ para o marcador 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito em função do número de terpenos/eritrócitos. . . . .	104
5.7	Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA (linhas negras) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) incorporado nas membranas de fibroblastos para uma amostra não tratada (controle) e para fibroblastos tratados com diversos terpenos (incubados por 90 minutos) na razão terpeno:célula de $6,3 \times 10^9 : 1$ . O melhor ajuste para cada espectro foi obtido usando o programa <i>NLLS</i> com um modelo de duas componentes espectrais. Os valores do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ) obtidos em cada ajuste estão indicados. O erro experimental em $\tau_c$ é estimado em 0,2 ns. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G. . . . .	105

6.1	Arranjo molecular dos lipídios que formam as membranas intercelulares do estrato córneo, baseado no modelo proposto por Hill e Wertz [62]. As sondas fluorescentes e o sesquiterpeno nerolidol estão mostrados na figura em suas prováveis localizações. As caixas hachuradas representam as regiões eletricamente densas onde os lipídios podem estar covalentemente ligados à superfície exterior dos envelopes proteicos dos corneócitos (representados pelos grupos R). ①, AHBA; ②, 6-NBD-PC; ③, DPH e ④, nerolidol. Figura adaptada de <i>Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum</i> [172]. . . . .	111
6.2	Arranjo utilizado para realização dos experimentos de espectroscopia de fluorescência em membranas de estrato córneo. As membranas de estrato córneo foram colocadas entre placas de quartzo e introduzidas em cubetas de quartzo (com um ângulo ligeiramente inferior a 45° com os lados da cubeta) contendo solução salina tamponada com acetato e pH 5,1. . . . .	113
6.3	Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas em vesículas de DPPC tratadas com nerolidol na razão 0,8:1 (terpeno:lipídio). Os comprimentos de onda de excitação de cada sonda foram: AHBA, 330 nm; 6-NBD-PC, 460 nm e DPH, 360 nm. . . . .	115
6.4	Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas em membranas de EC tratadas com nerolidol nas razões 0,25; 0,5 e 1 % (v/v). Os comprimentos de onda de excitação de cada sonda foram: AHBA, 330 nm; 6-NBD-PC, 460 nm e DPH, 360 nm. . . . .	115
6.5	Dependência angular da anisotropia da fluorescência das sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH incorporadas nas membranas de EC a 25 °C. As linhas representam o valor médio de todas as medidas. . . . .	116
6.6	Anisotropia da fluorescência das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas nas membranas de DPPC como função da temperatura para a razão 0,8:1 (nerolidol:lipídio). As linhas verticais pontilhadas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$ °C) da amostra controle (sem terpeno). . . . .	117

6.7	Anisotropia da fluorescência das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas nas membranas de EC como função da temperatura para diferentes concentrações (v/v) do sesquiterpeno nerolidol. As linhas verticais pontilhadas indicam a temperatura da primeira transição de fase ( $T_m \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) da amostra controle (sem terpeno). . . . .	117
6.8	Anisotropia da fluorescência da sonda DPH incorporadas em membranas de EC como função da temperatura. As amostras foram tratadas com com 1% (v/v) de (+)-limoneno ou nerolidol durante 90 min a 25 °C. A linha vertical pontilhada indica a temperatura da primeira transição de fase ( $T_m \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) da amostra controle (sem terpeno). . . . .	118
6.9	Modelo para a ação dos terpenos em membranas de estrato córneo. Figura adaptada de <i>Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I. Effect of terpenes.</i> [80]. . . . .	122
7.1	Estrutura química dos lipídios e das sondas fluorescentes utilizados neste trabalho.	125
7.2	Micrografias de fluorescência de vesículas unilamelares gigantes marcadas com a sonda Liss-Rho-PE e compostas de POPC, pSM, DPPC, pSM:col (0,6:0,4), DOPC:DSPC (1:1) e DOPC:pSM:col (2:1:1). Os painéis esquerdos (imagem 3D e plano equatorial) mostram as imagens das amostras controle e os painéis direitos (imagem 3D e plano equatorial) das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente. A barra de escala equivale a 10 $\mu\text{M}$ . . . . .	130
7.3	Imagens topográficas de microscopia de força atômica de SPB's compostas de pSM e psM:col (0,6:0,4). Os painéis esquerdos mostram as imagens das amostras controle e os painéis direitos das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG. As regiões negras representam o substrato de mica onde as bicamadas não foram adsorvidas. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente. A barra de escala equivale a 5 $\mu\text{M}$ . . . . .	131
7.4	Imagens topográficas de microscopia de força atômica de SPB's compostas de POPC, DPPC, DOPC:DSPC (1:1) e DOPC:pSM:col (2:1:1). Os painéis esquerdos mostram as imagens das amostras controle e os painéis direitos das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG. Os domínios lipídicos são identificados por suas diferenças de altura (escala de cor). As regiões negras representam o substrato de mica onde as bicamadas não foram adsorvidas. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente. A barra de escala equivale a 5 $\mu\text{M}$ . . . . .	132

7.5	Imagens topográficas de microscopia de força atômica de SPB's compostas de POPC, DPPC, DOPC:DSPC e DOPC:pSM:col. Os painéis esquerdos mostram as imagens das amostras controle, os painéis centrais das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG e os painéis direitos uma representação 3D dos painéis centrais. As partículas, em sua maioria, permaneceram estáveis durante o processo de aquisição da imagem. Por motivos técnicos não foi possível adquirir imagens da fase líquida-ordenada das amostras de DOPC:pSM:col. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente e possuem $0,5 \times 0,5 \mu\text{M}$ . . . . .	134
7.6	Distribuição dos diâmetros como função das alturas medidas através das imagens topográficas de AFM das nanopartículas AURORA-DSG introduzidas nas SPB's. O parâmetro R determina a correlação entre os valores encontrados para os diâmetros e para as alturas. Painéis: A, POPC; B, DOPC:DSPC (fase líquida-desordenada); C, DOPC:pSM:col (fase líquida-desordenada); D, DPPC; E, DOPC:DSPC (fase gel). . . . .	135
7.7	Histogramas e seus ajustes das alturas medidas através das imagens topográficas de AFM das nanopartículas AURORA-DSG introduzidas nas SPB's. Painéis: A, POPC; B, DOPC:DSPC (fase líquida-desordenada); C, DOPC:pSM:col (fase líquida-desordenada); D, DPPC; E, DOPC:DSPC (fase gel). . . . .	136
7.8	Anisotropia da fluorescência da sonda DPH incorporada em MLV's de POPC, pSM, DPPC e pSM:col. Foram adicionados as amostras 0,1 mol% de AURORA-DSG. O asterisco indica estatisticamente diferente a $P < 0,05$ (teste Tukey). . . . .	136
B.1	Níveis de energia e as respectivas transições possíveis para uma molécula de nitróxido submetida a altos valores do campo magnético aplicado, $\mathbf{H}$ . Na figura, $S = \frac{1}{2}$ , $I = 1$ e a notação utilizada é $ m_S, M_I\rangle$ . As linhas sólidas indicam as transições permitidas e as linhas pontilhadas as transições proibidas. Figura adaptada de <i>Theory of Slow Tumbling ESR Spectra for Nitroxides</i> [165]. . . . .	166
B.2	Espectro de RPE (linha preta) e seu melhor ajuste (linha vermelha) do marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC a $34^\circ\text{C}$ . As linhas verde e azul representam as componentes espectrais que formam o espectro composto (linha vermelha) separadas através do software <i>NLLS</i> . . . . .	167
C.1	Cargas $\pm q$ conectadas por um fio fino para formar um dipolo elétrico. . . . .	173

- D.1 Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,6:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2 respectivamente. A linha cinza representa o sinal dos marcadores incorporados nas micelas dos terpenos (componente 3). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . . 180
- D.2 Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (1,2:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2 respectivamente. A linha cinza representa o sinal dos marcadores incorporados nas micelas dos terpenos (componente 3). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . . 181
- D.3 Tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , para o marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,6:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. Os símbolos fechados referem-se a componente 1 e os símbolos abertos a componentes 2 ou 3. Os asteriscos representam os tempos de correlação rotacional dos marcadores dissolvidos nas micelas de terpeno. Os quadrados representam os tempos de correlação rotacional da amostra controle. As setas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$  °C) da amostra controle (sem terpeno). Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . . 182
- D.4 Tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , para o marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (1,2:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. Os símbolos fechados referem-se a componente 1 e os símbolos abertos a componentes 2 ou 3. Os asteriscos representam os tempos de correlação rotacional dos marcadores dissolvidos nas micelas de terpeno. Os quadrados representam os tempos de correlação rotacional da amostra controle. As setas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$  °C) da amostra controle (sem terpeno). Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . . 183

D.5	Populações relativas do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos. $N_3$ e $N_1$ dizem respeito as frações de marcadores de spin nas componentes 3 e 1 respectivamente. Painéis: A, 1,8-cineol; B, $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . .	184
D.6	Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio, $K_e$ , calculado com base nas populações $N_1$ , $N_2$ , e $N_3$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com terpenos na razão (1,2:1) terpeno:lipídio como função da temperatura absoluta. Os símbolos abertos equivalem a $K_e = (N_3/N_1)$ e os símbolos fechados a $K_e = (N_2/N_1)$ . Painéis: A, 1,8-cineol; B, (+)-limoneno. . . . .	184
D.7	Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio, $K_e$ , calculado com base nas populações $N_1$ , $N_2$ , e $N_3$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com terpenos na razão (0,6:1) terpeno:lipídio como função da temperatura absoluta. Os símbolos abertos equivalem a $K_e = (N_3/N_1)$ e os símbolos fechados a $K_e = (N_2/N_1)$ . Painéis: A, 1,8-cineol; B, $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol. . . . .	185
E.1	Micrografias de fluorescência (imagem 3D e plano equatorial) de vesículas unilamelares gigantes marcadas com as sondas Liss-Rho-PE e NAP e compostas de pSM:col, DOPC:pSM:col, POPC e DOPC:DSPC. As amostras foram preparadas de acordo com a seção 7.2.3 com a adição de 0,5 mol% da sonda fluorescente NAP (comprimento de excitação de 457 nm). As imagens foram adquiridas à temperatura ambiente através de dois canais de detecção equipados com filtros de $593 \pm 20$ nm (Liss-Rho-PE) e $485 \pm 20$ nm (NAP). A barra de escala equivale a $10 \mu\text{M}$ . . . . .	187
E.2	Esquema ilustrativo da determinação do raio da imagem de um corpo menor do que a ponta de AFM. Por simplicidade, a ponta de AFM foi aproximada para uma esfera. . . . .	188

# Lista de Tabelas

---

2.1	Parâmetros magnéticos para o radical nitróxido. . . . .	39
2.2	Valores para flutuação térmica, incertezas e razão sinal/ruído de cantilévers flexíveis. Tabela retirada de <i>Atomic Force Microscopy in Cell Biology</i> [150]. . . . .	69
4.1	Valores para os tempos de correlação rotacional $\tau_c$ associados as componentes 1, 2 e 3 do marcador de spin 5-DMS incorporado em membranas de DPPC tratadas com os terpenos 1,8-cineol, (+)-limoneno, $\alpha$ -terpineol e nerolidol nas razões 0,6:1, 0,8:1 e 1,2:1 (terpeno:lipídio). O erro experimental do parâmetro $\tau_c$ é de 0,2 ns. . . . .	86
4.2	Variações* da energia livre de Gibbs padrão $\Delta G^\circ$ a 10 °C e 38 °C e da entalpia $\Delta H^\circ$ e entropia $\Delta S^\circ$ padrão associadas à transferência do marcador de spin 5-DMS de C1 para C3 (região $\alpha = 0-20$ °C) e de C1 para C2 (região $\beta-\gamma = 20-80$ °C) em membranas de DPPC tratadas com os terpenos 1,8-cineol, (+)-limoneno, $\alpha$ -terpineol e nerolidol nas razões 0,6:1, 0,8:1 e 1,2:1 (terpeno:lipídio). . . . .	90
5.1	Valores de $IC_{50}$ obtidos do teste citotóxico Balb/c 3T3-A31 NRU para os terpenos testados após uma incubação de 48 h. . . . .	100
5.2	Concentração de terpeno necessária para 50% de hemólise após 90 min de incubação da suspensão de eritrócitos. . . . .	102
7.1	Valores para a altura média das nanopartículas AURORA-DSG incorporadas nas SPB's encontrados à partir das distribuições mostradas nas Figura 7.7. . . . .	135
B.1	Parâmetros magnéticos (G), populações relativas (%) e taxas de difusão rotacional ( $s^{-1}$ ) utilizados pelo software <i>NLLS</i> para ajustar o espectro experimental ao lado. . . . .	167
B.2	Lista de parâmetros usados pelo software <i>NLLS</i> para a simulação de espectros de RPE no regime de movimento lento. Tabela adaptada de <i>Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm</i> [228]. . . . .	169

# Prefácio

---

Nesta tese estão compilados parte dos resultados obtidos por mim, sob a orientação dos professores Dr. Antônio Alonso e Dr. Félix M. Goñi, durante meu período de doutoramento (março de 2010 à abril de 2014). De maneira geral, este trabalho examina a interação de algumas moléculas de interesse com uma série de biomembranas por meio de diferentes técnicas experimentais. No primeiro capítulo dessa tese, o leitor irá encontrar uma introdução sobre as características gerais das membranas lipídicas e sobre as características particulares das biomembranas estudadas, além de uma descrição das moléculas escolhidas (terpenos e uma nanopartícula conjugada) para serem estudadas nesse trabalho. No segundo capítulo, estão descritos os aspectos teóricos das técnicas experimentais utilizadas em nossos estudos com ênfase em suas aplicações em sistemas biológicos. O leitor moderadamente familiarizado com as espectroscopias de ressonância paramagnética eletrônica (associada ao método dos marcadores de spin) e de fluorescência, e também com as microscopias de fluorescência e de força atômica pode evitar este capítulo e dirigir sua leitura diretamente aos capítulos subsequentes sem perda de linearidade do texto. No terceiro capítulo, o leitor irá encontrar os principais objetivos desse trabalho.

Nos capítulos 4, 5 e 6 estão apresentadas as motivações, os métodos experimentais e os resultados de nossos estudos sobre a interação de terpenos com alguns tipos de biomembranas (estes estudos foram realizados sob a orientação do professor Dr. Antonio Alonso, na Universidade Federal de Goiás). No final de cada um destes capítulos está incluída também a contextualização de nossos resultados com os resultados encontrados na literatura e nossas respectivas conclusões parciais. O estudo da interação de terpenos com biomembranas é

particularmente interessante, uma vez que estas moléculas podem atuar como facilitadores da penetração de fármacos através da pele, além de apresentarem atividade antitumoral, antibacteriana e antiparasitária entre outras.

O capítulo 7 segue a mesma estrutura dos capítulos 4, 5 e 6 para apresentar os resultados obtidos (sob a orientação do professor Dr. Félix M. Goñi, na Universidade do País Basco) sobre a interação da nanopartícula de ouro conjugada 1,2-distearoil-sn-glicero-3-(Nanopartículas Aurora) com modelos de membranas lipídicas. Essa partícula foi desenvolvida para aumentar a resolução das bicamadas lipídicas em imagens de microscopia eletrônica e os primeiros resultados sobre os efeitos de sua incorporação nessas bicamadas estão reportados nessa tese.

Finalmente, nos capítulos 8 e 9 o leitor irá encontrar as conclusões gerais dos trabalhos aqui apresentados, bem como nossas perspectivas sobre a continuação desses estudos. O leitor pode encontrar ainda, no final desta tese, 5 apêndices nos quais estão apresentados partes do tratamento matemático das técnicas experimentais usadas e uma série de resultados obtidos, os quais foram separados da sequência principal do texto para facilitar sua leitura. Um último apêndice foi incluído na forma de uma lista dos artigos publicados e manuscritos preparados durante meu período de doutoramento. Espero que o texto à seguir corresponda as expectativas do leitor.

Sebastião Antônio Mendanha Neto  
Goiânia, abril de 2014.

# Resumo

---

As interações de terpenos com membranas de eritrócito, fibroblastos, estrato córneo e membrana modelo composta de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina foram investigadas por meio das espectroscopias de ressonância paramagnética eletrônica e de fluorescência por meio do uso de sondas lipofílicas. Foi possível demonstrar que quando adicionados em altas concentrações à sistemas que possuem uma alta relação lipídio/solvente, terpenos como o 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, (+)-limoneno e nerolidol são capazes de se estabilizar em agregados moleculares capazes de extrair os lipídios das bicamadas. Estudos sobre o potencial hemolítico e citotóxico de vários terpenos demonstraram que os danos celulares causados por estas moléculas são dependentes da concentração e que dentre os terpenos estudados, nerolidol e terpineol são os mais hemolíticos e citotóxicos enquanto limoneno e cineol são os menos hemolíticos e citotóxicos. Entretanto, a baixa correlação entre estes dois testes indica que os processos envolvidos em cada caso não são totalmente dependentes. Ficou demonstrado ainda que uma vez incorporados nas membranas, os terpenos aumentam a fluidez das bicamadas lipídicas e diminuem a temperatura de sua transição de fase principal. Diferenças entre o aumento de fluidez promovido pelo sesquiterpeno nerolidol e por todos os monoterpenos estudados foram verificadas. Contudo, uma comparação entre o efeito dos monoterpenos estudados, não aponta para diferenças significativas entre suas capacidades de aumento de fluidez. Além disso, foi demonstrado através das microscopias confocal e de força atômica e da espectroscopia de fluorescência que a 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-(Nanopartículas Aurora) é melhor incorporada em membranas lipídicas em fase fluida e que a adição de 0,1% destas nanopartículas conjugadas não produz grandes variações na fluidez e não provoca mudanças morfológicas substanciais das bicamadas lipídicas.

# Abstract

---

The interactions of terpenes with membranes of erythrocyte, fibroblasts, stratum corneum and the model membranes of 1,2-dipalmitoyl*sn*-glycero-3-phosphocholine were investigated by using the the electron paramagnetic resonance and fluorescence spectroscopic of lipophilic probes. It has been shown that when added at high concentrations to systems having a high lipid/solvent ratio, terpenes such as 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, (+)-limonene and nerolidol are able to self-stabilize in molecular aggregates which can extract the bilayers lipids. Studies on the hemolytic and cytotoxic potential of various terpenes showed that cell damage caused by these molecules are concentration dependent and that among the studied terpenes, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol are the most hemolytic and cytotoxic, while (+)-limonene and 1,8-cineole are the least hemolytic and cytotoxic. However, the low correlation between these two tests indicates that the processes involved in each case are not completely dependent. It was also shown that once embedded in the membrane, terpenes increase the fluidity of lipid bilayers and decrease the temperature of the main phase transition. Differences between increased fluidity promoted by sesquiterpene nerolidol and all monoterpenes studied were observed. Meanwhile, in a comparison of the effect of the monoterpenes studied, no significant differences in their ability to increase membrane fluidity were detected. Furthermore, it was demonstrated by using confocal and atomic force microscopy and fluorescence spectroscopy that the 1,2-distearoyl*sn*-glycero-3-(Aurora nanoparticles) is better incorporated in lipid membranes under fluid phase and that the addition of 0.1% of these conjugated nanoparticles do not produces large variations in membrane fluidity and no causes substantial morphological changes of lipid bilayers.

# Capítulo **1**

## Introdução

---

## 1.1 Biofísica de Membranas Biológicas

Existem várias áreas de interface científica onde os físicos têm fornecido - e continuam fornecendo - diversas contribuições valorosas. Um exemplo desse tipo de aplicação é encontrado no estudo da termodinâmica, estrutura, dinâmica e comportamento funcional das membranas biológicas. A física das membranas biológicas é excepcionalmente interessante uma vez que elas se auto-organizam espontaneamente em solução aquosa e são quase bidimensionais, compostas de moléculas relativamente grandes mas flexíveis e que possuem vários graus de liberdade intramoleculares. Além disso, as membranas biológicas exibem um comportamento de fase complexo e incorporam biomoléculas grandes, tais como proteínas, sem comprometer sua integridade estrutural básica. Este nível de diversidade estrutural apresenta muitos desafios para aqueles que desejam investigar as propriedades físicas e químicas das biomembranas, além de apresentar a possibilidade de que novos modelos possam surgir a partir desses estudos [1].

As membranas biológicas têm sido quantitativamente estudadas experimentalmente por uma grande variedade de métodos [2-4]. Neste trabalho vamos utilizar as espectroscopias de ressonância de spin eletrônico e de fluorescência, bem como as microscopias de fluorescência confocal e de força atômica para avaliar a interação de terpenos e de uma nanopartícula de ouro conjugada com uma série de biomembranas.

### 1.1.1 Composição Lipídica das Membrana Biológicas

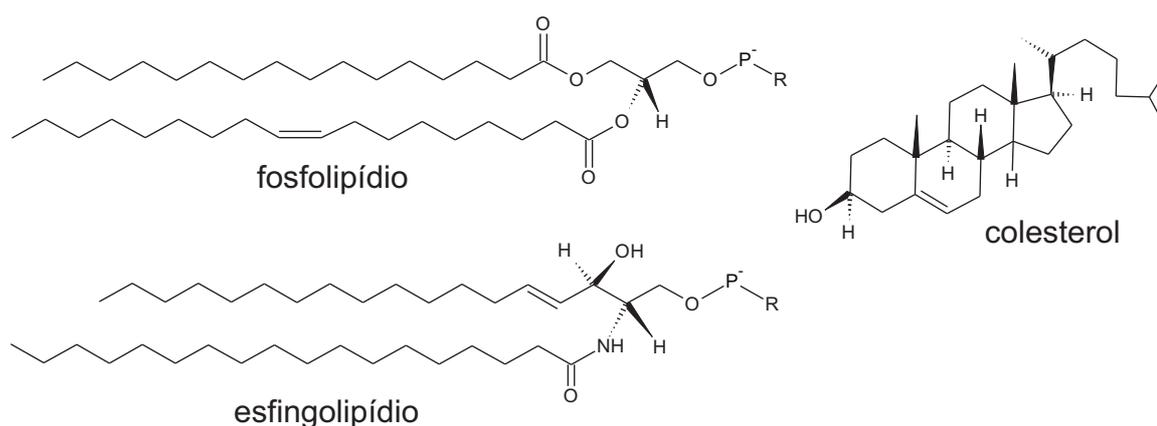
Biomembranas típicas são altamente heterogêneas em sua composição, mas sua matriz estrutural básica<sup>1</sup>, a bicamada lipídica, é a mesma em quase todas as células procariotas e eucariotas [1]. Bicamadas lipídicas são estruturadas por duas monocamadas opostas compostas por moléculas denominadas lipídios. Uma molécula de lipídio normal, geralmente tem peso molecular de cerca de 750 g/mol e é constituída por duas partes distintas - uma hidrofílica (solúvel em água) e outra hidrofóbica (insolúvel em água). A parte hidrofóbica é composta

---

<sup>1</sup>A visão conceitual de biomembranas com base no conceito bicamada lipídica, chamado de modelo de mosaico fluido, foi proposto pela primeira vez em 1972 por Singer e Nicholson [5].

por uma cadeia de grupos  $\text{CH}_2$  terminada por um grupo metila ( $\text{CH}_3$ ). Já a parte hidrofílica varia de lipídio para lipídio. Para o caso dos fosfolipídios, a parte hidrofílica pode conter entre outros grupos, fosfato e colina. Em pH neutro o fosfato carrega uma carga negativa líquida que é equilibrada por uma carga positiva líquida da colina. A natureza bipolar dos lipídios confere a essas moléculas um caráter anfifílico para se organizar em estruturas que protegem as regiões hidrofóbicas da água e maximizam o contato das regiões polares com a água.

Todas as membranas celulares contém glicerofosfolipídios, formados à partir da combinação de vários grupos ligados através do glicerol a duas cadeias acila, uma das quais é geralmente insaturada. Embora os glicerofosfolipídios sejam suficientes para formar bicamadas, a membrana plasmática da maioria das células eucarióticas contem ainda outras duas classes de lipídios - os esteróis e os esfingolipídios (Figura 1.1) [6].



**Figura 1.1:** Estruturas moleculares das principais classes de lipídios que compõem as membranas das células eucarióticas. Esteróis são baseados em uma estrutura de quatro anéis, com o colesterol sendo a forma presente em mamíferos. Glicerofosfolipídios são baseados no diacilglicerol e, tipicamente tem cadeias acila de 16-18 átomos de carbono, uma das quais contém uma ligação dupla cis. O grupo radical (R) pode ser neutro (serina ou inositol) ou positivo (etanolamina ou colina). Esfingolipídios são baseados na ceramida e, em mamíferos, o grupo (R) pode ser a colina (esfingomiéline) ou no caso dos glicoesfingolipídios a glicose. A cadeia acila ligada à base esfingóide é tipicamente saturada, variando entre 16-26 átomos de carbonos. Nos esfingolipídios verifica-se a presença de doadores (grupos hidroxila) e aceptores (grupos carbonil) de ligações de hidrogênio enquanto nos glicerofosfolipídios verifica-se a presença apenas de aceptores (grupo carbonil). Figura adaptada de *Lipid Rafts: Elusive or Illusive?* [6].

Esfingolipídios são baseados na ceramida e tem tanto a fosfocolina (esfingomiéline) ou uma série de estruturas de carboidratos (glicoesfingolipídios) como grupo polar. Os esteróis são baseados em uma estrutura rígida de quatro anéis, com o colesterol sendo a principal

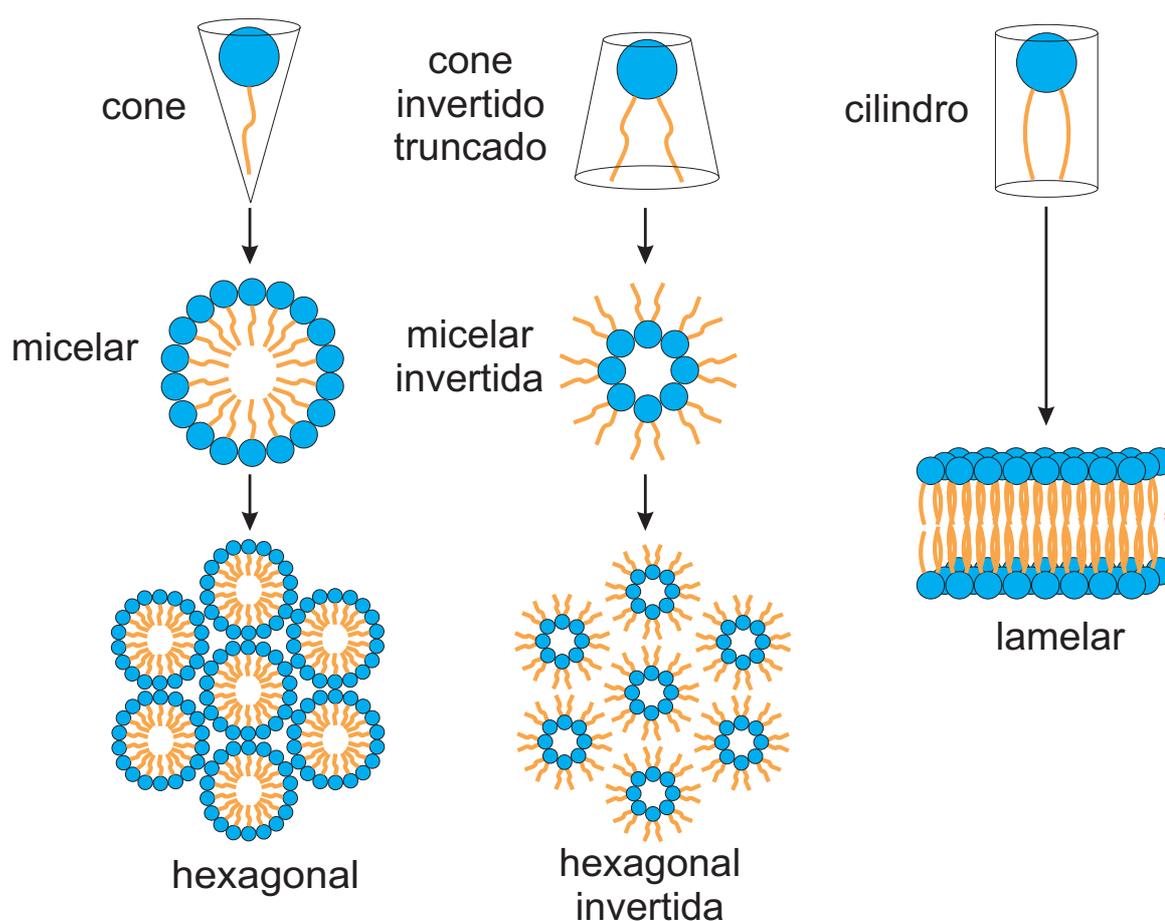
forma encontrada nos vertebrados. Embora os níveis precisos desses lipídios variem de acordo com o tipo de célula, o colesterol normalmente corresponde a 30-40 mol% dos lipídios da membrana plasmática [7,8]. A esfingomielina por sua vez, corresponde a 10-20 mol%, enquanto os glicoesfingolipídios estão normalmente presentes apenas em baixos níveis [9]. Além disso, as composições lipídicas das monocamadas que formam a membrana plasmática também são muito diferentes. A maioria, senão todos os esfingolipídios, estão presentes na monocamada externa, enquanto alguns dos glicerofosfolipídios estão restritos à monocamada interna [10]. Ao contrário dos fosfolipídios, o colesterol apresenta uma alta taxa de inversão espontânea entre as duas monocamadas [11].

### **1.1.2 Poliformismo e Movimentação dos Lipídios**

Devido à sua baixa solubilidade em água, quando dispersos em uma solução aquosa os lipídios se auto-agregam em diferentes estruturas, dependendo basicamente da força iônica e do pH da solução aquosa, da temperatura, da pressão, do nível de hidratação e de sua própria natureza geométrica. Dessa maneira, de acordo com as condições do sistema, os lípidos são ditos estar em uma fase particular. Essas fases são definidas por um arranjo espacial dos lipídios (sob condições de equilíbrio termodinâmico) e caracterizadas por propriedades físicas particulares.

As fases lipídicas podem ser classificadas de acordo com o tipo de rede, a ordem da cadeia e a curvatura da estrutura geral em que os lipídios se estruturam. Os principais tipos são as fases micelar, lamelar e hexagonal (Figura 1.2). Os lipídios das membranas celulares são basicamente organizados na fase lamelar. No entanto, alguns processos biológicos fundamentais tais como a fusão e a fissão de membranas [12] são caracterizados pela formação de estruturas não lamelares mais complexas tais como a fase hexagonal. A fase hexagonal também é verificada no complexo arranjo lipídico das membranas da camada mais superficial da pele (ver Seção 1.5).

Permutações entre as fases são chamadas transições de fase e ocorrem quando os parâmetros físicos específicos que definem uma determinada fase (tais como os coeficientes

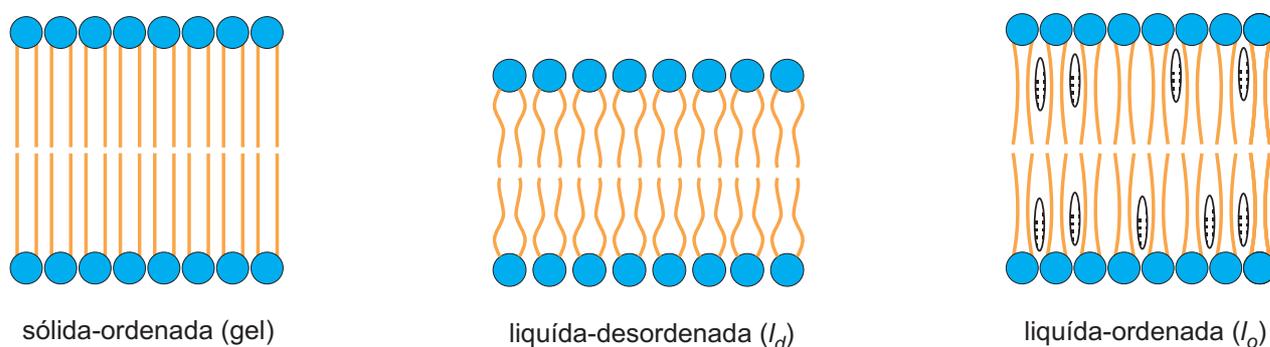


**Figura 1.2:** Poliformismo lipídico de acordo com a estrutura geométrica de cada tipo de molécula.

de ordem translacional e configuracional) são alteradas. Transições de fase podem ser induzidas por meio da mudança de temperatura (transições termotrópicas) e pressão (transições barotrópicas) do sistema ou ainda pela alteração na proporção dos solventes (transições liotrópicas). As transições termotrópicas são fortemente dependentes do comprimento da cadeia acila lipídica e de seu nível de insaturação, e sua caracterização para membranas compostas de um único ou de vários tipos de lipídio são importantes principalmente para situações onde os lipídios exibem transições termotrópicas na faixa de temperatura de relevância fisiológica ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ).

Membranas biológicas, sob condições de equilíbrio, são compostas de uma bicamada lipídica numa configuração lamelar. Elas, geralmente exibem duas fases: *sólida-ordenada* (gel) e *líquida* (*l*) (Figura 1.3). A fase gel é caracterizada por um alto grau de ordem translacional

(coeficiente de difusão translacional da ordem de  $10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s ou menor) e configuracional (alta razão trans/gauche nas cadeias acila), enquanto a fase  $l$  é caracterizada por menor ordem translacional (coeficiente de difusão translacional da ordem de  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s) e configuracional (baixa razão trans/gauche nas cadeias acila) [13]. Tem sido demonstrado que a fase gel parece não ter relevância fisiológica, e de fato, o empacotamento das cadeias acila dos lipídios reduz a temperatura de transição de fase principal  $T_m$  garantindo assim, a fase  $l$  da membrana em temperaturas fisiológicas [6].



**Figura 1.3:** Fases das bicamadas lipídicas. Bicamadas lipídicas que estão abaixo da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) formam uma fase sólido ordenada (gel) que acima da  $T_m$  passa a ser fase líquida-desordenada ( $l_d$ ) (também conhecida como líquida-cristalina). A presença de colesterol (estruturas ovais) ordena as cadeias acila da fase  $l_d$ , criando a fase líquida-ordenada ( $l_o$ ). Figura adaptada de *Lipid Rafts: Elusive or Illusive?* [6].

Membranas lipídicas que apresentam alta concentração de colesterol apresentam ainda uma terceira fase. O colesterol se relaciona de maneira distinta com os diferentes tipos de lipídios da membrana<sup>2</sup>, interagindo preferencialmente com lipídios de cadeias alifáticas totalmente saturadas, quando comparada com lipídios que tem uma ou mais cadeias insaturadas [14]. Além disso, a posição de uma dupla ligação em uma cadeia alifática e sua configuração será de suma importância no que diz respeito à interação dessa cadeia com o colesterol. Insaturações além do décimo quarto ou décimo quinto átomo de carbono na cadeia tem pouco ou nenhum efeito na interação com o colesterol [13].

Neste tipo de interação, a estrutura rígida do colesterol faz com que as cadeias acila dos fosfolipídios assumam uma forma mais (menos) compacta, reduzindo (aumentando) a superfície

<sup>2</sup>A interação dos glicerofosfolipídios com o colesterol por exemplo, diminui na seguinte ordem: fosfatidilcolina > fosfatidilserina > fosfatidiletanolamina [13].

ocupada pelo lipídio e aumentando (reduzindo) a espessura da bicamada na fase  $l$  (gel) [6,13]. O complexo condensado é estável em temperaturas abaixo da temperatura de transição de fase  $T_m$  dos lipídios e se dissocia endotermicamente acima dessa temperatura [13]. Além disso, a adição do colesterol reduz a entalpia da transição entre as fases gel e  $l$ , com total eliminação da transição de fase a partir da concentração de 50 mol% de colesterol [15]. Como as moléculas de colesterol ficam dispostas perpendicularmente à bicamada, o efeito de organização é direcional. Isto significa que as cadeias lipídicas não se deformam facilmente para permitir o movimento de pequenas moléculas através da membrana, mas os lipídios ainda podem se mover livremente uns sobre os outros. Portanto, o colesterol tem a propriedade marcante de ordenar a bicamada em uma dimensão e, conseqüentemente, diminuir (aumentar) a permeabilidade, enquanto tem um efeito mínimo (máximo) sobre a taxa de difusão lateral de proteínas e lipídios no plano da bicamada na fase  $l$  (gel) [15,16]. Esta nova fase, que surge da interação do colesterol com os outros lipídios é denominada fase *líquida-ordenada* ( $l_o$ ). A fase  $l_o$  possui propriedades intermediárias entre as fases gel e fluida. Desta forma, uma membrana que contém baixa concentração molar de colesterol é dita estar em uma fase *líquida-desordenada* ( $l_d$ ) (Figura 1.3).

Uma quantidade considerável de dados demonstram que o colesterol interage mais favoravelmente com a esfingomielina do que com outros fosfolipídios, tanto em bicamadas como em monocamadas [17–19]. O colesterol elimina a transição de fase da esfingomielina em misturas binárias com outros fosfolipídios, indicando uma interação preferencial. Além disso, a permeabilidade à água é menor em bicamadas esfingomielina/colesterol do que em membranas de fosfatidilcolina/colesterol, indicando um maior empacotamento lateral no primeiro sistema.

A razão para a preferência do colesterol pela esfingomielina perante a fosfatidilcolina está nas diferenças estruturais dessas moléculas lipídicas. A esfingomielina é um derivado da esfingosina (D-eritro-2-amino-*trans*-4-octadeceno-1,3-diol) onde um ácido graxo é ligado ao segundo grupo amina da esfingosina formando uma amida. Em esfingolipídios de mamíferos, esse ácido graxo é variável, mas geralmente é uma cadeia saturada com 16 a 24 carbonos com uma

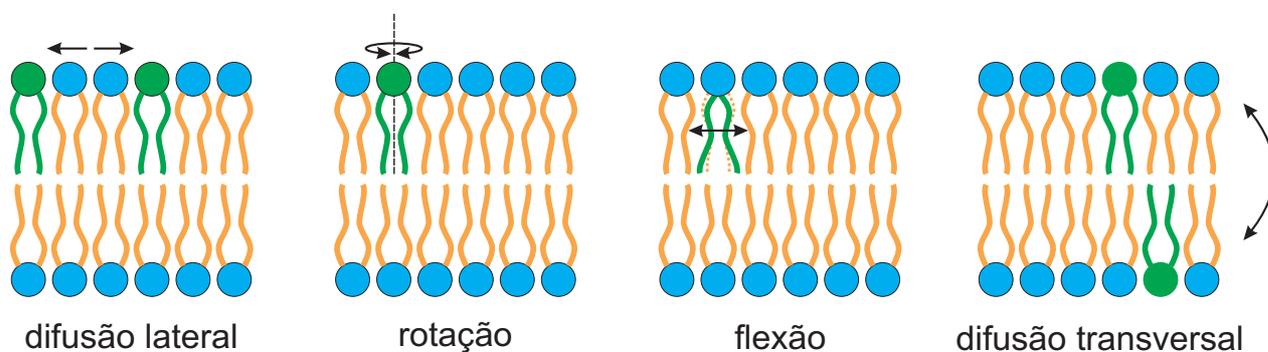
pequena fração de 24:1 <sup>$\Delta^{15cis}$</sup> , dependendo do tecido de origem. Assim, em termos da parte apolar das moléculas, esses lipídios apresentam cadeias alifáticas bastante longas e totalmente saturadas (com uma insaturação *trans* na base de esfingosina). Quando uma insaturação *cis* aparece, ela está localizada, mais profundamente na bicamada. Já as fosfatidilcolinas monoin-saturadas, as quais são as principais espécies lipídicas em membranas de células de mamíferos, geralmente têm uma ligação dupla *cis* na posição  $\Delta^9$  de um dos ácidos graxos e pode ter mais ligações duplas em posições mais profundas da cadeia acila.

Se considerarmos a ligação de hidrogênio como uma interação estrutural estabilizadora, a parte polar dos lipídios também tem importância na formação de estruturas ordenadas na membrana. Os lipídios baseados na esfingosina por exemplo, os quais possuem um grupo hidroxila e um grupo amida (ambos podendo atuar como doadores ou aceptores de ligações de hidrogênio) apresentam a habilidade de se ligar diretamente aos lipídios vizinhos via interação de hidrogênio na interface aquosa da bicamada. Por outro lado, as fosfatidilcolinas possuem apenas um grupo carbonila e átomos de oxigênio (podendo atuar somente como aceptores de ligação de hidrogênio) e não se ligam diretamente aos lipídios vizinhos [13]. Portanto, os esfingolipídios se apresentam como parceiros ideais para a interação com o colesterol.

Tem sido demonstrado que esta fase  $l_o$  tem uma ordem translacional ligeiramente maior quando comparada com a fase  $l$  livre de colesterol (coeficiente de difusão translacional cerca de duas vezes menor) e uma ordem configuracional comparável a de uma fase gel [13]. Não há, no entanto, uma definição exata em termos de frequências esperadas ou parâmetros de ordem para se distinguir rigidamente bicamadas em fase  $l_d$  de bicamadas em fase  $l_o$ .

Além disso, a fluidez da membrana permite que os lipídios e as proteínas se movam ao longo do plano da bicamada e entre as monocamadas (no caso de alguns lipídios específicos). O movimento em uma bicamada lipídica pode ser classificado em difusão lateral, rotação, flexão e difusão transversal (*flip-flop*) (Figura 1.4). A difusão lateral é um processo muito rápido e permite que a heterogeneidade da membrana ocorra [3]. Esse tipo de movimento permite que lipídios se movam no plano da monocamada na qual estão inseridos. O movimento de rotação

dos lípidos reflete o seu movimento ao longo do seu eixo perpendicular à bicamada e permite que as interações lipídio-lipídio aconteçam. Já o movimento de flexão, reflete o movimento das cadeias acila associadas aos glicerofosfolípidos, glicoglicerolípídios e esfingolípídios. Essa propriedade é fortemente dependente do comprimento da cadeia acila, de seu grau de saturação e da temperatura. O movimento transversal, por sua vez, refere-se aos lípidos que se deslocam entre as monocamadas da membrana. Esse tipo de movimento é energeticamente desfavorável, uma vez que o grupo polar do lipídio deve atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana, portanto, é um processo muito lento, com um tempo médio de duração de horas. O movimento transversal dos lípidios é de grande importância, por exemplo, na resposta apoptótica de uma célula, em que a exteriorização de fosfatidilserina, um fosfolípido presente apenas na monocamada interna das membranas plasmáticas, é necessária para potencializar o reconhecimento celular dos macrófagos. *Flippases*, *floppases* e *scramblases* são alguns tipos de proteínas que catalisam o movimento transversal dos lipídios [20].



**Figura 1.4:** Tipos de movimento realizados pelos lipídios nas bicamadas.

### 1.1.3 Domínios Lipídicos

As membranas celulares não são completamente homogêneas podendo apresentar então heterogeneidades laterais denominadas domínios de membrana [21]. Tais estruturas tem recebido grande atenção da comunidade científica desde a proposta da hipótese dos *lipid RAFTS* - domínios lipídicos ricos em esfingomiéline e colesterol [6]. A grande quantidade de trabalhos dedicados ao estudo deste tipo de domínio lipídico acabou criando uma terminologia confusa

para se referir aos domínios de membrana. Termos tais como domínios de membrana, plataformas lipídicas, domínios lipídicos, domínios em fase líquida-ordenada e membranas resistentes a detergentes são frequentemente usadas indistintamente para referir-se a estruturas semelhantes porém essencialmente distintas. Neste estudo, vamos utilizar a terminologia domínio lipídico/fase lipídica para nos referir a heterogeneidades da membrana lateralmente segregadas e que possuem concentrações de lipídios específicos.

Uma vez que bicamadas multicomponentes são sistemas mesoscópicos bidimensionais, elas podem apresentar várias fases ou mesmo a coexistência de fases em estreita analogia com sistemas macroscópicos tridimensionais<sup>3</sup>. Se a composição da membrana permite a coexistência de fases, pode-se encontrar diferentes tipos de domínios nas bicamadas, ou seja, regiões ou zonas lateralmente estendidas dentro da membrana que diferem em composição lipídica [22].

Domínios formados à partir da separação lateral dos lipídios podem se formar em membranas biológicas todo o tempo, mas tendo em conta os altos coeficientes de difusão dos lipídios (cerca de  $5 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s), um domínio desse tipo, formado em uma pequena área, digamos 10000 Å<sup>2</sup>, (o que corresponde a cerca de 150 lipídios) desapareceria em menos de 10 μs [23]. Esse pode ser um sinal transiente útil para o citoplasma. No entanto, se estes domínios contribuem para a organização estrutural da membrana, seu tempo de vida deve ser significativamente mais longo. Isto é, eles podem começar como domínios cinéticos, mas interações de estabilização termodinâmica devem estar presentes para assegurar um tempo de vida suficientemente longo para o domínio. Num sistema em equilíbrio termodinâmico, os domínios podem se formar simplesmente pela interação diferencial entre os componentes da membrana (como no caso da interação preferencial entre o colesterol e a esfingomielina,

---

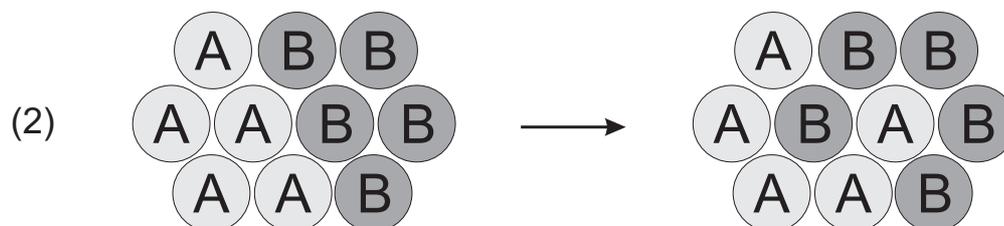
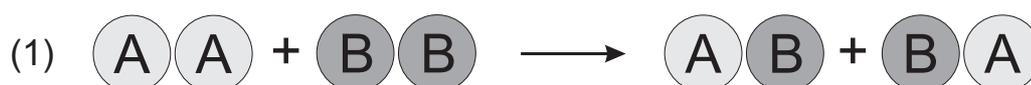
<sup>3</sup>No contexto da termodinâmica uma fase é sempre um sistema macroscópico que consiste em um grande número de moléculas. No entanto, em bicamadas lipídicas, as fases muitas vezes tendem a ser fragmentadas em pequenos domínios (algumas milhares de moléculas) onde cada qual, por si só, não tem um número suficiente de moléculas para satisfazer estritamente a definição termodinâmica de fase. Na ausência de melhor descrição para este tipo de estado mesoscópico, e assumindo que há um número grande de domínios em um determinado sistema, os domínios podem ser tratados como se fizessem parte de uma fase macroscópica, de forma que as mesmas propriedades atribuídas aos domínios possam descrever a fase. Esta definição é provavelmente adequada, desde que os domínios não se tornem muito pequenos. Por exemplo, em uma bicamada onde coexistam as fases  $l_d/l_o$ , a fase líquido-ordenada compreende todos os domínios (pequenos ou grandes) da fase *RAFT* e o resto da membrana que envolve estes domínios é dita estar na fase líquida,  $l_d$  [13].

discutida anteriormente).

Considere por exemplo uma molécula de lipídio em uma das monocamadas da membrana, cercada por seis lipídios vizinhos mais próximos<sup>4</sup>. Se os lipídios forem de duas espécies diferentes, por exemplo, A e B ambos em fase fluida, existem três interações lipídio-lipídio envolvidas: AA, AB e BB. Contudo, apenas a diferença entre a interação AB e a média das interações AA e BB são necessárias para descrever o sistema (Figura 1.5). A variação da energia livre de Gibbs padrão<sup>5</sup> por molécula para esta reação é dada por

$$\Delta G^\circ = g_{AB} - \frac{1}{2}(g_{AA} + g_{BB}), \quad (1.1)$$

em que  $g_{AA}$  e  $g_{BB}$  são as energias livres de Gibbs da interação entre duas moléculas A ou duas moléculas B e  $g_{AB}$  é a energia livre da interação entre uma molécula A e uma molécula B.



**Figura 1.5:** (1) Representação da reação de troca entre dois pares de lipídios semelhantes que produz dois pares de lipídios contrários. Esta reação define a energia livre de Gibbs de interação,  $\omega_{AB}$ . (2) Reação de troca entre dois lipídios. A diferença de energia livre entre as configurações inicial e final é um múltiplo de  $\omega_{AB}$ . Figura adaptada de *Thermodynamics of membrane domains* [23].

Podemos definir um parâmetro,  $\omega_{AB}$ , para representar a variação da energia livre de Gibbs da interação entre vizinhos mais próximos para lipídios de tipos diferentes. É este parâmetro que determina se os lipídios A e B tendem a se misturar ou a se separar em domínios.

<sup>4</sup>Como discutido por Jerala e co-autores, apenas as cadeias acila dos lipídios estão em uma rede triangular regular na fase gel. Entretanto o erro introduzido por esta aproximação é desprezível [24].

<sup>5</sup>A energia livre de Gibbs padrão,  $G^\circ$ , é a energia livre de Gibbs de um componente  $i$  em um estado de referência (por exemplo,  $[X_i] = 1 \text{ M}$ ).

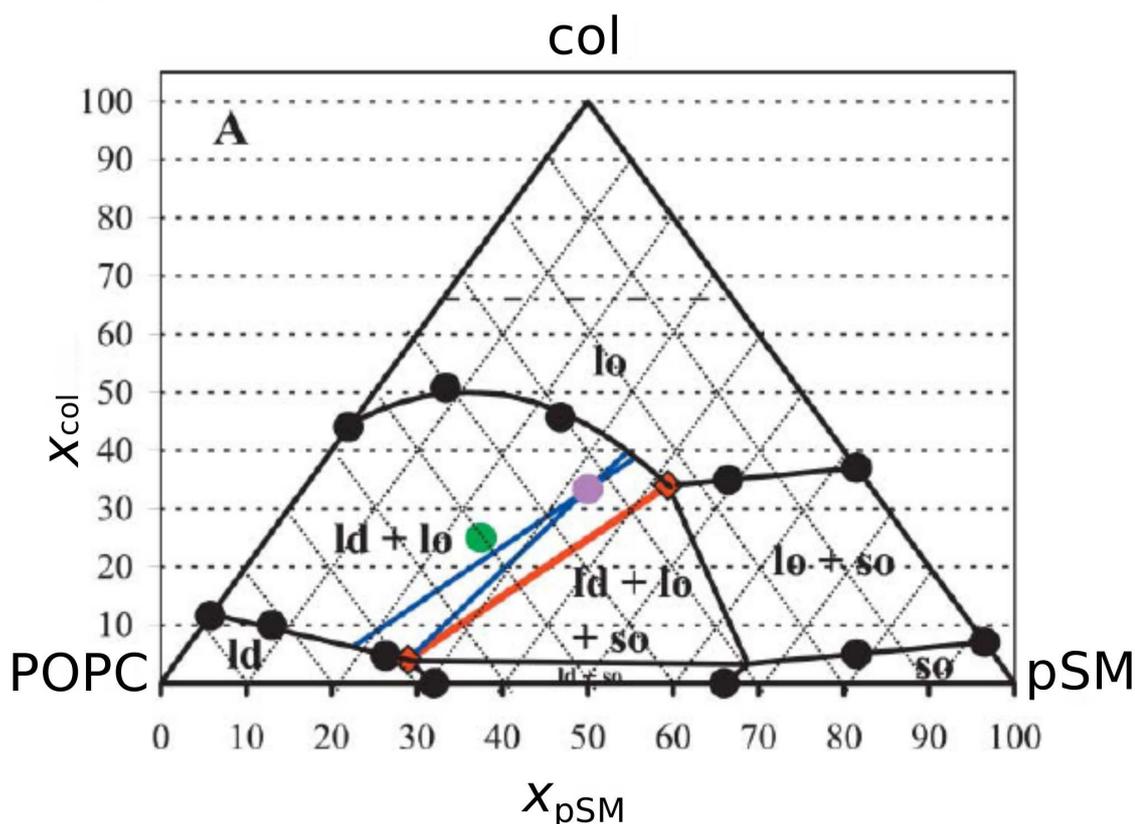
Se analisarmos a segunda situação mostrada na Figura 1.5, verificamos que a variação na energia livre de Gibbs para a troca de posição entre dois lipídios vizinhos é

$$\begin{aligned}
 \Delta G^\circ &= G_f^\circ - G_i^\circ \\
 &= 4g_{AA} + 4g_{BB} + 11g_{AB} - (7g_{AA} + 7g_{BB} + 5g_{AB}) \\
 &= 6g_{AB} - 3g_{AA} - 3g_{BB} = 6\omega_{AB}
 \end{aligned} \tag{1.2}$$

O lado direito da Figura 1.5 é favorecido pelo aumento da entropia. Entretanto, se  $\omega_{AB}$  for positivo, o lado esquerdo da Figura 1.5 é favorecido uma vez que a probabilidade de reação é proporcional à  $e^{-\Delta G^\circ/RT}$  ( $R$  representa a constante dos gases e  $T$  a temperatura). Ou seja, a separação lateral de fase entre A e B irá acontecer sempre que  $\omega_{AB}$  for positivo. Note que  $\omega_{AB} = 0$  implica em uma mistura aleatória e que  $\omega_{AB} < 0$  induz a formação de um padrão AB na forma de um tabuleiro de xadrez [23]. Se a geometria do sistema for mais complicada, tal como seria o resultado da introdução de uma proteína transmembranar na bicamada ou se mais componentes lipídicos são introduzidos, este formalismo deve ser ajustado e mais parâmetros do tipo  $\omega_{AB}$  devem ser incluídos. No entanto, o princípio básico continua o mesmo e é suficiente para entender a termodinâmica da formação dos domínios lipídicos. Já a origem física de  $\omega_{AB}$  parece estar relacionada com o descompasso entre as espessuras hidrofóbicas dos componentes da membrana (lipídios e proteínas integrais) [25]. Este descompasso hidrofóbico surge por exemplo, quando dois lípidos com diferentes comprimentos de cadeia são colocados lado-a-lado (como no caso da interação esfingomiéline-colesterol que leva a formação da fase  $l_o$  descrita anteriormente). Além do descompasso hidrofóbico, podem ser adicionados à  $\omega_{AB}$  os efeitos relacionados a entropia da cadeia lipídica e ao empacotamento entre as cadeias de lipídicas e as superfícies hidrofóbicas das proteínas. Entretanto, estes efeitos tem sido muito menos investigados e mais pesquisa nesta área é necessária [23].

O ponto de partida na caracterização das fases/domínios lipídicos é a construção do diagrama de fases (Figura 1.6). Diagramas de fases podem ser construídos a partir do comportamento termodinâmico das membranas lipídicas obtidos por meio de técnicas como a calorime-

tria diferencial, a ressonância magnética nuclear, a ressonância paramagnética eletrônica ou a fluorescência. As espectroscopias de fluorescência e de a ressonância paramagnética eletrônica envolvem o uso de sondas, mas isso não é um obstáculo para a obtenção de dados relevantes, uma vez que a alta sensibilidade destas técnicas permite que o sistema seja minimamente perturbado [26].



**Figura 1.6:** Diagrama de fases construído por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência para composição lipídica esfingomiéline:1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina:colesterol (POPC:pSM:col) a 23 °C. O ponto púrpura marca a composição 1:1:1 enquanto o ponto verde marca a composição 2:1:1. A linha pontilhada horizontal ( $x_{col}=0,66$ ) representa o limite da solubilidade do colesterol na bicamada lipídica. Figura adaptada de *Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts* [27].

A determinação dos limites da fase é o primeiro passo para construção de um diagrama de fases. Para isto, pode-se utilizar a representação gráfica da dependência de um determinado parâmetro da composição lipídica, o qual pode mostrar uma mudança abrupta sempre que a fronteira da fase é cruzada. Um exemplo de um diagrama de fases construído através da técnica de fluorescência para a mistura ternária esfingomiéline:1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina:colesterol está representado na Figura 1.6.

## 1.2 Membranas Modelo

Desde que as membranas celulares são um sistema complexo, grande parte dos estudos acerca de sua estrutura e função são realizados em sistemas simples denominados membranas modelo. Os lipossomas são uns dos tipos de membrana modelo mais simples e são obtidos espontaneamente quando lipídios com estrutura cilíndrica são expostos a um ambiente aquoso. Eles foram primeiramente observados em 1964 por Bangham e colaboradores [28] em suspensões de lecitina e sua estrutura de bicamada esférica minimiza as interações desfavoráveis entre a região hidrofóbica dos lipídios e as moléculas de água. As propriedades da bicamada tais como a fluidez, a densidade de carga e a permeabilidade são determinadas pelos grupos polares e pelas cadeias hidrofóbicas dos lipídios que formam o lipossoma. Dependendo do método de preparação, os lipossomas podem assumir diferentes diâmetros e possuir uma única ou várias bicamadas ou lamelas. Lipossomas compostos por várias estruturas lamelares concêntricas são denominados vesículas multilamelares (MLV's)<sup>6</sup>. Após a hidratação dos lipídios, as MLV's são formadas espontaneamente geralmente contendo entre 7 e 10 bicamadas concêntricas, cada uma delas separadas por uma fina camada de água. As MLV's possuem um diâmetro médio de cerca de 700 nm, que pode variar entre 100-5000 nm.

As MLV's são bastante utilizadas pois sua preparação é fácil e rápida. Entretanto este tipo de modelo apresenta uma desvantagem importante. Quando as MLV's são tratadas com algum tipo de agente de solubilização, ou quando se está interessado no efeito de proteínas ligadas a estas vesículas, apenas os efeitos de interação com os lípidos da bicamada mais externa estão sendo contabilizados. Para superar este problema, vesículas unilamelares são geralmente utilizadas. As vesículas unilamelares podem ser classificadas de acordo com o seu diâmetro em pequenas (SUV's)<sup>7</sup>, grandes (LUV's)<sup>8</sup> e gigantes (GUV's)<sup>9</sup> (Figura 1.7). As SUV's possuem diâmetros médios de 60 nm, as LUV's diâmetros entre 60 e 500 nm e as GUV's diâmetros

---

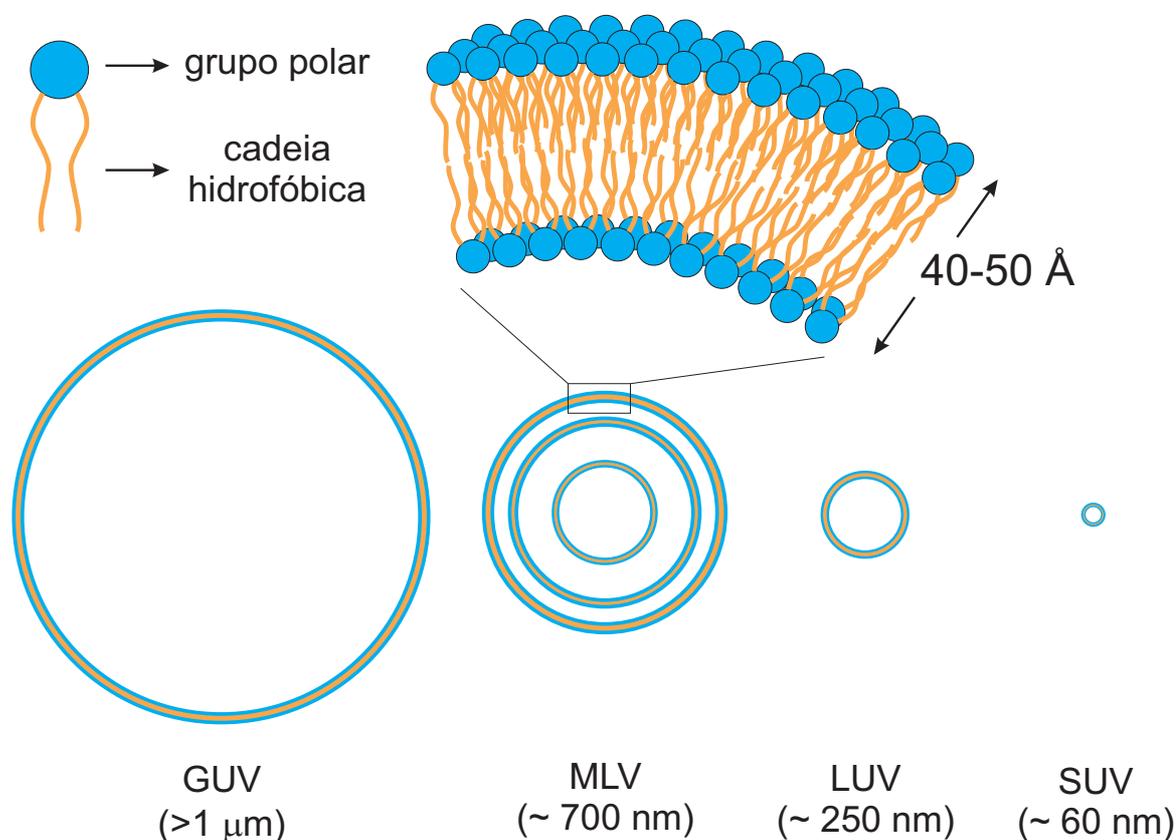
<sup>6</sup>Sigla para *Multilamellar Vesicles*.

<sup>7</sup>Sigla para *Small Unilamellar Vesicles*.

<sup>8</sup>Sigla para *Large Unilamellar Vesicles*.

<sup>9</sup>Sigla para *Giant Unilamellar Vesicles*.

superiores a  $1 \mu\text{m}$ . Neste trabalho estamos utilizando MLV's, SUV's, LUV's e GUV'S compostas de diferentes tipos de lipídios (ver Capítulos 4, 5, 6 e 7 para métodos de preparação).



**Figura 1.7:** Representação (em escala de comparação) dos tipos de vesículas utilizadas neste trabalho.

Devido ao seu pequeno diâmetro as SUV's apresentam uma tensão de curvatura elevada, o que induz uma maior concentração lipídica na monocamada externa [29]. SUV's são um bom modelo para o estudo de fusão/fissão de vesículas. As SUV's são geralmente preparadas através da sonicação de suspensões de MLV's. Ao contrário das SUV's as LUV's apresentam baixa tensão de curvatura e uma distribuição homogênea dos lipídios em cada uma das monocamadas. Desta forma, as LUV's representam um ótimo modelo para uma grande gama de estudos. As LUV's geralmente são geradas através da extrusão de suspensões de MLV's através de filtros de policarbonato com poros de tamanhos adequados.

As GUV's tem sido exploradas como principal tipo de modelo para o estudo da heterogeneidade da membrana [30]. Uma vez que suas dimensões são comparáveis as dimensões

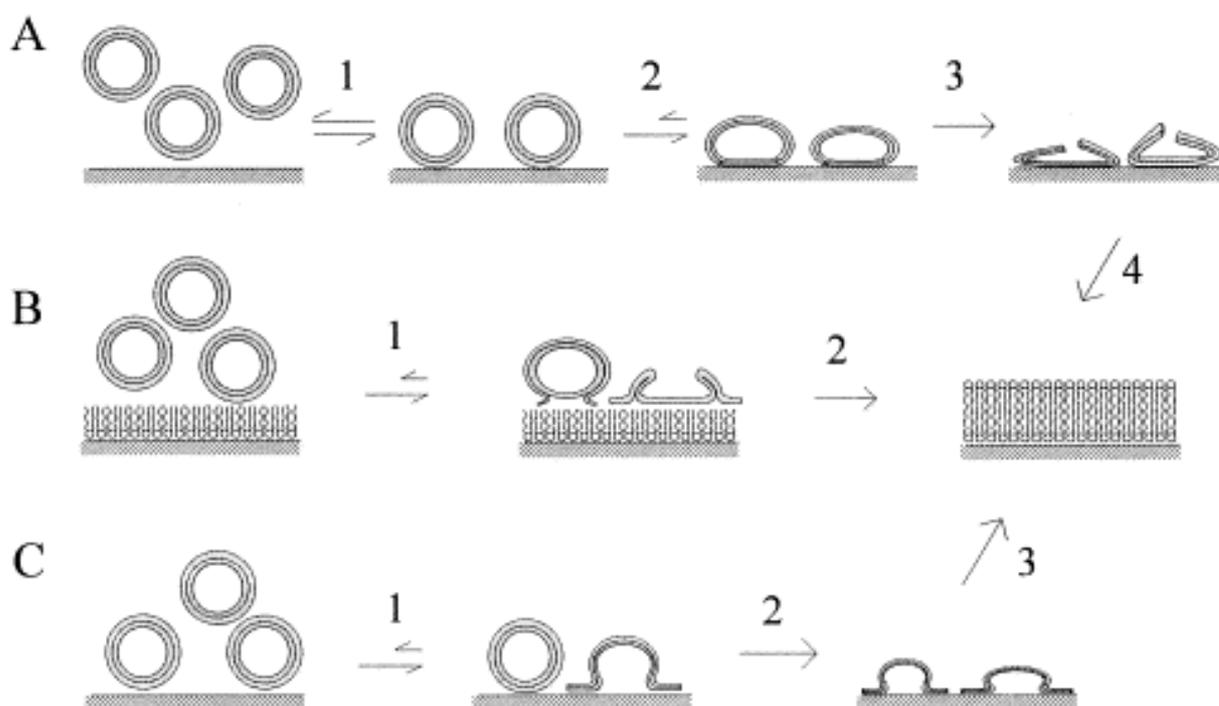
celulares, este tipo de vesícula permite a realização de microscopia direta em vesículas individuais. A geração de GUV's foi primeiramente descrita por Reeves e Dowben [31] expondo filmes lipídicos à soluções aquosas em temperaturas superiores a temperatura de transição de fase principal dos lipídios durante um período de 24 horas. Entretanto, este método gera vesículas com baixa concentração lipídica e distribuição de tamanho muita heterogênea. Um método de preparação alternativo foi desenvolvido por Angelova e Dimitrov [32] no qual as vesículas são formadas com base na exposição dos filmes lipídicos a uma solução aquosa na presença de campos elétricos. Esta metodologia é muito mais rápida do que a anterior e as vesículas formadas possuem maior concentração lipídica e uma distribuição de tamanho mais homogênea. A geração de vesículas na presença de campos elétricos é fortemente dependente da composição lipídica empregada, da força iônica da solução aquosa e também da tensão elétrica [33].

Outro tipo de membrana modelo comumente usada nos estudos biofísicos são as bicamadas lipídicas suportadas (SPB's)<sup>10</sup>. As SPB's podem ser preparadas pelo método de Langmuir-Blodgett [34] bem como pela adsorção de lipossomas em superfícies adequadas (método utilizado neste trabalho) [35]. A adsorção de lipossomas em superfícies hidrofílicas (como é o caso do substrato de mica) podem resultar em bicamadas que preservam ou não a orientação prévia em que suas monocamadas se encontravam nos lipossomas (Figura 1.8A e C). Já a adsorção de vesículas em superfícies hidrofóbicas (Figura 1.8B) impõe a fixação e espalhamento de cada monocamada durante a ruptura dos lipossomas. O mecanismo exato pelo qual esse processo energeticamente desfavorável ocorre ainda não foi completamente elucidado. Uma possível explicação está associada a forte deformação que as vesículas sofrem durante o processo de adsorção. Em determinado momento do processo, há uma sobreposição das bicamadas dos polos opostos da vesícula levando ao rompimento do lipossoma devido à elevada tensão de curvatura [36].

A composição lipídica dos lipossomas, as características da superfície de adsorção, o tamanho das vesículas, a temperatura, a pressão osmótica e a presença de íons de cálcio são

---

<sup>10</sup>Sigla para *Supported Planar Bilayers*.



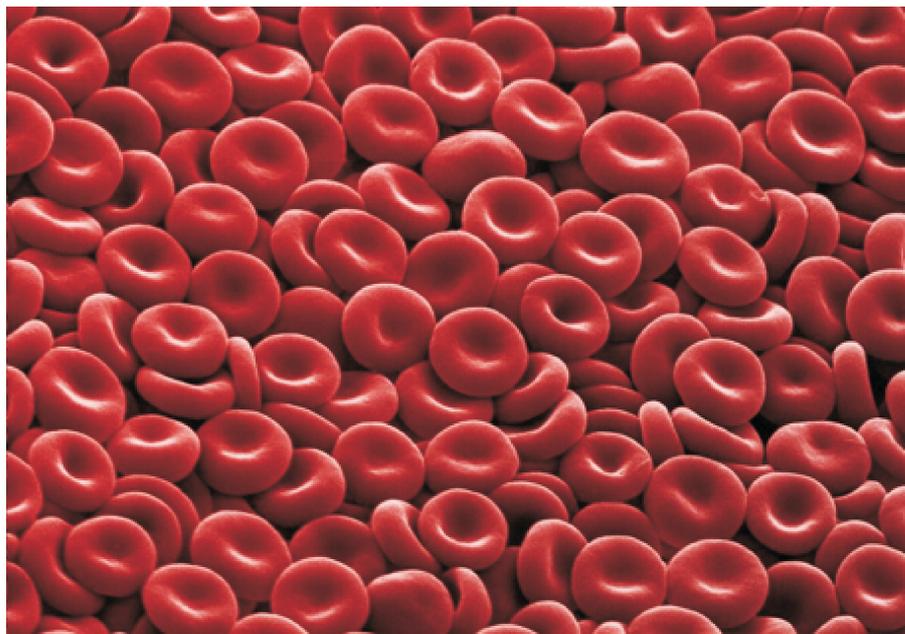
**Figura 1.8:** Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a formação SPB's através da adsorção de lipossomas em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. Os desenhos não estão em escala. Os lipídios estão ampliados cerca de 50 vezes em relação aos lipossomas. (A) adsorção de vesículas em uma superfície hidrofílica na qual a orientação das monocamadas é invertida; (B) adsorção de vesículas em uma superfície hidrofóbica; (C) adsorção de vesículas em uma superfície hidrofílica na qual a orientação das monocamadas é preservada. Figura retirada de *Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes - factors of importance for kinetics and stability* [37].

alguns dos fatores que influenciam a adsorção dos lipossomas [37, 38]. Tipicamente, SPB's formadas à partir do método de adsorção mantém uma camada de água ( $\sim 10 \text{ \AA}$ ) entre o substrato e a superfície da membrana adjacente [39]. Este tipo de SPB é muito estável (dias ou meses), em meio aquoso mas instável na presença de detergentes ou ar. A mobilidade lateral dos lípidos no interior da bicamada é mantida permitindo que as moléculas da membrana se difundam normalmente [40].

### 1.3 Membranas de Eritrócito

Os eritrócitos (Figura 1.9) são as células mais abundantes e especializadas do corpo humano. São compostos por água (721 mg/mL do eritrócito), proteínas (321 mg/mL do eritrócito), lipídios (5,1 mg/mL do eritrócito) e carboidratos (80 mg/mL do eritrócito) [41]. Sua

principal função é transportar oxigênio ( $O_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Por não possuírem núcleo, ribossomos e mitocôndrias os eritrócitos não possuem capacidade de divisão celular, síntese de proteínas e reações oxidativas mitocondriais necessitando assim, serem constantemente renovados pelo organismo [42].

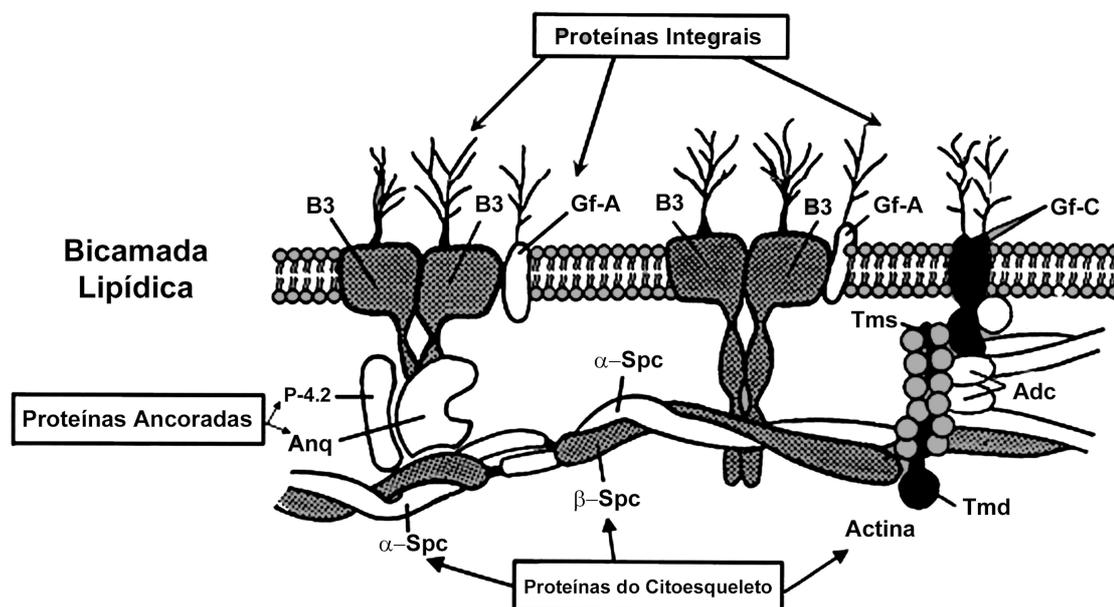


**Figura 1.9:** Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos normais mostrando sua forma de disco bicôncavo (Créditos da imagem: Annie Cavanagh, Wellcome Images [43]).

A organização estrutural da membrana celular dos eritrócitos permite que eles sofram grandes deformações mantendo sua integridade estrutural durante sua permanência de quatro meses no sistema circulatório. Essa membrana consiste em uma bicamada lipídica composta por 19.5% (peso/peso) de água, 39.6% de proteínas, 35.1% de lipídios e 5.8% de carboidratos [41].

As proteínas da membrana do eritrócito podem ser classificadas em três categorias de acordo com suas propriedades funcionais na ultra-estrutura da membrana. O primeiro grupo é formado pelas proteínas que compõem o citoesqueleto, entre as quais estão as espectrinas (cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ ), as proteínas banda 4.1 e a actina. Essas proteínas se associam especificamente entre si para formar um citoesqueleto localizado diretamente abaixo da bicamada lipídica. O segundo grupo é composto por proteínas integrais inseridas na membrana lipídica através dos domínios hidrofóbicos de suas sequências de amino-ácidos. Exemplos típicos deste grupo são

a proteína banda 3 e as glicoforinas. O último grupo, o das proteínas ancoradas, é formado



**Figura 1.10:** Modelo esquemático da bicamada lipídica e das proteínas integrais, ancoradas e do citoesqueleto que constituem a membrana do eritrócito. Proteínas integrais; B3: banda 3, Gf-A: glicoforina A e Gf-C: glicoforina-C. Proteínas ancoradas; Anq: anquirina e P-4.2: proteína 4.2. Proteínas do citoesqueleto;  $\alpha$ -Spc:  $\alpha$ -espectrina,  $\beta$ -Spc:  $\beta$ -espectrina, Adc: aductina, Tms: tropomiosina e Tmd: tropomodulina (Figura adaptada de *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model* [41]).

por proteínas que se conectam com as proteínas integrais e com as proteínas do citoesqueleto. Os exemplos mais representativos desse grupo são a anquirina e a banda 4.2 (Figura 1.10). Cada um desses três conjuntos de proteína tem um importante papel no controle da forma da célula, na ligação com outras células e substratos e na organização de domínios específicos da membrana [41, 42].

No que diz respeito aos lipídios da membrana do eritrócito, é sabido que o total de lipídios nos glóbulos vermelhos é aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  mg/célula. A bicamada lipídica é composta por aproximadamente 60% de fosfolipídios, 30% de colesterol e o restante principalmente por glicolipídios. Enquanto o colesterol é igualmente distribuído entre as duas camadas, os fosfolipídios são dispostos assimetricamente. A fosfatidilcolina e a esfingomiélnina estão predominantemente localizadas na monocamada exterior, enquanto a maioria da fosfatidiletanolamina e da fosfatidilserina se limita a monocamada interior. A maioria dos fosfolipídios da membrana do eritrócito tem duas cadeias de ácidos graxos, as quais são ligadas a uma estrutura

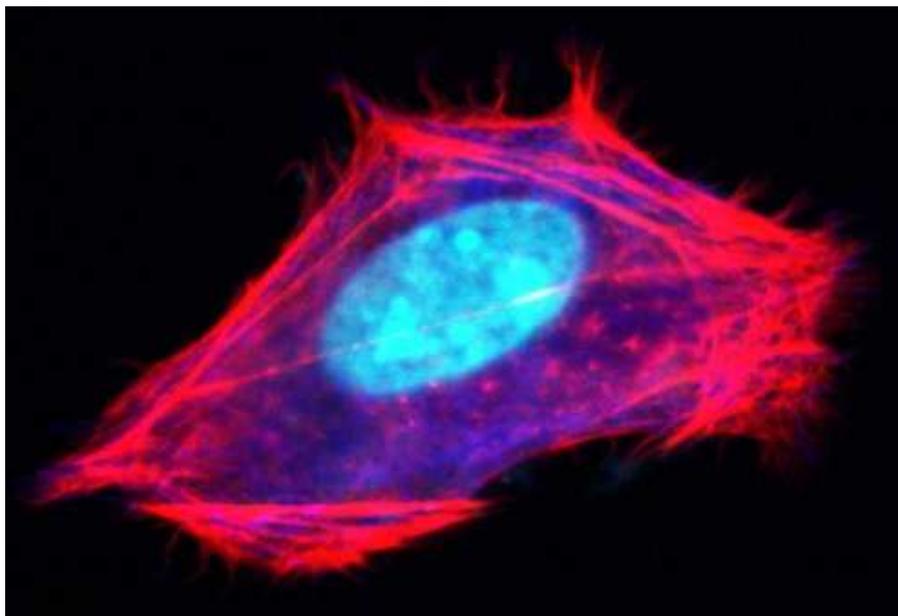
de glicerol. O estado de saturação (saturado ou insaturado) desses ácidos graxos e o tamanho de suas cadeias afetam significativamente o grau de fluidez da membrana. À medida que o grau de insaturação aumenta, o empacotamento das cadeias hidrofóbicas da bicamada diminui cada vez mais, aumentando assim a fluidez da membrana [41].

Os lipídios da membrana do eritrócito podem interagir com as proteínas integrais localizadas na bicamada (especialmente a banda 3) para formar canais de transporte através da bicamada lipídica. Outras proteínas, particularmente a banda 4.1 e a espectrina, as quais estão ligadas à superfície da bicamada, se ligam preferencialmente a fosfolipídios aniônicos, conferindo uma topografia extremamente específica à monocamada interior da membrana das células vermelhas [41]. Neste trabalho, estamos usando eritrócitos humanos obtidos através de bancos de sangue (ver Capítulo 5 para protocolo de utilização).

## 1.4 Membranas de Fibroblastos

Algumas das células diferenciadas no organismo adulto podem ser agrupadas em famílias cujos membros estão intimamente relacionados por sua origem e caráter. Um exemplo importante é a família de células do tecido conjuntivo, cujos membros não são apenas relacionados, mas também extraordinariamente interconversíveis [44]. Neste grupo estão incluídos os fibroblastos (Figura 1.11), células especializadas para a secreção de matriz extracelular não rígida que é rica em colágeno tipo I e/ou III [45].

Os fibroblastos são encontrados em todos os tecidos do corpo e, dependendo da sua localização assume várias morfologias [47,48]. Quando um tecido é lesionado, os fibroblastos se proliferam nas proximidades, migram para dentro da ferida e produzem grandes quantidades de matriz de colágeno, o que ajuda a isolar e reparar o tecido danificado. A sua capacidade de prosperar em lesões, juntamente com o estilo proliferativo, podem explicar por que os fibroblastos são as células mais fáceis para se cultivar em laboratório tornando-as ideais para estudos biológicos celulares [44]. Neste trabalho estamos usando fibroblastos Balb/c 3T3-A31 cedidos pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia da



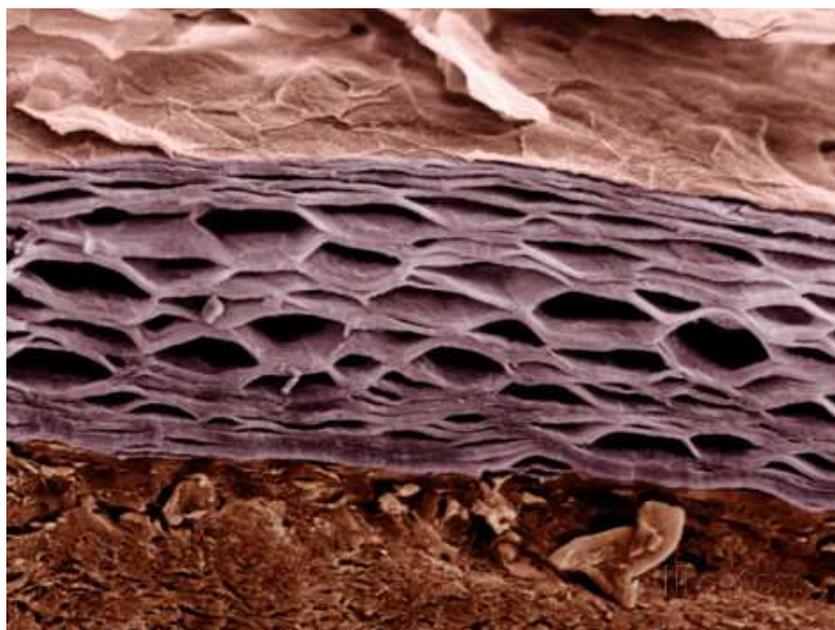
**Figura 1.11:** Micrografia confocal de uma célula de fibroblastos 3T3 antes da divisão em cultura. O núcleo foi marcado de azul, enquanto os microfilamentos de actina que fazem parte do citoesqueleto foram marcados de vermelho. O citoesqueleto forma a estrutura interna da célula, dando-lhe forma. (Créditos da imagem: David Becker, Wellcome Images [46]).

Universidade Federal de Goiás (ver Capítulo 5 para protocolo de cultivo), os quais fazem parte de uma linhagem celular estabelecida por Todaro e Green [49].

## 1.5 Membranas de Estrato Córneo

Formada por camadas anatomicamente distintas, a pele humana é a barreira orgânica que permite a regulação da perda transdermal de água e da temperatura do nosso corpo, além de efetuar a proteção necessária contra os efeitos nocivos da radiação solar e de agentes químicos externos ou micro-organismos. A maior barreira para a penetração de agentes químicos através da pele é fornecida por sua camada mais superficial (10-20  $\mu\text{m}$  de espessura), o estrato córneo (EC) (Figura 1.12). Logo abaixo do EC está a epiderme (50-100  $\mu\text{m}$  de espessura) a qual é responsável pela geração do EC. A derme (1-2 mm de espessura) é adjacente a epiderme e dá o suporte mecânico para a pele.

A epiderme é um epitélio estratificado, formado pelos estratos basal (EB), espinhoso (EE), granuloso (EG) e córneo (EC). Cada camada é definida por sua posição, forma, morfologia

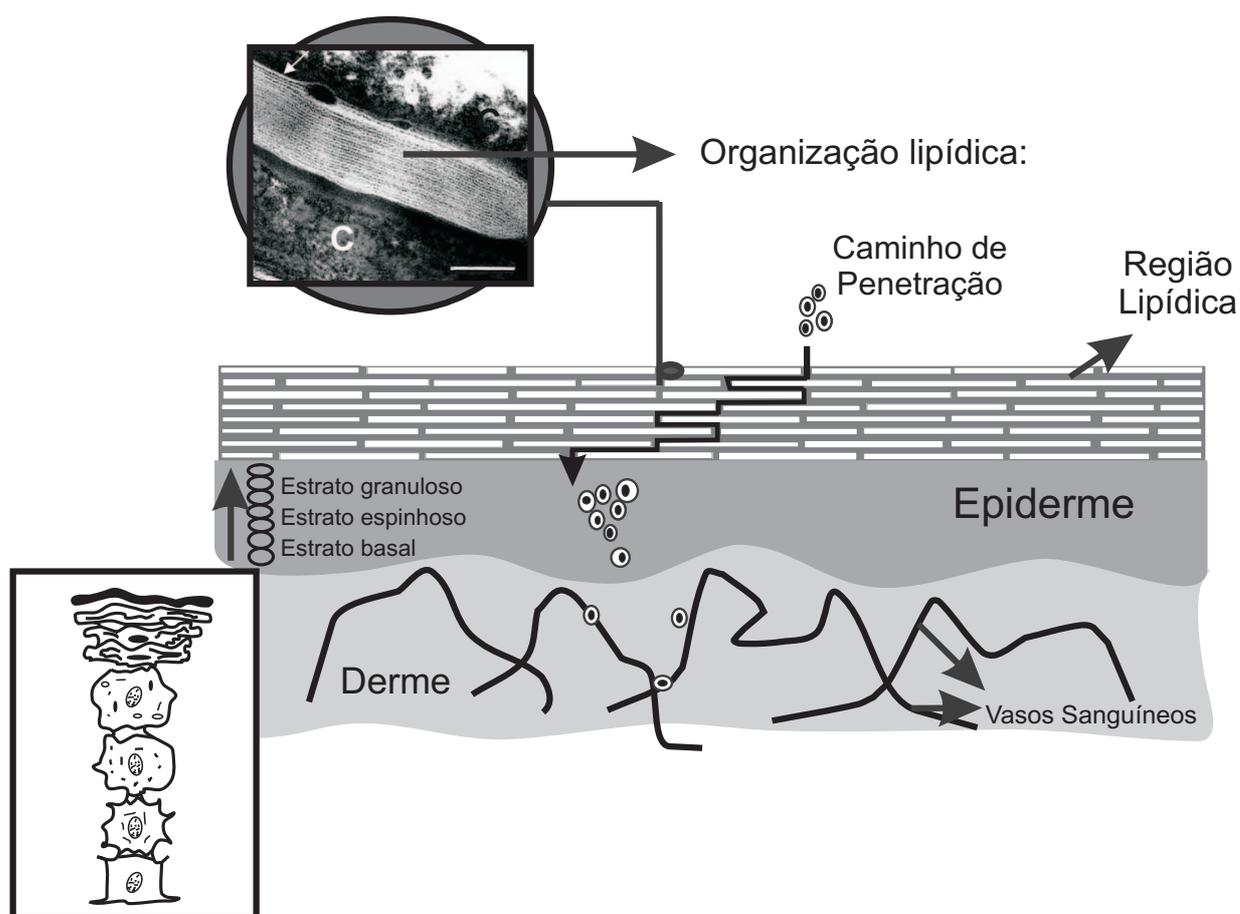


**Figura 1.12:** Micrografia eletrônica de varredura de uma seção transversal da pele humana que mostra o estrato córneo. (Créditos da imagem: Veronika Burmeister, Visuals Unlimited Inc. [50]).

e estado de diferenciação dos queratinócitos (Figura 1.13). Por ser um tecido dinâmico e em constante processo de auto-regeneração a epiderme garante que a perda das células da superfície do EC seja compensada pelo crescimento de células em suas camadas mais internas [51].

Logo acima da camada basal os queratinócitos começam a se diferenciar e durante a migração através do estrato espinhoso e granuloso passam por uma série de mudanças em sua estrutura e composição. Durante este processo os queratinócitos sintetizam um grande número de proteínas e lipídios estruturais. Em resposta a certo sinal (possivelmente um aumento na concentração de cálcio), os corpos lamelares (organelas ovoides enrijecidas principalmente em lipídios polares e enzimas catabólicas) os quais tem um papel essencial na formação do EC se movem para a periferia apical das células granulares, se fundem com a membrana de plasma e depositam seu conteúdo no espaço intercelular por exocitose. Os lipídios derivados dos corpos lamelares são subsequentemente modificados e rearranjados na lamela intercelular, sendo orientados aproximadamente paralelos à superfície das células [52–55].

Os corpos lamelares servem como carreadores dos lipídios precursores do EC, os quais consistem principalmente de glicoesfingolipídios, esteróis e fosfolipídios. Depois da extrusão



**Figura 1.13:** Desenho esquemático de um corte transversal da pele. Na camada basal da epiderme as células começam a se diferenciar até alcançarem a superfície da pele. Na interface entre o EC e o EG ocorre a diferenciação final onde os queratinócitos são transformados em corneócitos. Substâncias permeiam a pele principalmente pelo tortuoso caminho entre a região lamelar. C = corneócito, escala = 100 nm. Figura adaptada de *Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations* [51].

dos corpos lamelares na interface EG/EC, os lipídios polares precursores são enzimaticamente convertidos em produtos não polares e montados nas estruturas lamelares que circundam os corneócitos. A hidrólise de glicolipídios gera ceramidas enquanto que, fosfolipídios são convertidos em ácidos graxos livres. A mudança na composição lipídica e na estrutura celular resulta na formação de uma estrutura empacotada muito densa no EC. Por essa razão, os lipídios têm um lugar insubstituível na pele fazendo de seu mútuo arranjo nos domínios lamelares um processo chave na formação da barreira da pele [55].

O EC também possui uma complexa mistura lipídica na região intercelular que se interliga com o envelope lipídico celular formando uma estrutura conhecida como lamelas

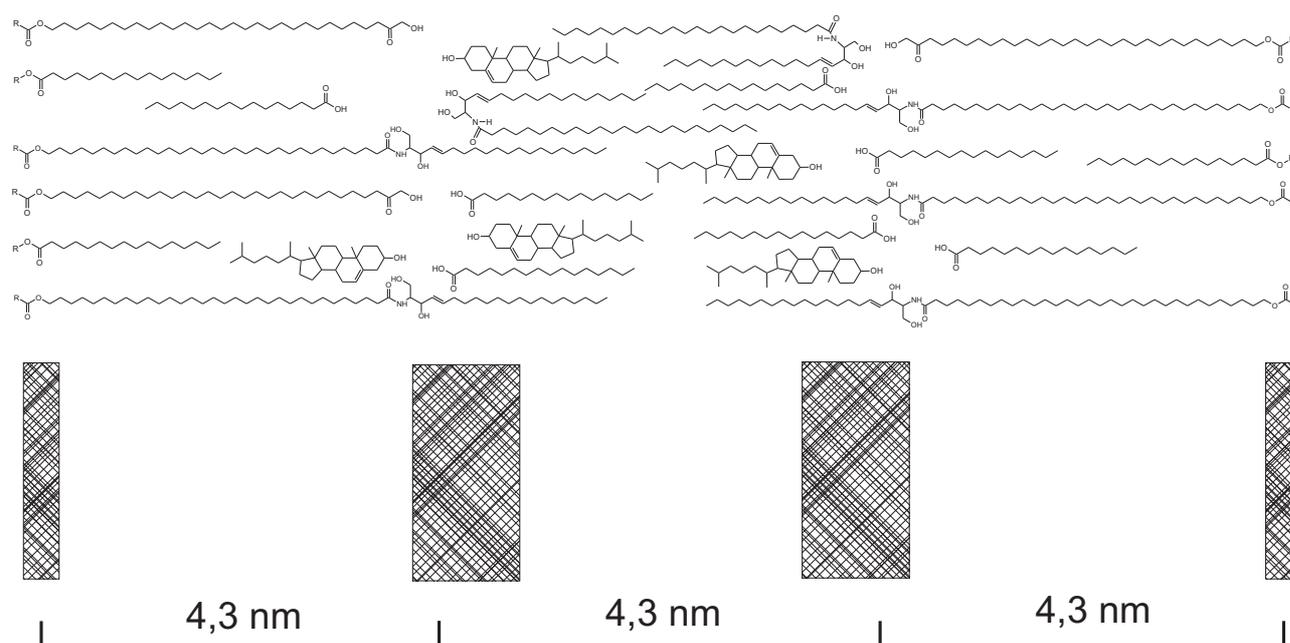
lipídicas [56, 57]. Ao contrário de outras membranas biológicas, o EC tem uma composição única, sendo praticamente destituído de fosfolipídios. Seus principais constituintes são: ceramidas (oito subclasses com os comprimentos de cadeia mais abundantes sendo C24-C26) 41%, o colesterol 27%, os ésteres de colesteril 10%, os ácidos graxos livres (em sua maioria saturados com os comprimentos de cadeia mais abundantes sendo C22-C24) 9%, e uma pequena fração de sulfato de colesterol 2% [55]. O EC humano possui dois tipos de ceramidas com uma estrutura molecular bastante excepcional, na qual um ácido linoleico está ligado a um ácido graxo de  $\omega$ -hidroxi com uma cadeia de comprimento de cerca de 30-32 átomos de carbono.

Através de estudos de *FTIR*<sup>11</sup> informações sobre a mobilidade e a empacotamento lateral dos lípidos no estrato córneo levaram a determinação de uma fase hexagonal (fase gel), uma subrede ortorrômbica e uma pequena subpopulação de lípidos em fase líquida [58, 59]. Estudos de difração de raios-x a baixos ângulos demonstraram que existem no EC duas fases lamelares caracterizadas por uma periodicidade de  $\sim 6$  e 13 nm as quais desaparecem quando a temperatura é elevada entre 60 e 75 °C [51, 55]. Alguns modelos foram desenvolvidos para representar esta periodicidade [60, 61]. A Figura 1.14 mostra o modelo proposto por Hill e Wertz [62] para representar o padrão largo-estrito-largo verificado nas membranas de EC.

A última sequência da diferenciação para a formação do EC está associada a profundas mudanças na estrutura dos queratinócitos, a qual resulta em sua transformação em células fisicamente e quimicamente resistentes, chamadas corneócitos. Os corneócitos são células chatas e anucleadas que contém em seu interior filamentos proteicos (queratinas), um envelope celular insolúvel de proteínas com ligações cruzadas além de, um envelope lipídico celular composto principalmente de  $\omega$ -hidroxiceramidas covalentemente ligados à periferia do envelope celular. Devido ao carácter impermeável do envelope, a principal rota de penetração de agentes externos reside no tortuoso caminho entre os corneócitos [55, 63]. Neste trabalho estamos usando EC obtido através de ratos recém nascidos da raça Wistar cedidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás (ver Capítulo 6 para protocolo de extração).

---

<sup>11</sup>Sigla para *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*.



**Figura 1.14:** Modelo molecular para o padrão largo-estrito-largo visualizado entre as extremidades adjacentes dos corneócitos. As caixas hachuradas representam as regiões eletricamente densas onde os lipídios podem estar covalentemente ligados à superfície exterior dos envelopes proteicos dos corneócitos (representados pelos grupos R). Figura adaptada de *Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum* [62].

## 1.6 Facilitadores da Permeação

A aplicação controlada de drogas (*drug delivery*) através da pele tem se mostrado uma excelente alternativa quando o fármaco em questão necessita ser administrado em doses extremamente elevadas. O Zidovudine (AZT), por exemplo, primeiro medicamento anti-HIV aprovado para uso clínico deve ser aplicado em doses de 200 mg a cada 4 h para manter seus níveis terapêuticos [64]. Contudo, após a administração oral, o AZT é rapidamente absorvido levando a concentrações plasmáticas iniciais muito elevadas e, conseqüentemente, alta incidência de toxicidade. Desta maneira, a aplicação tópica deste tipo de fármaco se torna cada vez mais interessante. Entretanto, o sucesso deste tipo de tratamento está associado a capacidade de difusão dos fármacos através da pele, a qual em geral é muito baixa. A difusão é um processo cinético passivo que diminui o gradiente de concentração de uma região com elevada concentração em favor de uma região de baixa concentração. A difusão em estado estacionário

pode ser descrita pela primeira lei de Fick [65]

$$\mathbf{J} = -AD\nabla C, \quad (1.3)$$

em que  $J$  representa a taxa de transferência (ou fluxo) da substância em difusão através de uma área  $A$  da membrana,  $C$  representa a concentração da substância e  $D$  o coeficiente de difusão. O sinal negativo na Equação (1.3) indica que o processo de difusão ocorre na direção oposta do aumento de concentração. Podemos manipular a Equação (1.3) para encontrar a segunda lei de Fick para a difusão na forma

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C. \quad (1.4)$$

A Equação (1.4) relaciona a variação da concentração no tempo com a taxa de variação do gradiente de concentração.

Se considerarmos que um determinado composto é aplicado à membrana em uma concentração fixa, no limite estacionário a Equação (1.4) pode ser escrita como [66]

$$J = AD\frac{C_m}{h}, \quad (1.5)$$

em que  $C_m$  é a concentração do composto associada à membrana e  $h$  é o caminho de difusão efetivo. O coeficiente de partição  $P$  pode ser definido como a razão entre as concentrações do composto na membrana e no solvente na forma [66]

$$P = \frac{C_m}{C_s}. \quad (1.6)$$

Desta maneira, a Equação (1.5) (lei de Fick modificada) pode ser escrita como

$$J_e = \frac{ADPC_s}{h}. \quad (1.7)$$

Portanto, fica claro que para o caso da permeação passiva de drogas através da pele, o aumento do fluxo de permeação pode ser alcançado através da manipulação de  $D$ ,  $P$  e  $C$ . Como discutido anteriormente, a principal barreira à permeação de compostos através da pele é conferida por sua camada mais superficial, o estrato córneo. Assim, alternativas<sup>12</sup>

---

<sup>12</sup>Existe ainda a possibilidade de se manipular o fluxo de permeação através da alteração da atividade termodinâmica do composto [66,67]. Entretanto esta alternativa não é o foco deste estudo e mais informações sobre suas consequências e aplicabilidades podem ser encontradas no trabalho de Lane e co-autores [68].

para aumentar a permeação de compostos através da pele, devem se concentrar principalmente em aumentar a solubilidade/partição ou as propriedades de difusão dos fármacos através das membranas do EC.

Desta forma, o uso de moléculas que aumentam a permeação das drogas através da pele tem se mostrado uma excelente alternativa para solucionar os problemas da aplicação controlada de fármacos pela rota transdérmica. Contudo, para que determinada molécula possa ser usada como um aumentador de permeação em aplicações farmacêuticas algumas propriedades de interação com a pele são exigidas. Os candidatos a aumentadores não devem ser tóxicos, irritantes ou alérgicos; sua atividade e efeito de duração devem ser reprodutíveis e, principalmente, o aumento da penetração deve ser unidirecional, isto é, deve permitir a entrada de agentes terapêuticos no corpo enquanto previne a perda de materiais internos [69].

Várias moléculas têm sido usadas para promover um aumento da permeação de fármacos. Entre elas destacam-se os pirrolidones [70], os surfactantes [71], os ácidos graxos [72], os glicóis [73], os álcoois [74], os ésteres [75], as amidas [76] e os terpenos [77–80]. Dentre estas, uma classe de facilitadores de permeação usada em grande escala pelas indústrias são os terpenos. Estas moléculas caracterizam-se por serem substâncias voláteis, extraídas principalmente de óleos vegetais, e que contêm somente átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio em sua estrutura molecular. Os terpenos são derivados de unidades de isopreno (fórmula molecular  $C_5H_8$ ). As unidades de isopreno podem se agrupar para formar terpenos com cadeias lineares ou formar anéis. De acordo com a quantidade de unidades isopreno os terpenos podem ser classificados em hemi- $(C_5H_8)$ , mono- $(C_{10}H_{16})$ , sesqui- $(C_{15}H_{24})$ , di- $(C_{20}H_{32})$ , ses- $(C_{25}H_{40})$ , tri- $(C_{30}H_{48})$ , sesquar- $(C_{35}H_{56})$ , tetra- $(C_{40}H_{64})$  e politerpenos (mais do que 8 unidades isopreno) [81].

Utilizando o modelo de EC de rato, Narishetty e Panchagnula demonstraram que alguns monoterpenos são capazes de facilitar a permeação do AZT através do EC em concentrações suficientemente grandes para que o fármaco atingisse a corrente sanguínea em concentrações terapêuticas [77]. Em outro estudo, Jain e co-autores demonstraram que monoterpenos como o mentol, terpineol, cineol e a mentona são facilitadores da permeação do cloridrato de imipramina

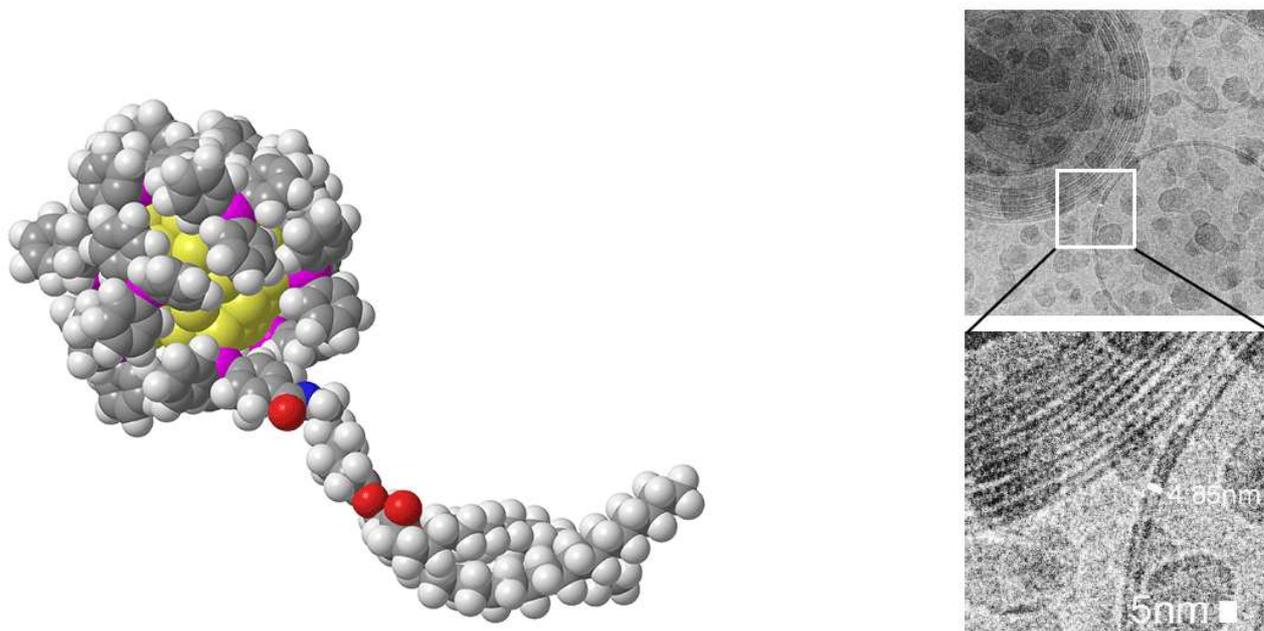
[80]. Somado a esses estudos, uma série de trabalhos de nosso laboratório [78,82–84] utilizando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica associada ao método dos marcadores de spin, demonstraram que os terpenos aumentam a dinâmica dos lipídios e a partição de pequenas moléculas nas membranas do EC. Além disso, estudos utilizando uma série de monoterpênicos dietéticos demonstraram que estas moléculas têm atividade antitumoral [85–87], antibacteriana [88], antifúngica [89], antiparasitária [90,91], antiviral [92], e anti-inflamatória [93].

Para um entendimento da relação entre a taxa de aumento da permeabilidade do EC e do potencial de irritação promovida pelos facilitadores de permeação, Karande e co-autores [94] exploraram as alterações morfológicas no micro-ambiente da pele na presença dos facilitadores. Seus resultados revelaram que dois mecanismos independentes são os principais responsáveis pela ação de um facilitador da permeação - o aumento da fluidez e a extração dos lipídios. No caso das moléculas que alteram a fluidez, o particionamento no interior da membrana é de suma importância, enquanto que, para os extratores lipídicos as forças intermoleculares (especialmente ligações de hidrogênio) são as mais importantes. Nos Capítulos 4, 5, 6 vamos apresentar resultados para o efeito de terpenos em membranas modelo, de eritrócito, de fibroblastos e de estrato córneo e apresentar um modelo de atuação para esses facilitadores de permeação.

## 1.7 Nanopartículas Aurora

A 1,2-distearoil-sn-glicero-3-(Nanopartículas Aurora) (AURORA-DSG) é um novo conjugado produzido pela Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA) que consiste em um *cluster* de ouro recoberto de trifenilfosfina ligado a um único diglicerídeo (Figura 1.15). Nanopartículas de ouro tem sido utilizadas como agentes de contraste no imageamento através da microscopia eletrônica de transmissão [95,96], microscopia de fluorescência [97,98], foto-acústica [99], espectroscopia Raman [100,101] e tomografia computadorizada [102–104]. Além disso, nanopartículas de ouro ainda tem sido aplicadas como agentes terapêuticos para melhorar a radioterapia [105], a entrega controlada de drogas [106] e a ablação fototérmica [107].

As nanopartículas AURORA-DSG são compostas de uma estrutura de cinquenta e



**Figura 1.15:** Estrutura molecular das nanopartículas AURORA-DSG (Painel esquerdo). O conjugado possui forma molecular  $\text{Au}_{55}\text{C}_{262}\text{H}_{265}\text{P}_{12}\text{NO}_7$  e peso molecular 14745,27 g/mol. O painel da direita mostra uma micrografia eletrônica na qual as várias camadas de vesículas multilamelares são identificadas graças ao contraste conferido pela incorporação de 0,1% de AURORA-DSG. Imagens retiradas de <http://www.avantilipids.com/>.

cinco átomos de ouro primeiramente descrita por Schmid e Corain [108]. Este tipo de partícula é extremamente resistente a oxidação [109] além de proporcionar facilidade e integridade nas reações de troca dos ligantes [110, 111] o que a torna uma excelente base genérica para a síntese de novas nanoestruturas centradas no ouro. Idealmente a AURORA-DSG ao contrário das partículas típicas de suspensões coloidais, é menos invasiva para as membranas lipídicas comportando-se como uma molécula intrínseca em vez de uma simples sonda metálica extrínseca. Entretanto, os reais efeitos da AURORA-DSG sobre a dinâmica e morfologia das membranas lipídicas ainda não foram determinados. No Capítulo 7 vamos apresentar resultados sobre a interação da AURORA-DSG com membranas modelo compostas de diferentes tipos de lipídios.

Capítulo **2**

**Técnicas Experimentais**

---

## 2.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica Aplicada a Sistemas Biológicos

### 2.1.1 Teoria Geral

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica que permite ao investigador detectar e caracterizar sistemas que possuem elétrons desemparelhados e pode ser considerada como uma extensão do famoso experimento de Stern-Gerlach [112]. A primeira observação de um pico de RPE foi realizada em 1945, quando Zavoisky [113] detectou uma linha de absorção para uma amostra de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (campo magnético = 47,6 G e frequência = 133 MHz). Experimentos posteriores com maiores frequências (micro-ondas) e campos magnéticos de 1000-3000 G mostraram as vantagens do uso de altas frequências e campos. Nesse contexto, radicais livres, membranas lipídicas e proteínas se tornaram os tipos de sistemas mais investigados por RPE em pesquisas biofísicas.

A espectroscopia de RPE monitora as transições induzidas entre os níveis de energia Zeeman de um sistema paramagnético situado em um campo magnético estático. Para que ocorra transição, a amostra deve ser irradiada com um campo eletromagnético de frequência  $\nu$  definida que corresponda a separação  $\Delta E$  dos níveis de energia entre os quais a transição acontece; ou seja,

$$h\nu = \Delta E. \quad (2.1)$$

Essa relação é conhecida como *condição de ressonância*. Em experimentos comuns de RPE o campo de radiação eletromagnética é polarizado em um plano perpendicular a direção do campo magnético estático.

A energia de interação (energia Zeeman) do momento de dipolo magnético da amostra irradiada com o campo externo estático  $\mathbf{H}$  é descrita pelo Hamiltoniano<sup>1</sup>

$$\mathcal{H} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H}, \quad (2.2)$$

---

<sup>1</sup>Esta descrição está utilizando o sistema de medidas cgs no qual  $\mu_0 = 1$ . Isto permite escrever  $\mathbf{B} = \mathbf{H}$  e usar Gauss (G) como unidade de medida para o campo magnético auxiliar  $\mathbf{H}$ .

para o qual o momento de dipolo magnético eletrônico,  $\boldsymbol{\mu}$ , pode ser expresso em termos do momento angular eletrônico total,  $\mathbf{J}$ , como

$$\boldsymbol{\mu} = -g\beta_e\mathbf{J}, \quad (2.3)$$

em que

$$g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad (2.4)$$

e

$$\beta_e = \frac{e\hbar}{2mc} \quad (2.5)$$

representam, respectivamente, o fator espectroscópico de desdobramento e o magneton de Bohr respectivamente [114].

Considerando que a direção do campo aplicado seja a direção  $z$ , a Equação (2.2) é reescrita como

$$\begin{aligned} \mathcal{H} &= -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H} = -\mu_z H \\ &= g\beta_e J_z H, \end{aligned} \quad (2.6)$$

onde  $J_z$  é o operador correspondente a projeção do momento angular total na direção do campo aplicado. Os valores esperados de  $J_z$  são denotados por  $m_J$  e variam entre  $-J$  e  $+J$  por valores inteiros. Assim, o efeito do campo magnético estático é produzir  $(2J+1)$  níveis, cada um com energia  $E_{m_J} = g\beta_e H m_J$  e população dada pela lei de distribuição de Boltzmann [115]

$$P_{m_J} = \exp\left(\frac{-E_{m_J}}{kT}\right) \bigg/ \sum_{m_J} \exp\left(\frac{-E_{m_J}}{kT}\right). \quad (2.7)$$

As transições são induzidas somente entre os níveis de energia adjacentes caracterizados pelos números quânticos  $m_J$  e  $m_{J\pm 1}$ , com isso, a condição de ressonância ( $\Delta E = g\beta_e H_r$ ) pode ser reescrita como

$$h\nu = g\beta_e H_r; \quad (2.8)$$

$H_r$  é chamado campo de ressonância [116].

A Equação (2.8) é satisfeita para uma grande faixa de frequências e campos magnéticos. Por razões técnicas, frequências na região das micro-ondas são usadas. Tipicamente para frequências de  $\nu = 9,5 \text{ GHz}$  (Banda X), é necessário um campo aplicado de  $H_r = 3400 \text{ G}$  e energias<sup>2</sup>  $\Delta\bar{E} = 0,3 \text{ cm}^{-1}$ . A Equação (2.8) nos diz ainda que existem dois possíveis meios para a detecção da absorção ressonante de uma amostra paramagnética. Podemos fixar  $H$  e então variar  $\nu$  e vice versa. Por razões experimentais o segundo método é o usado. Assim um espectro de RPE é registrado como função do campo magnético e não da frequência.

Energias magnéticas da ordem de  $0,3 - 1 \text{ cm}^{-1}$  são algumas centenas de vezes menores que a energia térmica  $kT$  para temperaturas ordinárias. Sendo assim, a diferença de população entre os níveis de energia, como dados na Equação (2.7) é muito pequena<sup>3</sup>. Contudo, é esta diferença de população a responsável pela detecção do sinal de RPE. De fato, quando a amostra é irradiada com um campo de micro-ondas, ela absorve energia desse campo e é excitada para níveis energéticos superiores, ao mesmo tempo que a transição inversa ocorre por emissão estimulada. Visto que as taxas de ambos processos são proporcionais a população do nível de energia do qual a transição começa, uma absorção de energia resultante permanece [116].

<sup>2</sup>Em espectroscopia, é comum expressar energia e frequência em unidades de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Para converter a energia real (em ergs) para número de onda (em  $\text{cm}^{-1}$ ) fazemos

$$\frac{E(\text{ergs})}{h(\text{ergs} \cdot \text{s}) \cdot c(\text{cm/s})} = \bar{E}(\text{cm}^{-1}),$$

de forma que  $0,3 \text{ cm}^{-1}$  equivalem a  $5,94 \times 10^{-17}$  ergs.

<sup>3</sup>À partir da Equação (2.7) temos que

$$P_+ = \exp\left(\frac{-E_+}{kT}\right) / \sum \exp\left(\frac{-E_+}{kT}\right) \quad \text{e} \quad P_- = \exp\left(\frac{-E_-}{kT}\right) / \sum \exp\left(\frac{-E_-}{kT}\right),$$

de forma que

$$\frac{P_+}{P_-} = \exp\left[\frac{-(E_+ - E_-)}{kT}\right] = \exp\left(\frac{-g\beta_e H}{kT}\right).$$

Expandindo  $e^{-x} = 1 - x$  com  $x \ll 1$  (em geral  $g\beta_e H$  é três ordens de grandeza menor do que  $kT$ ) temos

$$\frac{P_+}{P_-} = 1 - \frac{g\beta_e H}{kT} = 1 - \frac{h\nu}{kT}.$$

Considerando  $\nu \approx 10 \text{ GHz}$  e  $T = 300 \text{ K}$  encontramos

$$\frac{P_+}{P_-} \approx 0,9984.$$

Essas circunstâncias entretanto, não são suficientes para permitir a detecção contínua do sinal de RPE. Desde que o processo de absorção prevaleça, as populações dos níveis de energia irão se igualar causando o desaparecimento do sinal (saturação). Felizmente, existem mecanismos de relaxação, os quais levam o sistema de volta as populações determinadas pela distribuição de Boltzmann depois da perturbação causada pelo campo de micro-ondas com a situação de equilíbrio sendo restaurada por meio da dissipação da energia magnética em forma de energia térmica.

A taxa com a qual o equilíbrio térmico é restaurado é definida por um tempo característico denominado *tempo de relaxação spin-rede* ou *longitudinal*  $T_1$ . Considerando que o processo de relaxação possa ser representado por um decaimento exponencial,  $T_1$  pode ser representado como [116]

$$\frac{d\mathcal{M}_z}{dt} = \frac{-(\mathcal{M}_z - \mathcal{M}_{eq})}{T_1}, \quad (2.9)$$

em que  $\mathcal{M}_z$  é a magnetização macroscópica da amostra e  $\mathcal{M}_{eq}$  é dada pela *lei de Curie* [114]

$$\mathcal{M}_{eq} = \frac{J(J+1)\mathcal{N}g^2\beta_e^2 H}{3kT} \quad (2.10)$$

para qual  $\mathcal{N}$  é o número de spins e  $T$  é a temperatura absoluta.

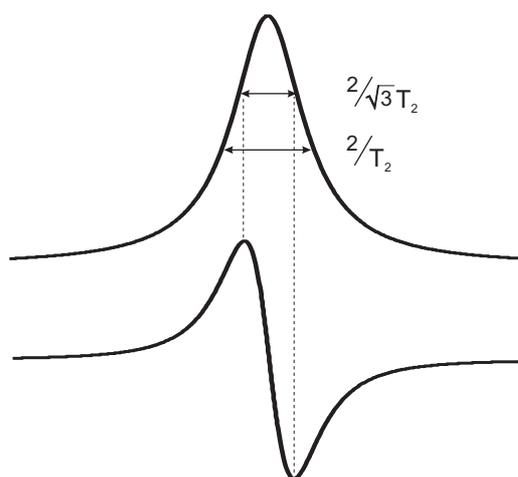
O processo de relaxação spin-rede diminui o tempo de vida dos níveis de energia, e conseqüentemente, um alargamento das linhas espectrais pode ocorrer. Contudo, sobre condições de baixa potência do campo de micro-ondas, o que evita os efeitos de saturação, o alargamento de linha é causado por outro mecanismo de relaxação. Esses mecanismos mantêm a energia Zeeman total constante em contraste com os mecanismos de relaxação spin-rede e são caracterizados por um tempo de relaxação  $T_2$  denominado *tempo de relaxação transversal*.

Devido a esses processos, a componente perpendicular da magnetização, que na ausência de relaxação iria seguir o campo de micro-ondas com mesma velocidade angular  $\omega = 2\pi\nu$ , decai para zero com o tempo característico  $T_2$  de acordo com a Equação [116]

$$\frac{d\mathcal{M}_x}{dt} = \frac{-\mathcal{M}_x}{T_2}. \quad (2.11)$$

As Equações (2.9) e (2.11) são conhecidas como *equações de Bloch* para a magnetização macroscópica. Pode ser demonstrado [116], que o processo de relaxação transversal produz uma curva de absorção que é descrita por uma função lorentziana. Na escala de frequência angular, a forma normalizada da função para uma linha ressonante centrada em  $\omega_0$  é escrita como

$$f(\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2}, \quad (2.12)$$



**Figura 2.1:** Curva Lorentziana e sua primeira derivada.

Experimentalmente,  $T_2$  é obtido à partir da largura na meia altura, a qual é  $2/T_2$ . Geralmente, nos espectrômetros de ressonância eletrônica um campo de modulação (100 kHz) é utilizado para amplificar o sinal. A utilização de tal metodologia, faz com que a curva adquirida em cada experimento seja a derivada de ordem 1 da curva de absorção. Desta maneira, a distância pico-a-pico medida na curva derivada corresponde a largura do pico da curva de absorção. Denotando esta distância pico-a-pico como  $\delta$  encontramos (Figura 2.1)

$$\frac{1}{T_2} = \frac{\sqrt{3}}{2}\delta. \quad (2.13)$$

Para uma molécula (por exemplo, um radical livre) na qual o spin eletrônico interage um campo magnético estático e via acoplamento hiperfino com  $N$  núcleos de números quânticos de spin individuais  $I_k$ , o hamiltoniano (2.2) pode ser escrita como (ver Apêndice A

para derivação formal desse hamiltoniano)

$$\mathcal{H} = \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \sum_{k=1}^N \mathbf{S} \cdot \mathbf{A}^{(k)} \cdot \mathbf{I}. \quad (2.14)$$

Por simplicidade, vamos considerar o caso onde a rápida reorientação molecular de uma espécie paramagnética em um solvente de baixa viscosidade, altera os termos anisotrópicos do hamiltoniano de interação hiperfina. Com isso, a posição da linha central do espectro e a magnitude do desdobramento hiperfino passam a ser determinadas pelos valores médios dos elementos diagonais dos tensores  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$ . Podemos então, definir um hamiltoniano isotrópico do tipo

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_0 &= g\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S} + \sum_{k=1}^N a_k \mathbf{S} \cdot \mathbf{I}_k \\ &= g\beta_e H S_z + \sum_{k=1}^N a_k (S_x I_{kx} + S_y I_{ky} + S_z I_{kz}), \end{aligned} \quad (2.15)$$

onde

$$g = \frac{1}{3} \text{Tr} \mathbf{g} \quad \text{e} \quad a_k = \frac{1}{3} \text{Tr} \mathbf{A}^{(k)}. \quad (2.16)$$

Os níveis de energia do sistema podem ser determinados a partir do hamiltoniano isotrópico, tratando o termo hiperfino como uma perturbação no termo de energia Zeeman. Assim, as autofunções do hamiltoniano isotrópico são obtidas acrescentando-se um termo referente ao produto das autofunções de spin eletrônico e nuclear dos operadores de spin  $S_z$  e  $I_{kz}$  ao termo Zeeman. Essas funções, também são autofunções do hamiltoniano simplificado

$$\mathcal{H}'_0 = g\beta_e H S_z + \sum_{k=1}^N a_k S_z I_{kz} \quad (2.17)$$

e as energias de primeira ordem são os correspondentes autovalores

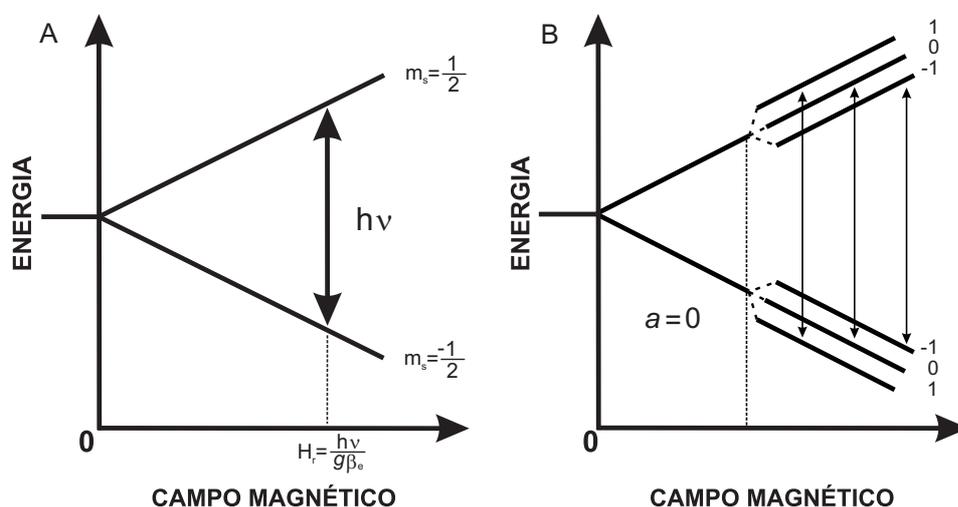
$$E = g\beta_e H m_s + \sum_{k=1}^N a_k m_s m_k, \quad (2.18)$$

em que  $m_s = \pm \frac{1}{2}$  e  $m_k = -I_k, -I_k + 1, \dots, I_k$ .

Devido ao efeito do campo estático aplicado e do acoplamento hiperfino, os níveis de energia originais são desdobrados em uma série de subníveis com energias dadas pela Equação

(2.18). Alguns desses níveis terão mesma energia, isto é, serão degenerados, se as interações hiperfinas forem as mesmas para dois ou mais átomos. Nesse caso o núcleo será dito magneticamente equivalente, e essa propriedade é imediatamente reconhecida à partir da geometria da molécula.

Como o operador  $S$  atua apenas sobre os estados de spin eletrônico, a disposição dos spins nucleares de dois estados entre os quais a transição acontece deve ser a mesma. Em conclusão, as transições permitidas devem satisfazer as regras de seleção  $\Delta m_s = \pm 1$  e  $\Delta m_k = 0$  para todos os núcleos (ver Apêndice A para mais informações).



**Figura 2.2:** Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) na presença de um campo magnético aplicado. O painel A mostra os níveis energéticos sem a interação com o spin nuclear do átomo de nitrogênio; o painel B mostra os níveis energéticos desdobrados pela interação nuclear hiperfina.

Supondo que todos os  $N$  núcleos são equivalentes, temos níveis de energia dados por

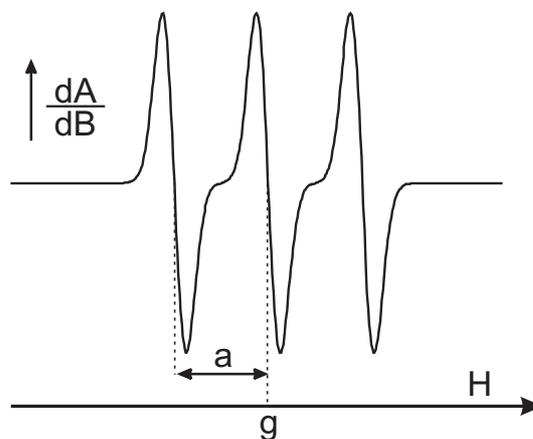
$$E(m_s, M) = g\beta_e H m_s + a m_s M, \quad (2.19)$$

em que  $M$  é a soma vetorial dos números quânticos  $m_k$ . A diferença de energia entre os níveis envolvidos nas transições permitidas é escrita como

$$\Delta E(M) = g\beta_e H + aM. \quad (2.20)$$

Dessa forma, o espectro será constituído de um número de linhas igual a  $2NI_k + 1$  possíveis valores de  $M$ , com intensidade proporcional a degenerescência de cada estado de spin

nuclear  $M$ . Se  $I_k = 1$ , então  $M_k$  poderá assumir os valores  $0, \pm 1$  e as linhas espectrais adjacentes serão igualmente espaçadas pelo valor de  $a$  como mostrado na Figura 2.3.



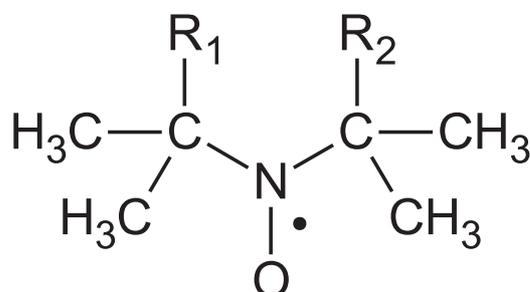
**Figura 2.3:** Espectro de RPE de uma espécie magnética com  $I = 1$ ;  $g$  define a posição da linha central e  $a$  é a constante de desdobramento hiperfino definida no Apêndice A.

## 2.1.2 O Método dos Marcadores de Spin

Muitos sistemas biológicos contêm naturalmente centros paramagnéticos, entretanto, tais sistemas são uma fração mínima dos quais a sensibilidade da espectroscopia de RPE pode ser útil. Desta forma, seria muito desejável que qualquer sistema biológico ou molécula pudesse ser feita paramagnética de um modo específico para que a espectroscopia de RPE pudesse ser empregada em seu estudo. Para solucionar este problema, foram desenvolvidos os marcadores de spin (*spin labels*) [117,118] - radicais livres estáveis que podem ser ligados a sítios específicos de uma molécula em um sistema complexo e que a espectroscopia de RPE fornece informações sobre o ambiente onde o marcador está inserido.

Uma propriedade essencial de um marcador de spin é a estabilidade sobre as condições usadas no estudo de sistemas biológicos, tais como pH, concentração salina e temperatura. O marcador de spin deve ser sensível a seu ambiente - preferencialmente a polaridade, as restrições espaciais, a sua orientação além de campos magnéticos e elétricos locais. Além disso, sua presença deve causar alterações desprezíveis no sistema. É necessário também, que as moléculas usadas para o desenvolvimento de marcadores de spin possuam um bom entendimento químico,

o qual permita a síntese de marcadores específicos para determinados fins. Sob esta perspectiva, os marcadores de spin mais utilizados são os baseados na molécula de nitróxido (Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Estrutura molecular geral do radical nitróxido.  $R_1$  e  $R_2$  representam os grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin.

Devido ao efeito protetor dos quatro grupos metil ligados aos carbonos adjacentes ao átomo de nitrogênio, o radical nitróxido se torna uma molécula notavelmente estável e inerte [119]. Os espectros de RPE do radical nitróxido são caracterizados por três linhas hiperfinas bem resolvidas resultantes do acoplamento do spin eletrônico ( $S = \frac{1}{2}$ ) com o spin nuclear do átomo de nitrogênio. Os valores típicos dos parâmetros magnéticos (componentes dos tensores  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}$ ), obtidos a partir do estudo de cristais preparados com o radical nitróxido incorporado em baixa concentração em uma matriz diamagnética, são apresentados na Tabela 2.1 [120]. O valor da constante de acoplamento isotrópico e a dependência angular dessa

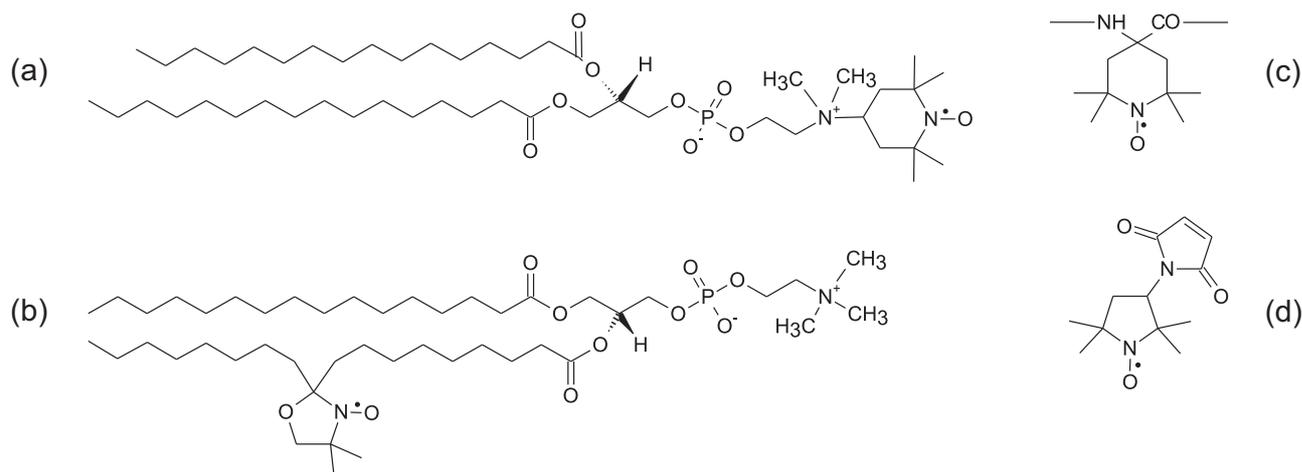
**Tabela 2.1:** Parâmetros magnéticos para o radical nitróxido.

$g_{xx}$	2,0089	$A_{xx}(A_{\perp})$	5 G
$g_{yy}$	2,0061	$A_{yy}(A_{\perp})$	5 G
$g_{zz}$	2,0027	$A_{zz}(A_{\parallel})$	31 G
$g$	2,0059	$a$	13,5 G

interação dipolar confirmam que o elétron desemparelhado do radical nitróxido está amplamente localizado no orbital  $2p\pi$  do átomo associado ao átomo de nitrogênio [116].

Uma série de marcadores de spin baseados no nitróxido foi desenvolvida como ferramenta para o estudo de sistemas biológicos (Figura 2.5). Entre eles se destacam os marcadores

de spin desenvolvidos para o estudo de membranas lipídicas e proteínas. Os marcadores de spin projetados para o estudo de membranas, geralmente são baseados nos diversos tipos de lipídios que compõem as bicamadas celulares e possuem o radical nitróxido ligado nas cadeias acila [121] ou nos grupos polares dos lipídios base [122]. Esses tipos de marcadores se organizam na mem-



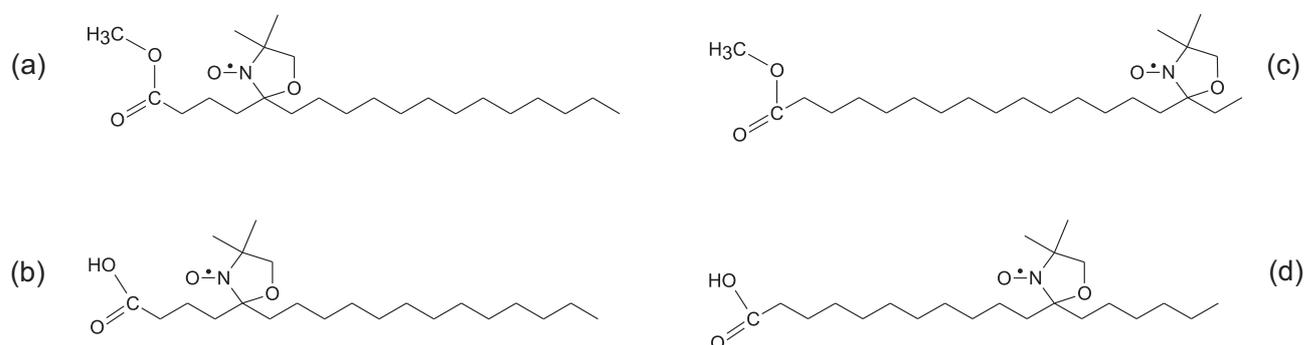
**Figura 2.5:** Estrutura química de alguns marcadores de spin frequentemente usados no estudo de membranas lipídicas e proteínas. (a) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo(tempo)colina (TEMPO-PC), (b) 1-palmitoil-2-estearoil-(10-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (10-PC), (c) 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxil (TOAC) e (d) 3-maleimida proxil (MAL-5). Os marcadores TEMPO-PC e 10-PC se estruturam nas bicamadas lipídicas através das interações hidrofóbicas. O marcador TOAC é diretamente incorporado nas cadeias laterais das proteínas através das ligações peptídicas e o marcador MAL-5 se liga covalentemente aos grupos sulfidríla da cisteína.

brana pelas mesmas interações hidrofóbicas que mantém os lipídios naturais estruturados na membrana e sua transferência pode ser realizada biossinteticamente, cultivando-se um organismo que contenha componentes previamente marcados; ou fisicamente, fazendo uso da alta solubilidade destes marcadores de spin em um ambiente similar a sua composição. Já para as o caso das proteínas, os marcadores podem ser acoplados aos grupos reativos das cadeias laterais de seus aminoácidos (principalmente o grupo sulfidríla da cisteína) [123] ou serem diretamente incorporados em suas cadeias através da ligação peptídica<sup>4</sup> [125].

Neste trabalho, estaremos interessados apenas nos marcadores desenvolvidos para o

<sup>4</sup>Existe ainda a possibilidade de usar os marcadores de spin através da metodologia conhecida como *Site-directed Spin Labeling* [124]. Nesta metodologia, os marcadores de spin são introduzidos em sítios específicos de proteínas recombinantes devidamente mutadas. Esta técnica é especialmente útil no estudo do enovelamento e da estrutura de proteínas. Entretanto, esta metodologia exige o uso da espectroscopia de ressonância paramagnética pulsada, a qual não será abordada neste texto.

estudo de membranas lipídicas, em especial nos baseados no ácido esteárico (Figura 2.6). Esses marcadores, quando incorporados ao ambiente da membrana, possuem movimento restrito o qual resulta no alargamento e na variação de suas linhas espectrais. O grau de restrição do movimento desses marcadores pode ser avaliado por meio de seu tempo de correlação rotacional  $\tau_c$ , o qual pode ser usado como uma medida da fluidez relativa da membrana (a derivação de uma expressão para  $\tau_c$  pode ser encontrada no Apêndice B).



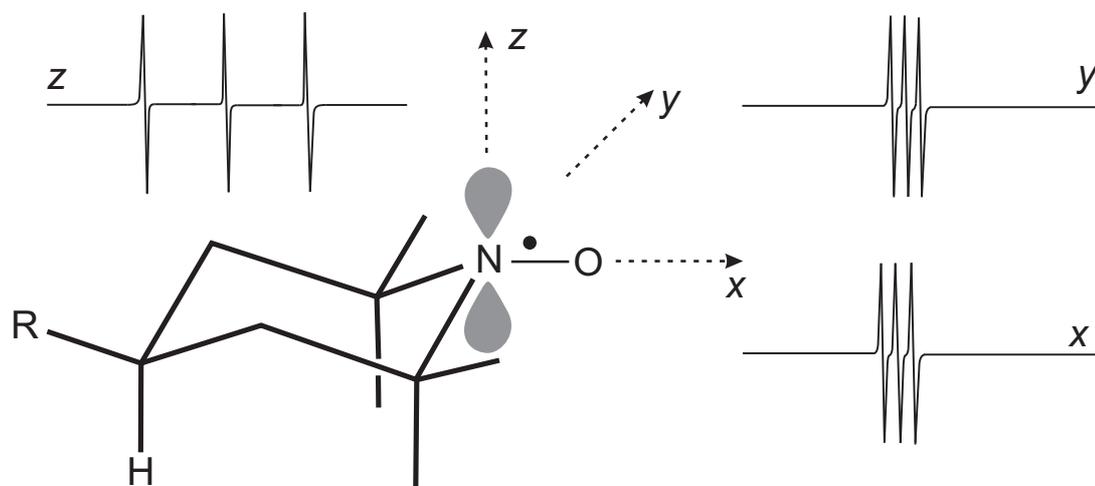
**Figura 2.6:** Estrutura química dos marcadores lipídicos usados neste trabalho. (a) 5-metil estearato (5-DMS), (b) 5-doxil estearato (5-DSA), (c) 16-doxil estearato (16-DSA) e (d) 12-doxil estearato (12-DSA).

Devido a anisotropia do fator  $g$  a linha central de cada espectro acontece para diferentes valores de campo dependendo da orientação molecular. Se a ressonância ocorre para um campo aplicado de  $H = 3400$  G para marcadores orientados com o eixo  $z$  do nitróxido posicionado ao longo do campo (Figura 2.7), as posições das linhas centrais dos espectros nas direções  $x$  e  $y$  são calculados a partir das relações [116]

$$g_{xx}(H + \delta H_x) = g_{yy}(H + \delta H_y) = g_{zz}H. \quad (2.21)$$

Além disso, o espectro de RPE de marcadores de spin é muito sensível à taxa com a qual o marcador consegue se reorientar. A Figura 2.8 mostra uma série de espectros de nitróxidos com diferentes tempos de correlação rotacional  $\tau_c$  entre os limites de movimento lento e movimento rápido<sup>5</sup>.

<sup>5</sup>Os limites de movimento rápido e lento são geralmente definidos como  $10^{-11} < \tau_c < 10^{-9}$  e  $10^{-9} < \tau_c < 10^{-6}$  respectivamente;  $\tau_c$  medido em  $s$ .



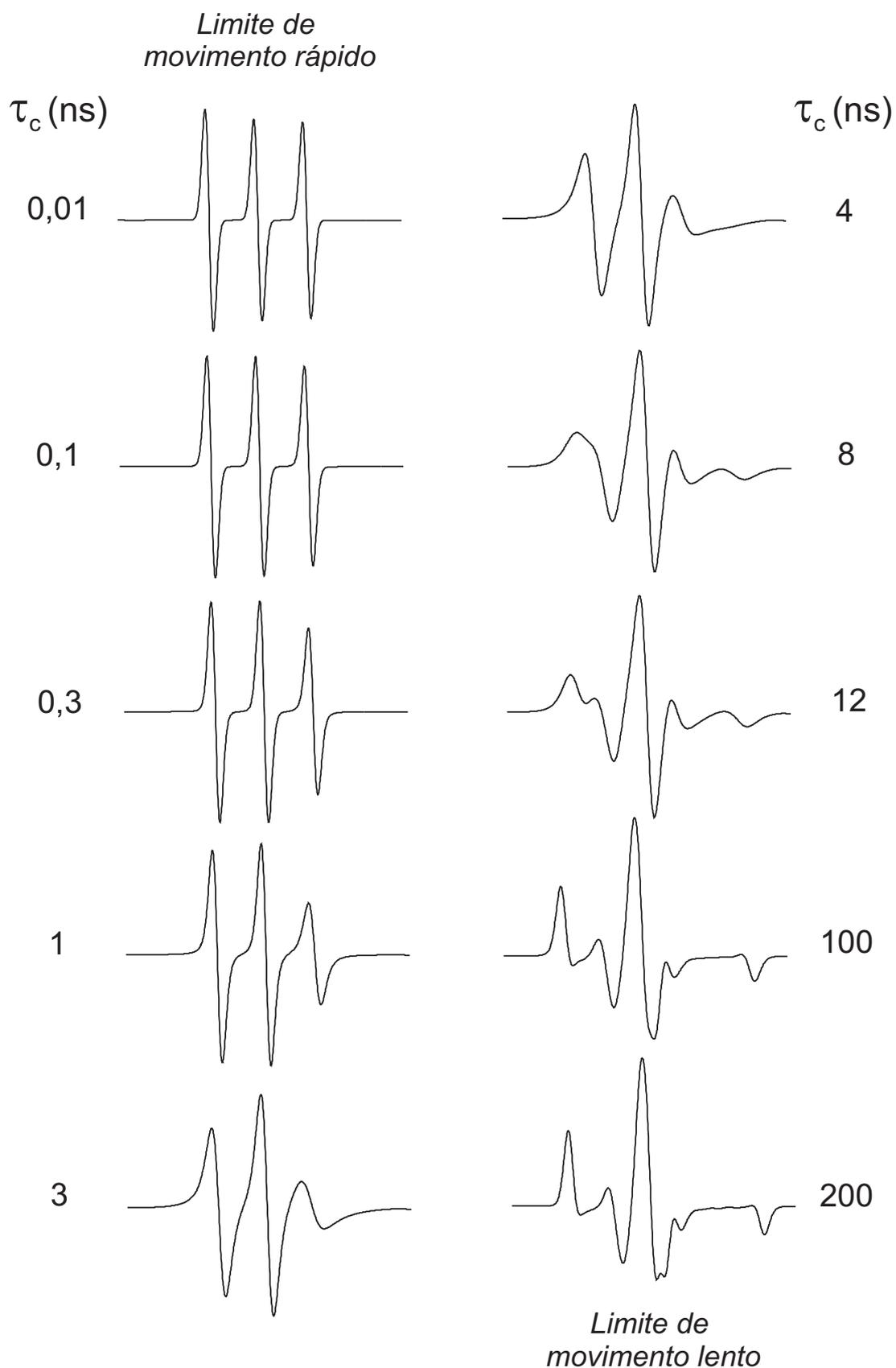
**Figura 2.7:** Espectros de RPE obtidos com o campo magnético estático aplicado paralelamente aos eixos moleculares  $x$ ,  $y$  e  $z$  do nitroxídeo.

Em princípio, as linhas espectrais deveriam ter a mesma intensidade, uma vez que a separação entre os níveis de energia magnética é muito pequena em comparação com a energia térmica  $kT$ , e as populações dos níveis energéticos, como pode ser visto a partir da Equação (2.7) são praticamente iguais. Entretanto, os experimentos nos mostram que na maioria dos casos, as alturas das linhas hiperfinas não são as mesmas. Uma análise da forma das linhas de ressonância revela que isto se deve ao fato de que as linhas espectrais na verdade não possuem a mesma largura.

As variações da largura de linha espectral podem ser atribuídas, na maioria dos casos, as flutuações dos termos anisotrópicos do hamiltoniano magnético causadas pelos movimentos moleculares [126,127]. Mesmo que os termos anisotrópicos não contribuam para os parâmetros magnéticos medidos em espectros de marcadores de spin em solução, eles constituem uma importante fonte de alargamento de linha [116]. O hamiltoniano (2.14) descrito na seção anterior, pode de fato, ser considerado como a soma de duas contribuições: uma isotrópica (orientacionalmente invariante) que foi dada na Equação (2.15), e uma puramente anisotrópica (orientacionalmente dependente) que pode ser escrita como

$$\mathcal{H}_1 = \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{g}' \cdot \mathbf{S} + \sum_{k=1}^N \mathbf{S} \cdot \mathbf{A}'^{(k)} \cdot \mathbf{I} \quad (2.22)$$

onde  $\mathbf{g}'$  e  $\mathbf{A}'^{(k)}$  são tensores com traço nulo.



**Figura 2.8:** Espectros de RPE de nitróxidos com diferentes tempos de correlação rotacional  $\tau_c$ . Os espectros foram obtidos através de simulação utilizando o software *easyspin* com a opção *chili*. Parâmetros da simulação:  $g$ , (2,008 2,006 2,003);  $A$ , (20 20 85); alargamento lorentziano, 0,3; e frequência, 9,5 GHz.

Para marcadores de spin dissolvidos em solução aquosa, a agitação molecular faz com  $\mathcal{H}_1$  seja uma função aleatória do tempo. Como consequência, há uma modulação aleatória dos níveis de energia e das frequências de transição. Embora  $\mathcal{H}_1$  neste caso, seja computada apenas como um valor médio que tende a zero, um alargamento das linhas de absorção deverá ocorrer.

As variações das frequências de transição podem ser caracterizadas por meio de suas amplitudes e coerência. A amplitude  $\Delta$  é definida pelo valor quadrático médio das interações anisotrópicas (em unidades de frequências angular) e a coerência é dada pelo tempo de correlação  $\tau_c$  do movimento aleatório. Para o caso de interesse deste texto ou seja, interações anisotrópicas moduladas por um movimento do tipo Browniano, o tempo de correlação é uma medida do período no qual as moléculas estão fixas em uma determinada orientação.

Verifica-se então, que a dependência da largura de linha  $1/T_2$  com o número quântico  $M$  que especifica a transição, pode ser ajustada pela equação [116]

$$[T_2(M)]^{-1} = C + DM + EM^2, \quad (2.23)$$

onde  $C$ ,  $D$  e  $E$  são parâmetros que podem ser relacionados por exemplo com as anisotropias magnéticas.

Pode ser demonstrado também [116], que a componente hiperfina referente ao campo alto é sempre mais larga do que as duas outras duas linhas, as quais tem aproximadamente a mesma largura. Esse fato pode ser racionalizado, se usarmos a Equação (2.23) para calcular as expressões explícitas dos parâmetros  $C$ ,  $D$ , e  $E$  em termos das anisotropias magnéticas.

O termo  $C$  inclui contribuições para o alargamento das linhas que resultam de mecanismos diferentes dos da modulação das interações anisotrópicas considerados até agora. Esses efeitos surgem, por exemplo, da presença de oxigênio na solução ou de fatores instrumentais (todos eles são independentes do índice de linha  $M$ ) [116]. Por esta razão, e também porque é mais fácil de medir as alturas relativas das linhas, em vez da largura de uma única linha, é conveniente reescrever a expressão (2.23) na forma

$$[T_2(0)]^{-1} [T^2(0)/T^2(\pm 1) - 1] = E \pm D \quad (2.24)$$

onde  $[T_2(0)]^{-1}$  é a largura da linha central ( $M = 0$ ). Os valores experimentais de  $T^2(0)/T^2(\pm 1)$  são obtidos a partir da raiz quadrada dos quocientes das alturas dos picos experimentais da curva derivada da absorção. Considerações teóricas conduzem a um valor positivo para a constante de acoplamento isotrópico, e isto permite a identificação do estado de spin  $M = 1$  como sendo a componente hiperfina de campo baixo.

Em termos dos componentes dos tensores de anisotropia, podemos obter os parâmetros  $D$  e  $E$  na forma [116]

$$D = \frac{4}{15}b\Delta\gamma H\tau_c, \quad E = \frac{1}{8}b^2\tau_c \quad (2.25)$$

onde

$$b = 2\pi A'_{zz} = 2\pi(A_{zz} - a) = \frac{4}{3}\pi(A_{\parallel} - A_{\perp}) \quad (2.26)$$

com os valores de  $A$  expressos em unidades de MHz, e

$$\Delta\gamma = \beta_e\hbar^{-1} \left[ g_{zz} - \frac{1}{2}(g_{xx} + g_{yy}) \right]. \quad (2.27)$$

Ao introduzirmos os valores listados na Tabela 2.1, verificamos que  $E \simeq -D$  para valores de campo de cerca de 3400 G. Desta maneira, podemos verificar à partir da Equação (2.24) que, devido ao sinal negativo de  $D$ , somente a linha de campo alto ( $M = -1$ ) parece ser mais larga do que a linha central em espectros de nitróxidos dissolvidos em solução aquosa (na banda X).

Em experimentos de banda-X, nos quais a frequência de ressonância é de aproximadamente 9,5 GHz (o que é equivalente a  $6 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ) e  $\Delta \simeq b$  calculado à partir da Equação (2.26) é de aproximadamente  $3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ . Assim, o tratamento desenvolvido até aqui, se aplica a espectros de marcadores de spin baseados no nitróxido para os quais os tempos de correlação rotacional estejam entre  $5 \times 10^{-11} - 10^{-9}$  segundos.

Além disso, de acordo com o modelo de difusão de Debye [128], o tempo de correlação rotacional pode ser calculado em termos das dimensões moleculares, temperatura e da viscosidade do meio se as moléculas puderem ser aproximadas por esferas de raio  $a$  pela equação

$$\tau_c = \frac{1}{6\mathcal{R}} \quad (\mathcal{R} = kT/8\pi\eta a^3), \quad (2.28)$$

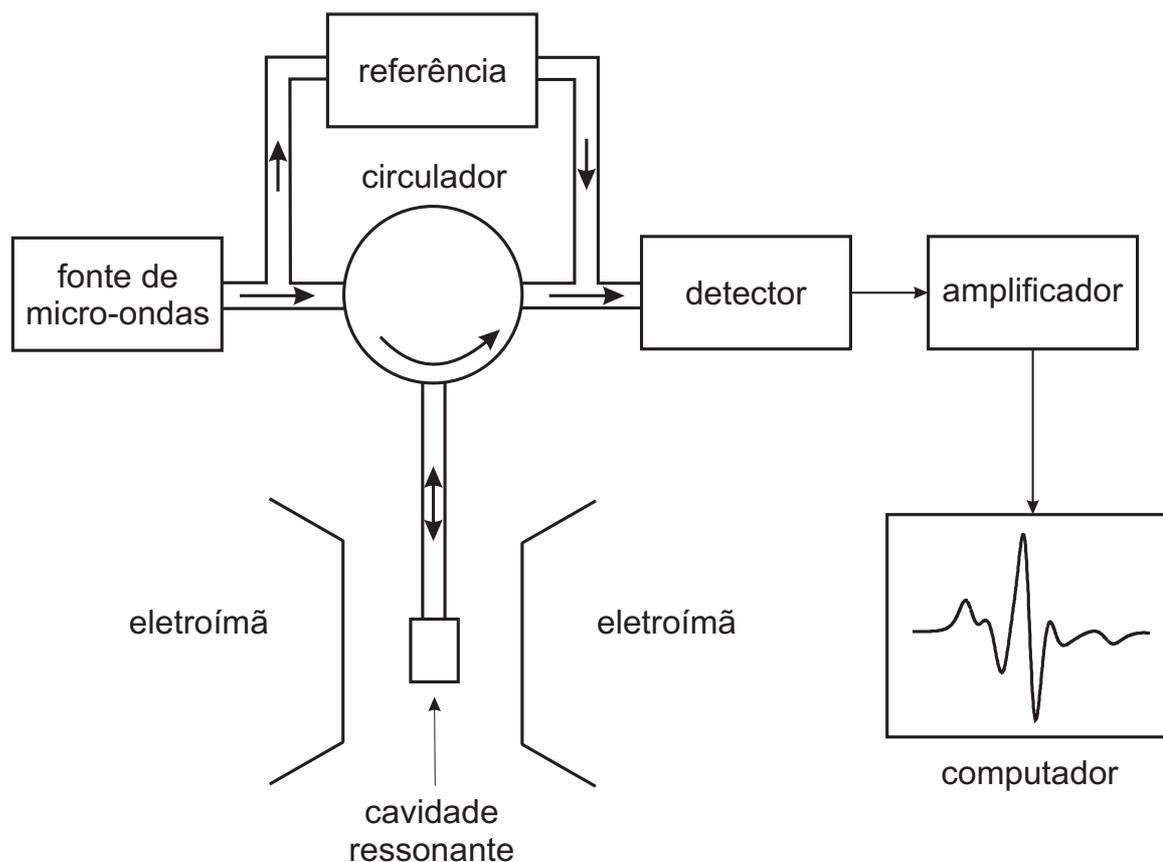
em que  $\mathcal{R}$  representa a constante de difusão rotacional e  $\eta$  a viscosidade do meio.

Entretanto, os espectros de marcadores de spin incorporados em membranas lipídicas tais como os mostrados nos Capítulos 4 e 5 possuem tempos de correlação entre  $10^{-9} < \tau_c < 10^{-8}$  s (*Slow Tumbling*). O tratamento adequado para esta situação está desenvolvido no Apêndice B e seus resultados nos mostram que a forma da linha espectral depende da solução de um conjunto de equações algébricas acopladas que descrevem o perfil da curva de absorção obtida pela perturbação do sistema através do campo de micro-ondas oscilante.

Por outro lado, os espectros de RPE de radicais livres nitróxido são sensíveis não só aos movimentos moleculares, mas também dependem da natureza do meio em que estes estão dissolvidos. Isto se dá pelo fato de que os parâmetros magnéticos de qualquer espécie de radical livre são funções muito sensíveis da distribuição eletrônica da molécula e, portanto, são influenciadas por perturbações devido ao ambiente. Dessa forma, o fator  $g$  e a constante de desdobramento hiperfino  $a$  dos espectros de marcadores de spin se tornam uma ferramenta eficiente de monitorar a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do ambiente no qual o marcador está inserido.

A Figura 2.9 mostra os principais componentes de um espectrômetro de RPE. Em espectrômetros mais antigos, a fonte de radiação eletromagnética era uma válvula *klystron* que foi substituída por uma fonte de radiação de estado sólido chamada diodo *Gunn* nos espectrômetros mais sofisticados. A maioria dos espectrômetros são de reflexão. Isto é, eles medem as variações (devido a transições espectroscópicas) na quantidade de radiação refletida à partir da amostra inserida em uma cavidade ressonante. Cavidades ressonantes são utilizadas para amplificar os sinais de RPE provenientes da amostra uma vez que a cavidade armazena a energia de micro-ondas e impede sua reflexão.

As cavidades são caracterizadas por sua qualidade  $Q$ , a qual indica o quão eficientemente a cavidade armazena a energia de micro-ondas. A sensibilidade do espectrômetro está



**Figura 2.9:** Diagrama de blocos simplificado de um espectrômetro de RPE. Figura adaptada de *Quantitative EPR* [129].

diretamente relacionada com  $Q$  pela da relação

$$Q = \frac{2\pi(\text{energia armazenada})}{\text{energia dissipada por ciclo}}, \quad (2.29)$$

onde a energia dissipada em cada ciclo representa a quantidade de energia perdida durante um período de oscilação da radiação de micro-ondas. A energia pode ser dissipada nas paredes laterais da cavidade uma vez que as micro-ondas geram correntes elétricas internas que, por sua vez geram calor. Como consequência da ressonância, haverá uma onda estacionária no interior da cavidade. Desde que ondas eletromagnéticas estacionárias têm suas componentes de campo elétrico e magnético exatamente fora de fase, as cavidades ressonantes são construídas de modo a anular a componente do campo elétrico e maximizar a componente do campo magnético em seu centro [129].

Como mencionado anteriormente, os espectrômetros de RPE utilizam uma técnica

conhecida como detecção sensível à fase para melhorar sua sensibilidade. Neste tipo de detecção, a magnitude do campo magnético a qual a amostra é submetida, varia senoidalmente na frequência de modulação (normalmente 100 kHz). Se houver um sinal de RPE, a modulação do campo varre rapidamente parte do sinal e a amplitude da radiação de micro-ondas refletida da cavidade é modulada com a mesma frequência. Quaisquer sinais (como ruído e/ou interferências elétricas) que não estejam de acordo com a referência produzida pelo detector sensível à fase são suprimidos. Para melhorar ainda mais a sensibilidade, uma constante de tempo é usada para filtrar o ruído. A detecção sensível à fase com modulação do campo magnético pode aumentar a sensibilidade de detecção em várias ordens de magnitude. No entanto, o usuário deve ter cuidado na escolha da amplitude e da frequência da modulação, além da constante de tempo. Uma má escolha de qualquer um destes três parâmetros pode causar distorções nos sinais de RPE e criar artefatos experimentais<sup>6</sup>.

## **2.2 Espectroscopia e Microscopia de Fluorescência Aplicadas a Sistemas Biológicos**

### **2.2.1 Teoria Geral**

Luminescência é a emissão de fótons na região do ultravioleta, visível ou infravermelho à partir de estados eletrônicos excitados. A luminescência pode ser dividida em duas categorias - fluorescência e fosforescência - dependendo da natureza do estado excitado. A fluorescência é caracterizada por transições eletrônicas entre estados do tipo singlete, nos quais o elétron no orbital excitado está orientado na direção oposta do elétron no orbital do estado fundamental. Conseqüentemente, o retorno para o estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente acompanhado da emissão de um fóton. As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente de  $10^8 \text{ s}^{-1}$ , desta forma, o tempo de vida típico da fluorescência é próximo de  $10^{-9} \text{ s}$  [131].

---

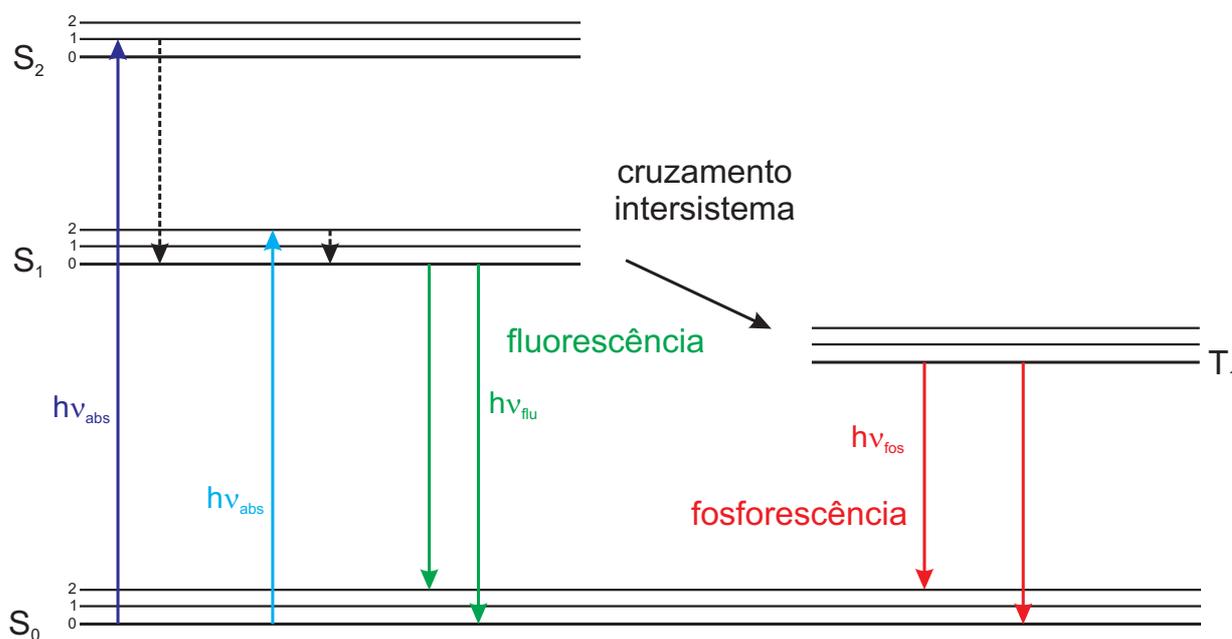
<sup>6</sup>Neste trabalho, estamos utilizando parâmetros instrumentais adequados para a detecção do sinal de marcadores de spin baseados no nitróxido. Uma descrição detalhada sobre os efeitos da variação destes parâmetros sobre a linha espectral pode ser encontrada em *Instrumental Aspects of Spin Labeling* [130].

Por outro lado, a fosforescência é caracterizada por transições eletrônicas entre estados do tipo tripleto, nos quais o elétron no orbital excitado tem a mesma orientação de spin do elétron do estado fundamental. Este tipo de transição é proibida e as taxas de emissão são lentas ( $10^3$  a  $10^0 \text{ s}^{-1}$ ), desta forma, o tempo de vida da fosforescência é tipicamente de milissegundos ou até segundos [131]. Neste trabalho, estamos interessados no fenômeno da fluorescência.

Os processos típicos que ocorrem entre a absorção e a emissão de luz podem ser ilustrados por um diagrama de Jablonski (Figura 2.10). Depois da absorção de luz, o fluoróforo geralmente é excitado para algum nível de energia vibracional mais elevado. Com algumas raras exceções, moléculas em fase condensada relaxam para um nível vibracional menos elevado. Este processo é chamado conversão interna e ocorre em  $10^{-12} \text{ s}$  ou menos [131]. Desde que os tempos de vida da fluorescência são tipicamente próximos a  $10^{-8} \text{ s}$ , a conversão interna acontece antes da emissão. Desta forma, a emissão fluorescente resulta de um estado excitado termicamente equilibrado, isto é, do nível vibracional de menor energia do estado excitado. Para a maioria das moléculas, a diferença de energia entre o estado fundamental e os estados excitados é suficientemente grande para que os estados excitados possam ser termicamente populados. Esta é a razão pela qual utilizamos luz e não calor para induzir a fluorescência.

O fenômeno da fluorescência apresenta um número de características gerais. Uma análise do diagrama de Jablonski (Figura 2.10) revela que a energia da emissão é tipicamente menor do que a da absorção. Este fenômeno foi primeiramente observado por Sir. G. G. Stokes [132] e por isso recebe o nome de deslocamento de Stokes. Uma causa comum do deslocamento de Stokes é o decaimento para o nível de menor energia vibracional de  $S_1$ . Além disso, os fluoróforos geralmente decaem para o nível de maior energia vibracional de  $S_0$  (Figura 2.10), resultando no favorecimento da perda de energia de excitação pela termalização do excesso de energia vibracional. Somado a estes efeitos, os fluoróforos podem apresentar ainda deslocamento de Stokes devido a efeitos do solvente, reações dos estados excitados, formação de complexos, e/ou transferência de energia [131].

Outra característica geral da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão é obser-



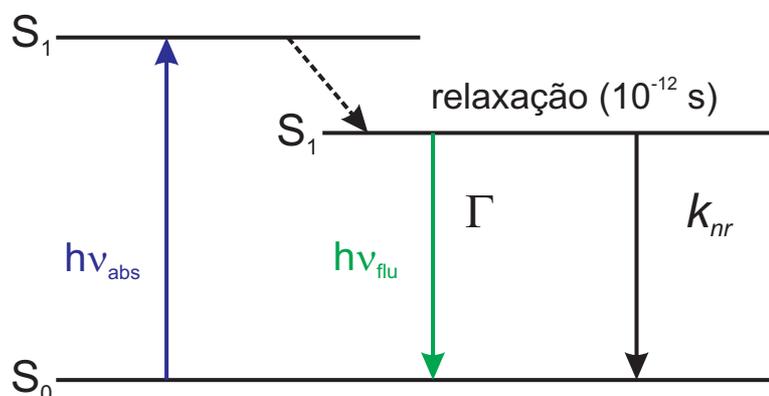
**Figura 2.10:** Diagrama de Jablonski ilustrando as transições responsáveis pela fluorescência e fosforescência. Figura adaptada de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [131].

vado para qualquer comprimento de onda usado na excitação (*Kasha's rule*) [133]. Isso pode ser explicado pelo fato de que na excitação para os níveis de energia eletrônicos e vibracionais mais altos, o excesso de energia é rapidamente dissipado, deixando o fluoróforo no nível vibracional mais baixo de  $S_1$ . Essa relaxação ocorre em cerca de  $10^{-12}$  s e é provavelmente o resultado da superposição dos estados de energia próximos. Devido esta relaxação rápida, o espectro de emissão é usualmente independente do comprimento de onda da excitação.

O tempo de vida da fluorescência  $\tau_v$  e o rendimento quântico  $Q$  talvez sejam as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é definido como sendo o número de fótons emitidos, relativos ao número de fótons absorvidos. Substâncias com maior rendimento quântico ( $Q \approx 1$ ) tais como as rodaminas, apresentam as emissões mais brilhantes. Já substâncias com maior tempo de vida, possuem um maior intervalo de tempo disponível para o fluoróforo interagir ou se difundir em um meio<sup>7</sup>. O significado de rendimento quântico e

<sup>7</sup>Geralmente, um aumento na temperatura resulta em um decréscimo no rendimento quântico e no tempo de vida de fluorescência. Isto se deve ao fato de que os processos não radiativos relacionados com a agitação térmica tais como as colisões com as moléculas do solvente além das vibrações e rotações intramoleculares tornam-se mais efetivos em altas temperaturas. Entretanto, na maioria das vezes os experimentos estão em bom acordo com a variação empírica linear  $\ln(1/Q - 1)$  versus  $1/T$  [134].

tempo de vida podem ser melhor ilustrados por um diagrama de Jablonski simplificado (Figura 2.11).



**Figura 2.11:** Diagrama de Jablonski simplificado ilustrando o significado de tempo de vida e de rendimento quântico. Figura adaptada de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [131].

O diagrama mostra os processos responsáveis pelo retorno do sistema para o estado fundamental (os processos de relaxação individuais, os quais levam o sistema para o estado  $S_1$  não foram explicitados). Em particular, estão destacadas a taxa de emissão do fluoróforo  $\Gamma$  e a taxa de decaimento não radiativo para  $S_0$   $k_{nr}$  (por conveniência, todos os processos não radiativos foram agrupados na constante  $k_{nr}$ ). Ambas as taxas  $\Gamma$  e  $k_{nr}$ , são responsáveis pela diminuição da população do estado excitado. Dessa forma, a fração de fluoróforos que decaem por meio da emissão de fótons é interpretada como o rendimento quântico dado por [131]

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (2.30)$$

Se  $k_{nr} \ll \Gamma$  o rendimento quântico se aproxima de 1. Note que o rendimento energético da fluorescência é sempre menor do que 1 devido as perdas de Stokes.

O tempo de vida do estado excitado é definido pelo tempo médio que a molécula gasta no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental. Para o fluoróforo descrito pelo diagrama ilustrado na Figura 2.11, o tempo de vida pode ser escrito como [131]

$$\tau_v = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (2.31)$$

O tempo de vida de um fluoróforo na ausência de processos não radiativos é chamado de tempo

de vida intrínseco ou natural e é dado por [131]

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma}. \quad (2.32)$$

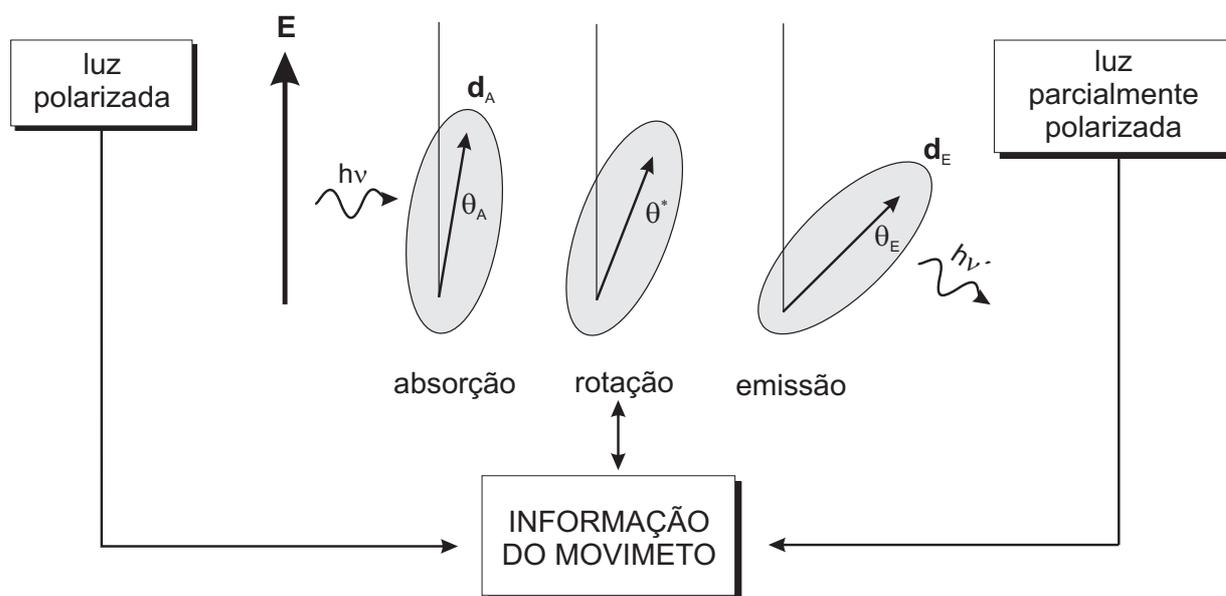
Usando as Equações (2.31) e (2.32) podemos escrever o tempo de vida natural como

$$\tau_v = \frac{\tau}{Q}. \quad (2.33)$$

## 2.2.2 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência pode ser aplicada a uma vasta gama de problemas em químicas, física e biologia. Esse tipo de espectroscopia faz uso dos espectros de emissão e absorção dos fluoróforos, bem como a anisotropia de sua fluorescência para encontrar informações sobre uma série de processos moleculares, incluindo interações molécula-solvente, difusão rotacional de biomoléculas, distâncias intermoleculares e mudanças conformacionais. As medidas de fluorescência podem ser classificadas em quase estáticas e resolvidas no tempo. Neste trabalho, vamos utilizar medidas do tipo quase estática. Neste tipo de medida, durante o processo de aquisição de dados a amostra é excitada com um feixe contínuo de luz. Devido a escala de tempo da fluorescência, quando a amostra é exposta a luz o estado quase estático é atingido quase imediatamente [131].

A anisotropia da fluorescência usa o fato de que se excitadas com luz polarizada a emissão de muitas moléculas também é polarizada, para obter informações sobre sistemas de interesse. A origem da anisotropia está relacionada com a orientação preferencial dos momentos de transição de absorção e de emissão ao longo da estrutura molecular dos fluoróforos (Figura 2.12). Contudo, a emissão fluorescente pode tornar-se despolarizada, por exemplo, pela difusão rotacional do fluoróforo. Nesse tipo de movimento, a direção dos momentos de transição de absorção e de emissão são alteradas e como consequência a radiação emitida se torna despolarizada. As medidas da anisotropia da fluorescência revelam então o deslocamento angular do fluoróforo que ocorre entre absorção e a subsequente emissão de um fóton. A taxa de difusão rotacional depende da viscosidade do meio, do tamanho e da forma da molécula fluorescente.



**Figura 2.12:** Movimento rotacional incluindo despolarização da fluorescência.  $d_A$  e  $d_E$  representam os momentos de transição de absorção e emissão respectivamente. Figura adaptada de *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* [134].

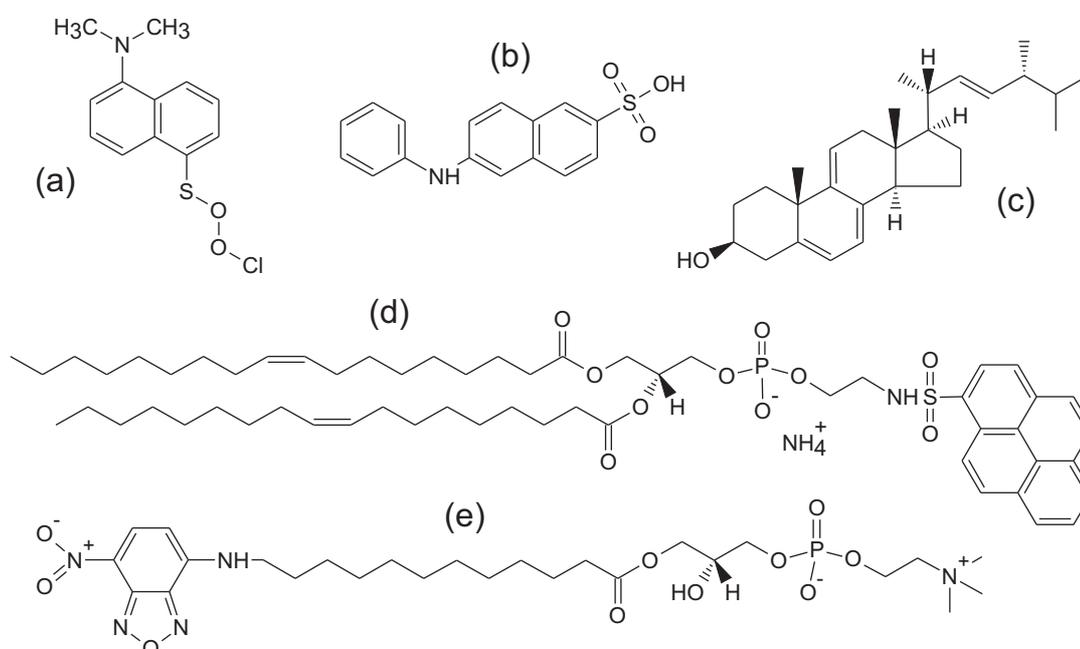
Pequenos fluoróforos em meios caracterizados por baixa viscosidade possuem alta difusão rotacional (mais rápida do que a taxa de emissão) e conseqüentemente sua emissão é despolarizada o que leva os valores da anisotropia para próximos de zero.

Assim como no caso dos marcadores de spin, foram desenvolvidas sondas fluorescentes estáveis sobre as condições usadas no estudo de sistemas biológicos, tais como pH, concentração salina e temperatura. Essas sondas também são sensíveis a seu ambiente (polaridade, restrições espaciais e campos elétricos locais) e sua presença causam alterações desprezíveis no sistema.

Seguindo esta ideia, uma série de sondas fluorescentes foram desenvolvidas como ferramenta para o estudo de sistemas biológicos (Figura 2.13). Entre elas se destacam as sondas desenvolvidas para o estudo de membranas lipídicas, DNA<sup>8</sup> e proteínas. As sondas projetadas para o estudo de membranas, geralmente são baseados nos diversos tipos de lipídios que compõem as bicamadas celulares (através da inserção de fluoróforos covalentemente ligados as cadeias acilas [135, 136] ou aos grupos polares dos lipídios [136, 137]) ou em moléculas que possuem grande hidrofobicidade [138, 139]. Esses tipos de sonda se organizam na membrana pelas

<sup>8</sup>Sigla para *deoxyribonucleic acid*.

mesmas interações hidrofóbicas que mantém os lipídios naturais estruturados na membrana. Já para as o caso das proteínas, uma variedade de sondas que possuem comprimentos de onda de excitação e emissão mais longos do que os aminoácidos aromáticos (dessa forma, a proteína marcada pode ser estudada na presença de outras proteínas não marcadas) foram projetadas para se ligar covalentemente aos grupos reativos das cadeias laterais de seus aminoácidos (principalmente aminas e histidinas) [140] ou não covalentemente [141] (sondas deste tipo possuem baixa ou nenhuma fluorescência em água, mas fluorescem fortemente quando ligadas as proteínas [142]).

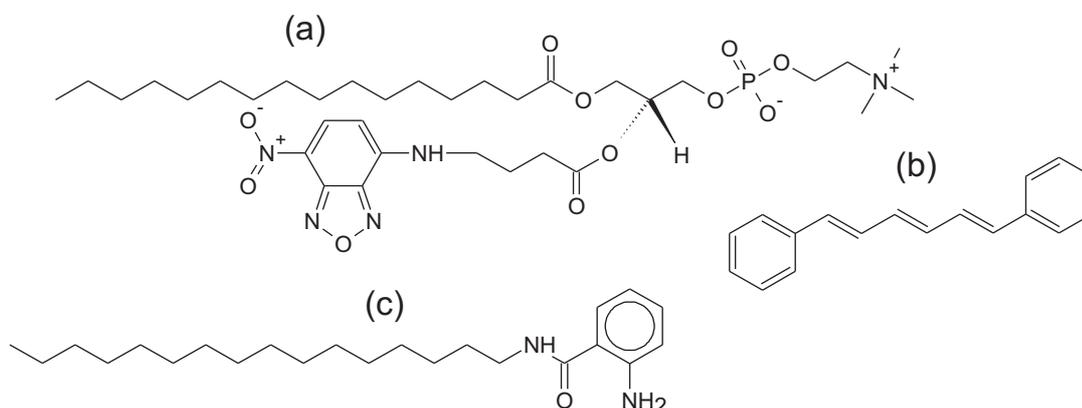


**Figura 2.13:** Estrutura química de algumas sondas fluorescentes frequentemente usadas no estudo de membranas lipídicas e proteínas. (a) cloreto de dansilo (DNS-Cl), (b) 2-anilino-naftaleno-6-sulfônico (2,6-ANS), (c) dehidroergosterol (DHE), (d) 1,2-di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-(1-pirenosulfonil) (sal de amônio) (Pireno-PE) e (e) 1-12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (Liso-NBD-PC). As sondas DNS-Cl e 2,6-ANS se ligam covalentemente e não covalentemente as proteínas, respectivamente. As sondas DHE, Pireno-PE e Liso-NBD-PC se estruturam nas bicamadas lipídicas através das interações hidrofóbicas.

Neste trabalho, estamos particularmente interessados no comportamento da anisotropia<sup>9</sup> da fluorescência de sondas lipofílicas (Figura 2.14). Essas sondas, quando incorporadas ao

<sup>9</sup>A polarização e a anisotropia contém as mesmas informações. Entretanto, o uso da polarização deve ser desencorajado já que comparada a anisotropia (a qual é normalizada pela intensidade total  $I = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ ), o uso da polarização traz uma complicação nas equações. Por exemplo, suponha que uma determinada amostra contenha várias espécies emissoras cada uma com valores de polarização  $P_i$  e intensidades fracionárias  $f_i$  distintas. A

ambiente da membrana possuem movimento restrito, o qual resulta na variação da anisotropia de sua fluorescência e nos permite avaliar por exemplo a dinâmica interna de membranas lipídicas ou o efeito de pequenas moléculas sobre suas temperaturas de transição de fase.



**Figura 2.14:** Estrutura química das sondas lipofílicas usadas neste trabalho. (a) 1-palmitoil-2-6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (6-NBD-PC), (b) 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) e (c) 2-amino-N-hexadecil benzamida (AHBA).

A Figura 2.15 mostra um esquema para medição da anisotropia da fluorescência. Na maioria dos experimentos a amostra é excitada com luz verticalmente polarizada, ou seja, o vetor campo elétrico da luz de excitação está orientado paralelamente a direção vertical (definida aqui como eixo  $z$ ). A intensidade da emissão é então medida por meio do uso de polarizadores e seus valores são utilizados para calcular a anisotropia  $r$  dada por

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (2.36)$$

Definida desta forma, a anisotropia da fluorescência é uma grandeza adimensional e polarização total  $P$  desta mistura é dada por [143]

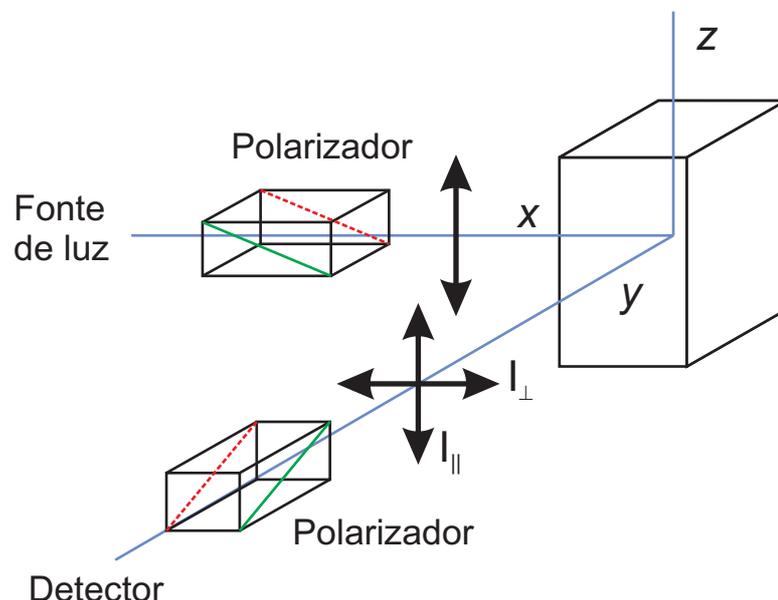
$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right)^{-1} = \sum_i \frac{f_i}{\left(\frac{1}{P_i} - \frac{1}{3}\right)}, \quad (2.34)$$

enquanto a anisotropia média  $\bar{r}$  é dada por [134]

$$\bar{r} = \sum_i f_i r_i \quad (2.35)$$

em que  $r_i$  indica a anisotropia de cada espécie emissora. Além disso, o decaimento da polarização não pode ser ajustado por uma única exponencial (como é o caso do decaimento da anisotropia) mesmo para uma molécula com simetria esférica [144].

independente da intensidade total da emissão da amostra. Além disso, na ausência de artefatos experimentais, a anisotropia também é independente da concentração do fluoróforo.



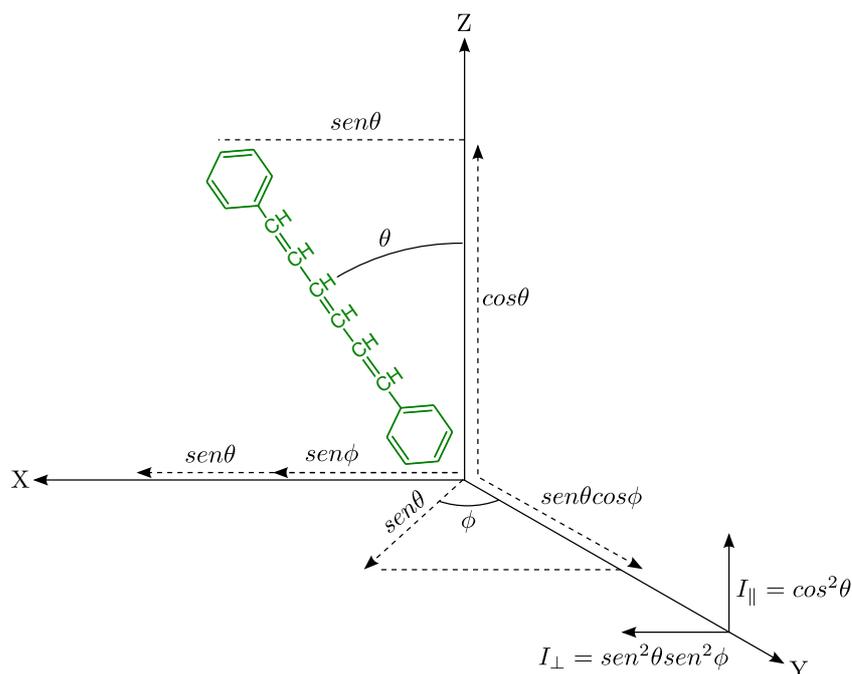
**Figura 2.15:** Diagrama esquemático para a medida da anisotropia da fluorescência. Figura adaptada de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [144].

Considerando que os momentos de transição de absorção e emissão sejam paralelos e que o fluoróforo está orientado com ângulos  $\theta$  e  $\phi$  em relação ao sistema de coordenadas do laboratório (Figura 2.16) existirão orientações preferenciais da população de estados excitados na direção da polarização da radiação de excitação. As intensidades da radiação emitida são então, proporcionais à projeção do momento de transição no sistema de coordenadas escolhido (isto é verdade já que projetar o momento de transição é o mesmo que projetar o campo elétrico criado pelo fluoróforo). O campo elétrico criado por um fluoróforo pode ser escrito como (ver Apêndice C para mais informações)

$$E(\theta, \phi) = k \frac{\text{sen}\theta}{r} \hat{\theta}, \quad (2.37)$$

em que  $k$  é uma constante,  $r$  é a distância do fluoróforo até o ponto de observação e  $\hat{\theta}$  é um vetor unitário na direção da coordenada  $\theta$ . A intensidade da luz emitida é proporcional ao quadrado do campo elétrico e é dada por

$$I(\theta, \phi) = k^2 \frac{\text{sen}^2\theta}{r^2} \hat{r}, \quad (2.38)$$



**Figura 2.16:** Intensidades emitidas para um único fluoróforo em um sistema de coordenadas. Figura adaptada de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [144].

em que  $\hat{r}$  é um vetor unitário da direção da propagação.

Desta maneira, podemos escrever as intensidades descritas na Figura 2.16 como

$$I_{||}(\theta) \propto \cos^2 \theta \quad (2.39)$$

e

$$I_{\perp}(\theta, \phi) \propto \text{sen}^2\theta \text{sen}^2\phi. \quad (2.40)$$

Se considerarmos que os fluoróforos estão orientados aleatoriamente, a dependência em  $\phi$  da Equação (2.40) pode ser eliminada para uma situação onde a população de fluoróforos excitados está simetricamente distribuída em torno do eixo  $z$ , fazendo

$$\langle \text{sen}^2\phi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \text{sen}^2\phi d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2}. \quad (2.41)$$

Portanto, as Equações (2.39) e (2.40) passam a ser escritas como

$$I_{||} \propto \cos^2 \theta \quad \text{e} \quad I_{\perp} \propto \frac{1}{2} \text{sen}^2\theta. \quad (2.42)$$

Fazendo a média com respeito ao eixo  $z$  obtemos

$$\overline{I_{||}} = \int_0^{2\pi} \cos^2 \theta P(\theta) d\theta = \langle \cos^2 \theta \rangle \quad (2.43)$$

e

$$\overline{I_{\perp}} = \int_0^{2\pi} \text{sen}^2\theta P(\theta) d\theta = \frac{1}{2} \langle \text{sen}^2\theta \rangle \quad (2.44)$$

onde  $P(\theta)$  é a probabilidade do fluoróforo estar orientado entre  $\theta$  e  $\theta + d\theta$ . Usando a Equação (2.36) podemos reescrever a anisotropia da fluorescência como<sup>10</sup>

$$\begin{aligned} r &= \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \\ &= \frac{\langle \cos^2\theta \rangle - \frac{1}{2}(1 - \langle \cos^2\theta \rangle)}{\langle \cos^2\theta \rangle + (1 - \langle \cos^2\theta \rangle)} \\ &= \frac{3\langle \cos^2\theta \rangle - 1}{2}. \end{aligned} \quad (2.45)$$

Quando uma amostra é excitada com luz polarizada, as moléculas que possuem momento de transição paralelo ao campo elétrico da radiação de excitação possuem maior probabilidade de serem excitadas. Entretanto, em geral, os momentos de transição de absorção e emissão não são paralelos (Figura 2.17). Para esta situação temos que

$$\cos\theta_E = \cos\theta_A \cos\alpha + \cos\psi \text{sen}\theta_A \text{sen}\alpha \quad (2.46)$$

e

$$\cos^2\theta_E = \cos^2\theta_A \cos^2\alpha + \cos^2\psi \text{sen}^2\theta_A \text{sen}^2\alpha + 2\cos\theta_A \text{sen}\theta_A \cos\alpha \text{sen}\alpha \cos\psi. \quad (2.47)$$

Assim, encontramos que

$$\begin{aligned} \langle \cos^2\theta_E \rangle &= \cos^2\alpha \langle \cos^2\theta_A \rangle + \frac{1}{2} \langle \text{sen}^2\theta_A \rangle \text{sen}^2\alpha \\ &= \frac{3}{2} \cos^2\alpha \langle \cos^2\theta_A \rangle - \frac{1}{2} \langle \cos^2\theta_A \rangle - \frac{1}{2} \cos^2\alpha + \frac{1}{2}, \end{aligned} \quad (2.48)$$

---

<sup>10</sup>Note que uma medida quase estática é simplesmente uma média dos fenômenos resolvidos no tempo. Se um fluoróforo exibe um único tempo de decaimento ( $\tau_v$ ) e um único tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ), o decaimento da intensidade e da anisotropia da fluorescência são dados como [131]

$$I(t) = I_i e^{-t/\tau_v}$$

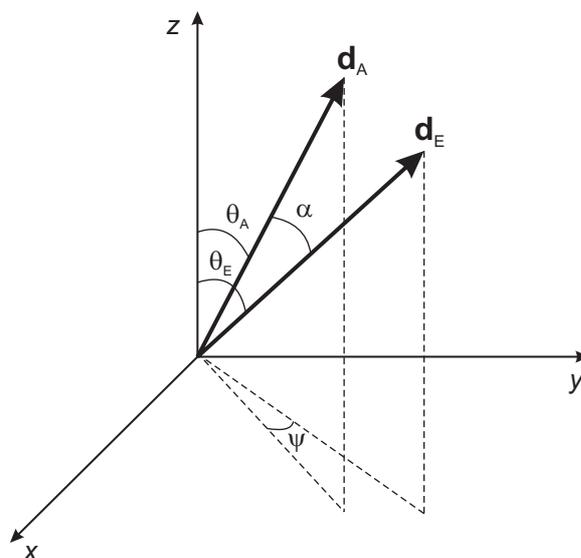
e

$$r(t) = r_i e^{-t/\tau_c},$$

onde  $I_i$  e  $r_i$  representam a intensidade e anisotropia da fluorescência respectivamente, em  $t = 0$  imediatamente após a excitação. Desta maneira, a anisotropia quase estática ( $r$ ) é dada pela média de  $r(t)$  ponderada por  $I(t)$  na forma

$$r = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt},$$

onde denominador foi introduzido para normalizar a anisotropia de forma a torná-la independente da intensidade total.



**Figura 2.17:** Definição dos ângulos  $\alpha$ , e  $\psi$  para a situação onde os momentos de transição de absorção ( $\mathbf{d}_A$ ) e de emissão ( $\mathbf{d}_E$ ) não são paralelos.

onde usamos

$$\langle \cos \psi \rangle = 0 \quad \text{e} \quad \langle \cos^2 \psi \rangle = \frac{1}{2}. \quad (2.49)$$

Conseqüentemente, a Equação (2.45) pode ser reescrita como

$$\begin{aligned} r &= \frac{3\langle \cos^2 \theta_E \rangle - 1}{2} \\ &= \frac{(3 \cos^2 \alpha - 1) (3\langle \cos^2 \theta_A \rangle - 1)}{2}. \end{aligned} \quad (2.50)$$

Podemos calcular  $\langle \cos^2 \theta_A \rangle$  fazendo

$$\begin{aligned} \langle \cos^2 \theta_A \rangle &= \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi \cos^2 \theta P(\theta) d\theta \\ &= \frac{3}{5}, \end{aligned} \quad (2.51)$$

onde usamos [134]

$$P(\theta) = \frac{\cos^2 \theta \sin \theta}{\int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi \cos^2 \theta \sin \theta d\theta}. \quad (2.52)$$

Portanto,

$$r = \frac{2}{5} \frac{(3 \cos^2 \alpha - 1)}{2} \quad (2.53)$$

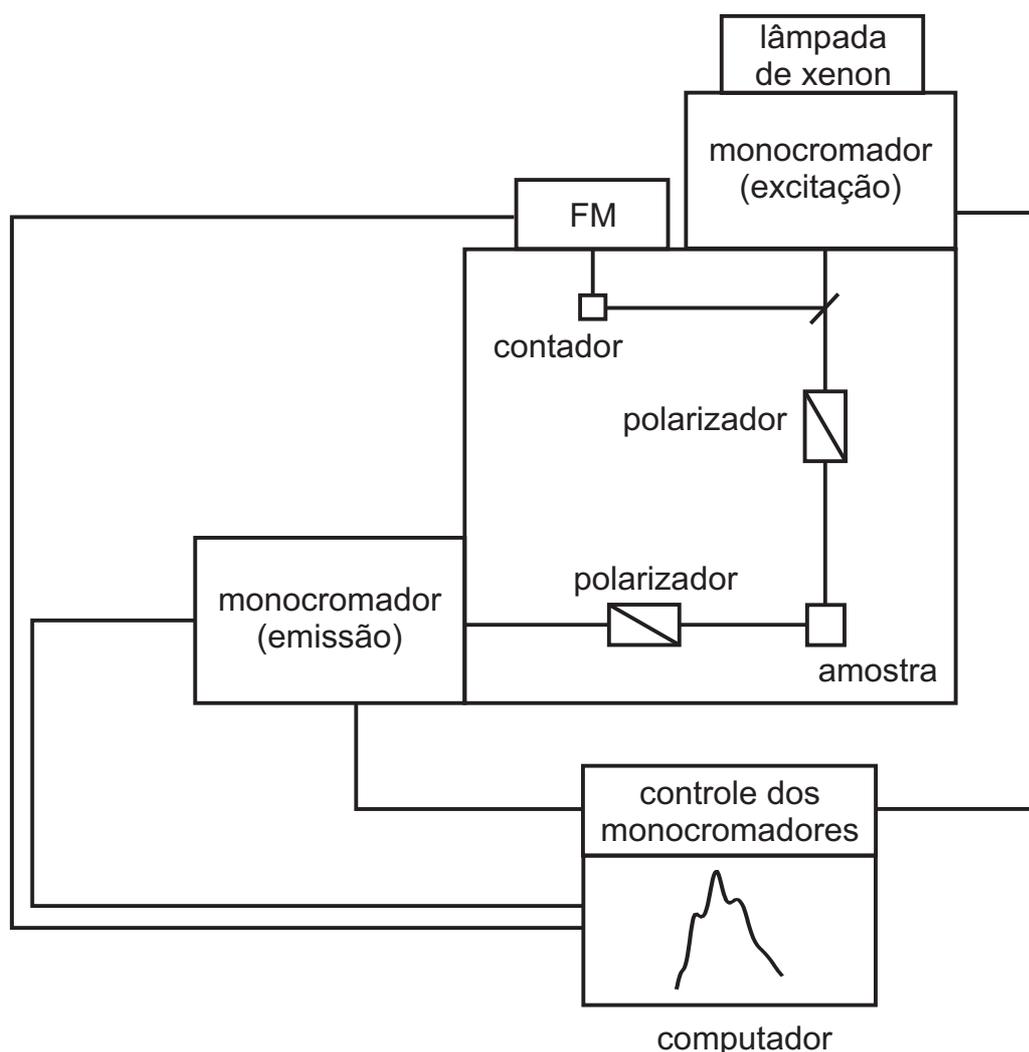
onde para  $\alpha = 0 \rightarrow r = r_0 = 0,4$  e para  $\alpha = 90 \rightarrow r = -0,2$  ( $r_0$  é denominada anisotropia fundamental).

Entretanto, existe uma diferença entre o valor teórico da anisotropia de emissão na ausência de movimento (anisotropia fundamental) e o valor obtido experimentalmente (anisotropia limitante). A anisotropia limite pode ser determinada tanto por medidas quase-estáticas em um meio rígido (para evitar os efeitos do movimento browniano), quanto em medidas resolvidas no tempo através do valor da anisotropia de emissão no tempo zero [134].

Se não houverem artefatos instrumentais, qualquer diferença observada entre a anisotropia fundamental e a anisotropia limitante deve estar relacionada com o próprio fluoróforo. Existem diversas explicações para esta diferença, no entanto, considera-se geralmente que a diferença entre as anisotropias fundamentais e limitantes é principalmente devido à torções vibracionais (mudança da geometria molecular entre seu estado fundamental e seu estado excitado) dos fluoróforos [134, 145]. Dessa maneira, uma dependência com temperatura da anisotropia limitante é esperada. Em baixas temperaturas  $r_0$  pode ser considerada constante, enquanto que para altas temperaturas seu valor diminui linearmente com a temperatura [134].

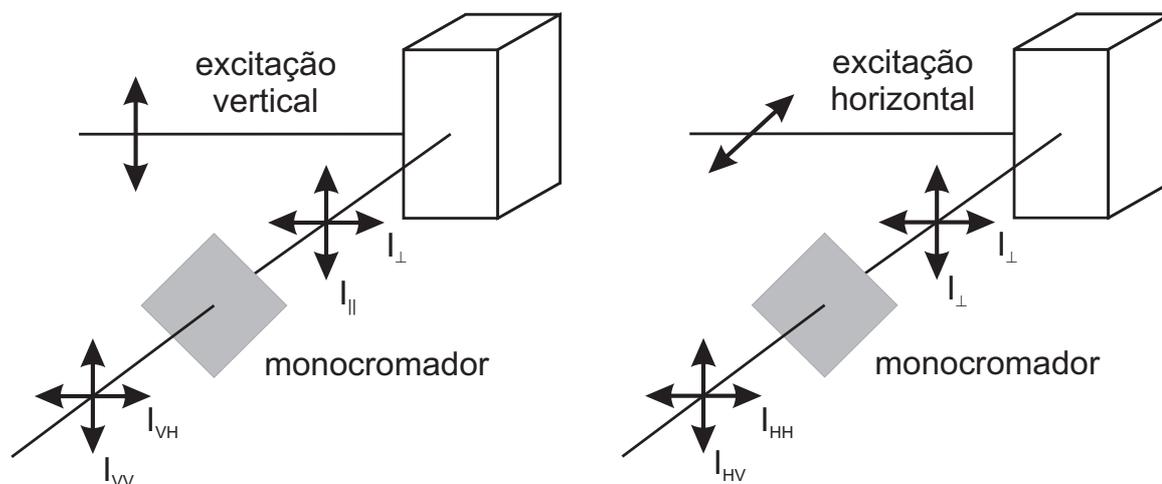
Na Figura 2.18 estão representados os principais componentes de um espectrofluorímetro convencional. A luz de excitação geralmente é gerada por um lâmpada de xenon de alta pressão que oferece a vantagem de uma emissão contínua a partir de  $\sim 250$  nm até o infravermelho. Monocromadores são usados para selecionar o comprimento de onda de excitação e a fluorescência é detectada em ângulo reto com relação ao feixe incidente e amplificada por uma fotomultiplicadora.

Em nossos experimentos, usamos um arranjo para medir a anisotropia da fluorescência conhecido como arranjo tipo L (Figura 2.19). Esse arranjo, é usado para fluorímetros que possuem apenas um canal de emissão. Os fluorímetros são geralmente equipados com um conjunto de monocromadores que possuem eficiências distintas para transmissão de luz verticalmente ou horizontalmente polarizada. Portanto, se a amostra for excitada com luz verticalmente polarizada, a rotação dos polarizadores da emissão irá alterar as intensidades medidas, mesmo que a amostra emita luz não polarizada [144]. Dessa forma, as intensidades medidas não são as verdadeiras intensidades paralela e perpendicular requeridas, mas sim, intensidades



**Figura 2.18:** Diagrama de blocos de um espectrofluorímetro convencional. Figura adaptada de *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* [134].

proporcionais às eficiências de transmissão do monocromador para cada componente polarizada. Para solucionar este problema, medidas com um único canal de emissão requerem a aquisição de quatro valores individuais das intensidades polarizadas;  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$ ,  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$ . Nessa notação, os dois índices subscritos indicam a orientação dos polarizadores de excitação e emissão, respectivamente. Por exemplo,  $I_{HV}$  corresponde a uma excitação por luz horizontalmente polarizada e uma emissão verticalmente polarizada. Esta notação é boa já que a ordem dos índices subscritos representa a ordem na qual a luz passa através dos dois polarizadores. Considerando que  $S_V$  e  $S_H$  sejam as sensibilidades do canal de emissão para os componentes verticalmente e horizontalmente polarizadas, respectivamente, verificamos que para a excitação



**Figura 2.19:** Diagrama esquemático para a medida da anisotropia da fluorescência no arranjo tipo L. Figura adaptada de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [144].

polarizada verticalmente as intensidades observadas são (Figura 2.19)

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad (2.54)$$

e

$$I_{VH} = kS_H I_{\perp}, \quad (2.55)$$

onde  $k$  é um fator de proporcionalidade para quantificar o rendimento quântico do fluoróforo e outros fatores instrumentais dependentes da sensibilidade dos polarizadores [144]. Manipulando (2.54) e (2.55) encontramos

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}. \quad (2.56)$$

Percebemos então que a razão das intensidades medidas é diferente do valor real, por um fator  $G$ . Para calcular a razão real entre as intensidades ( $I_{\parallel}/I_{\perp}$ ) devemos determinar o fator  $G$ , o qual é a razão das sensibilidades do sistema de detecção com respeito a luz verticalmente e horizontalmente polarizada. Note que se as medidas das intensidades não forem corrigidas por  $G$ , a anisotropia calculada estará incorreta. O fator  $G$  pode ser encontrado através de uma excitação horizontalmente polarizada. Usando a excitação horizontalmente polarizada, a distribuição de estados excitados é deslocada na direção do eixo de detecção. Com isso, ambas as componentes polarizadas ( $H$  e  $V$ ) são iguais e proporcionais à  $I_{\perp}$  (as componentes são iguais

porque o campo eléctrico é distribuído igualmente em torno do eixo de detecção e ambas as orientações do polarizador são perpendiculares à polarização da excitação). Assim, qualquer diferença medida em  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$  está associada ao sistema de detecção. Especificamente temos que

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = \frac{S_V}{S_H} = G. \quad (2.57)$$

Note que mesmo que a intensidade de excitação mude quando o polarizador do canal de excitação é girado, esta mudança é um fator constante no numerador e no denominador da equação acima e, que será portanto, cancelado.

Uma vez que o fator  $G$  seja determinado, a relação  $I_{\parallel}/I_{\perp}$  pode ser calculada usando

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}G} = \frac{I_{VV}I_{HH}}{I_{VH}I_{HV}} = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (2.58)$$

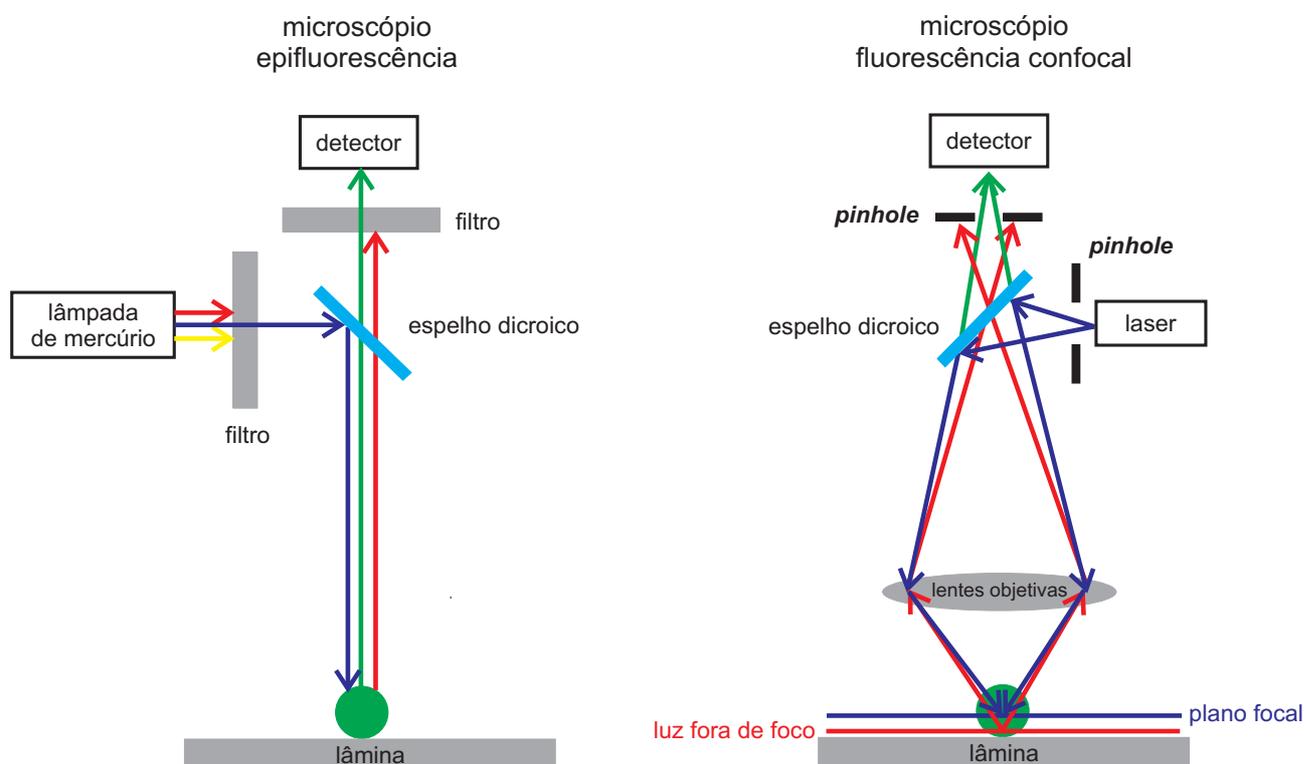
e a anisotropia passa a ser dada por

$$r = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 2} = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}. \quad (2.59)$$

### 2.2.3 Microscopia Confocal

O fenômeno da fluorescência pode ser usado para construir imagens de amostras naturalmente fluorescentes e/ou feitas fluorescentes pela adição de moléculas extrínsecas através da microscopia de fluorescência. Fazendo uso desta metodologia, a microscopia confocal, ao contrário da microscopia convencional, nos permite ver imagens claras dentro de amostras espessas. Considere por exemplo um microscópio de epifluorescência, mostrado na Figura 2.20. Durante a iluminação da amostra, embora a excitação seja focada em um determinado plano, vários outros planos acabam sendo excitados. Desta forma, a imagem formada no detector é o resultado da superposição da imagem proveniente do plano focal com um série de outras imagens provenientes de planos fora de foco (ao longo da espessura da amostra) excitados durante a iluminação. Já um microscópio confocal usa uma fonte de luz pontual para excitar uma região muito pequena da amostra. Esse tipo de iluminação, excita fortemente um único ponto ao longo da espessura da amostra fazendo com que a excitação de zonas fora de foco

sejam minimizadas. Assim como no caso da epifluorescência, a imagem formada no detector é o resultado da superposição da imagem proveniente do plano focal com uma série de outras imagens provenientes de planos fora de foco. Entretanto, a imagem proveniente do plano focal possui melhor resolução. Por outro lado, se incluirmos um *pinhole* no arranjo experimental de tal forma que este possa eliminar toda a luz que não é proveniente do plano focal a imagem formada no detector, passa a ter somente a contribuição da excitação do plano focal. Portanto,



**Figura 2.20:** Principais componentes dos microscópios de epifluorescência e de fluorescência confocal. No arranjo de epifluorescência, luz proveniente de vários planos ao longo da espessura da amostra chega ao detector enquanto no arranjo confocal apenas a luz proveniente do plano focal chega o detector.

um microscópio confocal (Figura 2.20), é a combinação de uma fonte de luz pontual que excita um ponto focal ao longo da espessura da amostra com um detector *pinhole* que seleciona a luz emitida do plano focal

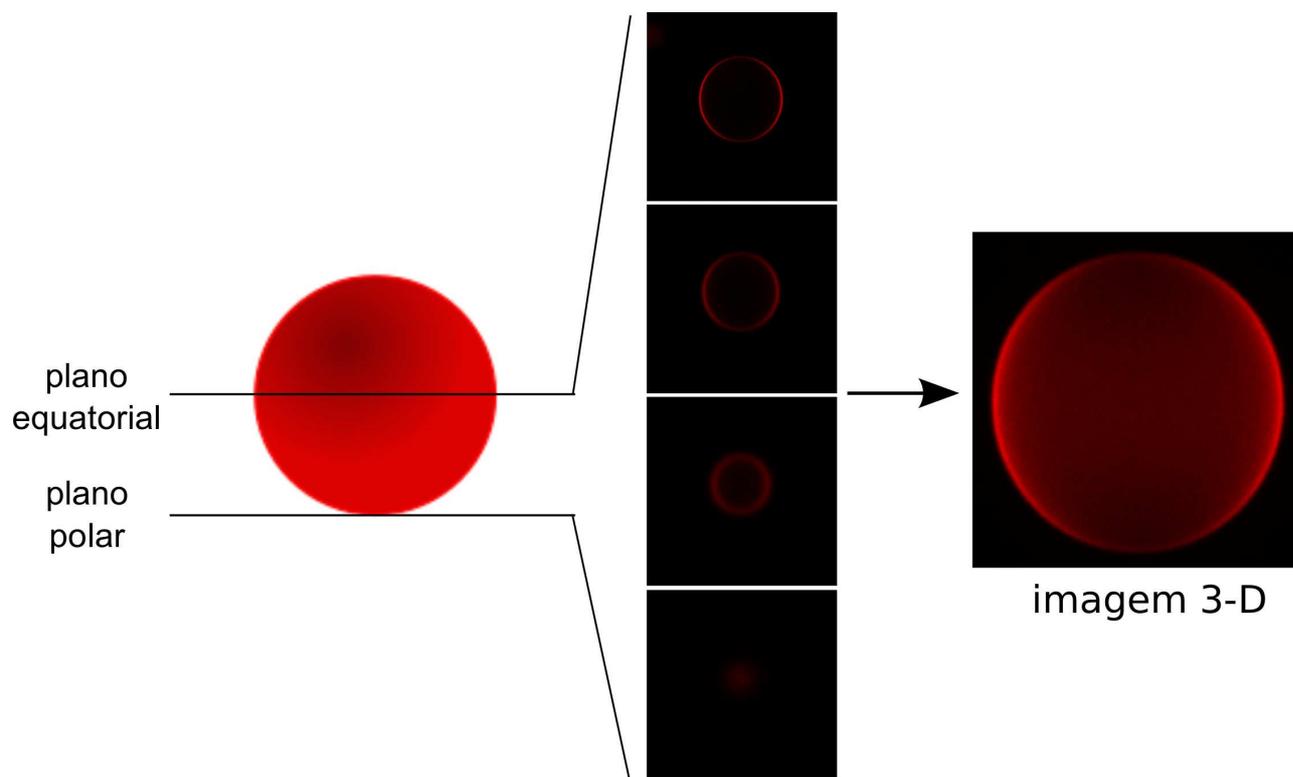
O microscópio confocal descrito acima, tem todas as características que permitem a obtenção de imagens referentes a um único ponto ao longo da espessura de uma amostra. No entanto, não é muito interessante olhar apenas para um único ponto. Dessa maneira, o

ideal é encontrar uma forma de mapear todo a amostra ponto-a-ponto. Para cumprir esta tarefa a maioria dos microscópios confocais de varredura a laser usam métodos de digitalização complexos para varrer os pontos do plano focal da amostra enquanto está parada. Um microscópio confocal discrimina pontos acima e abaixo do foco, uma característica denominada seccionamento óptico. Desta maneira, partes da amostra que estão acima ou abaixo do plano focal são fracamente iluminadas e a luz proveniente destas partes será descartada pelo *pinhole*. Os *pinholes* do microscópio confocal também eliminam a luz proveniente de pontos adjacentes ao ponto focal. Isso aumenta o contraste, até mesmo para as amostras finas. Este tipo de contraste é especialmente desejável quando se necessita diferenciar zonas escuras de zonas brilhantes como no caso dos domínios lipídicos mostrados no Capítulo 7.

Portanto, este microscópio pode determinar imagens em diferentes planos ao longo da espessura da amostra sem que estas imagens interfiram umas nas outras. Com um controle adequado, o microscópio confocal pode imagear uma série de seções ópticas, que podem depois ser superpostas para formar uma imagem tridimensional (Figura 2.21). Neste trabalho, a microscopia confocal de varredura a laser foi aplicada para a caracterização de domínios lipídicos em vesículas unilamelares gigantes através da utilização de sondas fluorescentes que particionam-se nas diferentes fases das bicamadas.

## 2.3 Microscopia de Força Atômica Aplicada a Sistemas Biológicos

Microscópios convencionais usam luz ou um feixe de elétrons para obter imagens de objetos. Entretanto, a resolução óptica de microscópios que utilizam luz é limitada pelo comprimento de onda da radiação utilizada. Embora uma alta resolução (em angstroms) de amostras biológicas possa ser obtida utilizando um microscópio eletrônico, a preparação das amostras surge como um fator limitante (via de regra as amostras devem ser congeladas, fixadas, secas e/ou processadas para obter-se um contraste na imagem). Desta forma, as alterações morfológicas, devido aos processos de preparação de amostra associados a microscopia eletrônica



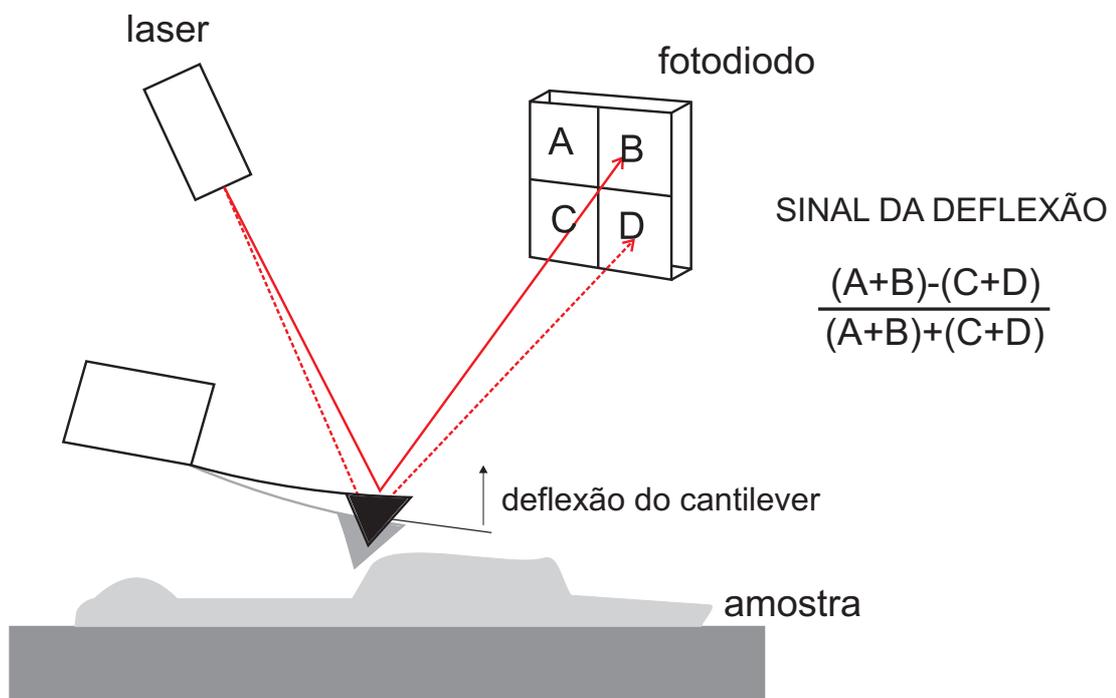
**Figura 2.21:** Micrografia confocal de uma vesícula unilamelar gigante composta de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina. A imagem 3-D é construída através da superposição de diversas imagens adquiridas entre os planos polar e equatorial.

sempre foram uma grande preocupação. Neste contexto, a microscopia de força atômica (AFM)<sup>11</sup>, a qual foi implementada por Bining e co-autores [146], tem se apresentado como uma ferramenta poderosa para o estudo da estrutura e morfologia de membranas lipídicas [147,148]. A possibilidade de se obter imagens de alta resolução de superfícies em meio aquoso tem revelado detalhes em escala nanométrica da morfologia de bicamadas lipídicas, os quais não podem ser observados por microscópios convencionais. Por exemplo, o estudo de eritrócitos através de AFM pode fornecer informações topológicas sobre a superfície da célula e sobre as estruturas da membrana com uma resolução significativamente mais elevada do que as fornecidas por um microscópio óptico [149]. Hoje em dia, a microscopia de força atômica aparece como uma das mais poderosas técnicas para a análise topográfica de membranas biológicas a uma resolução lateral inferior a 1 nm e uma resolução vertical entre 0,1 e 0,2 nm, permitindo que

<sup>11</sup>Sigla para *Atomic Force Microscopy*.

macromoléculas individuais sejam estudadas em condições fisiológicas [150].

A ideia básica da microscopia de força atômica é utilizar uma ponta de prova montada sobre um cantilever para varrer a superfície da amostra utilizando uma força constante [148]. Tanto a ponta como a amostra, podem ser precisamente deslocadas num padrão reticulado usando um piezo-tubo *xyz* para digitalizar a superfície da amostra e a deflexão do cantilever medida opticamente é usada para gerar uma força resposta na amostra [147] permitindo que imagens de células vivas e membranas biológicas submersas em soluções aquosas sejam construídas (Figura 2.22).



**Figura 2.22:** Princípio básico de uma medida de microscopia de força atômica. Figura adaptada de <http://www.jpk.com/>.

A microscopia de força atômica em membranas biológicas, ou em um modelo de bicamadas planas suportadas como no nosso caso, pode ser realizada normalmente através do modo contato ou do modo contato intermitente. No modo contato, a sonda está em contato direto com a superfície da amostra, realizando uma varredura com força vertical constante. Apesar da alta resolução das imagens de AFM obtidas através deste modo de operação, a informação sobre a altura da amostra gerada pode não ser precisa, uma vez que o um excesso de força de

varredura pode modificar a estrutura da bicamada. No entanto, mesmo que a força empregada possa deformar a superfície da bicamada, informações sobre suas propriedades visco-elásticas das membranas e a determinação da constante de mola efetiva do cantilever, permitem que a medição da altura da membrana seja feita com precisão. Por outro lado, no modo intermitente, a ponta oscila a uma frequência alta, determinada pela constante de mola do cantilever, e interage com a superfície da amostra apenas no extremo inferior de cada ciclo para permitir que as interações adesivas entre a ponta e a superfície da amostra atuem. No modo intermitente em fluidos, as forças laterais são praticamente desprezíveis. A velocidade de varredura da ponta em relação à amostra também desempenha um papel fundamental na qualidade da imagem. Como as bicamadas lipídicas são amostras moles, uma digitalização de alta velocidade irá influenciar a sua forma. Portanto, um movimento lento da ponta de AFM na superfície da membrana seria ideal e resultaria em mínimas distorções e imagens melhor resolvidas.

Desde que força é usada para o detalhamento da topologia do material sob investigação, as propriedades mecânicas da amostra podem influenciar criticamente a formação da imagem. Ao estudar bicamadas lipídicas, as propriedades elásticas da amostra contribuem significativamente para a imagem formada. Para minimizar os efeitos elásticos, bicamadas lipídicas devem ser estudadas com a menor força de imagem possível. As flutuações térmicas experimentadas por um cantiléver livre podem ser usadas com indicação sobre o limite inferior das forças utilizadas para obtenção da imagem. Se considerarmos o cantilever como uma mola descomprimida, as flutuações térmicas resultam em movimentos espontâneos da ponta com amplitude  $\Delta$ , e podem ser estimados utilizando [151]

$$\Delta = \sqrt{\frac{kT}{k_c}}, \quad (2.60)$$

em que  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta e  $k_c$  a constante de mola do cantilever. As amplitudes de flutuação e os correspondentes *ruídos de força* em temperatura ambiente (20 °C) para cantilévres comumente usados para construir imagens em modo contato em meio aquoso estão apresentados na Tabela 2.2.

Uma análise destes dados nos mostra que a utilização de cantilévres mais flexíveis reduz

**Tabela 2.2:** Valores para flutuação térmica, incertezas e razão sinal/ruído de cantilévers flexíveis. Tabela retirada de *Atomic Force Microscopy in Cell Biology* [150].

Constante de mola N/m	Flutuação térmica (Å) (força equivalente, pN)	Incerteza na força* pN	Sinal/ruído*
0,01	6,4 (6,4)	0,4	126
0,03	3,7 (11,1)	1,2	42
0,06	2,6 (15,6)	2,4	21
0,10	2,0 (20,0)	4,0	12,5
0,36	1,1 (39,6)	14,4	3,5

\* Para uma força de 50 pN.

acentuadamente o valor limite das forças utilizadas na digitalização, as quais devem ser maiores do que as flutuações térmicas. As flutuações são reduzidas, como uma função da força aplicada, uma vez que a ponta está em contato com a superfície, de acordo com a equação [150]

$$\Delta_c = \frac{kT}{2F}, \quad (2.61)$$

onde  $\Delta_c$  é a amplitude da flutuação na posição da ponta em contato e  $F$  é a força aplicada<sup>12</sup>. Os valores fornecidos pelos fabricantes para a constante de mola  $k_c$  dos cantilévers são, em geral, uma estimativa razoável do valor médio obtido para um número de cantilévers de comprimento e espessura comparável. Uma melhor avaliação da constante de mola do cantilever pode ser obtidas por meio da determinação da sua frequência de ressonância ou de seu ruído térmico [150].

As pontas utilizadas em AFM para o estudo de membranas biológicas geralmente são compostas de silício ou nitreto de silício e montadas sobre cantilévers que variam de 85 a 320  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,3 a 2  $\mu\text{m}$  de espessura. Para fazer o imageamento de membranas biológicas no modo de contato, cantilévers mais flexíveis são ideais uma vez que eles podem

<sup>12</sup>Por exemplo, aplicar uma força de 20 pN em uma cantilever com constante de mola igual a 0,01 N/m, corresponde a uma deflexão da posição da ponta de 2 nm e resulta em um decréscimo na flutuação de 6,4 para 1 Å. Ou seja, a flutuação espontânea é 1/20 do valor da deflexão imposta.

defletir sem deformar a superfície da amostra<sup>13</sup>. Além disso, a geometria e o tamanho da ponta desempenham um papel crítico na aquisição de imagens de AFM de membranas biológicas [152]. Artefatos como a convolução da ponta na imagem podem ocorrer se a ponta de varredura é menos acentuada do que o perfil do objeto naquele ponto [153] (ver Apêndice E para mais informações).

As forças que dominam a interação ponta-amostra são fortemente dependentes de uma distância de 0,1-100 nm. Essas forças são frequentemente referidas como forças de superfície uma vez que controlam a interação entre as superfícies de materiais que estão muito próximos. Qualquer classificação das forças de superfície é um tanto arbitrária, uma vez que todas possuem origem eletromagnética. Entretanto, a base da discussão é geralmente a *teoria DLVO*<sup>14</sup>. Esta teoria propõe que as interações entre pequenas partículas em solução aquosa pode ser explicadas pela interação entre duas forças: a van der Waals força e a força eletrostática de camada dupla. A força de van der Waals surge da correlação de dipolos dependentes do tempo em átomos ou moléculas. A dependência com o tempo ocorre tanto porque dipolos permanentes mudam sua orientação espacial quanto porque o próprio dipolo está mudando com o tempo. Uma vez que todos os materiais são polarizáveis, a força de van der Waals ocorre entre todos os átomos e todas as superfícies. A força entre dois átomos é relativamente fraca e de curta distância ( $D$ ), diminuindo proporcionalmente a  $D^{-7}$  para pequenas separações e a  $D^{-8}$  para separações maiores, onde a força é retardada devido às correlações mais fracas entre os átomos [156]. O cálculo das forças de van der Waals para sistemas de muitos átomos é complexo, uma vez que as forças entre átomos individuais não são aditivas. O tratamento moderno da forças de van der Waals, conhecido como *teoria de Lifshitz* [157, 158], é uma combinação de eletrodinâmica quântica e dados espectroscópicos<sup>15</sup>.

A força eletrostática de camada dupla é a outra contribuição para a força DLVO e surge

---

<sup>13</sup>O outro problema importante no estudo de bicamadas lipídicas utilizando a AFM é a adesão de agregados lipídicos na ponta de prova que resulta em perda de resolução, geração de artefatos na imagem, ou na total incapacidade de gerar uma força de resposta [150].

<sup>14</sup>Sigla em homenagem a Derjaguin e Landau [154], e Verwey e Overbeek [155].

<sup>15</sup>Um tratamento mais completo das forças de van der Waals entre a ponta de prova e a amostra pode ser encontrado no trabalho de Persson [159].

das cargas de superfície nas interfaces. A água tem uma constante dielétrica elevada. Assim, a dissociação de superfície ou adsorção de uma espécie carregada em água é muito comum [156]. A carga de superfície é balanceada por contra-íons dissolvidos que são atraídos para a superfície pelo campo elétrico mas são espalhados para aumentar a entropia. Juntos, os íons e superfície carregada são conhecidos como a dupla camada elétrica [156,160]. Quando outra superfície se aproxima, a dupla camada é perturbada e a força resultante é conhecida como a força de dupla camada<sup>16</sup>.

A teoria DLVO trata o meio intermediário como contínuo, por isso o modelo não atinge bons resultados quando o meio líquido entre as duas superfícies é de apenas poucos diâmetros moleculares de largura. Neste regime, as forças tendem a sofrer grandes oscilações com aproximadamente a periodicidade da molécula de solvente. Estas forças são normalmente descritas como forças de oscilação ou estruturais, e suas magnitudes aumentam com o grau de ordenação do solvente [156]. Em adição às forças estruturais, a interação entre solvente e sólidos pode também conduzir a forças mais específicas para as quais não existe um entendimento completo. Estas forças são muitas vezes conhecidos como forças de hidratação<sup>17</sup>. Devido sua correlação com a baixa energia de interação entre alguns sólidos com água, estas forças tem sido atribuídas à energia necessária para remover a água de hidratação da superfície.

O uso de suportes sólidos adequados também é crítico quando estamos medindo estruturas moles tais como as bicamadas lipídicas. Por esta razão, são necessários suportes atômica e molecularmente planos. Suportes hidrofílicos negativamente carregados tais como a mica e hidrofóbicos tais como o grafite são comumente usados em experimentos de AFM de estruturas de bicamada. Este tipo de suporte é facilmente preparado através da clivagem de suas folhas superiores antes da aplicação da amostra, apresentando uma superfície plana e limpa. Outra condição fundamental necessária para a realização de experimentos de AFM sob soluções aquosas é a seleção apropriada do tampão de ensaio. A solução tamponante deve ter condições

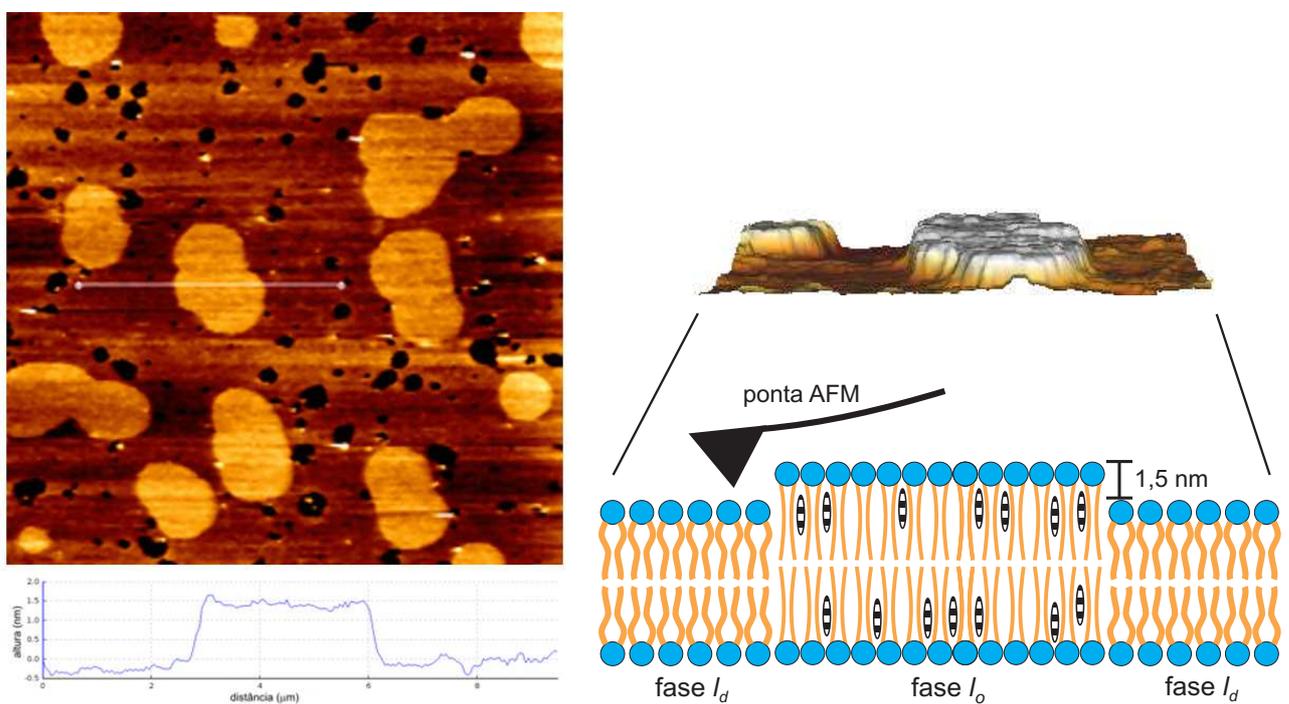
---

<sup>16</sup>Para uma descrição elaborada das forças de camada dupla ver *Foundations of Colloid Science* [161].

<sup>17</sup>Para uma descrição elaborada das forças estruturais e de hidratação ver *Intermolecular and Surface Forces* [162].

ideais de pH e de força iônica para permitir uma boa preparação das amostras além de permitir interações ponta-amostra adequadas durante o processo de imageamento.

Neste trabalho, estamos utilizando a microscopia de força atômica em modo contato para estudar domínios lipídicos formados em bicamadas lipídicas planas suportadas. Neste tipo de experimento, a ponta de AFM reflete as diferenças topológicas geradas pela separação lateral de fase de misturas lipídicas (Figura 2.23).



**Figura 2.23:** Imagem topográfica (altura) de bicamadas planas suportadas compostas de 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina:N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina:colesterol (2:1:1). As estruturas identificadas com maior altura relativa à bicamada (fase  $l_d$ ) são os domínios ricos em N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina:colesterol (fase  $l_o$ ), regiões claras na imagem, e as regiões negras representam o substrato de mica onde as bicamadas não foram adsorvidas.

# Capítulo **3**

## Objetivos

---

Este trabalho tem como principais objetivos:

- usar a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) através do método dos marcadores de spin para avaliar o efeito de terpenos sobre as componentes espectrais de marcadores estruturados em membranas de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC);
- estudar o efeito hemolítico de alguns terpenos e usar a técnica de RPE e o método dos marcadores de spin para avaliar seus efeitos sobre a dinâmica da membrana de eritrócitos e de fibroblastos para verificar se a capacidade dos terpenos em alterar a dinâmica das membranas plasmáticas está associada com seus efeitos de toxicidade;
- estabelecer uma metodologia para o estudo de membranas de estrato córneo (EC) através da anisotropia da fluorescência de sondas lipofílicas e avaliar o efeito de terpenos sobre a dinâmica de suas bicamadas;
- avaliar o efeito da incorporação da nanopartícula de ouro conjugada 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-(Nanopartículas Aurora) sobre a morfologia e dinâmica de membranas modelo compostas por diferentes combinações lipídicas através das técnicas de microscopia confocal de fluorescência, microscopia de força atômica e espectroscopia de fluorescência.

Capítulo **4**

**Efeitos de Terpenos Sobre as  
Componentes Espectrais de  
Marcadores de Spin Incorporados em  
Membrana Modelo**

---

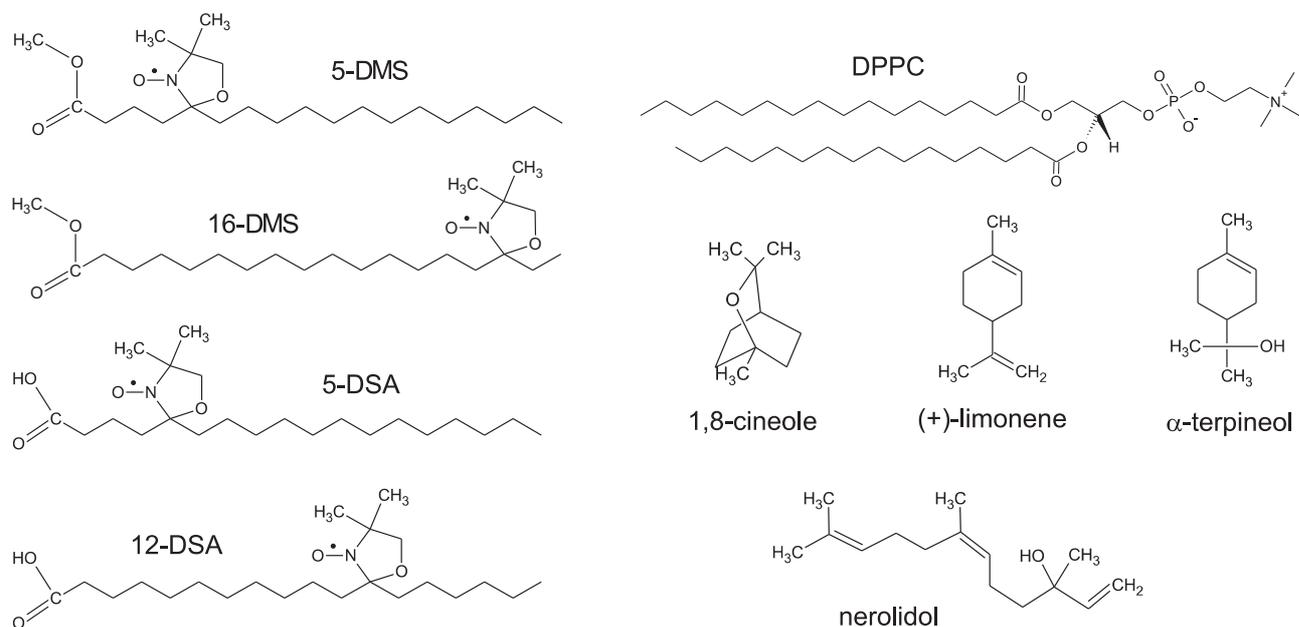
## 4.1 Motivação

O estudo das componentes espectrais provenientes de marcadores de spin estruturados em bicamadas lipídicas pode ser usado para se obter informações sobre as propriedades dinâmicas (as quais estão relacionadas com a permeabilidade) das membranas lipídicas. Em trabalhos anteriores de nosso laboratório [78, 82, 83, 163], os efeitos de terpenos sobre as componentes espectrais de marcadores de spin estruturados em membranas de estrato córneo foram utilizados para avaliar as mudanças provocadas por esses terpenos na dinâmica dessas membranas e explicar a habilidade dos terpenos em atuar com facilitadores da permeação. Neste contexto, nesta parte deste trabalho estamos interessados em estudar os efeitos de terpenos nas componentes espectrais de marcadores de spin baseados no ácido esteárico e estruturados em membranas de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, para obter informações complementares sobre a ação dos terpenos como facilitadores de permeação.

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Químicos

Os terpenos 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, (+)-limoneno e nerolidol foram adquiridos da Acros Organics (Geel, Bélgica). Os marcadores de spin 5-metil estearato (5-DMS), 16-metil estearato (16-DMS), 5-doxil estearato (5-DSE) e 12-doxil estearato (12-DSE) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e o fosfolípido, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) foi adquirido da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA) (Figura 4.1). Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) ou Merck S.A. (Rio de Janeiro, Brasil) com o maior grau de pureza disponível.



**Figura 4.1:** Estrutura química do lipídio, dos marcadores de spin e dos terpenos utilizados neste trabalho.

## 4.2.2 Preparação e Marcação das Membranas de DPPC

Filmes lipídicos de DPPC (1 mg/mL) dissolvidos em clorofórmio contendo os marcadores de spin desejados obedecendo a proporção de marcador:fosfolipídio (1:150) foram formados em tubos de vidro por evaporação do solvente usando um fluxo de nitrogênio gasoso. Os filmes foram mantidos sob vácuo moderado durante 12 h e posteriormente hidratados com 200  $\mu$ L de tampão fosfato salino (fosfato 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) para formar uma suspensão multilamelar de DPPC. Vesículas unilamelares foram preparadas utilizando um mini-extrusor adquirido da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA) equipado com filtros de policarbonato com poros de 0,1  $\mu$ m de diâmetro. Em seguida, as suspensões de vesículas foram resfriadas e concentradas por centrifugação (diminuição do volume final para  $\sim$  50  $\mu$ L). As alíquotas de solução estoque contendo cada terpeno diluído em etanol na proporção terpeno:etanol 1:2 foram adicionadas sobre as vesículas unilamelares de DPPC e as membranas foram então homogeneizadas e introduzidas em tubos capilares com diâmetro interno de 1 mm, os quais foram selados por chama. Finalmente, as amostras foram pré-aquecidas a 45  $^{\circ}$ C durante 30 min antes da realização dos experimentos de RPE.

### 4.2.3 Espectroscopia de RPE

As medidas de RPE foram realizadas utilizando espectrômetro Bruker ESP300 (Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma cavidade ressonante ER4102 ST operando em banda-X (aproximadamente 9,4 GHz) e um sistema de controle de temperatura Bruker. Para melhorar a estabilidade térmica das amostras, os capilares contendo as vesículas de DPPC foram mergulhados em óleo mineral no interior do tubo de quartzo utilizado para posicionar a amostra na cavidade ressonante. Um termopar foi introduzido no tubo de quartzo e em contato com o óleo em uma posição um pouco acima do centro da cavidade para aumentar a precisão nas medidas de temperatura da amostra. As medidas foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: potência de micro-ondas, 2 mW; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 ms.

### 4.2.4 Simulação Espectral

A simulação dos espectros de RPE foi realizada utilizando o software *NLLS* desenvolvido por Freed e co-autores [164] (para mais informações consultar apêndice B). Neste trabalho, estamos considerando que o tensor de difusão rotacional  $\mathcal{R}$  é axialmente simétrico em torno do eixo molecular  $z$  e que a anisotropia rotacional axial é descrita por  $\mathcal{N} = \log_{10}(\mathcal{R}_{\parallel}/\mathcal{R}_{\perp}) = 1$ . A taxa de difusão rotacional,  $\mathcal{R}_{bar}$ , obtida à partir do *NLLS* foi convertida para tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , através da relação (difusão rotacional browniana) [165]

$$\tau_c = \frac{1}{6\mathcal{R}_{bar}}. \quad (4.1)$$

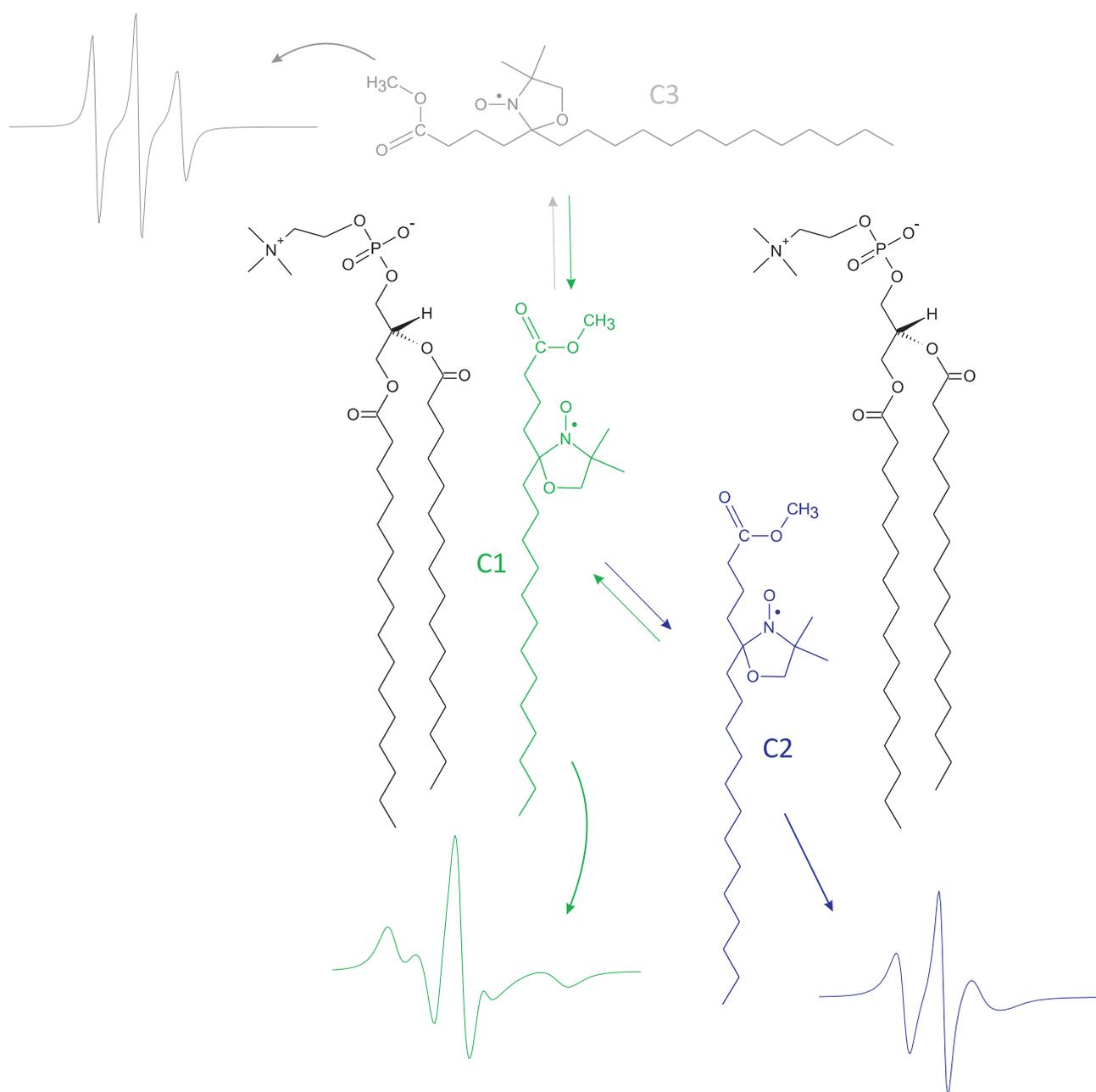
Os espectros experimentais foram ajustados utilizando modelos de 1 ou 2 componentes espectrais. Similarmente a outros estudos [166–168], os parâmetros magnéticos foram determinados com base em uma análise global do conjunto de espectros obtidos neste trabalho e todos os espectros foram simulados usando os mesmos parâmetros de entrada para os tensores magnéticos  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$ :  $g_{xx}(1) = 2,0080$ ;  $g_{yy}(1) = 2,0060$ ;  $g_{zz}(1) = 2,0017$ ;  $A_{xx}(1) = 6,9$ ;  $A_{yy}(1) = 6,0$ ;

$A_{zz}(1) = 32,0$ ;  $g_{xx}(2) = 2,0082$ ;  $g_{yy}(2) = 2,0062$ ;  $g_{zz}(2) = 2,0027$ ;  $A_{xx}(2) = 5,7$ ;  $A_{yy}(2) = 5,6$ ; e  $A_{zz}(2) = 31,2$ . No Apêndice D estão incluídos os arquivos de entrada utilizadas para simulação de espectros com 1 e 2 componentes espectrais.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Análise das Componentes Espectrais

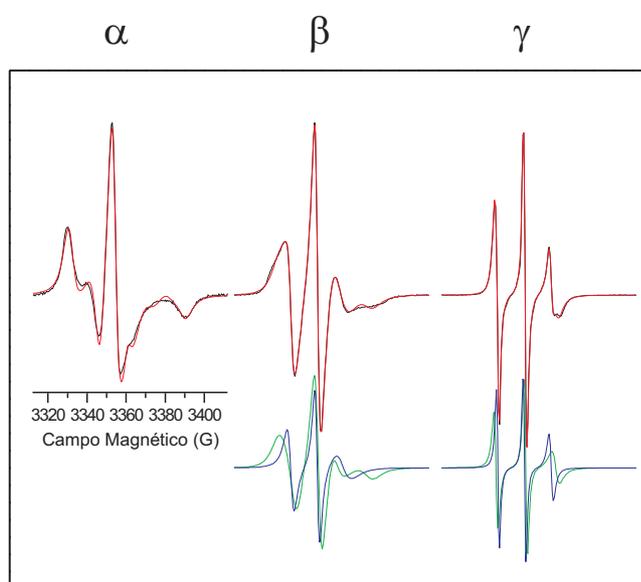
Como demonstrado por Camargos e Alonso [169], os espectros de marcadores de spin tais como o 5-DMS estruturado em membranas de DPPC podem ser ajustados como a superposição de duas componentes espectrais, as quais possuem forma de linha, parâmetros de movimento e de polaridade característicos. Neste trabalho, estamos utilizando a mesma ideia de Camargos e Alonso na qual o marcador de spin pode se encontrar em dois estados energéticos distintos quando incorporado em bicamadas lipídicas e adicionando um terceiro estado energético associado ao marcador de spin fora da membrana (Figura 4.2). Estamos denotando como componente espectral 1 (C1) a componente que diz respeito aos marcadores de spin que estão estruturados nas membranas de DPPC e interagindo fortemente com os grupos polares da bicamada, e como componente espectral 2 (C2) a componente espectral que diz respeito aos marcadores de spin que estão inseridos mais profundamente na membrana e, por isso, interagindo fracamente com a interface polar. Por fim, denotamos como componente 3 (C3) a componente relacionada aos marcadores de spin que estão dissolvidos nas micelas dos terpenos que se encontram fora das bicamadas de DPPC. Seguindo esta composição espectral, para todos os espectros experimentais onde a presença de duas componentes espectrais era evidente, foi realizada uma simulação usando uma combinação das componentes C1/C3 ou C1/C2. Desde que a forma de linha espectral está diretamente relacionada com o microambiente no qual o marcador de spin se encontra inserido, marcadores ditos na condição da componente C1 apresentam linhas mais anisotrópicas devido seu menor grau de movimento. Já os marcadores ditos na condição da componente C2 apresentam linhas mais estreitas e menos anisotrópicas



**Figura 4.2:** Representação esquemática das configurações propostas para o marcador de spin 5-DMS em membranas de DPPC e suas respectivas linhas espectrais. Os marcadores de spin da componente 1 (verde) estão localizados principalmente na região mais superficial da bicamada (onde se pode formar ligações de hidrogênio com maior facilidade) enquanto os marcadores de spin da componente 2 (azul) estão inseridos mais profundamente na membrana (realizando principalmente interações hidrofóbicas). Os marcadores de spin da componente 3 (cinza) estão fora da bicamada (dissolvidos no solvente).

resultantes de seu maior grau de movimento. E finalmente, marcadores ditos na condição da componente C3, onde o movimento molecular é superior ao das bicamadas, apresentam linhas ainda mais estreitas e isotrópicas do que as das componentes C2 (Figura 4.2).

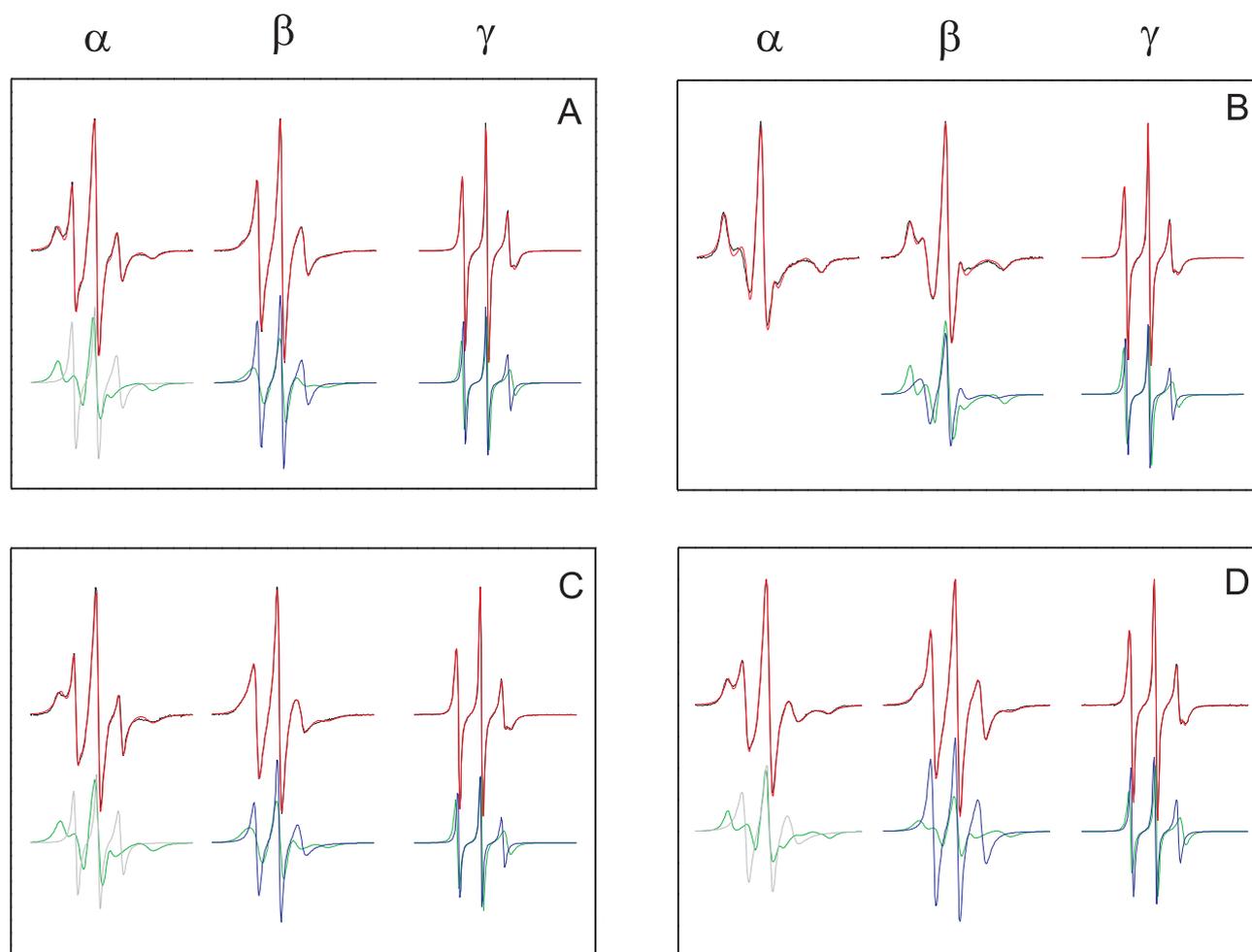
As Figuras 4.3 e 4.4 (e também as Figuras D.1 e D.2 do Apêndice D) mostram o espectro experimental mais representativo, seu melhor ajuste e as respectivas componentes espectrais do marcador 5-DMS introduzido em membranas de DPPC puras e tratadas com os diferentes terpenos na razões 0,6:1, 0,8:1 e 1,2:1 (terpeno:lipídio) nos intervalos de temperatura  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ( $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C) respectivamente. De maneira geral, a presença dos



**Figura 4.3:** Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2 respectivamente. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G.

terpenos facilita a transferência do marcador de spin de C1 para C3 no intervalo  $\alpha$  (o que não é verificado para a amostra controle) e de C1 para C2 no intervalo  $\beta$ - $\gamma$ . Como exemplo, na razão 0,8:1 os espectros das membranas tratadas com 1,8-cineol, (+)-limoneno e nerolidol na região  $\alpha$  podem ser descritos como uma superposição das componentes C1/C3 enquanto os espectros das membranas tratadas com  $\alpha$ -terpineol são ajustados somente por C1 assim como na amostra controle. Para as regiões  $\beta$  e  $\gamma$  os espectros das membranas de DPPC pura e tratadas com todos os terpenos podem ser ajustados por uma combinação das componentes C1/C2 (Figura

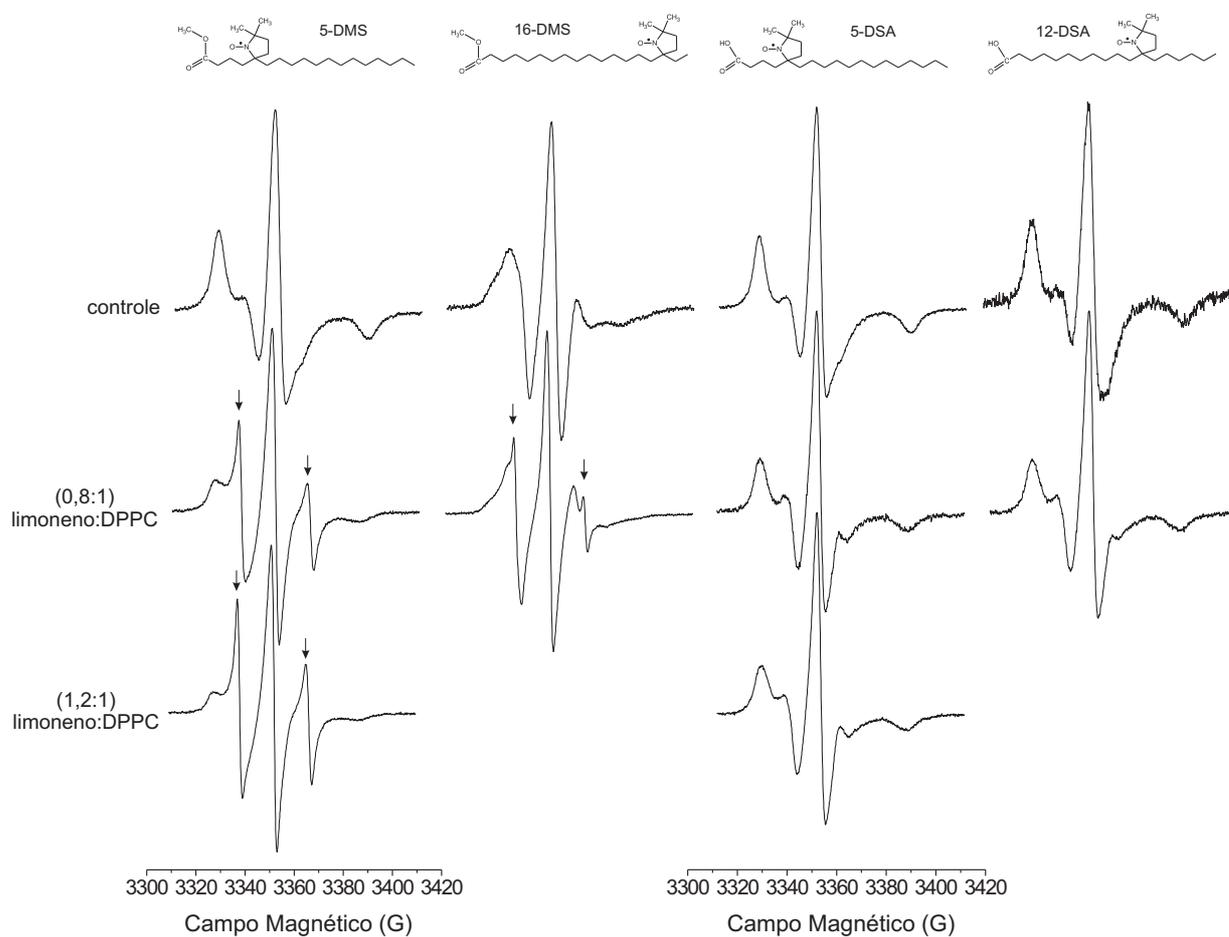
4.4).



**Figura 4.4:** Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,8:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2, respectivamente. A linha cinza representa o sinal dos marcadores incorporados nas micelas dos terpenos (componente 3). A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

Todavia, a capacidade dos terpenos de facilitar a transferência dos marcadores de spin de C1 para C3 também está relacionada com a estrutura molecular de cada sonda. Na Figura 4.5 estão representados os espectros de RPE de quatro marcadores de spin incorporados em membranas de DPPC tratadas com o terpeno (+)-limoneno a 10 °C (região  $\alpha$ ). Veja que para os marcadores que possuem o grupo carbonila (5- e 16-DMS), os quais podem formar apenas uma ligação de hidrogênio com os grupos polares das bicamadas, o espectro composto apresenta a componente C3 bem resolvida para uma razão terpeno:lipídio de 0,8:1. Entretanto,

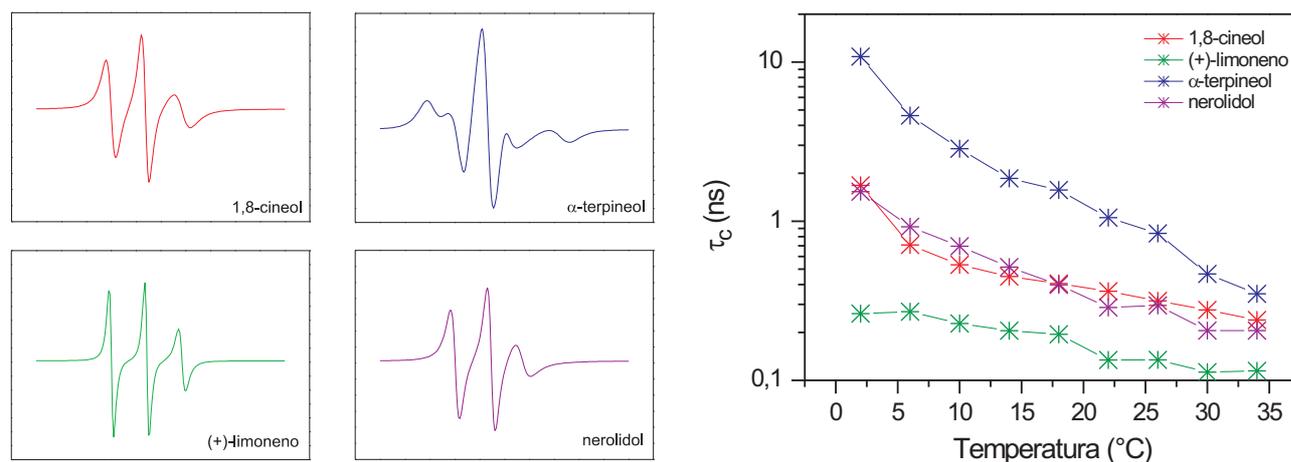
para os marcadores que possuem o grupo carboxila (5- e 12-DSA), os quais podem realizar até duas ligações de hidrogênio a componente C3 não está presente no espectro experimental. É importante notar que o aumento da razão terpeno:lipídio (0,8:1 para 1,2:1) não modifica o espectro do marcador 5-DMS, sugerindo que o (+)-limoneno não consegue extrair os marcadores do tipo n-DMS das bicamadas de DPPC mesmo para a concentração de terpeno mais alta analisada nesse trabalho. Desta maneira, todas as análises a seguir sobre a interação dos terpenos com membranas de DPPC dizem respeito ao marcador de spin 5-DMS.



**Figura 4.5:** Espectros de RPE dos marcadores 5-DMS, 16-DMS, 5-DSA e 12-DSA incorporados em vesículas de DPPC tratadas com (+)-limoneno a 10 °C. As setas indicam a posição do campo magnético onde as linhas da componente 3 estão claramente resolvidas. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G.

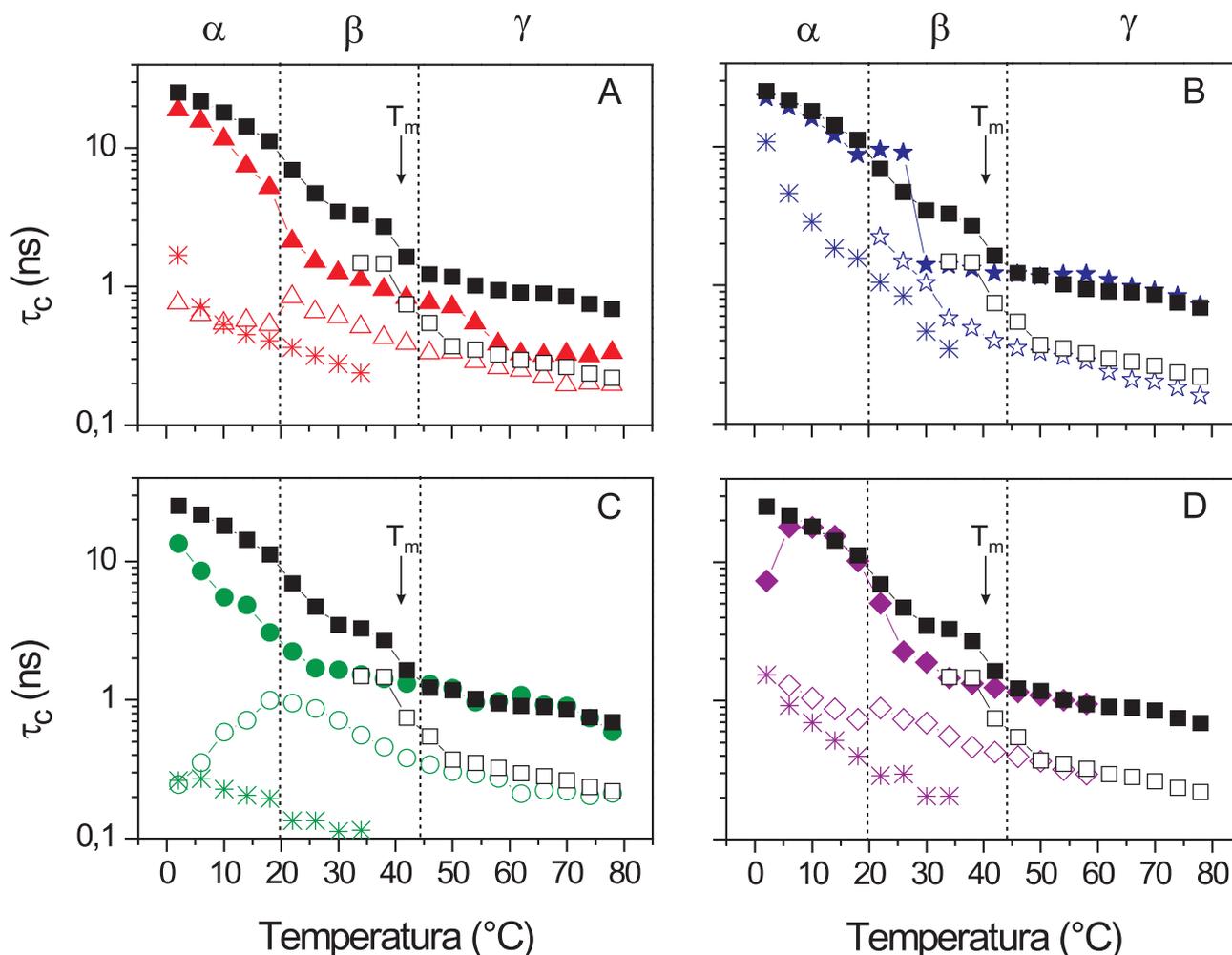
### 4.3.2 Dinâmica e Perfil Termodinâmico das Componentes Espectrais

Na Figura 4.6 estão indicados os valores do tempo de correlação rotacional  $\tau_c$  para o marcador de spin 5-DMS estruturado em micelas dos terpenos 1,8-cineol, (+)-limoneno,  $\alpha$ -terpineol e nerolidol como função da temperatura. Esse parâmetro é obtido através da simulação dos espectros experimentais e reflete o grau de liberdade de movimento dos marcadores de spin [82, 165, 169]. As diferentes características moleculares dos terpenos fazem com que a dinâmica do marcador incorporado em suas micelas seja diferente em cada caso. Como pode ser visto, o marcador 5-DMS atinge maiores e menores graus de mobilidades quando inserido nas micelas de (+)-limoneno e  $\alpha$ -terpineol, respectivamente.



**Figura 4.6:** Melhor ajuste dos espectros de RPE do marcador 5-DMS dissolvido em micelas de 1,8-cineol, (+)-limoneno,  $\alpha$ -terpineol e nerolidol a 10 °C (Painel esquerdo) e o comportamento dos respectivos tempos de correlação rotacional como função da temperatura (Painel direito).

A Figura 4.7 (e também as Figuras D.3 e D.4 do apêndice D) mostra o comportamento do tempo de correlação rotacional como função da temperatura para as vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão 0,8:1. Como pode ser observado, a adição dos terpenos causa uma diminuição dos valores de  $\tau_{c1}$  e  $\tau_{c2}$  em comparação com a amostra controle para todas as concentrações estudadas, principalmente para temperaturas inferiores a temperatura da transição de fase principal,  $T_m = 41,4$  °C [170], das membranas de DPPC.



**Figura 4.7:** Tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , para o marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,8:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. Os símbolos fechados referem-se a componente 1 e os símbolos abertos as componentes 2 ou 3. Os asteriscos representam os tempos de correlação rotacional dos marcadores dissolvidos nas micelas de terpeno. Os quadrados representam os tempos de correlação rotacional da amostra controle. As setas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$  °C) da amostra controle (sem terpeno). Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

Na Tabela 4.1 estão indicados os tempos de correlação rotacional para as componentes 1, 2 e 3 do marcador de spin 5-DMS para temperaturas selecionadas dentro dos intervalos de temperatura  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Note que para a razão 0,6:1 apenas os terpenos 1,8-cineol e (+)-limoneno são capazes de extrair o marcador de spin das membranas de DPPC (presença de uma fração de marcadores de spin na componente 3) e que para a razão 1,2:1 todos os terpenos são capazes de extrair os marcadores de spin das bicamadas lipídicas.

Perceba ainda, que para a razão 1,2:1 os terpenos  $\alpha$ -terpineol e nerolidol demonstram

**Tabela 4.1:** Valores para os tempos de correlação rotacional  $\tau_c$  associados as componentes 1, 2 e 3 do marcador de spin 5-DMS incorporado em membranas de DPPC tratadas com os terpenos 1,8-cineol, (+)-limoneno,  $\alpha$ -terpineol e nerolidol nas razões 0,6:1, 0,8:1 e 1,2:1 (terpeno:lipídio). O erro experimental do parâmetro  $\tau_c$  é de 0,2 ns.

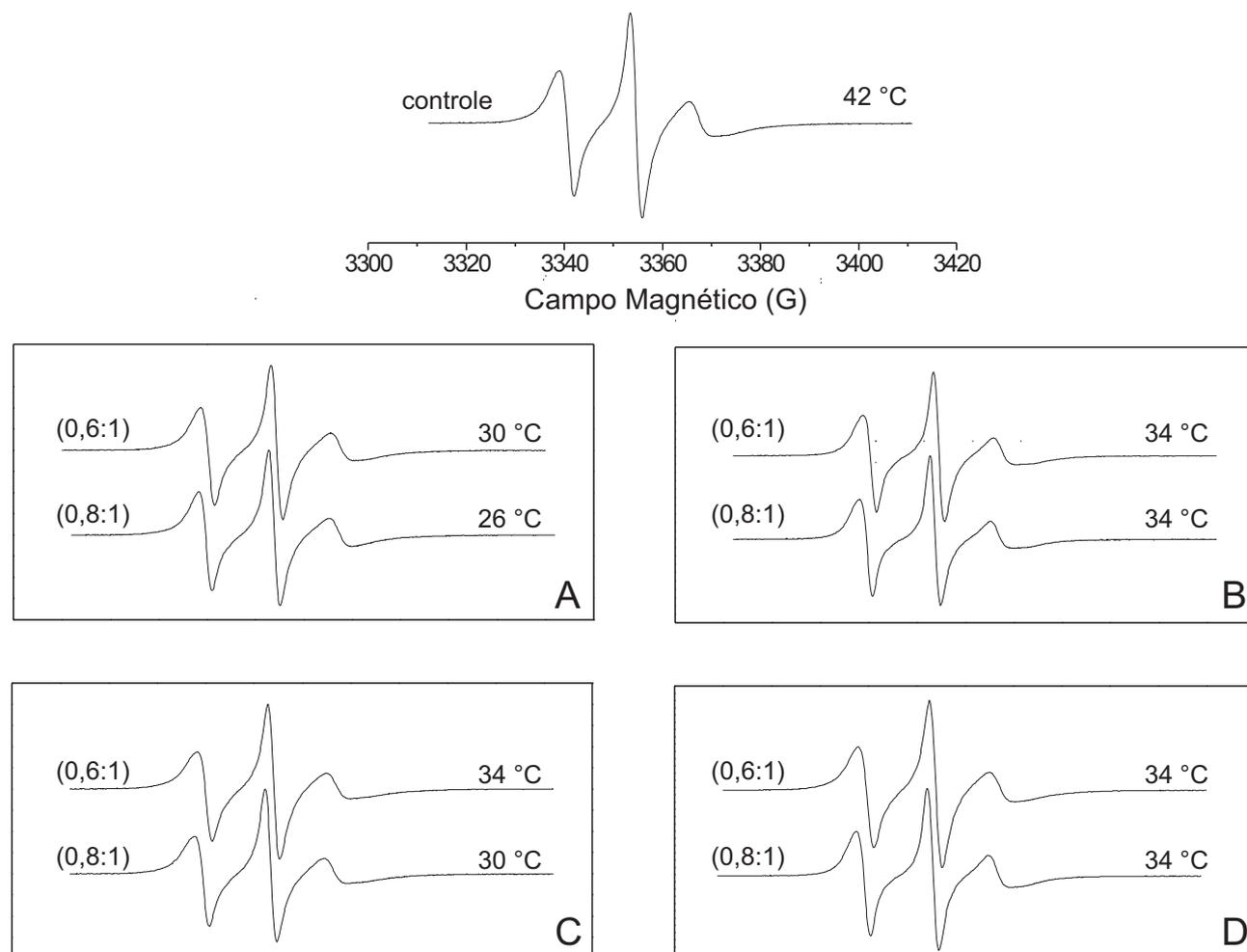
Amostras		Região $\alpha$			Região $\beta$			Região $\gamma$		
		10 ( $^{\circ}\text{C}$ )			38 ( $^{\circ}\text{C}$ )			50 ( $^{\circ}\text{C}$ )		
		$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_1$	$C_2$	$C_3$
1,8-cineol	0,6:1	17,5*	—	1,1	1,3	0,5	—	1,0	0,3	—
	0,8:1	11,6	—	0,6	1,0	0,4	—	0,7	0,3	—
	1,2:1	12,0	—	0,4	0,7	0,5	—	0,4	0,3	—
(+) -limoneno	0,6:1	7,0	—	0,4	1,1	0,7	—	1,0	0,4	—
	0,8:1	5,5	—	0,6	1,4	0,5	—	1,2	0,3	—
	1,2:1	4,3	—	0,4	1,4	0,4	—	1,3	0,3	—
$\alpha$ -terpineol	0,6:1	15,0	—	—	1,4	0,5	—	1,2	0,3	—
	0,8:1	16,0	—	—	1,3	0,5	—	1,1	0,3	—
	1,2:1	5,0	—	—	0,7	—	0,4	0,4	—	0,4
nerolidol	0,6:1	7,7	—	—	1,2	0,6	—	1,0	0,4	—
	0,8:1	18,0	—	1,0	1,3	0,5	—	1,1	0,4	—
	1,2:1	—	—	1,0	—	—	0,2	—	—	0,2
controle		18,0	—	—	2,7	1,5	—	1,2	0,4	—

\* Valores de  $\tau_c$  medidos em ns.

uma capacidade de extração em todo o intervalo de temperatura analisado. Além disso, pode ser verificado que um aumento na concentração dos terpenos causa reduções no tempo de correlação rotacional associado as componentes 1 e 2. Isto sugere que uma vez inseridos na membrana, os terpenos tem a capacidade de criar desordem na bicamada e aumentar o movimento dos marcadores de spin.

Somado a isto, como pode ser visto através dos espectros mostrados na Figura 4.8, a adição dos terpenos faz com que a temperatura da transição de fase principal das membranas de DPPC que ocorre em  $\sim 41$   $^{\circ}\text{C}$  para a amostra controle passe a ocorrer entre 26-34  $^{\circ}\text{C}$  (diminuição entre 8-16  $^{\circ}\text{C}$ ).

Supondo que as componentes espectrais estejam em equilíbrio termodinâmico, à partir das populações relativas dos marcadores de spin em cada componente espectral ( $N_1$ ,  $N_2$  e  $N_3$ )



**Figura 4.8:** Espectros do marcador 5-DMS incorporado em membranas de DPPC tratadas com os terpenos nas razões (0,6:1) e (0,8:1) terpeno:lipídio. Os espectros apresentados são aqueles que mais se assemelham ao espectro controle (DPPC sem terpeno a 42 °C). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

obtidas por meio da simulação, a constante de partição no equilíbrio,  $K_e$ , pode ser determinada para diversas temperaturas. Isto nos permite calcular os parâmetros termodinâmicos associados com a transferência do marcador de spin de C1 para C2 ou de C1 para C3. Sabendo que a variação da energia livre de Gibbs do sistema  $\Delta G$  pode ser escrita como [115,171]

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K_e, \quad (4.2)$$

em que  $\Delta G^\circ$  é a variação da energia livre de Gibbs padrão,  $R$  é a constante universal dos gases e  $T$  é a temperatura absoluta. Como no equilíbrio termodinâmico  $\Delta G = 0$ , podemos escrever

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_e. \quad (4.3)$$

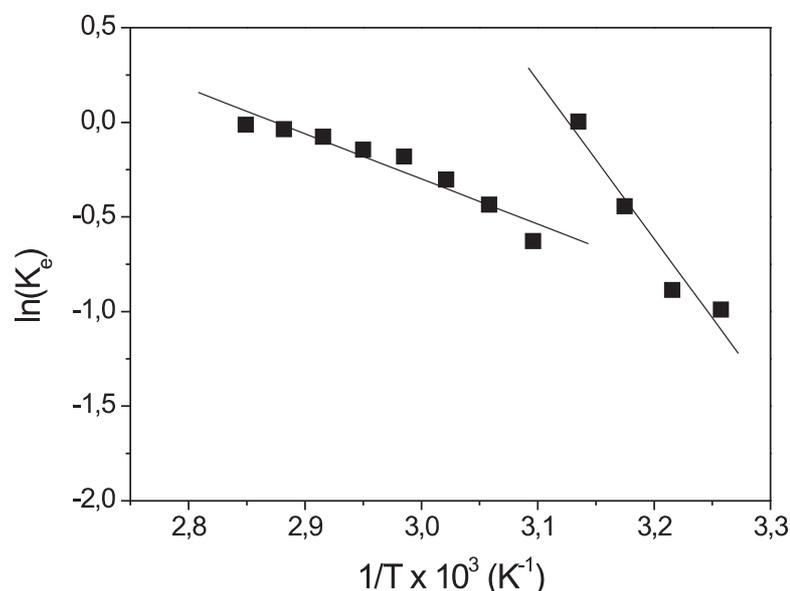
Usando a definição da energia livre de Gibbs [115]

$$G = H - TS, \quad (4.4)$$

onde  $H$  é a entalpia e  $S$  é a entropia do sistema, podemos reescrever (4.3) na forma

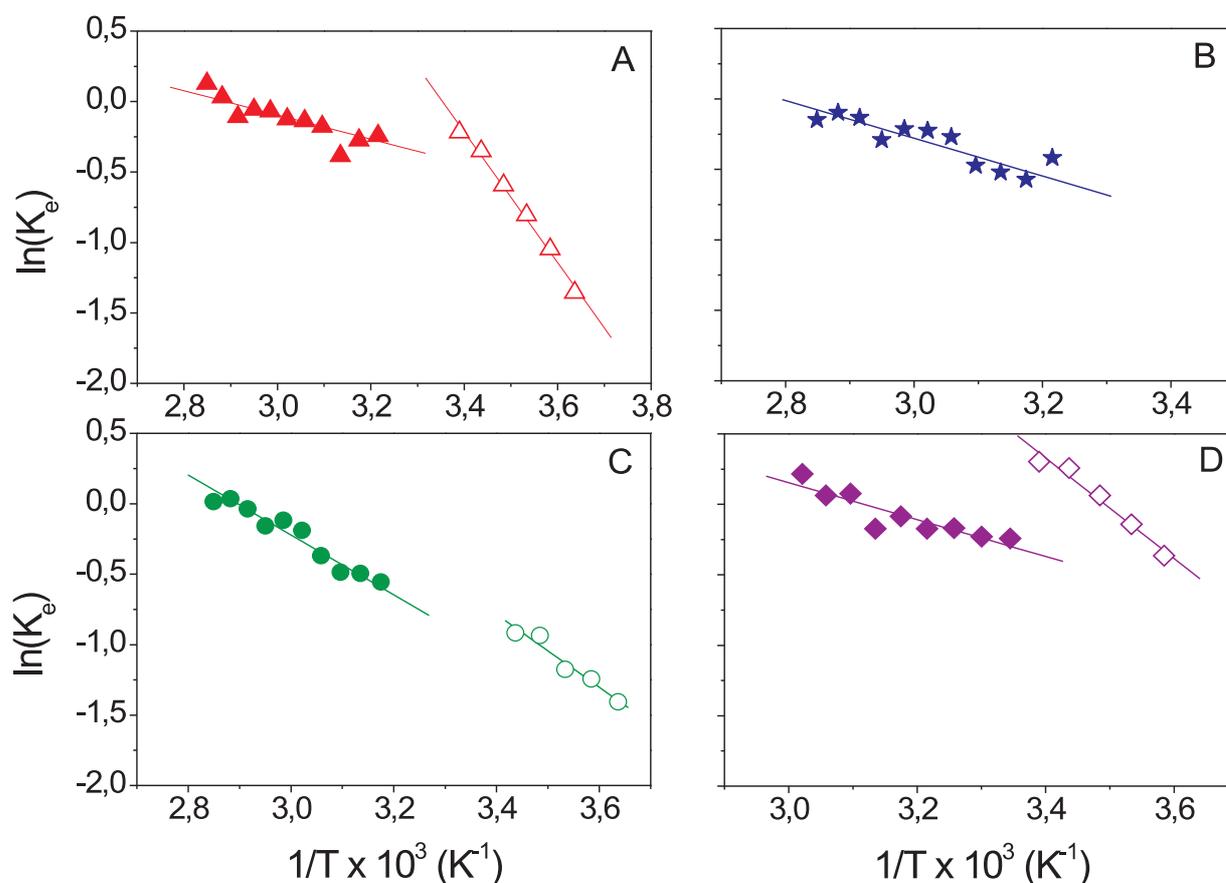
$$\ln K_e = \frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (4.5)$$

com  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  representando as variações na entalpia e entropia padrão necessárias para transferir o marcador de spin da componente 1 para a componente 2 ou da componente 1 para a componente 3 respectivamente. A Equação (4.5) conhecida como equação de van't Hoff [171], fornece uma maneira prática de encontrar os parâmetros termodinâmicos do sistema pela análise de gráficos em que  $\ln K_e$  é uma função linear de  $1/T$  (Figuras 4.9, 4.10, D.7 e D.6). Neste tipo de gráfico, os coeficientes angular e linear são equivalentes a  $\Delta H^\circ/R$  e  $\Delta S^\circ/R$ , respectivamente.



**Figura 4.9:** Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio,  $K_e = (N_2/N_1)$ , calculado com base nas populações  $N_1$  e  $N_2$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC como função da temperatura absoluta.

Na Tabela 4.2 estão apontados os valores para os parâmetros termodinâmicos associados à transferência do marcador de spin 5-DMS da componente 1 para a componente 2 ou da



**Figura 4.10:** Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio,  $K_e$ , calculado com base nas populações  $N_1$ ,  $N_2$ , e  $N_3$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com terpenos na razão (0,8:1) terpeno:lipídio como função da temperatura absoluta. Os símbolos abertos equivalem a  $K_e = (N_3/N_1)$  e os símbolos fechados a  $K_e = (N_2/N_1)$ . Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

componente 1 para a componente 3 em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos nas razões 0,6:1, 0,8:1 e 1,2:1 para as temperaturas onde a combinação dessas componentes estavam claramente resolvidas no espectro experimental. À partir dos valores encontrados para os potenciais termodinâmicos pode-se notar que a adição dos terpenos facilita a transferência do marcador de spin de C1 para C2 para temperaturas abaixo de  $T_m$  em todas as concentrações estudadas. Além disso, um aumento na razão terpeno:lipídio aumenta a transferência do marcador de spin de C1 para C3 (visto também na Figura D.5 do Apêndice D). Assim, podemos associar os valores encontrados para  $\Delta H^\circ$  na região  $\alpha$  com a energia necessária para se extrair o marcador lipídico da bicamada na presença dos terpenos.

**Tabela 4.2:** Variações\* da energia livre de Gibbs padrão  $\Delta G^\circ$  a 10 °C e 38 °C e da entalpia  $\Delta H^\circ$  e entropia  $\Delta S^\circ$  padrão associadas à transferência do marcador de spin 5-DMS de C1 para C3 (região  $\alpha = 0-20$  °C) e de C1 para C2 (região  $\beta-\gamma = 20-80$  °C) em membranas de DPPC tratadas com os terpenos 1,8-cineol, (+)-limoneno,  $\alpha$ -terpineol e nerolidol nas razões 0,6:1, 0,8:1 e 1,2:1 (terpeno:lipídio).

Amostras	$\Delta G^\circ$		$\Delta H^\circ$		$\Delta S^\circ$		
	(kcal/mol)		(kcal/mol)		(cal/mol·K)		
	10 °C C <sub>1</sub> →C <sub>3</sub>	34 °C C <sub>1</sub> →C <sub>2</sub>	$\alpha$ C <sub>1</sub> →C <sub>3</sub>	$\beta-\gamma$ C <sub>1</sub> →C <sub>2</sub>	$\alpha$ C <sub>1</sub> →C <sub>3</sub>	$\beta-\gamma$ C <sub>1</sub> →C <sub>2</sub>	
0,6:1	1,8-cineol	0,59	0,34	8,3	3,4	27,6	10,0
	(+)-limoneno	0,90	0,50	6,2	2,0	18,7	5,7
	$\alpha$ -terpineol	—	0,41	—	2,2	—	6,0
	nerolidol	—	0,19	—	3,2	—	9,9
0,8:1	1,8-cineol	0,45	0,08	9,2	2,1	30,9	6,0
	(+)-limoneno	0,66	0,43	5,1	3,9	15,9	11,3
	$\alpha$ -terpineol	—	0,43	—	2,4	—	6,6
	nerolidol	0,08	0,10	7,1	2,6	24,8	8,1
1,2:1	1,8-cineol	0,29	0,12	13,0	1,6	44,7	5,2
	(+)-limoneno	0,48	0,23	2,7	3,2	7,7	9,9
	$\alpha$ -terpineol**	—	—	—	—	—	—
	nerolidol	—	—	—	—	—	—
controle		—	0,60	—	16,6	—	51,9

\* Os valores foram calculados com base nas Equações 4.3 e 4.5, usando os dados das Figuras 4.9, 4.10, D.7 e D.6.

\*\* Não havia pontos suficientes para calcular os parâmetros termodinâmicos na região  $\alpha$  com segurança.

## 4.4 Discussão

A presença de duas componentes espectrais relacionadas as configurações energéticas do marcador de spin 5-DMS inserido em bicamadas lipídicas foi demonstrada por Camargos e Alonso [169] para uma série de lipídios com diferentes cadeias carbônicas, por Queiroz e co-autores [172] para membranas de estrato córneo e também por Anjos e co-autores [82] para membranas de DPPC na presença do terpeno 1,8-cineol. Neste trabalho, foi introduzida uma terceira configuração energética para realizar o melhor ajuste dos espectros experimentais, a qual está relacionada com o marcador de spin 5-DMS incorporado nas micelas dos terpenos estudados. O aparecimento dessa nova componente espectral (componente 3) está diretamente associado à relação lipídio/solvente de nossas amostras. Desde que as amostras aqui estuda-

das possuem uma alta relação lipídio/solvente, a adição de moléculas hidrofóbicas no solvente cria uma situação onde o exterior das bicamadas passam a ser um ambiente energeticamente favorável aos marcadores de spin. O estudo deste tipo de situação se torna relevante já que a situação fisiológica é caracterizada por uma alta concentração molecular no plasma a qual depende muitas vezes da interação de agregados moleculares com seus alvos.

Como demonstrado por Karande e co-autores [94] para uma série de moléculas, entre elas os terpenos cineol, terpineol e limoneno, as forças responsáveis pela extração lipídica e pelo potencial de irritação na pele são ambas proporcionais a capacidade que as moléculas tem de realizar ligações de hidrogênio. Além disso, já foi demonstrado que terpenos que possuem grupos -OH ou -C=O alteram a rede de ligações de hidrogênio das ceramidas das membranas intercelulares do estrato córneo, aumentando o potencial de permeação do hidrocloreto de imipramina através da pele [80]. Entretanto, o potencial de extração lipídica verificado neste trabalho está relacionado também com a capacidade que os terpenos possuem para alterar a polaridade do solvente, ou a atividade da água. A atividade de água é uma medida de quão eficientemente a água pode participar de uma reação química (física). Por exemplo, se parte da água está ligada as micelas dos terpenos a atividade global da água é reduzida, o que modula a preferência de ambiente dos marcadores de spin e conseqüentemente a formação de C3.

Desta maneira, as características moleculares de cada terpeno influenciam em seu potencial de extração. Uma comparação entre os terpenos mostra que para a razão 0,6:1 apenas limoneno e cineol são capazes de extrair os marcadores das membranas na faixa de temperatura  $\alpha$ . Isto pode ser explicado pelo fato de que em baixas temperaturas as membranas estão fortemente compactadas o que diminui a partição dos terpenos nas bicamadas e favorece a formação de estruturas micelares no solvente. Conseqüentemente, esses dois terpenos por serem os menos polares (PSA<sup>1</sup>: limoneno=0 Å<sup>2</sup>; cineol=9,23 Å<sup>2</sup>; terpineol=20,23 Å<sup>2</sup>; nerolidol=20,23 Å<sup>2</sup> [174]),

---

<sup>1</sup>Sigla para *Molecular Polar Surface Area*. A área de superfície polar é definida como a soma das superfícies dos átomos polares (geralmente oxigênios, nitrogênios e hidrogênios ligados) da molécula. Este parâmetro é um indicador que correlaciona-se bem com o transporte molecular passivo através de membranas e, conseqüentemente permite uma avaliação prévia das propriedades de transporte dos fármacos [173].

são aqueles que provocam maior alteração na hidrofobicidade do solvente. O aumento da temperatura faz com que os terpenos penetrem melhor na bicamada distribuindo-se igualmente nas membranas e passando a atuar principalmente como espaçadores (aumentando a dinâmica dos lipídios, a população relativa e a mobilidade dos marcadores na componente 2) como pode ser visto nas Figuras D.3, D.4, 4.7, D.5 e na Tabela 4.1 (diminuição dos valores de  $\Delta H_{1 \rightarrow 2}^\circ$ ). Esse comportamento está de acordo como os resultados obtidos por Anjos e co-autores [78, 82] e Camargos e co-autores [83] para os marcadores de spin 5-DMS, 5-DSA, TEMPO<sup>2</sup> e DTBN<sup>3</sup> em membranas de DPPC, DMPC<sup>4</sup> e estrato córneo tratadas com terpenos.

Por outro lado, o aumento na razão terpeno:lipídio para 0,8:1 e 1,2:1 parece favorecer a formação de micelas dos terpenos fora das membranas de DPPC. A diminuição dos valores de  $\Delta H_{1 \rightarrow 3}^\circ$  com o aumento da razão terpeno:lipídio para as membranas tratadas com (+)-limoneno e o aumento dos valores para as membranas tratadas com 1,8-cineol indicam que a ligação dos marcadores de spin com as micelas de cineol é mais estável. Isto pode ser explicado pelo caráter anfífilico da molécula de cineol que leva vantagem na ligação com os marcadores de spin quando comparado com a molécula apolar de limoneno. Além disso, o limoneno possui o maior coeficiente de partição dentre os terpenos estudados ( $\log P^5$ : limoneno=3,22; cineol=2,35; terpineol=2,17 e nerolidol=4,31 [174]) o que facilita sua permeação nas bicamadas de DPPC. Curiosamente, para a razão 1,2:1,  $\alpha$ -terpineol e nerolidol tem a capacidade de extrair os marcadores de spin durante todo o intervalo de temperatura estudado provavelmente, pelo fato de apresentarem as maiores áreas polares [174]. Por ter o ponto de ebulição de 214 °C, o mais elevado dentre os quatro terpenos utilizados [174], o  $\alpha$ -terpineol tem maior força de auto

<sup>2</sup>Sigla para 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina 1-oxil.

<sup>3</sup>Sigla para Di-*terc*-butil nitróxido.

<sup>4</sup>Sigla para 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina

<sup>5</sup>O coeficiente de partição,  $P$ , é a razão entre as concentrações de um composto não ionizado nas duas fases de solventes imiscíveis (água e n-octanol) em equilíbrio (isto é, o seu balanço hidrofílico/lipofílico).  $\log P$  é a medida logarítmica em base 10 deste coeficiente e é expressa como [175]

$$\log P = \log_{10} \left( \frac{[soluto]_{\text{n-octanol}}}{[soluto]_{\text{água}}^{\text{não ionizado}}} \right).$$

agregação [80,176] o que pode tornar suas micelas mais coesas e explicar o fato dos marcadores de spin dissolvidos nestas micelas possuírem tempos de correlação rotacional mais altos. Além disso, o  $\alpha$ -terpineol possui o menor coeficiente de partição dentre os quatro terpenos estudados o que poderia justificar a permanência das estruturas micelares perante o aumento de temperatura. Já para o nerolidol, o baixo ponto de fusão (145 °C) e o alto coeficiente de partição parecem não justificar o comportamento do terpeno. Entretanto, por ser um sesquiterpeno, apesar do número de moléculas no solvente ser o mesmo que no caso dos monoterpenos, o peso molecular é 1,5 vezes maior. Assim, para a razão 1,2:1 esse terpeno parece se encontrar em uma concentração suficientemente alta para se estabilizar na forma micelar durante todo o intervalo de temperatura o que indica uma aparente desestruturação das bicamas de DPPC.

Tudo isto, somado ao fato de que o (+)-limoneno tem maior capacidade de extrair os marcadores de spin que realizam menos interações de hidrogênio com os grupos polares (Figura 4.5) nos leva a entender que para nossas amostras, o potencial extrator dos terpenos polares parece ser uma combinação entre os “efeitos de micela” e os efeitos de ruptura da rede de ligações de hidrogênio dos grupos polares das membranas de DPPC.

## 4.5 Conclusões

Os resultados deste trabalho indicam que os terpenos podem atuar como espaçadores ou extratores lipídicos. Ficou demonstrado que a capacidade dos terpenos de atuar como extratores lipídicos não está relacionada somente com sua capacidade de afetar a rede de ligações de hidrogênio dos grupos polares das bicamadas, mas também com sua habilidade de formar estruturas micelares com uma hidrofobicidade suficiente para competir pelos lipídios das membranas. Além disso, quando inseridos na bicamada os terpenos aumentam a fluidez e reduzem a temperatura de transição de fase das membranas de DPPC. Em particular, nossos resultados mostram que (+)-limoneno e 1,8-cineol são os terpenos que apresentam maior facilidade para extrair os marcadores e alterar a temperatura de transição de fase das bicamadas de DPPC enquanto  $\alpha$ -terpineol e nerolidol em concentrações acima de 0,8:1 (terpeno:lipídio) mantem o

efeito extrator para um maior intervalo de temperatura.

Capítulo **5**

**Toxicidade de Terpenos em Células de  
Fibroblastos Comparada com seu  
Potencial Hemolítico e o Aumento da  
Fluidez das Membranas de Eritrócito e  
de Fibroblastos**

---

## 5.1 Motivação

Os terpenos são frequentemente usados como facilitadores da permeação transdérmica de fármacos. As membranas intercelulares do estrato córneo, camada mais externa da pele e barreira primária para a permeação através da pele, se torna fluída na presença de terpenos como DL-mentol [163] e 1,8-cineol [82]. Entretanto, eventualmente surgem efeitos colaterais deste tipo de tratamento, os quais podem estar associados a interação dos terpenos com as células sanguíneas (hemólise) e da pele (irritação). Nesta parte deste trabalho estamos interessados em investigar se a habilidade dos terpenos para facilitar a permeação de pequenas moléculas através da pele, se correlaciona com o aumento do potencial de irritação e com seu efeito hemolítico.

**Nota:** Por terem grande correlação com os resultados apresentados nesta tese, os dados sobre o potencial de toxicidade em fibroblastos obtidos através de experimentos realizados pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marize C. Valadares e pela M.<sup>a</sup> Soraia S. Moura, também foram incluídos neste texto.

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Químicos

O marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA) e o material para o cultivo celular foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os terpenos (Figura 5.1) foram adquiridos da Acros Organics (Geel, Bélgica). Os demais reagentes utilizados possuíam a mais alta qualidade disponível e os todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q.

### 5.2.2 Cultura Celular

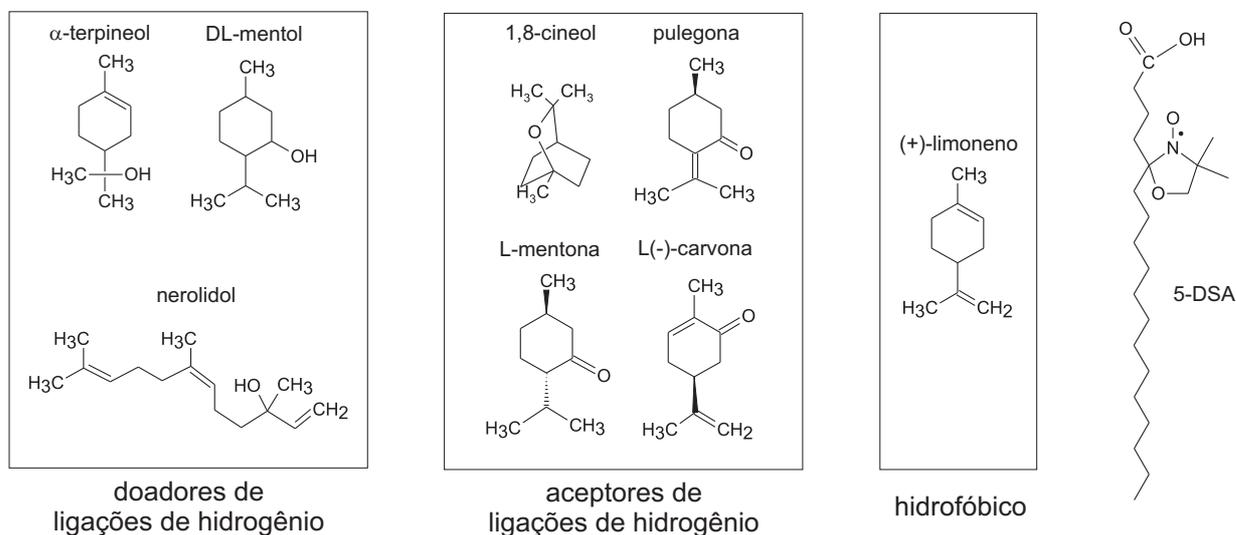
Os fibroblastos Balb/c 3T3-A31 foram cultivados em meio de cultura DMEM<sup>1</sup>-D5648, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-Gibco<sup>®</sup>) a  $37\pm 1$  °C,  $90\pm 10\%$  de umidade,  $5\pm 1\%$  CO<sub>2</sub>/ar. As células foram removidas dos frascos de cultura usando uma solução con-

---

<sup>1</sup>Sigla para *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

tendo tripsina:EDTA<sup>2</sup> na razão 0,25%:0,02% quando sua confluência estava entre 50 e 80%.

A viabilidade celular foi avaliada usando o método do azul de Tripano com o auxílio de uma



**Figura 5.1:** Estrutura química dos terpenos e do marcador de spin utilizados neste trabalho.

câmara de Neubauer.

### 5.2.3 Processamento do Sangue

As amostras de sangue obtidas de três doadores de dois bancos de sangue distintos foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS 5 mM de fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,4) e centrifugados a 150×g durante 10 min a 4 °C. O plasma e as células brancas foram cuidadosamente removidas em cada lavagem (3 vezes).

### 5.2.4 Indução da Hemólise

Para induzir a hemólise, alíquotas dos terpenos diluídos em etanol (300 mM) foram adicionadas a tubos contendo uma suspensão de eritrócitos diluídos em PBS contendo um hematócrito 50% (volume final de 100 μL). Após serem cuidadosamente agitados os tubos foram incubados a 37 °C por 1,5 h. Subsequentemente, os eritrócitos foram precipitados por centrifugação a 300×g a 25 °C durante 10 min. A magnitude da hemólise foi determinada

<sup>2</sup>Sigla para *Ethylenediamine tetraacetic acid*.

espectrofotometricamente a 540 nm de acordo com a equação

$$\% \text{hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times (100) \quad (5.1)$$

onde  $A_{c1}$  é a absorção da amostra controle (0% de terpeno),  $A_{c2}$  é a absorção da amostra completamente hemolisada com água Milli-Q e  $A_a$  é a absorção da amostra contendo a concentração desejada de terpeno. A concentração de terpeno que provoca 50% de hemólise foi determinada em unidades de mM. Como está bem aceito que o volume médio do eritrócito humano é de 90 fL, o número de células em cada amostra e a razão terpeno/célula que provoca 50% de hemólise foram calculados com base neste volume.

### **5.2.5 Marcação das Membranas de Eritrócito e de Fibroblastos e Tratamento com Terpenos**

Os terpenos foram dissolvidos em etanol na concentração desejada e 4  $\mu\text{L}$  desta solução foram aplicados diretamente a suspensão de células (45  $\mu\text{L}$ ). As suspensões terpeno-eritrócito ou terpeno-fibroblasto foram incubadas a 37 °C durante 1,5 h. Subsequentemente, uma pequena alíquota ( $\sim 1 \mu\text{L}$ ) do marcador de spin 5-DSA dissolvido em etanol (5 mg/mL) foi adicionado as células. Cada amostra contendo  $5 \times 10^8$  eritrócitos ou  $1,3 \times 10^7$  fibroblastos diluídos em PBS contendo 10% de etanol e a concentração desejada de terpeno foram introduzidos em tubos capilares e selados por fogo para os experimentos de RPE. As amostras controle, com e sem etanol, foram medidas e foi determinado que a concentração de etanol utilizada não altera significativamente a fluidez das membranas de eritrócito e de fibroblastos. Para calcular a razão terpeno/células para cada amostra, o volume dos eritrócitos foi adotado como 90 fL e o número de fibroblastos foi adotado como o número de células presentes na suspensão estoque de células.

### **5.2.6 Espectroscopia de RPE**

As medidas de RPE foram realizadas utilizando espectrômetro Bruker ESP300 (Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma cavidade ressonante ER4102 ST operando em banda-X (aproximadamente 9,4 GHz) e um sistema de controle de temperatura Bruker. As medidas fo-

ram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: potência de micro-ondas, 2 mW; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 ms.

## 5.2.7 Simulação Espectral

A simulação dos espectros de RPE foi realizada utilizando o software *NLLS* desenvolvido por Freed e co-autores [164] (para mais informações consultar apêndice B). Neste trabalho, estamos considerando que o tensor de difusão rotacional  $\mathcal{R}$  é axialmente simétrico em torno do eixo molecular  $z$  e que a anisotropia rotacional axial é descrita por  $\mathcal{N} = \log_{10}(\mathcal{R}_{\parallel}/\mathcal{R}_{\perp}) = 1$ . A taxa de difusão rotacional,  $\mathcal{R}_{bar}$ , obtida à partir do *NLLS* foi convertida para tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , através da relação (difusão rotacional browniana) [165]

$$\tau_c = \frac{1}{6\mathcal{R}_{bar}}. \quad (5.2)$$

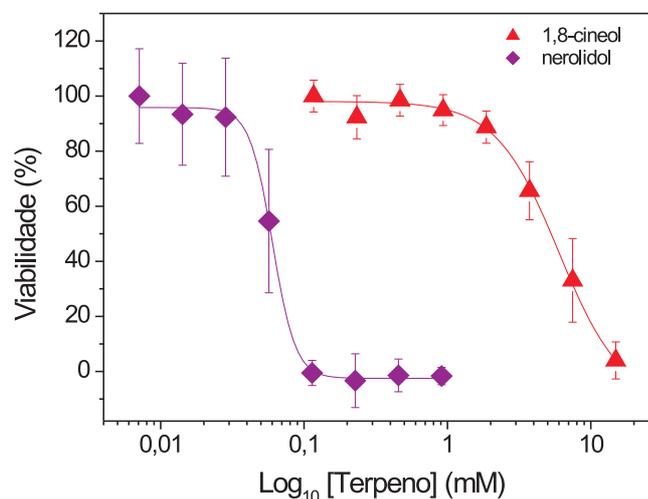
Os espectros experimentais foram ajustados utilizando modelos de 1 ou 2 componentes espectrais. Similarmente a outros estudos [166–168], os parâmetros magnéticos foram determinados com base em uma análise global do conjunto de espectros obtidos neste trabalho e todos os espectros foram simulados usando os mesmos parâmetros de entrada para os tensores magnéticos  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$ :  $g_{xx}(1) = 2,0088$ ;  $g_{yy}(1) = 2,0060$ ;  $g_{zz}(1) = 2,0026$ ;  $A_{xx}(1) = 6,1$ ;  $A_{yy}(1) = 6,3$ ;  $A_{zz}(1) = 36,5$ ;  $g_{xx}(2) = 2,0082$ ;  $g_{yy}(2) = 2,0062$ ;  $g_{zz}(2) = 2,0027$ ;  $A_{xx}(2) = 5,7$ ;  $A_{yy}(2) = 5,6$ ; e  $A_{zz}(2) = 31,2$ . No apêndice D estão incluídos os arquivos de entrada utilizadas para simulação de espectros com 1 e 2 componentes espectrais.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Citotoxicidade dos Terpenos

O teste Balb/c 3T3-A31 NRU foi utilizado para avaliar a citotoxicidade em fibroblastos de diferentes concentrações de oito terpenos após uma incubação de 48 h. A Figura 5.2 mostra a dependência da viabilidade celular com a concentração para os terpenos com maior e menor

citotoxicidade. O valor da concentração de terpeno que mata 50% das células ( $IC_{50}$ ) para os oito terpenos testados está apresentado na Tabela 5.1.



**Figura 5.2:** Teste citotóxico Balb/c 3T3-A31 NRU após uma exposição das células aos terpenos mais (nerolidol) e menos (1,8-cineol) citotóxicos durante 48 h. Os dados representam a viabilidade celular média (%)  $\pm$  desvio padrão (DP) para três experimentos independentes.

**Tabela 5.1:** Valores de  $IC_{50}$  obtidos do teste citotóxico Balb/c 3T3-A31 NRU para os terpenos testados após uma incubação de 48 h.

Terpeno	$IC_{50}$ (mM)*
nerolidol	$0,06 \pm 0,01^{a,**}$
$\alpha$ -terpineol	$0,13 \pm 0,01^a$
L(-)-carvona	$0,93 \pm 0,18^b$
pulegona	$1,01 \pm 0,21^b$
DL-mentol	$1,58 \pm 0,26^c$
(+)-limoneno	$1,58 \pm 0,05^c$
L-mentona	$1,74 \pm 0,13^c$
1,8-cineol	$4,02 \pm 0,15^d$

As médias e DP foram calculadas a partir de três experimentos independentes.

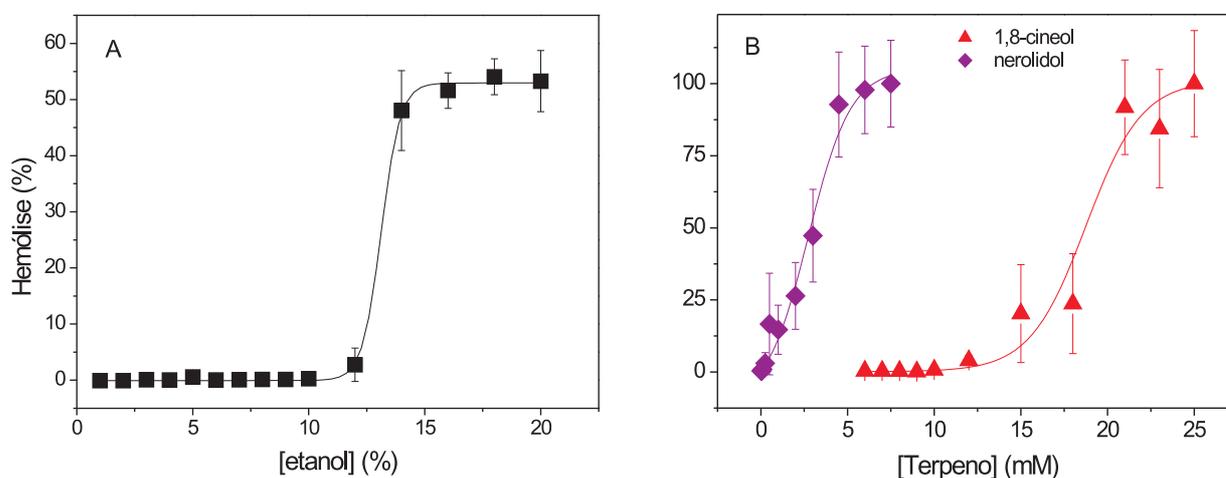
\* Neste experimento, 1 mM corresponde a  $10^{13}$  terpenos/célula.

\*\* Significância estatística: se não está marcado com a mesma letra é estatisticamente diferente a  $P < 0,05$  (teste Tukey).

### 5.3.2 Efeito Hemolítico dos Terpenos

O efeito hemolítico dos terpenos em eritrócitos humanos foi avaliado após 1,5 h de incubação e está apresentado na Figura 5.3B. O etanol foi usado como veículo para otimizar a incorporação dos terpenos nas membranas e seu efeito hemolítico foi previamente caracterizado.

Os níveis de hemólise induzidos pelo etanol para hematócrito 50% (Figura 5.3A) indicam que danos significativos a membrana ocorrem para concentrações de etanol acima de 10% (v/v).



**Figura 5.3:** Níveis hemolíticos induzidos após incubar uma suspensão de eritrócitos contendo um hematócrito de 50% com diferentes concentrações de etanol durante 1,5 h (Painel A). Níveis hemolíticos induzidos após incubar uma suspensão de eritrócitos contendo um hematócrito de 50% com diferentes concentrações de 1,8-cineol e nerolidol durante 1,5 h (Painel B).

O potencial hemolítico pode ser usado como um indicativo da toxicidade das moléculas em eritrócitos humanos [177]. Na Figura 5.3B pode-se observar a dependência da hemólise com a concentração adicionada dos terpenos mais (nerolidol) e menos (1,8-cineol) hemolíticos. Note que o nerolidol é hemolítico a baixas concentrações enquanto o 1,8-cineol mostra mudanças significativas nos níveis de hemólise apenas para concentrações superiores a 10 mM. Para os outros terpenos usados neste trabalho, a hemólise ocorre em concentrações entre 1 e 6 mM. A concentração de terpeno que causa 50% de hemólise foi determinada com base no ajuste sigmoidal das curvas obtidas para cada molécula e estão apresentadas na Tabela 5.2.

Para avaliar a possível correlação entre o efeito hemolítico e a viabilidade celular dos fibroblastos tratados com os terpenos, a concentração que causa 50% de hemólise foi relacionada com a respectiva  $IC_{50}$  para cada molécula (Figura 5.4); entretanto, apenas uma pequena correlação ( $R = 0,61$ ) foi observada.

### 5.3.3 Alteração na Fluidez da Membrana

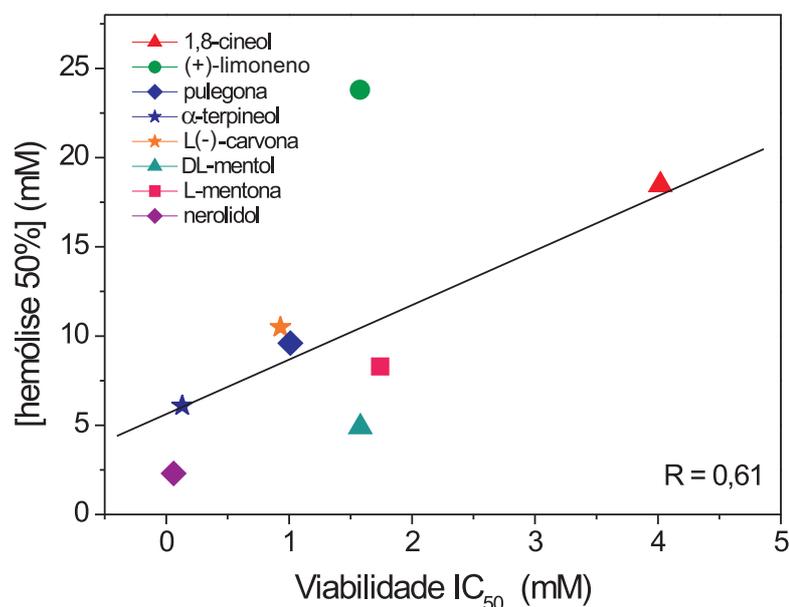
Os espectros do marcador 5-DSA incorporados nas membranas de eritrócito tratadas

**Tabela 5.2:** Concentração de terpeno necessária para 50% de hemólise após 90 min de incubação da suspensão de eritrócitos.

Terpeno	Concentração (mM)	(10 <sup>8</sup> terpenos/célula)
(+)-limoneno	23,8 ± 0,5 <sup>a,*</sup>	26,0 ± 0,6
1,8-cineol	18,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	20,1 ± 0,7
L(-)-carvona	10,5 ± 1,4 <sup>c</sup>	11,4 ± 1,6
pulegona	9,6 ± 0,5 <sup>c</sup>	10,5 ± 0,6
L-mentona	8,3 ± 0,9 <sup>c,d</sup>	9,0 ± 1,0
α-terpineol	6,1 ± 0,6 <sup>d,e</sup>	6,6 ± 0,7
DL-mentol	4,9 ± 1,1 <sup>e</sup>	5,3 ± 1,2
nerolidol	2,3 ± 0,8 <sup>f</sup>	2,5 ± 0,9

As médias e DP foram calculadas a partir de três experimentos independentes.

\* Significância estatística: se não está marcado com a mesma letra é estatisticamente diferente a  $P < 0,05$  (teste Tukey).



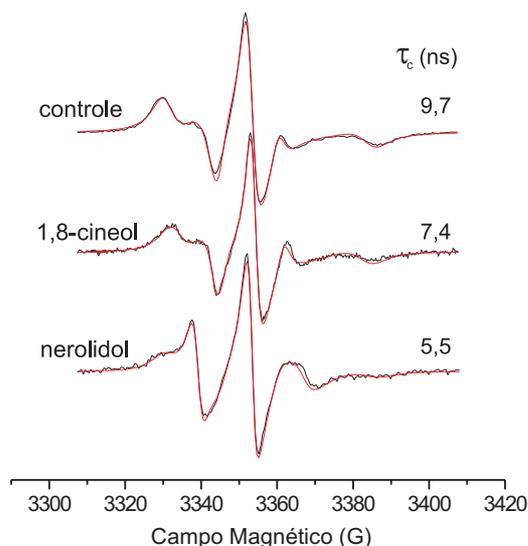
**Figura 5.4:** Correlação entre as concentrações dos terpenos requeridas para provocar 50% de hemólise e para obter o IC<sub>50</sub> de viabilidade celular. Cada ponto no gráfico corresponde a um terpeno (Tabelas 5.1 e 5.2). O valor obtido para o coeficiente de correlação (R) foi de 0,61.

com os terpenos 1,8-cineol e nerolidol estão apresentados na Figura 5.5. A simulação espectral permite avaliar a mobilidade do marcador de spin na membrana. A grande maioria dos espectros experimentais foram ajustadas utilizando um modelo de uma componente espectral. A presença de duas componentes espectrais foi observada apenas para amostras tratadas com altas concentrações de alguns terpenos. Para estas amostras o tempo de correlação rotacional

$\tau_c$  foi substituído por uma média calculada de acordo com a equação

$$\tau_c = N_1\tau_{c1} + N_2\tau_{c2} \quad (5.3)$$

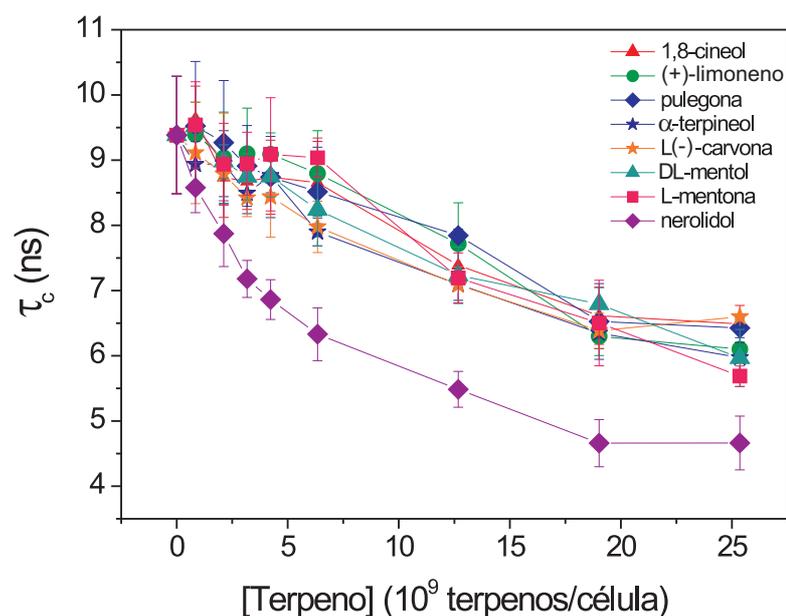
onde  $N_1$  e  $N_2$  são as populações relativas das componentes espectrais 1 e 2, respectivamente, e  $\tau_{c1}$  e  $\tau_{c2}$  são os respectivos tempos de correlação rotacional.



**Figura 5.5:** Espectros do marcador de spin 5-DSA (linhas negras) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) incorporado nas membranas de eritrócito para a amostra controle e para amostras incubadas por 90 minutos com 1,8-cineol e nerolidol na razão terpeno:célula de  $12,7 \times 10^9 : 1$ . O melhor ajuste para cada espectro foi obtido usando o programa *NLLS* com um modelo de duas componentes espectrais. Os valores do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ) obtidos em cada ajuste estão indicados. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G.

O comportamento do parâmetro  $\tau_c$  com a concentração de terpeno adicionado as membranas de eritrócito está apresentado na Figura 5.6. Note que enquanto os monoterpenos tem um efeito similar para todo o intervalo de concentração analisado, o sesquiterpeno (nerolidol) apresentou grandes mudanças para o parâmetro  $\tau_c$  confirmando o comportamento verificado nos testes hemolítico e de viabilidade celular.

A Figura 5.7 mostra os espectros de RPE, seus melhores ajustes e os valores correspondentes do tempo de correlação rotacional do marcador de spin 5-DSA incorporado nas membranas de fibroblastos para os oito terpenos estudados. Para uma razão de  $6,3 \times 10^9$  moléculas/célula, todos os terpenos causam aumento na fluidez das membranas de fibroblastos enquanto o nerolidol apresenta maior efeito. É importante notar que uma comparação entre



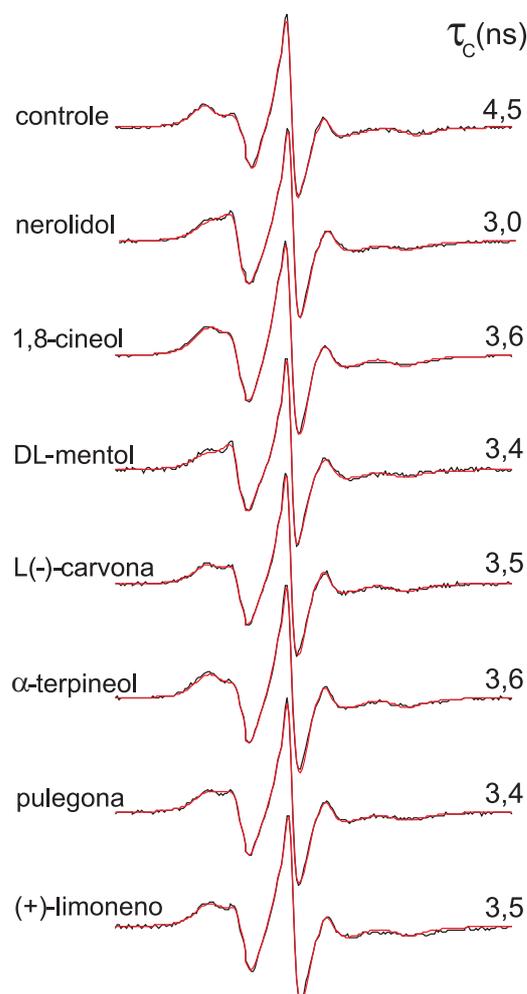
**Figura 5.6:** Tempo de correlação rotacional  $\tau_c$  para o marcador 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito em função do número de terpenos/eritrócitos.

os valores de  $\tau_c$  para as amostras controles das Figuras 5.5 e 5.7 revela que as membranas dos fibroblastos são naturalmente mais fluidas do que as membranas de eritrócito.

## 5.4 Discussão

Os facilitadores de permeação são moléculas importantes no uso de sistema de entrega controlada de drogas e na formulação de compostos que aumentam a absorção tópica de fármacos para o tratamento de diversas doenças da pele. Entretanto, a dificuldade de restringir seus efeitos a camada mais superficial da pele (o estrato córneo) e evitar irritação ou toxicidade nas camadas mais profundas tem limitado severamente sua aplicação [178]. É comumente aceito que os facilitadores químicos podem aumentar a permeação de drogas através da pele afetando os lipídios intercelulares do estrato córneo através da extração ou do aumento da fluidez<sup>3</sup> lipídica [179–181]. Em um estudo para projetar facilitadores da permeação de maneira a balancear o aumento final na permeação e o potencial de irritação, foi observado que o uso

<sup>3</sup>Note que neste trabalho, os terpenos atuam como facilitadores da permeação principalmente através do aumento da fluidez das membranas, uma vez que a linha espectral característica do processo de extração lipídica (componente 3) não é verificada nos espectros dos marcadores incorporados nas membranas de eritrócito e fibroblastos. A ausência da componente 3 está relacionada com a razão lipídio/solvente das amostras deste estudo (ver capítulo 4 para mais informações).



**Figura 5.7:** Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA (linhas negras) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) incorporado nas membranas de fibroblastos para uma amostra não tratada (controle) e para fibroblastos tratados com diversos terpenos (incubados por 90 minutos) na razão terpeno:célula de  $6,3 \times 10^9 : 1$ . O melhor ajuste para cada espectro foi obtido usando o programa *NLLS* com um modelo de duas componentes espectrais. Os valores do tempo de correlação rotacional ( $\tau_c$ ) obtidos em cada ajuste estão indicados. O erro experimental em  $\tau_c$  é estimado em 0,2 ns. A escala de varredura do campo magnético para todos os espectros foi de 100 G.

de facilitadores químicos como extratores lipídicos demonstraram uma correlação direta entre permeabilidade e irritação na pele, a qual não foi previamente observada para as moléculas que tipicamente atuam como espaçadores [94].

Neste estudo, foi demonstrado que os monoterpenos aumentam a dinâmica lipídica das membranas de eritrócito humano, mas que seus efeitos individuais não são significativamente distintos. Este resultado está de acordo com dados anteriormente reportados por nosso laboratório [78, 82, 83, 163], os quais demonstram um aumento na fluidez das membranas intercelulares do estrato córneo e de vesículas de DPPC causadas por quatro monoterpenos, mas

nenhuma diferença significativa entre eles. Desta forma, combinações de monoterpenos que facilitam a partição de pequenas drogas com baixo potencial de irritação, tais como o (+)-limoneno e o 1,8-cineol, com o sesquiterpeno nerolidol, o qual é citotóxico mas tem maior habilidade de desestabilizar a membrana, pode ser usada para alcançar uma permeação efetiva de fármacos polares e não polares através da pele.

Como proposto por Jain e co-autores [80], os terpenos tais como o  $\alpha$ -terpineol e o DL-mentol, os quais tem grupos -OH que atuam como doadores de ligações de hidrogênio podem desfazer a rede de ligações de hidrogênio das membranas de estrato córneo para facilitar a permeação de fármacos através da pele. Por outro lado, terpenos como 1,8-cineol, L-mentona, pulegona e L(-)-carvona, os quais possuem apenas aceptores de ligação de hidrogênio (grupos carbonila ou éter) apresentam menor capacidade para romper a rede de ligações de hidrogênio e, desta forma, demonstram uma capacidade reduzida de aumentar a permeação de drogas. De maneira similar, nossos dados mostram que os monoterpenos  $\alpha$ -terpineol e DL-mentol (doadores de ligação de hidrogênio) são altamente hemolíticos; enquanto L-mentona, pulegona, L(-)-carvona e 1,8-cineol (aceptores de ligação de hidrogênio) tem potencial hemolítico moderado e finalmente que o (+)-limoneno o qual não forma ligação de hidrogênio, apresenta menor potencial hemolítico. Por outro lado, o sesquiterpeno nerolidol o qual possui um grupo -OH, apresentou os maiores efeitos hemolíticos e citotóxicos. Geralmente, os terpenos podem competir com as ligações de hidrogênio intermoleculares mediadas por moléculas de água entre os lipídios, rompendo a rede de ligações de hidrogênio da bicamada e desestabilizando a membrana. Um importante resultado deste trabalho, é que os monoterpenos não apresentam diferenças significativas em seu potencial para aumentar a fluidez da membrana, ao passo que diferem em seu potencial hemolítico (5.2) e citotóxico (5.1). Uma comparação entre os terpenos estudados mostra que os monoterpenos menos polares, (+)-limoneno e 1,8-cineol, foram os que causaram menor dano às membranas de eritrócito e aos fibroblastos enquanto o nerolidol apesar de apresentar o maior potencial para aumentar a fluidez das membranas possui também a maior capacidade hemolítica e citotóxica.

A concentração de nerolidol que causa 50% de hemólise foi de aproximadamente  $2,5 \times 10^8$  moléculas/célula (5.2), enquanto a concentração que produz um aumento significativo na fluidez das membranas de eritrócito foi de  $2,5 \times 10^9$  moléculas/célula. Desta forma, verificamos que a mudança na fluidez da membrana é observada para uma concentração 10 vezes superior a observada na hemólise. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a razão molar entre os marcadores de spin e os lipídios naturais das membranas usada nos experimentos de RPE foi de 1:200. Desta forma, para detectar mudanças na fluidez, o micro-ambiente no qual a maioria dos marcadores de spin está inserido deve mudar (mudança geral das bicamadas) enquanto uma mudança altamente localizada é suficiente para provocar hemólise.

Os efeitos anti-proliferativos dos monoterpenos foram previamente demonstrados através da modulação da expressão gênica associada a apoptose [182–184]. Mesmo que os mecanismos responsáveis pela citotoxicidade dos terpenos não tenham sido investigados neste trabalho, sugerimos que os terpenos podem desencadear mecanismos de morte celular relacionados com a alteração da membrana celular, o que provavelmente ocorre durante a hemólise induzida pelos terpenos. Visto que alguns monoterpenos apresentam atividade contra *Leishmânia infantum* promastigota [185] e que o sesquiterpeno nerolidol inibe o crescimento de diversas espécies de *Leishmânia* promastigota e amastigota [91], estes terpenos podem ser interessantes candidatos a componentes de formulações para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea. Neste caso, os terpenos ou suas combinações atuariam não somente como facilitadores da permeação de fármacos com atividade leishmanicida mas também contribuiriam para o tratamento anti-parasitário.

## 5.5 Conclusões

O potencial hemolítico e citotóxico em fibroblastos de vários terpenos foi examinado e demonstramos que os danos celulares causados por estas moléculas são dependentes da concentração. Nerolidol,  $\alpha$ -terpineol e DL-mentol foram os terpenos mais hemolíticos enquanto que (+)-limoneno e 1,8-cineol foram os menos hemolíticos. Com relação a citotoxicidade, nerolidol

---

e  $\alpha$ -terpineol apresentaram maior efeito e o 1,8-cineol o menor efeito. Entretanto, a baixa correlação entre os dois testes ( $R=0,61$ ) indica que os processos envolvidos em cada caso são pouco dependentes. Este estudo demonstrou ainda que os monoterpenos tem grande capacidade para aumentar a fluidez das membranas de eritrócito e de fibroblastos e foi observado que os efeitos não diferem significativamente entre eles, sugerindo que todos os monoterpenos estudados tem o mesmo potencial para aumentar a permeação transdérmica.

Capítulo **6**

**Efeitos do Nerolidol em Membrana  
Modelo e de Estrato Córneo Estudados  
pela Anisotropia da Fluorescência de  
Sondas Lipofílicas**

---

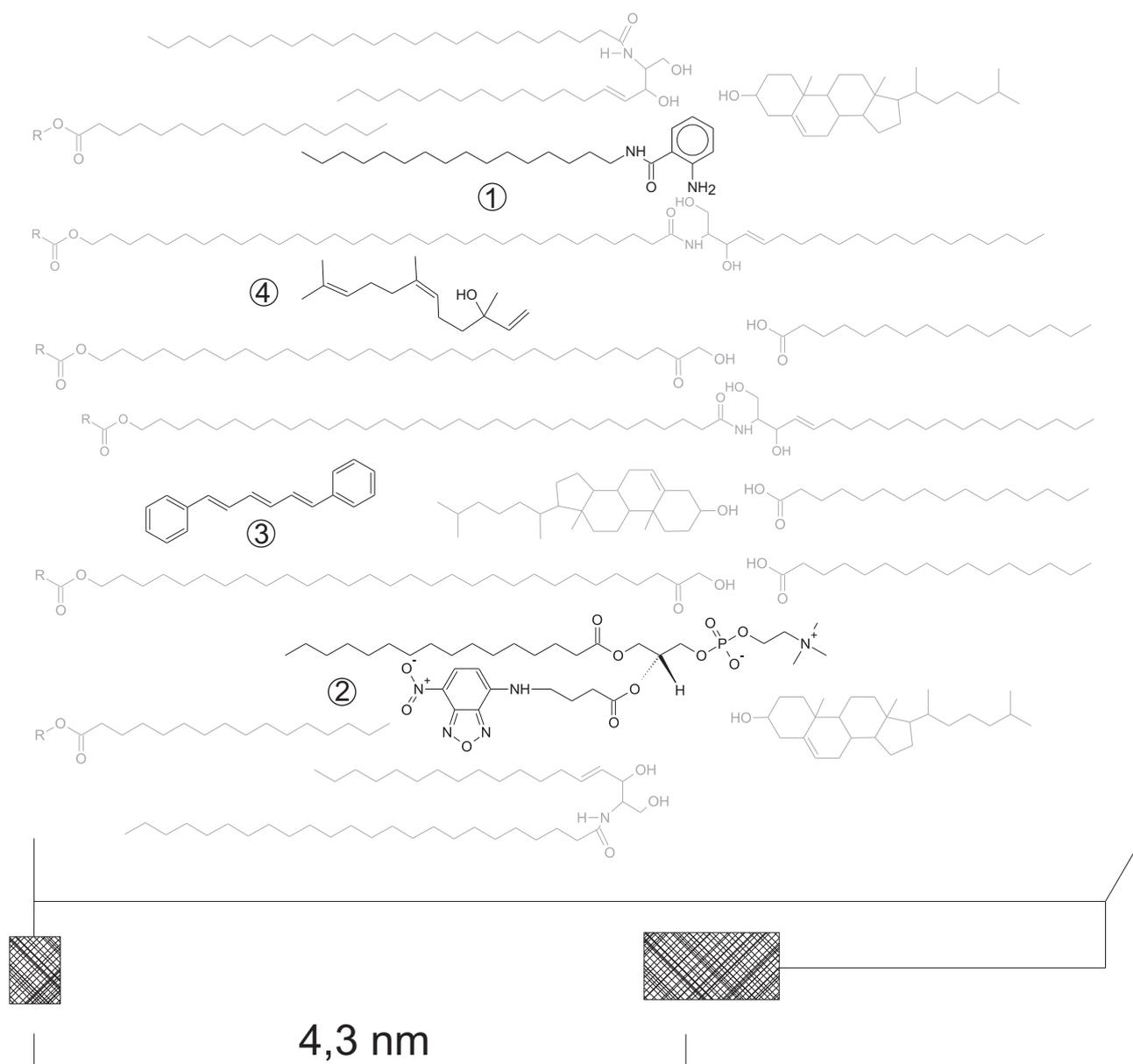
## 6.1 Motivação

O nerolidol é um sesquiterpeno presente em óleos essenciais de diversas plantas e um agente promissor para aumentar a penetração de fármacos usados em sistemas transdérmicos de entrega controlada de droga [180] além de ter sido apontado como um composto leishmanicida [91]. Em nosso laboratório, a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) associada ao método dos marcadores de spin tem sido empregada para estudar os efeitos de terpenos sobre as membranas de estrato córneo (EC). Mesmo fornecendo informações importantes, o uso da técnica de RPE é limitado pelo alto custo dos espectrômetros. Desta forma, nesta parte deste trabalho estamos interessados em estabelecer uma metodologia alternativa para o estudo de membranas de EC através da espectroscopia de fluorescência de sondas lipofílicas e avaliar os efeitos do nerolidol sobre as bicamadas lipídicas do EC para obter informações complementares sobre a ação dos terpenos como facilitadores de permeação.

## 6.2 Materiais e Métodos

### 6.2.1 Químicos

O fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) assim como a sonda fluorescente 1-palmitoil-2-6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (6-NBD-PC) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA). A sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi adquirida junto a Life Technologies do Brasil Ltda (São Paulo, Brasil) enquanto a sonda fluorescente 2-amino-N-hexadecil benzamida (AHBA) foi preparada como descrito anteriormente por Marquezin e colaboradores [186]. Os terpenos nerolidol e (+)-limoneno foram adquiridos da Organics (Geel, Bélgica) (Figura 6.1). Todos os outros reagentes com mais alto grau de pureza disponível, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) ou da Merck SA (Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q.



**Figura 6.1:** Arranjo molecular dos lipídios que formam as membranas intercelulares do estrato córneo, baseado no modelo proposto por Hill e Wertz [62]. As sondas fluorescentes e o sesquiterpeno nerolidol estão mostrados na figura em suas prováveis localizações. As caixas hachuradas representam as regiões eletricamente densas onde os lipídios podem estar covalentemente ligados à superfície exterior dos envelopes proteicos dos corneócitos (representados pelos grupos R). ①, AHBA; ②, 6-NBD-PC; ③, DPH e ④, nerolidol. Figura adaptada de *Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum* [172].

## 6.2.2 Preparação das Membranas de EC

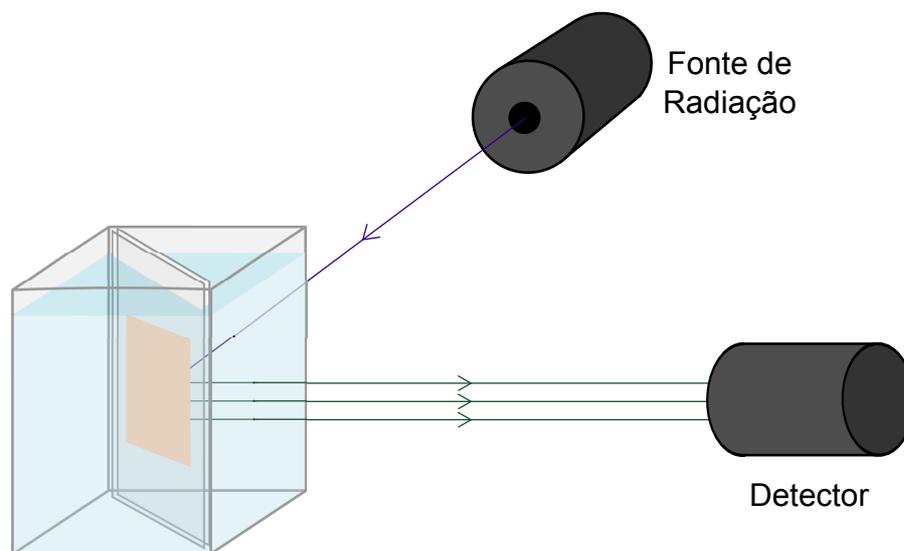
As membranas de EC foram obtidas a partir de ratos da raça Wistar com idade inferior a 24 h e preparadas de acordo com o protocolo descrito por Alonso e colaboradores [187]. Um breve sumário do protocolo segue: após serem sacrificados, os animais tem suas peles removidas e separadas da gordura residual. Para separar o EC da epiderme, as peles foram colocadas em contato com vapor de hidróxido de amônio durante 5 min e em seguida com água destilada durante 2 h. Após este procedimento, as peles foram colocadas em papel filtro e as membranas de EC foram cuidadosamente separadas da epiderme. Em seguida, as membranas de EC foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram armazenadas em um dessecador sob vácuo moderado contendo sílica gel até ao momento da utilização.

## 6.2.3 Marcação e Tratamento das Membranas de EC

As amostras de EC intacto ( $\sim 2$  mg) foram incubadas durante 30 min à temperatura ambiente em solução salina tamponada com acetato (acetato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,1). Em seguida, foram realizadas repetidas passagens das membranas de EC já hidratadas em placas de vidro onde as sondas fluorescentes desejadas (dissolvidas em etanol) foram previamente depositadas. Após este procedimento, as membranas de EC foram incubadas durante 90 min à temperatura ambiente em soluções contendo terpeno-etanol/tampão (0,25-1% v/v). Finalmente, as amostras de EC foram colocadas entre placas de quartzo e introduzidas em cubetas de quartzo contendo tampão. Sob estas condições, o EC pode ser considerado, no seu estado completamente hidratado durante todas as medições. Um esquema do arranjo utilizado está apresentado na Figura 6.2.

## 6.2.4 Preparação e Tratamento das vesículas de DPPC

Filmes lipídicos de DPPC (dissolvidos em clorofórmio) contendo a sonda fluorescente desejada (inicialmente dissolvida em etanol) a uma proporção de sonda/lípido (1:100) foram



**Figura 6.2:** Arranjo utilizado para realização dos experimentos de espectroscopia de fluorescência em membranas de estrato córneo. As membranas de estrato córneo foram colocadas entre placas de quartzo e introduzidas em cubetas de quartzo (com um ângulo ligeiramente inferior a  $45^\circ$  com os lados da cubeta) contendo solução salina tamponada com acetato e pH 5,1.

formados em tubos de vidro por evaporação do solvente usando um fluxo de nitrogênio gasoso. A fim de remover o solvente orgânico residual os filmes foram mantidos sob vácuo durante 12 h. Em seguida, os filmes de lipídios foram hidratados com um volume adequado de tampão fosfato salino (fosfato 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), para formar uma suspensão de vesículas multilamelares de DPPC. Vesículas unilamelares foram preparadas com um mini-extrusor adquirido da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA), equipado com filtros de policarbonato com poros de  $0,1 \mu\text{m}$  de diâmetro. Subsequentemente, as vesículas de DPPC foram resfriadas e concentrada por centrifugação. A esta suspensão foram adicionadas as alíquotas desejadas de uma solução contendo terpeno:etanol na proporção 1:2. Para evitar os efeitos de espalhamento de luz, a concentração final de DPPC foi fixada em 0,2 mM.

## 6.2.5 Medidas da Anisotropia da Fluorescência

As medidas da anisotropia da fluorescência foram realizadas usando um espectrofluorímetro Horiba Fluorolog<sup>®</sup> FL-3221 (Kyoto, Japão) com polarizadores nos canais de emissão e excitação e equipado com um sistema de medida tipo L. A temperatura das amostras foi con-

trolada usando um circulador térmico Cientec (Charqueada, Brasil). Os comprimentos de onda de excitação de cada sonda foram de 330 nm para o AHBA, 460 nm para o 6-NBD-PC e 360 nm para o DPH. A anisotropia da fluorescência foi calculada de acordo com a equação [188]

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (6.1)$$

na qual  $r$  é a anisotropia da fluorescência quase estática e  $I_{\parallel}$  e  $I_{\perp}$  são as intensidades da fluorescência paralela e perpendicular, respectivamente, ao plano de polarização da luz de excitação para cada comprimento de onda de excitação das sondas utilizadas.

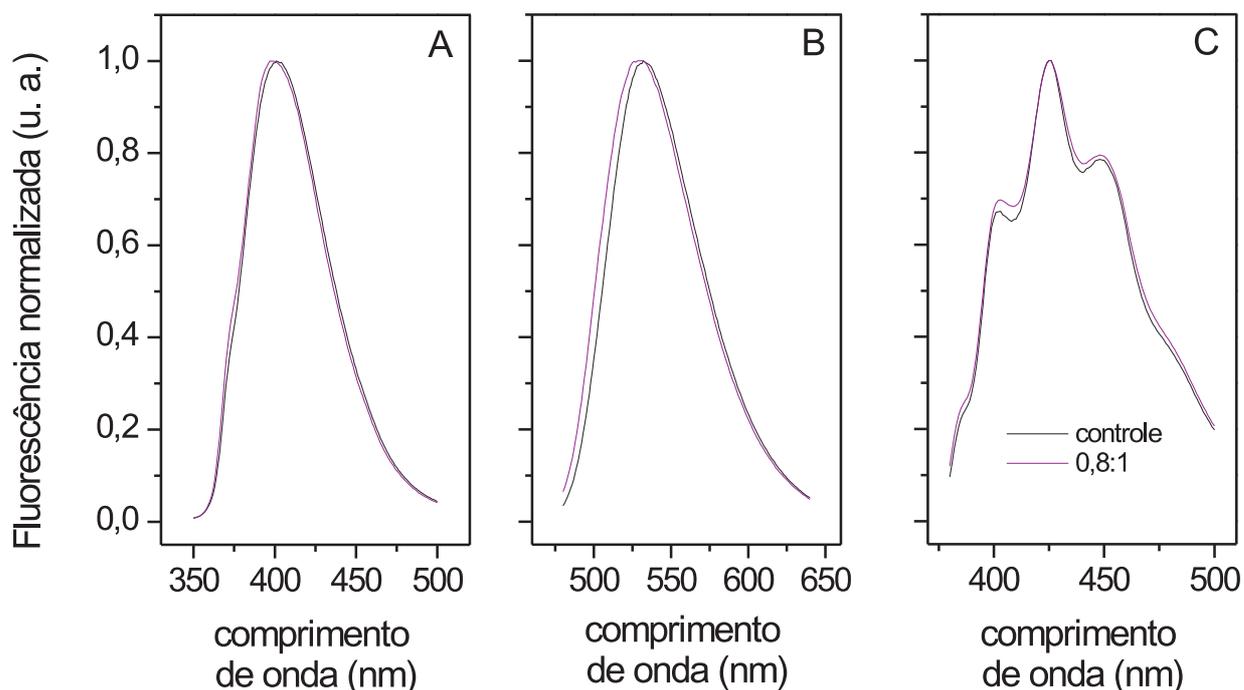
## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Validação do Arranjo Experimental

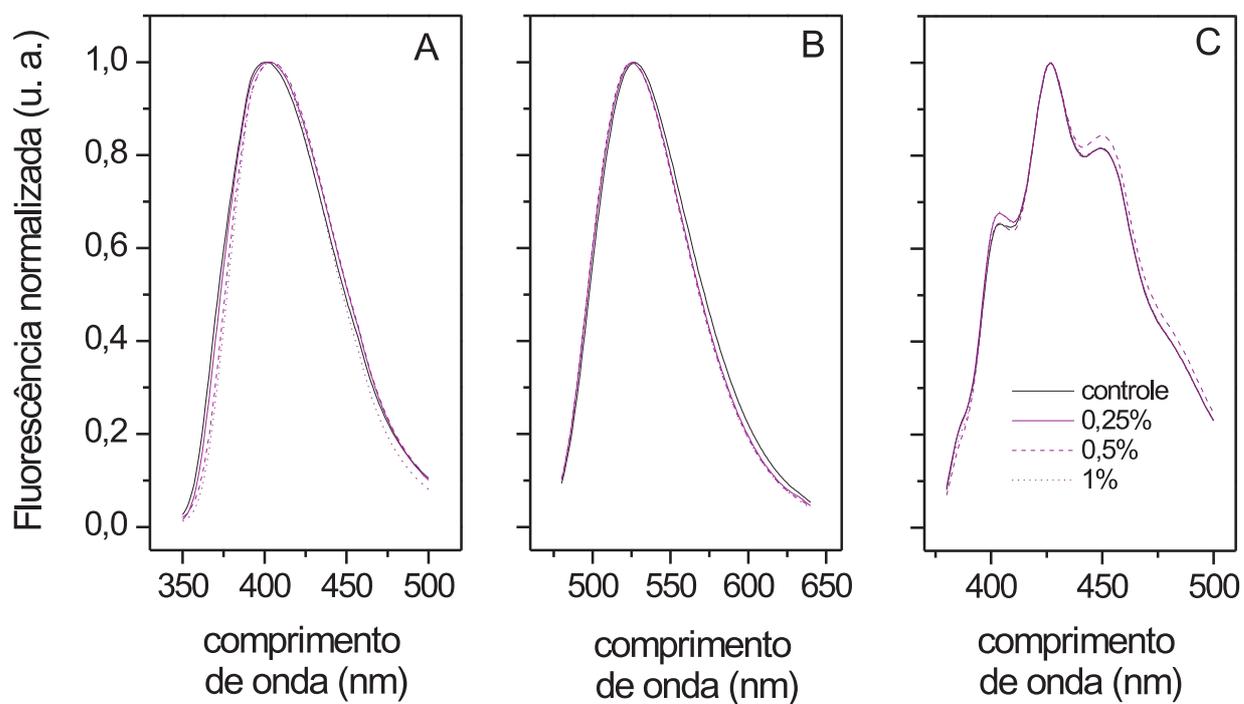
Para validar o arranjo experimental estabelecido para as medidas da anisotropia da fluorescência de sondas lipofílicas incorporadas nas membranas intercelulares do EC, foram realizados experimentos controle para otimização dos parâmetros experimentais necessários. Experimentos paralelos com vesículas de DPPC também foram realizados para determinar possíveis alterações no comportamento padrão das sondas (AHBA, 6-NBD-PC e DPH) provocadas pelo nerolidol.

As Figuras 6.3 e 6.4 mostram o comportamento dos espectros de emissão de fluorescência a 25 °C das sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH incorporadas em vesículas de DPPC e em membranas de EC respectivamente, tratadas com nerolidol. Uma vez que a adição de nerolidol não alterou significativamente a estrutura de bandas ou a posição dos picos dos espectros de emissão, os comprimentos de onda de emissão utilizados nos experimentos de anisotropia da fluorescência foram fixados em 400 nm para o AHBA, 527 nm para o 6-NBD-PC e 427 nm para o DPH.

A Figura 6.5 mostra os valores da anisotropia da fluorescência das sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH como função do ângulo  $\theta$  entre o feixe de excitação e o vetor normal ao

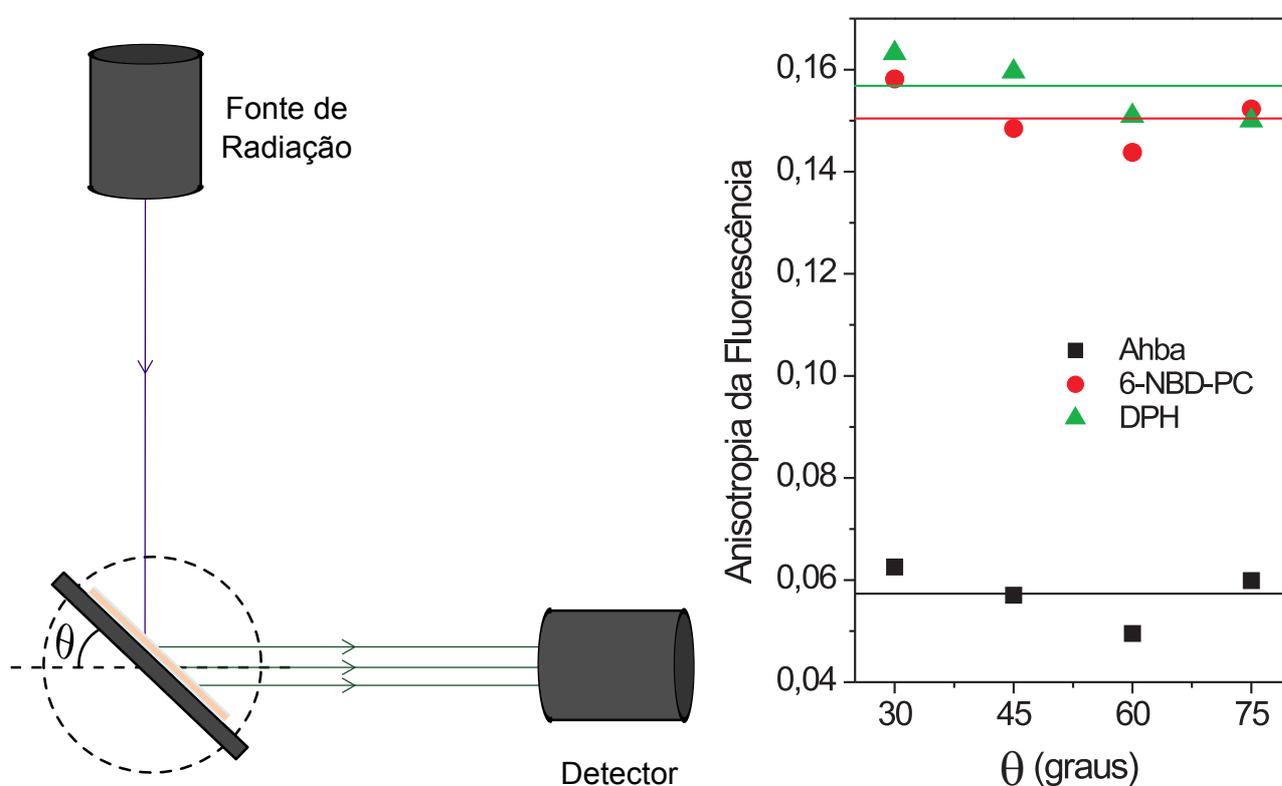


**Figura 6.3:** Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas em vesículas de DPPC tratadas com nerolidol na razão 0,8:1 (terpeno:lipídio). Os comprimentos de onda de excitação de cada sonda foram: AHBA, 330 nm; 6-NBD-PC, 460 nm e DPH, 360 nm.



**Figura 6.4:** Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas em membranas de EC tratadas com nerolidol nas razões 0,25; 0,5 e 1 % (v/v). Os comprimentos de onda de excitação de cada sonda foram: AHBA, 330 nm; 6-NBD-PC, 460 nm e DPH, 360 nm.

plano da amostra de EC. Note que variações de  $\theta$  não alteram significativamente os valores encontrados para a anisotropia da fluorescência das três sondas utilizadas. Desta forma, para os experimentos de anisotropia da fluorescência como função da temperatura, as amostras de EC foram introduzidas nas cubetas de quartzo em um ângulo ligeiramente inferior  $45^\circ$  com os lados da cubeta. Esta posição facilita a padronização dos experimentos e evita efeitos de espalhamento de luz ( $\theta$  exatamente igual a  $45^\circ$  maximiza os efeitos de espalhamento de luz).

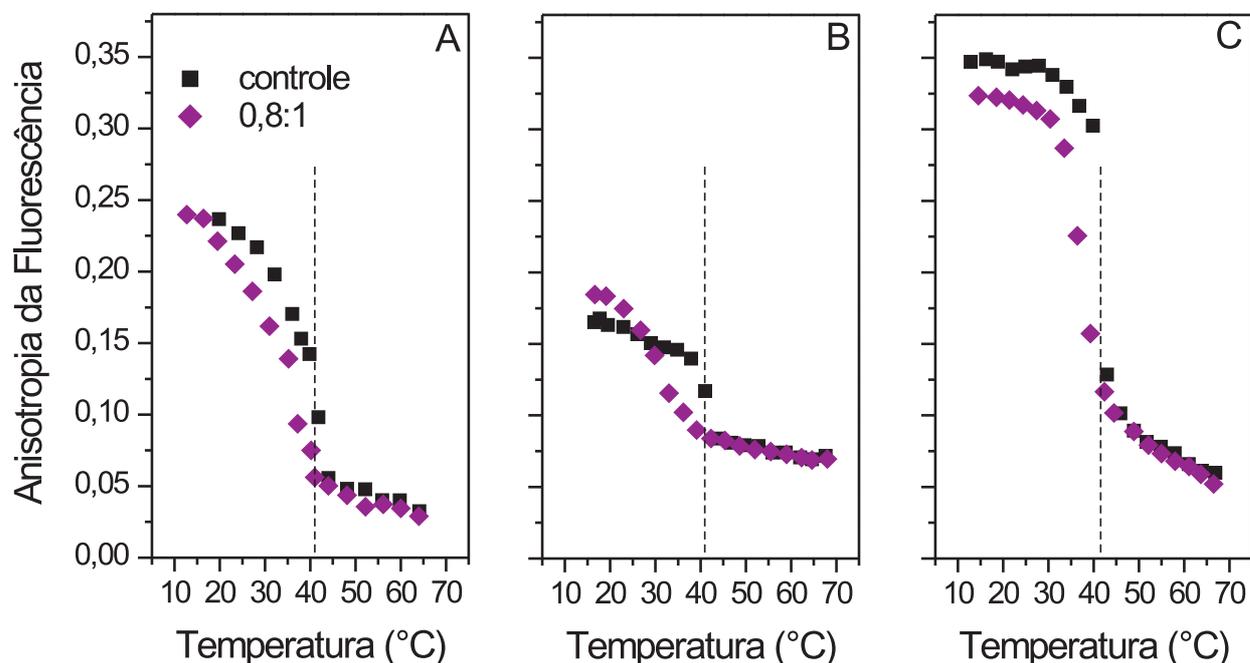


**Figura 6.5:** Dependência angular da anisotropia da fluorescência das sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH incorporadas nas membranas de EC a  $25^\circ\text{C}$ . As linhas representam o valor médio de todas as medidas.

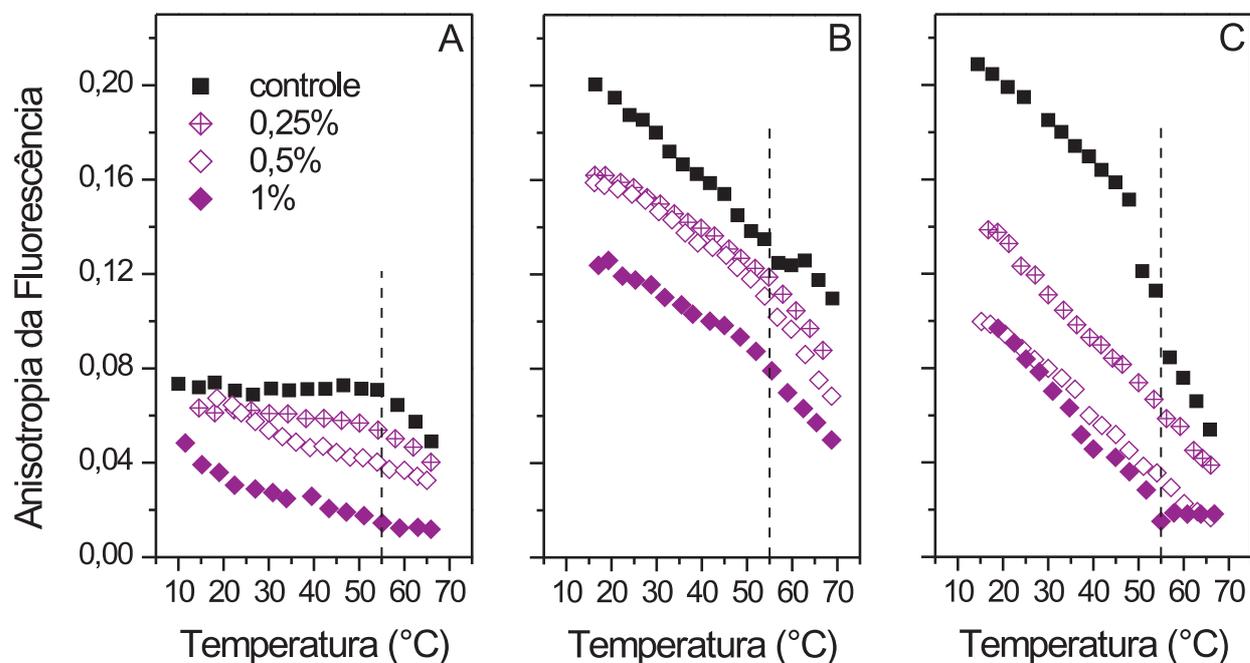
### 6.3.2 Anisotropia da Fluorescência

Uma vez que os parâmetros experimentais foram estabelecidos, foram realizados experimentos de anisotropia da fluorescência como função da temperatura para as membranas de EC marcadas com as sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH. Nas Figuras 6.6 e 6.7 está representada a diminuição da anisotropia da fluorescência destas sondas incorporadas nas membranas de DPPC (experimento controle) e EC indicando um aumento da fluidez das bicamadas para

a concentrações à partir de 0,8:1 (DPPC) e 0,25% (v/v) (EC).



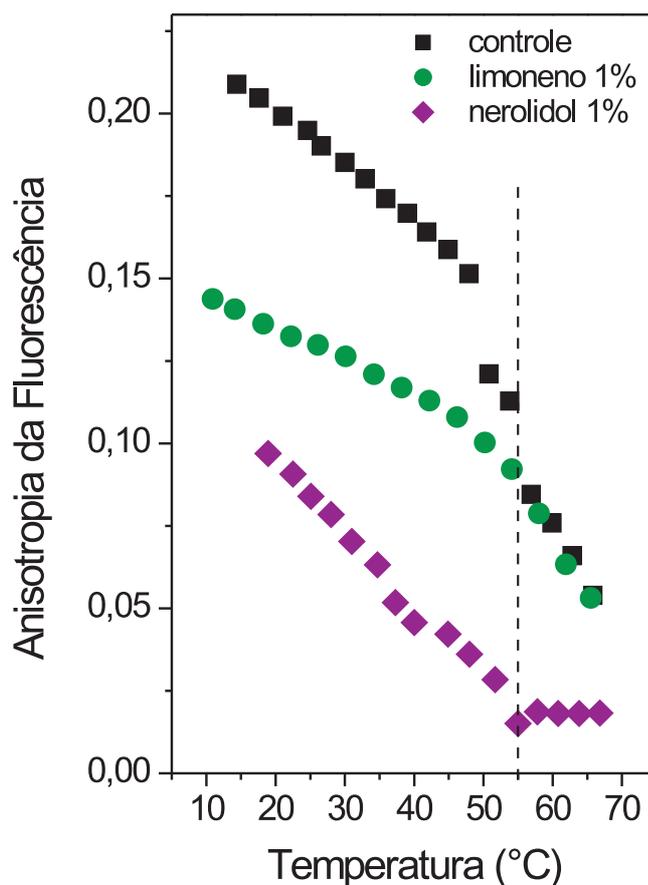
**Figura 6.6:** Anisotropia da fluorescência das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas nas membranas de DPPC como função da temperatura para a razão 0,8:1 (nerolidol:lipídio). As linhas verticais pontilhadas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4^\circ\text{C}$ ) da amostra controle (sem terpeno).



**Figura 6.7:** Anisotropia da fluorescência das sondas AHBA (Painel A), 6-NBD-PC (Painel B) e DPH (Painel C) incorporadas nas membranas de EC como função da temperatura para diferentes concentrações (v/v) do sesquiterpeno nerolidol. As linhas verticais pontilhadas indicam a temperatura da primeira transição de fase ( $T_m \sim 55^\circ\text{C}$ ) da amostra controle (sem terpeno).

A Figura 6.7 sugere ainda que a adição de 0,25 e 0,5% (v/v) de nerolidol é suficiente para suprimir a transição de fase retratada pelas sondas AHBA e DPH. Já para o 6-NBD-PC, o aumento gradual da concentração de nerolidol faz com que a transição de fase que não estava bem resolvida na amostra sem tratamento com nerolidol possa ser melhor visualizada. Pode-se observar também, para as três sondas utilizadas, que a adição do nerolidol reduz em aproximadamente 6 °C a temperatura de transição de fase das bicamadas de DPPC (Figura 6.6).

A Figura 6.8 apresenta uma comparação entre o efeito sobre a anisotropia da fluorescência da sonda DPH incorporada em membranas de EC tratadas com 1% (v) de (+)-limoneno (monoterpeno) ou nerolidol (sesquiterpeno). Pode-se observar que o tratamento com o



**Figura 6.8:** Anisotropia da fluorescência da sonda DPH incorporadas em membranas de EC como função da temperatura. As amostras foram tratadas com com 1% (v/v) de (+)-limoneno ou nerolidol durante 90 min a 25 °C. A linha vertical pontilhada indica a temperatura da primeira transição de fase ( $T_m \sim 55$  °C) da amostra controle (sem terpeno).

monoterpeno causa uma diminuição nos valores encontrados para a anisotropia da fluorescência do DPH mas uma leve transição de fase com início entre 45-50 °C continua sendo visualizada. Já no tratamento com nerolidol, a diminuição da anisotropia é maior e a transição de fase é completamente suprimida indicando que o nerolidol tem maior capacidade de aumentar a dinâmica das bicamadas intercelulares do EC quando comparado ao (+)-limoneno.

## 6.4 Discussão

O EC é um tecido composto de células achatadas (cheias de queratina) incorporadas em uma matriz lipídica [189] que pode ser separado do restante da pele na forma de uma membrana de pequena espessura. Quando hidratada, a membrana de EC atinge um estado flexível e quase translúcido, adequado para ser estudado através da espectroscopia de fluorescência. Neste trabalho, a espectroscopia de fluorescência de sondas lipofílicas foi usada para estudar as alterações provocadas pelo tratamento de membranas de EC com o terpeno nerolidol. Para isso, foi desenvolvido um arranjo experimental, no qual as membranas hidratadas de EC foram colocadas entre placas de quartzo submersas em solução tamponante durante a realização dos experimentos. Possíveis artefatos experimentais provocados pelo arranjo experimental escolhido foram descartados uma vez que quando incorporadas no EC, as sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH reproduziram seus respectivos espectros de emissão tais quais reportados na literatura [186, 190, 191], demonstrando que as sondas estão devidamente incorporadas nas lamelas lipídicas do EC e que o tratamento com nerolidol não dá origem a comportamentos singulares.

O EC é caracterizado por possuir uma composição lipídica distinta das demais membranas celulares e uma organização bastante complexa com três transições de fase descritas. A primeira transição de fase acontece para uma temperatura entre 55-65 °C [59] e está relacionada com a perda da estrutura cristalina ortorrômbica dos lipídios covalentemente ligados ao exterior do envelope do corneócito. As outras duas acontecem a 72 °C e 83 °C [192-194] e estão associadas com o desordenamento da fase lamelar (transição da fase gel para a fase líquida

crystalina). Estas duas últimas transições desaparecem com a deslipidização do EC [194], o que sugere que estão relacionadas com lipídios livres (não ligados covalentemente aos corneócitos, ver modelo apresentado no capítulo 1) das membranas intercelulares do EC. O comportamento da anisotropia da fluorescência como função da temperatura das sondas AHBA, 6-NBD-PC e DPH inseridas nas membranas de EC, reflete a transição de fase localizada entre 55-65 °C. Curiosamente, esta transição de fase está bem resolvida para as sondas AHBA e DPH mas aparece como apenas uma leve mudança de inclinação no comportamento da anisotropia da sonda 6-NBD-PC. Além disso, a adição do terpeno nerolidol, suprime a transição observada com as sondas AHBA e DPH enquanto aumenta a resolução da transição visualizada com 6-NBD-PC.

Uma análise da sonda 6-NBD-PC mostra que o grupo fluorescente está introduzido em uma posição intermediária de sua cadeia acila. É esperado então que esta sonda monitore as mudanças da região hidrofóbica das bicamadas. Entretanto, uma tendência do grupo polar NBD a se deslocar em direção a interface água-lipídio esta demonstrada através de estudos de dinâmica molecular e anisotropia da fluorescência quase estática e com resolução temporal [195, 196] e de supressão da fluorescência [197, 198] de sondas lipofílicas com o grupo NBD ligado as cadeias acilas. Este comportamento parece ser o responsável por esta sonda refletir fracamente a primeira transição de fase do EC. Por outro lado, a presença do nerolidol, parece facilitar a entrada do grupo NBD na região hidrofóbica das membranas, aumento assim sua sensibilidade a transição de fase. Esta habilidade dos terpenos em suprimir a primeira transição de fase e alterar a posição relativa de sondas extrínsecas inseridas nas membranas do EC está demonstrada no trabalho de Anjos e Alonso [82], onde a adição do monoterpeneo 1,8-cineol facilita a transferência de marcadores de spin baseados no ácido esteárico de uma posição menos inserida (em contato com os grupos polares das bicamadas) para uma posição mais profundamente inserida nas membranas (em contato com o núcleo hidrofóbico das bicamadas) de EC.

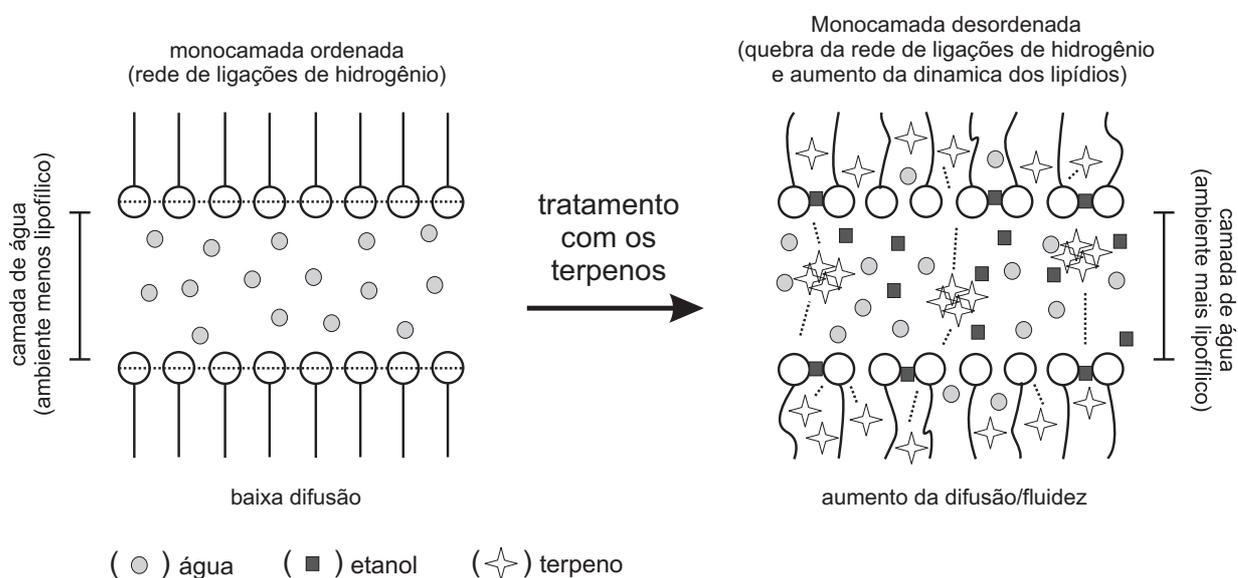
Por outro lado, a adição de 0,25 e 0,5% (v/v) de nerolidol, faz com que a transição de fase reportada pelas sonda AHBA (que possui seu grupo fluorescente posicionado próximo

dos grupos polares das bicamadas) e DPH (que possui caráter não polar), respectivamente, não possam mais ser observadas. Curiosamente, quando incorporada nas membranas de EC a sonda AHBA apresenta uma anisotropia cerca de 3 vezes menor em relação aos valores encontrados para as vesículas de DPPC. Como discutido por Marquezin e co-autores [186] dois tempos de correlação rotacional foram identificados para esta sonda incorporada em membranas de DMPC<sup>1</sup>. O maior destes tempos foi relacionado com a rotação da sonda como um todo, enquanto o menor foi relacionado com o movimento do anel aromático fluorescente. Os baixos valores encontrados para a anisotropia da fluorescência desta sonda incorporada nas membranas de EC podem estar relacionados com uma possível interação de hidrogênio entre o grupo amida da sonda e os grupos polares dos lipídios das bicamas a qual resultaria em uma imobilização temporária da cadeia acila do marcador. Desta forma, a maior contribuição para a anisotropia quase estática viria da rotação do anel aromático.

Como discutido por Jain e colaboradores [80] um tratamento com os terpenos que possuem grupos -OH ou -C=O altera a rede de ligações de hidrogênio entre os grupos polares das ceramidas das membranas intercelulares do EC levando a um menor empacotamento das bicamadas e um aumento na fluidez das membranas. Além disso, dados de PRE reportados por nosso grupo [78, 82, 83] indicam que uma vez incorporados no EC, os terpenos (polares e não polares) se distribuem pelas membranas, atuam como espaçadores lipídicos e aumentam a fluidez do EC e o particionamento de pequenas moléculas. Neste trabalho, através da anisotropia da fluorescência das sondas lipofílicas também foi possível verificar um aumento na fluidez das membranas de EC tratadas com nerolidol e (+)-limoneno. Entretanto, uma comparação entre nerolidol (sesquiterpeno que possui um grupo polar) e o (+)-limoneno (monoterpeno que não possui grupo polar) mostra que o sesquiterpeno apresenta maior capacidade em aumentar a fluidez das membranas de EC. Este resultado está de acordo com os dados apresentados no capítulo 5 onde o nerolidol mostra maior capacidade em aumentar a dinâmica das membranas de eritrócito e de fibroblastos. Desta forma, sugerimos que quando incorporados no EC os

<sup>1</sup>Sigla para 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina.

terpenos apresentam um efeito combinado entre desestabilizar a rede de ligações de hidrogênio e provocar desordem nas cadeias acilas dos lipídios do EC (Figura 6.9)



**Figura 6.9:** Modelo para a ação dos terpenos em membranas de estrato córneo. Figura adaptada de *Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I. Effect of terpenes*. [80].

## 6.5 Conclusões

Nossos resultados demonstram que a metodologia empregada para estudar a interação dos terpenos com as membranas intercelulares do EC através da anisotropia da fluorescência de sondas lipofílicas foi satisfatória e pode ser empregada no estudo de outras moléculas. Utilizando esta metodologia observamos que em concentrações de 1% (v/v para o EC) e na proporção 0,8:1 (terpeno:lípido para DPPC) o sesquiterpeno nerolidol provoca alterações drásticas na dinâmica molecular das bicamadas lipídicas, aumentando sua fluidez e modificando sua transição de fase. Isto sugere que o efeito leishmanicida do nerolidol pode estar diretamente relacionado com sua capacidade de alterar a dinâmica das membranas<sup>2</sup>. Desta forma, este sesquiterpeno além de ser usado diretamente no tratamento da leishmaniose, pode ser usado para aumentar a permeação através da pele de fármacos específicos de maneira eficaz para se obter um efeito combinado.

<sup>2</sup>De fato esta correlação foi demonstrada por nosso grupo em um trabalho submetido para publicação: Camargos, HS; Moreira, RA; Mendanha, SA; Fernandes, KS; Dorta, ML e Alonso, A. Terpenes increase the lipid dynamics in plasma Leishmania membrane at concentrations similar to their IC<sub>50</sub>.

Capítulo **7**

**Interação de Nanopartículas de Ouro  
AURORA-DSG com Membranas  
Modelo**

---

## 7.1 Motivação

O estudo de membranas lipídicas através da microscopia eletrônica depende do uso de contrastes baseados em metais pesados tais como o ósmio, chumbo e o urânio. Entretanto, o uso destes agentes de contraste não conferem às imagens resolução suficiente para o estudo detalhado das bicamadas lipídicas. Para resolver este problema, a Avanti Polar Lipids Inc. criou nanopartículas de ouro conjugadas com duas cadeias acila, que quando incorporadas nas bicamadas lipídicas são capazes de conferir uma resolução suficientemente grande para se distinguir individualmente cada lamela de vesículas multilamelares. Desta forma, nesta parte deste trabalho estamos interessados em avaliar os efeitos da incorporação destas nanopartículas de ouro sobre a morfologia e dinâmica de diferentes tipos de membrana modelo para determinar o possível surgimento de artefatos experimentais.

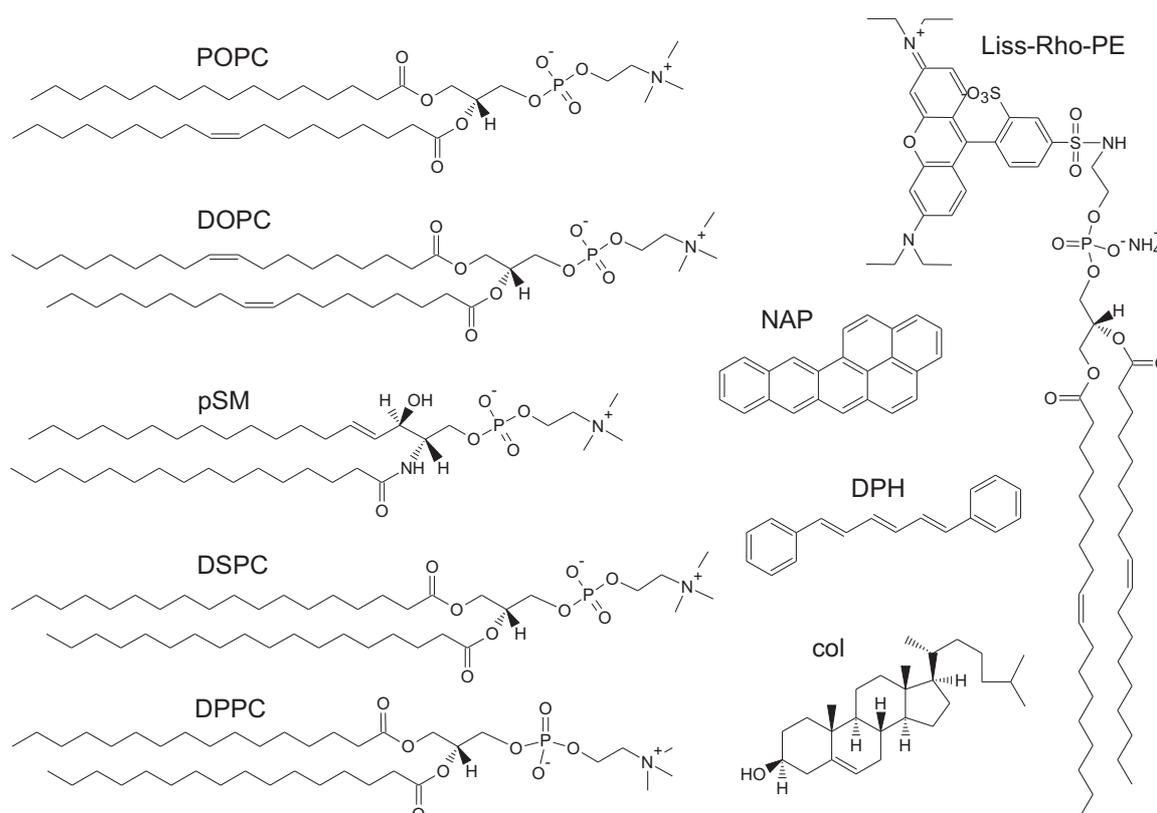
## 7.2 Materiais e Métodos

### 7.2.1 Químicos

Os lipídios 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC), N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (pSM), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), a sonda fluorescente 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Liss-RhoPE), o colesterol (col) e a 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-(Nanopartículas Aurora) (AURORA-DSG) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, EUA). A sonda fluorescente Nafto[2,3-a]pireno (NAP) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e a sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi adquirida da Molecular Probes<sup>®</sup> (Eugene, EUA) (Figura 7.1). Os demais reagentes utilizados possuíam a mais alta qualidade disponível e todas as soluções foram preparados com água Milli-Q.

## 7.2.2 Manipulação da AURORA-DSG

Filmes de AURORA-DSG dissolvida em clorofórmio (0,5 mg/mL) foram formados em tubos de PFA<sup>1</sup> (Saville, Eden Prairie, EUA) por evaporação do solvente usando um fluxo de nitrogênio gasoso. Os tubos contendo os filmes de AURORA-DSG foram armazenados a 4 °C até o momento de sua utilização.



**Figura 7.1:** Estrutura química dos lipídios e das sondas fluorescentes utilizados neste trabalho.

## 7.2.3 Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes

As vesículas unilamelares gigantes (GUV's) foram preparadas através do método de eletroformação de acordo com o protocolo descrito por Montes e co-autores [199] usando câmaras de formação especiais baseadas nas descritas por Fidorra e co-autores [200], as quais permitem a observação direta das GUV's sob o microscópio. Um breve sumário do protocolo segue: 5  $\mu\text{L}$  das soluções estoque dos lipídios (0,2 mM) dissolvidos em clorofórmio:metanol (2:1 v/v)

<sup>1</sup>Sigla para *PerFluoroAlkoxy*.

contendo 0,3 mol% da sonda fluorescente Liss-Rho-PE foram adicionados sobre a superfície dos eletrodos de platina das câmaras de formação. As câmaras foram mantidas sob vácuo moderado durante 90 min para eliminar o solvente orgânico residual. Em seguida, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de solução tampão (HEPES<sup>2</sup> 25 mM, NaCl 15 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) a cada câmara e estas foram conectadas a um gerador elétrico de corrente alternada TG330 (Thurlby Thandar Instruments, Huntington, Reino Unido). Os parâmetros do processo de eletroformação foram: frequência da corrente alternada, 500 Hz; tensão da corrente alternada, 0,03 V durante 6 min, 0,33 V durante 20 min e 0,8 V durante 90 min. As câmaras foram mantidas a 60 °C durante todo o processo de eletroformação. A incorporação da AURORA-DSG nas amostras foi realizada através da adição das soluções estoque sobre os filmes de AURORA previamente preparados. As soluções resultantes foram cuidadosamente agitadas durante 2 min antes de serem adicionadas sobre os eletrodos de platina. A concentração final de AURORA-DSG em cada amostra foi de 0,1 mol%.

## 7.2.4 Microscopia Confocal

Após o período de formação, as câmaras foram introduzidas em um microscópio invertido confocal Nikon D-ECLIPSE C1 (Nikon Inc., Melville, EUA) para aquisição das imagens de fluorescência das GUV's. O comprimento de onda de excitação para a Liss-Rho-PE foi de 561 nm. As imagens foram adquiridas através de um canal de detecção equipado com um filtro de  $593\pm 20$  nm e tratadas com o software EZ-C1 3.20 (Nikon Inc.). Todas as imagens foram adquiridas em temperatura ambiente e nenhuma diferença no tamanho, formação ou distribuição dos domínios lipídicos foi verificada durante ou após o período de exposição ao laser de excitação.

## 7.2.5 Preparação das Vesículas Multilamelares

Filmes dos lipídios dissolvidos em clorofórmio:metanol (2:1) contendo 0,2 mol% da sonda fluorescente DPH foram formados em tubos de PFA (Saville, Eden Prairie, EUA) por evaporação do solvente usando um fluxo de nitrogênio gasoso. Os tubos foram mantidos sob

---

<sup>2</sup>Sigla para *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

vácuo moderado durante 90 min para eliminar o solvente orgânico residual e posteriormente hidratados com 1000  $\mu\text{L}$  de solução tampão (HEPES 25 mM, NaCl 15 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) a 45 °C para formar uma suspensão de vesículas multilamelares (MLV's). As amostras foram homogeneizadas através de sonicação a 50 °C durante 6 min em um sonicador FB-15049 (Fisher Scientific, Waltham, EUA). A incorporação da AURORA-DSG nas amostras foi realizada através da adição das soluções de lipídios sobre os filmes de AURORA previamente preparados. As soluções resultantes foram cuidadosamente agitadas durante 2 min antes de serem evaporadas pelo fluxo de nitrogênio gasoso. A concentração final de AURORA-DSG em cada amostra foi de 0,1 mol%. Para evitar os efeitos de espalhamento de luz, a concentração final das MLV's foi fixada em 0,025 mM.

## 7.2.6 Medidas da Anisotropia da Fluorescência

As medidas da anisotropia da fluorescência foram realizadas usando um espectrofluorímetro QuantaMaster 40 (Photon Technology International, Lawrenceville, EUA) com polarizadores nos canais de emissão e excitação e equipado com um sistema de medida tipo L. Um controlador térmico TC125 (Quantum Northwest, Liberty Lake, EUA) foi utilizado para estabilizar a temperatura das amostras. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão para o DPH foram 360 e 427 nm respectivamente. A anisotropia da fluorescência foi calculada de acordo com a equação [188]

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7.1)$$

na qual  $r$  é a anisotropia da fluorescência quase estática e  $I_{\parallel}$  e  $I_{\perp}$  são as intensidades da fluorescência paralela e perpendicular, respectivamente, ao plano de polarização da luz de excitação para o comprimento de onda de excitação do DPH.

## 7.2.7 Preparação das Bicamadas Planas Suportadas

As bicamadas planas suportadas (SPB's) foram preparadas através do método de adsorção de vesículas unilamelares pequenas (SUV's) [35]. Filmes dos lipídios dissolvidos em

clorofórmio:metanol (2:1) foram formados em tubos de PFA (Savillex, Eden Prairie, EUA) por evaporação do solvente usando um fluxo de nitrogênio gasoso. Os tubos foram mantidos sob vácuo moderado durante 90 min para eliminar o solvente orgânico residual e posteriormente hidratados com 100  $\mu\text{L}$  de solução tampão (PIPES<sup>3</sup> 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) a 45 °C. Os SUV's foram formados através da sonicação da suspensão de MLV's durante 60 min a 45 °C. Logo após, 60  $\mu\text{L}$  da solução de SUV's foi adicionada a um substrato de mica (Asheville-Schoonmaker Mica Co., Newport News, EUA) previamente introduzido em uma célula especial (*BioCell*) para microscopia de força atômica de amostras líquidas (JPK Instruments, Berlim, Alemanha). Em seguida, foram adicionados a *BioCell* 60  $\mu\text{L}$  de solução tampão contendo  $\text{CaCl}_2$  e 60  $\mu\text{L}$  de solução tampão sem  $\text{CaCl}_2$  e a solução final foi lentamente aquecida até 45 °C (1 °C/min). A concentração final de lipídio foi de 0,17 mM. Após 30 min a 45 °C a temperatura da *BioCell* foi ajustada para a temperatura ambiente (22-24 °C) e as SPB's foram equilibradas a esta temperatura durante 30 min. Os SUV's não adsorvidos foram eliminados através de repetidas trocas de solução tampão (sem  $\text{CaCl}_2$ ). A incorporação da AURORA-DSG nas amostras foi realizada através da adição das soluções de lipídios sobre os filmes de AURORA previamente preparados. As soluções resultantes foram cuidadosamente agitadas durante 2 min antes de serem evaporadas pelo fluxo de nitrogênio gasoso. A concentração final de AURORA-DSG em cada amostra foi de 0,1 mol%.

## 7.2.8 Microscopia de Força Atômica

Os experimentos de microscopia de força atômica (AFM) foram realizados em um microscópio NanoWizard II (JPK Instruments, Berlim, Alemanha) equipado com cantilêveres e pontas de nitreto de silício (raio nominal  $\sim 20$  nm) modelo MLCT (Bruker AFM Probes, Camarillo, EUA). O valor para a constante de mola usado nas medidas em modo contato (deflexão vertical do cantilêver constante) foi de 0,1-0,5 N/m. As imagens medindo  $512 \times 512$  pixels foram adquiridas a uma taxa de varredura de 1 Hz ( $30 \times 30$ - $10 \times 10$   $\mu\text{m}$ ) ou 10 Hz ( $0,5 \times 0,5$

---

<sup>3</sup>Sigla para *Piperazine-N,N-bis(2-ethanesulfonic acid)*.

$\mu\text{m}$ ) e tratadas com o software JPK Data Processing (JPK Instruments).

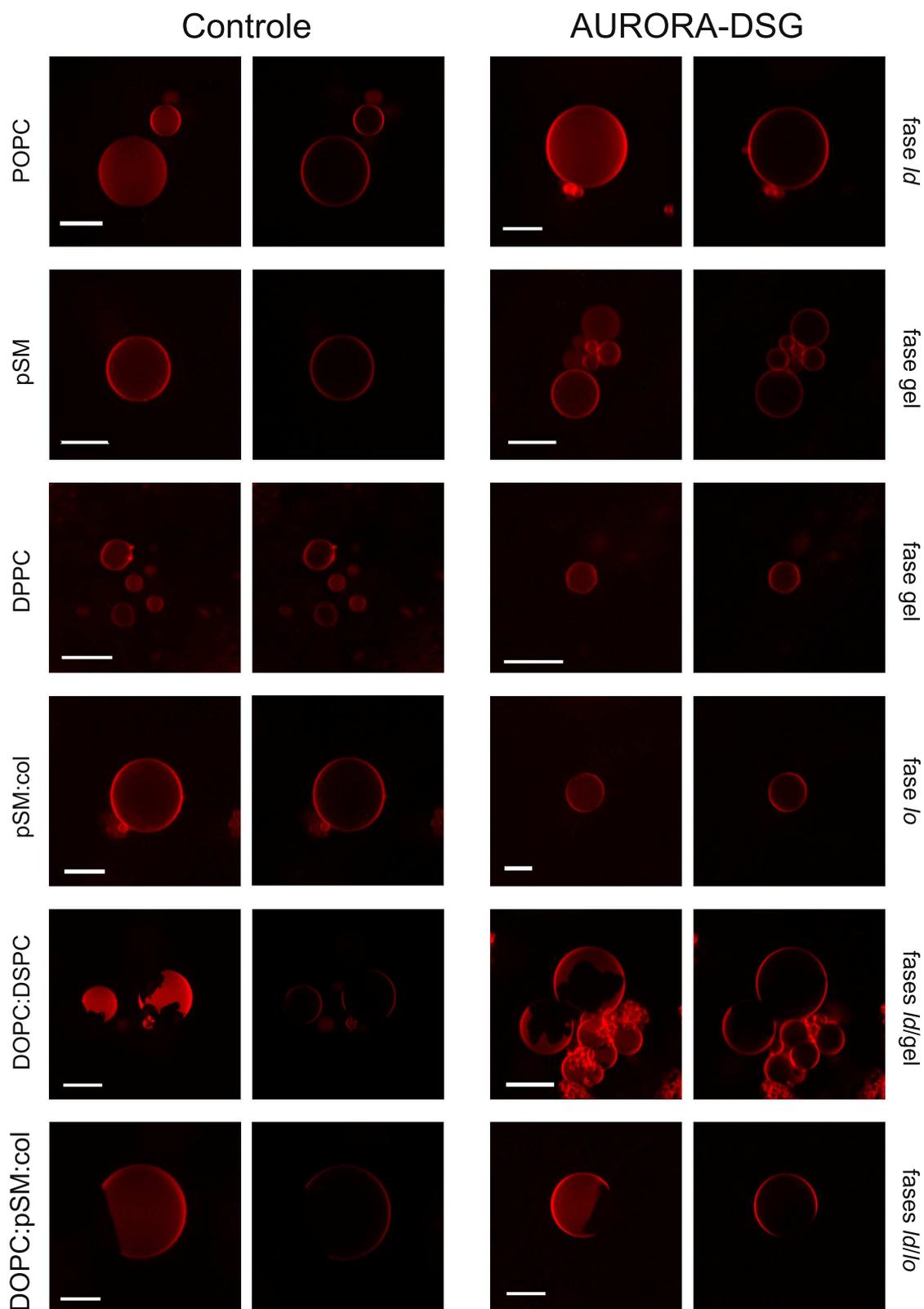
## 7.3 Resultados

### 7.3.1 Efeito da AURORA-DSG sobre a Morfologia dos Domínios Lipídicos

As amostras estudadas neste trabalho podem ser divididas em duas classes: a) homogêneas: POPC, pSM, DPPC e pSM:col (0,6:0,4); b) com domínios: DOPC:DSPC (1:1) e DOPC:pSM:col (2:1:1). Em temperatura ambiente, as amostras compostas de POPC se encontram na fase líquida-desordenada, as amostras compostas de pSM e DPPC se encontram na fase gel e as amostras compostas de pSM:col (0,6:0,4) se encontram na fase líquida-ordenada. Já as amostras compostas de DOPC:DSPC (1:1) se encontram nas fases líquida-desordenada (rica em DOPC)/gel (rica em DSPC) enquanto as amostras compostas por DOPC:pSM:col (2:1:1) se encontram nas fases líquida-desordenada (rica em DOPC)/líquida-ordenada (rica em pSM:col).

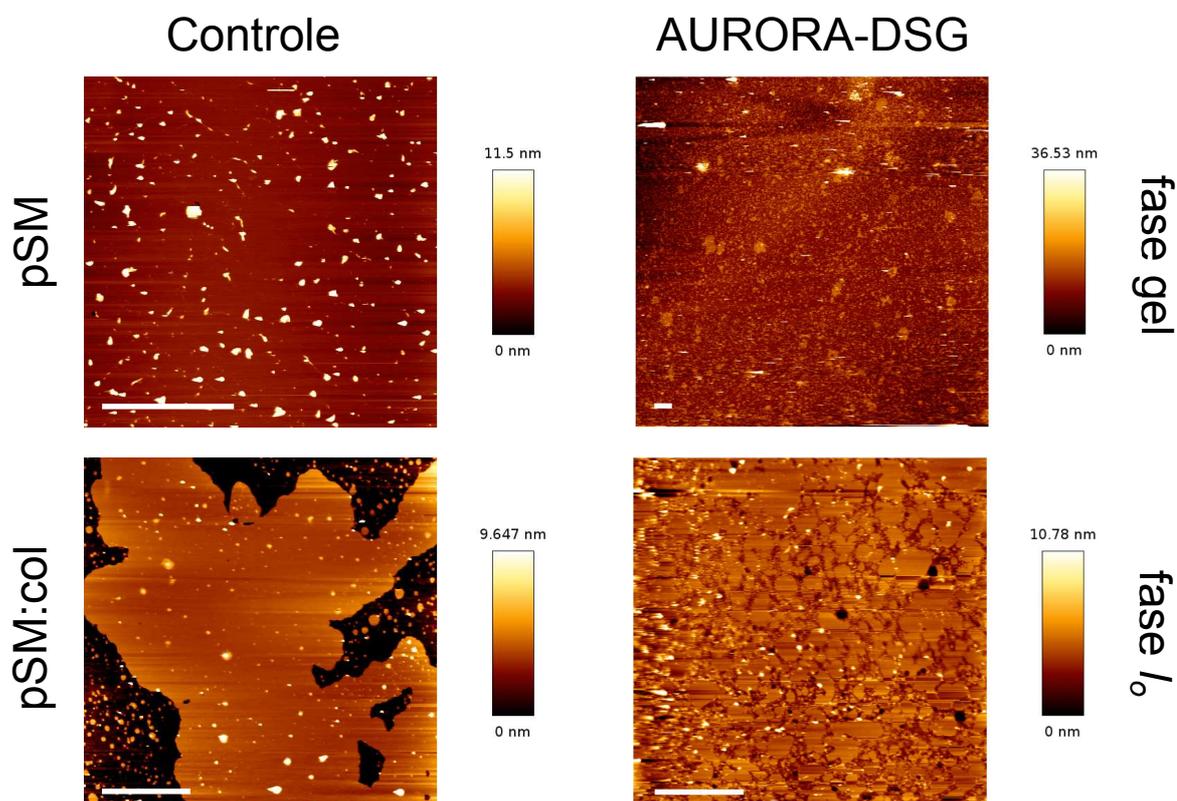
A Figura 7.2 mostra as imagens de microscopia confocal de GUV's compostas de POPC, pSM, DPPC, pSM:col (0,6:0,4), DOPC:DSPC (1:1) e DOPC:pSM:col (2:1:1) e marcadas com a sonda Liss-Rho-PE, a qual se particiona preferencialmente na mais fase fluida (ver apêndice E para mais informações) das vesículas. Desta maneira, as zonas negras de cada imagem representam os domínios lipídicos que se encontram nas fases gel ou líquida-ordenada. Note que a adição de 0,1% de AURORA-DSG não altera a morfologia das vesículas, ou em outras palavras, não induz a formação de domínios nas amostras homogêneas bem como não modifica a estrutura dos domínios pré-existentes.

Nas Figuras 7.3 e 7.4 estão apresentadas as imagens de microscopia de força atômica de SPB's compostas de POPC, DPPC, DOPC:DSPC (1:1), DOPC:pSM:col (2:1:1), pSM e pSM:col. Assim como no caso das GUV's a adição de 0,1% de AURORA-DSG parece não alterar de maneira significativa a morfologia das SPB's com exceção da amostra DOPC:pSM:col



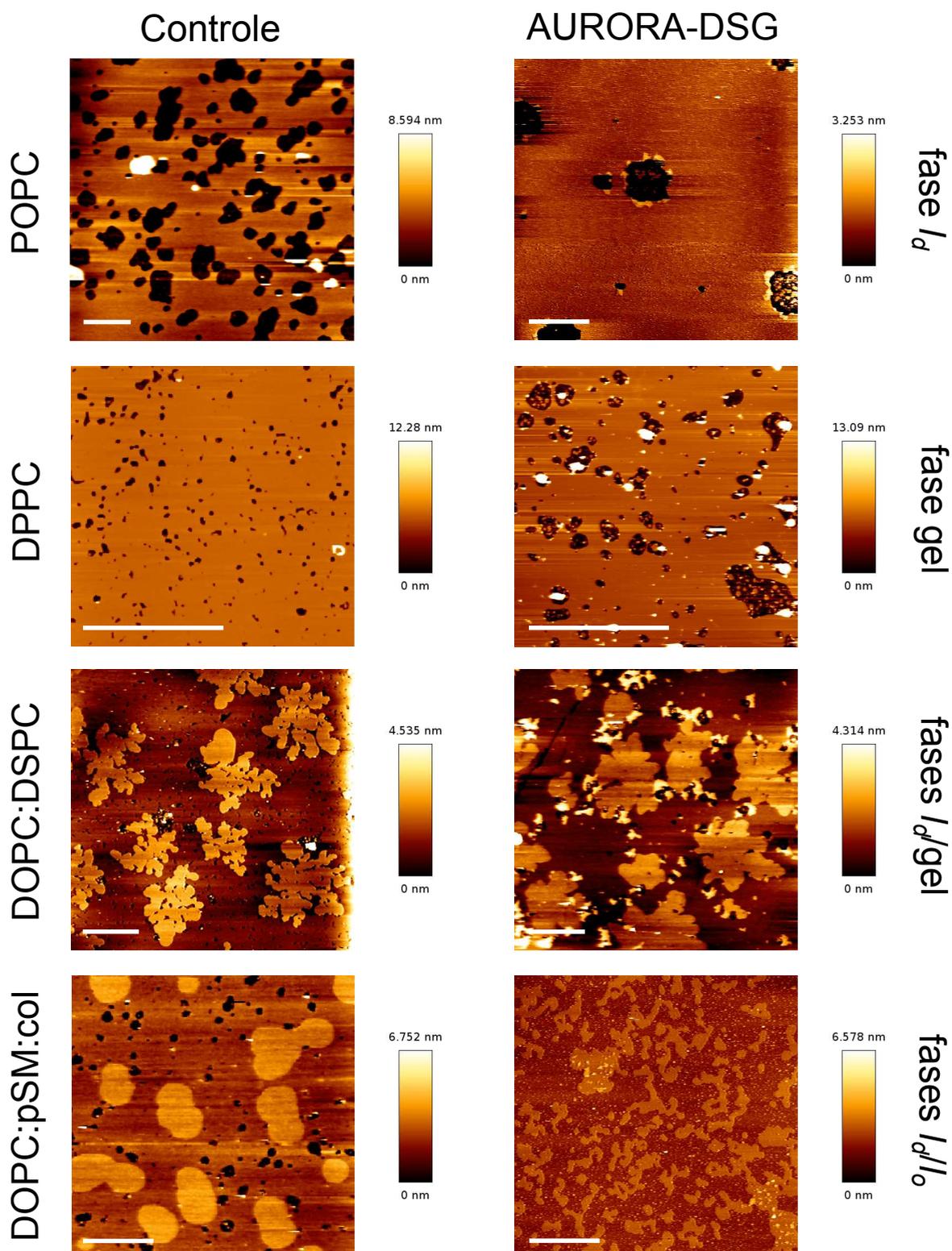
**Figura 7.2:** Micrografias de fluorescência de vesículas unilamelares gigantes marcadas com a sonda Liss-Rho-PE e compostas de POPC, pSM, DPPC, pSM:col (0,6:0,4), DOPC:DSPC (1:1) e DOPC:pSM:col (2:1:1). Os painéis esquerdos (imagem 3D e plano equatorial) mostram as imagens das amostras controle e os painéis direitos (imagem 3D e plano equatorial) das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente. A barra de escala equivale a 10  $\mu$ M.

onde a presença da AURORA-DSG faz com que os domínios de fase líquida-ordenada passem a ter formas mais irregulares.



**Figura 7.3:** Imagens topográficas de microscopia de força atômica de SPB's compostas de pSM e pSM:col (0,6:0,4). Os painéis esquerdos mostram as imagens das amostras controle e os painéis direitos das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG. As regiões negras representam o substrato de mica onde as bicamadas não foram adsorvidas. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente. A barra de escala equivale a 5  $\mu$ M.

Entretanto, para todas as amostras, a incorporação de AURORA-DSG nas SUV's leva a uma diminuição da extensão das bicamadas e a um acúmulo de agregados lipídicos. Para as SPB's compostas de pSM e pSM:col não foi possível preparar extensões de membranas suficientemente grandes e homogêneas para que se adquirir imagens confiáveis indicando que a incorporação da AURORA-DSG está interferindo na extensão destas amostras (Figura 7.3).



**Figura 7.4:** Imagens topográficas de microscopia de força atômica de SPB's compostas de POPC, DPPC, DOPC:DSPC (1:1) e DOPC:pSM:col (2:1:1). Os painéis esquerdos mostram as imagens das amostras controle e os painéis direitos das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG. Os domínios lipídicos são identificados por suas diferenças de altura (escala de cor). As regiões negras representam o substrato de mica onde as bicamadas não foram adsorvidas. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente. A barra de escala equivale a 5  $\mu$ M.

### 7.3.2 Visualização das Nanopartículas AURORA-DSG

Afim de visualizar as nanopartículas AURORA-DSG inseridas nas SPB's e estudar seu comportamento, para todas as amostras onde a extensão das bicamadas foi satisfatória, foram adquiridas imagens com  $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}$ . Nestas imagens foi possível identificar pequenas regiões reproduzíveis as quais possuíam maior altura quando comparadas com o restante das bicamadas (Figura 7.5). Como pode ser visto, há um maior número de eventos (presença de AURORA-DSG) nas SPB's que estão em fase líquida o que indica que as nanopartículas são incorporadas com maior facilidade na fase fluida. Devido a forma semi-esférica/cônica encontrada para as nanopartículas, estimar seu real diâmetro se torna uma tarefa difícil. Para tentar minimizar erros de medida, o diâmetro médio de cada nanopartícula foi adotado como sendo o diâmetro a meia altura visualizada na seção transversal das imagens. Na Figura 7.6 estão apresentadas as distribuições de alturas das nanopartículas AURORA-DSG como função de seus diâmetros médios (obtidos através do software JPK Data Processing).

A Figura 7.7 mostra os histogramas<sup>4</sup> construídos à partir dos valores obtidos para a altura das partículas AURORA-DSG em relação as SPB's. Os valores médios para a altura das AURORA-DSG incorporadas nas amostras de POPC, DPPC, DOPC:DSPC e DOPC:pSM:col calculados à partir do ajuste dos histogramas estão apresentados na Tabela 7.1. Como pode ser observado, a altura média das nanopartículas é menor para a fase líquida-desordenada.

Finalmente, na Figura 7.8 estão apresentados os valores da anisotropia da fluorescência da sonda DPH incorporada em MLV's compostas de POPC, pSM, DPPC e pSM:col. A adição de 0,1% de AURORA-DSG não provoca alterações significativas na fluidez das bicamadas que

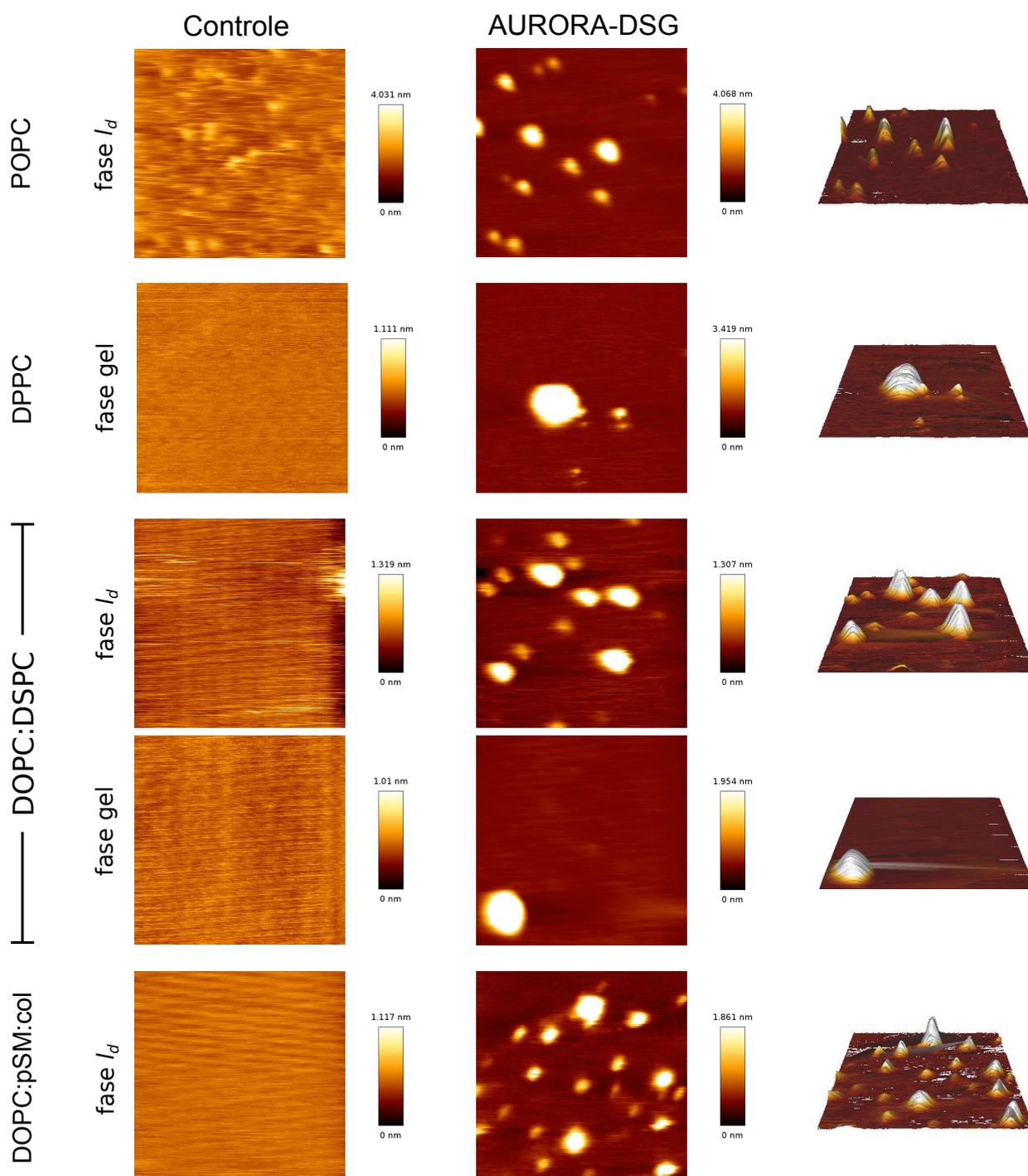
<sup>4</sup>Os histogramas foram construídos obedecendo o critério de Sturges [201], segundo o qual o conjunto  $n$  de medidas deve ser distribuído em  $k$  grupos representados no histograma como colunas, onde

$$k = 1 + 3,222 \log_{10}(n). \quad (7.2)$$

A largura de cada coluna é definida como a diferença entre os valores do maior e do menor elemento da contagem, dividido pelo inteiro superior mais próximo de  $k$ . Cada histograma foi ajustado pela distribuição lognormal [202]

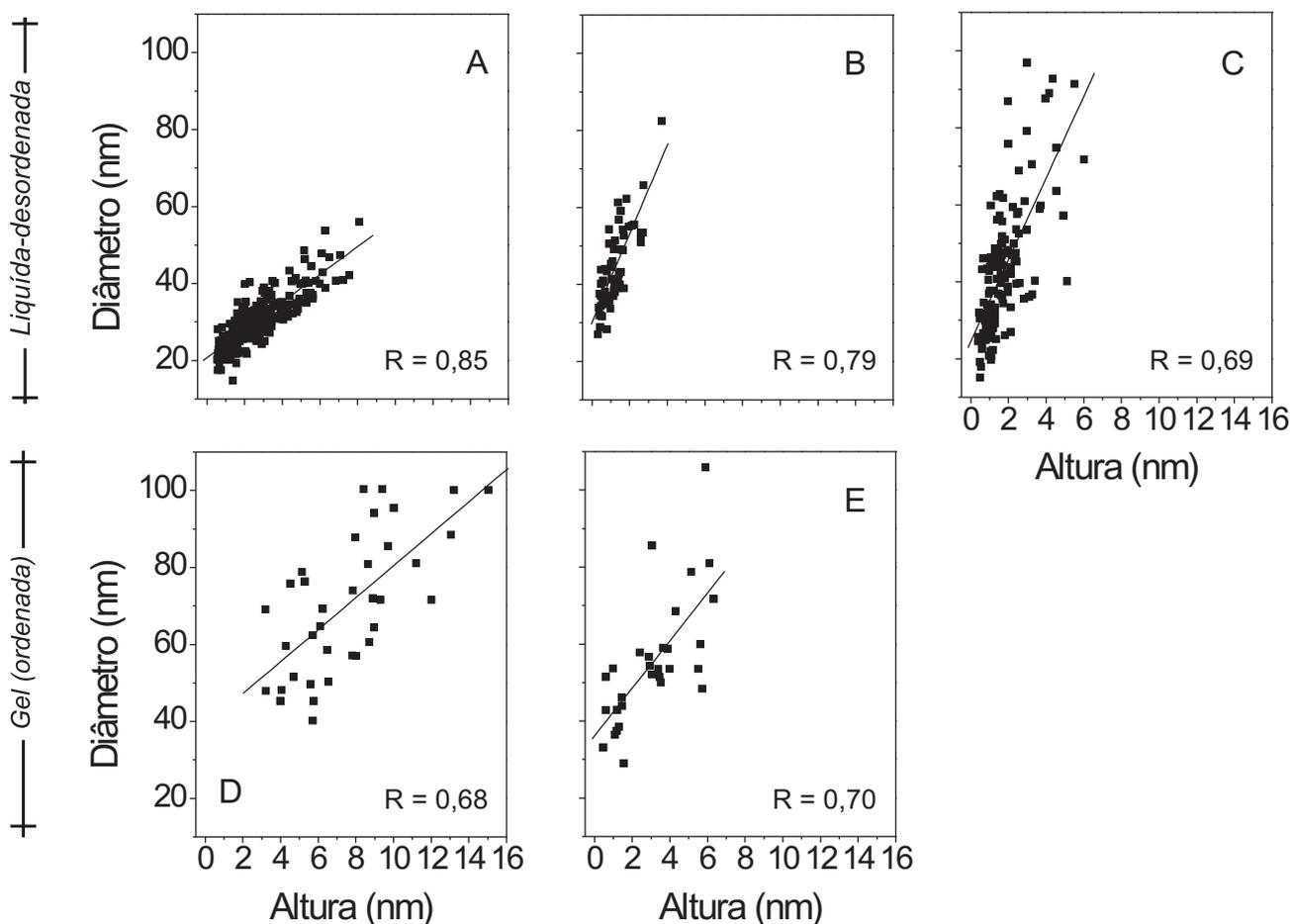
$$f(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}}, \quad (7.3)$$

onde  $0 < x < \infty$ ,  $0 < \sigma$  e  $\mu$  é real.



**Figura 7.5:** Imagens topográficas de microscopia de força atômica de SPB's compostas de POPC, DPPC, DOPC:DSPC e DOPC:pSM:col. Os painéis esquerdos mostram as imagens das amostras controle, os painéis centrais das amostras contendo 0,1 mol% de AURORA-DSG e os painéis direitos uma representação 3D dos painéis centrais. As partículas, em sua maioria, permaneceram estáveis durante o processo de aquisição da imagem. Por motivos técnicos não foi possível adquirir imagens da fase líquida-ordenada das amostras de DOPC:pSM:col. Todas as imagens foram adquiridas à temperatura ambiente e possuem  $0,5 \times 0,5 \mu\text{M}$ .

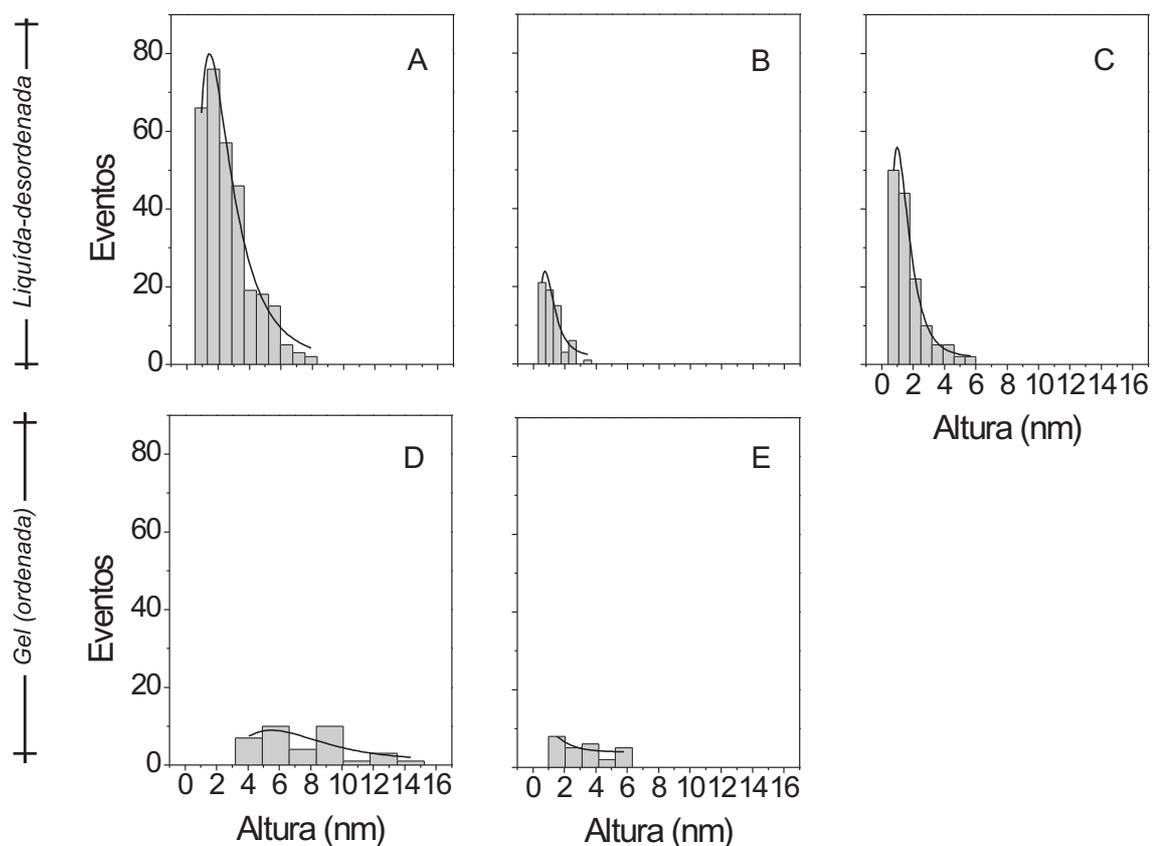
se encontram nas fases  $l_d$  e  $l_o$ . Por outro lado, para as membranas de DPPC e pSM (fase gel) a presença de AURORA-DSG provoca um ligeiro aumento e diminuição da fluidez das bicamadas respectivamente.



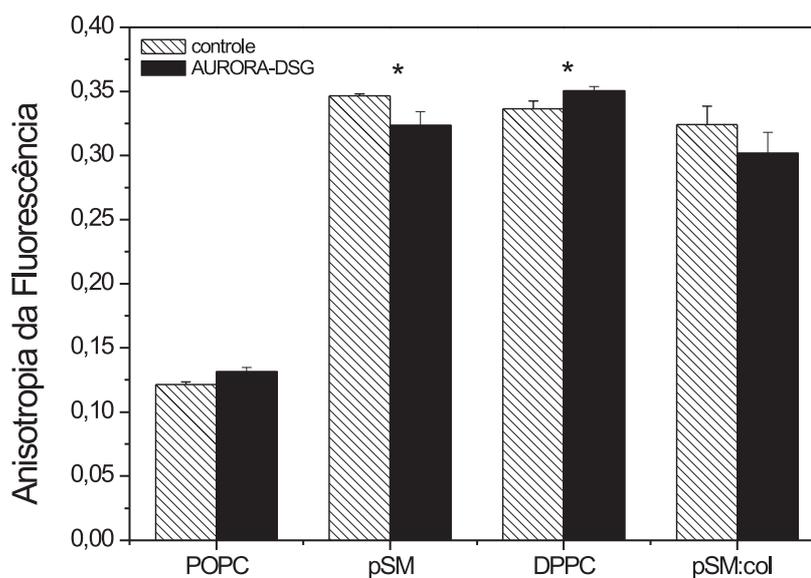
**Figura 7.6:** Distribuição dos diâmetros como função das alturas medidas através das imagens topográficas de AFM das nanopartículas AURORA-DSG introduzidas nas SPB's. O parâmetro R determina a correlação entre os valores encontrados para os diâmetros e para as alturas. Painéis: A, POPC; B, DOPC:DSPC (fase líquida-desordenada); C, DOPC:pSM:col (fase líquida-desordenada); D, DPPC; E, DOPC:DSPC (fase gel).

**Tabela 7.1:** Valores para a altura média das nanopartículas AURORA-DSG incorporadas nas SPB's encontrados à partir das distribuições mostradas nas Figura 7.7.

	Altura (nm)	
	fase $l_d$	fase gel
POPC	$2,87 \pm 1,25$	—
DPPC	—	$7,55 \pm 1,11$
DOPC:DSPC	$1,20 \pm 1,18$	$1,75 \pm 1,20$
DOPC:pSM:col	$1,55 \pm 1,17$	—



**Figura 7.7:** Histogramas e seus ajustes das alturas medidas através das imagens topográficas de AFM das nanopartículas AURORA-DSG introduzidas nas SPB's. Painéis: A, POPC; B, DOPC:DSPC (fase líquida-desordenada); C, DOPC:pSM:col (fase líquida-desordenada); D, DPPC; E, DOPC:DSPC (fase gel).



**Figura 7.8:** Anisotropia da fluorescência da sonda DPH incorporada em MLV's de POPC, pSM, DPPC e pSM:col. Foram adicionados as amostras 0,1 mol% de AURORA-DSG. O asterisco indica estatisticamente diferente a  $P < 0,05$  (teste Tukey).

## 7.4 Discussão

A separações laterais de fase  $l_o/l_d$  e  $l_d$ /gel estão bem caracterizadas em GUV's [33, 200, 203–206] e SPB's [207–211] para uma diversidade de composições lipídicas. Nossos resultados de microscopia confocal indicam que a incorporação de 0,1% de AURORA-DSG não afeta a estrutura morfológica das bicamadas, uma vez que as vesículas gigantes conservaram seus domínios pré-existentes e o surgimento de novos tipos de domínios também não foi verificado. No caso das SPB's a incorporação das nanopartículas parece não alterar de maneira substancial a topografia das bicamadas compostas por POPC, DPPC, DOPC:DSPC e DOPC:pSM:col. Curiosamente, as SPB's compostas de pSM e pSM:col não apresentaram o mesmo comportamento. Como discutido por Lawrence e co-autores [212], a alta concentração de colesterol (próximas de 50 %) impedem a formação de SPB's com uma reprodutibilidade adequada (apesar disto não ser verificado para o caso de monocamadas) para o estudo de AFM. Este fato pode explicar a baixa adsorção de nossas amostras de pSM:col, sobretudo da amostra controle. Entretanto, no caso da amostras de pSM e pSM:chol onde a AURORA-DSG foi incorporada, parece haver uma interação preferencial entre as partículas de AURORA-DSG e as moléculas de pSM, a qual não pode ser completamente explicada neste momento, que impossibilita a adsorção dos SUV's e impede seu estudo por AFM. Além disso, aparentemente esta interação não está associada a rigidez das bicamadas de pSM, uma vez que para SPB's compostas de DPPC, as quais apresentam uma rigidez similar as das SPB's de pSM, foi possível realizar uma extensão satisfatória.

De acordo com os resultados para a anisotropia da fluorescência da sonda DPH, a presença das nanopartículas AURORA-DSG não provocam alterações significativas na fluidez das amostras em fase fluída. Por outro lado, alterações na dinâmica das membranas em fase gel (DPPC e pSM) são verificadas e mais uma vez uma interação entre a AURORA-DSG e as moléculas de pSM pode ser observada. Recentemente, tem sido reportado interações preferenciais entre a pSM e ceramidas de diferentes tamanhos de cadeia. Neste tipo de interação,

a afinidade da hidroxila da parte polar da ceramida pelo grupo amida das moléculas de pSM é tão alta que excluí as moléculas de colesterol que interagem com a pSM para formar domínios de fase líquida-ordenada dando origem a um novo tipo de domínio com maior rigidez [30, 213–215]. Uma interação similar pode ser a origem das alterações provocadas pela inserção das nanopartículas nas membranas compostas de pSM, uma vez que a parte lipídica das AURORA-DSG possui um possível grupo amida (não detalhado pelo fabricante) o qual poderia estar interagindo fortemente com o grupo amida da pSM. Contudo, ao que tudo indica, a baixa concentração de AURORA-DSG não é suficiente para promover um efeito macroscópico sobre os domínios das amostras estudadas neste trabalho. Mesmo que a forma dos domínios  $l_o$  das SPB's compostas de DOPC:pSM:col-AURORA tenham formas distintas da amostra controle, nossos dados não são conclusivos e mais experimentos devem ser realizados afim de esclarecer a interação AURORA-pSM.

Entretanto, ficou demonstrado que as nanopartículas AURORA-DSG se inserem nas SPB's compostas pelas diferentes composições lipídicas. Devido a dimensão das nanopartículas AURORA, os dados relacionados com o diâmetro médio das partículas obtidos através das imagens de AFM poderiam estar afetados pelo efeito da convolução da ponta. No entanto, em nossos experimentos, os valores encontrados para a altura das partículas foi sempre inferior a 15 nm, enquanto a sobrevalorização introduzida pela convolução da ponta na imagem gera medidas entre 15 e 22 nm (considerando um diâmetro médio para a parte metálica da nanopartícula entre 1,4 e 3 nm e assumindo o raio nominal da ponta igual a 20 nm, como indicado pelo fabricante, ver apêndice E para maiores informações). Note que o diâmetro (Figura 7.6A) associado ao valor de altura média (2,87 nm) encontrada para as amostras de POPC é  $\sim 30$  nm, o que ajuda a validar nossos dados. Mesmo que diâmetros maiores do que 20 nm tenham sido encontrados e que as dimensões reais das nanopartículas quando inseridas nas SPB's não possam ser determinadas de maneira precisa, a diferença de inserção das nanopartículas entre as fases  $l_d$  e gel é evidente. A dependência linear encontrada entre as alturas e os diâmetros médios obtidos através das imagens de AFM, indica que as nanopartículas estão inseridas nas SPB's sempre com a mesma

orientação/perfil e diferem apenas em seu grau de inserção nas bicamadas. Este resultado é importante pois exclui a possibilidade das regiões observadas serem artefatos experimentais, uma vez que possíveis agregados lipídicos responsáveis pelas diferenças topográficas encontradas nas imagens de AFM teriam formas irregulares e orientações aleatórias.

## 7.5 Conclusões

Os resultados deste trabalho mostram que a adição de 0,1% de AURORA-DSG não provoca mudanças morfológicas substanciais em bicamadas lipídicas homogêneas ou com domínios lipídicos, bem como não produz grandes variações em sua fluidez. Além disso, ficou demonstrado que a AURORA-DSG se incorpora melhor em membranas que estão em fase fluída. Desta maneira, nossos resultados sugerem que a AURORA-DSG pode ser usada como agente de contraste em imagens de microscopia eletrônica de membranas lipídicas sem provocar efeitos colaterais associados.

Capítulo **8**

**Conclusões Gerais**

---

Este trabalho descreveu possíveis mecanismos da interação de diferentes tipos de terpenos com as membranas lipídicas, os quais são responsáveis por seu papel como facilitadores da permeação. Através das espectroscopias de ressonância paramagnética eletrônica e de fluorescência fomos capazes de demonstrar que

- os terpenos podem atuar como espaçadores ou extratores lipídicos e que sua capacidade de atuar como extratores lipídicos não está relacionada somente com sua capacidade de afetar a rede de ligações de hidrogênio dos grupos polares das bicamadas mas também com sua habilidade de formar estruturas micelares com uma hidrofobicidade suficiente para competir pelos lipídios das membranas;
- quando inseridos nas membranas lipídicas, os terpenos aumentam sua fluidez e reduzem a temperatura da transição de fase das bicamadas;
- os monoterpenos estudados não apresentam diferenças entre si em sua capacidade de aumentar a dinâmica de membranas lipídicas, mas que mudanças significativas são vistas quando eles são comparados com o sesquiterpeno nerolidol;
- os processos envolvidos no ataque dos terpenos às membranas de eritrócito e de fibroblastos não são completamente independentes.

Além disso, este trabalho apresentou os primeiros resultados sobre a interação da nanopartícula de ouro conjugada AURORA-DSG desenvolvida pela Avanti Polar Lipids Inc. para aumentar o contraste das bicamadas lipídicas em imagens de microscopia eletrônica. Através das microscopias confocal e de força atômica e da espectroscopia de fluorescência fomos capazes de demonstrar que a adição de 0,1% de AURORA-DSG

- não provoca mudanças morfológicas substanciais em bicamadas lipídicas homogêneas ou com domínios lipídicos;
- não provoca grandes variações na dinâmica das bicamadas lipídicas;

sugerindo então que essas nanopartículas podem ser usadas como agente de contraste em imagens de microscopia eletrônica de membranas lipídicas sem provocar efeitos colaterais associados.

Capítulo **9**

**Perspectivas**

---

Com base nos resultados obtidos sobre a interação de terpenos com as diversas membranas lipídicas estudadas nesta tese, nossas principais perspectivas a cerca deste tema são

- estudar a interação de terpenos com as membranas de parasitos tais como o *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da tripanossomíase) para determinar seus possíveis efeitos antiparasitários e os respectivos mecanismos de ação;
- estudar a interação de terpenos com as membranas de linhagens de células cancerígenas para determinar seus possíveis efeitos antitumorais e os respectivos mecanismos de ação;
- usar a metodologia desenvolvida nesta tese para o estudo do estrato córneo (EC) por meio da espectroscopia de fluorescência para estudar os efeitos de terpenos sobre a partição de porfirinas utilizadas na terapia fotodinâmica nas membranas do EC.

No que diz respeito aos resultados obtidos sobre a interação das nanopartículas 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-(Nanopartículas Aurora) (AURORA-DSG) com bicamadas lipídicas, nossas principais perspectivas são

- elucidar a possível interação da AURORA-DSG com a N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (pSM) e com outros lipídios de mesma estrutura;
- avaliar os efeitos da inserção da AURORA-DSG em membranas celulares tais como a membrana de eritrócito.

Apêndice 

## Interações Magnéticas

---

Para construir um hamiltoniano que represente melhor os sistemas estudados neste trabalho por meio da ressonância de spin eletrônico, devemos levar em conta uma série de interações magnéticas que ocorrem em nossas amostras. Elas podem ser intra- ou intermoleculares e se manifestar dependendo da natureza do sistema ou do meio no qual as moléculas paramagnéticas estão inseridas. As interações intermoleculares não são desejadas e podem ser evitadas pelo uso de amostras nas quais as moléculas paramagnéticas estejam suficientemente diluídas na matriz diamagnética. Contudo, a alta sensibilidade dos espectrômetros e a possibilidade de se trabalhar com amostras concentradas garantem uma boa detecção do sinal de RPE.

Já as interações magnéticas inerentes a espécies paramagnéticas, são as responsáveis pela estrutura complexa de seu espectro. A seguir, vamos discutir em detalhes as principais interações observadas nos espectros obtidos através do método dos marcadores de spin (Zeeman, com o campo de micro-ondas e hiperfina) e construir um hamiltoniano adequado para nossas finalidades.

## A.1 Interação Zeeman

A interação Zeeman surge da interação entre o spin eletrônico e o campo magnético estático aplicado. O hamiltoniano de um elétron de carga  $e$  ( $e$  negativa) sob ação de um campo externo  $\mathbf{H}$  pode ser escrita como [216]

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2m} \left( \mathbf{p} - \frac{e}{c} \mathbf{A} \right)^2 + V_0 + \lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S} + 2\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S}, \quad (\text{A.1})$$

onde  $\mathbf{A}$  é o potencial vetor associado com o campo magnético estático aplicado  $\mathbf{H}$ ,  $V_0$  é o potencial do “átomo livre”,  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  é o termo de acoplamento spin-órbita e  $2\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S}$  representa o acoplamento do momento de spin eletrônico e o campo externo aplicado. Estamos usando  $\lambda$  para representar a constante de acoplamento spin-órbita e  $\beta_e$  para expressar o momento magnético eletrônico. O magneton de Bohr está relacionado com  $\gamma_e$ , a razão giromagnética do

elétron e com  $\mu$ , o momento de dipolo magnético de spin, através da equação

$$\boldsymbol{\mu} = -\gamma_e \hbar \mathbf{S} = -2\beta_e \mathbf{S} \quad \text{ou} \quad \gamma_e \hbar = 2\beta_e. \quad (\text{A.2})$$

O sinal negativo representa o fato de que o spin e o momento são diretamente opostos.

Expandindo o primeiro termo do lado direito da Equação (A.1) temos

$$\frac{1}{2m} \left( \mathbf{p} - \frac{e}{c} \mathbf{A} \right)^2 = \frac{p^2}{2m} - \frac{e}{2mc} (\mathbf{p} \cdot \mathbf{A} + \mathbf{A} \cdot \mathbf{p}) + \frac{e^2}{2mc^2} A^2. \quad (\text{A.3})$$

É conveniente explicitar que na notação aqui apresentada o potencial vetor é definido como

$$\mathbf{A} = \frac{1}{2} \mathbf{H} \times \mathbf{r}, \quad (\text{A.4})$$

que nos leva a

$$\frac{1}{2m} \left( \mathbf{p} - \frac{e}{c} \mathbf{A} \right)^2 = \frac{p^2}{2m} - \frac{e\hbar}{2mc} \mathbf{H} \cdot \mathbf{L} + \frac{e^2}{8mc^2} H^2 (x'^2 + y'^2) \quad (\text{A.5})$$

onde, como é usual,  $\mathbf{L} = -i\hbar \mathbf{r} \times \nabla$ , e onde os eixos  $x'$  e  $y'$  são perpendiculares a direção do campo  $z'$  (estamos distinguindo a direção do campo  $z'$  e o eixo cristalino  $z$ ). O termo proporcional a  $H^2$  nos dá o diamagnetismo usual. Ele acaba por ser irrelevante, quando comparado com o termo  $\mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$ , na influência sobre a ressonância de spin eletrônico. Utilizando o fato de que  $\beta_e = e\hbar/2mc$ , temos o hamiltoniano

$$\mathcal{H} = \frac{p^2}{2m} + \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L} + V_0 + \lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S} + 2\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S}. \quad (\text{A.6})$$

Vamos considerar que os principais termos de energia são os termos cinético e o potencial do “átomo livre”  $V_0$ . Sendo assim, vamos tratar os termos  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  e  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  usando o método de teoria de perturbação. Para isso, iremos usar os três estados degenerados do orbital tipo  $p$   $xf(r)$ ,  $yf(r)$  e  $zf(r)$ , os quais são solução do potencial do átomo livre, para denotar funções de onda do tipo  $xf(r)u_m$ ,  $yf(r)u_m$  e  $zf(r)u_m$ , onde as funções  $u_m$  são funções de spin. Se não existir acoplamento spin-órbita<sup>1</sup>, o spin será quantizado independentemente do orbital,

<sup>1</sup>Ao examinar o tipo de elementos de matriz que os termos  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  e  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  possuem, encontramos dois tipos: aqueles que conectam o mesmo orbital, e aqueles que conectam orbitais diferentes. Temos então, elementos de

de forma que as funções  $u_m$  serão autofunções do operador  $\hat{S}_{z'}$  onde  $z'$  é a direção do campo magnético aplicado.

Temos então, uma função de onda modificada<sup>2</sup>  $\psi_{xm}$  [217]

$$\psi_{xm} = xf(r)u_m + \sum_{m'} \sum_{\omega=y,z} \frac{\langle \omega m' | \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L} | xm \rangle}{E_x - E_\omega} \omega f(r) u_{m'}. \quad (\text{A.7})$$

Como  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  não depende do spin,  $m' = m$ . Escrevendo  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  na forma de componentes, encontramos

$$\psi_{xm} = \left[ xf(r) + \sum_{\omega=y,z} \sum_{q=x,y,z} \frac{\langle \omega | L_q | x \rangle}{E_x - E_\omega} \beta_e H_q \omega f(r) \right] u_m. \quad (\text{A.8})$$

Agora usamos esta função de onda corrigida para calcular os elementos da matriz de  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$ , que envolvem o estado fundamental do orbital. Na verdade, existem elementos de matriz para o estado excitado, que em segunda ordem podem retornar para o estado fundamental. No entanto, esses estados não envolvem o campo aplicado  $H$  [216]. Ao negligenciá-los, estamos encontrando a energia de acoplamento dependente do campo

$$\int \psi_{xm'}^* \lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S} \psi_{xm} d\tau d\tau_S = \lambda \sum_{\omega=y,z} \sum_{q,q'=x,y,z} \frac{\langle m' | S_{q'} | m \rangle [\langle x | L_{q'} | \omega \rangle \langle \omega | L_q | x \rangle + \langle x | L_q | \omega \rangle \langle \omega | L_{q'} | x \rangle] H_q}{E_x - E_\omega}. \quad (\text{A.9})$$

Para computar os elementos de matriz internos do estado fundamental orbital, basta

---

matriz tais como [216]

$$\int xf(r)u_m^* \beta_e H_z L_z xf(r)u_{m'} d\tau d\tau_S \quad \text{ou}$$

$$\int xf(r)u_m^* \lambda L_z S_z xf(r)u_{m'} d\tau d\tau_S$$

onde  $d\tau$  representa uma integral sobre as coordenadas espaciais e  $d\tau_S$  sobre as variáveis de spin. Podemos notar que as integrais acima envolvem

$$\int xf(r)L_z xf(r)d\tau.$$

Usando a expressão  $L_z = -i\hbar \left( x \frac{\partial}{\partial y} - y \frac{\partial}{\partial x} \right)$  [217] e o fato de que as funções  $xf(r)$  são funções reais, percebemos que a integral acima deve ser nula, o que leva a supressão do momento angular orbital. Portanto, os únicos elementos de matriz que não desaparecem dos termos  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  e  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  conectam estados que diferem em energia orbital.

<sup>2</sup>Os termos  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  e  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  não apresentam contribuição de primeira ordem [216]. Em segunda, e ordens mais elevadas, ambos os termos perturbam a função de onda. Vamos tratar primeiramente do efeito de  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  sobre a função de onda. Pode parecer mais sensato tomar o termo  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  em primeiro lugar. Entretanto, como veremos a seguir, a expressão final envolve uma aproximação que é proporcional ao produto  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  e  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  (que é a interação entre as duas energias que causam o efeito). Sendo assim, é irrelevante qual a interação usamos para perturbar a função de onda.

substituir os termos  $\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{L}$  e  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$  por um termo efetivo no hamiltoniano ( $\mathcal{H}_{ef}$ )

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{ef} &= \sum_{q,q'} S_q H_{q'} \lambda \beta_e \sum_{\omega} \left[ \frac{\langle x|L_q|\omega\rangle \langle \omega|L_{q'}|x\rangle + \langle x|L_{q'}|\omega\rangle \langle \omega|L_q|x\rangle}{E_x - E_{\omega}} \right] \\ &= \beta_e \sum_{q,q'} S_q a_{qq'} H_{q'}. \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

Uma vez que os elementos de matriz que compõem  $a_{qq'}$  são transformados sobre rotações coordenadas como  $L_q$  e  $L_{q'}$ , os  $a_{qq'}$  são identificados como componentes de um tensor de segunda ordem. Uma análise da Equação (A.10) mostra que se trata de um tensor simétrico ( $a_{qq'} = a_{q'q}$ ).

Para nosso caso particular podemos computar os elementos de matriz dos operadores

$$L_x = -i\hbar \left( y \frac{\partial}{\partial z} - z \frac{\partial}{\partial y} \right), \quad L_y = -i\hbar \left( z \frac{\partial}{\partial x} - x \frac{\partial}{\partial z} \right) \quad \text{e} \quad L_z = -i\hbar \left( x \frac{\partial}{\partial y} - y \frac{\partial}{\partial x} \right). \quad (\text{A.11})$$

Usando as três expressões acima, encontramos

$$L_x x f(r) = 0, \quad L_y x f(r) = -i\hbar z f(r) \quad \text{e} \quad L_z x f(r) = i\hbar y f(r). \quad (\text{A.12})$$

Desta forma, os elementos de matriz de  $L_x$  desaparecem, os de  $L_y$  conectam-se apenas com o estado  $z f(r)$ , e os de  $L_z$  conectam-se apenas com  $y f(r)$ . Isto nos dá contribuições apenas para os termos onde  $q = q'$ . Isto é, os eixos  $x, y, z$  são os eixos principais do tensor  $a_{qq'}$ . Usando (A.11) e (A.12) temos,

$$\mathcal{H}_{ef} = 2\beta_e \left( \frac{\lambda}{E_x - E_z} S_y H_y + \frac{\lambda}{E_x - E_y} S_z H_z \right). \quad (\text{A.13})$$

Combinando este resultado com o termo Zeeman  $2\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S}$ , obtemos um hamiltoniano de spin para o estado fundamental orbital na forma

$$\mathcal{H}_Z = \beta_e (g_{xx} H_x S_x + g_{yy} H_y S_y + g_{zz} H_z S_z), \quad (\text{A.14})$$

onde

$$g_{xx} = 2, \quad g_{yy} = 2 \left( 1 - \frac{\lambda}{E_z - E_x} \right), \quad g_{zz} = 2 \left( 1 - \frac{\lambda}{E_y - E_x} \right). \quad (\text{A.15})$$

Podemos empregar a notação diádica  $\mathbf{g}$ , definida por

$$\mathbf{g} = g_{xx} \mathbf{i} + g_{yy} \mathbf{j} + g_{zz} \mathbf{k}, \quad (\text{A.16})$$

para escrever a interação como

$$\mathcal{H}_Z = \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} \quad (\text{A.17})$$

no lugar de

$$\mathcal{H}_Z = 2\beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S}. \quad (\text{A.18})$$

Comparando as Equações (A.17) e (A.18) percebemos que o efeito combinado do acoplamento spin-órbita e da energia Zeeman é substituir o campo real  $\mathbf{H}$  por um campo efetivo  $\mathbf{H}_{\text{ef}}$  dado por

$$\mathbf{H}_{\text{ef}} = \frac{\mathbf{H} \cdot \mathbf{g}}{2} = H_x \frac{g_{xx}}{2} \mathbf{i} + H_y \frac{g_{yy}}{2} \mathbf{j} + H_z \frac{g_{zz}}{2} \mathbf{k} \quad (\text{A.19})$$

e com ressonância dada por

$$\mathcal{H}_Z = 2\beta_e \mathbf{H}_{\text{ef}} \cdot \mathbf{S}. \quad (\text{A.20})$$

Como  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  e  $g_{zz}$  são em geral diferentes, o campo efetivo difere do campo real aplicado tanto em magnitude quanto em direção. Se denotarmos  $z''$  como sendo a direção do campo efetivo, fica evidente que a transformação de coordenadas irá colocar (A.20) na forma

$$\mathcal{H}_Z = 2\beta_e H_{\text{ef}} S_{z''}, \quad (\text{A.21})$$

onde  $H_{\text{ef}}$  é a magnitude do campo  $\mathbf{H}_{\text{ef}}$ . A frequência de ressonância  $\nu_0$  portanto, satisfaz a condição

$$\begin{aligned} h\nu_0 &= 2\beta_e H_{\text{ef}} \\ &= \beta_e \sqrt{H_x^2 g_{xx}^2 + H_y^2 g_{yy}^2 + H_z^2 g_{zz}^2} \\ &= \beta_e H \sqrt{\alpha_1^2 g_{xx}^2 + \alpha_2^2 g_{yy}^2 + \alpha_3^2 g_{zz}^2}, \end{aligned} \quad (\text{A.22})$$

onde  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  são os cossenos dos ângulos entre  $\mathbf{H}$  e os eixos  $x, y, z$ . Geralmente podemos escrever (A.22) como

$$h\nu_0 = g\beta_e H, \quad (\text{A.23})$$

onde o fator  $g$  é definido pela equação

$$g = \sqrt{\alpha_1^2 g_{xx}^2 + \alpha_2^2 g_{yy}^2 + \alpha_3^2 g_{zz}^2}. \quad (\text{A.24})$$

As Equações (A.23) e (A.24) enfatizam o fato de que para uma dada orientação de  $\mathbf{H}$ , o desdobramento dos estados de spin é diretamente proporcional a magnitude de  $\mathbf{H}$ . À partir de (A.15) e (A.24) e reconhecendo que ambas  $E_z - E_x$  e  $E_y - E_x$  são positivas, vemos que valores positivos de  $\lambda$  fazem  $g$  menor ou igual a 2, enquanto valores negativos de  $\lambda$  fazem  $g$  maior ou igual a 2 ( $g = 2$  para o elétron livre).

## A.2 Interação com o Campo de Micro-ondas

Em adição ao efeito do campo magnético estático, o qual determina a separação dos níveis Zeeman, devemos considerar a presença do campo de micro-ondas, o qual é responsável pelas transições de RPE. O campo magnético associado com a radiação oscilante ao longo do eixo  $x$  perpendicular a direção do campo principal aplicado, tem componentes

$$H_{1x} = H_1 \cos \omega t, \quad H_{1y} = H_{1z} = 0. \quad (\text{A.25})$$

O hamiltoniano correspondente a interação com o momento magnético de spin, negligenciando por simplicidade a anisotropia do fator  $g$  é

$$\mathcal{H}' = g\beta_e H_1 S_x \cos \omega t. \quad (\text{A.26})$$

Como  $H_1$  é muito menor do que o campo principal  $H$  (é normalmente da ordem de alguns miligauss para evitar o fenômeno de saturação),  $\mathcal{H}'$  pode ser tratada com uma perturbação dependente do tempo nos autoestados de  $\mathcal{H}_Z$ . Para isto, escrevemos a função de onda dependente do tempo como

$$|\psi(t)\rangle = \sum_n c_n(t) |\alpha\rangle, \quad (\text{A.27})$$

com

$$c_n(t) = b_n(t) e^{iE_n t/\hbar}. \quad (\text{A.28})$$

Usando a teoria de perturbação dependente do tempo, encontramos a aproximação de primeira ordem de  $b_n(t)$  através de [218]

$$b_n^{(1)}(t) = \frac{1}{i\hbar} \int_0^t e^{i\omega_{\alpha\alpha'} t'} A_{\alpha\alpha'}(t') dt', \quad (\text{A.29})$$

com  $\omega_{\alpha\alpha'} = \frac{E_\alpha - E_{\alpha'}}{\hbar}$  e  $A_{\alpha\alpha'} = \langle \alpha | \mathcal{H} | \alpha' \rangle$ . Substituindo (A.26) em (A.29) encontramos

$$\begin{aligned} b_n^{(1)}(t) &= \frac{1}{i\hbar} \int_0^t \langle \alpha | g_e \beta_e H_1 S_x \cos \omega t' | \alpha' \rangle e^{i\omega_{\alpha\alpha'} t'} dt' \\ &= \frac{g_e \beta_e H_1}{2i\hbar} \langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle \int_0^t e^{i\omega_{\alpha\alpha'} t'} \left[ e^{i\omega t'} + e^{-i\omega t'} \right] dt' \\ &= \frac{g_e \beta_e H_1}{2i\hbar} \langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle \left[ \frac{e^{i(\omega_{\alpha\alpha'} + \omega)t} - 1}{(\omega_{\alpha\alpha'} + \omega)} + \frac{e^{i(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t} - 1}{(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)} \right]. \end{aligned} \quad (\text{A.30})$$

Fazendo a aproximação<sup>3</sup>

$$2|\omega_{\alpha\alpha'}| \gg \Delta\omega \quad \text{ou} \quad t \gg \frac{1}{|\omega_{\alpha\alpha'}|} \simeq \frac{1}{\omega}, \quad (\text{A.31})$$

temos que

$$\begin{aligned} b_n^{(1)}(t) &= \frac{g_e \beta_e H_1}{2i\hbar} \langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle \frac{e^{i(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t/2}}{(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)} \left[ e^{i(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t/2} - e^{-i(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t/2} \right] \\ &= \frac{g_e \beta_e H_1}{\hbar} \langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle \frac{e^{i(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t/2}}{(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)} \text{sen} \left[ (\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t/2 \right]. \end{aligned} \quad (\text{A.32})$$

A probabilidade de transição  $\alpha \rightarrow \alpha'$  é dada então por

$$\begin{aligned} P_{\alpha\alpha'} &= |b_n^{(1)}(t)|^2 \\ &= \left( \frac{g_e^2 \beta_e^2 H_1^2 |\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle|^2}{\hbar^2} \right) \frac{\text{sen}^2 \left[ (\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)t/2 \right]}{(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega)^2} \\ &= \left( \frac{g_e^2 \beta_e^2 H_1^2 |\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle|^2}{\hbar^2} \right) F(t, \omega_{\alpha\alpha'} - \omega). \end{aligned} \quad (\text{A.33})$$

Utilizando a Regra de ouro de Fermi [218] temos que

$$\begin{aligned} \lim_{t \rightarrow \infty} F(t, \omega_{\alpha\alpha'} - \omega) &= \pi t \delta(\omega_{\alpha\alpha'} - \omega) \\ &= 2\pi \hbar t \delta(E_\alpha - E_{\alpha'} - \hbar\omega), \end{aligned} \quad (\text{A.34})$$

que nos leva a

$$P_{\alpha\alpha'} = \left( \frac{g_e^2 \beta_e^2 H_1^2 |\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle|^2}{\hbar^2} \right) 2\pi \hbar t \delta(E_\alpha - E_{\alpha'} - \hbar\omega). \quad (\text{A.35})$$

---

<sup>3</sup>Esta aproximação é válida apenas se a perturbação atua durante um tempo  $t$  o qual é suficientemente grande quando comparado a  $1/\omega$ . O significado físico desta aproximação é claro: durante o intervalo de tempo  $[0, t]$ , a perturbação deve executar numerosas oscilações para aparecer no sistema como uma oscilação senoidal. Se, por outro lado,  $t$  for pequeno comparado com  $1/\omega$  a perturbação não terá tempo para oscilar e será equivalente a uma perturbação variando linearmente no tempo, ou constante. Para uma perturbação constante a condição A.31 nunca será satisfeita, já que  $\omega = 0$  [218].

Assim, a taxa de transição por unidade de tempo  $p_{\alpha\alpha'}$  é

$$p_{\alpha\alpha'} = \left(\frac{2\pi}{\hbar}\right) g_e^2 \beta_e^2 H_1^2 |\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle|^2 \delta(E_\alpha - E_{\alpha'} - \hbar\omega), \quad (\text{A.36})$$

em que  $\delta$  é a função delta de Dirac, a qual impõe a condição  $E_\alpha - E_{\alpha'} = \hbar\omega$ . A condição para valores diferentes de zero de  $\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle$  é encontrada reescrevendo o operador de spin  $S_x$  em termos dos operadores de abaixamento e levantamento  $S_+$  e  $S_-$  [217]

$$S_\pm = S_x \pm iS_y, \quad S_x = \frac{1}{2}(S_+ + S_-). \quad (\text{A.37})$$

O efeito destes operadores nas funções de onda de spin é

$$S_\pm |S, m_s\rangle = [S(S+1) - m_s(m_s \pm 1)]^{\frac{1}{2}} |S, m_s \pm 1\rangle. \quad (\text{A.38})$$

Portanto, as transições irão acontecer apenas entre níveis de energia com separação igual a  $\Delta E = \hbar\omega$ , satisfazendo a regra de seleção  $\Delta m_s = \pm 1$ .

## A.3 Interação Hiperfina

Devemos considerar também a interação hiperfina, a qual surge do acoplamento do spin eletrônico com o spin nuclear de um núcleo próximo. A forma básica da interação pode ser diferenciada entre os estados tipo  $s$  e não  $s$  [216].

*estados  $s$*

$$\mathcal{H}_I = \frac{8\pi}{3} \gamma_e \gamma_n \hbar^2 \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \delta(\mathbf{r}). \quad (\text{A.39})$$

*estados não  $s$*

$$\mathcal{H}_I = \frac{\gamma_e \gamma_n \hbar^2}{r^3} \left[ \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^2}, \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \right]. \quad (\text{A.40})$$

com  $\gamma_n = \frac{e}{2m_p c} g_n = \frac{g_n \beta_n}{\hbar}$  onde  $\gamma_n$ ,  $\beta_n$  e  $g_n$  representam o fator giromagnético nuclear, o magneton nuclear e o fator de desdobramento espectroscópico nuclear respectivamente.

Considerando que o momento angular orbital é suprimido, notamos que na matriz hamiltoniana existirão elementos referentes ao acoplamento hiperfino semelhantes aos que conectavam estados de diferentes energias cristalinas descritos na Seção A.1. Negligenciando os

elementos que estão fora da diagonal, temos elementos tais como [216]

$$\langle xm_S m_I | \mathcal{H}_I | x m'_S m'_I \rangle = \int \phi_{m_I}^* u_{m_S}^* x f(r) \mathcal{H}_I \phi'_{m_I} u'_{m_S} x f(r) d\tau d\tau_S d\tau_I, \quad (\text{A.41})$$

em que  $m_S$  e  $m_I$  são os autovalores de  $S_z$  e  $I_z$ ;  $\phi_{m_I}$  e  $u_{m_S}$  são funções nucleares e eletrônicas respectivamente, e  $d\tau$  e  $d\tau_S$  representam integrações sobre coordenadas especiais e de spin eletrônico respectivamente; e finalmente  $d\tau_I$  representa uma integração sobre as coordenadas do spin nuclear. É conveniente deixar a especificação da quantização do spin eletrônico e do spin nuclear para depois, uma vez que os estados quânticos adequados dependerão de outras partes do hamiltoniano. Vamos então omitir as funções eletrônicas e nucleares de spin e suas integrações e computar apenas  $\int x f(r) \mathcal{H}_I x f(r) d\tau$ , denotada como

$$\mathcal{H}_{IS} = \int x f(r) \mathcal{H}_I x f(r) d\tau. \quad (\text{A.42})$$

Substituindo (A.40), obtemos

$$\mathcal{H}_{IS} = \gamma_e \gamma_n \hbar^2 \int \frac{1}{r^3} \left[ 3 \left( \frac{\mathbf{I} \cdot \mathbf{r}}{r^2} \right) (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) - \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \right] x^2 f^2(r) d\tau. \quad (\text{A.43})$$

Os termos tais como  $I_x x S_y y$  não irão contribuir, já que para eles, o integrando é uma função ímpar de  $x$  e  $y$ . Os outros termos podem ser expressos como o produto de integrais angulares e radiais, que levam a [216]

$$\mathcal{H}_{IS} = \gamma_e \gamma_n \hbar^2 \overline{\left( \frac{1}{r^3} \right)} \frac{2}{5} (3I_x S_x - \mathbf{I} \cdot \mathbf{S}), \quad (\text{A.44})$$

onde  $\overline{(1/r^3)}$  representa o valor médio de  $1/r^3$  sobre o estado  $x f(r)$ .

Se ao invés de um estado  $p$  tivermos um estado  $s$ , ou uma função de onda  $\psi$  que contem algum estado tipo  $s$ , podemos computar o termo  $\mathcal{H}_{IS}$  decorrente do acoplamento hiperfino como

$$\mathcal{H}_{IS} = \int \psi^*(r) \mathcal{H}_I \psi(r) d\tau = \frac{8\pi}{3} \gamma_e \gamma_n \hbar^2 |\psi(0)|^2 \mathbf{I} \cdot \mathbf{S}. \quad (\text{A.45})$$

A interação mais geral, é claro, a soma dos acoplamentos das interações de (A.39) e (A.40):

$$\mathcal{H}_{IS} = \int |\psi|^2 \left\{ \frac{8\pi}{3} \gamma_e \gamma_n \hbar^2 \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \delta(\mathbf{r}) + \frac{\gamma_e \gamma_n \hbar^2}{r^3} \left[ \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^2} - \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \right] \right\} d\tau. \quad (\text{A.46})$$

Examinando separadamente os termos do hamiltoniano acima, percebemos que o segundo termo da integral (termo dipolar) pode ser escrito na notação notação diádica como

$$\mathcal{H}_{hf1} = \mathbf{I} \cdot \mathbf{A}' \cdot \mathbf{S}, \quad (\text{A.47})$$

onde  $\mathbf{A}'$  é um tensor de segunda ordem com elementos dados pela relação

$$A'_{ij} = -g_e \beta_e g_n \beta_n \langle (r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j) r^{-5} \rangle \quad (\text{A.48})$$

e os *brackets* denotam a integração sobre a distribuição eletrônica. O termo dipolar é simétrico, e seu traço tende a zero uma vez que  $\sum x_i^2 = r^2$ . Além disso, assim como para o tensor  $g$ , a magnitude da interação dipolar depende da orientação da molécula com respeito a direção do campo aplicado.

Já o primeiro termo da integral (A.46) (termo de contato de Fermi) pode ser escrito como

$$\mathcal{H}_{hf2} = a \mathbf{I} \cdot \mathbf{S}, \quad (\text{A.49})$$

onde a constante de acoplamento isotrópico,  $a$ , é definida por

$$a = (8\pi/3) g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi^2(0)|. \quad (\text{A.50})$$

Dessa maneira, o hamiltoniano hiperfino completo assume a forma<sup>4</sup>

$$H_{hf} = \mathbf{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{S}, \quad (\text{A.51})$$

onde o tensor  $\mathbf{A}$  tem componentes

$$A_{ij} = A'_{ij} + \delta_{ij} a. \quad (\text{A.52})$$

Podemos combinar as Equações (A.51) com (A.17) para obter o hamiltoniano de spin que melhor representa os sistemas estudados neste trabalho na forma

$$\mathcal{H} = \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}. \quad (\text{A.53})$$

---

<sup>4</sup>Se não estivéssemos considerando a supressão do momento angular orbital, seria necessário incluir o acoplamento do momento de spin nuclear com o campo magnético originado do movimento orbital do elétron e escolher um novo conjunto de estados eletrônicos para obter o hamiltoniano de spin, como por exemplo, estados que fossem autofunções de  $J^2$ .

Ao examinar os tipos de efeito que o acoplamento de (A.53) produz, notamos que não há razão para que os eixos principais de  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$  coincidam. Assumindo que de fato os eixos principais não coincidem e que o  $\mathbf{H}$  é paralelo a um dos eixos principais, o eixo  $z$  por exemplo, temos então

$$\mathcal{H} = \beta_e H g_{zz} S_z - \gamma_n \hbar H I_z + A_x I_x S_x + A_y I_y S_y + A_z I_z S_z. \quad (\text{A.54})$$

Infelizmente, não podemos resolver o hamiltoniano acima em sua forma fechada sem assumir que a energia Zeeman eletrônica  $\beta_e H g_{zz}$  é muito maior que as energias de acoplamento hiperfino  $A_x$ ,  $A_y$  e  $A_z$ . Esta aproximação é frequentemente boa quando temos campos magnéticos fortes ( $2\beta_e H = 10^{10}$  Hz para  $H = 3300$  G, enquanto  $A$  é geralmente  $10^9$  Hz ou menos). Se tomarmos o termo Zeeman eletrônico como sendo suficientemente grande, percebemos que  $\mathcal{H}$  comuta com  $S_z$  com boa aproximação e vamos tomar as autofunções de  $S_z$ , com autovalores  $m_S$  como sendo as autofunções do Hamiltoniano. Os termos  $A_x I_x S_x$  e  $A_y I_y S_y$  não possuem elementos de matriz que são diagonais em  $m_S$  e serão excluídos do hamiltoniano em aproximação de primeira ordem. Por outro lado,  $A_z I_z S_z$  é diagonal em  $m_S$  e será mantido. Isto nos dá um hamiltoniano aproximado do tipo

$$\mathcal{H} = \beta_e g_{zz} H S_z - \gamma_n \hbar H I_z + A_z S_z I_z. \quad (\text{A.55})$$

Notamos ainda, que  $I_z$  comuta com (A.55) e como anteriormente, usaremos suas autofunções de  $I_z$  com autovalores  $m_I$  como sendo as autofunções do Hamiltoniano. A energia de primeira ordem é dada então por

$$E = \beta_e g_{zz} H m_S - \gamma_n \hbar H m_I + A_z m_S m_I. \quad (\text{A.56})$$

Desde que  $I^2$ ,  $S^2$ ,  $I_z$  e  $S_z$  todos comutam com o hamiltoniano (A.55) podemos definir as autofunções do sistema como sendo um produto das funções de spin nuclear pelas funções de spin eletrônico do tipo

$$\psi_{m_I m_S} = \phi_{I m_I} u_{S m_S}. \quad (\text{A.57})$$

As possíveis transições produzidas por um campo alternado são encontradas considerando os

elementos de matriz do operador  $\mathcal{H}'(t)$  (usando a mesma metodologia da Seção A.2)

$$\mathcal{H}'(t) = (\gamma_e \hbar S_x - \gamma_n \hbar I_x) H_x \cos \omega t \quad (\text{A.58})$$

entre estados como os de (A.57). Encontramos então que a parte  $S_x$  de  $\mathcal{H}'(t)$  conecta estados com  $\Delta m_S = \pm 1$  e  $\Delta m_I = 0$ , enquanto  $I_x$  conecta  $\Delta m_S = 0$  e  $\Delta m_I = \pm 1$ . Como já havíamos encontrado que umas das regras de seleção deveria ser  $\Delta m_S = \pm 1$ , percebemos que a regras de seleção completas para nosso caso devem ser  $\Delta m_S = \pm 1$  e  $\Delta m_I = 0$ .

Notamos portanto, que o efeito do acoplamento hiperfino na ressonância eletrônica é equivalente a adicionarmos um campo magnético extra proporcional a componente  $z$  do spin nuclear. Desde que o núcleo pode assumir apenas orientações quantizadas, a ressonância eletrônica é desdobrada em  $2I + 1$ .

Apêndice **B**

**Simulação de Espectros de RPE**

---

Espectros de RPE na região de movimento lento ( $10^{-9} < \tau_c < 10^{-6}$ ) são observados no movimento de marcadores de spin baseados no nitróxido incorporados em membranas ou proteínas [167, 219–221]. Usando os métodos desenvolvidos por Freed e co-autores [126, 222] é possível interpretar as formas de linhas espectrais em termos de parâmetros obtidos através de algoritmos computacionais, tais como as componentes dos tensores  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}$  e o tempo de correlação rotacional  $\tau_c$  para avaliar a dinâmica dos processos de reorientação molecular. A seguir, vamos apresentar a teoria para o cálculo da forma de linha de espectros de RPE de marcadores de spin em regime de movimento lento, bem como as principais características do software utilizado para a realização das simulações espectrais contidas nesse trabalho.

## B.1 Teoria Geral

Em um experimento de RPE a forma da curva de absorção é determinada pelo perfil da intensidade de energia absorvida em função da frequência do campo de micro-ondas oscilante  $H_x(t)$ . Pode ser demonstrado que a potência absorvida do campo oscilante pela amostra pode ser escrita como [116]

$$\mathcal{P} \propto \mathcal{M}_x, \quad (\text{B.1})$$

em que

$$\mathcal{M}_x = -\mathcal{N}g\beta_e \langle S_x \rangle = -\mathcal{N}g\beta_e \text{Tr} \rho(t) S_x, \quad (\text{B.2})$$

representa a magnetização macroscópica da amostra,  $\mathcal{N}$  é a concentração de spins eletrônicos,  $g$  é o fator espectroscópico de desdobramento,  $\beta_e$  é o magneton de Bohr e  $\rho$  é a matriz densidade do sistema. Assim, para determinar a forma de linha espectral, basta encontrarmos uma expressão adequada para o comportamento temporal de  $\mathcal{M}_x$  (que nesse caso significa encontrar o comportamento temporal de  $\rho$ ). A equação de movimento da matriz densidade, considerando o mesmo hamiltoniano  $\mathcal{H}(t)$  para todos os membros do sistema, é dada pela equação quântica de Liouville [217]

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -i[\mathcal{H}(t), \rho]. \quad (\text{B.3})$$

Nessa descrição, estamos assumindo que a dependência do hamiltoniano  $\mathcal{H}(t)$  do marcador de spin vem de suas interações com o ambiente de tal forma que  $\mathcal{H}(t)$  é totalmente determinado por um conjunto completo de variáveis  $\Omega$ . Estamos assumindo ainda, que a dependência temporal de  $\Omega$  é descrita por um processo de Markov estacionário de tal forma que a probabilidade de se estar em um estado  $\Omega_1$  no tempo  $t$ , partindo de um estado  $\Omega_2$  no tempo  $t - \Delta t$ , é independente do valor de  $\Omega$  em qualquer tempo anterior a  $t - \Delta t$  e depende apenas de  $\Delta t$  e não de  $t$ . Um processo de Markov estacionário pode ser descrito pela equação diferencial [165, 223]

$$\frac{\partial}{\partial t} P(\Omega, t) = -\Gamma_{\Omega} P(\Omega, t), \quad (\text{B.4})$$

em que  $P(\Omega, t)$  é a probabilidade de se encontrar o radical livre no estado  $\Omega$  em um determinado tempo  $t$ . Como o processo é assumido estacionário,  $\Gamma$  é independente do tempo. O operador de evolução  $\Gamma_{\Omega}$  é dependente apenas das variáveis aleatórias  $\Omega$  e independente do espaço de spin. Além disso, estamos assumindo que o processo tem uma única distribuição de equilíbrio  $P_0(\Omega)$ , caracterizada por

$$\Gamma_{\Omega} P_0(\Omega) = 0. \quad (\text{B.5})$$

Pode ser demonstrado [222, 224] que as Equações (B.3)-(B.5) levam a equação de movimento estocástica de Liouville

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(\Omega, t) = -i[\mathcal{H}(t), \rho(\Omega, t)] - \Gamma_{\Omega} \rho(\Omega, t), \quad (\text{B.6})$$

em que agora,  $\rho(\Omega, t)$  é entendido como sendo um valor de  $\rho$  associado com um valor particular de  $\Omega$ . Dessa maneira, ao invés de nos preocuparmos com a dependência temporal explícita do hamiltoniano de spin  $\mathcal{H}$ , a qual envolve a interação com o ambiente, vamos expressar  $\mathcal{H}$  em termos das variáveis angulares aleatórias  $\Omega$  de forma que suas modulações devido aos movimentos rotacionais passam a ser expressas pela dependência temporal de  $\Omega$ .

Dessa forma, encontramos então para a  $\lambda$ -ésima linha hiperfina especificada por  $\Omega$  do espectro de estado estacionário de um marcador de spin na presença de um campo oscilante de

micro-ondas [222]

$$\mathcal{P}_\lambda(\Omega) = 2\mathcal{N}\hbar\omega d_\lambda Z_\lambda^{(1)''}(\Omega), \quad (\text{B.7})$$

em que  $\mathcal{P}_\lambda$  é a potência absorvida,  $d_\lambda$  é o momento de transição dado por  $d_\lambda = \frac{1}{2}\gamma_e H_1 \langle \lambda^- | S_- | \lambda^+ \rangle$  (em que  $S_\pm = S_x \pm iS_y$  e  $\lambda^\pm$  são os estados de spin eletrônico  $m_S = \pm\frac{1}{2}$  para a  $\lambda$ -ésima transição) e  $Z_\lambda^{(1)''}$  é definido pela série de equações [222]

$$(\rho - \rho_0)_\lambda = \chi_\lambda, \quad (\text{B.8})$$

$$\chi_\lambda = \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{i n \omega t} Z_\lambda^{(n)}, \quad (\text{B.9})$$

e

$$Z_\lambda^{(n)} = Z_\lambda^{(n)'} + i Z_\lambda^{(n)''}. \quad (\text{B.10})$$

Na Equação (B.8),  $\rho_0(\Omega)$  é a matriz densidade de spin na qual a dependência com  $\Omega$  é tal que  $\Gamma_\Omega \rho_0 = 0$  e  $\chi_\lambda$  representa a susceptibilidade magnética da amostra. Na Equação (B.9), a solução do estado estacionário  $\chi_\lambda$  foi expandida em uma série de Fourier com coeficientes independentes do tempo  $Z_\lambda^{(n)}$  de forma que  $\rho_0(\Omega) = \rho_0^{(0)}$ . Note que a Equação (B.7) mostra o fato de que é o harmônico  $n = 1$  o diretamente observado. Na notação acima,  $\rho_\lambda$  representa o elemento de matriz de tal forma que

$$\rho_\lambda \equiv \langle \lambda^- | \rho | \lambda^+ \rangle, \quad (\text{B.11})$$

em que  $\lambda^-$  e  $\lambda^+$  são os dois níveis de energia entre os quais a  $\lambda$ -ésima transição acontece (para o nitróxido existem três transições permitidas).

A absorção total é obtida como uma média do equilíbrio da Equação (B.7) sobre todos os  $\Omega$ . Assim, introduzimos médias tais como [222]

$$\overline{Z}_\lambda^{(n)} = \int d\Omega P_0(\Omega) Z_\lambda^{(n)}(\Omega), \quad (\text{B.12})$$

de forma que a absorção total pode ser escrita como

$$\mathcal{P}_\lambda = 2\mathcal{N}\hbar\omega d_\lambda \overline{Z}_\lambda^{(1)''}, \quad (\text{B.13})$$

em que estamos considerando  $d_\lambda$  essencialmente independente da orientação. O hamiltoniano de spin total  $\mathcal{H}(t)$ , expressa em unidades de frequência angular pode ser separada em três componentes

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_1(\Omega) + \mathcal{H}'(t). \quad (\text{B.14})$$

Para o termo independente do tempo  $\mathcal{H}_0$  podemos usar o procedimento descrito na Seção A.3 do Apêndice A para encontrar os níveis de energia de ordem zero e as frequências de transição na forma

$$\hbar\mathcal{H}_0 = g_e\beta_e H S_z - \hbar \sum_i \gamma_i I_{z_i} H - \hbar\gamma_e \sum_i \bar{a}_i S_z I_{z_i}. \quad (\text{B.15})$$

O termo  $\mathcal{H}_1$  diz respeito a perturbação dependente da orientação dos ângulos  $\Omega$  e sendo um escalar, pode ser expresso como o produto escalar de dois tensores. Dessa forma, na notação de Freed e Fraenkel [126]

$$\mathcal{H}_1(\Omega) = \sum_{L,m,m''\mu,i} \mathcal{D}_{-m,m''}^L(\Omega) \mathcal{F}'_{\mu,i}{}^{(L,m)} A_{\mu,i}^{(L,m'')}, \quad (\text{B.16})$$

em que  $\mathcal{F}'_{\mu,i}{}^{(L,m)}$  e  $A_{\mu,i}^{(L,m'')}$  são componentes irreduzíveis de um tensor de ordem  $L$  e componente  $m$ ,  $\mu$  distingue os diferentes tipos de interação presentes em  $\mathcal{H}_1$ ,  $i$  se refere aos diferentes núcleos do radical e os apóstrofes indicam que as interações estão escritas nos eixos moleculares e os elementos da matriz de rotação de Wigner  $\mathcal{D}_{-m,m''}^{(L)}(\Omega)$  incluem a transformação do eixo molecular fixo  $(x', y', z')$  para o eixo do laboratório  $(x, y, z)$ . Estaremos preocupados com os tensores  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}$ , para os quais  $L = 2$ . Finalmente, para o termo  $\mathcal{H}'(t)$ , o qual diz respeito a interação do spin eletrônico com o campo magnético da radiação oscilante, podemos escrever (assim como descrito na Seção A.2 do Apêndice A)

$$\mathcal{H}'(t) = g\beta_e H_1 S_x \cos\omega t. \quad (\text{B.17})$$

com  $S_x = \frac{1}{2}(S_- + S_+)$ .

Quando tomamos os elementos de matriz  $\langle \lambda_{j-} | \lambda_{j+} \rangle$  da Equação (B.6) e utilizamos as Equações (B.8)-(B.10), a equação do estado estacionário para  $Z_\lambda^{(n)}$  é escrita como [222]

$$(n\omega - \omega_\lambda) Z_\lambda^{(n)}(\Omega) + [\mathcal{H}_1(\Omega), Z_\lambda^{(n)}(\Omega)]_{\lambda-} - i [\Gamma_\Omega Z_\lambda^{(n)}(\Omega)]_{\lambda+} + d_\lambda \left[ \chi_{\lambda+}^{(n-1)} - \chi_{\lambda-}^{(n-1)} \right] = q\omega_\lambda d_\lambda. \quad (\text{B.18})$$

Os índices sobrescritos nos  $\chi_{\lambda^\pm}$  se referem aos harmônicos no sentido da Equação (B.9). Para temperaturas moderadas e valores de intensidade de campo comumente encontrados nos experimentos de ressonância eletrônica, podemos escrever [222]  $\rho_0 = \mathcal{N}'^{-1} - q\mathcal{H}_0$ , em que  $\mathcal{N}'$  é o número de autoestados de spin de  $\mathcal{H}_0$  e  $q = \hbar/\mathcal{N}'kT$ . Além disso, temos que  $\hbar\omega_\lambda = E_{\lambda^+} - E_{\lambda^-}$  e os  $Z_\lambda^{(n)}(\Omega)$  são matrizes de spin definidas pelas Equações (B.8)-(B.10) e as  $E_{\lambda^\pm}$  são as autoenergias de  $\mathcal{H}_0$  para os estados  $\lambda^\pm$ .

Para obter a linha espectral devemos resolver a Equação da difusão (B.4) e em seguida a Equação (B.12). A solução de tais equações diferenciais podem ser expressas em termos de um conjunto completo de autofunções ortonormais denotadas  $G_m(\Omega)$  [222] tais que

$$\Gamma_\Omega G_m(\Omega) = \tau_m^{-1} G_m(\Omega), \quad (\text{B.19})$$

em que  $\tau_m^{-1}$  é o  $m$ -ésimo autovalor.

Expandindo os elementos de matriz de  $Z_\lambda^{(n)}(\Omega)$  em um conjunto completo de funções ortonormais  $G_m(\Omega)$  temos

$$Z_\lambda^{(n)} = \sum_m [C_m^{(n)}(\omega)]_\lambda G_m(\Omega), \quad (\text{B.20})$$

em que os coeficientes  $C_m^{(n)}(\omega)$  são operadores no espaço de spin e funções de  $\omega$ , entretanto são independentes de  $\Omega$ .

Substituindo as Equação (B.20) na Equação (B.18), multiplicando a equação resultante por  $G_m^*(\Omega)$ , integrando sobre  $\Omega$  e usando as propriedades de ortonormalidade das  $G_m(\Omega)$ , obtemos [222]

$$\begin{aligned} [(n\omega - \omega_\lambda) - i\tau_m^{-1}] [C_m^{(n)}]_\lambda + \sum_{m'} \int d\Omega G_m^*(\Omega) [\mathcal{H}_1(\Omega), C_m^{(n)}]_\lambda C_{m'} + \\ d_\lambda ([C_m^{(n-1)}]_{\lambda^+} - [C_m^{(n-1)}]_{\lambda^-}) = q\omega_\lambda d_\lambda \delta(m, 0) \delta(n, 1). \end{aligned} \quad (\text{B.21})$$

Como a absorção descrita pela Equação (B.13), depende apenas de  $Z_\lambda^{(1)}$ , ao resolvermos a Equação (B.21) para  $[C_0^{(1)}]_\lambda$  e para todas as transições permitidas, encontraremos a forma da linha espectral. Na ausência de saturação podemos assumir  $d_\lambda = 0$  [165] no lado esquerdo da Equação (B.21) e fazer  $n = 1$ , para obter as expressões necessárias.

Uma largura de linha Lorentziana rotacionalmente invariante  $T_2^{-1}$  pode ser incluída nas Equações (B.18) ou (B.21) fazendo

$$\omega_\lambda \longrightarrow \omega_\lambda + iT_2^{-1}. \quad (\text{B.22})$$

No limite quase rígido, essa largura de linha corresponde a largura de linha de um monocristal, ou mais precisamente a largura de linha residual do espectro de pó [126]. De maneira mais geral, uma variação angular da largura de linha pode ser introduzida na forma [165]

$$T_2^{-1}(\theta) = \alpha + \beta \cos^2 \theta, \quad (\text{B.23})$$

em que  $\theta$  é o ângulo entre o eixo do campo magnético e o eixo molecular  $z$ .

As expressões acima nos fornecem equações algébricas acopladas para os coeficientes  $\left[ C_m^{(n)} \right]_\lambda$ , as quais devemos resolver utilizando um número finito de coeficientes (já que a base completa escolhida anteriormente, inclui um número infinito de autofunções). A convergência depende essencialmente da razão  $|\mathcal{H}_1(\Omega)|/\tau_m^{-1}$ . Quanto maior o valor dessa razão, mais termos de  $\left[ C_m^{(n)} \right]_\lambda$  serão necessários para alcançar a convergência.

## B.2 Difusão Rotacional Browniana

Quando o método da seção anterior é aplicado para a modulação rotacional,  $\Omega$  passa a se referir aos ângulos de Euler  $\Gamma \equiv (\alpha, \beta, \gamma)$  entre os eixos moleculares girantes e os eixos fixos do laboratório. Para uma molécula sobre o efeito de inúmeras colisões, as quais causam pequenas reorientações angulares aleatórias, o movimento browniano isotrópico resultante é um processo markoviano que pode ser descrito pela equação de difusão rotacional [222]

$$\frac{\partial}{\partial t} P(\Omega, t) = \mathcal{R} \nabla_\Omega^2 P(\Omega, t), \quad (\text{B.24})$$

em que  $\nabla_\Omega^2$  é o operador laplaciano na superfície de uma esfera unitária e  $\mathcal{R}$  é o coeficiente de difusão rotacional. Se a molécula puder ser aproximada por uma esfera rígida de raio  $a$  girando em um meio de viscosidade  $\eta$ , a relação de Stokes-Einstein fornece [225]

$$\mathcal{R} = \frac{kT}{8\pi a^3 \eta}. \quad (\text{B.25})$$

Em um líquido isotrópico, a distribuição de equilíbrio  $P_0(\Omega)$  é igual para todas as orientações, o que nos leva à  $P_0(\Omega) = 1/8\pi^2$ . Além disso, o operador markoviano  $\Gamma_\Omega$  é identificado como sendo  $-\mathcal{R}\nabla_\Omega^2$ , que é formalmente o hamiltoniano cujo as autofunções são as matrizes de rotação normalizadas de Wigner ou os harmônicos esféricos generalizados [226]

$$G_m \longrightarrow \phi_{KM}^L(\Omega) = \left[ \frac{(2L+1)}{8\pi^2} \right]^{\frac{1}{2}} \mathcal{D}_{K,M}^L(\Omega), \quad (\text{B.26})$$

com autovalores  $\mathcal{R}L(L+1)$ . Note que para  $K=0$ ,  $\mathcal{D}_{0,M}^L(\alpha, \beta, \gamma) = [4\pi/(2L+1)]^{\frac{1}{2}} Y_{LM}(\beta, \gamma)$ , em que  $Y_{LM}$  são os harmônicos esféricos [217]. De maneira similar, o hamiltoniano para o movimento browniano axialmente simétrico em torno de um eixo molecular  $z$  fixo também possui as matrizes de rotação de Wigner como autofunções de autovalores

$$\Gamma_\Omega \phi_{KM}^L = [\mathcal{R}_\perp L(L+1) + (\mathcal{R}_\parallel - \mathcal{R}_\perp) K^2] \phi_{KM}^L, \quad (\text{B.27})$$

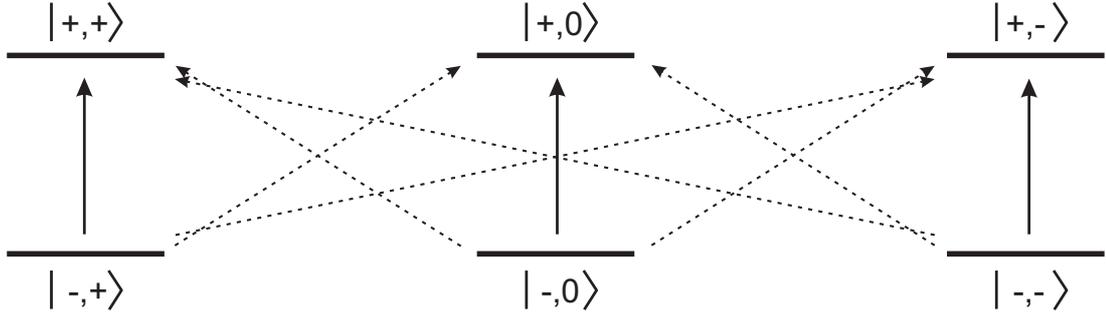
em que  $\mathcal{R}_\perp$  e  $\mathcal{R}_\parallel$  são as constantes de difusão rotacional sobre os eixos  $x, y$  e  $z$  respectivamente [165, 226, 227]. Os índices  $K$  e  $M$  das matrizes de rotação de Wigner se referem a projeções ao longo do eixos de simetria molecular e ao longo do eixos fixos do laboratório, respectivamente. Com isso, basta executarmos todos os passos entre (B.6) e (B.20) para obter uma expressão análoga a (B.21) que diga respeito à difusão rotacional browniana.

Para os nitróxidos, existem três transições de EPR permitidas e outras seis proibidas (Figura B.1), as quais devem ser consideradas em uma solução rigorosa da Equação (B.21). Portanto, para conseguir resolver a Equação (B.21) devemos incluir expressões para os tensores  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$  (na notação de Freed e Fraenkel) no hamiltoniano de spin  $\mathcal{H}_1(\Omega)$ , que fica na forma [165]

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_1(\Omega) = & \mathcal{D}_{0,0}^2(\Omega) [\mathcal{F}_0 + D'I_z] S_z + [\mathcal{D}_{-2,0}^2(\Omega) + \mathcal{D}_{2,0}^2(\Omega)] (\mathcal{F}_2 + D^{(2)'} I_z) S_z \\ & + [\mathcal{D}_{0,1}^2(\Omega) I_+ - \mathcal{D}_{0,-1}^2(\Omega) I_-] D S_z + [\mathcal{D}_{-2,1}^2(\Omega) + \mathcal{D}_{2,1}^2(\Omega)] D^{(2)} I_+ S_z \\ & - [\mathcal{D}_{-2,-1}^2(\Omega) + \mathcal{D}_{2,-1}^2(\Omega)] D^{(2)} I_- S_z, \end{aligned} \quad (\text{B.28})$$

em que

$$\mathcal{F}_i = \sqrt{\frac{2}{3}} g^{(i)} \hbar^{-1} \beta_e H_0, \quad (\text{B.29})$$



**Figura B.1:** Níveis de energia e as respectivas transições possíveis para uma molécula de nitróxido submetida a altos valores do campo magnético aplicado,  $\mathbf{H}$ . Na figura,  $S = \frac{1}{2}$ ,  $I = 1$  e a notação utilizada é  $|m_S, M_I\rangle$ . As linhas sólidas indicam as transições permitidas e as linhas pontilhadas as transições proibidas. Figura adaptada de *Theory of Slow Tumbling ESR Spectra for Nitroxides* [165].

$$g^{(0)} = \frac{1}{\sqrt{6}} [2g_{z'} - (g_{x'} + g_{y'})], \quad (\text{B.30})$$

$$g^{(2)} = \frac{1}{2} [g_{x'} - g_{y'}], \quad (\text{B.31})$$

$$D = \left( \frac{|\gamma_e|}{2\sqrt{6}} \right) (A_{x'} + A_{y'} - 2A_{z'}), \quad (\text{B.32})$$

$$D^{(2)} = \frac{1}{4} |\gamma_e| (A_{y'} - A_{x'}), \quad (\text{B.33})$$

com  $D' = -(8/3)^{\frac{1}{2}}D$  e  $D^{(2)'} = -(8/3)^{\frac{1}{2}}D^{(2)}$ . Dessa maneira, verificamos que as transições proibidas da Figura B.1 estão acopladas nas expressões das transições permitidas através dos termos que envolvem  $I_{\pm}S_z$  na Equação (B.28) ( $I_{\pm}$  são os operadores de spin nuclear de levantamento e abaixamento) e que os ângulos de Euler  $\alpha, \beta, \gamma$  definem as rotações entre o sistema de coordenadas do laboratório e o sistema de coordenadas principal das moléculas nos quais os tensores  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$  são diagonais. A Equação (B.21) pode ser avaliada para ( $n = 1$ ) e  $d_{\lambda} = 0$  e as expressões resultantes estão extensamente discutidas no trabalho de Freed [165]. As expressões obtidas por Freed, definem um conjunto de equações algébricas acopladas que conectam as transições proibidas com as transições permitidas e aproximações para a solução completa podem ser obtidas restringindo as equações acopladas a um limite finito ao fixar  $C_{KM}^L(i) = 0$  para todo  $L > n_L$ .

## B.3 Software *NLLS*

O software *NLLS*<sup>1</sup> utiliza um algoritmo modificado à partir do método de Levenberg-Marquardt (um dos métodos *quasi-Newton*) conhecido como *modelo de região de confiança* [228,229] e as equações obtidas na seção anterior para determinar a forma de linha de espectros de RPE. Dessa forma, este software nos permite ajustar um único espectro experimental através da superposição de componentes espectrais distintas, cada uma delas possuindo parâmetros magnéticos (componentes dos tensores  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$ ), populações relativas ( $N$ ) e taxas de difusão rotacional ( $R_{bar}$ ) características que fornecem informações da natureza local do ambiente onde os marcadores de spin estão inseridos (Figura B.2 e Tabela B.1).



**Figura B.2:** Espectro de RPE (linha preta) e seu melhor ajuste (linha vermelha) do marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC a 34 °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais que formam o espectro composto (linha vermelha) separadas através do software *NLLS*.

**Tabela B.1:** Parâmetros magnéticos (G), populações relativas (%) e taxas de difusão rotacional ( $s^{-1}$ ) utilizados pelo software *NLLS* para ajustar o espectro experimental ao lado.

	componente 1		componente 2	
	$\mathbf{A}$	$\mathbf{g}$	$\mathbf{A}$	$\mathbf{g}$
xx	6,9	2,008000	5,7	2,008200
yy	6,0	2,006000	5,6	2,006200
zz	30,0	2,002260	28,0	2,004633
	$N$	$R_{bar}$	$N$	$R_{bar}$
	72,9	7,704327	27,1	8,050981

Para realizar a simulação espectral o software *NLLS* expressa os tensores magnéticos  $\mathbf{A}$  e  $\mathbf{g}$  e o tensor de difusão rotacional  $\mathcal{R}$  em um conjunto de eixos fixos no marcador de spin. Além disso, para explicitar as interações magnéticas dos spins eletrônico e nuclear, é possível especificar o tensor  $\mathbf{W}$ , o qual está associado com o sistema de coordenadas magnético e que especifica um alargamento não homogêneo adicional do tipo Lorentziano e os parâmetros  $\Delta$ , os quais adicionam uma largura de linha não homogênea do tipo Gaussiana. O cálculo da forma de linha ainda incorpora diferentes tipos de modelo para a difusão rotacional (browniana, não

<sup>1</sup>Sigla para *Nonlinear Least-Square*.

browniana, viscosidade anisotrópica e saltos discretos). Todas as simulações desse trabalho foram realizadas utilizando o modelo de difusão browniana. Esse modelo trata a difusão como uma série de reorientações infinitesimais e é o mais adequado para marcadores de spin de tamanho intermediário e macromoléculas marcadas [228]. O software permite ainda, que um tensor de difusão rotacional completamente anisotrópico seja especificado para esse modelo. Já os parâmetros dinâmicos são especificados como  $\log_{10}$  do valor real dos parâmetros, divididos por unidades de  $s$  ou  $s^{-1}$ . A escala logarítmica é adotada porque ela ajusta os parâmetros dinâmicos à mesma escala de magnitude dos outros parâmetros necessários para a simulação, o que melhora substancialmente a convergência do algoritmo [228]. Somado a isto, o software inclui também um potencial de orientação dado por [228]

$$U(\Omega) = -kT \sum_{L,M} C_K^L \mathcal{D}_{0K}^L(\Omega), \quad (\text{B.34})$$

que modela a tendência do marcador de spin a se reorientar quando esse está inserido em uma membrana. Na notação acima,  $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$  representam os ângulos que relacionam os eixos de difusão com o eixo diretor e os coeficientes  $C_K^L$  tem a propriedade  $C_K^L = C_{-K}^L = C_K^{L*}$  e  $D_{0K}^L(\Omega)$  são os elementos da matriz de rotação de Wigner [165].

Na Tabela B.2 estão apresentados os principais parâmetros que devem ser considerados para o ajuste de espectros que se encontram no intervalo de movimento lento, divididos em quatro categorias: (i) *parâmetros magnéticos e estruturais*, os quais descrevem os tensores magnéticos  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{A}$  e um tensor não homogêneo para a largura de linha; (ii) *parâmetros dinâmicos*, que incluem as taxas de difusão rotacional para os tipos de modelos implementados no software; (iii) *parâmetros de ordem*, os quais descrevem a influência da orientação em fluidos anisotrópicos, tais como cristais líquidos e membranas; e (iv) *parâmetros inteiros*, que definem o tipo de modelo ou de cálculo utilizado.

A seguir, estão representadas os arquivos de entrada utilizados para a simulação dos espectros de RPE dos marcadores de spin utilizados nesse trabalho. Em cada arquivo, o parâmetro `par_rbar` foi substituído por um valor inicial para a taxa de difusão rotacional.

**Tabela B.2:** Lista de parâmetros usados pelo software *NLLS* para a simulação de espectros de RPE no regime de movimento lento. Tabela adaptada de *Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm* [228].

Parâmetro	Descrição
<i>Magnéticos, Estruturais e de Ordem</i>	
gxx, gyy, gzz	tensor <b>g</b>
axx, ayy, azz	tensor hiperfino <b>A</b> (G)
wxx, wyy, wzz	tensor (definido no sistema de coordenadas molecular) para a largura de linha Lorentziana (G)
alphad, betad, gammad	ângulos de inclinação de difusão (°)
alpham, betam, gammam	ângulos de inclinação magnéticos (°)
psi	ângulo de inclinação diretor (°)
gib0, gib2	alargamento (dependente do sistema de coordenadas diretor) inhomôgeneo Gaussiano (G)
c20, c22, c40, c42, c44	coeficientes para o potencial de orientação
phase	fase do espectro (°)
B0	campo magnético estático
<i>Dinâmicos</i>	
pl, pkxy, pkzz	log <sub>10</sub> dos parâmetros para o modelo de difusão não browniana
rxx, ryy, rzz	log <sub>10</sub> do tensor de difusão rotacional (s <sup>1</sup> )
djf, djfprp	log <sub>10</sub> do tensor de difusão efetivo para o modelo de viscosidade anisotrópica (s <sup>1</sup> )
oss	log <sub>10</sub> da taxa de interação de troca de Heisenberg (s <sup>1</sup> )
<i>Inteiros</i>	
in2	duas vezes o valor do spin nuclear
ipdf	parâmetro de escolha do modelo (difusão browniana, não browniana, viscosidade anisotrópica)
ist	número de sítios simetricamente relacionados (saltos discretos)
ml, mxy, mzz	sinalizadores para o modelo de difusão não browniana
lemx, lomx, kmn, kmx, mmn, mmx, ipnmx	índices de truncamento dos cálculos
nort	número de orientações no modelo MOMD

## Arquivo de entrada para simular espectros com uma componente

```
echo off
echo — Open file 'nome.log' to save a record of this session
echo
log nome
echo
echo — Set magnetic parameters for a generic nitroxide
echo
let gxx(1),gyy(1),gzz(1) = 2.0080,2.0060,2.0017
let in2=2
let axx(1),ayy(1),azz(1) = 6.9,6.0,32.0
let wxx(1),wy(1),wzz(1) = 1.1,1.0,1.1
let B0(1) = 3354.0
echo
echo — Specify that two components are to be calculated
echo
sites 1
echo
echo — Specify basis set truncation parameters
echo
let lem,x,lom,x,kmx,mmx=6,5,4,4,2
echo
echo — Read in the datafile
echo
data nome ascii nspline 200 bc 20 shift
echo
echo — Provide initial estimates for rotation rates for each component
echo — Parameters for a given component are specified by an index
echo — in parentheses following the parameter name
echo
let rbar(1),N(1) = par_rbar1,1.0
let c20(1),c22(1)= 0.0,0.0
vary c20(1),c22(1),rbar(1),wy(1),gzz(1),azz(1)
echo
echo — Carry out nonlinear least-squares procedure:
echo — (1) Stop after a maximum of 80 iterations
echo — (2) Stop after a maximum of 2000 spectral calculations
echo — (3) Chi-squared convergence tolerance is 1%
echo
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
echo
echo — fit again for full convergence
echo
fit
fix all
vary c20(1),c22(1),wx(1),wy(1),wz(1)
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
fit
fix all
vary c20(1),c22(1),rbar(1),wy(1),gzz(1)
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
fit
echo
exit
```

## Arquivo de entrada para simular espectros com duas componentes

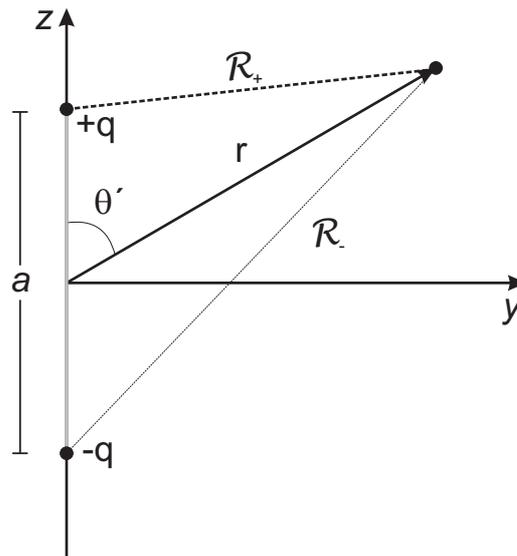
```
echo off
echo — Open file 'nome.log' to save a record of this session
echo
log nome
echo
echo — Set magnetic parameters for a generic nitroxide
echo
let gxx(1),gyy(1),gzz(1) = 2.0080,2.0060,2.0017
let gxx(2),gyy(2),gzz(2) = 2.0082,2.0062,2.0027
let in2=2
let axx(1),ayy(1),azz(1) = 6.9,6.0,32.0
let axx(2),ayy(2),azz(2) = 5.7,5.6,31.2
let wxx(1),wyy(1),wzz(1) = 0.8,0.4,0.8
let wxx(2),wyy(2),wzz(2) = 0.5,0.5,0.5
let B0(1) = 3270.0
let B0(2) = 3270.0
echo
echo — Specify that two components are to be calculated
echo
sites 2
echo
echo — Specify basis set truncation parameters
echo
let lem,x,lom,x,kmx,mmx=6,5,4,4,2
echo
echo — Read in the datafile
echo
data nome ascii nspline 200 bc 20 shift
echo
echo — Provide initial estimates for rotation rates for each component
echo — Parameters for a given component are specified by an index
echo — in parentheses following the parameter name
echo
let rbar(1),N(1) = par_rbar1,1.0
let rbar(2),N(2) = par_rbar2,1.0
let c20(1),c22(1) = 0.0,0.0
let c20(2),c22(2) = 0.0,0.0
vary c20(*),c22(*),wyy(*),rbar(*),gzz(1),azz(1)
echo
echo — Carry out nonlinear least-squares procedure:
echo — (1) Stop after a maximum of 80 iterations
echo — (2) Stop after a maximum of 2000 spectral calculations
echo — (3) Chi-squared convergence tolerance is 1%
echo
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
echo
echo — fit again for full convergence
echo
fit
fix all
vary c20(*),c22(*),wyy(*),rbar(*),gzz(2),azz(2)
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
fit
fix all
vary c20(*),c22(*),wxx(*),wyy(*),wzz(*)
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
fit
fix all
vary c20(*),c22(*),rbar(*),wyy(*),gzz(*)
fit maxit 2000 maxfun 20000 ftol .001
fit
echo
exit
```

Apêndice **C**

## Radiação de um Fluoróforo

---

Para calcular a intensidade da radiação emitida por um fluoróforo devemos ser capazes de calcular o respectivo campo elétrico associado a essa radiação. É sabido que um fluoróforo pode ser tratado como um dipolo elétrico que emite radiação [230]. Dessa forma, vamos modelar nosso fluoróforo como sendo duas pequenas esferas metálicas separadas por uma distância  $a$  e conectadas por um fio fino (Figura C.1).



**Figura C.1:** Cargas  $\pm q$  conectadas por um fio fino para formar um dipolo elétrico.

Para um tempo  $t$ , vamos considerar que a carga na esfera de cima é  $q(t)$ , e a carga na esfera de baixo é  $-q(t)$ . Suponha também que a carga  $q$  oscile entre as extremidades do fio à uma frequência angular  $\omega$ . Dessa forma, podemos escrever que

$$q(t) = q_0 \cos(\omega t) \quad (\text{C.1})$$

e

$$\mathbf{d}(t) = d_0 \cos(\omega t) \hat{z}, \quad (\text{C.2})$$

onde  $\mathbf{d}$  representa o momento de dipolo e

$$d_0 = q_0 a \quad (\text{C.3})$$

é seu valor máximo.

O potencial elétrico retardado para esta situação pode ser escrito como [231]

$$V(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left\{ \frac{q_0 \cos[\omega(t - \mathcal{R}_+/c)]}{\mathcal{R}_+} - \frac{q_0 \cos[\omega(t - \mathcal{R}_-/c)]}{\mathcal{R}_-} \right\}, \quad (\text{C.4})$$

onde pela lei dos cossenos

$$\mathcal{R}_\pm = \sqrt{r^2 \mp ra \cos \theta' + (a/2)^2}. \quad (\text{C.5})$$

Dessa forma, para transformar esse dipolo físico em um dipolo perfeito, devemos fazer a separação entre as cargas muito pequena, ou seja

$$a \ll r. \quad (\text{C.6})$$

Logicamente, se  $a$  for zero não teremos potencial de dipolo; dessa forma, desejamos uma expressão expandida até primeira ordem em  $a$ . Assim,

$$\mathcal{R}_\pm \cong r \left( 1 \mp \frac{a}{2r} \cos \theta' \right). \quad (\text{C.7})$$

Segue então que

$$\frac{1}{\mathcal{R}_\pm} \cong \frac{1}{r} \left( 1 \pm \frac{a}{2r} \cos \theta' \right), \quad (\text{C.8})$$

e

$$\begin{aligned} \cos[\omega(t - \mathcal{R}_\pm/c)] &\cong \cos \left\{ \omega \left[ t - \frac{r}{c} \left( 1 \mp \frac{a}{2r} \cos \theta' \right) \right] \right\} \\ &\cong \cos \left[ \omega(t - r/c) \pm \frac{\omega a}{2c} \cos \theta' \right], \end{aligned} \quad (\text{C.9})$$

que pode ser reescrito na forma

$$\cos[\omega(t - \mathcal{R}_\pm/c)] \cong \cos[\omega(t - r/c)] \cos \left[ \frac{\omega a}{2c} \cos \theta' \right] \mp \text{sen}[\omega(t - r/c)] \text{sen} \left[ \frac{\omega a}{2c} \cos \theta' \right]. \quad (\text{C.10})$$

Na aproximação do dipolo perfeito temos então<sup>1</sup> que

$$a \ll c/\omega. \quad (\text{C.11})$$

Sobre estas condições

$$\cos[\omega(t - \mathcal{R}_\pm/c)] \cong \cos[\omega(t - r/c)] \mp \left( \frac{\omega a}{2c} \cos \theta' \right) \text{sen}[\omega(t - r/c)]. \quad (\text{C.12})$$

---

<sup>1</sup>Desde que ondas de frequência  $\omega$  tem comprimentos de onda  $\lambda = 2\pi/\omega$ , isto equivale ao requerimento  $a \ll r$ .

Substituindo (C.8) e (C.12) em (C.4), obtemos o potencial de um dipolo oscilante perfeito

$$V(r, \theta', t) = \frac{p_0 \cos \theta'}{4\pi\epsilon_0 r} \left( \frac{1}{r} \cos [\omega(t - r/c)] - \frac{\omega}{c} \text{sen} [\omega(t - r/c)] \right). \quad (\text{C.13})$$

No limite estático ( $\omega \rightarrow 0$ ) o primeiro termo reproduz o resultado encontrado para o potencial de um dipolo estacionário [231]

$$V(r, \theta') = \frac{p_0 \cos \theta'}{4\pi\epsilon_0 r^2}. \quad (\text{C.14})$$

Entretanto, esse não é o termo de interesse. De fato, estamos interessados nos campos que sobrevivem à distâncias longas à partir da fonte, na chamada *zona de radiação*<sup>2</sup> caracterizada por

$$r \gg c/\omega. \quad (\text{C.15})$$

Nessa região o potencial se reduz a

$$V(r, \theta', t) = -\frac{p_0 \omega}{4\pi\epsilon_0 c} \left( \frac{\cos \theta'}{r} \right) \text{sen} [\omega(t - r/c)]. \quad (\text{C.16})$$

Sabemos que o potencial vetor é determinado por [232]

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \int \frac{\mathbf{J}(\mathcal{R})}{\mathcal{R}} d\mathcal{R}^3 \quad (\text{C.17})$$

onde a densidade de corrente  $\mathbf{J}$  é dada por

$$\begin{aligned} \mathbf{J} &= I d\mathbf{l} \\ &= \frac{dq}{dt} d\mathbf{l} \\ &= \frac{d}{dt} [q_0 \cos(\omega t)] d\mathbf{l}. \end{aligned} \quad (\text{C.18})$$

De acordo com a Figura C.1 o potencial vetor  $\mathbf{A}(\mathbf{r}, t)$  pode ser escrito como

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}, t) = \frac{\mu_0}{4\pi} \int_{-d/2}^{d/2} -\frac{q_0 \omega \text{sen} [\omega(t - \mathcal{R}/c)]}{\mathcal{R}} dz \hat{z}, \quad (\text{C.19})$$

<sup>2</sup>Note que as aproximações (C.11) e (C.15) agrupam a aproximação (C.6) e que uma combinação dessas equações nos leva a  $a \ll \lambda \ll r$ .

com

$$\mathcal{R} = \sqrt{r^2 - 2rz \cos \theta' + z^2}. \quad (\text{C.20})$$

Usando a Equação (C.6) encontramos

$$\mathcal{R} \cong r \left( 1 - \frac{z}{r} \cos \theta' \right), \quad (\text{C.21})$$

que nos leva a

$$\frac{1}{\mathcal{R}} \cong \frac{1}{r} \left( 1 + \frac{z}{r} \cos \theta' \right) \quad (\text{C.22})$$

e conseqüentemente

$$\text{sen} [\omega (t - \mathcal{R}/c)] \cong \text{sen} [\omega (t - r/c)] \cos \left[ \frac{\omega z}{2c} \cos \theta' \right] + \cos [\omega (t - r/c)] \text{sen} \left[ \frac{\omega z}{2c} \cos \theta' \right]. \quad (\text{C.23})$$

Usando novamente a Equação (C.11) temos

$$\text{sen} [\omega (t - \mathcal{R}_{\pm}/c)] \cong \text{sen} [\omega (t - r/c)] + \left( \frac{\omega z}{2c} \cos \theta' \right) \cos [\omega (t - r/c)]. \quad (\text{C.24})$$

Substituindo (C.24) e (C.22) em (C.19) encontramos uma expressão para o potencial vetor na forma

$$\mathbf{A}(r, \theta', t) = -\frac{\mu_0 p_0 \omega}{4\pi r} \text{sen} [\omega (t - r/c)] \hat{z}. \quad (\text{C.25})$$

Note que apesar de usar as Equações (C.6) e (C.11) mantendo somente os termos de primeira ordem em  $a$ , a Equação (C.25) não está sujeita a Equação (C.15).

A partir das Equações (C.16) e (C.25) podemos calcular o campo elétrico  $\mathbf{E}$  usando a relação [232]

$$\mathbf{E} = -\nabla V - \frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} = -\left( \frac{\partial V}{\partial r} \hat{r} + \frac{1}{r} \frac{\partial V}{\partial \theta'} \hat{\theta}' \right) - \frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t}. \quad (\text{C.26})$$

Calculando os termos encontramos

$$\begin{aligned} \nabla V &= -\frac{p_0 \omega}{4\pi \epsilon_0 c} \left\{ \cos \theta' \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{\text{sen} [\omega (t - r/c)]}{r} \right) + \left( \frac{\text{sen} [\omega (t - r/c)]}{r^2} \right) \frac{\partial}{\partial \theta'} (\cos \theta') \right\} \\ &= -\frac{p_0 \omega}{4\pi \epsilon_0 c} \left\{ \cos \theta' \left( -\frac{1}{r^2} \text{sen} [\omega (t - r/c)] - \frac{\omega}{rc} \cos [\omega (t - r/c)] \right) \hat{r} \right. \\ &\quad \left. - \frac{\sin \theta'}{r^2} \text{sen} [\omega (t - r/c)] \hat{\theta}' \right\} \\ &\cong \frac{p_0 \omega^2}{4\pi \epsilon_0 c^2} \left( \frac{\cos \theta'}{r} \right) \cos [\omega (t - r/c)] \hat{r} \end{aligned} \quad (\text{C.27})$$

onde usamos (C.15), e

$$\begin{aligned}\frac{\partial \mathbf{A}}{\partial t} &= -\frac{\mu_0 p_0 \omega}{4\pi r} \frac{\partial}{\partial t} (\text{sen} [\omega (t - r/c)]) \hat{z} \\ &= -\frac{\mu_0 p_0 \omega^2}{4\pi r} \cos [\omega (t - r/c)] \left( \cos \theta' \hat{r} - \text{sen} \theta' \hat{\theta}' \right).\end{aligned}\quad (\text{C.28})$$

Portanto, o campo elétrico  $\mathbf{E}$  pode ser escrito como

$$\mathbf{E}(r, \theta', t) = -\frac{\mu_0 p_0 \omega^2}{4\pi} \left( \frac{\text{sen} \theta'}{r} \right) \cos [\omega (t - r/c)] \hat{\theta}'. \quad (\text{C.29})$$

Usando a relação [232]

$$\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} = \frac{1}{r} \left[ \frac{\partial}{\partial r} (r A_{\theta'}) - \frac{\partial A_r}{\partial \theta'} \right] \hat{\phi}, \quad (\text{C.30})$$

podemos calcular os termos para o campo magnético  $\mathbf{B}$  na forma

$$\begin{aligned}\frac{\partial}{\partial r} (r A_{\theta'}) &= -\frac{\mu_0 p_0 \omega}{4\pi} \text{sen} \theta' \frac{\partial}{\partial r} (\text{sen} [\omega (t - r/c)]) \\ &= -\frac{\mu_0 p_0 \omega^2}{4\pi c} \text{sen} \theta' \cos [\omega (t - r/c)]\end{aligned}\quad (\text{C.31})$$

e

$$\begin{aligned}\frac{\partial A_r}{\partial \theta'} &= \frac{\mu_0 p_0 \omega}{4\pi r} \text{sen} [\omega (t - r/c)] \frac{\partial}{\partial \theta'} (\cos \theta') \\ &= -\frac{\mu_0 p_0 \omega}{4\pi r} \sin \theta' \sin [\omega (t - r/c)]\end{aligned}\quad (\text{C.32})$$

para reescrever o campo magnético (C.30) como (novamente estamos usando (C.15))

$$\mathbf{B}(r, \theta', t) = -\frac{\mu_0 p_0 \omega^2}{4\pi c} \left( \frac{\text{sen} \theta'}{r} \right) \cos [\omega (t - r/c)] \hat{\phi}. \quad (\text{C.33})$$

As Equações (C.29) e (C.33) representam ondas monocromáticas de frequência  $\omega$  viajando na direção radial à velocidade da luz.  $\mathbf{E}$  e  $\mathbf{B}$  estão em fase, mutuamente perpendiculares, transversos e a razão entre suas amplitudes é dada por  $E_0/B_0 = c$ . Tudo isto é precisamente o que esperamos para ondas eletromagnéticas no espaço livre. Entretanto, estas são ondas esféricas e sua amplitude decresce com  $1/r$ . Assim, para  $r \rightarrow \infty$  elas se tornam em boa aproximação ondas planas para pequenas regiões.

A energia irradiada por um dipolo elétrico oscilante é determinada pelo vetor de Poynting [232]

$$\mathbf{S} = \frac{1}{\mu_0} (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) = E_{\theta'} B_{\phi} \hat{r}. \quad (\text{C.34})$$

Dessa maneira, a energia irradiada toma a forma

$$\mathbf{S} = \frac{\mu_0}{c} \left\{ \frac{p_0 \omega^2}{4\pi} \left( \frac{\text{sen} \theta'}{r} \right) \cos [\omega (t - r/c)] \right\}^2 \hat{r}, \quad (\text{C.35})$$

e a intensidade da radiação é obtida através da média temporal sobre um ciclo completo

$$\begin{aligned} I &= \frac{\mu_0}{c} \left[ \frac{p_0 \omega^2}{4\pi} \left( \frac{\text{sen} \theta'}{r} \right) \right]^2 \int_0^\tau \cos^2 [\omega (t - r/c)] dt \hat{r} \\ &= \frac{\mu_0 p_0^2 \omega^4}{32\pi^2 c} \left( \frac{\text{sen}^2 \theta'}{r^2} \right) \hat{r}. \end{aligned} \quad (\text{C.36})$$

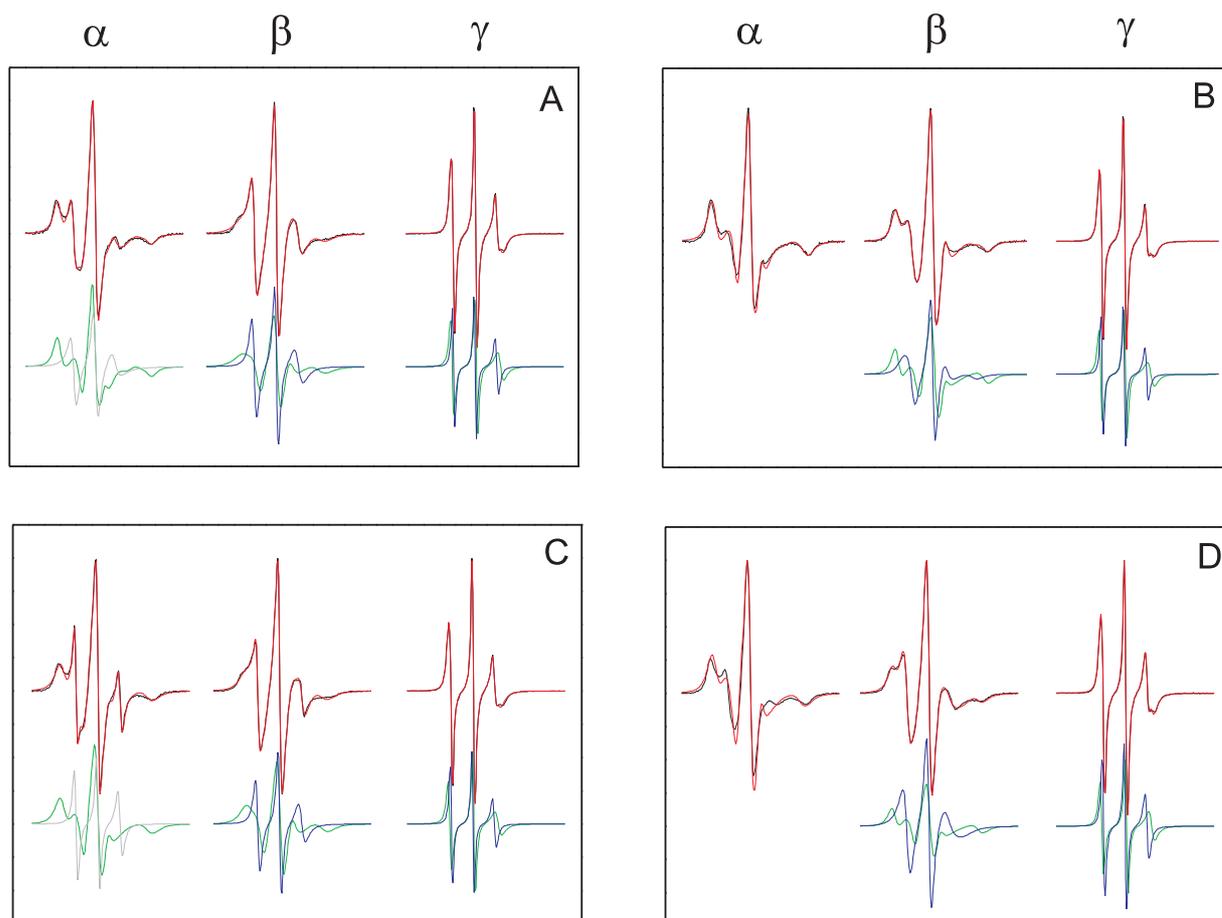
Dessa forma, encontramos que a intensidade da radiação emitida pelo fluoróforo é proporcional ao seno ao quadrado do ângulo  $\theta'$  entre o fluoróforo e o eixo  $z$  do sistema de coordenadas do laboratório.

Apêndice **D**

**Material Suplementar 1**

---

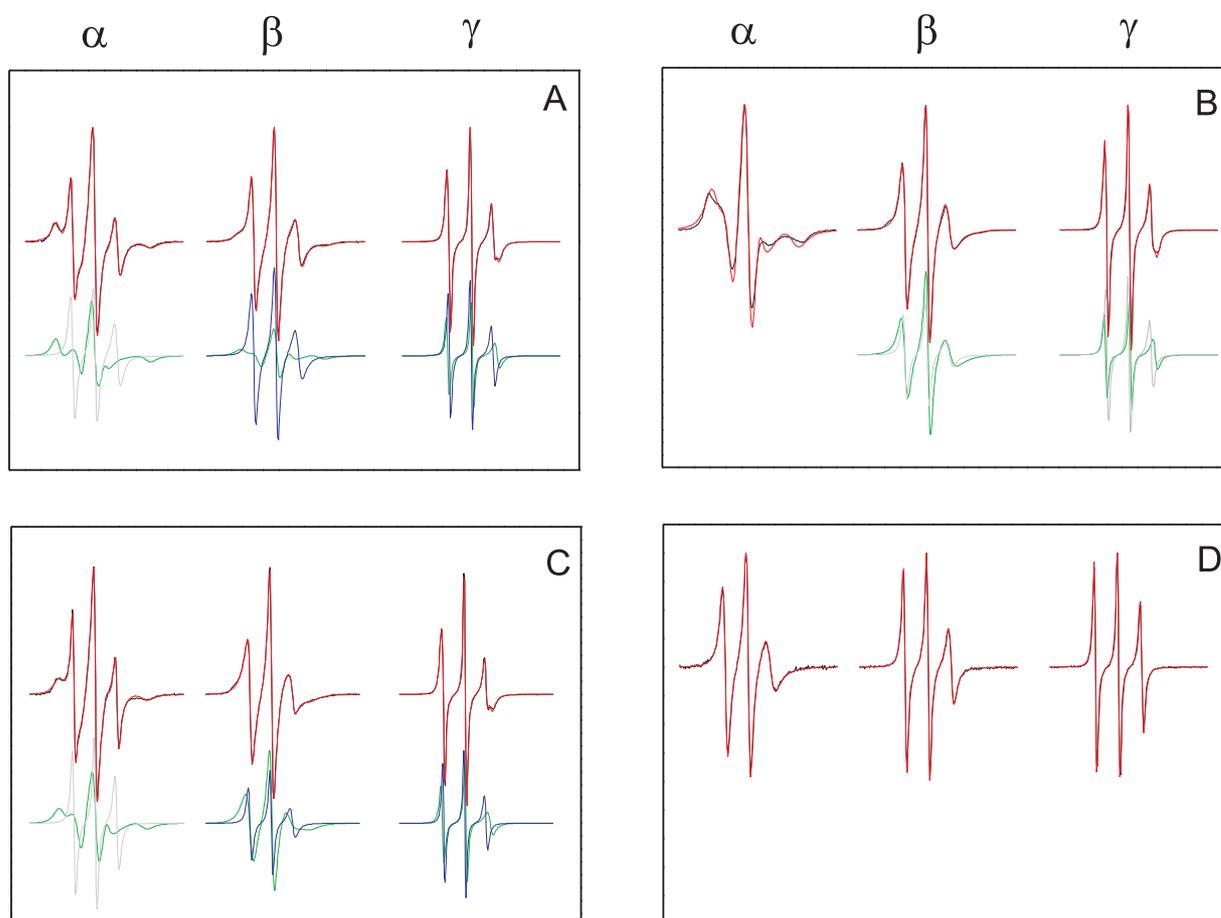
As Figuras D.1 e D.2 mostram o espectro experimental mais representativo, seu melhor ajuste e as respectivas componentes espectrais do marcador 5-DMS introduzido em membranas de DPPC tratadas com os diferentes terpenos na razão terpeno:lipídio 0,6:1 e 1,2:1 nos intervalos de temperatura  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Para a região  $\alpha$  os espectros das membranas tratadas com 1,8-cineol,



**Figura D.1:** Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,6:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2 respectivamente. A linha cinza representa o sinal dos marcadores incorporados nas micelas dos terpenos (componente 3). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

(+)-limoneno e nerolidol podem ser descritos como uma superposição das componentes C1/C3 ou C1/C2 para a razão 0,6:1. Para uma razão 1,2:1 os espectros da região  $\alpha$  das membranas tratadas com 1,8-cineol e (+)-limoneno podem ser ajustados pela combinação C1/C3 ao passo que as membranas tratadas com nerolidol passam a ser ajustados somente por C3. Já os espectros das amostras tratadas com  $\alpha$ -terpineol podem ser ajustados pela componente espectral

C1 para a razão 0,6:1 e C1/C3 para a razão 1,2:1.

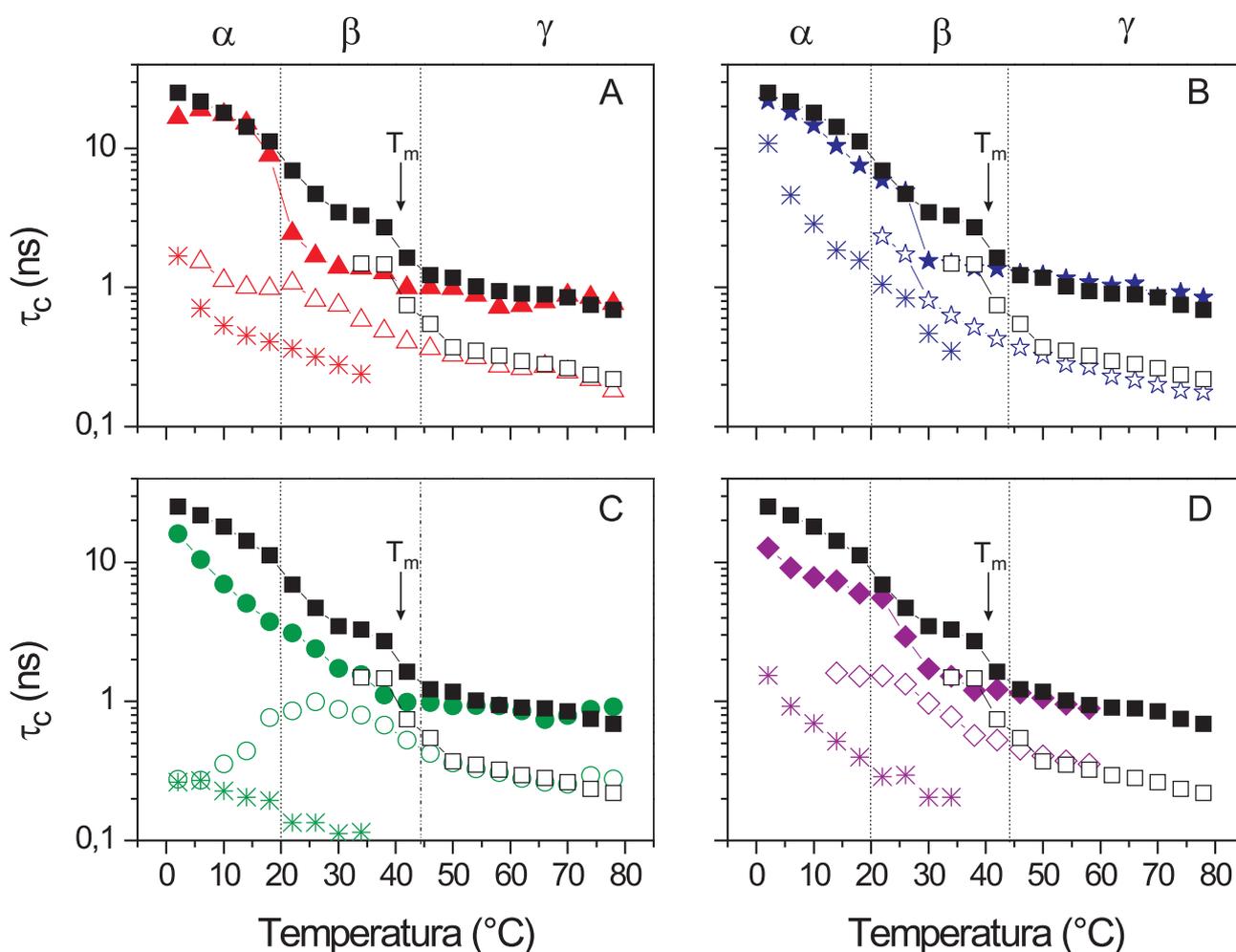


**Figura D.2:** Espectros de RPE (linhas pretas) e seus melhores ajustes (linhas vermelhas) do marcador 5-DMS incorporado nas bicamadas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (1,2:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. As linhas verde e azul representam as componentes espectrais 1 e 2 respectivamente. A linha cinza representa o sinal dos marcadores incorporados nas micelas dos terpenos (componente 3). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

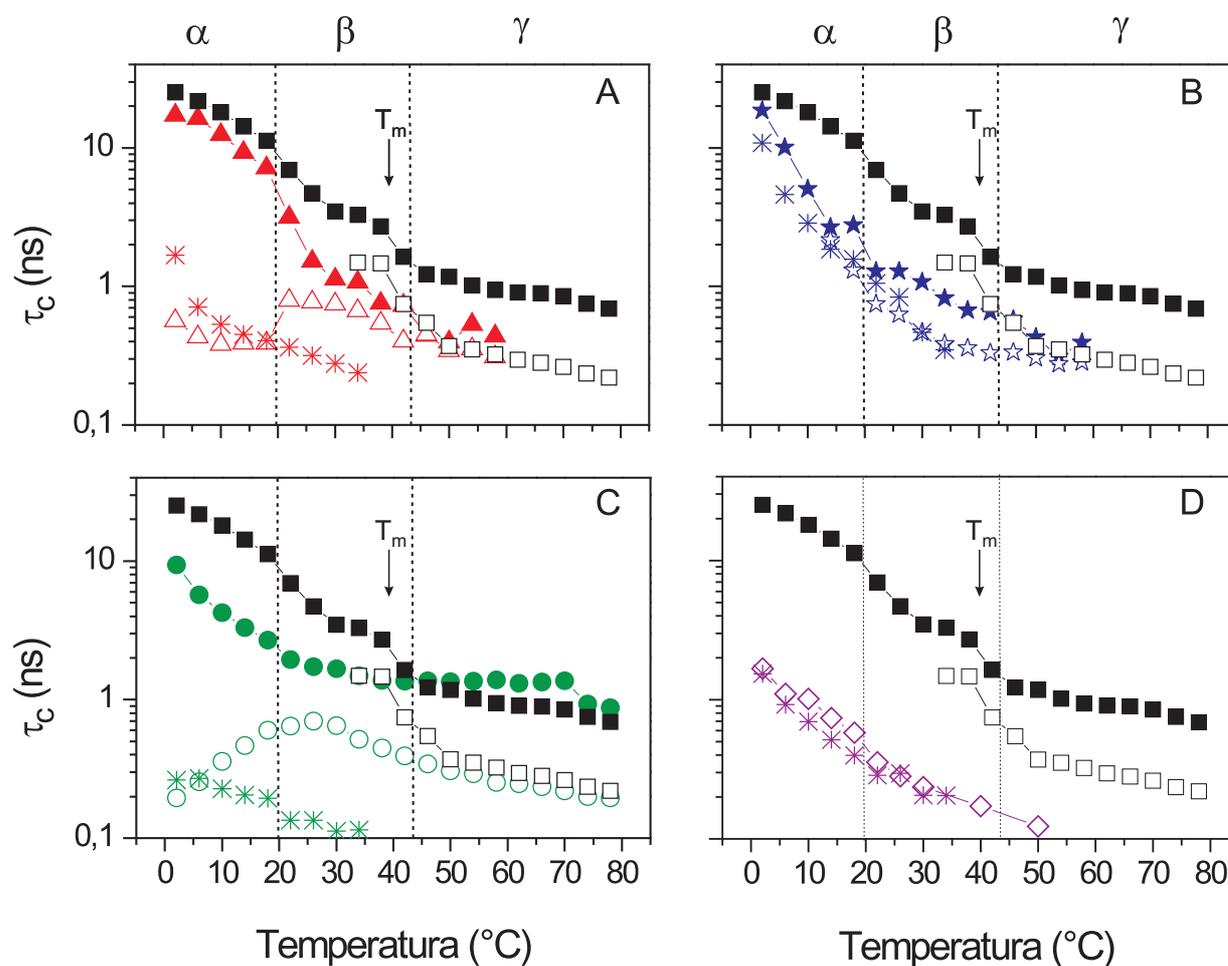
Para a região  $\beta$ , os espectros das membranas de DPPC podem ser sempre ajustados por uma combinação de C1/C2 para os terpenos 1,8-cineol e (+)-limoneno para as razões 0,6:1 e 1,2:1. Já os espectros das vesículas tratadas com  $\alpha$ -terpineol e nerolidol podem ser ajustados pela combinação de C1/C2 apenas para a razão (0,6:1) uma vez que para a razão (1,2:1) os espectros das membranas tratadas com  $\alpha$ -terpineol passam a ser ajustados pela combinação de C1/C3 enquanto os espectros das membranas tratadas com nerolidol são ajustados somente por C3. Para a região  $\gamma$ , na razão 0,6:1 os espectros das membranas de DPPC tratadas com todos os terpenos podem ser ajustadas por uma combinação de C1/C2. Para a razão 1,2:1,

os espectros das vesículas tratadas com 1,8-cineol e (+)-limoneno continuam sendo ajustados pela combinação C1/C2. Já os espectros das membranas tratadas com  $\alpha$ -terpineol passam a ser ajustados pela combinação C1/C3 e os espectros das bicamadas tratadas com nerolidol continuam a ser ajustados somente por C3.

As Figuras D.3 e D.4 mostram o comportamento do tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , como função da temperatura para as vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão 0,6:1 e 1,2:1.



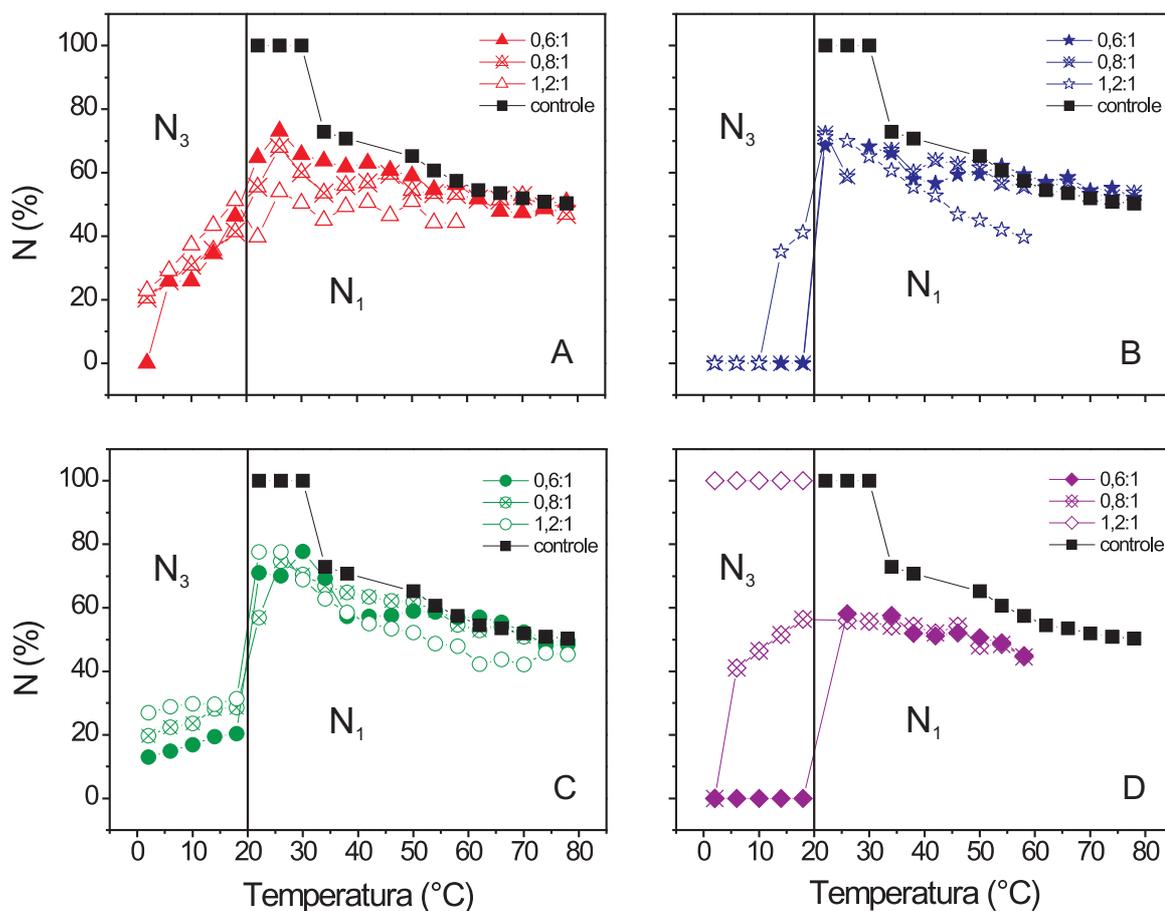
**Figura D.3:** Tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , para o marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (0,6:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. Os símbolos fechados referem-se a componente 1 e os símbolos abertos a componentes 2 ou 3. Os asteriscos representam os tempos de correlação rotacional dos marcadores dissolvidos nas micelas de terpeno. Os quadrados representam os tempos de correlação rotacional da amostra controle. As setas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$  °C) da amostra controle (sem terpeno). Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.



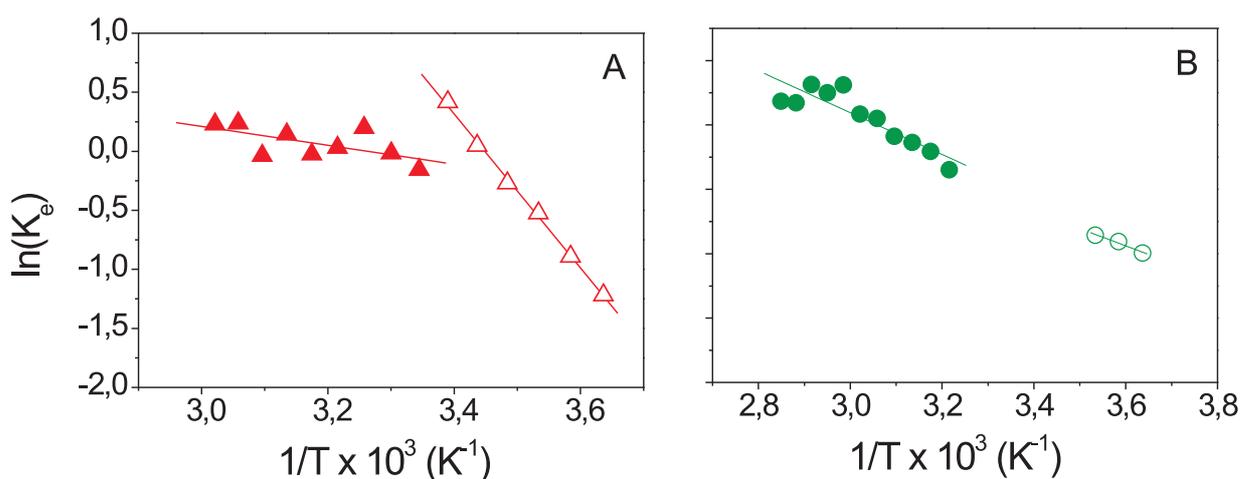
**Figura D.4:** Tempo de correlação rotacional,  $\tau_c$ , para o marcador 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos na razão (1,2:1) terpeno:lipídio nos intervalos de temperatura  $\alpha=0-20$  °C,  $\beta=20-45$  °C e  $\gamma=45-80$  °C. Os símbolos fechados referem-se a componente 1 e os símbolos abertos a componentes 2 ou 3. Os asteriscos representam os tempos de correlação rotacional dos marcadores dissolvidos nas micelas de terpeno. Os quadrados representam os tempos de correlação rotacional da amostra controle. As setas indicam a temperatura da transição de fase principal ( $T_m = 41,4$  °C) da amostra controle (sem terpeno). Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

Na Figura D.5 está representado o comportamento das populações relativas do marcador de spin 5-DMS incorporado em membranas de DPPC tratadas com os terpenos 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, (+)-limoneno e nerolidol. O aumento gradual da razão terpeno:lipídio facilita a transferência dos marcadores de spin de C1 para C3 ou de C1 para C2 (dependendo da faixa de temperatura e do terpeno analisado).

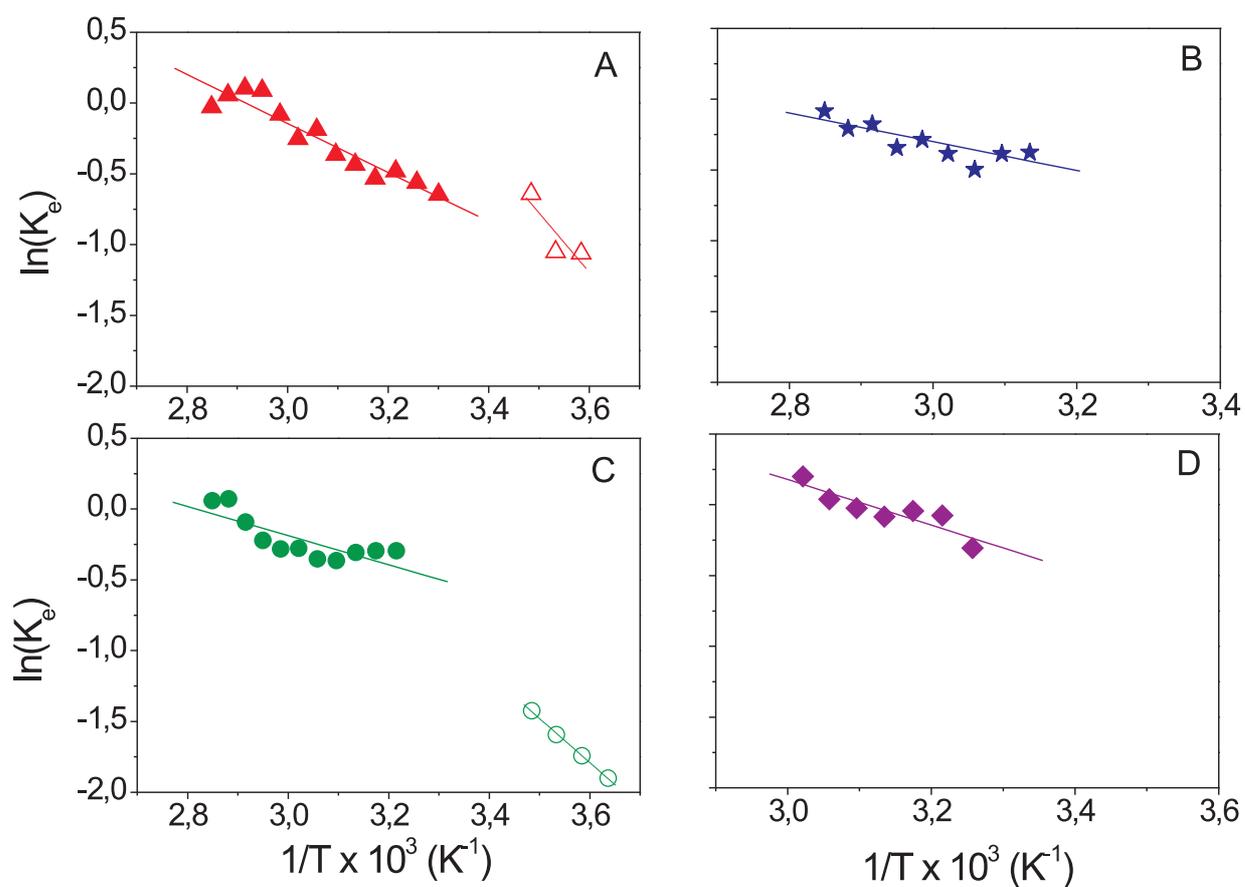
Nas Figuras D.6 e D.7 estão representados o comportamento do logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio,  $K_e$  como função da temperatura absoluta para as amostras tratadas com os terpenos na razão 1,2:1 e 0,6:1, respectivamente.



**Figura D.5:** Populações relativas do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com os terpenos.  $N_3$  e  $N_1$  dizem respeito às frações de marcadores de spin nas componentes 3 e 1 respectivamente. Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.



**Figura D.6:** Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio,  $K_e$ , calculado com base nas populações  $N_1$ ,  $N_2$ , e  $N_3$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com terpenos na razão (1,2:1) terpeno:lipídio como função da temperatura absoluta. Os símbolos abertos equivalem a  $K_e = (N_3/N_1)$  e os símbolos fechados a  $K_e = (N_2/N_1)$ . Painéis: A, 1,8-cineol; B, (+)-limoneno.



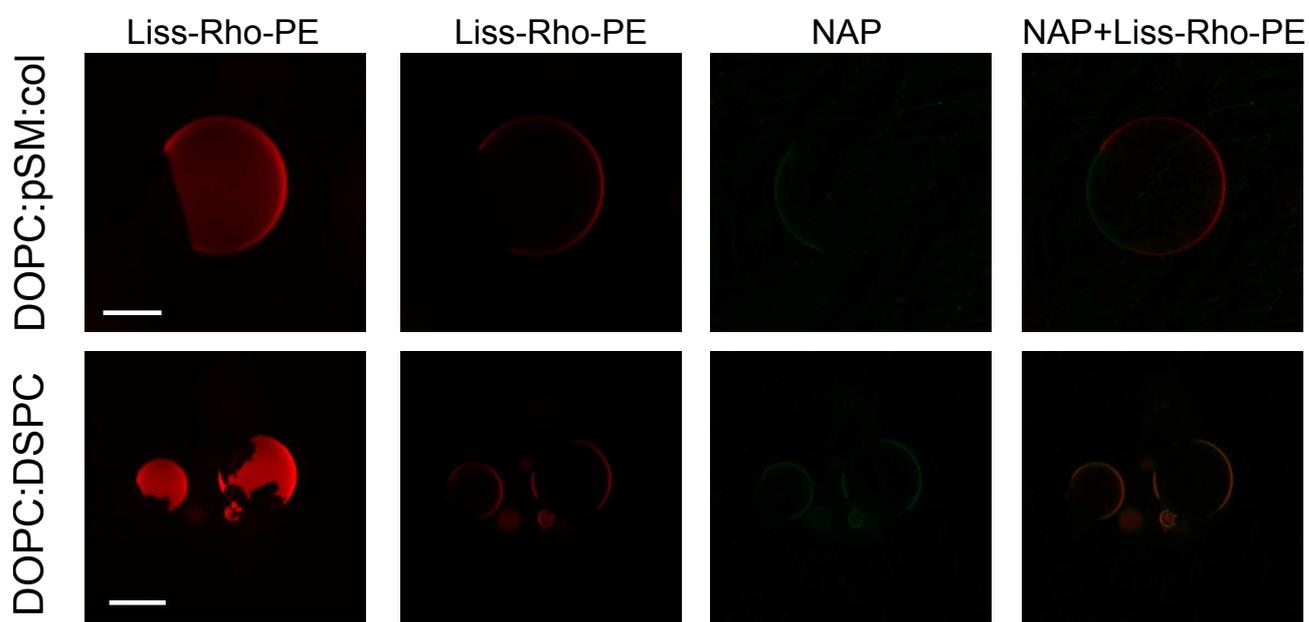
**Figura D.7:** Logaritmo natural do coeficiente de partição no equilíbrio,  $K_e$ , calculado com base nas populações  $N_1$ ,  $N_2$ , e  $N_3$ , do marcador de spin 5-DMS incorporado em vesículas de DPPC tratadas com terpenos na razão (0,6:1) terpeno:lipídio como função da temperatura absoluta. Os símbolos abertos equivalem a  $K_e = (N_3/N_1)$  e os símbolos fechados a  $K_e = (N_2/N_1)$ . Painéis: A, 1,8-cineol; B,  $\alpha$ -terpineol; C, (+)-limoneno; D, nerolidol.

Apêndice **E**

**Material Suplementar 2**

---

Como demonstrado por Baumgart e co-autores [233], sondas aromáticas policíclicas tais como o NAP particionam-se preferencialmente na fase líquida-ordenada pois são capazes de se incorporar nas bicamadas sem alterar o empacotamento lipídico. Por outro lado, sondas fluorescentes ligadas a fosfolipídios de cadeia saturada, tais como a Liss-Rho-PE particionam-se preferencialmente na fase líquida-desordenada. Na Figura E.1 estão apresentadas imagens de microscopia confocal de GUV's compostas de DOPC:pSM:col (2:1:1) e DOPC:DSPC (1:1) marcadas com as sondas Liss-Rho-PE e NAP. Como pode ser observado, na presença das fases  $l_d$

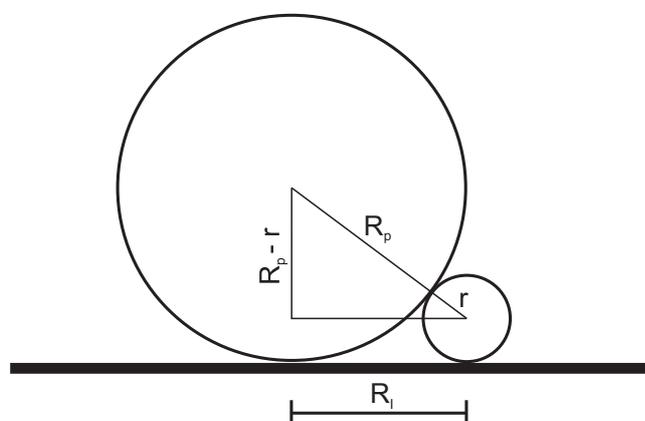


**Figura E.1:** Micrografias de fluorescência (imagem 3D e plano equatorial) de vesículas unilamelares gigantes marcadas com as sondas Liss-Rho-PE e NAP e compostas de pSM:col, DOPC:pSM:col, POPC e DOPC:DSPC. As amostras foram preparadas de acordo com a seção 7.2.3 com a adição de 0,5 mol% da sonda fluorescente NAP (comprimento de excitação de 457 nm). As imagens foram adquiridas à temperatura ambiente através de dois canais de detecção equipados com filtros de  $593\pm 20$  nm (Liss-Rho-PE) e  $485\pm 20$  nm (NAP). A barra de escala equivale a  $10\ \mu\text{M}$ .

e  $l_o$  a sonda Liss-Rho-PE particiona-se preferencialmente na fase  $l_d$  enquanto a NAP particiona-se preferencialmente na fase  $l_o$ . Por outro lado, na presença das fases gel e  $l_d$  ambas as sondas encontram-se particionadas na fase  $l_d$ . Desta maneira, em amostras marcadas somente com Liss-Rho-PE onde existe a co-existência de fases  $l_d/l_o$  ou  $l_d/\text{gel}$ , os domínios ordenados excluem a sonda e são representados nas imagens de microscopia confocal por zonas negras.

Em experimentos de AFM nos quais a dimensão do objeto de estudo é muito menor

do que a dimensão da ponta utilizada, a imagem adquirida é na verdade uma convolução da geometria da ponta com a topografia do objeto de estudo. Uma série de métodos foram desenvolvidos para a recuperação da real topografia das amostras (deconvolução da ponta) [234]. Neste trabalho porém, estamos interessados somente em um valor aproximado para o diâmetro das nanopartículas AURORA-DSG inseridas em diferentes composições lipídicas. Desta forma, podemos estimar o efeito da convolução da ponta sobre as imagens de AFM utilizando o esquema descrito na Figura E.2. Portanto, o raio da imagem de AFM pode ser descrito como (assumindo



**Figura E.2:** Esquema ilustrativo da determinação do raio da imagem de um corpo menor do que a ponta de AFM. Por simplicidade, a ponta de AFM foi aproximada para uma esfera.

que a ponta tenha uma forma esférica)

$$(R_p + r)^2 = R_I^2 + (R_p - r)^2$$

$$R_I = 2\sqrt{R_p r}. \quad (\text{E.1})$$

Uma vez que as pontas utilizadas neste trabalho possuíam um raio nominal de 20 nm e a parte metálica das nanopartículas AURORA-DSG um raio de 1,39 nm (ambos os raios especificados pelos respectivos fabricantes) a Equação (E.1) nos fornece um raio para a imagem de AFM de 15 nm.

Apêndice **F**

Publicações

---

### Publicações Referentes a esta Tese

1. Mendanha, SA; Moura, SS; Anjos, JLV; Valadares, MC e Alonso, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicol In Vitro*, **27**, 323-329, 2013, doi:10.1016/j.tiv.2012.08.022.

### Manuscritos Referentes a esta Tese em Preparação

1. Mendanha, SA e Alonso, A. Effects of Terpenes on the Spectral Components of Spin Labels Incorporated into Model Membranes.
2. Mendanha, SA; Marquezin, CA e Alonso, A. Effects of Nerolidol in Model and Stratum Corneum Membranes Studied by the Fluorescence Anisotropy of Lipophilic Probes.
3. Mendannha, SA; García-Arribas, AB; Sot, J e Goñi, FM. Interaction of Gold Nanoparticles AURORA-DSG with Model Membranes.

### Demais Publicações Durante o Período de Doutorado

1. Alonso, L; Mendanha, SA; Marquezin, CA; Berardi, M; Ito, AS; Acuña, AU e Alonso, A. Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. *Int J Pharm*, **434**, 391-398, 2012, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.006.
2. Mendanha da Cunha, CR; Mendanha, SA; Carlos da Silva, C; Cortez, AP; Gomes, MN; Martins, FI; Alonso, A; Rezende, KR; Menegatti, R; de Magalhães, MTQ e Valadares, MC. 4-Nerolidylcatechol and its synthetic analogues: Antioxidant activity and toxicity evaluation. *Eur J Med Chem*, **62**, 371-378, 2012, doi:10.1016/j.ejmech.2012.12.028.
3. Fernandes, KS; Silva, AHM; Mendanha, SA; Rezende, KR e Alonso, A. Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and  $\alpha$ -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. *Braz J Med Biol Res*, **46**, 780-788, 2013, doi:10.1590/1414-431X20132940.

4. Moreira, RA; Mendanha, SA; Hansen, D e Alonso, A. Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. *J Pharm Sci*, **102**, 1661-1669, 2013, doi:10.1002/jps.
5. Moreira, RA; Mendanha, SA; Fernandes, KS; Matos, GG; Alonso, L; Dorta, ML e Alonso, A. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in Leishmania membranes at similar concentrations to those needed for cytotoxicity activity. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**, 3021-3028, 2014, doi:10.1128/AAC.01332-13.

#### Manuscritos Submetidos Durante o Período de Doutorado

1. Camargos, HS; Moreira, RA; Mendanha, SA; Fernandes, KS; Dorta, ML e Alonso, A. Terpenes increase the lipid dynamics in plasma Leishmania membrane at concentrations similar to their IC<sub>50</sub>.

## Referências

---

- [1] SA Pandit e HL Scott. *Soft Matter: Lipid Bilayers and Red Blood Cells*, capítulo Simulations and Models of Lipid Bilayers. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [2] AL Boscia, BW Treece, D Mohammadyani, J Klein-Seetharaman, AR Braun, TA Wassenaar, B Klösgen, e S Tristram-Nagle. X-ray Structure, Thermodynamics, Elastic Properties and MD Simulations of Cardiolipin/dimyristoylphosphatidylcholine Mixed Membranes. *Chem Phys Lipids*, **178**, 1–10, 2014.
- [3] G Lindblom e G Orädd. Lipid Lateral Diffusion and Membrane Heterogeneity. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 234–244, 2009.
- [4] SN Pinto, LC Silva, RFM de Almeida, e M Prieto. Membrane Domain Formation, Interdigitation, and Morphological Alterations Induced by the Very Long Chain Asymmetric C24:1 Ceramide. *Biophys J*, **95**, 2867–2879, 2008.
- [5] SJ Singer e GL Nicolson. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, **175**, 720–731, 1972.
- [6] S Munro, H Road, e U Kingdom. Lipid Rafts: Eelusive or Illusive? *Cell*, **115**, 377–388, 2003.
- [7] Y Lange, MH Swaisgood, BV Ramos, e TL Steck. Plasma Membranes Contain Half the Phospholipid and 90Cholesterol and Sphingomyelin in Cultured Human Fibroblasts. *J Biol Chem*, **264**, 3786–3793, 1989.
- [8] G van Meer. Lipid Traffic in Animal Cells. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 247–275, 1989.
- [9] K Simons e G van Meer. Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry*, **27**, 6197–6202, 1988.
- [10] MS Bretscher. Membrane Structure: Some General Principles. *Science*, **181**, 622–629, 1973.
- [11] TL Steck, J Ye, e Y Lange. Probing Red Cell Membrane Cholesterol Movement With Cyclodextrin. *Biophys J*, **83**, 2118–2125, 2002.

- [12] KNJ Burger. Greasing Membrane Fusion and Fission Machineries. *Traffic*, **1**, 605–613, 2000.
- [13] K Simons e WLC Vaz. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269–295, 2004.
- [14] J Silvius. Role of Cholesterol in Lipid Raft Formation: Lessons From Lipid Model Systems. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 174–183, 2003.
- [15] TPWW McMullen, RNAH Lewis, e RN McElhaney. Cholesterol-phospholipid Interactions, The Liquid-ordered Phase and Lipid Rafts in Model and Biological Membranes. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, **8**, 459–468, 2004.
- [16] JC Owicki e HM McConnell. Lateral Diffusion in Inhomogeneous Membranes: Model Membranes Containing Cholesterol. *Biophys J*, **30**, 383–397, 1980.
- [17] KE Brown e CA Knudsen. Oxidized Heme Proteins in an Animal Model of Hemochromatosis. *Free Radic Biol Med*, **24**, 239–44, 1998.
- [18] H Ohvo-Rekilä, B Ramstedt, P Leppimäki, e JP Slotte. Cholesterol Interactions With Phospholipids in Membranes. *Prog Lipid Res*, **41**, 66–97, 2002.
- [19] B Ramstedt e JP Slotte. Membrane Properties of Sphingomyelins. *FEBS Lett*, **531**, 33–37, 2002.
- [20] PF Devaux, A Herrmann, N Ohlwein, e MM Kozlov. How Lipid Flippases Can Modulate Membrane Structure. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1591–1600, 2008.
- [21] DM Engelman. Membranes are More Mosaic than Fluid. *Nature*, **438**, 578–580, 2005.
- [22] R Lipowsky. Domains and Rafts in Membranes - Hidden Dimensions of Selforganization. *J Biol Phys*, **28**, 195–210, 2002.
- [23] PFF Almeida, A Pokorny, e A Hinderliter. Thermodynamics of Membrane Domains. *Biochim Biophys Acta*, **1720**, 1–13, 2005.
- [24] R Jerala, PFF Almeida, e RL Biltonen. Simulation of the Gel-Fluid Transition in a Membrane Composed of Lipids with Two Connected Acyl Chains: Application of a Dimer-Move Step. *Biophys J*, **71**, 609–615, 1996.
- [25] OG Mouritsen e M Bloom. Mattress Model of Lipid-protein Interactions in Membranes. *Biophys J*, **46**, 141–153, 1982.

- [26] FM Goñi, A Alonso, LA Bagatolli, RE Brown, D Marsh, M Prieto, e JL Thewalt. Phase Diagrams of Lipid Mixtures Relevant to the Study of Membrane Rafts. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 665–684, 2008.
- [27] RFM de Almeida, A Fedorov, e M Prieto. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts. *Biophys J*, **85**, 2406–2416, 2003.
- [28] AD Bangham e RW Horne. Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol*, **8**, 660–668, 1964.
- [29] F Szoka e D Papahadjopoulos. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng*, **9**, 467–508, 1980.
- [30] J Sot, M Ibarguren, JV Busto, L Montes, FM Goñi, e A Alonso. Cholesterol Displacement by Ceramide in Sphingomyelin-containing Liquid-ordered Domains, and Generation of Gel Regions in Giant Lipidic Vesicles. *FEBS Lett*, **582**, 3230–3236, 2008.
- [31] JP Reeves e RM Dowben. Formation and Properties of Thin-walled Phospholipid Vesicles. *J Cell Physiol*, **73**, 49–60, 1969.
- [32] MI Angelova e DS Dimitrov. Liposome Electroformation. *Faraday Discuss*, **81**, 303–311, 1986.
- [33] LA Bagatolli. Thermotropic Behavior of Lipid Mixtures Studied at the Level of Single Vesicles: Giant Unilamellar Vesicles and Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. In *Liposomes, Part A*. Academic Press, 2003.
- [34] Z Ma, PA Janmey, KA Sharp, e TH Finkel. Improved Method of Preparation of Supported Planar Lipid Bilayers as Artificial Membranes for Antigen Presentation. *Microsc Res Tech*, **74**, 1174–1185, 2011.
- [35] HM McConnell, TH Watts, RM Weis, e AA Brian. Supported Planar Membranes in Studies of Cell-cell Recognition in the Immune System. *Biochim Biophys Acta*, **864**, 95–106, 1986.
- [36] J Jass, T Tjärnhage, e G Puu. From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: an Atomic Force Microscopy Study. *Biophys J*, **79**, 3153–3163, 2000.
- [37] G Puu e I Gustafson. Planar Lipid Bilayers on Solid Supports From Liposomes - Factors of Importance for Kinetics and Stability. *Biochim Biophys Acta*, **1327**, 149–161, 1997.

- [38] E Reimhult, F Höök, e B Kasemo. Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure. *Langmuir*, **19**, 1681–1691, 2003.
- [39] TM Bayerl e M Bloom. Physical Properties of Single Phospholipid Bilayers Adsorbed to Micro Glass Beads. A New Vesicular Model System Studied by <sup>2</sup>H-nuclear Magnetic Resonance. *Biophys J*, **58**, 357–362, 1990.
- [40] J Gaudioso e DY Sasaki. Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, capítulo Nanostructure and Dynamic Organization of Lipid Membranes. Taylor & Francis, 2013.
- [41] Y Yawata. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- [42] MYB Çimen. Free Radical Metabolism in Human Erythrocytes. *Clin Chim Acta*, **390**, 1–11, 2008.
- [43] Annie Cavanagh. Wellcome Images, <http://images.wellcome.ac.uk/>, 2006.
- [44] B Alberts. Molecular Biology of the Cell, capítulo Histology: The Lives and Deaths of Cells in Tissues. Garland Science, 2002.
- [45] B Alberts. Molecular Biology of the Cell, capítulo Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. Garland Science, 2002.
- [46] David Becker. Wellcome Images, <http://images.wellcome.ac.uk/>, 2006.
- [47] J Baum e HS Duffy. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we Talking About? *J Cardiovasc Pharmacol*, **57**, 376–379, 2011.
- [48] JM Sorrell e AI Caplan. Fibroblast Heterogeneity: More Than Skin Deep. *J Cell Sci*, **117**, 667–75, 2004.
- [49] GJ Todaro e H Green. Quantitative Studies of the Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and Their Development Into Established Lines. *J Cell Biol*, **17**, 299–313, 1963.
- [50] Veronika Burmeister. Visuals Unlimited, <http://www.visualsunlimited.com>, 2007.
- [51] JA Bouwstra, PL Honeywell-nguyen, GS Gooris, e M Ponec. Structure of the Skin Barrier and its Modulation by Vesicular Formulations. *Prog Lipid Res*, **42**, 1–36, 2003.
- [52] PA Bowser, RJ White, e DH Nugteren. Location and Nature of the Epidermal Permeability Barrier. *Int J Cosm Sci*, **8**, 125–134, 1986.

- [53] PM Elias e GK Menon. Structural and Lipid Biochemical Correlates of the Epidermal Permeability Barrier. *Adv in Lip Res*, **24**, 1–26, 1991.
- [54] DT Downing. Lipid and Protein Structures in the Permeability Barrier of Mammalian Epidermis. *J Lip Res*, **33**, 301–313, 1992.
- [55] JA Bouwstra e M Ponec. The skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 2080–2095, 2006.
- [56] AS Breathnach, T Goodman, C Stolinski, e M Gross. Freeze-fracture Replication of Cells of Stratum Corneum of Human Epidermis. *J Anat*, **114**, 65–81, 1973.
- [57] AS Breathnach. Aspects of Epidermal Ultrastructure. *J Clin Invest*, **65**, 2–15, 1975.
- [58] B Ongpipattanakul, ML Francoeur, e RO Potts. Polymorphism in Stratum Corneum Lipids. *Biochim Biophys Acta*, **1190**, 115–122, 1994.
- [59] CL Gay, Guy RH, GM Golden, VH Mak, e ML Francoeur. Characterization of Low-temperature (i.e., < 65 Degrees C) Lipid Transitions in Human Stratum Corneum. *Journal of Invest Dermatol*, **103**, 233–239, 1994.
- [60] DC Swartzendruber, PW Wertz, DJ Kitko, KC Madison, e DT Downing. Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum Corneum. *J Invest Dermatol*, **92**, 251–257, 1989.
- [61] J a Bouwstra, GS Gooris, FER Dubbelaar, e M Ponec. Phase Behavior of Stratum Corneum Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: the Role of Natural and Synthetic Ceramide 1. *J Invest Dermatol*, **118**, 606–617, 2002.
- [62] JR Hill e PW Wertz. Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae From Epidermal Stratum Corneum. *Biochim Biophys Acta*, **1616**, 121–126, 2003.
- [63] DC Swarzendruber, PW Wertz, KC Madison, e DT Downing. Evidence that the Corneocyte has a Chemically Bound Lipid Envelope. *J Invest Dermatol*, **88**, 709–713, 1987.
- [64] RW Klecker, JM Collins, R Yarchoan, R Thomas, JF Jenkins, S Broder, e CE Myers. Plasma and Cerebrospinalfluid Pharmacokinetics of 3V-azido-3V-deoxythymidine: a Novel Pyrimidine analog with Potential Application for the Treatment of Patients with AIDS and Related Diseases. *Clin Pharmacol Ther*, **41**, 407–412, 1987.
- [65] DM Ruthven. *Molecular Sieves Science and Technology*, capítulo Fundamentals of Adsorption Equilibrium and Kinetics in Microporous Solids. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

- [66] ME Lane. Skin Penetration Enhancers. *Int J Pharm*, **447**, 12–21, 2013.
- [67] T Higuchi. Physical Chemical Analysis of Percutaneous Absorption Process From Creams and Ointments. *J Soc Cosmet Chem*, **11**, 85–97, 1960.
- [68] ME Lane, P Santos, AC Watkinson, e J Hadgraft. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*, capítulo Passive Skin Permeation Enhancement. John Wiley & Sons, Inc, 2011.
- [69] AC Williams e BW Barry. Penetration Enhancers. *Adv Drug Delivery Rev*, **56**, 603–618, 2004.
- [70] SS Godavarthy, KM Yerramsetty, VK Rachakonda, BJ Neely, SV Madihally, RL Robinson, e KAM Gasem. Design of Improved Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *J Pharm Sci*, **98**, 4085–4099, 2009.
- [71] H Törmä, M Lindberg, e B Berne. Skin Barrier Disruption by Sodium Lauryl Sulfate-exposure Alters the Expressions of Involucrin, Transglutaminase 1, Profilaggrin, and Kallikreins During the Repair Phase in Human Skin in Vivo. *J Invest Dermatol*, **128**, 1212–1219, 2008.
- [72] M Artusi, S Nicoli, P Colombo, R Bettini, A Sacchi, e P Santi. Effect of Chemical Enhancers and Iontophoresis on Thiocolchicoside Permeation Across Rabbit and Human Skin in Vitro. *J Pharm Sci*, **93**, 2431–2438, 2004.
- [73] P Santos, AC Watkinson, J Hadgraft, e ME Lane. Formulation Issues Associated With Transdermal Fentanyl Delivery. *Int J Pharm*, **416**, 155–159, 2011.
- [74] M Dias, A Naik, RH Guy, J Hadgraft, e ME Lane. In Vivo Infrared Spectroscopy Studies of Alkanol Effects on Human Skin. *Eur J Pharm Biopharm*, **69**, 1171–1175, 2008.
- [75] P Santos, AC Watkinson, J Hadgraft, e ME Lane. Influence of Penetration Enhancer on Drug Permeation From Volatile Formulations. *Int J Pharm*, **439**, 260–268, 2012.
- [76] IT Degim, A Uslu, J Hadgraft, T Atay, C Akay, e S Cevheroglu. The Effects of Azone and Capsaicin on the Permeation of Naproxen Through Human Skin. *Int J Pharm*, **179**, 21–25, 1999.
- [77] STK Narishetty e R Panchagnula. Transdermal Delivery of Zidovudine: Effect of Terpenes and Their Mechanism of Action. *J Controlled Release*, **95**, 367–79, 2004.
- [78] JLV dos Anjos e A Alonso. Terpenes Increase the Partitioning and Molecular Dynamics of an Amphipathic Spin Label in Stratum Corneum Membranes. *Int J Pharm*, **350**, 103–112, 2008.

- [79] AF El-Kattan, CS Asbill, e BB Michniak. The Effect of Terpene Enhancer Lipophilicity on the Percutaneous Permeation of Hydrocortisone Formulated in HPMC Gel Systems. *Int J Pharm*, **198**, 179–189, 2000.
- [80] AK Jain, NS Thomas, e R Panchagnula. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I. Effect of terpenes. *J Controlled Release*, **79**, 93–101, 2002.
- [81] DJ McGarvey e R Croteau. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1015–1026, 1995.
- [82] JLV Anjos, DS Neto, e A Alonso. Effects of 1,8-cineole on the Dynamics of Lipids and Proteins of Stratum Corneum. *Int J Pharm*, **345**, 81–87, 2007.
- [83] HS Camargos, AHM Silva, JLV Anjos, e A Alonso. Molecular Dynamics and Partitioning of Di-tert-butyl Nitroxide in Stratum Corneum Membranes: Effect of Terpenes. *Lipids*, **45**, 419–427, 2010.
- [84] JLV dos Anjos, D de Sousa Neto, e A Alonso. Effects of Ethanol/l-menthol on the Dynamics and Partitioning of Spin-labeled Lipids in the Stratum Corneum. *Eur J Pharm Biopharm*, **67**, 406–412, 2007.
- [85] PL Crowell. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. *J Nutr*, **129**, 775S–778S, 1999.
- [86] Roslin J Thoppil e Anupam Bishayee. Terpenoids as Potential Chemopreventive and Therapeutic Agents in Liver Cancer. *World J Hepatol*, **3**, 228–249, 2011.
- [87] T Rabi e A Bishayee. Terpenoids and Breast Cancer Chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat*, **115**, 223–239, 2009.
- [88] CL Cantrell, SG Franzblau, e NH Fischer. Antimycobacterial Plant Terpenoids. *Planta Med*, **67**, 685–694, 2001.
- [89] B Oliva, E Piccirilli, T Ceddia, E Pontieri, P Aureli, e AM Ferrini. Antimycotic Activity of Melaleuca Alternifolia Essential Oil and its Major Components. *Lett Appl Microbiol*, **37**, 185–7, 2003.
- [90] DC Arruda, DC Miguel, JK Yokoyama-Yasunaka, AM Katzin, e SR Uliana. Inhibitory Activity of Limonene Against Leishmania Parasites in Vitro and in Vivo. *Biomed Pharmacother*, **63**, 643–649, 2009.
- [91] DC Arruda, AM Katzin, e SRB Uliana. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 1679–1687, 2005.

- [92] GM Cragg e DJ Newman. Plants as a Source of Anti-cancer and Anti-HIV Agents. *Ann Appl Biol*, **143**, 127–133, 2003.
- [93] AN Yamada, R Grespan, AT Yamada, EL Silva, SE Silva-Filho, MJ Damião, MMO Dalalio, CA Bersani-Amado, e RKN Cuman. Anti-inflammatory Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil in Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis. *Am J Chin Med*, **41**, 913–926, 2013.
- [94] P Karande, AK Jain, K Ergun, V Kispersky, e S Mitragotri. Design Principles of Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4688–4693, 2005.
- [95] M Oyasu, M Fujimiya, K Kashiwagi, S Ohmori, H Imaeda, e N Saito. Immunogold Electron Microscopic Demonstration of Distinct Submembranous Localization of the Activated GammaPKC Depending on the Stimulation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, **56**, 253–265, 2008.
- [96] E Bos, C Sant’Anna, H Gnaegi, RF Pinto, RBG Ravelli, AJ Koster, W de Souza, e PJ Peters. A New Approach to Improve the Quality of Ultrathin Cryo-sections; its Use for Immunogold EM and Correlative Electron Cryo-tomography. *Journal of Structural Biology*, **175**, 62–72, 2011.
- [97] NJ Durr, T Larson, DK Smith, BA Korgel, K Sokolov, e A Ben-Yakar. Two-Photon Luminescence Imaging of Cancer Cells Using Molecularly Targeted Gold Nanorods. *Nano Lett*, **7**, 941–945, 2007.
- [98] IE Allijn, W Leong, J Tang, A Gianella, AJ Mieszawska, F Fay, G Ma, S Russell, CB Callo, RE Gordon, E Korkmaz, JA Post, Y Zhao, HC Gerritsen, A Thran, R Proksa, H Daerr, G Storm, V Fuster, EA Fisher, Z a Fayad, WJM Mulder, e DP Cormode. Gold Nanocrystal Labeling Allows Low-density Lipoprotein Imaging From the Subcellular to Macroscopic Level. *ACS Nano*, **7**, 9761–9770, 2013.
- [99] MF Kircher, A de la Zerda, JV Jokerst, CL Zavaleta, PJ Kempen, E Mittra, K Pitter, R Huang, C Campos, F Habte, R Sinclair, CW Brennan, IK Mellinghoff, EC Holland, e S Gambhir. A Brain Tumor Molecular Imaging Strategy Using a New Triple-modality MRI-photoacoustic-Raman Nanoparticle. *Nature Medicine*, **18**, 829–834, 2012.
- [100] X Huang, IH El-Sayed, W Qian, e MA El-Sayed. Cancer Cells Assemble and Align Gold Nanorods Conjugated to Antibodies to Produce Highly Enhanced, Sharp, and Polarized Surface Raman Spectra: A Potential Cancer Diagnostic Marker. *Nano Lett*, **7**, 1591–1597, 2007.

- [101] S Keren, C Zavaleta, Z Cheng, A de la Zerda, O Gheysens, e SS Gambhir. Noninvasive Molecular Imaging of Small Living Subjects Using Raman Spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5844–5849, 2008.
- [102] JF Hainfeld, DN Slatkin, TM Focella, e HM Smilowitz. Gold Nanoparticles: a New X-ray Contrast Agent. *The British Journal of Radiology*, **79**, 248–253, 2006.
- [103] MM van Schooneveld, DP Cormode, R Koole, JT van Wijngaarden, C Calcagno, T Skajaa, J Hilhorst, DC Hart, ZA Fayad, WJM Mulder, e A Meijerink. A Fluorescent, Paramagnetic and PEGylated gold/silica Nanoparticle for MRI, CT and Fluorescence Imaging. *Contrast Media Mol Imaging*, **5**, 231–236, 2010.
- [104] DP Cormode, E Roessl, A Thran, T Skajaa, RE Gordon, J Schlomka, V Fuster, EA Fisher, WJM Mulder, R Proksa, e ZA Fayad. Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles. *Radiology*, (2010, ).
- [105] JF Hainfeld, DN Slatkin, e HM Smilowitz. The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice. *Physics in Medicine and Biology*, **49**, N309–315, 2004.
- [106] SK Libutti, GF Paciotti, AA Byrnes, HR Alexander, WE Gannon, M Walker, GD Seidel, N Yuldasheva, e L Tamarkin. Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine. *Clinical cancer research*, **16**, 6139–6149, 2010.
- [107] G von Maltzahn, J Park, A Agrawal, NK Bandaru, SK Das, MJ Sailor, e SN Bhatia. Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-circulating Gold Nanorod Antennas. *Cancer Res*, **69**, 3892–3900, 2009.
- [108] G Schmid e B Corain. Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities. *Eur J Inorg Chem*, **2003**, 3081–3098, 2003.
- [109] HG Boyen, G Kastle, F Weigl, B Koslowski, C Dietrich, P Ziemann, JP Spatz, S Riethmuller, C Hartmann, M Moller, G Schmid, MG Garnier, e P Oelhafen. Oxidation-resistant gold-55 Clusters. *Science*, **30**, 1533–1536, 2002.
- [110] W Lewandowski, K Jateczak, D Pocięcha, e J Mieczkowski. Control of Gold Nanoparticle Superlattice Properties via Mesogenic Ligand Architecture. *Langmuir*, **29**, 3404–3410, 2013.
- [111] R Balasubramanian, R Guo, AJ Mills, e RW Murray. Reaction of Au<sub>55</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>12</sub>Cl<sub>6</sub> with Thiols Yields Thiolate Monolayer Protected Au<sub>75</sub> Clusters. *journal of american chemical society*, **127**, 8126–8132, 2005.

- [112] O Stern e W Gerlach. Das Magnetische Moment des Silberatoms. *Z Phys*, **9**, 353–355, 1922.
- [113] EK Zavoisky. Spin Magnetic Resonance in Paramagnetics. *J Phys USSR*, **9**, 245, 1945.
- [114] AP Guimarães. Magnetism and Magnetic Resonance in Solids, capítulo Atomic Magnetic Moments. John Wiley & Sons, Inc, 1998.
- [115] W Greiner, L Neise, e H Stöcker. Thermodynamics and statistical mechanics, capítulo Thermodynamic Potentials. Springer-Verlag, 1995.
- [116] PL Nordio. Spin Labeling: Theory and Applications, capítulo General Magnetic Resonance Theory. Academic Press, 1976.
- [117] TJ Stone, T Buckman, PL Nordio, e HM McConnell. Spin-labeled Biomolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **54**, 1010–1017, 1965.
- [118] S Ohnishi e HM McConnell. Interaction of the Radical Ion of Chlorpromazine With Deoxyribonucleic Acid. *J Am Chem Soc*, **87**, 2293–2293, 1965.
- [119] N Kocherginsky e HM Swartz. Nitroxide Spin Labels: Reactions in Biology and Chemistry, capítulo Chemical Reactivity of Nitroxides. Taylor & Francis, 1995.
- [120] OH Griffith, DW Cornell, e HM McConnell. Nitrogen Hyperfine Tensor and g Tensor of Nitroxide Radicals. *J Chem Phys*, **43**, 2909–2910, 1965.
- [121] D Marsh. Electron Spin Resonance in Membrane Research: Protein-Lipid Interactions from Challenging Beginnings to State of the Art. *Eur Biophys J*, **39**, 513–25, 2010.
- [122] K Miroslavljević e V Noethig-Laslo. Spin Labelling Study of Interfacial Properties of Egg-Phosphatidylcholine Liposomes as a Function of Cholesterol Concentrations. *Chem Phys Lipids*, **155**, 74–79, 2008.
- [123] CH Trad, W James, A Bhardwaj, e DA Butterfield. Selective Labeling of Membrane Protein Sulfhydryl Groups With Methanethiosulfonate Spin Label. *J Biochem Biophys Methods*, **30**, 287–299, 1995.
- [124] MT Lerch, J Horwitz, J McCoy, e WL Hubbell. Circular Dichroism and Site-Directed Spin Labeling Reveal Structural and Dynamical Features of High-Pressure States of Myoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E4714–E4722, 2013.
- [125] JJ Inbaraj, TB Cardon, M Laryukhin, SM Grosser, e GA Lorigan. Determining the Topology of Integral Membrane Peptides Using EPR Spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **128**, 9549–9554, 2006.

- [126] JH Freed e GK Fraenkel. Theory of Linewidths in Electron Spin Resonance Spectra. *J Chem Phys*, **39**, 326–348, 1963.
- [127] A Hudson e GR Luckhurst. The Electron Resonance Line Shapes of Radicals in Solution. *Chemical review*, **69**, 191–225, 1969.
- [128] PJW Debye. Polar Molecules, capítulo Anomalous Dispersion for Radio Frequencies. Chemical Catalog Company, Incorporated, 1945.
- [129] GR Eaton, SS Eaton, DP Barr, e RT Weber. Qualitative EPR, capítulo Basics of Continuous Wave EPR. Springer-Verlag/Wien, 2010.
- [130] P Jost e OH Griffith. Spin Labeling: Theory and Applications, capítulo Instrumental Aspects of Spin Labeling. Academic Press, 1976.
- [131] JR Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy, capítulo Introduction to Fluorescence. Springer, 2007.
- [132] GG Stokes. On the Change of Refrangibility of Light. *Philos Trans R Soc Lond*, **142**, 463–562, 1852.
- [133] M Kasha. Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discuss Faraday Soc*, **9**, 14–19, 1950.
- [134] B Valeur. Molecular Fluorescence: Principles and Applications, capítulo Fluorescence polarization. Emission anisotropy. Wiley-VCH, 2002.
- [135] CW Cairo, JA Key, e CM Sadek. Fluorescent Small-Molecule Probes of Biochemistry at the Plasma Membrane. *Curr Opin Chem Biol*, **14**, 57–63, 2010.
- [136] A Chattopadhyay. Chemistry and Biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled Lipids: Fluorescent Probes of Biological and Model Membranes. *Chem Phys Lipids*, **53**, 1–15, 1990.
- [137] C Leidy, WF Wolkers, K Jørgensen, OG Mouritsen, e JH Crowe. Lateral Organization and Domain Formation in a Two-component Lipid Membrane System. *Biophys J*, **80**, 1819–28, 2001.
- [138] MA Soto-Arriaza, C Olivares-Ortega, FH Quina, Aguilar LF, e Sotomayor CP. Effect of Cholesterol Content on the Structural and Dynamic Membrane Properties of DMPC/DSPC Large Unilamellar Bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **1828**, 2763 – 2769, 2013.

- [139] TJ Pucadyil, S Mukherjee, e A Chattopadhyay. Organization and Dynamics of NBD-Labeled Lipids in Membranes Analyzed by Fluorescence Recovery After Photobleaching. *J Phys Chem B*, **111**, 1975–1983, 2007.
- [140] A Alaimo, C Malo, P Areso, K Aloria, O Millet, e A Villarroel. The use of dansyl-calmodulin to study interactions with channels and other proteins. *Methods Mol Biol*, **998**, 217–231, 2013.
- [141] MS Celej, SA Dassie, E Freire, ML Bianconi, e GD Fidelio. Ligand-induced Thermostability in Proteins: Thermodynamic Analysis of ANS-albumin Interaction. *Biochim Biophys Acta*, **1750**, 122–133, 2005.
- [142] JR Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy, capítulo Fluorophores. Springer, 2007.
- [143] G Weber. Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. *Biochem J*, **51**, 145–155, 1952.
- [144] JR Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy, capítulo Fluorescence Anisotropy. Springer, 2007.
- [145] A Jablonski. Fundamental Polarization of Photoluminescence and Torsional Vibrations of Molecules. *Acta Phys Pol*, **10**, 193–206, 1950.
- [146] G Binnig, CF Quate, e CH Gerber. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett*, **56**, 930–933, 1986.
- [147] S Alexander, L Helleman, O Marti, J Schneir, V Elings, PK Hansma, M Longmire, e J Gurley. An Atomic-resolution Atomic-force Microscope Implemented Using an Optical Lever. *J Appl Phys*, **65**, 164–167, 1989.
- [148] TR Albrecht, S Akamine, TE Carver, e CF Quate. Microfabrication of Cantilever Styli for the Atomic Force Microscope. *J Vac Sci Technol A*, **8**, 3386–3396, 1990.
- [149] HJ Butt, EK Wolff, SAC Gould, BD Northern, CM Peterson, e PK Hansma. Imaging Cells With the Atomic Force Microscope. *J Struct Biol*, **105**, 54–61, 1990.
- [150] E Lesniewska, PE Millhiet, M Giocondi, e C le Grimellec. Atomic Force Microscopy in Cell Biology, capítulo Atomic Force Microscope Imaging of Cells and Membranes. Academic Press, 2002.
- [151] Z Shao, J Mou, DM Czajkowsky, J Yang, e J Yuan. Biological Atomic Force Microscopy: What is Achieved and What is Needed. *Adv Phys*, **45**, 1–86, 1996.

- [152] DJ Taatjes, AS Quinn, MR Lewis, e EG Bovill. Quality Assessment of Atomic Force Microscopy Probes by Scanning Electron Microscopy: Correlation of Tip Structure with Rendered Images. *Microsc Res Tech*, **44**, 312–326, 1999.
- [153] JH Hoh e PK Hansma. Atomic Force Microscopy for High-resolution Imaging in Cell Biology. *Trends Cell Biol*, **2**, 208–213, 1992.
- [154] BV Derjaguin e L Landau. A theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and the Coalescence of Strongly Charged Particles in Electrolytic Solutions. *Acta Physicochim USSR*, **14**, 633–645, 1941.
- [155] EJW Verwey. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J Phys Colloid Chem*, **51**, 631–636, 1947.
- [156] HJ Butt, M Jaschke, e W Ducker. Measuring Surface Forces in Aqueous Electrolyte Solution with the Atomic Force Microscope. *Bioelectrochem Bioenerg*, **38**, 191–201, 1995.
- [157] EM Lifshitz. The Theory of Molecular Attractive Forces Between Solids. *Soviet Phys*, **2**, 73–160, 1956.
- [158] B Davies. Lifshitz Theory—exact or Approximate Statistical Mechanics? *Phys Lett A*, **48**, 298–300, 1974.
- [159] BNJ Persson. The Atomic Force Microscope: Can it be Used to Study Biological Molecules? *Chem Phys Lett*, **141**, 366–368, 1987.
- [160] G Cevc. Membrane Electrostatics. *Biochim Biophys Acta*, **1031**, 311–382, 1990.
- [161] RJ Hunter e LR White. Foundations of Colloid Science. Clarendon Press, 1987.
- [162] JN Israelachvili. Intermolecular and Surface Forces. Elsevier Science, 2011.
- [163] JLV dos Anjos, D de Sousa Neto, e A Alonso. Effects of Ethanol/L-menthol on the Dynamics and Partitioning of Spin-labeled Lipids in the Stratum Corneum. *Eur J Pharm Biopharm*, **67**, 406–412, 2007.
- [164] DE Budil, S Lee, S Saxena, e JH Freed. Nonlinear-least-squares Analysis of Slow-motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm. *J Magn Reson*, **120**, 155–189, 1996.
- [165] JH Freed. Spin Labeling: Theory and Applications, capítulo Theory of Slow Tumbling ESR Spectra for Nitroxides. Academic Press, 1976.

- [166] A Alonso, WP Santos, SJ Leonor, JG Santos, e M Tabak. Stratum Corneum Protein Dynamics as Evaluated by a Spin-label Maleimide Derivative: Effect of Urea. *Biophys J*, **81**, 3566–3576, 2001.
- [167] A Alonso, JV Silva, e M Tabak. Hydration Effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1646**, 32–41, 2003.
- [168] WP de Queirós, D de Sousa Neto, e A Alonso. Dynamics and Partitioning of Spin-labeled Stearates Into the Lipid Domain of Stratum Corneum. *J Controlled Release*, **106**, 374–385, 2005.
- [169] HS Camargos e A Alonso. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectral Components of Spin-labeled Lipids in Saturated Phospholipid Bilayers: Effect of Cholesterol. *Quim Nova*, **36**, 815–821, 2013.
- [170] S Mabrey e JM Sturtevant. Investigation of Phase Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 3862–3866, 1976.
- [171] P. Atkins e J. de Paula. *Physical Chemistry*, capítulo Chemical Equilibrium. W. H. Freeman, 2006.
- [172] WP de Queirós, D de Sousa Neto, e A Alonso. Dynamics and Partitioning of Spin-labeled Stearates Into the Lipid Domain of Stratum Corneum. *J Controlled Release*, **106**, 374–385, 2005.
- [173] P Ertl, B Rohde, e P Selzer. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-based Contributions and its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J Med Chem*, **43**, 3714–3717, 2000.
- [174] ChemAxon. <http://www.chemicalize.org/>, 04/2014.
- [175] J. Sangster. *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*. Wiley, 1997.
- [176] P.J. Sinko e Y. Singh, editores. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, capítulo States of Matter. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- [177] T Benavides, M Mitjans, V Martínez, P Clapés, MR Infante, RH Clothier, e MP Vinar-dell. Assessment of Primary Eye and Skin Irritants by in Vitro Cytotoxicity and Phototoxicity Models: an in Vitro Approach of New Arginine-based Surfactant-induced Irritation. *Toxicology*, **197**, 229–237, 2004.

- [178] MR Prausnitz e R Langer. Transdermal Drug Delivery. *Nat Biotechnol*, **26**, 1261–8, 2008.
- [179] BW Barry. Lipid-Protein-Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *J Controlled Release*, **15**, 237–248, 1991.
- [180] MA Yamane, AC Williams, e BW Barry. Effects of Terpenes and Oleic Acid as Skin Penetration Enhancers Towards 5-fluorouracil as Assessed With Time; Permeation, Partitioning and Differential Scanning Calorimetry. *Int J Pharm*, **116**, 237–251, 1995.
- [181] K Zhao e J Singh. Mechanisms of Percutaneous Absorption of Tamoxifen by Terpenes: Eugenol, D-limonene and Menthone. *J Controlled Release*, **55**, 253–260, 1998.
- [182] S Bardon, K Picard, e P Martel. Monoterpenes Inhibit Cell Growth, Cell Cycle Progression, and Cyclin D1 Gene Expression in Human Breast Cancer Cell Lines. *Nutr Cancer*, **32**, 1–7, 1998.
- [183] H Yang e QP Dou. Targeting Apoptosis Pathway With Natural Terpenoids: Implications for Treatment of Breast and Prostate Cancer. *Curr Drug Targets*, **11**, 733–744, 2010.
- [184] C Wu, Y Chen, JJW Chen, J Shieh, C Huang, P Lin, G Chang, J Chang, e C Lin. Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2012**, 818261, 2012.
- [185] M Morales, MC Navarro, J Martín, A Valero, AM Lara, S Barón, e F Morillas. Activity of Different Monoterpenic Derivatives of Natural Origin Against *Leishmania Infantum* Promastigotes. *Rev Latinoam Parasitol*, **68**, 65–72, 2009.
- [186] CA Marquezín, IY Hirata, L Juliano, e AS Ito. Spectroscopic Characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a New Fluorescence Probe for Membranes. *Biophys Chem*, **124**, 125–133, 2006.
- [187] A Alonso, NC Meirelles, e M Tabak. Effect of Hydration Upon the Fluidity of Intercellular Membranes of Stratum Corneum: an EPR Study. *Biochim Biophys Acta*, **1237**, 6–15, 1995.
- [188] G Weber. Fluorescence and Phosphorescence Analysis: Principles and Applications, capítulo Polarization of the Fluorescence of Solutions. Interscience Publishers, 1966.
- [189] KC Madison, DC Swartzendruber, PW Wertz, e DT Downing. Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol*, **88**, 714–718, 1987.
- [190] Avanti Polar Lipids. <http://www.avantilipids.com>, 04/2014.

- [191] LifeTech. <http://www.lifetechnologies.com>, 04/2014.
- [192] JA Bouwstra, GS Gooris, JA van der Spek, e W Bras. Structural Investigations of Human Stratum Corneum by Small-angle X-ray Scattering. *Journal of Invest Dermatol*, **97**, 1005–1012, 1991.
- [193] JA Bouwstra, GS Gooris, MA Salomons-de Vries, JA van der Spek, e W Bras. Structure of Human Stratum Corneum as a Function of Temperature and Hydration: A Wide-angle X-ray Diffraction Study. *Int J Pharm*, **84**, 205–216, 1992.
- [194] PA Cornwell, BW Barry, JA Bouwstra, e GS Gooris. Modes of Action of Terpene Penetration Enhancers in Human Skin; Differential Scanning Calorimetry, Small-angle X-ray Diffraction and Enhancer Uptake Studies. *Int J Pharm*, **127**, 9–26, 1996.
- [195] H Raghuraman, S Shrivastava, e A Chattopadhyay. Monitoring the Looping up of Acyl Chain Labeled NBD Lipids in Membranes as a Function of Membrane Phase State. *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 1258–67, 2007.
- [196] LMS Loura e JPP Ramalho. Location and dynamics of acyl chain NBD-labeled phosphatidylcholine (NBD-PC) in DPPC bilayers. A molecular dynamics and time-resolved fluorescence anisotropy study. *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 467–78, 2007.
- [197] A Chattopadhyay e E London. Parallax Method for Direct Measurement of Membrane Penetration Depth Utilizing Fluorescence Quenching by Spin-labeled Phospholipids. *Biochemistry*, **26**, 39–45, 1987.
- [198] FS Abrams e E London. Extension of the Parallax Analysis of Membrane Penetration Depth to the Polar Region of Model Membranes: Use of Fluorescence Quenching by a Spin-label Attached to the Phospholipid Polar Headgroup. *Biochemistry*, **32**, 10826–10831, 1993.
- [199] LR Montes, A Alonso, FM Goñi, e LA Bagatolli. Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions. *Biophys J*, **93**, 3548–3554, 2007.
- [200] M Fidorra, L Duelund, C Leidy, AC Simonsen, e LA Bagatolli. Absence of Fluid-ordered/fluid-disordered Phase Coexistence in Ceramide/POPC Mixtures Containing Cholesterol. *Biophys J*, **90**, 4437–4451, 2006.
- [201] HA Sturges. The Choice of a Class Interval. *J Amer Statist Assoc*, **21**, 65–66, 1926.
- [202] RB Leipnik. On Lognormal Random Variables: I-the Characteristic Function. *J Austral Math Soc Ser B*, **32**, 327–347, 1991.

- [203] H Kaiser, D Lingwood, I Levental, JL Sampaio, L Kalvodova, L Rajendran, e K Simons. Order of Lipid Phases in Model and Plasma Membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16645–16650, 2009.
- [204] C Dietrich, LA Bagatolli, Z N Volovyk, N L Thompson, M Levi, K Jacobson, e E Gratton. Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys J*, **80**, 1417–1428, 2001.
- [205] LA Bagatolli. Direct Observation of Lipid Domains in Free Standing Bilayers: From Simple to Complex Lipid Mixtures. *Chem Phys Lipids*, **122**, 137–145, 2003.
- [206] J Korlach, P Schwille, WW Webb, e GW Feigenson. Characterization of Lipid Bilayer Phases by Confocal Microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8461–8466, 1999.
- [207] S Chiantia, N Kahya, J Ries, e P Schwille. Effects of Ceramide on Liquid-ordered Domains Investigated by Simultaneous AFM and FCS. *Biophys J*, **90**, 4500–4508, 2006.
- [208] S Chiantia, J Ries, N Kahya, e P Schwille. Combined AFM and Two-focus SFCS Study of Raft-exhibiting Model Membranes. *ChemPhysChem*, **7**, 2409–2418, 2006.
- [209] RMA Sullan, JK Li, C Hao, GC Walker, e S Zou. Cholesterol-dependent Nanomechanical Stability of Phase-segregated Multicomponent Lipid Bilayers. *Biophys J*, **99**, 507–516, 2010.
- [210] PE Milhiet, MC Giocondi, e C Le Grimellec. AFM Imaging of Lipid Domains in Model Membranes. *TheScientificWorldJournal*, **3**, 59–74, 2003.
- [211] SD Connell e DA Smith. The Atomic Force Microscope as a Tool for Studying Phase Separation in Lipid Membranes. *Mol Membr Biol*, **23**, 17–28, 2006.
- [212] JC Lawrence, DE Saslowsky, JM Edwardson, e RM Henderson. Real-time Analysis of the Effects of Cholesterol on Lipid Raft Behavior Using Atomic Force Microscopy. *Biophys J*, **84**, 1827–1832, 2003.
- [213] JV Busto, ML Fanani, L De Tullio, J Sot, B Maggio, FM Goñi, e A Alonso. Coexistence of Immiscible Mixtures of Palmitoylsphingomyelin and Palmitoylceramide in Monolayers and Bilayers. *Biophys J*, **97**, 2717–2726, 2009.
- [214] JV Busto, J Sot, J Requejo-Isidro, FM Goñi, e A Alonso. Cholesterol Displaces Palmitoylceramide From its Tight Packing With Palmitoylsphingomyelin in the Absence of a Liquid-disordered Phase. *Biophys J*, **99**, 1119–1128, 2010.

- [215] JV Busto, AB García-Arribas, J Sot, A Torrecillas, JC Gómez-Fernández, FM Goñi, e A Alonso. Lamellar Gel ( $L\beta$ ) Phases of Ternary Lipid Composition Containing Ceramide and Cholesterol. *Biophys J*, **106**, 621–630, 2014.
- [216] CP Slichter. Principles of Magnetic Resonance, capítulo Electron Spin Resonance. Springer-Verlag, 1989.
- [217] JJ Sakurai. Modern Quantum Mechanics, capítulo Theory of Angular Momentum. Addison Wesley, 1993.
- [218] C Cohen-Tannoudji, B Diu, e F Laloë. Quantum Mechanics, capítulo Approximation Methods for Time-Dependent Problems. Wiley & Sons, 1977.
- [219] G Jeschke, G Panek, S Schleidt, e U Jonas. Addressing the Interface in Polymer-clay Nanocomposites by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy on Surfactant Probes. *Polym Eng Sci*, **44**, 1112–1121, 2004.
- [220] JLV Anjos, PS Santiago, M Tabak, e A Alonso. On the Interaction of Bovine Serum Albumin With Ionic Surfactants: Temperature Induced EPR Changes of a Maleimide Nitroxide Reflect Local Protein Dynamics and Probe Solvent Accessibility. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **88**, 463–70, 2011.
- [221] CEG Salmon, DS Neto, M Tabak, e AJ Costa-Filho. Simulação de Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) Através do Programa NLSL. *Quim Nova*, **30**, 1240–1248, 2007.
- [222] JH Freed, GV Bruno, e CF Polnaszek. Electron Spin Resonance Line Shapes and Saturation in the Slow Motional Region. *J Phys Chem*, **75**, 3385–3399, 1971.
- [223] RM Mazo. Brownian Motion: Fluctuations, Dynamics, and Applications, capítulo Stochastic Processes. Oxford University Press, 2002.
- [224] R Kubo. Stochastic Theories of Randomly Modulated Systems. *J Phys Soc Japan Suppl.*, **26**, 1–5, 1969.
- [225] RM Mazo. Brownian Motion: Fluctuations, Dynamics, and Applications, capítulo Einstein-Smoluchowski Theory. Oxford University Press, 2002.
- [226] JH Freed. Anisotropic rotational diffusion and electron spin resonance linewidths. *J Chem Phys*, **41**, 2077–2083, 1964.
- [227] LD Favro. Fluctuation Phenomena in Solids, capítulo Rotational Brownian Motion. Academic Press, 1965.

- 
- [228] DE Budil, S Lee, S Saxena, e JH Freed. Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm. *J Magn Reson*, **120**, 155–189, 1996.
- [229] JE Dennis e RB Schnabel. Numerical Methods for Unconstrained Optimization and Nonlinear Equations, capítulo Methods for Problems with Special Structure. Society for Industrial and Applied Mathematics, 1996.
- [230] P Selényi. Wide-Angle Interferences and the Nature of the Elementary Light Sources. *Phys Rev*, **56**, 477–479, 1939.
- [231] DJ Griffiths. Introduction to Electrodynamics, capítulo Radiation, pages 443–469. Prentice Hall, 1999.
- [232] DJ Griffiths. Introduction to Electrodynamics, capítulo Eletrodynamics, pages 285–331. Prentice Hall, 1999.
- [233] T Baumgart, G Hunt, ER Farkas, WW Webb, e GW Feigenson. Fluorescence Probe Partitioning Between Lo/Ld Phases in Lipid Membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 2182–2194, 2007.
- [234] F Tian, X Qian, e JS Villarrubia. Blind Estimation of General tip Shape in AFM Imaging. *Ultramicroscopy*, **109**, 44–53, 2008.