



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
LABORATÓRIO DE BIOFÍSICA

**EFEITOS DE TERPENOS NAS MEMBRANAS DE ESTRATO  
CÓRNEO ESTUDADOS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA  
ELETRÔNICA**

JORGE LUIZ VIEIRA DOS ANJOS

GOIÂNIA-GO

2008

**JORGE LUIZ VIEIRA DOS ANJOS**

Programa de Pós-graduação em Física

**EFEITOS DE TERPENOS NAS MEMBRANAS DE ESTRATO CÓRNEO  
ESTUDADOS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso

**GOIÂNIA**

**2008**

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

Anjos, Jorge Luiz Vieira dos.

A611e Efeitos de terpenos nas membranas de estrato córneo estudados por ressonância paramagnética eletrônica [manuscrito] / Jorge Luiz Vieira dos Anjos. – 2008.

xiii, 100 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2008.

Bibliografia: f.94-99.

Inclui lista de figuras, tabelas e de abreviaturas e siglas.  
Apêndice.

1. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica 2.  
Terpenos I. Alonso, Antonio II. Universidade Federal de Goiás,  
**Instituto de Física.** III. Título.

CDU: 543.429.22

*“O importante é não parar de questionar; a curiosidade tem sua própria razão para existir.”*

*(Albert Einstein)*

**À MINHA FAMÍLIA**

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais por terem acreditado em meus ideais e terem me condicionado para realização deste trabalho;*

*Ao Prof. Antônio Alonso, orientador e principalmente amigo, pela orientação e oportunidade oferecida deste trabalho;*

*Aos professores do instituto de Física da UFG, pela dedicação e atenção durante o curso de graduação;*

*Aos meus colegas que por diversas vezes me auxiliaram nos momentos de dificuldades com o curso e me proporcionaram momentos de descontração que tornaram os estudos mais prazerosos;*

*Aos colegas do laboratório de Biofísica, Adolfo e Sebastião, pela amizade e enorme ajuda na preparação das amostras de EC e nas medidas de ressonância;*

*Aos meus familiares, avó, irmãos e sobrinhas, que mesmo com dificuldades em compreender o verdadeiro significado do curso, me estimularam a seguir em frente;*

*Ao Prof. Dr. Fernando Pelegrini, por ceder gentilmente o laboratório de RPE;*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de iniciação científica e a Fundação de Apoio à Pesquisa (FUNAPE), pelo auxílio financeiro.*

## ABSTRACT

The interaction of the skin penetration enhancers DL-menthol,  $\alpha$ -terpineol, 1,8-cineole and (+)-limonene with membranes of the uppermost skin layer, the stratum corneum (SC) and with multilamellar vesicles from 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) is investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy using spin-labeled analogs of androstanol (ASL), stearic acid (5-DSA), methyl stearate (5-DMS) and a small spin label 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO). The terpenes were added to SC samples using ethanol as a co-solvent (20% ethanol in the buffer), the effect of ethanol on the SC also was investigated. The spectra of spin labels ASL, 5-DSA and 5-DMS in the membranes of SC are characterized by the presence of two spectral components differing in mobility. Component 1 was attributed to the spin labels H-bonded to the headgroups, while component 2 was assigned to the spin labels H-bonded to water molecules or temporally non-hydrogen-bonded. EPR results showed that ethanol in the range 0-70% did not alter the fluidity in SC membranes or the relative fractions of these two components. Instead, ethanol only caused a selective extraction of spin labels, indicating that ethanol acts as extractor and not as fluidizer when facilitates molecular permeation in the skin. Addition of 1% DL-menthol to the solvent containing 20% ethanol increases both the mobility and the fraction of spin labels in the component 2 (more mobile spectral component). Similarly, with the addition of 1,8-cineole, the spin probes were gradually transferred from the motionally more restricted component 1 to the more mobile component 2. The spectrum of the spin label TEMPO in the membranes of SC allows for the determination of the actual partition coefficient and rotational diffusion rates of the spin probe in the aqueous and hydrocarbon environments. The enthalpy changes,  $\Delta H^\circ$ , to transfer the spin probe from the aqueous to the hydrocarbon phase, as well as the activation energies associated to its rotational motion, were considerably smaller for SC when compared to DPPC, indicating less pronounced thermal reorganizations for SC samples. For DPPC, all terpenes increased both the partition coefficient and the rotational diffusion rate of the spin label in the membrane, except in the liquid-crystalline phase. These results suggest that the terpenes, effectively acting as spacers in the membrane, fluidize the lipids and cause ruptures in the hydrogen-bonded network of the membrane-water interface, with consequent displacements of spin probes towards the hydrophobic core. The EPR spectra of maleimide derivative spin label (6-MSL) covalently attached to stratum corneum proteins indicate that 1,8-cineole does not alter the dynamics of protein backbones. Instead, this terpene only increases the solvent's ability to 'dissolve' and mobilize the nitroxide side chain, which is in agreement with its low irritation response.

## RESUMO

A interação dos aumentadores de permeação da pele DL-mentol,  $\alpha$ -terpineol, 1,8-cineole e (+)-limoneno com as membranas da camada mais externa da pele, o estrato córneo (EC) e com vesículas multilamelares de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) foi investigado por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) utilizando marcadores de spin análogos do androstanol (ASL), ácido esteárico (5-DSA) e estearato de metila (5-DMS), além de um pequeno marcador anfifílico, o 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), que se particiona entre as fases aquosa e hidrocarbônica. Como os terpenos foram adicionados ao EC usando soluções do etanol a 20% no tampão, foram também investigados os efeitos do etanol sobre as membranas do EC. Os espectros dos marcadores de spin ASL, 5-DSA e 5-DMS nas membranas de EC são caracterizados pela presença de duas componentes espectrais diferindo em mobilidade. A componente 1 foi atribuída aos marcadores de spin que formam ligações de hidrogênio com os grupos polares da membrana, enquanto que a componente 2 foi atribuída aos marcadores de spin que formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água ou que, temporariamente, não estão formando ligações de hidrogênio. Os resultados de RPE mostraram que o etanol em concentrações variando de 0-70% não causa alteração de fluidez nem alteração das frações relativas das duas componentes espectrais. Ao invés disso, o etanol apenas causou uma seletiva extração dos marcadores lipídicos, indicando que os efeitos do etanol como facilitador advém de sua capacidade de extrair lipídios da membrana. Com a adição de 1% de L-mentol ao solvente contendo 20% de etanol houve um aumento tanto da mobilidade quanto da fração dos marcadores de spin da componente 2 (componente espectral mais móvel). Analogamente, com a adição de 1,8-cineole, os marcadores de spin foram gradualmente transferidos da componente 1, de mobilidade mais restrita, para a componente 2 mais móvel. O espectro do marcador de spin TEMPO nas membranas de EC permite determinar o coeficiente de partição e a taxa de difusão rotacional do marcador de spin nos ambientes aquoso e hidrofóbico. As mudanças de entalpia,  $\Delta H^\circ$ , para transferir o marcador de spin da fase aquosa para fase hidrocarbônica, bem como as energias de ativação associadas com o movimento rotacional, foram consideravelmente menores para o EC em relação às amostras de DPPC, indicando reorganizações térmicas menos pronunciadas para as membranas do EC. Para DPPC, todos os terpenos aumentaram tanto o coeficiente de partição quanto a taxa de difusão rotacional dos marcadores de spin na membrana, exceto na fase líquido-cristalina. Estes resultados sugerem que os terpenos agem efetivamente como espaçadores dos lipídios da membrana reduzindo seu empacotamento e aumentando sua fluidez, desse modo causando rupturas da rede de ligações de hidrogênio na interface membrana-água e assim gerando deslocamentos dos marcadores de spin para o core hidrofóbico. O espectro de RPE do marcador de spin derivado do maleimido (6-MSL) covalentemente ligado às proteínas do EC indicou que o 1,8-cineole não altera a dinâmica do esqueleto protéico. Ao invés disso, este terpeno apenas aumenta a habilidade do solvente em ‘dissolver’ e mobilizar a cadeia lateral do nitróxido, o que está em acordo com seu baixo potencial de irritação.

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1: Representação esquemática da pele evidenciando suas principais camadas. ....	16
Fig. 1.2: Fotomicrografia da divisão da epiderme em camadas (estratos) e um esquema ilustrando o arranjo das células nos estratos. As células nascem na camada basal e vão empurrando as células mais externas, de forma que a divisão entre as camadas mencionadas no texto não é nítida, pois o processo é contínuo.....	17
Fig. 1.3: Ilustração esquemática do modelo “tijolos e cimento” representando a estrutura do EC. ....	19
Fig. 1.4: Lamela lipídica normal (ampliação de 200.000x). ....	20
Fig. 1.5: Estruturas moleculares das ceramidas naturais presentes em EC humano. ....	21
Fig. 1.6: Micrografia de transmissão eletrônica mostrando os padrões de estruturas lamelares contendo três, seis, e nove lamelas dentro dos espaços intercelulares do EC. ....	22
Fig. 1.7: Organização lipídica na fase lamelar de 13 nm de acordo com o modelo de sanduíche.....	23
Fig. 1.8: Um esquema representando as rotas de permeação de fármacos no EC.....	24
Fig. 1.9: Ação dos aumentadores de permeação nos domínios.....	25
Fig. 3.1: Diagrama de blocos do equipamento de RPE.....	30
Fig. 3.2: Níveis de energia eletrônica em função da intensidade do campo magnético.....	34
Fig. 3.3: Diagrama vetorial ilustrando o movimento de precessão do momento magnético em torno do campo magnético externo $H$ e o componente magnético do campo de microonda $H_1$ aplicada transversalmente.....	49
Fig. 3.4: Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de $I = \frac{1}{2}$ como uma função do campo magnético em uma frequência constante.....	42
Fig. 3.5: Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de $I = 1$ , para um campo fixo.....	43
Fig. 3.6: Interação dos momentos de dipolo do elétron e do núcleo. ....	46
Fig. 3.7: Fórmula química geral do radical nitróxido.....	48
Fig. 3.8: Espectro de absorção e primeira derivada da curva de absorção. ....	49
Fig. 3.9: Radical nitróxido esquematizado, ilustrando as orientações dos eixos principais dos tensores.....	50
Fig. 3.10: Espectros de RPE mostrando as anisotropias do fator g e a constante de acoplamento hiperfino.....	51
Fig. 4.1: Rato da raça wistar com menos de 24 h de vida e uma membrana de EC intacto desidratada. ....	54
Fig. 4.2: Estruturas químicas dos marcadores de spin e dos terpenos utilizados neste trabalho. *Estrutura molecular do radical nitróxido.....	55
Fig. 4.3: Esquema do processo de formação das estruturas lipídicas. ....	59
Fig. 5.1: Arranjo molecular dos lipídios do EC baseado no modelo proposto por Hill e Wertz explicando o padrão largo-estreito-largo encontrado por micrografia de transmissão eletrônica de rutênio. ....	62
Fig. 5.2: Espectros de RPE experimental e de melhor-ajuste do marcador de spin derivado do ácido esteárico (5-DSA), do estearato de metila (5-DMS) e do marcador análogo do colesterol (ASL) no EC.....	63

Fig. 5.3: Espectros de RPE experimentais para os marcadores de spin 5-DSA (A) e ASL (B) no EC com 20% de etanol em tampão (pH 5.1) e a concentração de mentol indicada.....	65
Fig. 5.4: Espectros de RPE experimentais para os marcadores de spin 5-DSA e ASL no EC (pH 5.1) tratado com várias concentrações de 1,8-cineole (indicadas para cada espectro na figura).....	66
Fig. 5.5: Parâmetro de difusão rotacional, $R_{bar}$ , convertido para escala de tempo, como função das concentrações de etanol e DL-mentol. O mentol foi adicionado em uma solução tampão (pH 5.1) contendo 20% de etanol.....	67
Fig. 5.6: Parâmetro de difusão rotacional, $R_{bar1}$ , convertido para escala de tempo, para o marcador de spin 5-DSA como função da concentração de 1,8-cineole.....	68
Fig. 5.7: Fração dos marcadores de spin da componente mais restrita, componente 1, no EC como função da concentração de etanol DL-mentol e 1,8-cineole. DL-mentol foi dissolvido em 20% de etanol em tampão (pH 5.1).....	69
Fig. 5.8: Fração dos marcadores de spin da componente 3, nas membranas de EC, como função da concentração de etanol.....	70
Fig. 5.9: Espectro de RPE, 30°C, do marcador de spin 5-DMS em DPPC para várias taxas molares de 1,8-cineole:DPPC. ....	71
Fig. 5.10: Espectros de RPE do marcador de spin derivado do maleimido, 6-MSL, inserido nas proteínas do EC e modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado a proteína do EC, S e W representam as componentes fortemente e fracamente imobilizadas, respectivamente.....	72
Fig. 5.11: (a) Espectros de RPE do marcador de spin TEMPO no EC (pH 5.5, 50°C) e os parâmetros espectrais H e P que definem o parâmetro $f = H/(H + P)$ . (b) o mesmo espectro (linha preta) e o melhor ajuste sobreposto (linha vermelha). Para uma melhor compreensão, a região do espectro utilizada para o cálculo do parâmetro f foi ampliada. A figura também indica os resultados da simulação: a porcentagem dos marcadores de spin em cada componente, $N_H$ e $N_P$ , e seus respectivos logaritmos da média do parâmetro de difusão rotacional, $\log R_{bar}H$ e $\log R_{bar}P$ . O campo magnético de varredura foi de 65 G. ....	74
Fig. 5.12: Espectros experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) de RPE do marcador de spin TEMPO em membranas de EC e DPPC em várias temperaturas e concentrações de 1,8-cineole em 24 °C (dado em porcentagem de 1,8-cineole em EC ou taxa molecular de 1,8-cineole:DPPC). A varredura de campo magnético foi de 65 G.....	75
Fig. 5.13: Parâmetro espectral $f = H/(H + P)$ como descrito na Fig. 5.11 (círculos sólidos) e a relativa população dos marcadores de spin na componente H (círculos abertos) determinada por meio da simulação computacional do espectro experimental para vesículas de DPPC (figura da esquerda) e EC (figura da direita) versus a temperatura. ....	76
Fig. 5.14: Logaritmo natural do coeficiente de partição K para membranas de DPPC (figura da esquerda) e EC (figura da direita) versus a temperatura absoluta recíproca. Os terpenos foram adicionados em uma taxa molar terpeno:DPPC de 0,75:1 ou em 0,4% de terpeno em EC. Na figura da direita está mostrado uma legenda dos símbolos que serve tanto para DPPC quanto para EC.....	78
Fig. 5.15: Taxa de difusão rotacional, $\log R_{bar}H$ para membranas de DPPC e EC versus a temperatura absoluta recíproca. ....	80
Fig. 5.16: Taxa de difusão rotacional, $\log R_{bar}H$ e $\log R_{bar}P$ , para membranas de DPPC e EC versus a temperatura para amostras controle. ....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Lista de parâmetros utilizados no programa de simulação NLLS .....	53
Tabela 4.1: Autovalores dos tensores magnéticos $\vec{g}$ (t) e $\vec{A}$ (t) utilizados no programa de ajuste NLLS, para as componentes espectrais dos marcadores de spin <i>n</i> -DSA, TEMPO e 6-MSL.....	60
Tabela 5.2: Energia de ativação para a difusão rotacional do marcador de spin TEMPO nas membranas de DPPC ou de EC.....	80
Tabela 5.3: Constante de desdobramento hiperfino isotrópico do $^{14}\text{N}$ , $a_0$ (Gauss), em 25°C.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH	-	Potencial hidrogeniônico
EC	-	Etrato Córneo
AZT	-	Zidovudine
RPE	-	Ressonância Paramagnética Eletrônica
EB	-	Etrato basal
EE	-	Etrato espinhoso
EG	-	Etrato granuloso
SH	-	Grupos sulfidríla
ECC	-	Envelope celular dos corneócitos
SPRs	-	Pequenas proteínas ricas em prolina
DESC	-	Sigla em inglês de <i>differential scanning calorimetry</i>
ATR-FTIR	-	Sigla em inglês de <i>Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Radiation</i>
DPPC	-	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
PM	-	Peso molecular
$a_0$	-	Constante de desdobramento hiperfino isotrópico
NLLS	-	Nonlinear Least-Square
$R_{bar}$	-	Coefficiente de difusão rotacional
NEM	-	N-etil maleimido
TEMPO	-	2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
5-DSA	-	5-doxil ácido esteárico
5-DMS	-	5-doxil metil estearato
16-DSA	-	16-doxil ácido esteárico
ASL	-	5- $\alpha$ -Androstano
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
6-MSL	-	4-maleimido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1 oxil
DPPE	-	dipalmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 As Camadas da Pele .....	15
1.2 O Processo de Diferenciação Celular .....	17
1.3 O Estrato Córneo .....	18
1.3.1 Os tijolos ( <i>Corneócitos</i> ) .....	19
1.3.2 O cimento ( <i>Lipídios Intercelulares</i> ) .....	20
1.3.3 Rotas de permeação de fármacos no EC.....	23
1.4 Terpenos como Aumentadores de Permeação .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3. INTRODUÇÃO A RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA</b> .....	<b>29</b>
3.1 Introdução.....	29
3.2 O Fenômeno de Ressonância.....	31
3.3 Transições Entre Estados Quânticos Magnéticos .....	35
3.4 Frequência de Larmor e Precessão do Momento Magnético.....	37
3.5 O Fator g.....	40
3.6 Interação Nuclear Hiperfina .....	41
3.7 Campo Magnético de Modulação .....	47
3.8 O Método dos Marcadores de Spin .....	47
3.9 A Simulação dos Espectros de RPE de Membranas Biológicas.....	52
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
4.1 Preparações das Membranas de EC.....	54
4.2 Marcações das Membranas de EC.....	55
4.3 Marcações das Proteínas de EC.....	57
4.4 Medidas do Teor de Solvente nas Amostras de EC.....	57
4.5 Preparações e Marcações das Vesículas de DPPC .....	58
4.6 Condições de Operação do Espectrômetro .....	59
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
5.1 Efeitos do 1,8-cineole e do DL-mentol na dinâmica dos lipídios e proteínas do EC .....	61
5.1.1 Espectros de RPE característicos de marcadores de spin em membranas lipídicas .....	61
5.1.2 Dinâmica e partição dos marcadores de spin nas membranas lipídicas do EC .....	66
5.1.3 Dinâmica das proteínas do EC.....	71
5.2 Efeitos dos Terpenos na Dinâmica e Partição de um Pequeno Marcador de Spin (TEMPO) nas Membranas de EC .....	73

5.2.1	<i>Análises dos espectros do marcador TEMPO</i> .....	74
5.2.2	<i>Coefficiente de partição do marcador TEMPO entre a fase polar e hidrocarbônica</i> .....	76
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÕES</b> .....	<b>83</b>
6.1	Efeitos do Etanol Sobre os Domínios Lipídicos do EC .....	83
6.2	Mecanismos de Ação do 1,8-cineole e DL-mentol Sobre os Domínios Lipídicos das Membranas de EC e DPPC .....	85
6.3	Influências dos Terpenos na Dinâmica das Proteínas do EC .....	87
6.4	Os Terpenos Aumentam a Partição e a Dinâmica Molecular do Marcador de Spin TEMPO nas Membranas de EC .....	88
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>100</b>

# 1 – INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm crescido bastante o número de estudos que visam buscar novos mecanismos que possam controlar a dosagem de medicamentos no corpo humano, tentando obter um melhor aproveitamento do medicamento, e minimizar os efeitos nocivos que ele pode propiciar ao organismo. Entretanto, a administração por vias convencionais possui algumas limitações, tais como: a vulnerabilidade dos agentes terapêuticos no ambiente gastrointestinal, a degradação pelos primeiros passos do metabolismo no fígado, a variação temporal da ação do fármaco além de mudanças drásticas de pH [1]. Em vista destas situações que comprometem a eficiência terapêutica do fármaco a rota transepidermal (através da pele) é uma excelente alternativa com várias vantagens em comparação com as outras formas de administração. Entretanto, a grande limitação para o tratamento transdérmico é geralmente a baixa permeabilidade do fármaco na pele. É bastante conhecido que a principal barreira física para difusão da água e fármacos na pele é exercida pela camada mais externa da epiderme, o *Estrato Córneo* (EC). Deste modo, o sucesso de uma administração transdérmica está relacionado à capacidade do fármaco em permear o EC em quantidade suficiente para alcançar concentrações sanguíneas terapêuticas. Inúmeros estudos têm sido realizados para entender os mecanismos que impedem a entrada e a saída de moléculas através da pele. Scheuplein e Blank [2], em seus estudos, obtiveram resultados indicando que a permeabilidade de fármacos e da água através do EC se dá predominantemente através da rota transcelular. Posteriormente foi discutido que a principal barreira à passagem de água e a permeação de fármacos situam-se na matriz lipídica intercelular do EC [3].

Dentre as técnicas desenvolvidas para viabilizar a medicação de fármacos via pele, os aumentadores de permeação têm ganhado grande destaque, devido às suas várias vantagens, tais como: flexibilidade de formulação química, aplicação em “*patch*” (denominação para adesivo contendo fármacos) sobre uma área grande e a ausência de mecanismos físicos externos interferindo na entrega [4]. Terpenos, componentes de óleos essenciais compostos basicamente de carbono, hidrogênio e oxigênio, são considerados eficientes aumentadores de permeação para uma variedade de fármacos. Citando como exemplo o primeiro medicamento anti-HIV aprovado para uso clínico, zidovudina (AZT), que devido à alta dosagem (200 mg a cada 4 h), requerida para que possa compensar a sua degradação nos primeiros passos do metabolismo do fígado e assim atingir concentrações terapêuticas adequadas, propicia uma desconfortável elevação da concentração do fármaco no sangue e, conseqüentemente, altos graus de toxicidade [5]. Estudos mostraram que uma combinação de terpenos com etanol foi capaz de aumentar a taxa de permeação deste fármaco na pele de rato em até 100 vezes [6].

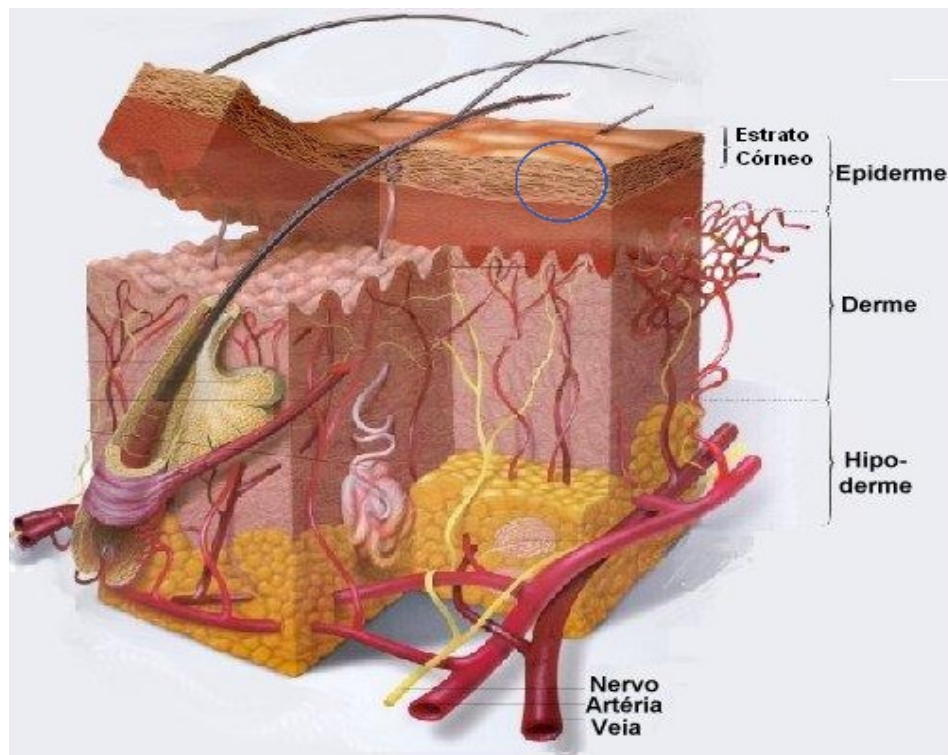
Apesar de inúmeros estudos terem sido realizados com intuito de explicar os mecanismos de interação molecular pelos quais os terpenos conseguem aumentar a permeação da pele, ainda não se tem uma explicação precisa sobre a ação destas moléculas nos domínios moleculares do EC. Uma avaliação destes mecanismos é muito importante não apenas para selecionar e incluir os terpenos em uma formulação transdérmica ou regulamentar sua aprovação, mas principalmente para fazer o desenho de novos facilitadores da permeação, específicos para cada fármaco.

Para entender como os terpenos desempenham o papel de aumentadores de permeação é importante que haja uma ferramenta que permita detectar as alterações que ocorrem nos domínios moleculares da pele, quando os terpenos estão atuando. Esta é a principal característica da espectroscopia Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de marcadores de spin. Esta espectroscopia (veja detalhes no capítulo seguinte) consiste em introduzir sondas paramagnéticas (moléculas repórteres) no meio biológico de interesse e através dos espectros de RPE obter informações sobre a dinâmica molecular e polaridade do meio. No caso do EC, têm sido usados ácidos graxos marcados que são análogos dos naturais da membrana e marcadores que se ligam covalentemente às proteínas do EC. Qualquer alteração que ocorra no EC será “percebida” pelos marcadores de spin e reportada na forma de espectros. A eficácia da espectroscopia de RPE foi evidenciada em estudo realizado em nosso laboratório [7].

Desta forma, a espectroscopia de RPE pode ser explorada para avaliar de forma detalhada os efeitos dos terpenos nas membranas de EC e, assim, propor explicações mais precisas a respeito dos aumentadores de permeação, bem como identificar o comportamento das membranas de EC sobre diversas situações.

### ***1.1 As Camadas da Pele***

A pele de um adulto cobre cerca de  $2\text{m}^2$  da superfície do corpo e pesa mais que 10% da sua massa total. Ela não é apenas o maior órgão do corpo humano, mas também um dos mais complexos. É a pele que separa o organismo vital do ambiente externo, agindo como um “escudo” protetor contra os efeitos nocivos do ambiente e contra a desidratação corpórea. A pele desempenha um papel crucial na regulação da temperatura do corpo, além de servir como um sensor orgânico que transmite informações a respeito do ambiente externo, tais como dor calor [8].



**Fig. 1.1:** Representação esquemática da pele evidenciando suas principais camadas [9].

As várias camadas da pele trabalham em harmonia para prover força, flexibilidade e executar as funções múltiplas. Microscopicamente, a pele é um tecido constituído de duas camadas histológicas, a derme e a epiderme (veja Fig. 1.1), que por sua vez são formadas por multicamadas orgânicas. A derme é a camada mais profunda da pele, ela é composta basicamente por colágeno, elastina, fibroblastos e é extensivamente vascularizada. A derme é subdividida em duas camadas: a camada papilar em contacto com a epiderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, e a camada reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras colagenosas.

A outra camada da pele é a epiderme, com a proximadamente 100 a 150  $\mu\text{m}$  de espessura ela consiste de várias camadas estratificadas e queratinizadas. É na epiderme que estão presentes os melanócitos, responsáveis pela geração de pigmentos, as células de Langerhans responsáveis por respostas imunológicas e as células de Merckel que atuam na recepção sensorial. A Fig. 1.2 mostra uma representação esquemática das quatro camadas (ou estratos) presentes na epiderme:

- Estrato basal (EB), é uma camada formada por células cilíndricas, contendo organelas e filamentos de queratina.

- Estrato espinhoso (EE), é constituído por células poliédricas que apresentam projeções citoplasmáticas intercelulares dando resistência ao atrito. Além de organelas típicas e de queratina, as células desta camada possuem os “corpos lamelares”, vesículas que contém discos lipídicos compostos por fosfolipídios, colesterol e glicosilceramidas empacotados.
- Estrato granuloso (EG), as células desta camada apresentam abundância de queratina e corpos lamelares, que são secretados para o meio extracelular na fase final de diferenciação destas células em corneócitos.
- Estrato Lúcido (EL) é uma camada fina (nem sempre evidenciada), de modo geral, é uma região translúcida e fina, cujas células contém eleidina.
- Estrato córneo (EC) é a camada mais externa da epiderme e a principal responsável pela função barreira da pele, detalhes na seção 1.3.

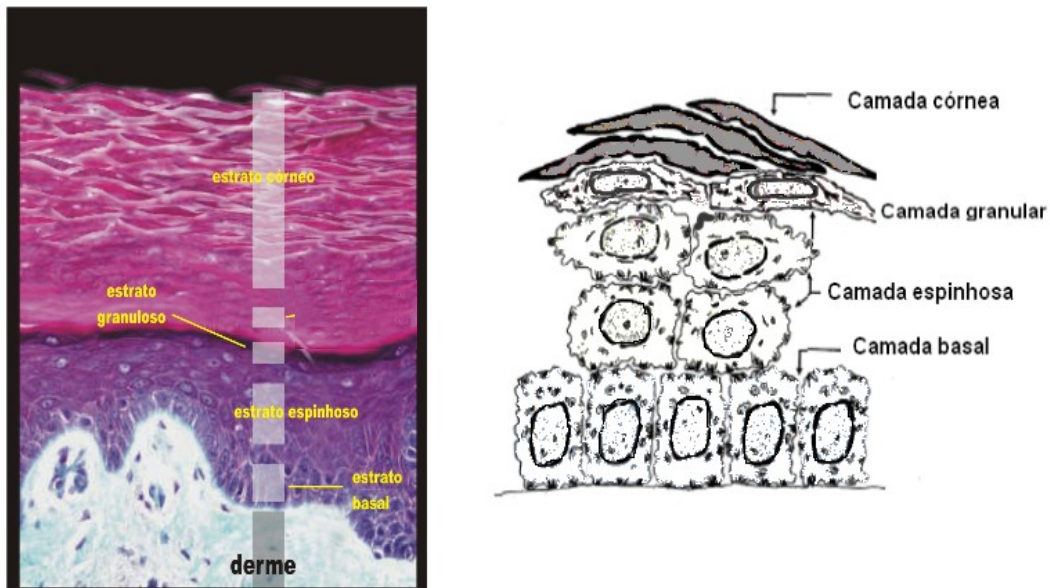


Fig. 1.2: Fotomicrografia da divisão da epiderme em camadas (estratos) e um esquema ilustrando o arranjo das células nos estratos. As células nascem na camada basal e vão empurrando as células mais externas, de forma que a divisão entre as camadas mencionadas no texto não é nítida, pois o processo é contínuo [10].

## 1.2 O Processo de Diferenciação Celular

A epiderme é constituída principalmente de queratinócitos, células ricas em filamentos de queratinas que constituem aproximadamente 90% do tecido [11]. Os queratinócitos são os precursores dos corneócitos, os quais são formados a partir do processo de diferenciação

celular (Fig. 1.2 da direita). É na camada basal que se inicia o processo de diferenciação celular dos queratinócitos, estas células se movem para as camadas superiores da epiderme se diferenciando até formarem os corneócitos. Ao passar da camada basal para camada espinhosa as células sofrem alterações em suas formas, assumindo um formato poligonal. O processo de diferenciação terminal ocorre no estrato granular quando as células perdem suas organelas citoplasmáticas, tornando-se anucleadas e ricas em queratinas, e assim vão se rearranjando em estruturas densamente empacotadas. Quando se tornam totalmente queratinizadas, as células passam a ser denominadas corneócitos e compõem o EC até que ocorra a descamação. Este processo leva em torno de 24 dias até ser reiniciado para renovação do EC [12].

Durante o processo final de diferenciação, a queratina presente no citoplasma dos corneócitos tem sua estrutura reforçada pela oxidação de seus grupos sulfidril (SH) em dissulfeto (S-S). Esta oxidação confere ao envelope celular dos corneócitos (ECC) uma alta insolubilidade, que se deve exatamente ao fato de que suas proteínas são interligadas por pontes cruzadas de dissulfeto e ligações isopeptídicas  $N^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$ , as quais são formadas pela enzima transglutaminase presente na membrana do queratinócito [13]. Esta característica insolúvel das proteínas do EC dificulta a realização de estudos mais detalhados a respeito das suas estruturas e composições. Entretanto, estudos baseados em modelos teóricos apresentaram um resultado estimado para a composição protéica do envelope celular, no qual a loricrina é a proteína mais abundante, em torno de 65-70% em EC humano, enquanto as demais proteínas se apresentam em quantidades menores: proteínas ricas em cisteína (14%), filagrina (10%), SPR's (5%), cistatina-a e involucrina (2-5% cada) [14,15]. Anormalidades no processo de formação do envelope influenciam a integridade funcional e estrutural dos corneócitos. Portanto, o processo de diferenciação celular é extremamente importante para a manutenção do papel protetor da pele contra agentes externos que possam oferecer danos ao organismo, além do que é este processo que contribui para a constante regeneração deste tecido [16].

### ***1.3 O Estrato Córneo***

A camada mais superficial da pele, conhecida como camada cornificada ou EC (Fig. 1.2), tem sido identificada como a principal barreira cutânea contra a difusão de substâncias, incluindo a água. Qualquer agressão que o atinja resulta em uma maior permeabilidade da água e de outros compostos além de uma conseqüente desidratação da pele. O EC, quando

seco, possui uma espessura de aproximadamente 10-15  $\mu\text{m}$  de espessura. Ele contém cerca de 10-25 camadas de células anabolicamente mortas e ricas em queratinas, os corneócitos, envolvidos por um envelope lipídico e embebidos em uma matriz lipídica intercelular. A composição lipídica da lamela intercelular não é muito usual em membranas, tendo como maiores classes as ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres, além de uma pequena quantidade de sulfato de colesterol. Devido a sua estrutura altamente organizada o EC é frequentemente descrito como uma estrutura de tijolos (corneócitos e proteínas) e cimento (lamelas lipídicas) (Fig. 1.3). Os lipídios contribuem para a função de barreira de água e outros solutos, enquanto o EC como um todo protege o organismo em relação aos danos físicos e entrada ou saída de substâncias maiores. [17].

O EC contém aproximadamente 15% de água, 70% de proteínas e 15% de lipídios [19]. O baixo nível de hidratação se deve às hidrólises e degradação de ácidos nucleicos, proteínas, fosfolipídios e outros compostos com capacidade higroscópica (capacidade de reter água).

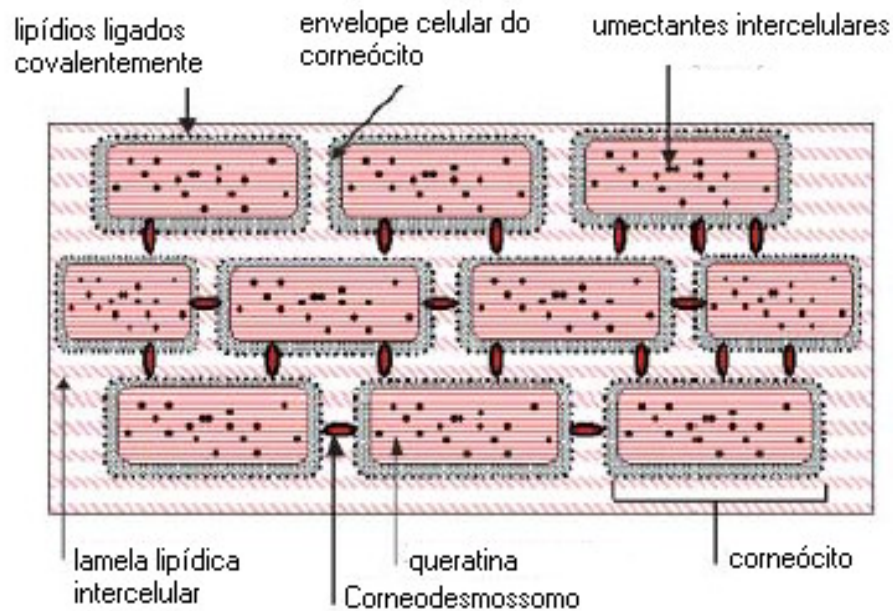


Fig. 1.3: Ilustração esquemática do modelo “tijolos e cimento” representando a estrutura do EC. [18].

### 1.3.1 Os tijolos (Corneócitos)

O corneócito não contém organelas citoplasmáticas e núcleo sendo formado por lamínulas delgadas poligonais e uma estrutura queratinizada ligada a diversas proteínas. Nesta célula, a membrana plasmática dá lugar a uma complexa estrutura formada por um envoltório protéico e um envoltório lipídico caracterizados principalmente pelos seus altos graus de

hidrofobicidade [20]. No envelope lipídico os lipídios são covalentemente ligados ao envelope protéico dos corneócitos, mais abundantemente à involucrina, e consistem principalmente de  $\omega$ -hidroxiceramidas com cadeias longas (30-34 carbonos) [21]. O papel dos lipídios do envelope lipídico do corneócito ainda não está completamente entendido, entretanto, há algumas hipóteses sobre as possíveis funções deste envelope: (a) os lipídios covalentemente ligados assumem um papel importante na organização dos lipídios intercelulares, agindo como substratos que facilitam a orientação da lamela paralela ao corneócito. (b) Os lipídios covalentemente ligados podem facilitar a interação do interior hidrofílico dos corneócitos com o domínio lipídico intercelular. (c) Os lipídios covalentemente ligados podem estabilizar a estrutura do EC e a coesão entre os lipídios intercelulares. (d) Estes lipídios podem fornecer uma barreira, em torno dos corneócitos, à permeabilidade e impedir a difusão de substâncias através do envelope [22].

### 1.3.2 O cimento (*Lipídios intercelulares*)

Os corpos lamelares, que surgem no EE, passam por um processo de extrusão, no qual lipídios polares são convertidos em lipídios altamente hidrofóbicos. Como resultado, fosfolipídios são quase que ausentes no EC. Estes lipídios se organizam espontaneamente em estruturas multilamelares entre os corneócitos, formando uma fase lipídica contínua que ocupa aproximadamente 20% do volume total do EC [23]. Estas lamelas lipídicas são estruturas alinhadas paralelamente à superfície do EC. A Fig. 1.4 mostra as camadas lipídicas após a remoção da camada superior do EC.

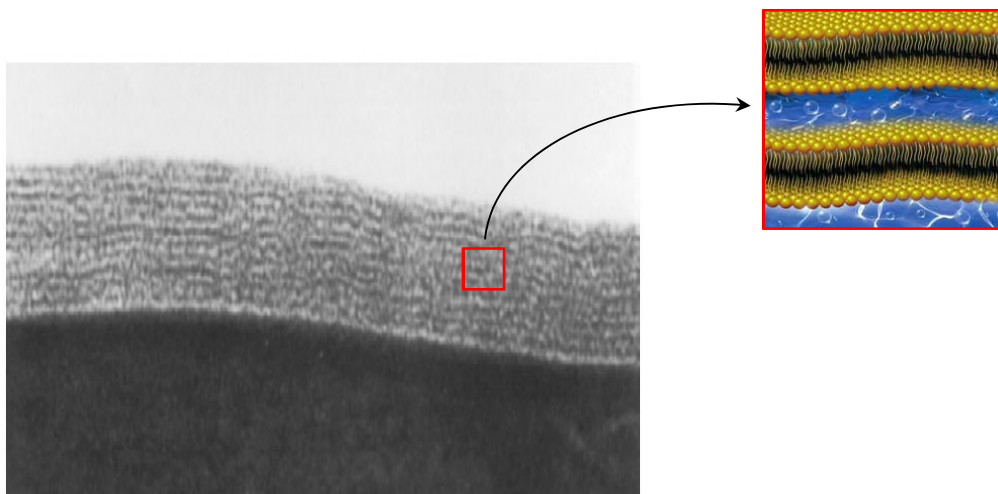


Fig. 1.4: Lamela lipídica normal (ampliação de 200.000x). A caixa pequena à direita mostra a ampliação de uma pequena região desta lamela, destacando o arranjo das bicamadas, em azul está mostrada a região aquosa e em amarelo as bicamadas lipídicas [25].

Os lipídios lamelares (cimento), que envolvem o corneócito, são predominantemente compostos por 41% de ceramidas, 27% de colesterol, 10% de colesteril ésteres, 9% de ácidos graxos livres e 3% de sulfato de colesterol [24]. Os ácidos graxos contribuem para um pH ácido no EC que é de aproximadamente 5,5. É esta acidez que protege o corpo contra colônias de bactérias nocivas que podem se alojar na superfície da pele. Já as ceramidas são resistentes à oxidação que no caso da pele é de grande importância devido ao contato com as moléculas de oxigênio do ar e exposição à radiação UV.

A Fig. 1.5 ilustra as várias classes de ceramidas presentes em EC humano e suíno. As ceramidas são estruturalmente heterogêneas e consistem de duas longas cadeias hidrocarbônicas e uma pequena cabeça polar com vários grupos funcionais. Cada uma das 9 ceramidas identificadas em EC humano contém grupos polares compostos de esfingosina (S) fitosfingosina (P) ou 6 hidroxiesfingosina (H), nos quais as bases dos ácidos graxos *non-hidroxi* (N), ou *a*-hidroxi (A), estão ligados ao nitrogênio da amida. Estes ácidos graxos têm comprimento de cadeia variável, sendo que os comprimentos com 24 e 26 átomos de carbono são os predominantes. Além disso, temos também três acilceramidas CER1 (EOS), CER4 (EOH) e CER9 (EOP) como as únicas estruturas que contem ácido linoléico quimicamente ligado a um ácido graxo  $\omega$ -hidroxi (EO) e com um comprimento de cadeia de 30 a 34 átomos de carbono aproximadamente [26,27].

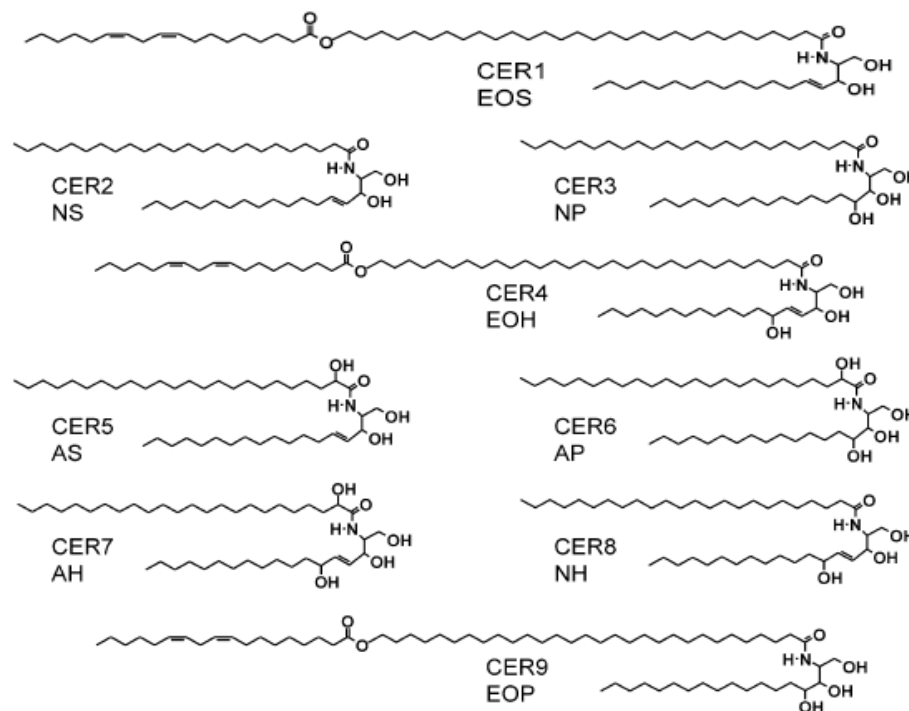


Fig. 1.5: Estruturas moleculares das ceramidas naturais presentes em EC humano [27].

Estudos realizados por meio de microscopia eletrônica de criofratura [28] confirmaram a hipótese de que os lipídios são organizados em lamelas localizadas na região intercelular do EC. Em micrografias de transmissão eletrônica (Fig. 1.6) usando o tetróxido de rutênio ( $\text{RuO}_4$ ), estas estruturas lamelares aparentam estar organizadas em unidades trilamelares repetidas, seguindo um padrão de banda largo–estreito–largo [29,30]. Os padrões lamelares freqüentemente vistos incluem três, seis, e nove estruturas lamelares (Fig.1.6) [29,31], sendo que os padrões de três bandas claras são vistos entre as extremidades adjacentes dos corneócitos, enquanto os padrões com seis e nove bandas são vistos entre as superfícies planas e largas de células adjacentes. Adicionalmente, resultados de difração de raios-X a pequeno ângulo revelaram que os lipídios no EC formam duas fases lamelares com periodicidade de aproximadamente 6 e 13 nm, respectivamente [32,33].

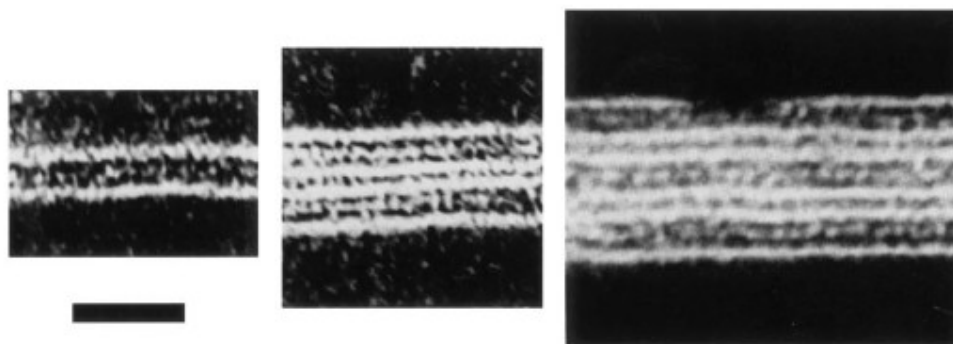


Fig. 1.6: Micrografia de transmissão eletrônica mostrando os padrões de estruturas lamelares contendo três, seis, e nove lamelas dentro dos espaços intercelulares do estrato córneo. Barra = 100 nm [29].

Em 2004 foi mostrado pela primeira vez a formação da fase de periodicidade longa com misturas de colesterol, ceramidas sintéticas e ácidos graxos livres [34]. Estas misturas foram preparadas em uma proporção semelhante encontrada no EC nativo, com o conteúdo de ceramidas sintéticas CER1, CER3 e CER4 preparadas em uma relação molar 1:7:2 respectivamente. E a presença dos ácidos graxos livres foi crucial para alcançar uma organização lipídica similar encontrada no EC nativo de suíno e humano. Em outro estudo, o *modelo de sanduíche* foi proposto para descrever a organização dos lipídios intercelulares do EC [35]. De acordo com este modelo (veja Fig. 1.7) os lipídios da fase de periodicidade longa estão organizados em uma estrutura tri-lamelar: duas camadas largas com uma estrutura cristalina (ortorrômbica) que são separadas por uma camada lipídica central com domínios fluidos. Este padrão largo-estreito-largo de cadeias hidrocarbônicas corresponde a imagens obtidas por microscopia eletrônica [35].

Esta periodicidade de 13 nm é uma excepcional característica do EC, uma vez que ela não é identificada em outras membranas biológicas. Estudos envolvendo difração de raios-X de alto ângulo indicaram que os lipídios do EC humano, na fase cristalina, são predominantemente arranjados em estruturas do tipo ortorrômbica, e possivelmente uma fase gel com um ligeiro empacotamento do tipo hexagonal [33,36].

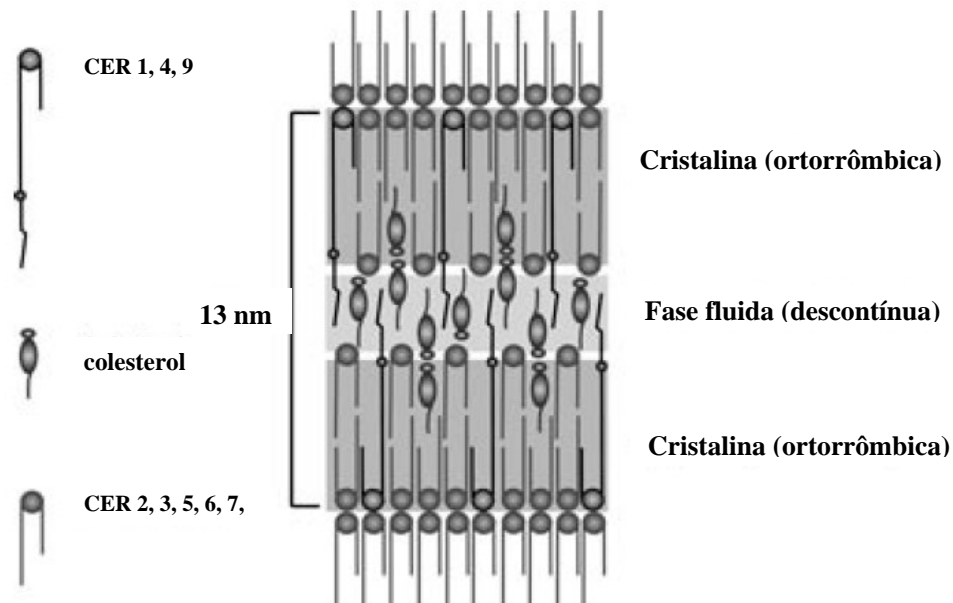


Fig. 1.7: Organização lipídica na fase lamelar de 13 nm de acordo com o modelo de sanduíche [35].

### 1.3.3 Rotas de permeação de fármacos no EC

A permeação de um fármaco através da pele é um processo complexo que envolve múltiplos fatores. O primeiro passo é a partição do fármaco no EC e subsequentemente é necessário que o fármaco consiga se difundir do ambiente lipofílico para o ambiente hidrofílico atingindo a circulação sanguínea. Teoricamente, existem dois caminhos possíveis no EC para difusão do fármaco: o transcelular, no qual o transporte é transversal aos corneócitos alternando entre estruturas hidrofílicas e lipofílicas, e no transporte intercelular o fármaco segue a rota entre os corneócitos através das lamelas lipídicas (Fig. 1.8). Acredita-se que a rota intercelular é o principal caminho para a maioria dos fármacos [37,38]. Dados experimentais têm mostrado que a permeação através do EC é fortemente dependente da lipofilicidade e do peso molecular da maioria dos compostos [38,39]. Entretanto, tem sido sugerido que compostos altamente hidrofílicos penetram através da região hidrofílica dos corneócitos e da matriz lipídica [40]. A chave para promover a permeação de moléculas através da pele, a um fluxo considerável, é alterar as propriedades dos dois principais

caminhos, transcelular e intercelular. A hidratação e a elevação da temperatura aumentam a permeação de moléculas lipofílicas revelando que o fluxo destas moléculas está associado com as transições de fase das membranas [41].

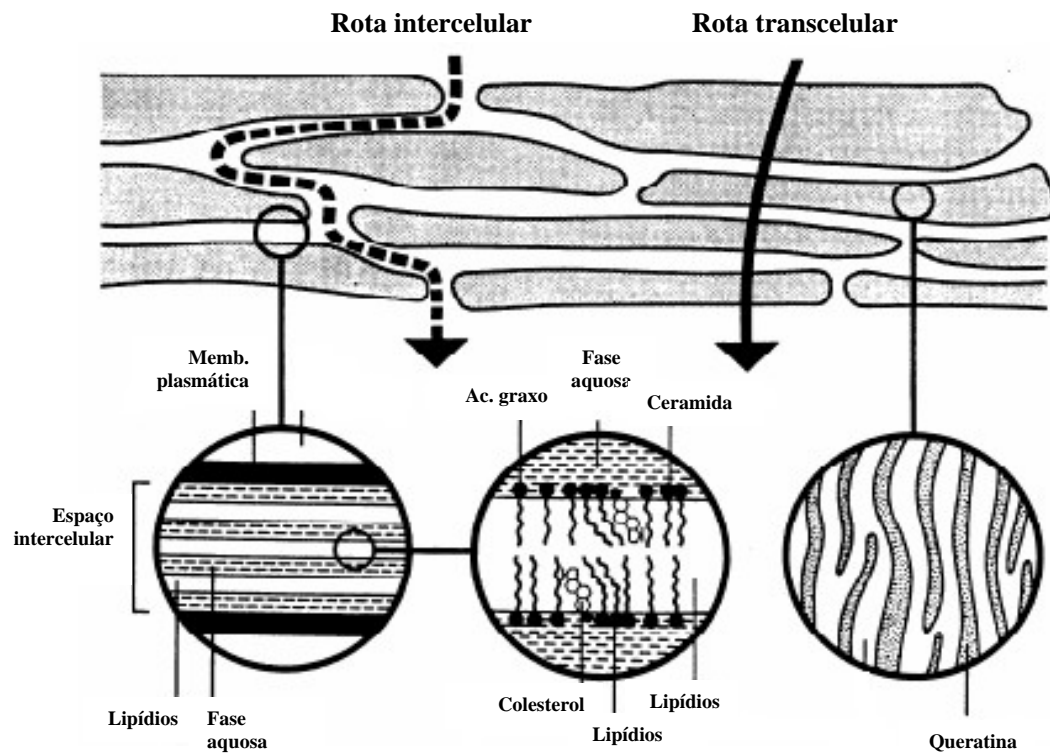


Fig. 1.8: Um esquema representando as rotas de permeação de fármacos no EC [42].

### ***1.4 Terpenos como Aumentadores de Permeação***

A descoberta de um promissor aumentador de permeação até sua comercialização requer uma ampla variedade de testes toxicológicos. Um estudo recente [4] realizado com mais de 250 moléculas aumentadoras de permeação mostrou que apenas 0,02% dos candidatos a aumentadores de permeação passam por todos os testes sobre toxicidade. Isto se deve ao fato de que, geralmente, potentes aumentadores de permeação são também muito irritantes à pele em concentrações necessárias para induzir suficientes aumentos de penetração. Por outro lado, estes aumentadores quando combinados entre si podem agir em sinergismo em uma formulação aumentando o fluxo e diminuindo seu potencial de irritação na pele [43].

Um aumentador de permeação ideal precisa, primariamente, satisfazer as seguintes condições [44]:

- Ser não tóxico, não irritante, não alérgico e não ser fototóxico.
- Ter uma ação rápida e precisa.
- Não devem ter atividade sistêmica.
- Atuar unidirecionalmente facilitando a entrada de fármacos sem permitir a saída de material endógeno do corpo.
- Ter ação reversível, ou seja, quando removidos da pele, as propriedades de barreira precisam retornar ao mesmo estado anterior ao contato com os aumentadores.
- Serem cosmeticamente aceitáveis.

Em geral a ação dos facilitadores da permeação se dá por três possíveis mecanismos: rompimento da estrutura lipídica altamente ordenada do EC; aumento da solubilidade do permeante no EC ou aumento da partição do fármaco no EC. A Fig.1.9 abaixo ilustra os possíveis mecanismos de ação dos aumentadores nas lamelas lipídicas do EC.

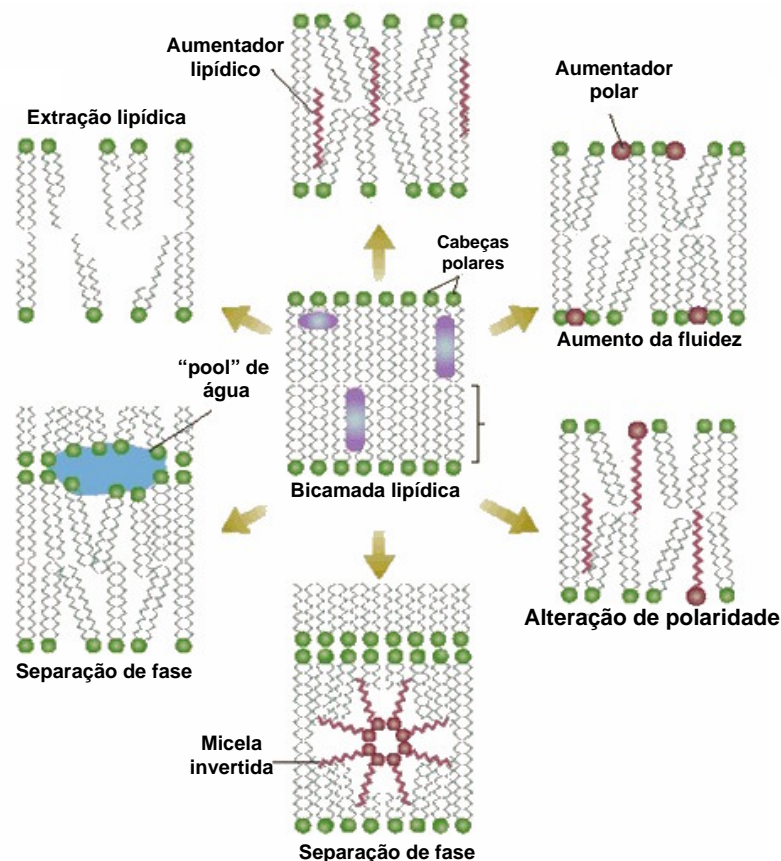


Fig. 1.9: Ação dos aumentadores de permeação nos domínios lipídicos [49].

Os terpenos são adequados aumentadores de permeação da pele com baixo potencial de irritação. Dentre uma variedade de terpenos, 1,8-cineole, DL-mentol,  $\alpha$ -terpineol e limoneno são geralmente considerados como seguros (GRAS- do inglês *generally regarded as safe*) e têm sido amplamente utilizados como aumentadores de permeação de vários. Os terpenos são componentes de óleos essenciais de plantas, contendo apenas carbono, hidrogênio e oxigênio, e são definidos e classificados pela regra do 'isopreno' [45]. Eles podem ser classificados dependendo dos seus grupos químicos (isto é, álcoois, ésteres, cetonas, éteres...). Estudos mostraram que terpenos hidrocarbônicos são fracos aumentadores de permeação de fármacos hidrofílicos quando comparados aos terpenos alcoólicos e cetônicos. Os terpenos éteres mostraram serem potentes aumentadores de permeação para o 5-fluoracil, enquanto forneceram um moderado aumento para a permeação do estradiol, em contraste aos fármacos lipofílicos. Resultados similares foram encontrados para a permeação da molécula lipofílica indometacina em pele de rato; enquanto os terpenos hidrocarbônicos, especialmente o limoneno, foram efetivos aumentadores, já os terpenos oxigenados (1,8-cineole) foram pouco efetivos [44]. Outros fármacos hidrofílicos, tais como propanolol e diazepam tiveram seus fluxos através da pele aumentados por terpenos contendo grupos polares. Narishetty e co-autores mostraram que o L-mentol e o 1,8-cineole quando aplicados em 5% (peso/volume) em 66,6% de etanol como veículo podem aumentar consideravelmente os níveis de permeação do AZT através da pele de rato (menos permeável do que a humana) [46].

A atividade dos terpenos como aumentadores de permeação está primariamente relacionada às estruturas químicas bem como às propriedades físico-químicas dos permeantes. A seguir destacaremos algumas características de alguns terpenos candidatos a aumentadores de permeação comercializáveis [47]. Veja as estruturas moleculares destes terpenos na seção que descreve os materiais e os métodos utilizados neste trabalho.

- **Mentol:** É um monoterpeneo alcoólico obtido a partir da floração do cume da *Mentha piperita*. Seu ponto de fusão (*melting point*) está em torno de 42-45°C. Mentol tem sido utilizado como aumentador de penetração de uma variedade de fármacos, incluindo hidrocloreto de imipramina, cafeína, hidrocortisona, hidrocloreto de propanolol e AZT. A maior proposta acerca dos mecanismos de ação do mentol no aumento da permeação da pele está relacionada a uma ruptura das ligações de hidrogênio entre os grupos polares das ceramidas presentes nas bicamadas lipídicas dos domínios intercelulares do EC.

- **Limoneno:** É um monoterpene lipofílico hidrocarbônico (contem apenas carbono e hidrogênio), obtido da casca do limão, *Citrus limon*. O limoneno é um potente aumentador de permeação de moléculas lipofílicas e compostos anfifílicos, mas é pouco efetivo para compostos hidrofílicos, tais como o manitol. Em outros estudos, o limoneno se mostrou eficaz em promover o aumento da permeação do succinato de sumatriptano [48]. Extração lipídica está entre os mecanismos de ação sugeridos para o limoneno no EC [49].
- **Cineole:** É um monoterpene cíclico do tipo éter obtido do óleo essencial da folha *Eucalyptus globulus*, e outras espécies de eucalipto. Tem sido proposto que o cineole fornece um melhor aumento de permeantes hidrofílicos [44]. Foi reportado que o cineole é um efetivo aumentador do hidrocloreto de propanolol através da pele, quando comparado com mentol e propilenoglicol [50]. Os possíveis mecanismos de ação deste terpeno, no aumento da permeação do AZT, estão relacionados à modificação da propriedade de barreira da pele. Os mesmos autores mostraram com dados de DSC “*differential scanning calorimetry*” e de ATR-FTIR “*Attenuated total reflectance infrared*” que o 1,8-cineole aumenta a permeação do AZT modificando a estrutura lipídica do EC de um arranjo do tipo ortorrômbico para um empacotamento do tipo hexagonal compacto [6,46].
- **Terpineol:** É um monoterpene alcoólico de ocorrência natural que pode ser isolado do óleo de pinho. Estudos realizados com hidrocloreto de imipramina mostraram que o terpineol produz um considerável aumento da permeação deste fármaco na pele, tais como o haloperidol [51,52]. O terpineol, assim como o mentol, tem sido identificado como um eficiente aumentador da permeação de moléculas hidrofílicas. Seus mecanismos de ação estão relacionados à ruptura das pontes de hidrogênio entre os grupos cabeças polares.

## 2 – OBJETIVOS

- Investigar as características dos espectros de marcadores de spin em membranas de EC utilizando a espectroscopia de RPE. Analisar os espectros por meio do programa de simulação NLLS.
- Utilizar a espectroscopia de RPE de marcadores de spin para investigar as propriedades físico-químicas das membranas e proteínas do EC e analisar os efeitos de facilitadores da permeação da classe dos terpenos. Os terpenos escolhidos foram o 1,8-cineole (éter, receptor de hidrogênio),  $\alpha$ -terpineol e DL-mentol (alcoóis, doadores de hidrogênio) e (+)-limoneno (hidrocarboneto, não participa de ligações de hidrogênio).
- Investigar a atividade do etanol no EC visando seu uso como veículo dos terpenos que são pouco solúveis em água. Como o EC é um sistema complexo, também são feitos estudos em DPPC que é uma membrana modelo mais simples e de propriedades físico-químicas bem conhecidas.
- Como muitas moléculas apresentam potencial de irritação porque afetam proteínas também são marcadas as proteínas do EC a fim de examinar se os terpenos apresentam esse tipo de toxicidade.
- Avaliar as informações espectrais de diferentes marcadores de spin lipídicos, uma classe de marcadores que ficam estruturados na membrana fornecendo informações sobre a dinâmica, polaridade e que permitem monitorar as transições de fase. E também o marcador TEMPO que é uma molécula pequena (PM = 150,2 g) e anfipática que particiona a membrana e assim pode mimetizar um fármaco.
- Traçar o perfil termodinâmico das membranas de RPE por meio de informações reportadas através dos espectros do marcador de spin TEMPO, uma vez que o coeficiente de partição deste marcador bem como seu movimento rotacional no interior da membrana retrata com precisão as transições de fase.

3.1

**3.1**

# 3 – INTRODUÇÃO A RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

## ***Introdução***

Neste capítulo, trataremos de introduzir alguns aspectos básicos referente à RPE, desde uma fundamentação teórica simplificada até a interpretação dos espectros de membranas. Por fim, apresentaremos as principais características do método de marcadores de spin.

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica é uma técnica que monitora as transições induzidas entre os níveis Zeeman de um sistema paramagnético situado em um campo magnético estático, ou seja, ela monitora a absorção de energia de um campo de radiação quando as moléculas mudam seu estado de energia. Ela permite ao investigador detectar e caracterizar moléculas com elétrons desemparelhados, tais como radicais livres ou complexos orgânicos e inorgânicos de íons metálicos, sem alterar ou destruir estas moléculas. De modo que a RPE surge do fato de determinados átomos possuírem momento angular intrínseco (spin) e um momento magnético ( $\mu$ ) associado [53].

A primeira observação de um espectro de RPE foi feita pelo russo E. Zavoisky, em 1945. De lá pra cá, a técnica tem se mostrado uma eficiente alternativa para estudos de diversos sistemas, seja de caráter físico, químico ou biológico. Sendo que neste último a RPE tem ganhado uma maior popularidade, pois consegue, de maneira específica, avaliar sistemas extremamente complexos sem alterar suas propriedades como um todo. Inicialmente a espectroscopia de RPE era utilizada basicamente por físicos. Entretanto, esta espectroscopia é hoje muito bem aceita em muitos aspectos e em diferentes áreas do conhecimento. A facilidade de interpretação, qualitativa, dos espectros em termos dos parâmetros magnéticos e dos parâmetros moleculares é a principal responsável pela versatilidade da RPE. Outro fator importante é a sensibilidade das variáveis espectrais (frequência de ressonância, desdobramento hiperfino e forma de linha) devido à distribuição eletrônica, orientações moleculares, natureza do ambiente e movimento molecular.

Apenas em 1954, nove anos após os trabalhos de Zavoisky, surgiram os primeiros resultados de estudos com sistemas biológicos usando a técnica de RPE. Commoner, Townsendj e Pake (1954) [54] observaram que a concentração de radicais livres em tecidos biológicos está relacionada com a atividade metabólica dessas espécies biológicas. Desde então a técnica de RPE tem sido muito explorada no estudo de problemas bioquímicos e biomédicos como uma ferramenta altamente sensível para a descoberta de espécies radicais livres. Materiais paramagnéticos, incluindo cátions metálicos e complexos ou radicais orgânicos estáveis (normalmente nitróxido), podem ser adicionados às amostras como sondas

de ambientes moleculares locais, com a finalidade de monitorar seus comportamentos dinâmicos. Junto com outros radicais orgânicos “estáveis”, o nitróxido pode ser usado para determinar a atividade metabólica em diversos sistemas biológicos pela redução do radical [55].

A Fig. 3.1 mostra um diagrama de blocos simplificado de um espectrômetro de RPE. Basicamente ele consiste de uma fonte de microondas (Klystron), um circulador que direciona a microonda para a amostra e depois para o sistema de detecção. A onda eletromagnética (microonda) produzida pela fonte é conduzida por meio de uma guia de onda. O sistema de detecção é sensível a fase e utiliza um diodo detector para medir a intensidade da microonda. A amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante que consiste de uma caixa metálica, normalmente com o interior banhado a ouro, com dimensões que permitem obter um valor mínimo para a componente do campo elétrico da radiação eletromagnética incidente na amostra, e um valor máximo para a componente magnética. A cavidade encontra-se entre duas bobinas, geradoras do campo de modulação (com frequência de 100 KHz). O eletroímã produz o campo magnético e a varredura de campo. Todo sistema de detecção está interligado a um computador que permite ao usuário monitorar as condições operacionais do equipamento e a gravação do espectro.

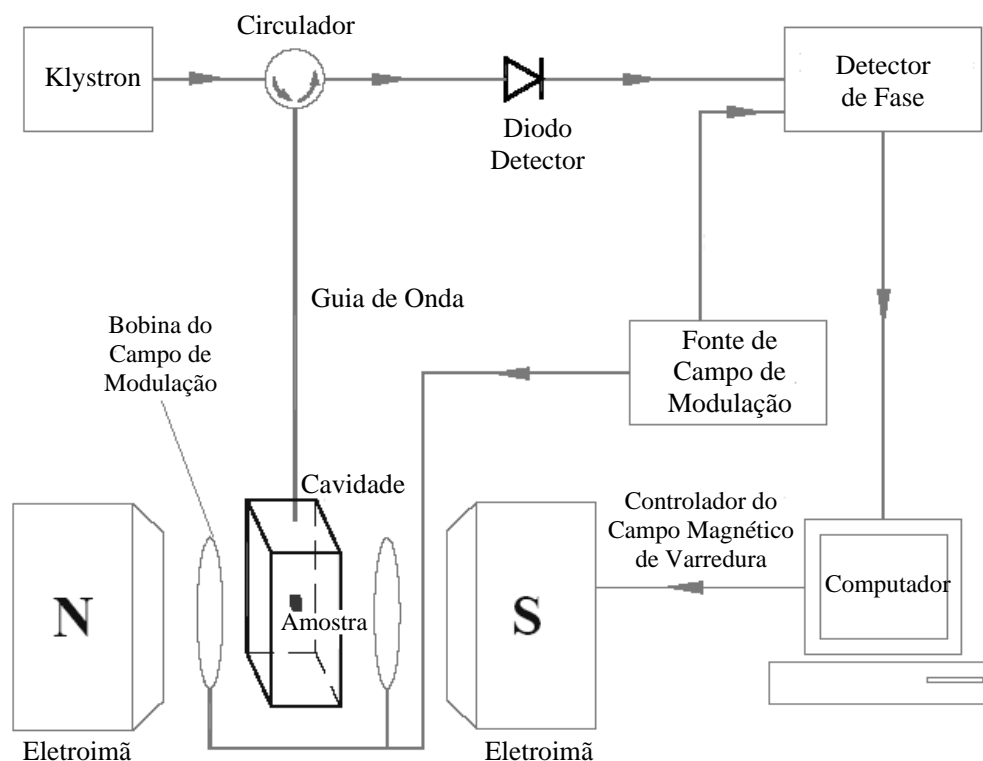


Figura 3.1: Diagrama de blocos do equipamento de RPE [56].

No experimento de RPE as transições eletrônicas são monitoradas usando os seguintes passos: (i) A amostra é colocada em uma cavidade de ressonância onde é ajustada a frequência de acoplamento do feixe de microonda incidente, geralmente na escala dos GHz, no espectrômetro que opera em frequências de banda-X; (ii) A amostra na cavidade é sujeita, continuamente, a uma potencia de microonda, tipicamente da ordem de 10-20 mW para marcadores de spin nitróxido; (iii) O campo magnético é ajustado, de modo a varrer uma faixa em torno do campo de ressonância, isto é, desde um valor inicial abaixo do campo de ressonância até um valor acima. No caso do radical nitróxido em membranas, esta varredura é em torno de 100 G, e dura cerca de 44 s; (iv) Durante a varredura de campo magnético, o elétron desemparelhado dos spins nas amostras atingem a ressonância, de acordo com a condição de ressonância (descrita nas próximas seções). Essa ressonância é mostrada em linguagem espectral; (v) A saída de um espectrômetro de RPE é um sinal gráfico (espectro de absorção) que reflete a amplitude da microonda do sinal refletido versus a intensidade do campo.

Uma importante aplicação da técnica de RPE encontra-se no estudo de membranas biológicas. Como a maioria dos sistemas biológicos é de origem diamagnética (não possui elétrons desemparelhados), além da sua inespecificidade de informação, foi desenvolvido em 1965 por MacConnel um método conhecido como *spin label* (marcador de spin), que consiste na inserção de moléculas repórteres que possuem um grupamento paramagnético (geralmente o nitróxido) no interior dos sistemas biológicos, estas moléculas fornecem um espectro de ressonância composto de três linhas simples. Por análise espectral e/ou simulação computacional pode-se obter informações sobre a viscosidade do meio onde se encontra a sonda repórter, polaridade do meio, orientação molecular, movimentos de rotação ou translação, medidas intermoleculares entre outras [57]. O método de marcadores de spin trouxe contribuições fundamentais para a compreensão da estrutura das membranas artificiais e naturais. Neste trabalho, por exemplo, utilizamos a técnica de spin label para avaliar o comportamento de dois tipos de membranas, nas variadas condições.

### **3.2 O Fenômeno de Ressonância**

Cada elétron em um átomo executa uma órbita em torno do seu núcleo, e para cada um destes elétrons está associado um momento magnético intrínseco  $S$ . Este momento magnético, que é inerente às partículas elementares, é comumente denominado de momento magnético de spin (ou, alternativamente, somente de spin). Apenas dois valores de spin são observados: “*up*” ou “*down*”. Nas moléculas, os elétrons estão emparelhados em sua maioria e, em

conformidade com o princípio da exclusão de Pauli, os elétrons de um mesmo orbital estão com seus spins apontando em sentidos opostos, resultando em um momento magnético total nulo. Em substâncias paramagnéticas, cada elétron desemparelhado tem um nível de energia associado a ele. Na ausência de um campo magnético, todos os elétrons desemparelhados têm a mesma energia associada, ou seja, o sistema é dito degenerado. Entretanto, quando eles são sujeitos a um campo magnético estático, os elétrons desemparelhados são separados em dois níveis diferentes, correspondendo a dois estados de energia bem definidos, um para o estado de spin orientado paralelamente (spin *up*) e outro para antiparalelamente (spin *down*) ao campo externo. Assim, o campo magnético aplicado separa o sistema de mesma energia em dois subsistemas com uma diferença de energia,  $\Delta E$ .

As transições de energia, nas quais os elétrons alteram seu estado de spin, são possíveis desde que o campo magnético aplicado (campo externo) esteja também acoplado com ondas eletromagnéticas de frequência apropriada. A energia requerida para que as transições ocorram é absorvida na forma de quanta de luz (um quantum de luz tem energia  $h\nu$ , onde  $h$  é a constante de Planck ( $6,625 \times 10^{-27}$  erg-seg) e  $\nu$  é a frequência da luz em hertz). Para que a absorção ocorra duas condições precisam ser satisfeitas [53]:

- I. O pacote de energia contido no quanta de luz ( $h\nu$ ) precisa corresponder à separação ( $\Delta E$ ) dos níveis de energia, entre os quais uma transição ocorre que é a *condição de ressonância*,

$$\Delta E = h\nu \quad (3.1)$$

- II. A componente magnética (ou elétrica) oscilante da luz precisa ser capaz de estimular uma oscilação do dipolo magnético (ou elétrico) na molécula. Se estas condições são satisfeitas, então nós dizemos que a transição é permitida [53].

Dipolos magnéticos permanentes em uma molécula estão associados tanto com os elétrons quanto com os núcleos. Dois tipos de dipolos magnéticos são possíveis, um surgindo do movimento dos elétrons sobre o núcleo de um átomo (dipolo magnético orbital), e o outro do hipotético giro do elétron em torno do seu eixo (dipolo magnético de spin). Na maioria dos casos encontrados, mais de 99% dos dipolos magnéticos se devem ao momento angular de spin, com uma pequena contribuição orbital [58].

A quantização do momento angular de spin em uma direção específica conduz a uma quantização dos níveis de energia de um sistema de dipolos magnéticos em um campo magnético. Sendo, portanto, admitido apenas valores discretos para a energia do sistema,

comumente referidos como energias Zeeman. As energias  $E_i$  dos sistemas são obtidas a partir da solução da equação de Schroedinger:

$$\hat{H}\psi_i = E_i\psi_i \quad (3.2)$$

onde  $\hat{H}$  é o operador Hamiltoniano de spin e  $E_i$  é o autovalor energia correspondente a autofunção  $\psi_i$ . Usando a notação de Dirac para um sistema de spins com  $S = 1/2$ , onde os dois estados de spin são caracterizados por números quânticos  $M_s = \pm 1/2$ , temos para a componente  $z$  do operador de spin ( $\hat{S}$ )

$$\hat{S}_z|\alpha\rangle = +\frac{1}{2}|\alpha\rangle \quad \text{e} \quad \hat{S}_z|\beta\rangle = -\frac{1}{2}|\beta\rangle \quad (3.3)$$

os símbolos  $\alpha$  e  $\beta$  são usados para os estados  $M_s=+1/2$  e  $M_s=-1/2$ .

Sendo o momento magnético de spin e o momento de dipolo magnético proporcionais, podemos escrever

$$\hat{\mu} = \gamma\hat{S}\hbar \quad (3.4)$$

onde a constante de proporcionalidade  $\gamma$  é a *razão giromagnética*,  $\gamma = -q/2mc$ . Se  $q$  é igual a carga eletrônica  $-e$ , o fator  $\gamma$  torna-se, de maneira mais geral, igual a  $-eg/2m_e c$ , no qual  $m_e$  é a massa eletrônica,  $c$  é a velocidade da luz e  $g$  é um fator necessário (fator- $g$ ). O fator  $g$  pode ser considerado como uma quantidade característica da molécula no qual o elétron desemparelhado está localizado. Este fator será mais bem discutido em seção posterior. Cada múltiplo inteiro de  $\hbar$ , no valor do momento angular orbital, tem um momento magnético orbital associado igual à  $eh/4\pi mc$ . Para o elétron, esta constante é chamada de *magnéton de Bohr* ( $\beta$ ), e o fator  $g$  é muito próximo de 2, sendo que o valor obtido pela teoria eletromagnética quântica para o elétron livre é  $g_e = 2,00232$  [59].

Logo,

$$\hat{\mu} = -\frac{geh}{4\pi m_e c}\hat{S} = -g\beta\hat{S} \quad (3.5)$$

Desde que  $E = -\mu \cdot H = -\mu_z H$  e que o operador Hamiltoniano atua nos estados de spin da forma

$$H|a\rangle = E_a|a\rangle \quad \text{e} \quad H|\beta\rangle = E_\beta|\beta\rangle, \quad (3.6)$$

podemos escrever o Hamiltoniano do sistema da seguinte forma

$$\hat{H} = -\hat{\boldsymbol{\mu}} \cdot \mathbf{H} = g\beta H \hat{S}_z \quad (3.7)$$

Agora, utilizando as expressões (3.3), (3.6) e (3.7); obtemos

$$\begin{aligned} \hat{H} |\alpha\rangle &= g\beta H \hat{S}_z |\alpha\rangle = +\frac{1}{2} g\beta H |\alpha\rangle \\ \hat{H} |\beta\rangle &= g\beta H \hat{S}_z |\beta\rangle = -\frac{1}{2} g\beta H |\beta\rangle \end{aligned} \quad (3.8)$$

ou

$$E_{\alpha,\beta} = \pm \frac{1}{2} g\beta H \quad (3.9)$$

Estas são as energias Zeeman, as quais dependem do campo magnético  $H$  (Fig. 3.2). Deste modo, se o sistema for exposto a uma onda eletromagnética (comumente na faixa de microondas para um campo de 0,35 T) de frequência apropriada haverá uma absorção de energia, para um dado campo magnético  $H_r$ . Olhando para as equações (3.1) e (3.9) chegamos ao campo de ressonância dado por:

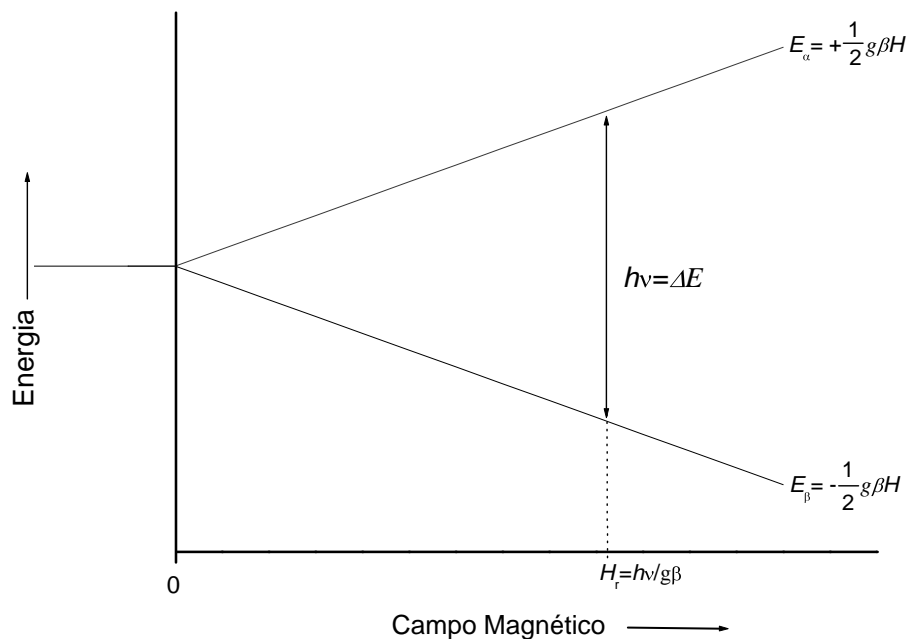


Fig. 3.2: Níveis de energia eletrônica em função da intensidade do campo magnético.  $H_r$  é o campo magnético de ressonância, ou seja, quando  $h\nu = g\beta H_r$ ;  $E_\alpha$  e  $E_\beta$  representam as energias dos estados  $M_s = +1/2$  e  $M_s = -1/2$ , respectivamente.

$$\begin{aligned}\Delta E &= h \nu = g \beta H_r \\ H_r &= \frac{h \nu}{g \beta}\end{aligned}\tag{3.10}$$

$H_r$  é o campo de ressonância. A segunda condição de ressonância é satisfeita quando a componente magnética da onda eletromagnética é polarizada perpendicularmente a direção do campo magnético estático. As transições entre estes dois estados de energia ocorrem tanto por absorção quanto por emissão de radiação eletromagnética, desde que seja satisfeita a condição I.

A condição (3.10) pode ser alcançada mantendo o campo magnético fixo e variando a frequência  $\nu$ , ou mantendo a frequência fixa e variando linearmente o campo magnético, entretanto, por conveniência instrumental, a segunda opção é mais utilizada.

### 3.3 Transições Entre Estados Quânticos Magnéticos

A aplicação de uma radiação eletromagnética de frequência apropriada induz transições eletrônicas de spin entre os dois níveis de energia Zeeman (eq. 3.9) com igual probabilidade tanto para absorção quanto para emissão. Se as populações dos dois níveis de energia fossem iguais não ocorreria nem absorção nem emissão e, portanto a condição de ressonância não poderia ser satisfeita.

É interessante entender como os níveis de energia ( $E_\alpha$  e  $E_\beta$ ) são populados. Para uma coleção de spins que não interagem entre si na presença de um campo magnético estático,  $\mathbf{H}$ , a distribuição eletrônica destes dois níveis no equilíbrio se dá de acordo com a distribuição de Boltzmann [60].

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{g\beta H}{kT}\right),\tag{3.11}$$

onde  $N_\alpha$  e  $N_\beta$  são os números de populações de partículas nos estados  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente,  $\Delta E$  é a diferença de energia entre estes estados ( $E_\alpha - E_\beta$ ),  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta. Sendo  $\Delta E$  muito pequeno (da ordem de três vezes) quando comparado a energia térmica  $kT$ , podemos expandir a expressão (3.11) em série de Maclaurin e considerarmos somente termos até primeira ordem, sendo assim

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} \cong 1 - \frac{h \nu}{kT} = 1 - \frac{g\beta H}{kT}.\tag{3.12}$$

Podemos notar de (3.12) que, no equilíbrio, haverá um ligeiro excesso de spins no estado  $\beta$  em comparação aos spins do estado  $\alpha$  que, embora pequeno, é suficiente para detectar a absorção de energia quando a condição de ressonância é alcançada. Considerando a população total de spins como  $N = N_\alpha + N_\beta$  e a diferença entre os dois níveis de energia como  $n = N_\alpha - N_\beta$ , temos que

$$\frac{n}{N} \cong \frac{g\beta H}{2kT} = \frac{\gamma\hbar H}{2kT}, \quad (3.13)$$

devido ao excesso de spins no estado de energia mais baixo ( $\beta$ ), a absorção da energia da microonda ocorre no sentido de  $\beta$  para  $\alpha$ . Na ausência de processos dissipativos, a população do estado  $\beta$  se iguala a população do estado  $\alpha$ . Neste caso, não há absorção de energia e, portanto, não pode ser observado qualquer sinal de ressonância. Este fenômeno é conhecido como *saturação*. Por outro lado, em consequência dos mecanismos de troca de energia entre os spins e a vizinhança através do movimento aleatório das moléculas, ocorre a reposição da população de spin do nível inferior através do mecanismo de relaxação. Para evitar a saturação, a velocidade de relaxação dos spins eletrônicos excitados para o nível de menor energia precisa ser tão grande quanto ou maior do que a velocidade com que eles absorvem a energia da microonda.

Para se reduzir a saturação e produzir um sinal de absorção facilmente detectável, a relaxação deveria ocorrer tão rapidamente quanto possível, isto é, o tempo de vida do estado excitado deveria ser pequeno. Um segundo fator, a relação inversa entre o tempo de vida de um estado excitado e a largura da sua linha de absorção, se opõe à vantagem de tempos de vida muito curtos. Assim, quando as velocidades de relaxação são altas, ou os tempos de vida são curtos, o alargamento das linhas impede medidas de alta resolução. Há dois tipos de processos de relaxação em espectroscopia de RPE: (1) *relaxação spin-rede*, ou longitudinal, e (2) *relaxação spin-spin*, ou transversal, [61].

**Relaxação Spin-Rede.** Em uma amostra paramagnética, em seu estado natural, os spins estão orientados aleatoriamente e quando aplicamos um campo magnético sobre elas os spins se orientam no sentido deste campo, originando assim uma magnetização. Após sofrerem transições eletrônicas, os spins tendem a voltar aos seus estados de equilíbrio, e, para que isso ocorra é necessário que a rede molecular receba em seus modos de vibração o excesso de energia do sistema de spins, este efeito é denominado de relaxação spin-rede. Ao tempo necessário para que este processo ocorra, por convenção, dá-se o nome de tempo de relaxação

spin-rede ( $T_1$ ). Além de depender da razão giromagnética ( $\gamma$ ) do elétron absorvedor,  $T_1$  é afetado fortemente pela mobilidade da rede. À medida que a mobilidade cresce, as frequências (vibracional e rotacional) aumentam, aumentando assim a probabilidade de uma variação magnética da magnitude apropriada para uma transição de relaxação;  $T_1$  fica menor como consequência.

**Relaxação Spin-Spin.** Atingida a condição de ressonância, cada spin deveria precessionar com uma frequência idêntica a da radiação absorvida, frequência de Larmor (veja seção seguinte). Entretanto, esses spins sofrem perturbação dos spins não excitados (que não estão em ressonância) da vizinhança. Essa perturbação reflete a variação da frequência de precessão dos spins excitados devido à flutuação dos estados quânticos dos spins da vizinhança que não estão em ressonância [62]. Essa flutuação de frequência causa o decaimento da memória de fase dos spins. Este decaimento permanece até que a componente transversal da magnetização retorne ao equilíbrio, esta é a relaxação spin-spin. O período de tempo necessário para que este processo ocorra é chamado de tempo de relaxação spin-spin ( $T_2$ ). A largura de linha dos espectros de ressonância é facilmente alterada pelo tempo de relaxação spin-spin, quanto maior for a largura de linha do espectro menor será  $T_2$ .

Quando dois elétrons vizinhos de mesma natureza têm velocidades de precessão idênticas, mas estão em estados quânticos magnéticos diferentes, os campos magnéticos de ambos podem interagir causando uma troca de estados, isto é, um elétron no estado de spin mais baixo é excitado, enquanto o núcleo excitado relaxa para o estado de energia mais baixa. Neste caso, não ocorre variação na população relativa de spins e, portanto, não ocorre diminuição na saturação, mas o tempo de vida médio de um elétron excitado é diminuído, promovendo assim um alargamento da linha de ressonância [61].

### ***3.4 Frequência de Larmor e Precessão do Momento Magnético.***

Como campo magnético oscilatório,  $H_1$ , associado à radiação eletromagnética varia periodicamente com uma frequência  $\nu$ , então, faz-se necessário uma interação coerente entre este campo e os momentos magnéticos,  $\mu$ , das partículas do sistema de spins. Logo, é preciso que alguma componente de  $\mu$  varie periodicamente com a mesma frequência de  $H_1$ . Por outro lado, para que ocorram transições entre os níveis de spin  $\alpha$  e  $\beta$ , a componente magnética de  $H_1$  deve ser perpendicular ao campo estático  $H$ , permitindo que os estados de energia sejam acoplados por meio de  $H_1$ . Usando a expressão (3.10) e escrevendo o magnéton de Bohr em termos da razão giromagnética,  $\gamma$ , temos:

$$h\nu = \frac{gehH}{4\pi m_e c} = h \frac{|\gamma|H}{2\pi}. \quad (3.14)$$

Definindo  $\omega_0 = |\gamma|H$ :

$$\nu_L = \frac{|\gamma|H}{2\pi} = \frac{\omega_0}{2\pi}, \quad (3.15)$$

$\nu_L$  é conhecida como *freqüência de Larmor*. A seguir mostraremos que o momento magnético de spin do elétron executa um movimento de precessão em torno do eixo-z com uma velocidade igual a  $2\pi\omega_0$ . O resultado de um magneto girando em um campo magnético foi primeiro dado por Larmor em 1904, e é conhecido como teorema de Larmor. Daí o nome de *freqüência de Larmor*. Comparando (3.14) com (3.15), temos que

$$\nu = \nu_L \quad (3.16)$$

isto é, a freqüência da radiação que satisfaz a condição de ressonância é igual a freqüência da precessão do momento magnético dos spins [63].

Os momentos magnéticos ( $\mu$ ) dos elétrons não têm uma orientação fixa em relação à direção do campo magnético aplicado  $\mathbf{H}$ . Entretanto, com a aplicação de um campo magnético há um ordenamento dos spins, resultante de um torque, na direção de  $\mathbf{H}$ . Este torque faz com que os spins executem um movimento de precessão em torno do campo estático (Fig. 3.3). De acordo com a mecânica quântica a evolução temporal de um operador independente do tempo é dada pela equação de movimento de Heisenberg:

$$\frac{d}{dt}\langle\mu\rangle = \frac{i}{\hbar}\langle[H, \mu]\rangle = (|\gamma|H)\times\mu = \omega_0\times\langle\mu\rangle. \quad (3.17)$$

Esta expressão identifica-se com a que descreve a precessão do vetor  $\mu$  em torno de  $\mathbf{H}$  com velocidade angular  $\omega_0$ . A solução da equação (3.17) pode ser obtida escrevendo o vetor magnético do elétron em termos de suas componentes cartesianas:

$$\mu = \mu_x\hat{i} + \mu_y\hat{j} + \mu_z\hat{k}, \quad (3.18)$$

Admitindo que o campo magnético esteja orientado na direção z, com magnitude  $H$  e resolvendo o produto vetorial de (3.17), temos que:

$$\gamma H \times \mu = \gamma H (\mu_x\hat{j} - \mu_y\hat{i}) \quad (3.19)$$

Considerando (3.17) e (3.19), podemos escrever o resultado para cada uma das componentes

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}\langle\mu_x\rangle &= -\gamma H\langle\mu_y\rangle \Rightarrow \mu_x = \cos \omega_0 t \\ \frac{d}{dt}\langle\mu_y\rangle &= \gamma H\langle\mu_x\rangle \Rightarrow \mu_y = \text{sen } \omega_0 t \\ \frac{d}{dt}\langle\mu_z\rangle &= 0 \Rightarrow \mu_z = \text{constante} .\end{aligned}\quad (3.20)$$

O movimento descrito pela eq. (3.20) descreve um movimento de precessão do momento magnético em torno do eixo z com uma velocidade angular igual a  $\omega_0$ . Esse movimento, ilustrado na Fig. 3.3 abaixo, é análogo ao movimento de um giroscópio quando ele é deslocado da vertical por uma força lateral [61]. O campo efetivo é dado por  $\mathbf{H}_{\text{ef.}} = \mathbf{H} + \mathbf{H}_1(t)$ , onde  $\mathbf{H}_1(t)$  é o campo da microonda. A ressonância ocorrerá quando  $\omega_0 = \omega_1$ .

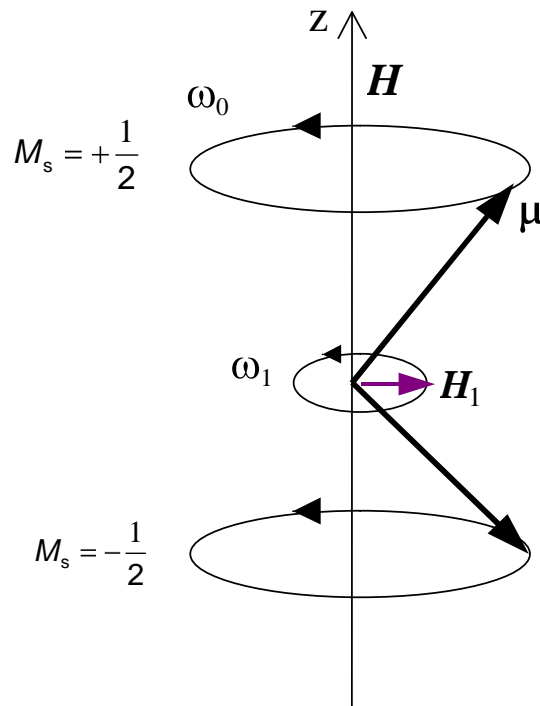


Fig. 3.3: Diagrama vetorial ilustrando o movimento de precessão do momento magnético em torno do campo magnético externo  $H$  e o componente magnético do campo de microonda  $H_1$  aplicada transversalmente.

### 3.5 O Fator $g$

A condição de ressonância (3.10) foi obtida a partir de considerações do momento magnético de spin ( $\mu$ ). Para o caso de um sistema eletrônico, se a magnitude do momento magnético associado com cada elétron desemparelhado em uma molécula paramagnética tivesse o mesmo valor, então todas as ressonâncias ocorreriam em um mesmo valor de campo,  $H_r$ , para um espectrômetro operando com uma dada frequência  $\nu$  [60]. Num experimento de RPE deve ser levado em conta não apenas o campo magnético externo que atua sobre a partícula, mas também as possíveis contribuições de campos internos, o que modifica o campo de ressonância. A aplicação de um campo magnético externo na amostra pode produzir um campo magnético interno, que irá somar ou subtrair do campo externo. Assim, é conveniente definir o campo de ressonância, eq. (3.10), e permitir que o fator  $g$  varie em resposta a diferentes magnetizações na amostra,

$$g_{eff} = \frac{h\nu}{H_r\beta}. \quad (3.21)$$

O fator  $g$  se origina de efeitos relativísticos e das interações do elétron com as flutuações eletromagnéticas no vácuo ao redor do elétron [64]. Este fator torna-se então uma característica particular em espécies no qual o elétron livre está localizado, e a partir dele pode-se determinar a natureza das espécies paramagnéticas responsáveis pelo sinal de RPE. A determinação do fator  $g$  para um sinal desconhecido pode ser uma ajuda muito valiosa na identificação da origem do sinal. Enquanto para muitos sistemas os valores de  $g$  são similares ao do elétron livre (2,00232), consideráveis variações nestes valores são também observadas, ex:  $g_{\text{Nitróxidos}} = 2,0020-2,0090$ ,  $g_{\text{Flavosemiquinonos}} = 2,0030-2,0040$ ,  $g_{\text{Cu}^{2+}} = 2,0-2,4$  [53].

Um momento magnético orbital introduzido por uma mistura de estados excitados, no nível fundamental, é a principal fonte de campo magnético local, que causa desvios do fator  $g$  em relação ao valor do elétron livre. Para maioria das moléculas o fator  $g$  é anisotrópico (depende da orientação), sendo  $H_r$  (e assim o fator  $g$ ) uma função da orientação da molécula em relação ao campo magnético externo.

Em geral, o fator  $g$  é representado na forma de tensor, em sistemas de eixos cartesianos ele pode ser escrito como

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix}. \quad (3.22)$$

Se os eixos principais na molécula paramagnética são  $X$ ,  $Y$  e  $Z$ , então neste sistema de eixos o tensor  $g$  contém apenas elementos na diagonal principal ( $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  e  $g_{zz}$ ). Se  $X$ ,  $Y$  e  $Z$  são equivalentes, temos que  $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$ . Em tais casos o fator  $g$  é isotrópico (não depende da orientação) e pode ser representado por um único valor. Se a molécula possui altos graus de simetria em  $Z$ , então  $X$  e  $Y$  são equivalentes. Esta é a chamada simetria axial  $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$ . É muito comum designar o fator  $g$  como  $g_{//}$ , o fator  $g$  paralelo ao eixo de simetria ( $g_{//} = g_{zz}$ ), e  $g_{\perp}$  para o fator  $g$  perpendicular a este eixo ( $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$ ).

Espécies paramagnéticas em soluções diluídas de baixa viscosidade podem exibir um único e isotrópico fator  $g$ , resultante da média:  $g = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3$ . Para o fator  $g$  ser totalmente isotrópico, a taxa de reorientação do spin precisa ser suficientemente rápida, o que normalmente é satisfeita apenas quando os materiais possuem baixo peso molecular em soluções de baixa viscosidade. Em experimentos com moléculas de alto peso molecular, um alargamento das linhas de ressonância pode ocorrer devido à anisotropia do fator  $g$ . Para um sistema com  $g_{//} > g_{\perp}$ , a ressonância pode ocorrer apenas dentro de um intervalo de valores para o campo magnético. O mínimo valor do campo no qual a ressonância ocorre é dado por

$$H_{\min} = \frac{h\nu}{g_{//}\beta}. \quad (3.23)$$

Quando  $H = H_{\min}$  apenas as moléculas para as quais o eixo de simetria ( $Z$ ) é paralelo ao campo  $H$  contribuirá para o sinal de ressonância. Por outro lado, o máximo valor de campo para o qual a ressonância pode ocorrer é dado por

$$H_{\max} = \frac{h\nu}{g_{\perp}\beta}. \quad (3.24)$$

Neste caso apenas as moléculas orientadas perpendicularmente ao plano do eixo de simetria irão contribuir para a ressonância [53].

### 3.6 Interação Nuclear Hiperfina

A maioria das moléculas paramagnéticas possui campos magnéticos locais permanentes que não são induzidos por campos externos. Estes campos locais se devem à presença de núcleos magnéticos na molécula, e a interação do elétron desemparelhado com

estes momentos magnéticos localizados induz a uma ação mútua entre as partículas. Esta ação, envolvendo elétron e núcleo, é conhecida como *Interação Nuclear Hiperfina* que pode ser tanto isotrópica (independente da orientação) quanto anisotrópica (dependente da orientação do campo externo,  $\mathbf{H}$ , com relação ao eixo molecular). A interação nuclear hiperfina desdobra a ressonância paramagnética em várias componentes, que vai depender do valor do spin nuclear (Fig. 3.4). Informações importantes acerca das estruturas das espécies paramagnéticas podem ser obtidas por análises cuidadosas do padrão de desdobramento, por este motivo ela é tida como uma espécie de “impressão digital” dos íons paramagnéticos presentes em uma amostra [62].

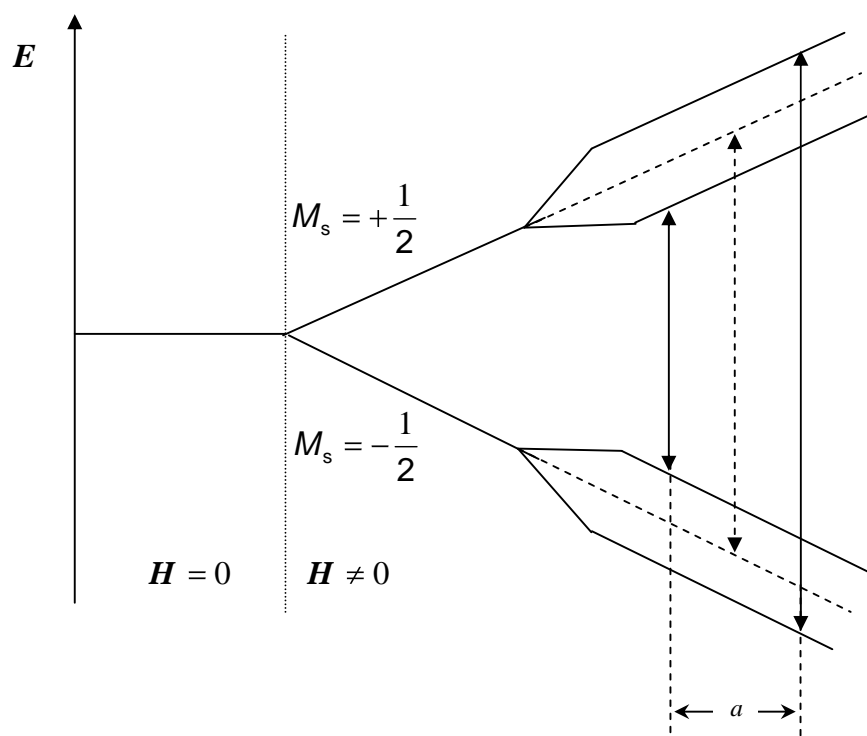


Fig. 3.4: Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de  $I = \frac{1}{2}$  como uma função do campo magnético em uma frequência constante. As linhas pontilhadas podem ser observadas se  $a = 0$ .

Os prótons possuem spin nuclear e um momento magnético nuclear resultante, que é uma fonte de campo magnético. Assim como os elétrons, os núcleos também possuem um momento angular de spin intrínseco, caracterizado pelo número quântico de spin  $I$ . As componentes do vetor momento angular de spin nuclear são quantizadas e, assim como no caso eletrônico, assume valores de  $M_I$  que vão de  $-I$  a  $+I$ . A interação do spin nuclear com o spin eletrônico é que produz a interação hiperfina e desdobra as linhas do espectro de ressonância em  $2I+1$  componentes, para o caso de um elétron que interage com um núcleo

que possui  $I \neq 0$ . Um radical que contém o átomo de  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ), por exemplo, têm um espectro de RPE composto por três linhas idênticas (Fig. 3.5) com intensidades iguais, pois o núcleo de  $^{14}\text{N}$  tem três orientações possíveis do spin (-1, 0, +1) [64].

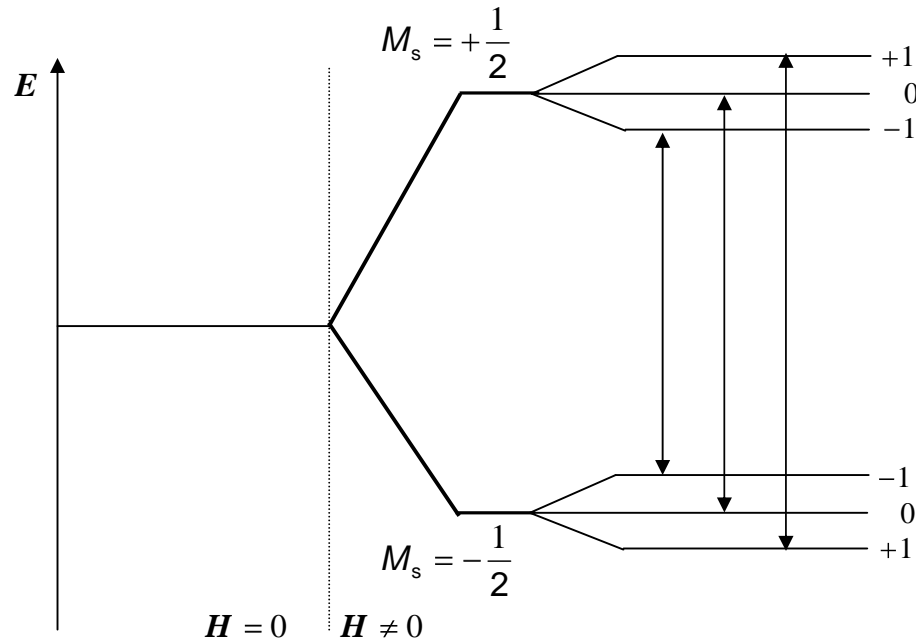


Fig. 3.5: Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de  $I=1$ , para um campo fixo.

O campo magnético  $H_r$  (eq. 3.10) representa o campo experimentado pelo elétron desemparelhado. Se há a presença de um campo magnético local, este deve ser adicionado vetorialmente ao campo magnético externo  $H$  para gerar o campo magnético efetivo, que é

$$\mathbf{H}_{\text{eff}} = \mathbf{H} + \mathbf{H}_{\text{local}} \quad (3.25)$$

O sistema mais simples que exibe interação nuclear hiperfina é o átomo de hidrogênio (um elétron e um próton;  $I = 1/2$ ). Neste caso,  $M_I$  pode assumir dois valores possíveis ( $\pm 1/2$ ) e assim produzir duas linhas de ressonância de igual intensidade, veja Fig. 3.4. De (3.25) temos que:

$$H_{\text{eff}} = H' \mp \frac{a}{2} = H' - aM_I \quad (3.26)$$

onde  $a/2$  é a magnitude do campo magnético local e  $H'$  é o campo de ressonância quando  $a = 0$ . Note da equação (3.23) que, para este caso, haverá dois campos para o qual ocorrerá o

fenômeno de ressonância, um para  $H' - a/2$  e outro para  $H' + a/2$ . Deste modo,  $a$  pode ser medido pelo intervalo entre essas duas linhas hiperfinas de ressonância. Por este motivo,  $a$  é comumente chamada de *constante de desdobramento hiperfino*.

Um elétron num orbital  $p$  pouco se aproxima do núcleo e sofre, por isso, a ação de um campo que parece ser a de um dipolo magnético uniforme. A interação resultante é uma interação dipolo-dipolo. Por outro lado, um elétron num orbital  $s$  distribui-se em uma simetria esférica em torno de um núcleo e por isso tem interação dipolo-dipolo com média nula. Entretanto, como a probabilidade do elétron  $s$  estar no núcleo não é nula, não é correto tratar a interação como a de dois dipolos puntiformes. Neste caso, deve ser levada em consideração a *interação de contato de Fermi* com o núcleo [64]. O Hamiltoniano que descreve a interação do elétron com o núcleo é dado por:

$$\hat{H} = -g_e \beta_e g_n \beta_n \left[ \frac{\hat{\mathbf{I}} \cdot \hat{\mathbf{S}}}{r^3} - \frac{3(\hat{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{r})(\hat{\mathbf{S}} \cdot \mathbf{r})}{r^5} - \frac{8\pi}{3} (\hat{\mathbf{I}} \cdot \hat{\mathbf{S}}) \delta(\mathbf{r}) \right] \quad (3.27)$$

O fator  $g$  do núcleo e o magnéton de Bohr nuclear são representados aqui pelas constantes  $g_n$  e  $\beta_n$ , respectivamente,  $\mathbf{r}$  é a distância entre o elétron e o núcleo (Fig. 3.6),  $\hat{\mathbf{I}}$  e  $\hat{\mathbf{S}}$  são respectivamente os vetores representados por operadores de spins, nuclear eletrônico.

Os dois primeiros termos da equação (3.27) descrevem a interação dipolar entre o elétron e o núcleo e o terceiro termo descreve a interação de contato de Fermi, observe que o segundo termo só é válido para orbitais do tipo  $s$ , pois a função delta garante esta interação apenas para  $r = 0$ . Podemos reescrever o Hamiltoniano para a interação dipolar na forma tensorial

$$\hat{H}_{dipolar} = I \cdot \hat{\mathbf{A}}' \cdot \hat{\mathbf{S}} \quad (3.28)$$

Sendo  $\hat{\mathbf{A}}'$  um tensor de acoplamento hiperfino de segunda ordem dado por uma matriz de elementos  $\mathbf{A}_{ij}$ :

$$A'_{ij} = g_e \beta_e g_n \beta_n \left\langle \frac{(r^2 \delta_{ij} - 3 r_i r_j)}{r^5} \right\rangle, \quad i, j = x, y, z \quad (3.29)$$

onde o bracket, denota integração sobre toda a distribuição eletrônica [60].

A interação de contato de Fermi é isotrópica, isto é, independe da orientação do radical, e por isso é exibida mesmo por moléculas que basculam rapidamente nos fluidos. Por outro lado, a interação dipolar tem caráter anisotrópico, ou seja, depende do ângulo entre a linha que une os dipolos e a direção do campo magnético externo. Como o traço do tensor de interação dipolar é zero, em solução onde a movimentação das moléculas é rápida essa interação anisotrópica não contribui para as posições das linhas do espectro de RPE, tendendo para um valor médio zero, e assim, interferindo basicamente na largura de linha do espectro.

Se pensarmos em uma interação dipolar entre o elétron e o núcleo comportando-se classicamente, uma expressão aproximada para a energia de interação dipolo-dipolo pode ser dada por

$$E_{dipolar} = g_n \beta_n g_e \beta_e \frac{(1 - 3\cos^2\theta)}{r^3} = -\mu_n \mu_e \frac{(1 - 3\cos^2\theta)}{r^3} = H_{local} \mu_e \quad (3.30)$$

onde as componentes do momento de dipolo do elétron e do núcleo ao longo do campo magnético são  $\mu_e$  e  $\mu_n$ , respectivamente; os dipolos são separados por uma distância  $r$ .  $\theta$  é o ângulo entre a direção do campo magnético e a linha que liga os dois dipolos, conforme indicado na Fig. 3.6. Dependendo do valor de  $\theta$ , a contribuição  $H_{local}$  pode ser nula, positiva ou negativa. Uma vez que o elétron não se encontra localizado em uma posição bem definida no espaço, a energia de interação  $H_{local}$  precisa ser obtida realizando uma média sobre todas as orientações possíveis do elétron. Se todas as orientações são igualmente prováveis (por exemplo, um elétron em um orbital  $s$  centrado em um núcleo) o valor médio  $\langle \cos^2\theta \rangle = 1/3$ , o que implica que  $H_{local}$  na equação (3.30) desaparece. Consequentemente, a interação dipolar clássica não pode gerar desdobramento hiperfino se o elétron está distribuído em um orbital  $1s$  [53].

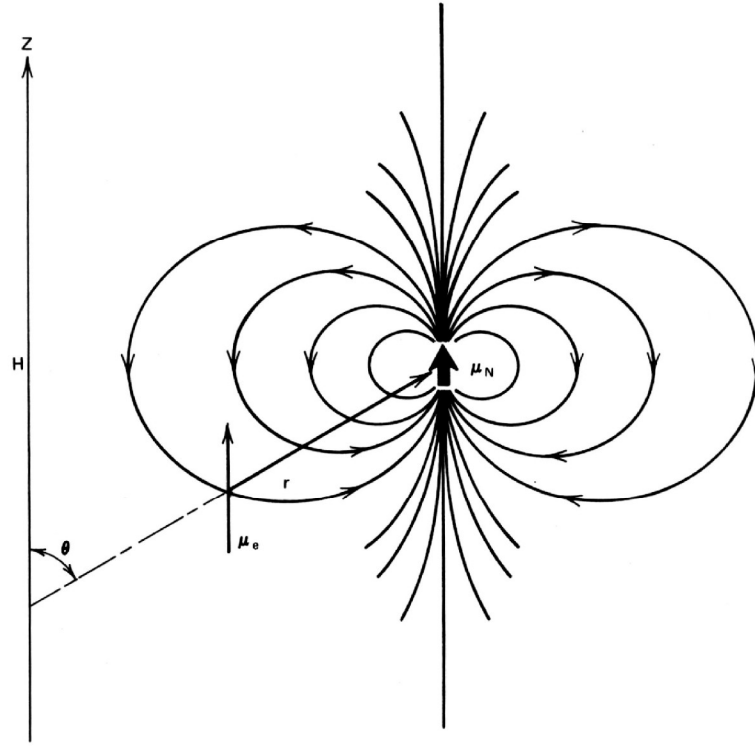


Fig. 3.6: Interação dos momentos de dipolo do elétron e do núcleo. As linhas curvas representam o fluxo de campo magnético gerado pelo momento magnético nuclear. Este cria um campo local  $H_{local}$  sobre o elétron.  $H_{local}$  se soma vetorialmente ao campo magnético externo  $H$  [53].

O terceiro termo da equação (3.27) descreve a interação hiperfina de contato de Fermi. É chamada de contato de Fermi porque, quando essa interação hiperfina ocorre, há uma probabilidade de encontrar o elétron no estado  $s$ , no núcleo. Como a interação de contato de Fermi é independente da orientação do íon paramagnético podemos representá-la por:

$$\hat{H}_{\text{isotropica}} = a \hat{I} \cdot \hat{S}, \quad (3.31)$$

em que  $a$  é a constante de acoplamento hiperfino isotrópico dada por:

$$a = -\frac{8\pi}{3} \mu_n \mu_e |\psi(0)|^2. \quad (3.32)$$

Como exemplo, a função de onda  $\psi$  do átomo de hidrogênio, é dada por:

$$\psi_{1s} = \left( \frac{1}{\pi a_0^3} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left( \frac{-r}{a_0} \right). \quad (3.33)$$

Em que  $a_0$  é o raio de Bohr e  $r$  é a posição do elétron relativa ao núcleo. Podemos observar desta equação que a probabilidade, integral sobre todo o espaço de  $|\psi^2|$ , de encontrar o elétron próximo ao núcleo não é nula por isso não é correto tratar essa interação como a de dois dipolos puntiformes. Enquanto que se o elétron se encontrar nos orbitais  $p$ ,  $d$ ,  $f$ , darão contribuições nulas, pois as funções de onda possuem nós nos núcleos para estes orbitais e, nesse caso temos que a interação elétron-núcleo é do tipo dipolo-dipolo.

### ***3.7 Campo Magnético de Modulação***

Quando a condição de ressonância é satisfeita, apenas uma pequena parte da potência da microonda é absorvida, por isso, o sinal de RPE é muito fraco. Devido ao ruído de fundo e a pouca intensidade do sinal, a espectroscopia de RPE faz uso de um campo magnético de modulação de baixa frequência, usado para melhorar a relação sinal/ruído no espectro. Um campo de modulação oscilante na frequência típica de 100 kHz e com amplitude de 0,1 a 1 G, no caso dos radicais livres, se superpõe ao campo magnético externo, tendo mesma direção. A idéia do campo magnético de modulação é que, durante a varredura deste campo, os spins eletrônicos entrarão e sairão da ressonância com a frequência da modulação, de modo que o sinal obtido sai modulado. A detecção do sinal é feita na mesma frequência de modulação e sensível à fase. De modo que, sinais ocorrendo por outras fontes e caindo fora desta faixa de frequência serão rejeitados. Assim, este sistema de detecção acaba funcionando como um filtro do sinal de RPE. Além disso, os ruídos são caracterizados por frequências baixas e, desse modo, mais ruídos são eliminados quando se aumenta a frequência de modulação/detecção. É importante ressaltar também, que o campo de modulação contribui para evitar o efeito de saturação, permitindo aos spins entrarem e saírem de ressonância.

### ***3.8 O Método dos Marcadores de Spin***

Para que a técnica de RPE pudesse ser estendida aos sistemas biológicos e bioquímicos, que são carentes de grupos paramagnéticos era necessário introduzir nestes sistemas uma espécie de sonda, contendo um radical livre com estabilidade suficiente para a análise das amostras e com sinal de ressonância adequado para gerar informações sobre o meio biológico. Além disso, estas moléculas precisavam ser inseridas em regiões específicas do sistema, tendo boa compatibilidade e causando mínimas perturbações. Foi então que Ohmishi e McConnell em 1965 desenvolveram o *método dos marcadores de spin* que eficientemente supria todas as exigências.

Basicamente, os marcadores de spin são moléculas orgânicas que contêm um radical livre paramagnético. Os marcadores de spin mais utilizados são os que contêm o radical nitróxido (Fig. 3.7), especialmente pela sua alta estabilidade química que se deve parcialmente pela proteção da ligação N-O fornecida pelos quatro grupos metil adjacentes, esta propriedade permite ao nitróxido participar de várias reações químicas sem que seu elétron desemparelhado seja. Os radicais nitróxidos são líquidos ou sólidos e brilhantemente coloridos variando do amarelo ao vermelho escuro dependendo do tamanho do anel e dos substituintes  $R_1$  e  $R_2$  [65,66].

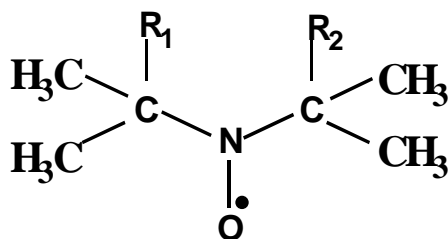


Fig. 3.7: Fórmula química geral do radical nitróxido.  $R_1$  e  $R_2$  representam grupos químicos que variam de acordo com o tipo de marcador de spin.

Estes marcadores de spin podem ser ligados covalentemente às proteínas e, no caso de membranas e micelas, serem intercalados fisicamente. O sinal de RPE produzido pelo nitróxido é extremamente sensível à dinâmica molecular, polaridade, viscosidade, acidez, estrutura e ordem do meio.

O espectro do marcador de spin é muito sensível ao seu movimento rotacional, o qual reflete a dinâmica do meio em que se encontra. Outra importante característica é que o fator  $g$  e o desdobramento hiperfino dos marcadores de spin variam com a polaridade do solvente. Assim, podemos identificar através dos espectros de RPE se o marcador está inserido em um ambiente (ambiente em torno do radical marcador) de natureza hidrofóbica ou hidrofílica.

Os três parâmetros mais importantes, presentes nos espectros de RPE, são o fator  $g$ , o desdobramento hiperfino e a largura de linha. Da combinação destas informações podem ser obtidas valiosas informações sobre orientação, anisotropia do movimento, viscosidade e polaridade do meio biológico.

No caso do nitróxido o elétron interage com o spin nuclear do nitrogênio ( $I = 1$ ), com isso detectando três valores de campos locais diferentes devido aos números quânticos de spin nuclear  $M_I = -1, 0, +1$ . Isto resulta em um desdobramento dos níveis de energia em três novos níveis devido aos campos locais (Fig. 3.5). Quando o número quântico de spin for  $M_I = +1$  há

uma contribuição do campo local favorável ao campo externo apresentando um desdobramento de energia maior; quando  $M_l = 0$  não há contribuição do campo local ao campo externo e quando  $M_l = -1$  a contribuição é desfavorável ao campo externo. É a interação hiperfina que provocará o desdobramento do espectro de RPE em  $2I + 1$  linhas de ressonâncias (Fig. 3.8) de intensidades iguais para três distintos valores de campo, satisfazendo a regra de seleção  $\Delta M_l = 0$ .

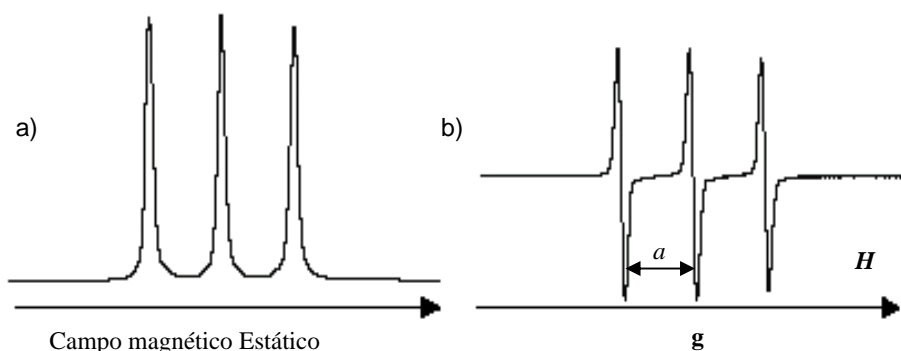


Fig. 3.8: (a) espectro de absorção e (b) primeira derivada da curva de absorção;  $a$  é a constante de desdobramento hiperfino, a posição da linha central é definida pelo fator  $g$  [7].

A distância medida em Gauss (G) entre duas linhas adjacentes que caracteriza o espectro de RPE do nitróxido em movimento rápido de rotação é a medida da constante de desdobramento hiperfino  $a$ , já o fator  $g$  é o parâmetro que define a posição da linha central em relação ao campo magnético aplicado (Fig. 3.8). A integral do espectro de absorção (Fig. 3.8a) permite calcular a concentração de marcador na amostra, uma vez que a curva de absorção é proporcional ao número de elétrons desemparelhados presente na amostra.

A grande capacidade do nitróxido de gerar informações sobre sua dinâmica molecular é atribuída às anisotropias de desdobramento hiperfino e de fator  $g$  com respeito à sua orientação em relação ao campo magnético. Estas anisotropias são representadas por tensores de segunda ordem com sistema de eixos fixados no radical: o eixo  $x$  em geral coincide com a ligação N-O, o eixo  $z$  está ao longo do orbital  $2p\pi$  do nitrogênio e o eixo  $y$  perpendicular aos outros dois. O sistema de eixos convencionais para o nitróxido é representado abaixo (Fig 3.9). Cálculos sobre os dados obtidos dos espectros de RPE do nitróxido permitem avaliar que a probabilidade do elétron desemparelhado ser encontrado no orbital  $p\pi$  do nitrogênio é acima de 80% [53].

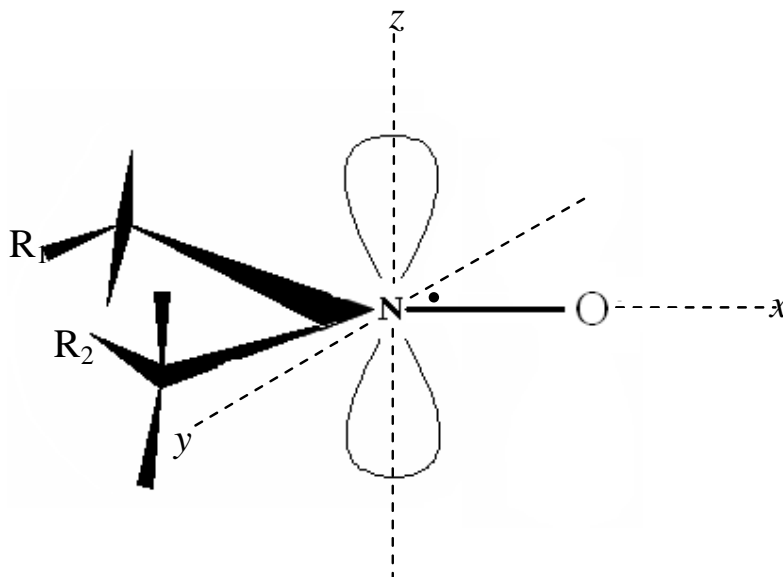


Fig. 3.9: Radical nitróxido esquematizado, ilustrando as orientações dos eixos principais dos tensores.

Para obter as componentes do tensor  $g$  e do tensor de acoplamento hiperfino é preciso conhecer a dependência do espectro de RPE do nitróxido com o ângulo entre o campo magnético aplicado e os eixos de simetria do radical. Estas componentes podem ser obtidas dopando um cristal diamagnético, de estrutura tridimensional conhecida, com o nitróxido de interesse. Este estudo foi realizado por Griffith *et al.* [67] para três diferentes nitróxidos em um cristal de tetrametil-1,3-ciclobutadieno. Os eixos principais de  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$  foram idênticos. Quando em solução, devido ao movimento rápido do nitróxido, as características anisotrópicas tendem a desaparecer, pois a interação hiperfina de origem dipolar tende a desaparecer e o espectro resultante tende para uma situação isotrópica, apresentando os valores médios dos tensores, dados por:

$$A_0 = \left(\frac{1}{3}\right)(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

e

$$g_0 = \left(\frac{1}{3}\right)(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$$

(3.34)

As anisotropias mesmo em solução não desaparecem completamente, e os seus desaparecimentos gradativos com o aumento do movimento causam alterações nos espectros que dão as informações de seu movimento.

Quando o campo é aplicado ao longo do eixo  $z$  observa-se o maior valor para a constante de acoplamento hiperfino  $A_{zz} \sim 32$  G. Enquanto que desdobramentos menores são observados quando o campo é aplicado ao longo das direções  $x$  e  $y$ :  $A_{xx} \sim A_{yy} \sim 6$  G. A mudança na direção do campo aplicado com relação aos eixos moleculares do nitróxido causa também um deslocamento dos espectros para a esquerda devido a um aumento no fator  $g$  ( $g_{xx} = 2,0090$  G,  $g_{yy} = 2,0060$  G,  $g_{zz} = 2,0027$  G, (Fig. 3.10).

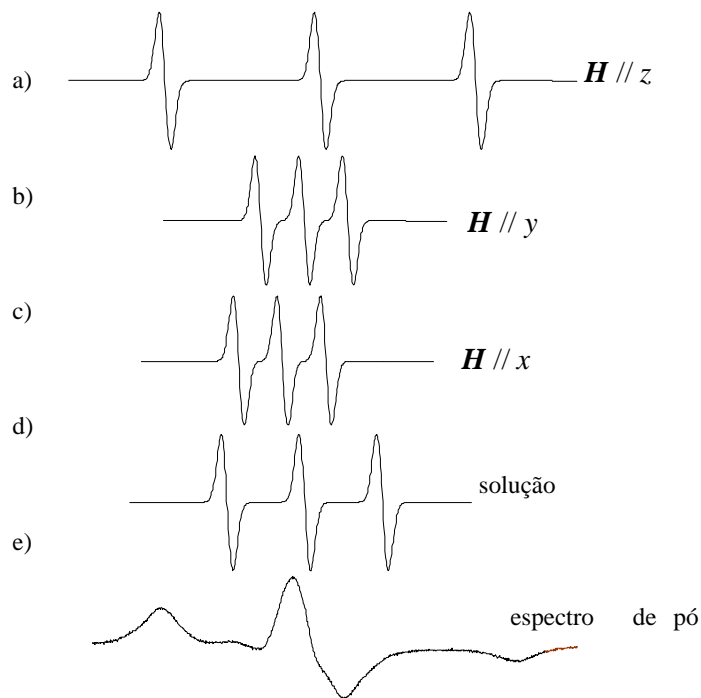


Fig. 3.10: Espectros de RPE mostrando as anisotropias do fator  $g$  e a constante de acoplamento hiperfino. (a) Quando o campo magnético está aplicado paralelamente ao eixo 'z', (b) Paralelo a 'y' e (c) Na direção 'x', (d) Espectro do marcador em solução e (f) espectro obtido a  $-70^{\circ}\text{C}$  (chamado espectro de pó).

Devido à característica iônica da ligação do nitróxido, os valores das componentes dos tensores  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$  de um dado marcador de spin variam com a polaridade do ambiente. Em geral, a constante de desdobramento hiperfino isotrópico aumenta cerca de 10% ao passar de um ambiente hidrofóbico para um hidrofílico, ao passo que o fator  $g$  isotrópico diminui com o aumento da polaridade do meio [68]. Esta sensibilidade surge do fato de que os parâmetros magnéticos, de qualquer espécie de radical, são funções da distribuição eletrônica na

molécula, e por isso são influenciados pela perturbação devido ao ambiente. Esta característica torna o marcador de spin extremamente valioso como molécula repórter em situações nas quais a perturbação causa um rearranjo das componentes hidrofóbicas e hidrofílicas de um sistema biológico.

### ***3.9 A Simulação dos Espectros de RPE de Membranas Biológicas***

Os espectros de RPE podem fornecer complicadas formas de linha necessitando de simulações computacionais para extrair informações do sistema em estudo. Há diversos programas que se encarregam de simular as linhas espectrais de maneira eficiente, facilitando assim ao espectroscopista uma análise mais confiável, e, permitindo a obtenção de importantes dados experimentais. A análise do espectro é baseada em um modelo adequado para simular o espectro teórico e um algoritmo que ajusta um determinado conjunto de parâmetros que descrevem um espectro teórico de melhor convergência com o espectro experimental [69]. Tendo em vista a complexidade das teorias envolvidas nos programas de simulação, trataremos de apresentar apenas uma idéia qualitativa acerca do método.

Neste trabalho utilizamos o programa *Non Linear Least Square* (NLLS) que foi inicialmente desenvolvido por Jack H. Freed e colaboradores (Cornell University). Este programa gera um espectro teórico a partir da solução da equação estocástica de Liouville utilizando valores de entrada dos parâmetros definidos pelo usuário, veja apêndice A. Os parâmetros de entrada utilizados nas simulações espectrais de movimento lento são: (i) parâmetros que descrevem os tensores magnéticos do fator  $\mathbf{g}$  e do desdobramento hiperfino  $\mathbf{A}$ ; (ii) parâmetros dinâmicos que incluem as taxas de difusões rotacionais ( $R_{\text{bar}}$ ); (iii) coeficientes do potencial de ordenamento, que descrevem a influencia da orientação dos fluidos anisotrópicos tais como cristais líquidos e membranas; e (iv) parâmetros que definem o truncamento dos cálculos [71]. A tabela abaixo mostra alguns dos parâmetros de entrada utilizados no programa.

Tabela 3.1: Lista de parâmetros utilizados no programa de simulação NLLS

Parâmetros	Descrição
$g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}$	Tensor $g$
$a_{xx}, a_{yy}, a_{zz}$	Tensor A (hiperfino) (G)
$w_{xx}, w_{yy}, w_{zz}$	Tensor de largura de linha lorentziana (G)
$R_{\text{bar}}$	Coefficiente de difusão rotacional ( $s^{-1}$ )
$c_{20}, c_{22}$	Coefficientes para o potencial de orientação
$b_0$	Campo central estático (G)
$l_{\text{emx}}, l_{\text{omx}}, k_{\text{mx}}, m_{\text{mx}}$	Índices de truncamento dos cálculos

A média das taxas de difusão rotacional é dada por  $R_{\text{bar}} = \overline{R} \equiv \overline{R_x.R_y.R_z}$ , que é a média geométrica da constante de difusão rotacional sobre cada um dos eixos de difusão molecular; similarmente a anisotropia rotacional  $N \equiv R_z/(R_x.R_y)^{1/2}$ , que é a taxa das constantes para difusão rotacional sobre os eixos perpendiculares e paralelos ao eixo  $z$ . Pode ser notado que, no caso de uma simetria axial ( $R_x = R_y$ ), a definição de  $R_{\text{bar}}$  pode ser escrita como  $R_{\text{bar}} \equiv (R_{\perp}R_{\parallel})^{1/2}$  [71]. O NLLS, utilizando cálculos numéricos, ajusta o espectro teórico ao experimental através de um algoritmo de minimização, o método dos mínimos quadrados ( $\chi^2$ ). Dentre os mais famosos algoritmos de otimização de parâmetro estão: Powell, Monte Carlo, método dos gradientes conjugados, bem como Gauss–Newton, quase–Newton e Levenberg–Marquardt [70]. No caso do NLLS o modelo empregado é o quase–Newton. A vantagem do método quase-Newton inclui convergência global, e um maior controle de flexibilidade sobre os critérios de convergência, que, quando propriamente aplicados, permite que iterações excessivas sejam evitadas [71].

A maioria dos espectros deste trabalho é composta por duas componentes espectrais sendo que neste caso são necessários dois conjuntos de tensores magnéticos e de parâmetros dinâmicos como dados de entrada. Na simulação é conveniente ao usuário fazer uma estimativa inicial adequada dos tensores a partir das posições das linhas e atribuir valores de entrada variando um tensor de cada vez, uma vez que eles podem estar fortemente correlacionados. Após otimização dos valores de todos os parâmetros magnéticos eles são fixados para todos os espectros do experimento. Em nossas simulações geralmente assumimos um modelo de duas componentes espectrais com difusão isotrópica browniana.

*4.1*

## 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

### ***Preparação das Membranas de EC***

As amostras de EC (Fig.4.1) foram obtidas de ratos recém nascidos (menos de 24 h) da raça Wistar cedidos pelo biotério central da UFG. Toda preparação das amostras foi realizada em nosso laboratório de biofísica.

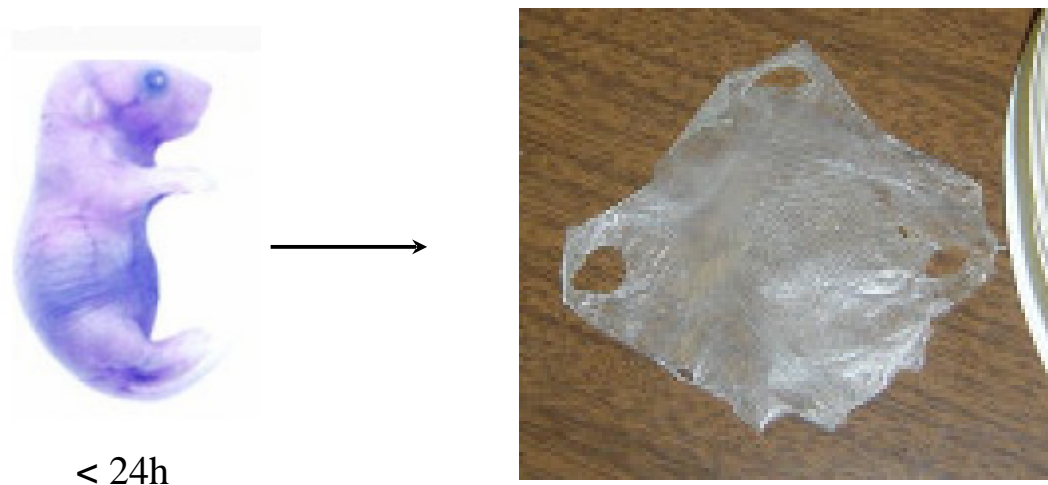
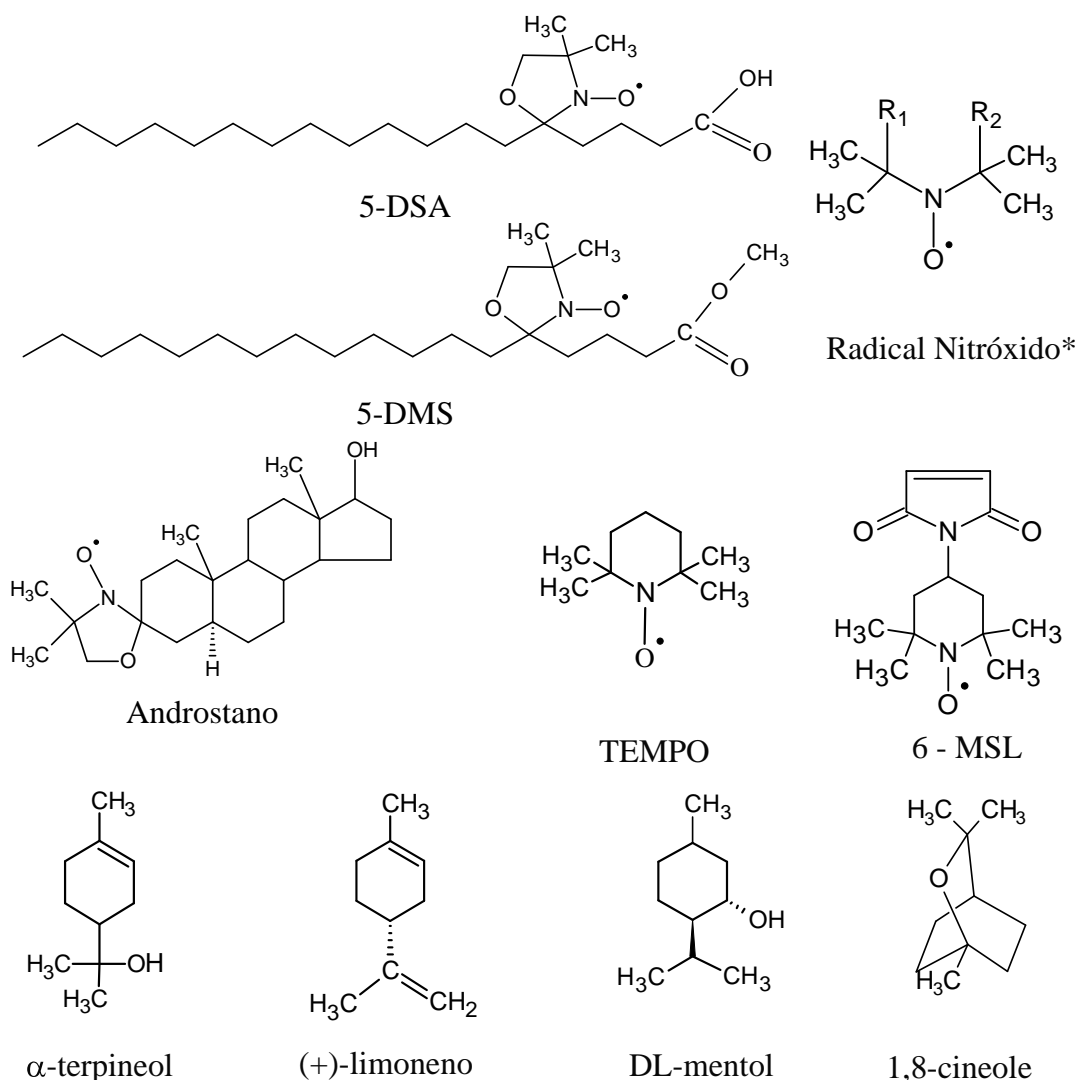


Fig. 4.1: Rato da raça wistar com menos de 24 h de vida e uma membrana de EC intacto desidratada.

Após o sacrifício<sup>b</sup> dos animais, as peles foram removidas com tesoura e bisturi e lavadas, em seguida foram colocadas em água destilada para que pudessem ser hidratadas e logo depois estendidas sobre papel de filtro (Whatmam nº 2) com a parte externa em contato com o papel. Dispomos os papeis com as peles em um suporte. Esse suporte foi introduzido em um dessecador (dessecador-1), o qual mantinha em seu interior um recipiente contendo 500 mL de hidróxido de amônio,  $\text{NH}_3$ . Nesta etapa as amostras não entravam em contato com o líquido de  $\text{NH}_3$ , mas apenas com o gás do solvente. Outro dessecador (dessecador-2) sob vácuo foi conectado com o primeiro -através de uma mangueira- com o intuito de transferir o vácuo para o dessecador-1 contendo as amostras de peles, este procedimento foi repetido por mais uma vez e após 8 minutos (de exposição das peles sob efeito do gás de amônia) retiramos as amostras colocando-as novamente para flutuar em água destilada por mais 2 horas, com as superfícies internas em contato com a água. A finalidade desta etapa é formar bolhas na pele, entre a epiderme e o EC. Passado esse tempo, as peles foram novamente colocadas em contato com o papel de filtro, agora com o lado interno da epiderme em contato com o papel, então as friccionamos contra o papel. Todo este procedimento nos permite separar o EC das camadas mais internas da pele. Logo depois, as membranas de EC isoladas foram esticadas e transferidas para uma tela de teflon, onde foram novamente lavadas e posteriormente colocadas para secar em condição ambiente. Todo este procedimento reduz a

um mínimo a quantidade do tecido da epiderme junto às membranas do EC. Por fim as membranas são mantidas sob vácuo, permanecendo ali até o uso [72].



**Fig. 3.2:** Estruturas químicas dos marcadores de spin e dos terpenos utilizados neste trabalho. \*Estrutura molecular do radical nitróxido, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são os grupos químicos que variam de acordo com o tipo de marcador de spin. Observe que o radical nitróxido está presente em todas as outras moléculas de marcadores de spin.

#### 4.2 Marcação das Membranas de EC

As membranas de EC (intacto) desidratadas foram divididas em pedaços de aproximadamente 3 mg (com dimensão de aproximadamente 2,5 por 2,5cm) e feita uma incubação prévia em uma solução de N-etil maleimido (NEM) –Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA- a 50 mM por cerca de 15 h. O NEM reage com os grupos sulfidrilas (SH) presentes no EC impedindo que eles provoquem redução do radical nitróxido, o que

comprometeria a intensidade do sinal de RPE. Após este período de incubação iniciamos o processo de marcação das amostras.

Os marcadores de spin (*spin label*), TEMPO, 5-doxil ácido esteárico (5-DSEA) contendo um grupo nitróxido ligado no 5º carbono da cadeia acil do lipídio, o derivado do estearato de metila 5-doxil metil estearato (5-DMS), além do marcador análogo do colesterol 5- $\alpha$ -Androstano (ASL), todos contendo um anel do radical nitróxido, foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St Luis, MO). Algumas fórmulas químicas gerais destes marcadores, bem como o radical nitróxido, estão apresentadas na Fig. 4.2.

O processo de marcação do EC se deu por duas maneiras distintas, uma para o marcador TEMPO, que se encontrava dissolvido a 10 mM em Tampão salino acetato (10 mM acetato, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA, pH 5.5) e outra para os demais marcadores que se encontravam dissolvidos em solução de etanol puro (5 mg/mL).

Para o marcador TEMPO o procedimento foi o seguinte: uma peça de EC tratada com NEM foi mergulhada durante 1,5 h em temperatura ambiente em 45  $\mu$ L de tampão salino acetato contendo 0,2 mM do marcador TEMPO e a requerida concentração de terpeno (Acros Organics, Geel, Belgium), o qual foi adicionado à amostra, dissolvido em 5  $\mu$ L de etanol puro. As amostras controles foram submetidas a uma preparação idêntica, no qual 5  $\mu$ L de etanol foi adicionado sem os terpenos. Por fim, introduzimos o EC marcado, ainda úmido, dentro de tubos capilares e retiramos o excesso de solvente com uma micro-seringa, feito isso, os tubos foram hermeticamente fechados com chama e levados para as medidas de RPE. Para os demais marcadores o procedimento se deu da seguinte forma: uma pequena alíquota (1  $\mu$ L) de cada um dos marcadores, dissolvido em solução de etanol puro (5 mg/ml), foi então aplicada sobre uma placa de petri -uma para cada marcador. Após a evaporação do etanol, as membranas de EC (~3 mg) umedecidas pelo NEM foram colocadas sobre os marcadores (em cima das placas de petri). Visando assegurar uma boa marcação, as membranas foram reidratadas com mais 40 mL de tampão salino acetato (10 mM acetato, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA, pH 5.1) e posteriormente foram efetuadas repetidas passagens das membranas sobre o local do marcador na placa de petri por 10 minutos com o auxílio de um pequeno bastão. Após a marcação, cada amostra foi suspensa em uma solução contendo tampão, etanol e a respectiva porcentagem de terpeno (1,8-cineole ou DL-mentol). No estudo relacionado aos efeitos do etanol, as membranas de EC foram marcadas de maneira similar, foram incubadas em uma solução contendo tampão/etanol em uma concentração variando de 0 a 70% (v/v). Em todos os procedimentos as membranas de EC permaneceram nas suas respectivas

soluções por um período de 1,5 a 2 horas. Em seguida introduzimos o EC ainda úmido dentro de tubos capilares e retiramos o excesso de solvente de dentro do capilar com uma micro-seringa, os tubos foram hermeticamente fechados e levados para as medidas de RPE. A pequena proporção de marcadores de spin na solução é usada para garantir que eles se distribuirão de modo a evitar interações magnéticas entre os grupos nitroxídeo. Essas interações provocam distorções nas linhas de ressonância comprometendo a avaliação das informações contidas nos espectros. As interações entre os marcadores são em grande parte evitadas desde que na preparação as amostras contenham 150 ou mais lipídios naturais para cada marcador [74].

### ***4.3 Marcação das Proteínas de EC***

O marcador de spin derivado do maleimido (6-MSL) foi adquirido da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). Uma peça de EC intacto (~3 mg) foi incubada por 30 min em tampão salino acetato (10 mM acetate, 150 mM NaCl and 10 mM EDTA, pH 5.1) seguido por uma segunda incubação de 15 min em tampão com 2 mM do marcador 6-MSL. As membranas de EC foram secas em papel de filtro e incubadas em 2 mL de tampão sob agitação moderada por 2 min. Este processo foi repetido cinco vezes com o intuito de eliminar os marcadores livres, não ligados. Após o processo de marcação, as membranas de EC foram incubadas por 1,5 h em tampão contendo 5% (v/v) de 1,8-cineole e, por fim, introduzidas dentro de tubos capilares para medidas de RPE.

### ***4.4 Medidas do Teor de Solvente nas Amostras de EC***

A fim de verificar se o teor de solvente contido nas amostras de EC altera com o acréscimo de etanol, em diferentes concentrações, efetuamos um experimento para avaliar o teor de solvente absorvido pelas membranas de EC.

As amostras foram mergulhadas em soluções contendo diferentes concentrações de etanol em tampão salino acetato (10 mM acetato, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA, pH 5.1), a diferença de concentração de uma solução para outra foi de 20%, desde 0 (controle) a 60% (v/v). Mergulhamos as membranas nas soluções (etanol + tampão) e deixamos por um tempo até que elas pudessem ser completamente hidratadas, quatro amostras, uma para cada porcentagem de etanol. Após os tratamentos as amostras foram pesadas e o peso de cada uma foi anotado (peso úmido). Logo depois, as membranas foram levadas para o dessecador por um período de 48 h para que elas pudessem ser desidratadas o máximo possível. Pesamos

então as membranas desidratadas (peso seco) e comparamos com o peso úmido de cada uma, e, assim calculamos gravimetricamente o percentual de solvente (etanol/água) presente nas amostras de EC. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (SD).

#### ***4.5 Preparação e Marcação das Vesículas de DPPC***

As vesículas, membranas artificiais (Fig. 4.3), foram preparadas com uma apropriada mistura de lipídios em solventes orgânicos. Os lipídios de DPPC com mais de 99% de pureza foram adquiridos da Avanti (Alabaster, AL, USA). Uma pequena quantidade de DPPC (3 mg) foi dissolvida em um tubo de ensaio contendo 60  $\mu$ L de uma mistura com clorofórmio:metanol (2:1), em seguida colocado para secar sob um jato moderado de gás de nitrogênio com o intuito de formar um fino filme lipídico na superfície interna do tubo. Para remover o resíduo de solvente o tubo foi deixado em pernoite sob vácuo. O filme foi hidratado com 0,5 mL de tampão salino acetato pH 5.5 (mesmo tampão utilizado nas amostras de EC) para formar vesículas multilamelares e fragmentos de bicamadas de DPPC, a amostra foi aquecida por cerca de 5 min, a uma temperatura de  $\sim 50^{\circ}\text{C}$ , logo depois submetida a agitação periódica em vórtex à temperatura ambiente, feito isso ela foi novamente aquecida a  $\sim 50^{\circ}\text{C}$ , este processo se repetiu por mais três vezes visando obter uma solução aparentemente homogênea, que sugere uma boa dispersão dos lipídios de DPPC. O volume da amostra foi reduzido a 40  $\mu$ L por centrifugação a  $4^{\circ}\text{C}$ , retirando o excesso de solvente e preservando o volume de precipitado. Passado esta etapa, 2  $\mu$ L do marcador de spin TEMPO dissolvido em tampão (10 mM) foi adicionado às membranas de DPPC que posteriormente foram agitadas. No caso dos demais marcadores de spin, dissolvidos em etanol, uma pequena alíquota foi adicionada ao tubo de ensaio, deixando que o álcool evaporasse e restasse apenas os marcadores de spin, antes mesmo de dissolver os lipídios de DPPC na solução de clorofórmio:metanol. O próximo passo foi adicionar a requerida quantidade de terpeno. A concentração apropriada de cada terpeno em solução de etanol (33%, v/v) foi adicionada à amostra (cerca de 1,5  $\mu$ L), dependendo da densidade do terpeno, nada foi adicionado na amostra controle). Por fim, as membranas de DPPC foram agitadas e transferidas para tubos capilares, os quais foram selados e levados para medidas de RPE.

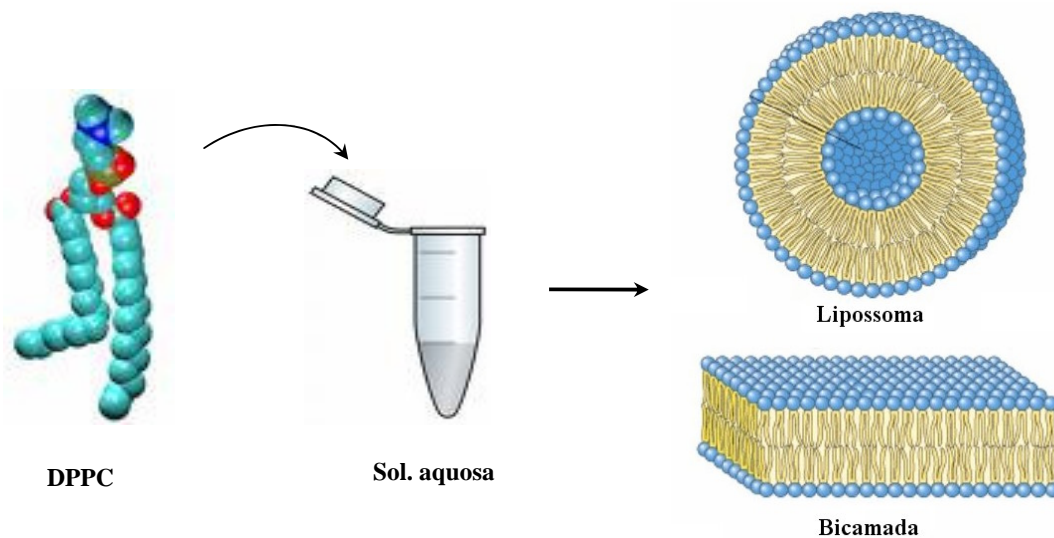


Fig. 4.3: Esquema do processo de formação das estruturas lipídicas.

#### 4.6 Condições de Operação do Espectrômetro

A obtenção dos espectros foi feita no laboratório de RPE do Instituto de Física da UFG. Utilizamos um espectrômetro Bruker ESP 300 equipado com uma cavidade ressonante ER4102 ST operando em banda-X (~9.4 GHz). Todas as medidas foram realizadas nas seguintes condições: potência de microonda de 20 mW; frequência de modulação de 100 KHz; amplitude de modulação de 0,3 a 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura de 168 segundos e constante de tempo de detecção, 41 ms. Uma parte dos experimentos foi realizada em um espectrômetro Varian E-109 (Lab. de Biofísica Molecular, Inst. de Física de São Carlos). A temperatura foi controlada com uma precisão de  $\pm 0,3$  °C por um sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten, Germany).

Como comentado anteriormente, as análises dos espectros foram feitas utilizando o programa NLLS. Este programa nos permite ajustar espectros com duas componentes tendo diferentes estados de mobilidade e tensores magnéticos, a partir de parâmetros espectrais. Com o auxílio da simulação podemos determinar as populações relativas e as constantes de difusão rotacional associadas aos marcadores. Os parâmetros considerados para o radical nítróxido estão intimamente relacionados com a dinâmica do marcador de spin no meio em que esse se encontra. Analogamente a trabalhos anteriores, os parâmetros magnéticos foram determinados com base em uma análise geral de todos os espectros obtidos neste trabalho, uma vez determinados, os espectros de RPE foram simulados usando os mesmos valores de entrada para os tensores magnéticos  $\vec{g}(t)$  e  $\vec{A}(t)$ . Os parâmetros magnéticos usados estão mostrados na Tabela 4.1 abaixo.

Tabela 4.1: Autovalores dos tensores magnéticos  $\bar{g}(t)$  e  $\bar{A}(t)$  utilizados no programa de ajuste NLLS, para as componentes espectrais dos marcadores de spin *n*-DAS, TEMPO e 6-MSL.

Parâmetros	Comp. 1	Comp. 2	Comp. H	Comp. P	Comp. S	Comp. W
$g_{xx}$	2,0087	2,0086	2,0084	2,0082	2,0098	2,0079
$g_{yy}$	2,0060	2,0060	2,0060	2,0050	2,006	2,0054
$g_{zz}$	2,0022	2,0031	2,0026	2,0022	2,002	2,003
$A_{xx}(G)$	6,0	5,5	6,5	6,8	6,9	7,5
$A_{yy}(G)$	6,0	5,5	6,5	6,8	7,9	7,5
$A_{zz}(G)$	33,5	31,5	34,7	38,1	36,2	36,2
$a_0(G)^a$	15,2	14,2	15,9	17,2	17,0	17,1

$$^a a_0 = 1/3(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}).$$

## 5 – RESULTADOS

Este capítulo de resultados está subdividido em duas partes referentes a três tipos básicos de marcadores de spin utilizados neste trabalho. Na primeira parte mostraremos os dados referentes aos efeitos do etanol, DL-mentol e 1,8-cineole na dinâmica molecular de marcadores de membrana, da classe doxil, e de um marcador protéico, derivado do maleimido, no tecido intacto do EC; explicitando nossas interpretações dos espectros de RPE e dos parâmetros obtidos a partir da simulação. Já na segunda parte apresentaremos os resultados e análises detalhadas do comportamento do marcador de spin TEMPO difundido nas membranas de SC, bem como em membranas artificiais de DPPC, quando estas são submetidas ao tratamento com soluções contendo diferentes tipos de terpenos.

### ***5.1 Efeitos Do 1,8-Cineole e do DL-mentol na Dinâmica dos Lipídios e Proteínas do EC***

#### ***5.1.1 Espectros de RPE característicos de marcadores de spin em membranas lipídicas***

Para uma melhor compreensão de nossos resultados experimentais está mostrado na Figura 5.1 um arranjo molecular dos lipídios no interior do EC conforme o modelo proposto por Hill e Wertz (2003) [17], que explica o padrão largo-estrito-largo descoberto por micrografia de transmissão eletrônica de tetróxido de rutênio fixado no EC. A esquerda deste arranjo molecular tem os lipídios ( $\omega$ -hidroxiceramidas) ligados covalentemente ao envelope celular do corneócito (representado por R na figura), e a direita temos o arranjo proposto para os lipídios intercelulares (aqueles que podem ser removidos do EC com solventes orgânicos). A molécula da  $\omega$ -hidroxiceramida possui duas cadeias longas e neste modelo uma cadeia está ligada ao envelope protéico e a outra que corresponde a esfingosina está inserida na lamela central. O marcador de spin 5-DSA, cujo grupo paramagnético doxil está ligado ao 5º átomo de carbono da cadeia acil, foi inserido neste arranjo molecular. Neste arranjo molecular está mostrado apenas uma banda luzente compreendendo o envelope lipídico (ligado ao envelope celular) e mais uma monocamada da outra banda, ou seja, a metade da banda.

Quando intercalamos marcadores de spin lipídicos em membranas de EC, os espectros de RPE gerados por estes marcadores são similares aos espectros destes mesmos marcadores em outros tipos de membranas naturais tais como as de eritrócitos, mitocôndrias e de membranas artificiais como a DPPC, entre outras. Devido à heterogeneidade estrutural das membranas, os marcadores irão se distribuir em ambientes com diferentes propriedades. Por

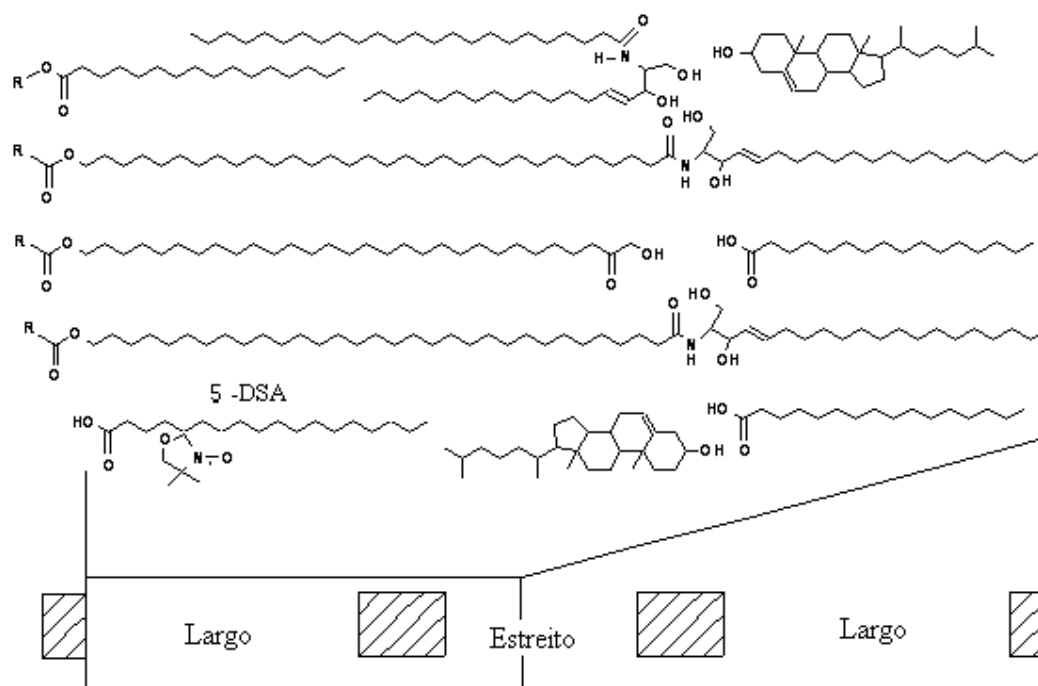


Fig. 5.1: Arranjo molecular dos lipídios do EC baseado no modelo proposto por Hill e Wertz (2003) [29] explicando o padrão largo-estrito-largo encontrado por micrografia de transmissão eletrônica de tetróxido rutênio. O marcador de spin 5-DSA é mostrado na figura, em uma possível posição. Os retângulos hachurados externos representam as bandas eletro densas onde os lipídios são ligados covalentemente à superfície celular dos corneócitos e os internos representam bandas eletro densas de regiões polares e as partes claras entre esses retângulos são as bandas luzentes das regiões hidrofóbicas.

este motivo, seus espectros são compostos por superposições de várias componentes, correspondendo a diferentes ambientes locais ou domínios, diferindo especialmente com relação à fluidez. Em estudos recentes destes marcadores em membranas, incluindo a de EC, pôde-se evidenciar a formação predominante de duas componentes espectrais, sugerindo uma distribuição dos marcadores em dois locais predominantes da membrana [76]. A Fig. 5.2 mostra os espectros de RPE, experimental (linhas pretas) e de melhor ajuste (linhas vermelhas), dos marcadores de spin análogos do ácido esteárico 5-DSA e 5-DMS, e do análogo do colesterol Androstano (ASL) (Fig. 4.2), estruturados nas membranas de EC. Devido à alta hidrofobicidade destes marcadores, bem como às condições de preparação das amostras, eles apresentaram a habilidade de penetrar no tecido do EC e intercalar com os outros lipídeos da membrana lipídica. De modo que, eles foram adequadamente incorporados às bicamadas lipídicas e distribuídos pelas membranas de EC como um todo. A adequada distribuição dos marcadores pode ser assegurada pela capacidade destas amostras reterem os

marcadores estruturados nas bicamadas lipídicas, sem permitir interações magnéticas entre eles.

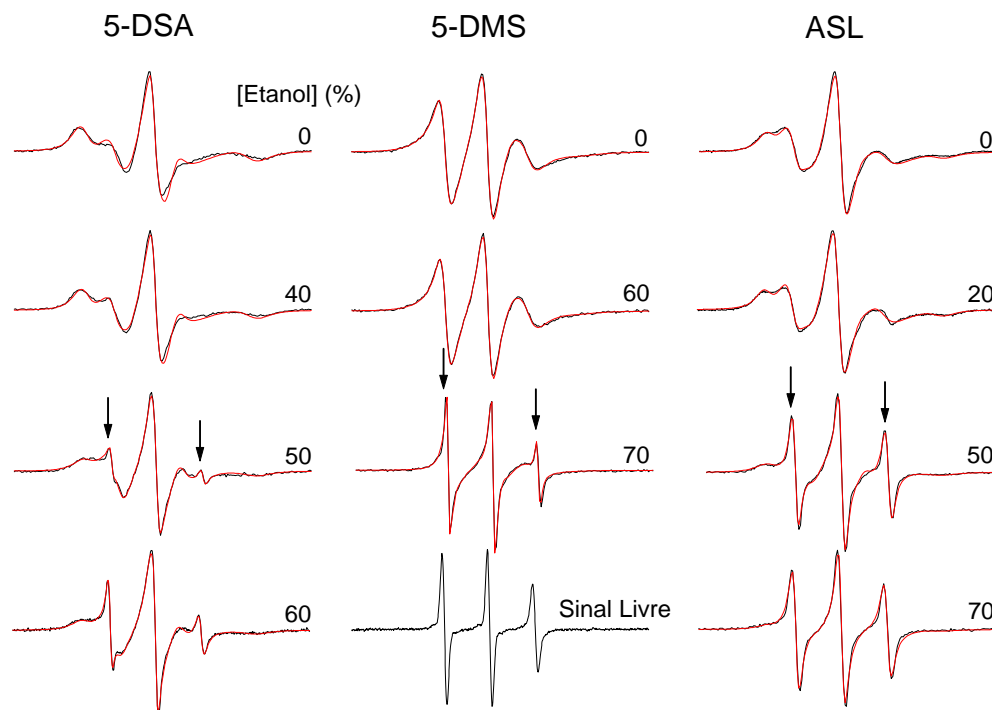


Fig. 5.2: Espectros de RPE experimental (linhas pretas) e de melhor-ajuste (linhas vermelhas) do marcador de spin derivado do ácido esteárico (5-DSA), do estearato de metila (5-DMS) e do marcador análogo do colesterol (ASL) no EC. Está indicada em cada espectro a concentração de etanol. Os espectros simulados (melhor-ajuste) foram obtidos com o programa de ajuste NLLS, usando um modelo de simulação de duas ou três componentes espectrais. As setas indicam a posição do campo magnético em que surge os sinais livres. A variação total do campo magnético foi de 100G.

Os espectros de RPE apresentados na Fig. 5.2 revelam claramente que eles são compostos de duas a três componentes espectrais, cada uma indicando um estado de movimento dos marcadores de spin. Na presença do etanol surge uma terceira componente que corresponde à fração dos marcadores de spin que estão no tecido EC, mas situadas no lado externo das membranas, e girando livremente no solvente. Esta componente possivelmente se deve ao fato de que a solução (contendo etanol), tem maior capacidade de dissolver o marcador lipídico e assim competir com a solubilidade deste na membrana. Na Fig. 5.2, as setas indicam a posição do campo magnético onde surge o sinal da terceira componente. Observe que a simulação está perfeitamente ajustada ao espectro experimental. É interessante notar que a forma de linha deste espectro é muito similar ao espectro de RPE dos marcadores de spin livres no tampão, não ligados na membrana (veja sinal livre na coluna

do meio da Fig. 5.2). Entretanto, há uma sutil mudança nos parâmetros obtidos através da simulação.

Uma vez que as bicamadas lipídicas têm características anfífilas, utilizamos marcadores com diferentes polaridades com o intuito de verificar o comportamento de cada um, nos diferentes ambientes lipídicos das membranas de EC. Com relação ao marcador de spin mais hidrofóbico utilizado nesta etapa do experimento, 5-DMS, o sinal livre surge apenas em altas concentrações de etanol (70%), enquanto para o 5-DSA observamos o aparecimento deste sinal em uma concentração de 50%. Para amostras tratadas com 50-70% de etanol e marcadas com ASL, marcador análogo do colesterol, a forma livre é predominante no espectro composto.

O aparecimento da componente 3 sugere que boa parte dos marcadores de spin, que antes contribuía apenas para as componentes 1 e 2, se deslocam para o solvente formando esta nova componente. Entretanto, nossos resultados nos mostram que é possível tratar o EC com até 20% de etanol em solução, sem que haja o surgimento da terceira componente espectral, conseqüentemente, sem promover alterações nas bicamadas. Por outro lado, se faz necessário verificar a influência do etanol nos domínios lipídicos do EC, ou seja, se causa alterações na mobilidade das cadeias lipídicas.

Um conjunto de espectros experimentais dos marcadores de spin 5-DSA e ASL nas membranas de EC, tratadas com mentol dissolvido em tampão (pH 5.1) contendo 20% de etanol são mostrados na Fig. 5.3. Note que, tanto para o 5-DSA (Fig. 5.3A) quanto para o marcador ASL (Fig. 5.3B), há uma significativa alteração nas formas de linha dos espectros à medida que elevamos a concentração de mentol no EC. Os espectros, experimental e simulado, bem como suas componentes espectrais, isoladas com o auxílio do programa NLLS, também são apresentados na Fig. 5.3C. Observe que o espectro simulado (vermelho) converge para o espectro experimental (preto), o que nos permite obter os espectros isolados que correspondem precisamente as componentes 1 e 2, e assim, a partir da análise das formas de linha, tiramos conclusões acerca do comportamento dos lipídios marcados, em dois domínios dentro das membranas de EC. A componente livre referente aos marcadores de spin extraídos das membranas de EC não está presente em todas as concentrações de etanol. Podemos perceber que a fração dos marcadores da componente 1 decresce gradualmente com o aumento da concentração de mentol, tendendo a desaparecer para amostras tratadas com mais de 1% de mentol.

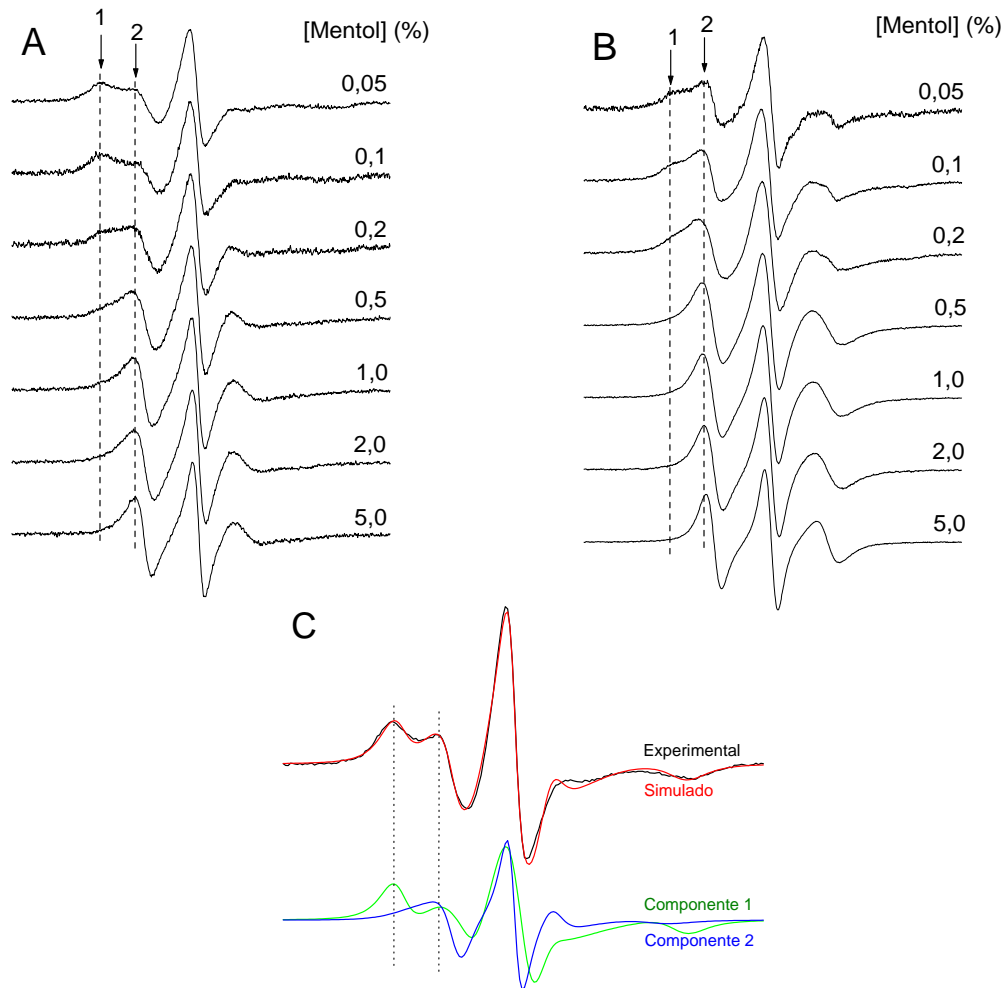


Fig. 5.3: Espectros de RPE experimentais para os marcadores de spin 5-DSA (A) e ASL (B) no EC com 20% de etanol em tampão (pH 5.1) e a concentração de mentol indicada. As linhas pontilhadas indicam a posição do campo magnético onde a formação das componentes 1 e 2 é mais claramente vista. A Fig. 5.3C mostra o espectro simulado (melhor-ajuste) e suas respectivas componentes separadas, obtidas com o programa de ajuste NLLS. A variação total do campo magnético foi de 100G.

Um resultado similar foi obtido quando tratamos as membranas de EC com 1,8-cineole (Fig. 5.4). Novamente podemos notar nos espectros da Fig. 5.3 que a relativa população dos marcadores de spin da componente 1 decrescem gradualmente com o aumento da concentração de terpeno, enquanto a componente 2 apresenta um comportamento contrário. Analogamente ao que aconteceu para as membranas tratadas com mentol, em altas concentrações de cineole todos os marcadores de spin migraram da componente 1, de menor mobilidade, para o interior das bicamadas lipídicas; uma vez que não foi observado nem um

sinal referente à componente 1 para 3% de cineole no caso do marcador 5-DSA (Fig. 5.4A) e 5% para o ASL (Fig. 5.4B).

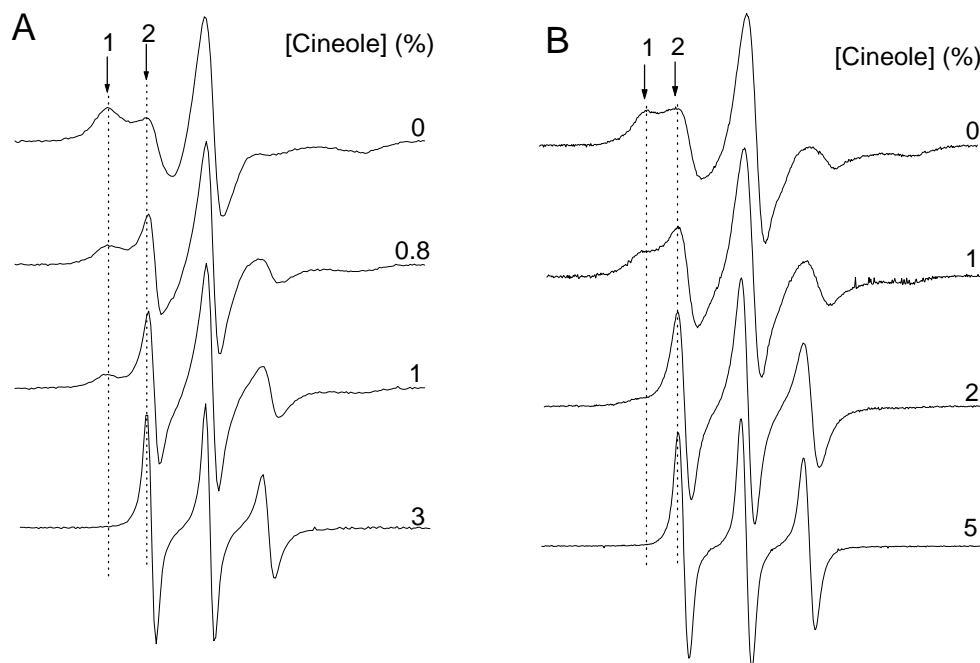


Fig. 5.4: Espectros de RPE experimentais para os marcadores de spin 5-DSA (A) e ASL (B) no EC (pH 5.1) tratado com várias concentrações de 1,8-cineole (indicadas para cada espectro na figura). As linhas pontilhadas indicam a posição do campo magnético onde as componentes 1 e 2 se caracteriza mais claramente.

Como foi comentado anteriormente, as componentes 1 e 2 representam uma distribuição bi-modal dos marcadores de spin na membrana. A origem destas duas componentes foi discutida em um trabalho prévio [76], não estando ainda completamente estabelecida. A interpretação dada é que a componente 1, de movimento mais restrito, surge de uma população de marcadores de spin que interagem com os grupos polares da membrana através de ligações de hidrogênio, enquanto que a componente de maior mobilidade (componente 2), é gerada pelos marcadores de spin que não formam ligações de hidrogênio com os grupos polares, e desta forma estão mais inseridos no interior hidrofóbico da membrana, interagindo com os lipídios apenas por ligações de Van Der Waals.

### 5.1.2 Dinâmica e partição dos marcadores de spin nas membranas lipídicas do EC

Membranas biológicas são estruturas altamente dinâmicas, devido às rotações moleculares de seus componentes lipídicos. Esta mobilidade, ou fluidez, tem efeitos decisivos nas propriedades das membranas além de terem um papel essencial para muitas de suas

funções. O movimento das cadeias lipídicas situa-se na escala de tempo de nanosegundos o que adequadamente se enquadra na escala de tempo da espectroscopia de RPE convencional o nitróxido. Os parâmetros de movimento rotacional  $R_{\text{bar}1}$  e  $R_{\text{bar}2}$ , obtidos a partir do ajuste do espectro de RPE, refletem os estados de mobilidade das componentes 1 e 2, respectivamente.

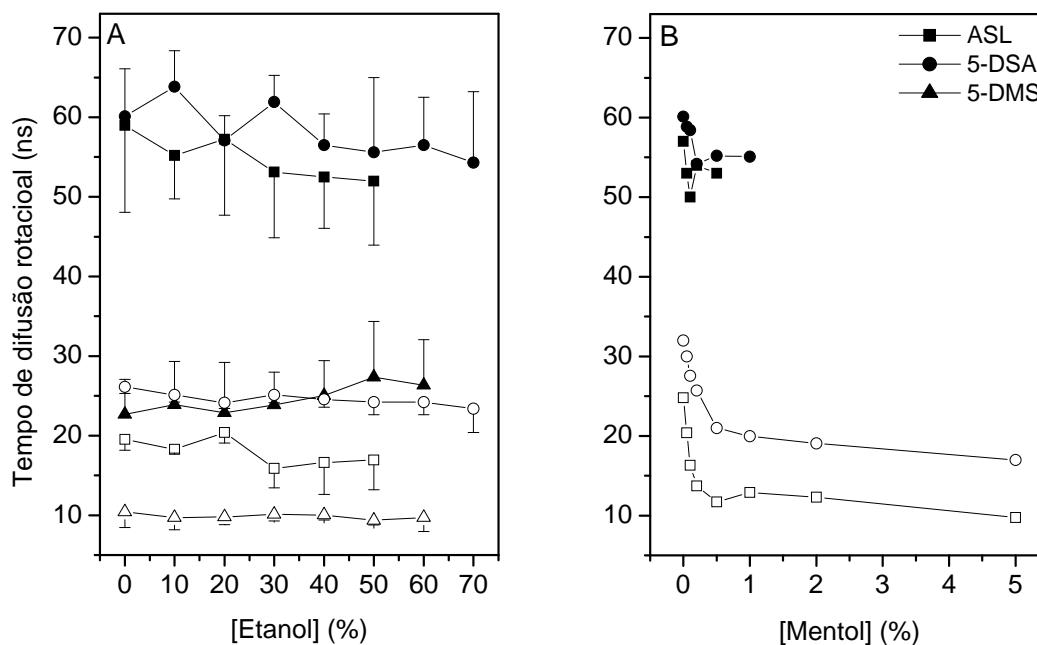


Fig. 5.5: Parâmetro de difusão rotacional,  $R_{\text{bar}}$ , convertido para escala de tempo, como função das concentrações de etanol (A) e DL-mentol (B). O mentol foi adicionado em uma solução tampão (pH 5.1) contendo 20% de etanol. Os parâmetros foram obtidos a partir dos dados da simulação dos espectros de RPE, considerando a resolução de duas componentes espectrais nas membranas. Os círculos representam os valores de  $R_{\text{bar}}$ , convertidos para escala de tempo, para o marcador de spin 5-DSA, os quadrados para o ASL e os triângulos para o 5-DMS. Os símbolos fechados se referem à componente 1 enquanto os abertos à componente 2. Em (A) a média e o desvio são de três experimentos.

Na Fig. 5.5, os parâmetros  $R_{\text{bar}1}$  e  $R_{\text{bar}2}$ , convertidos a escala de tempo, são plotados como uma função da concentração de etanol (Fig. 5.5A) e concentração de DL-mentol em solução com 20% de etanol (Fig. 5.5B) para três diferentes marcadores de spin estruturados nas membranas de EC. Em uma primeira observação podemos notar que os valores obtidos para o tempo de difusão rotacional do marcador de spin 5-DMS são pequenos quando comparado aos valores encontrados para o 5-DSA e para o ASL, o que demonstra que estes dois últimos estão se movimentando mais lentamente. Isto provavelmente se deve ao fato de que o 5-DMS interage pouco com os grupos polares da membrana, quando comparado aos outros dois marcadores, dessa forma adquirindo mais liberdade para freqüentar o núcleo hidrofóbico das membranas. Entretanto, à medida que aumentamos a concentração de etanol

nas amostras não pudemos observar qualquer mudança significativa na mobilidade de nenhum dos lipídios marcados (Fig. 5.5A), indicando que o etanol não promove qualquer alteração na fluidez das bicamadas lipídicas. Por outro lado, a adição de DL-mentol causou um aumento na mobilidade dos marcadores da componente 2 (Fig. 5.5B). É interessante notar que o efeito observado com 1% de mentol se mantém para altas concentrações.

Quando tratamos as amostras com 1,8-cineole os resultados foram similares aos obtidos com DL-mentol, como pode ser notado na Fig. 5.6 abaixo. Observe novamente que há um pronunciado decréscimo no tempo de difusão rotacional dos lipídios marcados até cerca de 1% de cineole, acima desta concentração não há alteração relevante nos lipídios da componente 2. Na Fig. 5.6 estão representados também os valores obtidos na simulação para o tempo de difusão rotacional do marcador de spin 5-DSA estruturado nas amostras de EC tratadas com cineole em solução contendo 50% de etanol (símbolos vazios). É interessante notar que não houve alterações significativas no comportamento dinâmico das cadeias lipídicas do EC.

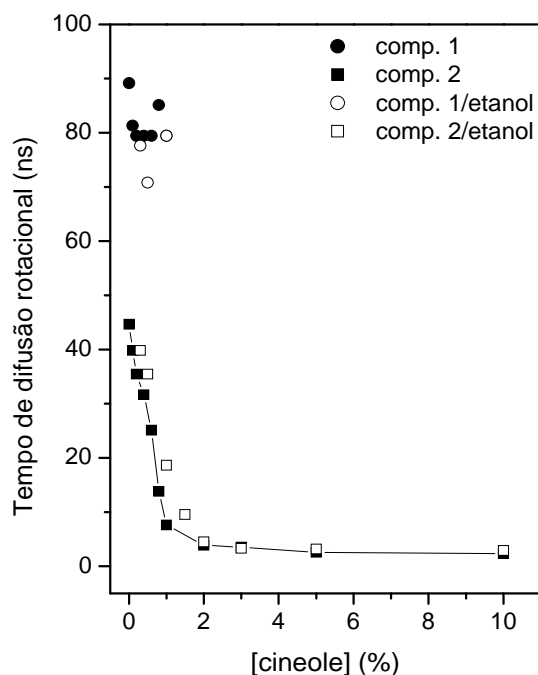


Fig. 5.6: Parâmetro de difusão rotacional,  $R_{\text{bar}1}$ , convertido para escala de tempo, para o marcador de spin 5-DSA como função da concentração de 1,8-cineole. Os parâmetros foram obtidos a partir dos dados da simulação dos espectros de RPE, considerando a resolução de duas componentes espectrais nas membranas. Os tempos de difusão rotacional são apresentados para componente 1 (círculos) e 2 (quadrados). Os símbolos vazios se referem às amostras contendo 50% de etanol (v/v).

Estes resultados observados tanto para DL-mentol quanto para 1,8-cineole, Fig. 5.5 e Fig. 5.6, possivelmente se deve ao fato dos terpenos estarem interagindo com os lipídios das membranas de duas possíveis maneiras: (1) ou as moléculas de terpenos estariam competindo com os lipídios naturais das bicamadas pelas interações de hidrogênio entre seus grupos polares, ou (2) eles penetram na região do centro hidrofóbico das membranas formando agregados e distribuídos entre as cadeias graxas aumentam as distâncias entre elas, propiciando menor empacotamento e assim maior liberdade de movimento. Uma vez que estas interpretações se referem às possíveis interações dos terpenos com duas regiões de polaridades distintas na membrana, é interessante entender não só a dinâmica dos marcadores como também seus ambientes de localização à medida que é adicionado terpeno à membrana.

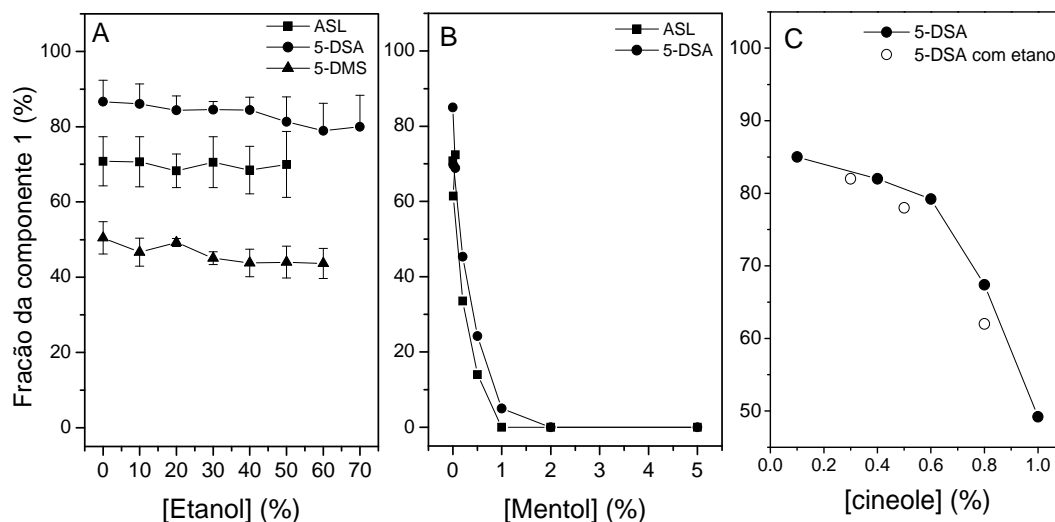


Fig. 5.7: Fração dos marcadores de spin da componente mais restrita, componente 1, no EC como função da concentração de etanol (A), DL-mentol (B) e 1,8-cineole (C). DL-mentol foi dissolvido em 20% de etanol em tampão (pH 5.1), os símbolos vazios em (C) representam os resultados para amostras contendo 50% de etanol. Símbolos: 5-DSA (círculos), ASL (quadrados) e 5-DMS (triângulos). Os valores em (A) são mostrados com média e desvio padrão ( $n = 3$ ).

O programa de ajuste NLLS pode ser usado para calcular as relativas populações das duas frações de marcadores de spin na membrana, bem como a aparente mudança nessas populações na presença dos terpenos. As Fig. 5.7A, B e C exibem as taxas de populações relativas da componente 1 plotadas em função das concentrações de etanol, DL-mentol e 1,8-cineole, respectivamente. Podemos notar que a população dos marcadores de spin que compõem a componente 1 não sofrem mudanças consideráveis na presença de etanol para nenhum dos marcadores utilizados, sugerindo que a formação de pontes de hidrogênio entre

estes lipídios marcados e a superfície polar das membranas é essencialmente preservada com o aumento da concentração de etanol até 70%. De fato, as formas dos espectros desta componente sofrem alterações insignificantes sob diferentes concentrações de etanol. Por outro lado, as Fig. 5.7B e 7C mostram um resultado bem mais interessante, onde podemos notar claramente que na presença de 1% tanto de mentol quanto de cineole, a componente 1 dos marcadores diminuem consideravelmente, mostrando a tendência que os terpenos têm de causar modificações nas superfícies polares das membranas, sugerindo que eles induzem a saída dos lipídios dessas regiões.

É importante ressaltar que a fração de marcadores de spin extraídos da componente 1 aumentou drasticamente para o ASL a medida que era aumentada a concentração de etanol nas amostras acima de 30%, como mostrado na Fig. 5.8. Estes resultados também revelam uma menor habilidade do etanol para extrair os marcadores de spin 5-DMS, enquanto um intermediário nível de extração foi observado para o 5-DSA. O marcador 5-DMS apresenta um grau de hidrofobicidade maior, quando comparado ao 5-DSA, o que lhe confere uma maior afinidade pelas regiões apolares das membranas.

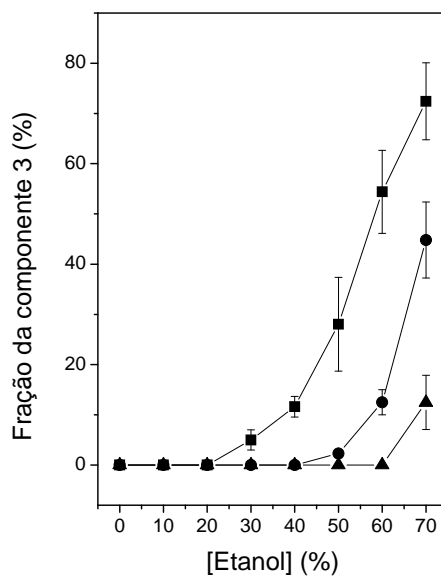


Fig. 5.8: Fração dos marcadores de spin da componente 3, nas membranas de EC, como função da concentração de etanol. Símbolos: 5-DSA (círculos), ASL (quadrados) e 5-DMS (triângulos). Os valores em (A) são mostrados com média e desvio padrão ( $n = 3$ ).

Além do mais, o marcador 5-DMS possui uma menor capacidade de formar interações de hidrogênio, tanto com a superfície polar das bicamadas quanto com o solvente, pois possui apenas uma carbonila como grupo polar enquanto o 5-DSA possui um grupo carboxílico, o que deve diminuir a afinidade com moléculas polares como o etanol.

Em um estudo prévio [76] foi verificado em nosso laboratório que mesmo removendo os lipídios intercelulares, restando apenas os lipídios ligados covalentemente às proteínas, as duas componentes espectrais ainda eram observadas. Como as duas componentes também são observadas em bicamada modelos simples, fica claro que as duas componentes estão relacionadas com as propriedades gerais de membrana.

É importante considerar que o EC tem uma composição lipídica complexa e que a quantidade de lipídios é estimada em 17% em relação ao peso seco. Tendo em vista a impossibilidade de quantificar com precisão os lipídios do EC, nossos experimentos foram realizados com bicamadas lipídicas simples de DPPC, um sistema bem conhecido da literatura onde é possível adicionar os terpenos em conhecidas relações moleculares de terpeno:lipídio. A Fig. 5.9 mostra os espectros de RPE experimentais para o marcador de spin 5-DMS para várias taxas molares de terpeno:lipídio. Podemos notar que há uma sensível distorção nas formas de linha dos espectros para concentrações aumentadas de cineole nas membranas de DPPC. O efeito começa para uma taxa molar de 0.5:1.

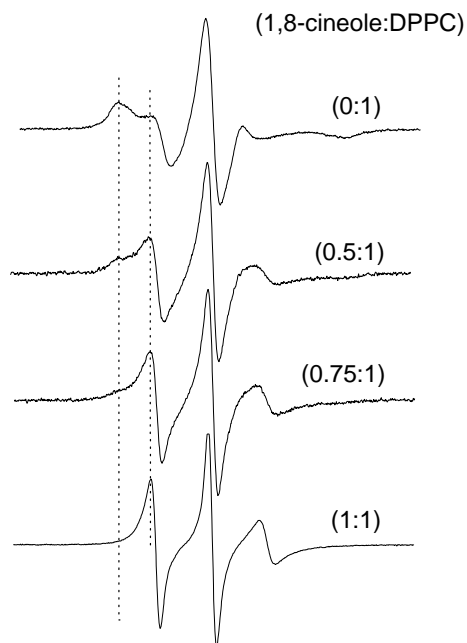


Fig. 5.9: Espectro de RPE, 30°C, do marcador de spin 5-DMS em DPPC para várias taxas molares de 1,8-cineole:DPPC. A variação total de campo magnético foi de 100 G.

### 5.1.3 Dinâmica das proteínas do EC

A Fig.5.10A apresenta os espectros de RPE do marcador de proteínas 6-MSL (Fig. 4.2) ligado aos grupos sulfidrilas das proteínas de EC. Estes espectros também foram

simulados através do programa NLLS considerando a presença de duas componentes espectrais, ou seja, a existência de duas populações de nitróxidos monitorando dois ambientes moleculares distintos. Trabalhos anteriores [72,76] mostraram que estas duas componentes resultam de um equilíbrio termodinâmico entre duas populações de marcadores com diferentes estados de mobilidade. A componente menos móvel (aqui denotada componente S) prevalece quando a cadeia lateral do nitróxido adota uma conformação “dobrada” sobre a cadeia polipeptídica, contatando com os sítios da proteína através de pontes de hidrogênio com o envolvimento do átomo de oxigênio do radical nitróxido, enquanto que a componente mais móvel (denotada componente W) é gerada pelos marcadores de spin em contato com o solvente (Fig. 5.10B), os quais refletem a polaridade típica dos meios aquosos.

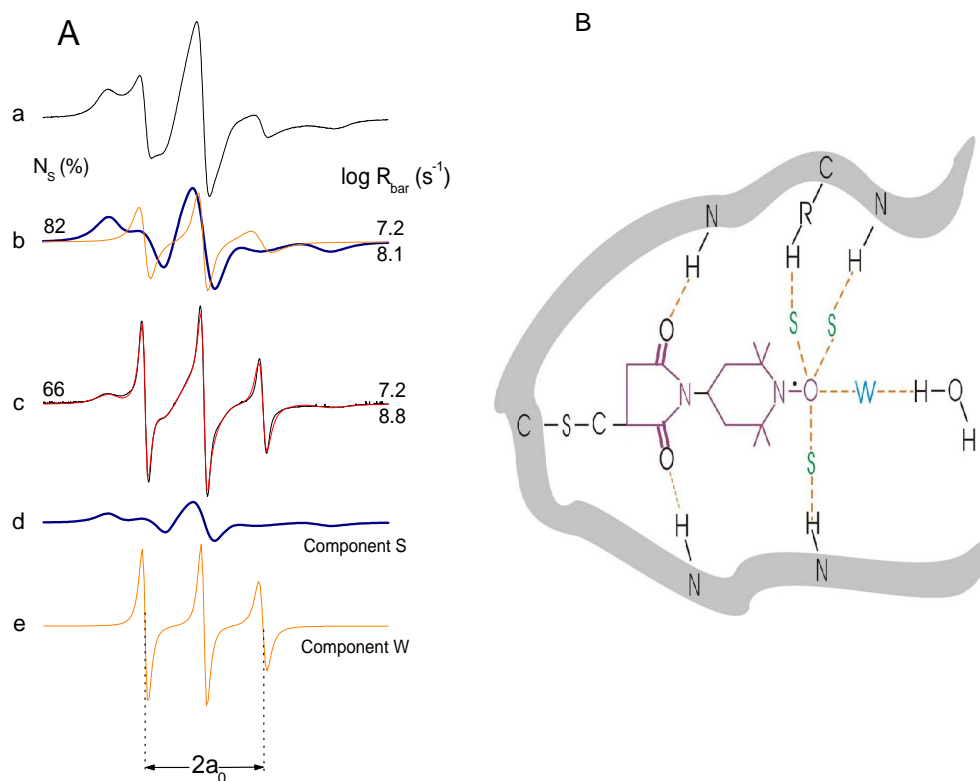


Fig. 5.10: (A) Espectros de RPE do marcador de spin derivado do maleimido, 6-MSL, inserido nas proteínas do EC. (a) espectro experimental composto. (b) superposição das componentes espectrais W (linha laranja) e S (linha azul) obtidas usando o programa NLLS. (c) Espectro experimental (linha preta) e melhor-ajuste (linha vermelha) do marcador 6-MSL no EC após 90 min de incubação com 5% de 1,8-cineole. (d e e) Componentes S e W, respectivamente, que descrevem o espectro (c). (B) Modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado a proteína do EC, S e W representam as componentes fortemente e fracamente imobilizadas, respectivamente.

Através da simulação podemos notar que a fração daqueles marcadores da componente W apresenta um tempo de correlação rotacional na escala dos nanossegundos e um desdobramento hiperfino isotrópico,  $2a_0$ , consistente com o marcador disperso no tampão ( $17.1 \pm 0.5$  G). O parâmetro  $2a_0$  é muito sensível à polaridade do meio onde o radical nitróxido está dissolvido, de modo que os valores encontrados estão de acordo com resultados de marcadores expostos ao solvente (Fig.5.10A). Por outro lado, a componente S apresenta uma taxa de difusão rotacional em torno de uma ordem de magnitude inferior àquela da componente W, o que confirma a presença de fortes interações entre o radical nitróxido e a cadeia polipeptídica das proteínas. Assim, o parâmetro de movimento rotacional  $R_{\text{bar}}S$  reflete a mobilidade da cadeia polipeptídica, enquanto  $R_{\text{bar}}W$  reflete o movimento rotacional da cadeia lateral do nitróxido na fase aquosa e pode ser afetada pela microviscosidade nas vizinhanças do grupo sulfidril.

Nossos resultados mostraram que a presença de 5% de terpeno no solvente não altera a mobilidade das proteínas do EC, como deduzido dos valores do parâmetro  $R_{\text{bar}}S$  (Fig.5.10A), entretanto há um aumento tanto da mobilidade quanto da fração de marcadores na componente W (livre no solvente), como pode ser observado pelo maior valor de  $R_{\text{bar}}W$  e pequeno valor de  $N_S$ .

## ***5.2 Efeito dos Terpenos na Dinâmica e Partição de um Pequeno Marcador de Spin (TEMPO) nas Membranas de EC***

Nesta parte, iremos expor os resultados de um pequeno marcador de spin (TEMPO) que é capaz de se difundir rapidamente pela membrana. Os marcadores de membranas (5-DSA, 5-DMS, 16-DAS e ASL) se associam fortemente às bicamadas lipídicas posicionando o grupamento nitróxido em regiões bem definidas no interior das membranas, ao passo que o marcador de spin TEMPO pode se movimentar entre o ambiente aquoso e hidrofóbico das bicamadas. A grande vantagem de se utilizar este marcador é que ele sofre partição entre as bicamadas lipídicas e a fase aquosa e assim pode mimetizar um fármaco, isto se deve ao seu baixo peso molecular e suas características anfipáticas. Todavia, a composição lipídica do EC é bastante complexa, sendo assim nós conduzimos um estudo paralelo com membranas de DPPC para comparar resultados de EC com um sistema simples e bem conhecido.

### 5.2.1 Análises dos espectros do marcador TEMPO

O espectro de RPE do marcador de spin TEMPO estruturado em uma dispersão multilamelar de vesículas de DPPC ou em membranas de EC é composto pela superposição de duas componentes H e P, as quais retratam as frações de marcadores de spin dissolvidos nos ambientes hidrofóbico e polar, respectivamente. A Fig. 5.11 mostra o espectro de RPE para o marcador de spin TEMPO inserido no EC, bem como os parâmetros espectrais medidos. O parâmetro  $f$ , igual a  $H/(H + P)$ , tem sido usado inicialmente na literatura como a fração aproximada do marcador de spin dissolvido na membrana [77] Um modelo de duas componentes espectrais descrevendo uma difusão Browniana anisotrópica do marcador TEMPO foi adotado para simulação dos espectros de RPE e analisar separadamente as duas

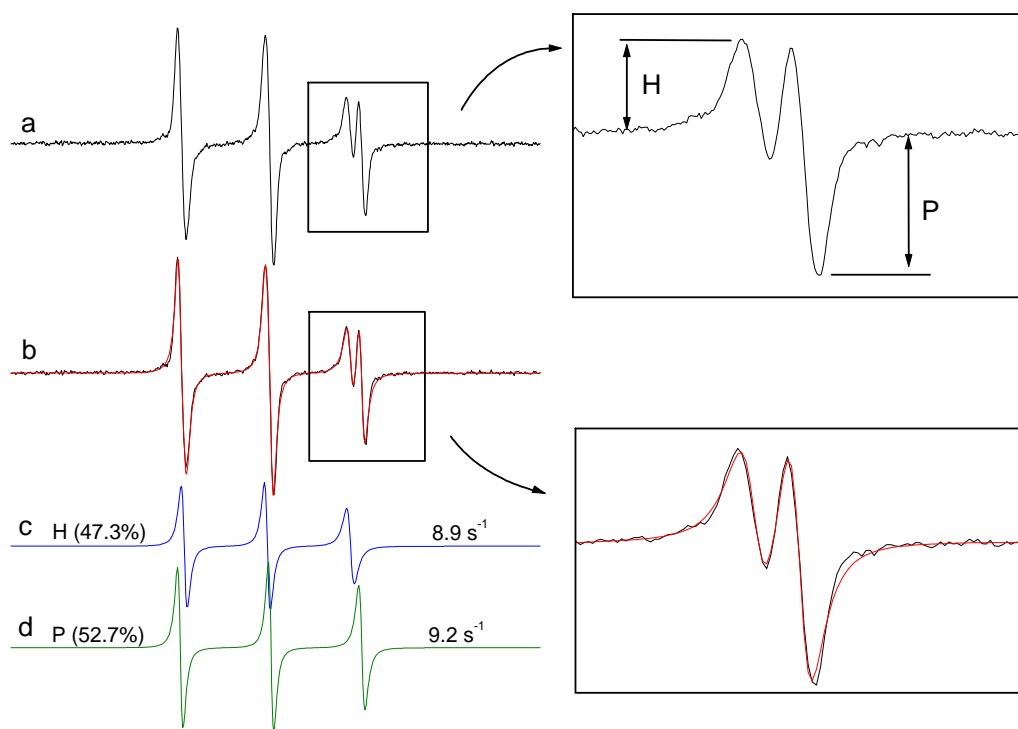


Fig. 5.4: (a) Espectros de RPE do marcador de spin TEMPO no EC (pH 5.5, 50°C) e os parâmetros espectrais H e P que definem o parâmetro  $f = H/(H + P)$ . (b) o mesmo espectro (linha preta) e o melhor ajuste sobreposto (linha vermelha). O espectro de melhor ajuste foi obtido por meio do programa NLLS, usando um modelo de simulação de duas componentes espectrais. A componente H (espectro c) se refere à fração dos marcadores de spin no ambiente hidrofóbico e a componente P (espectro d) aos marcadores de spin no solvente. Para uma melhor compreensão, a região do espectro utilizada para o cálculo do parâmetro  $f$  foi ampliada. A figura também indica os resultados da simulação: a porcentagem dos marcadores de spin em cada componente,  $N_H$  e  $N_P$ , e seus respectivos logaritmos da média do parâmetro de difusão rotacional,  $\log R_{barH}$  e  $\log R_{barP}$ . O campo magnético de varredura foi de 65 G.

componentes superpostas. A Fig. 5.11b mostra o mesmo espectro experimental da Fig. 5.11a (linha preta) junto com o espectro de melhor ajuste (linha vermelha), enquanto que as Figs. 5.11c e 11d mostram as componentes H e P separadas e seus parâmetros de melhor ajuste.

Os espectros de RPE, experimental (linha preta) e de melhor ajuste (linha vermelha), do marcador de spin TEMPO em membranas de EC e de DPPC são mostrados na Fig. 5.12 para várias temperaturas e concentrações de 1,8-cineole em 26°C. Como pode ser notado, há uma elevação da curva referente à população de marcadores da componente H com o aumento da concentração de terpeno ou temperatura. Em torno de 2% de terpeno em EC (v/v) ou em uma taxa molecular de terpeno:DPPC de 2:1 (dados omitidos) pode ser notado que todos os marcadores de spin foram deslocados para as regiões hidrofóbicas das membranas.

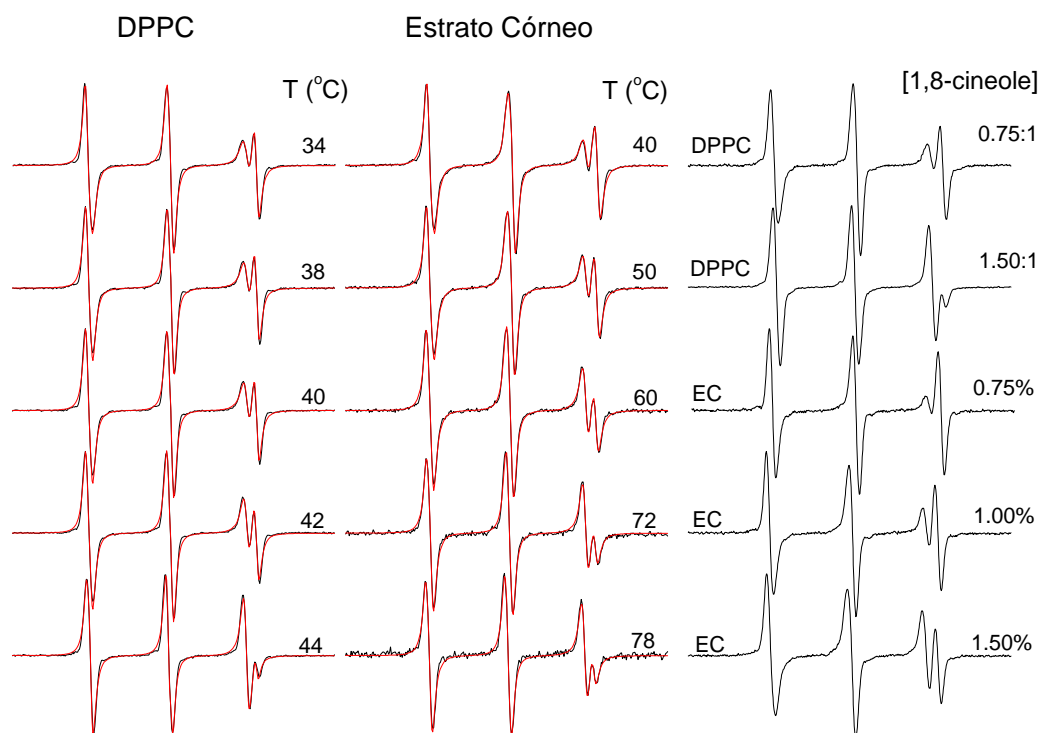


Fig. 5.5: Espectros experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) de RPE do marcador de spin TEMPO em membranas de EC e DPPC em várias temperaturas e concentrações de 1,8-cineole em 24 °C (dado em porcentagem de 1,8-cineole em EC ou taxa molecular de 1,8-cineole:DPPC). A varredura de campo magnético foi de 65 G.

### 5.2.2 Coeficiente de partição do marcador TEMPO entre a fase polar e hidrocarbônica

A Fig. 5.13 mostra a dependência do parâmetro espectral  $f$  e da população relativa de H ( $N_H$ ) com a temperatura, obtida por meio da simulação computacional. Embora os gráficos dos dois parâmetros,  $f$  e  $N_H$ , apresentem similaridades quanto ao comportamento geral, ocorrem significativas discrepâncias quando se observam os dados ponto a ponto. Ambos os parâmetros de RPE indicam transições abruptas de fase para DPPC entre  $\sim 34$  e  $\sim 42^\circ\text{C}$ , enquanto para o EC as mudanças nas formas das curvas são mais suaves, com um coeficiente de inclinação mais alto entre  $\sim 55$  e  $\sim 72^\circ\text{C}$ . Para as membranas de DPPC, as transições de fase são bem conhecidas [78,79]: a transição em  $34^\circ\text{C}$  corresponde a uma transição da fase gel  $L_\beta$  para uma fase de pré-transição  $P_\beta$ , e a transição em  $\sim 42^\circ\text{C}$  corresponde a transição da fase  $P_\beta$  para a fase fluida ( $L_\alpha$ ).

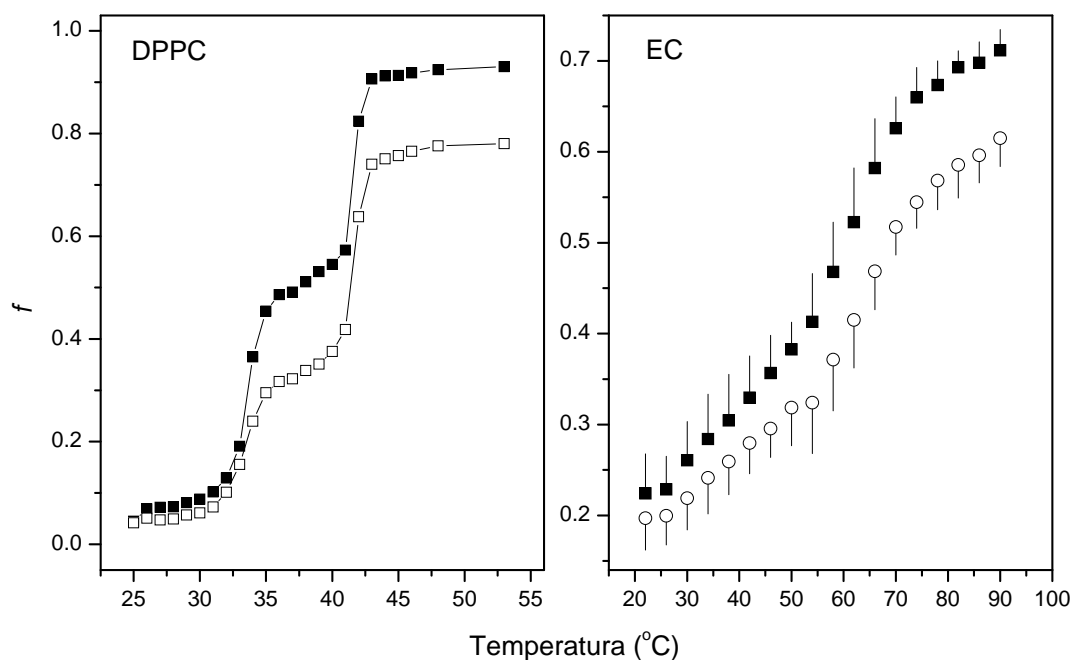


Fig. 5.6: Parâmetro espectral  $f = H/(H + P)$  como descrito na Fig. 5.11 (círculos sólidos) e a relativa população dos marcadores de spin na componente H (círculos abertos) determinada por meio da simulação computacional do espectro experimental para vesículas de DPPC (figura da esquerda) e EC (figura da direita) versus a temperatura.

De acordo com a teoria de difusão-solubilidade, o coeficiente de permeabilidade ( $P$ ) de uma molécula que atravessa uma membrana é geralmente descrito em termos do coeficiente de partição na bicamada,  $K$ , da constante de difusão através dela,  $D$ , e da espessura da bicamada,  $\Delta x$ , de acordo com a seguinte equação [80]:

$$P = \frac{KD}{\Delta x}. \quad (5.1)$$

O coeficiente de difusão é definido como:

$$D = \frac{KT}{6\pi r \eta}, \quad (5.2)$$

onde  $KT$  é a energia térmica,  $\eta$  a viscosidade da membrana e  $r$  o raio molecular. O coeficiente de partição é a razão entre a concentração do soluto na bicamada,  $c_H$ , e a concentração no meio aquoso,  $c_P$ .  $K$  pode ser determinado se o volume relativo da membrana e o solvente na amostra forem conhecidos.

$$K = \frac{c_H}{c_P}, \quad (5.3)$$

ou

$$K = \frac{N_H / V_{membrana}}{N_P / V_{solvente}}, \quad (5.4)$$

onde  $N_H$  e  $N_P$  são as populações relativas nos ambientes hidrofóbico e polar, respectivamente, que são fornecidas pelo programa de ajuste. O volume relativo membrana-solvente para estes dois sistemas foi estimado levando-se em conta o volume da amostra dentro dos tubos capilares (cerca de 15  $\mu\text{L}$ ) e pesando as amostras antes e após serem secadas; o conteúdo de água nas amostras (peso/peso) foi de 65% para DPPC e 67% para EC. No cálculo de  $K$ , várias suposições foram consideradas: (a) no caso do EC, o volume correspondente de membranas é de 20% em relação ao peso seco, (b) o marcador de spin está distribuído por toda membrana, (c) o volume relativo de solvente e de membrana não sofre alteração nas medidas com variação de temperatura e por último (d) foi estimado que a presença dos terpenos aumenta o volume das membranas em até 15%, tendo em vista a concentração utilizada no experimento.

A mudança na energia livre de Gibbs para transferir o marcador da fase aquosa para a fase hidrocarbônica,  $\Delta G^\circ$ , pode ser calculada com base no coeficiente de partição, como segue [81,82]:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K, \quad (5.5)$$

ou

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (5.6)$$

onde  $R$  é a constante dos gases,  $T$  a temperatura absoluta,  $\Delta H^\circ$  a variação de entalpia padrão para transferência das moléculas do solvente para o interior da membrana e  $\Delta S^\circ$  é a variação na entropia associada. Estes parâmetros termodinâmicos podem ser determinados do gráfico de van't Hoff mostrado na Fig. 5.14.

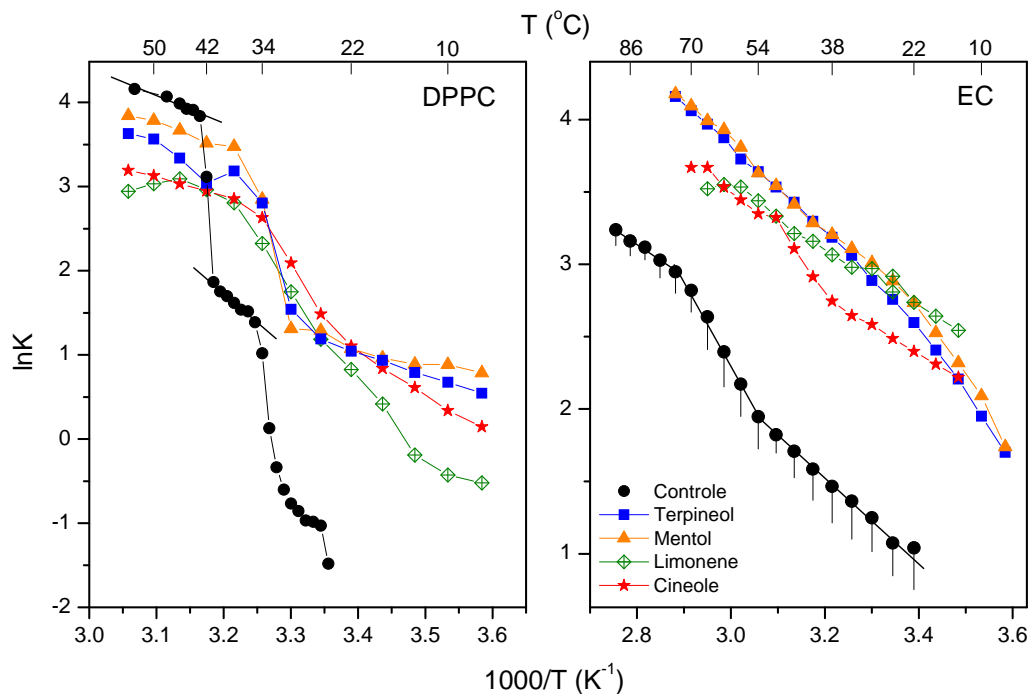


Fig. 5.14: Logaritmo natural do coeficiente de partição  $K$  para membranas de DPPC (figura da esquerda) e EC (figura da direita) versus a temperatura absoluta recíproca. Os terpenos foram adicionados em uma taxa molar terpeno:DPPC de 0,75:1 ou em 0,4% de terpeno em EC. Na figura da direita está mostrado uma legenda dos símbolos que serve tanto para DPPC quanto para EC.

Neste tipo de gráfico, o coeficiente de inclinação da curva deve gerar  $\Delta H^\circ/R$  e a intersecção  $\Delta S^\circ/R$ , de acordo com a equação (5.6). Os valores calculados de  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  para as curvas das amostras controle de DPPC e EC estão apresentados na Tabela 5.1. É

importante notar que para determinar o parâmetro  $\Delta H^0$ , diferente das determinações de  $\Delta G^0$  e  $\Delta S^0$ , não é necessário conhecer o volume relativo das fases membrana-água da amostra, isto é, o cálculo da variação da entalpia não depende do valor real de K, sendo por causa disso, uma determinação mais precisa.

Tabela 5.1: Variação na energia livre de Gibbs (a 26°C), entalpia e entropia acompanhando a transferência do marcador de spin TEMPO da água para as membranas de DPPC ou estrato córneo (EC).

Amostras	$\Delta G_{w \rightarrow m}^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{w \rightarrow m}^0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_{w \rightarrow m}^0$ (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
DPPC 35-41°C	-0.4	14.3	49.2
DPPC 43-53°C	-0.7	5.6	21.0
EC 22-54°C	16.2	16.1	16.1
EC 54-70°C	-0.1	12.4	41.8
EC 70-90°C	-1.2	4.5	18.8

<sup>a</sup>Os valores numéricos foram calculados com base na equação (5.6) e usando dados do gráfico de van't Hoff (Fig. 5.14).

Na presença dos terpenos, a transição de DPPC em 42°C aparece entre 32 e 38°C e a fase gel parece ser transformada em fase de pré-transição ( $P_{\beta'}$ ). As membranas de DPPC foram mais afetadas pelos terpenos no intervalo de temperatura correspondente a fase gel (6-32°C) e não sofreram alterações na fase líquido cristalina. Em contraste, as amostras de EC apresentaram aumentos na partição do TEMPO causado pelos terpenos em todo intervalo de temperatura medido. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que as bicamadas de DPPC na fase líquido cristalina já terem alcançado uma máxima desordem para a taxa molecular empregada (0,75:1). A variação de entalpia e de entropia observada na presença dos terpenos foram essencialmente as mesmas observadas nas amostras controle (dados não incluídos na Tabela 5.1)

### 5.2.3 Dinâmica molecular do marcador tempo na fase hidrocarbônica

O logaritmo da média da constante de difusão rotacional da componente H,  $R_{bar}H$ , plotado como função da temperatura absoluta recíproca, é mostrado na Fig. 5.15. Este gráfico de Arrhenius nos permite calcular a energia de ativação aparente,  $E_a$ , nas regiões a dependência é linear, usando a seguinte equação:

$$\log R_{bar}H = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right), \quad (5.7)$$

onde  $A$  é um fator pré-exponencial.  $E_a$  é a barreira de energia que os marcadores de spin precisam superar para alcançar estados de movimento mais elevados. Alguns valores de  $E_a$  obtidos do gráfico da Fig. 5.15 são mostrados na Tabela 5.2.

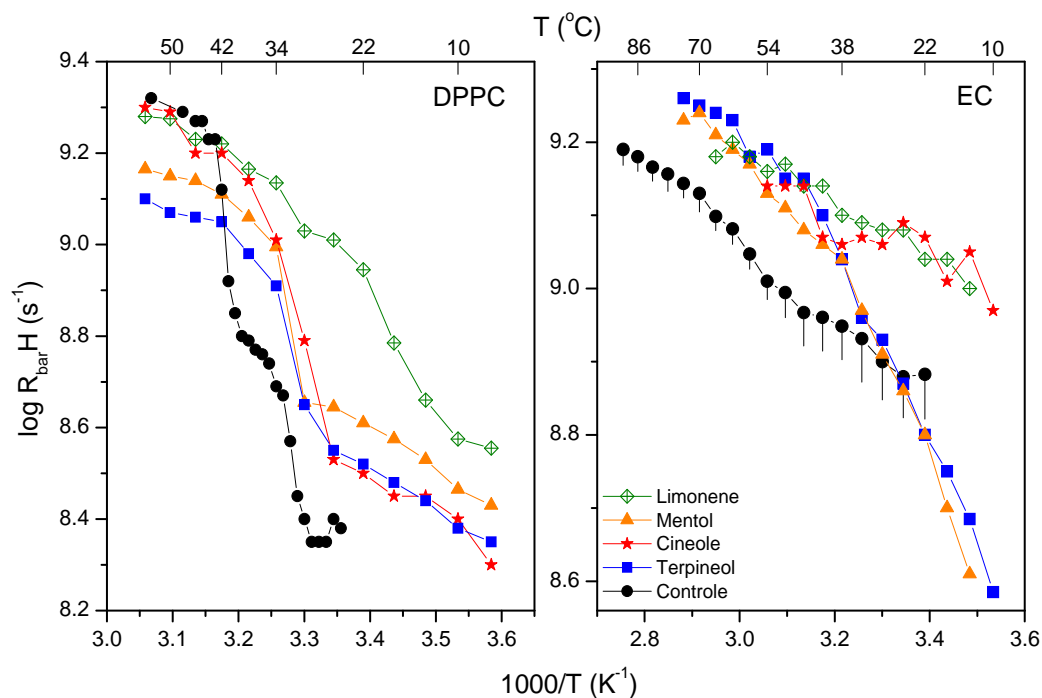


Fig. 5.15: Taxa de difusão rotacional,  $\log R_{\text{bar}}H$  para membranas de DPPC (figura da esquerda) e EC (figura da direita) versus a temperatura absoluta recíproca. Os terpenos foram adicionados em uma taxa molar terpeno:DPPC de 0,75:1 ou em 0,4% de terpeno em EC. Na figura da direita está mostrada uma legenda dos símbolos que serve tanto para DPPC quanto para EC.

Tabela 5.2: Energia de ativação para a difusão rotacional do marcador de spin TEMPO nas membranas de DPPC ou de EC.

Amostras	$E_a$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
DPPC 35-40°C	8.7
DPPC 43-53°C	4.3
EC 22-54°C	1.8
EC 54-70°C	3.8
EC 70-90°C	1.7

<sup>a</sup>Os valores numéricos foram calculados com base na Eq. (7) e nos dados dos gráficos da Fig. 5.14.

É interessante notar que a taxa de difusão rotacional dos marcadores de spin também refletem as transições de fase das membranas, similarmente ao coeficiente de partição (Fig. 5.14), e que no caso da DPPC, os terpenos exercem efeitos análogos nos dois parâmetros. Os

terpenos não aumentam o movimento rotacional dos marcadores de spin na fase fluida das membranas de DPPC, onde ele apresenta alto grau de partição. Em baixas temperaturas, os terpenos mostraram aumentos significativos na dinâmica das bicamadas de DPPC, enquanto que nas membranas de EC tratadas com os terpenos DL-Mentol e  $\alpha$ -terpineol pode ser notada uma tendência para reduzir o parâmetro de movimento para valores abaixo do controle. Este fato provavelmente está associado com o ponto de fusão (*melting point*) destes terpenos, que vai de 32 a 41°C. Vale a pena mencionar que os resultados comparativos entre estes terpenos foram muito similares.

A Fig. 5.16 mostra a dependência do logaritmo de  $R_{\text{bar}}H$  e  $R_{\text{bar}}P$  para as amostras não tratadas (controle). É interessante que o movimento rotacional dos marcadores de spin no ambiente polar decresce com a temperatura e também refletem eficientemente as transições de fase das bicamadas de DPPC. Além disso, quando estas bicamadas alcançam a fase fluida, a mobilidade dos marcadores de spin de ambas as componentes, H e P, foram similares. No EC, este efeito ocorre por volta de 78°C. Este resultado sugere que os marcadores de spin da fase aquosa interagem com a interface polar e que esta interação, a qual aumenta com a temperatura, é também modulada pelas fases da membrana.

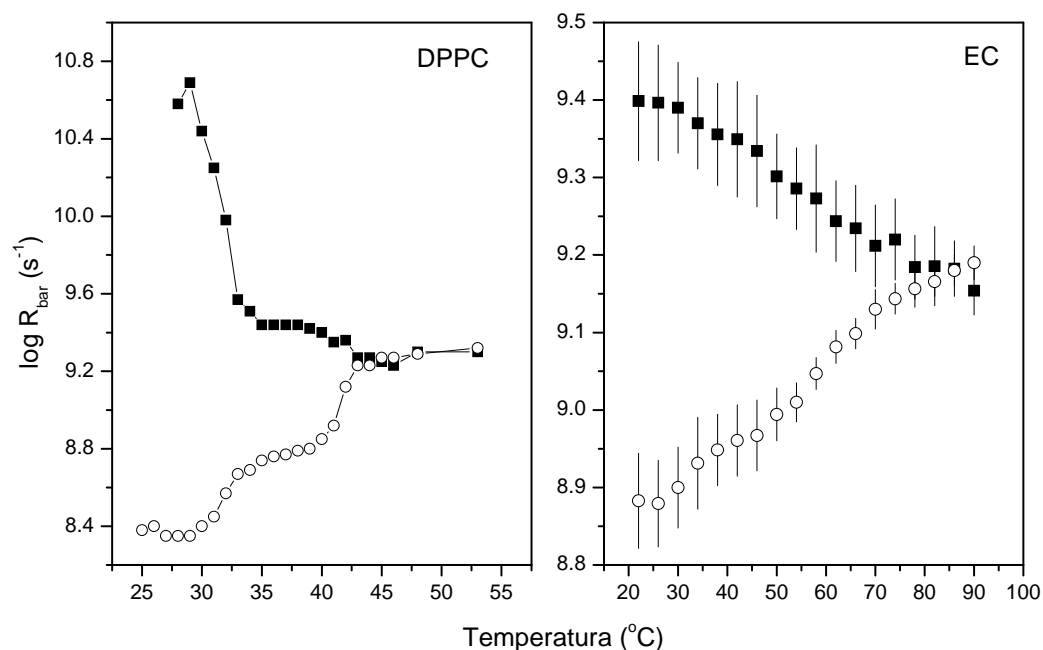


Fig. 5.16: Taxa de difusão rotacional,  $\log R_{\text{bar}}H$  (círculos abertos) e  $\log R_{\text{bar}}P$  (quadrados sólidos), para membranas de DPPC (figura da esquerda) e EC (figura da direita) versus a temperatura.

Para examinar a localização do TEMPO no interior da bicamada e para determinar se os terpenos podem interferir nestas localizações, a constante de acoplamento hiperfino,  $a_0$ , que é dependente da polaridade local do ambiente, foi medida nos dois sistemas estudados na presença e na ausência de terpenos (Tabela 5.3). Medidas do parâmetro  $a_0$  têm sido reportadas para o marcador de spin glicerofosfolípídio com o grupo nitróxido (doxil) na posição  $n$  da cadeia  $sn-2$  ( $n$ -PCSL) em membranas de DPPC, sendo obtidos valores de 15,1 G para  $n = 4$  e 14,5 G para  $n = 16$  [83] que correspondem a um decréscimo de 0,6 G ao longo da cadeia lipídica. Uma vez que o valor de  $a_0$  observado para o TEMPO em DPPC é de 16,0 G (veja Tabela 5.3), o que é um alto valor, tem sido frequentemente deduzido que o maior valor se dá quando a localização do marcador é próxima a interface polar. Porém, a medida do parâmetro  $a_0$  em (+)-limoneno foi de 14,5 G para o marcador de spin 5-DSA e 15,7 G para o marcador TEMPO. Assumindo que esta diferença de 1,2 G entre estes dois marcadores de spin também ocorre em membranas de DPPC, os valores correspondentes esperados para o marcador TEMPO em bicamadas de DPPC seriam em torno de 16,3 G na região central da membrana. Assim, o valor de  $a_0$  observado de 16,0 G para o TEMPO em membranas de DPPC coincide com o valor médio de 15,7-16,3 G, e seria consistente com o nitróxido distribuído através de todo o interior da membrana. Além disso, sendo o marcador TEMPO uma molécula muito pequena e de rápido movimento, teria baixa estabilidade na região dos grupos polares, sendo esperado um deslocamento do mesmo para a região apolar induzido pelo aumento da temperatura ou pela presença dos terpenos, reduzindo assim o valor de  $a_0$ ; porém esta alteração não foi observada.

Tabela 5.3: Constante de desdobramento hiperfino isotrópico do  $^{14}\text{N}$ ,  $a_0$  (Gauss), em 25°C.

Amostras	DPPC*	EC**	Terpeno
Control	16.0***	16.0	-
1,8-Cineole	16.0	16.0	15.6
$\alpha$ -terpineol	16.2	16.1	16.1
DL-menthol	16.2	16.1	16.0
(+)-limonene	16.1	15.9	15.7

Este parâmetro de RPE reflete a polaridade dentro da membrana. Na fase aquosa  $a_0$  foi de 17,0 Gauss.

\* A taxa molar terpeno:DPPC foi de 0,75:1

\*\* 0,5% terpeno

\*\*\* O erro experimental associado a esta medida é 0,1 Gauss

*6.1*

## 6 – DISCUSSÕES

### ***Efeitos do Etanol Sobre os Domínios lipídicos do EC***

As interações dos marcadores de spin com os componentes das membranas, e suas possíveis localizações neste sistema, têm sido pouco exploradas. Trabalhos anteriores evidenciaram a eficiência da técnica de RPE na análise não só de membranas como também do comportamento de moléculas que promovem o aumento da permeabilidade do EC [7,76]. Pôde ser evidenciado também que marcadores de spin derivados de ácidos graxos sofrem partições no interior de domínios lipídicos do EC, conduzindo a duas classes de moléculas: uma classe que realiza pontes de hidrogênio com a superfície polar e outra que não possui interação deste tipo com os lipídios das membranas [76].

A interação entre o etanol e os constituintes da matriz lipídica de membranas biológicas é um assunto que ainda não está bem esclarecido, mas é um tema de grande interesse devido ao papel como facilitador da entrega de fármacos através da pele, e sua baixa toxicidade e tolerância local. Recentemente, através de avaliações de ressonância magnética nuclear e dinâmica molecular tem sido evidenciado que a interação do etanol com as bicamadas de fosfolipídios se dá primariamente via interações hidrofílicas, tais como pontes de hidrogênio, sendo assim ele pode penetrar na região mais superficial da membrana. Por outro lado, a probabilidade de localizar o etanol no centro das bicamadas é três ordens de magnitude menor que localizá-lo na interface lipídio/água [84]. Outro estudo sugere que a partição de alcoóis na região dos grupos polares das bicamadas resulta na redução da tensão interfacial e aumento da permeabilidade da membrana [85].

Medidas de transformada de Fourier de infravermelho (FTIR – do inglês *Fourier Transform Infrared*) em EC humano não detectaram alterações significantes no empacotamento das cadeias lipídicas, mobilidade e ordem conformacional na presença de alcoóis de cadeias pequenas. Além disso, um decréscimo da absorbância das cadeias alquila sugere extração lipídica [86]. Similarmente, usando a técnica de FTIR, uma redução na mobilidade das cadeias alquila dos lipídios do EC na presença de etanol tem sido também observado [87]. Dados de anisotropia de fluorescência sobre a interação de alcoóis de cadeias curtas, n-alcanóis com lipossomas formados com lipídios de EC, mostraram um aumento muito pequeno, ou nenhum, na fluidez das cadeias lipídicas do centro hidrofóbico das bicamadas [88]. Por outro lado, suaves aumentos na fluidez das regiões próximas a interface hidrofóbica/hidrofílica (C2-C9) foram observados. Sendo que não foram detectadas alterações na polaridade das membranas causadas pelo etanol, o que está de acordo com os achados de fluorescência [88].

Esses resultados indicam que o etanol promove efeitos compensatórios nas membranas. O etanol interage primariamente com a matriz lipídica por pontes de hidrogênio, nesta situação a probabilidade de penetração do etanol em direção ao centro hidrofóbico da membrana é extremamente pequena quando em uma taxa molar lipídio/etanol/água de 1:1:10. Essa ligação do álcool a superfície polar da membrana pode romper a microestrutura natural dos lipídios, aumentando a área por cabeça-polar e, conseqüentemente, reduzindo a tensão superficial [85]. Por isso, poderia ser esperado um aumento de fluidez. Além do que, a possível extração do colesterol poderia contribuir para o aumento da dinâmica, uma vez que o colesterol aumenta o empacotamento da bicamada e reduz a fluidez da membrana [89,90]. Entretanto, o etanol promove uma desidratação dos grupos polares das membranas, causada pelo deslocamento local das moléculas de água, favorecendo a formação de pontes de hidrogênio diretas entre os lipídios, efeito este que compensa a extração lipídica.

O etanol tem sido comumente utilizado em sistemas comerciais de entrega transdérmica de fármacos como um potente co-solvente de baixa toxicidade e tolerabilidade local. Além disso, é bem conhecido que o etanol é um moderado aumentador de permeação da pele e tem um sinergismo com outros aceleradores de permeação, tais como os terpenos. Neste estudo nós realizamos cuidadosas medidas explorando a sensibilidade da espectroscopia de RPE com o marcador de spin nitróxido com o intuito de verificar se o etanol promoveria alguma alteração na fluidez dos lipídios de duas regiões distintas, componente 1 e componente 2, das membranas de EC. Conforme mencionado, na seção de resultados, a origem dessas duas componentes pode estar envolvida nos mecanismos de permeação de moléculas através da pele. A componente 1 é atribuída à fração de marcadores de spin que interagem via pontes de hidrogênio com os grupos polares dos lipídios das bicamadas, (estrutura rígida) enquanto que a componente 2 é gerada pelos marcadores que estão interagindo, ou momentaneamente não interagindo, com as moléculas de água por pontes de hidrogênio (estrutura móvel) e mais profundamente inseridas no centro hidrofóbico da membrana. Similarmente, tem sido descrito por uma distribuição bi modal do marcador de fluorescência 4'-dimethylamino-3-hydroxyflavone (marcador F) em bicamadas de fosfolipídios [91], onde duas localizações de marcadores caracterizadas por diferentes polaridades e hidratações foram identificadas e atribuídas a habilidade do marcador em formar interações de hidrogênio. No entanto, nossos dados indicam que o etanol nem altera a dinâmica das membranas de EC de ratos recém nascidos, nem a relativa fração entre as duas componentes espectrais, como deduzido dos parâmetros de RPE de quatros marcadores de spin (dados não mostrados para o 16-DSA). Estes resultados mostram que o etanol age como

um seletivo extrator dos lipídios das membranas de EC e que para altas concentrações de etanol a quantidade de lipídios extraídos pode ser muito alta.

## ***6.2 Mecanismos de Ação do 1,8-cineole e DL-mentol Sobre os Domínios Lipídicos das Membranas de EC e DPPC***

De acordo com a teoria da partição lipídio proteína [44], os aumentadores de permeação podem agir por um ou mais dos três principais mecanismos de ação: rompimento da estrutura lipídica altamente ordenada, interação celular com a proteína para promover permeação através do corneócito, e extraíndo ou aumentando a fluidez das lamelas lipídicas intercelulares. De fato, tanto o L-mentol quanto o 1,8-cineole devido a suas características lipofílicas, possuem uma enorme facilidade de incorporarem nas membranas de EC e de DPPC, afetando drasticamente suas organizações lipídicas e, conseqüentemente, suas organizações dinâmicas.

A atividade dos terpenos, como aumentadores de permeação de fármacos, está em primeiro lugar relacionada com as suas características moleculares, bem como com as propriedades físico-químicas das drogas. Por outro lado, um aumentador de permeação ideal para pele, é efetivamente não irritante e possui um efeito reversível no tecido cutâneo [92]. Administrar quantidades elevadas de terpeno no EC pode por um lado promover um substancial aumento da permeação da pele como também reter uma considerável quantidade deste aumentador no tecido, o que comprometeria o potencial de reversibilidade [93]. Nossos resultados mostraram que o efeito, tanto do 1,8-cineole quanto do DL-mentol, inicia-se para concentrações em torno de 0,75% no EC e em taxas moleculares de terpeno:DPPC de (0,5:1). Considerando que o EC contenha aproximadamente 20% de lipídios (peso seco), e que o peso médio molecular dos lipídios do EC é cerca de 600 g, nós podemos obter a taxa molecular de 1,8-cineole/DL-mentol:lipídios de EC de (3:1) correspondente a 1% de terpeno no EC (v/v, 50 µL de solvente para 3 mg de EC). Em termos moleculares, estes dados indicam que a concentração mínima necessária para induzir alterações na fluidez do EC é seis vezes maior que para DPPC, sugerindo que os terpenos estudados não interagem apenas com os domínios lipídicos do EC, mas também com os sítios protéicos.

Estudos de ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared*, usando membranas modelo compostas por lipídios de EC, tem indicado que a presença de 1,8-cineole e DL-mentol reduzem as frequências de alongamento do grupo amida I não ligado por pontes de hidrogênio, sugerindo que os terpenos agem principalmente nas

cabeças polares dos lipídios das membranas rompendo as interações de hidrogênio intra e intermolecular entre as bicamadas [46]. Por outro lado, dados de DSC (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) têm revelado um decréscimo nas temperaturas de transição dos lipídios de EC induzidas pelo tratamento com terpenos [94]. Estes achados estão em concordância com nossos dados de RPE que mostram um gradual aumento na dinâmica molecular das membranas com o aumento da concentração de cineole e de mentol. Resultados similares de RPE para membranas de EC e de DPPC sugerem que o efeito dos terpenos está relacionado a uma propriedade geral das membranas e não a fases específicas.

As análises de marcadores de spin por espectroscopia de RPE podem fornecer informações complementares acerca dos efeitos dos terpenos nas membranas de EC. O aumento da concentração de 1,8-cineole e de DL-mentol no solvente contendo 20% de etanol, proporciona uma substancial elevação da fluidez das membranas, ao mesmo passo em que se nota uma migração dos marcadores de spin da componente 1 para componente 2. O programa de ajuste NLLS permite uma análise mais detalhada dos espectros de RPE. Na ausência de terpeno, o tempo de difusão rotacional se deve essencialmente a contribuição dos marcadores de spin da componente 1, que são mantidas em 50-60 ns para o 5-DSA e ASL. Com a adição de DL-mentol ou de cineole, os marcadores de spin são transferidos desta componente de mobilidade mais restrita para a componente mais móvel, componente 2, com tempo de difusão rotacional de ~20 ns para o 5-DSA e ~13 ns para o ASL com 1% de terpeno, e alterando, respectivamente, para ~17 e ~10 ns com 5%. O desaparecimento da componente mais restrita (componente 1) do marcador de spin 5-DSA em estrato córneo de porco aconteceu na presença de 1% de DL-mentol em combinação com 15% de etanol [95]. Neste trabalho, o marcador de spin ASL foi escolhido principalmente devido a seu espectro em temperatura ambiente, que apresenta duas componentes espectrais bem resolvidas no EC à temperatura ambiente, o que nos permite monitorar pequenas variações na fração relativa destas duas componentes. Mesmo para o marcador 5-DSA, o qual possui uma forte tendência a formar a componente 1, o cineole foi capaz de promover a formação da componente 2 (Fig. 5.4). Para membranas de DPPC, o marcador de spin 5-DMS foi utilizado, levando em conta sua tendência de formar as duas componentes a uma temperatura de 30 °C. As análises espectrais realizadas neste estudo revelaram efeitos similares do cineole e do mentol tanto nas membranas de EC quanto nas de DPPC, sugerindo que a relação hipotética entre os efeitos dos terpenos nas fases das membranas requer uma investigação mais criteriosa.

Essencialmente, os resultados mostraram que ocorre, na presença dos terpenos, uma passagem dos marcadores de spin de uma componente espectral mais restrita para uma menos

restrita. Provavelmente, uma apreciável fração de 1,8-cineole e de DL-mentol se estabiliza nas regiões centrais das bicamadas aumentando a mobilidade e o volume lipídico das membranas. Este processo introduz grupos polares, do mentol e do cineole, no interior da membrana, e, deste modo atrai os lipídios pouco estruturados nas bicamadas para o centro da membrana (grande fração da componente 2), o que acarreta em um aumento da polaridade do ambiente interno da membrana. A ruptura de interações de hidrogênio na superfície polar entre os lipídios da membrana está relacionada ao deslocamento destes lipídios para o centro hidrofóbico, podendo conduzir a uma perda de integridade da função de barreira do EC, facilitando a partição e, conseqüentemente, a permeação de moléculas polares tais como o AZT.

### ***6.3 Influências dos Terpenos na Dinâmica das Proteínas do EC***

O potencial de irritação dos aumentadores de permeação tem sido correlacionado com capacidade destes de realizarem pontes de hidrogênio com as proteínas. A competitividade dos aumentadores de permeação pelas pontes de hidrogênio com as cadeias das proteínas podem potencialmente alterar as interações de hidrogênio nativas destas podendo conduzi-las à mudanças conformacionais e até mesmo desnaturação, sugerindo que o aumento de mobilidade associado a estas mudanças pode ser usado como um indicativo de irritação *in vitro*, o qual está relacionada com os riscos que um dado aumentador de permeação pode oferecer [43]. Trabalhos recentes [96,97] mostraram que o espectro de RPE do marcador de spin protéico 6-MSL (Fig. 4.2) é altamente sensível à variação de temperatura e mudanças na conformação das proteínas induzidas por urea [96] ou hidratação [97]. Aqui, os resultados mostraram que o 1,8-cineole não promove qualquer alteração na dinâmica das proteínas do EC e apenas aumenta a mobilidade das cadeias laterais do nitróxido, indicando que o 1,8-cineole não é capaz de induzir alterações conformacionais nos domínios protéicos do EC, resultado este que está consistente com o baixo potencial de irritação do terpeno. De fato, muitos terpenos, incluindo 1,8-cineole, DL-mentol,  $\alpha$ -terpineol e mentone, são descritos como GRAS (sigla em inglês utilizada para materiais geralmente reconhecidos como seguros). Mentol e o cineole, por exemplo, têm sido incluídos no grupo de terpenos que não produzem, ou produzem muito pouca, irritação através de estudos de citotoxicidade em cultura de células da pele humana [98].

#### ***6.4 Os Terpenos Aumentam a Partição e a Dinâmica Molecular do Marcador de Spin TEMPO nas Membranas de EC***

A composição do EC não é incomum e sua organização é totalmente complexa. Em EC humano, nove subclasses de ceramidas têm sido identificadas [99], junto com uma longa cadeia de ácidos graxos livres, colesterol e sulfato de colesterol, organizado em fases lamelares cristalinas. Estudos com difração de raios-X em baixo ângulo em EC humano, de rato e de porco tem mostrado que elas têm duas fases lamelares lipídicas com distâncias repetidas de ~6 e 13 nm, as quais desaparecem entre 60 e 75°C [32,99,100]. Tem sido mostrado por Difração de raios-X de alto ângulo [100,101] e difração de elétrons [102] que o empacotamento lateral dos lipídios é do tipo ortorrômbico em temperatura ambiente, com uma transição para uma sub-rede hexagonal ocorrendo entre 30 e 40°C [102,99]. A estrutura hexagonal desaparece entre 75 e 95°C [100,101], com uma provável mudança para uma fase líquida cristalina.

Espectroscopia de transformada de Fourier de infravermelho (FTIR) tem sido usada para investigar o comportamento termotrópico das fases de EC de porco e de seus lipídios extraídos [103] e em membranas modelo de EC formadas por misturas lipídicas [46]. Para EC de porco, um aumento mais pronunciado de  $\nu_{\text{CH}_2}$  tem sido reportado por difração de raios-X em um intervalo de temperatura de 60-80°C, o qual está associado com o desaparecimento da estrutura lamelar e a uma provável transição de fase de empacotamento líquido hexagonal.

Comparando a resposta termotrópica de membranas de DPPC e EC nas Figs. 5.13 e 5.14, nós podemos ver várias diferenças notáveis. DPPC é caracterizada por um abrupto aumento no coeficiente de partição e na taxa de difusão rotacional seguido por duas transições de fase em 34 e 42°C, enquanto que nas membranas de EC houve um moderado aumento nestes dois parâmetros de RPE, mesmo no intervalo de temperatura de ~54-70°C onde ocorre sua principal transição de fase, como caracterizado por difração de raios-X e espectroscopia de FTIR [103].

Análises baseadas em dados de calorimetria e fluorescência de vesículas unilamelar e multilamelares de DPPC [104] revelaram que os processos de transições assemelham-se muito a transições de fase de primeira ordem. Em concordância, Nielson et al. usando simulação computacional (Monte Carlo) obteve resultados consistentes com uma transição de fase de primeira ordem para modelos de lipídios puros e misturas de lipídio-colesterol [105]. Em resumo, Sukut e co autores mostraram que os mecanismos para a transição de fase de uma fase gel para uma fase líquido-ordenada, para membranas de DPPC e DPPE, envolvem

alterações cooperativas nas estruturas das bicamadas que podem ser quantificadas pelas medidas da área por lipídio, espessura da bicamada, ondulações e parâmetros de ordenamento das cadeias lipídicas e nível de interdigitação. A implicação de todas as alterações estruturais observadas fornece suporte a uma transição de fase de primeira ordem para DPPC e DPPE [106]. Por outro lado, as bicamadas em geral apresentam grandes histereses na área por lipídio e espessura das bicamadas nos ciclos de aquecimento e resfriamento, condições estas que são extremamente adversas, dificultando a identificação das transições de fase. Metso et al. [107] forneceram extensivas análises de dados de DSC e de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo para determinar a natureza da transição de fase de lipossomas unilamelares de DPPC, seus achados indicaram que uma súbita mudança na intensidade de fluorescência na transição de fase das bicamadas, resultados que estão em acordo tanto com uma transição de primeira ordem quanto com uma de segunda ordem [107]. Monitorar estas transições se torna algo quase inviável quando se trata de sistemas de membranas mais complexos, tais como o EC. Assim, fica difícil fazer inferências precisas com relação ao grau destas transições.

No intervalo de temperatura entre as transições de fase em EC ( $\sim 54\text{-}70^\circ\text{C}$ ), os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  são comparáveis aos observados para estruturas do tipo  $P_\beta$  em bicamadas de DPPC. Além disso, as energias de ativação associadas com o movimento rotacional foram consideravelmente grandes para DPPC (Tabela 5.2). Enquanto que o parâmetro de movimento rotacional do marcador,  $\log R_{bar}$ , variou de  $\sim 8,4$  a  $9,3 \text{ s}^{-1}$  para DPPC no intervalo de temperatura de cerca de  $20^\circ\text{C}$  ( $\sim 30\text{-}50^\circ\text{C}$ ), uma menor variação de  $\sim 8,9\text{-}9,2 \text{ s}^{-1}$  foi observada para membranas de EC em uma ampla variação de temperatura ( $22\text{-}90^\circ\text{C}$ ), denotando que a reorganização da membrana, induzida pela temperatura, é muito maior em DPPC que nas membranas de EC. É bem conhecido que bicamadas de fosfolípidios podem exibir grandes aumentos na permeabilidade de pequenas moléculas solúveis em água nas regiões de coexistência de duas fases gel-liquida cristalina [108,109], onde duas fases coexistem em equilíbrio. O mecanismo sugere que esta alta permeabilidade ocorre devido às flutuações de densidade das regiões de contorno onde as duas fases coexistem [108], as quais aumentam a probabilidade da formação de defeitos ou buracos transientes que elevam a permeabilidade das bicamadas para seu valor máximo na  $T_m$  [108]. Neste contexto, a probabilidade esperada para formar defeitos nas membranas EC deveria ser baixa tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, o qual indica sua alta estabilidade, refletida nas mudanças suaves dos parâmetros medidos ao longo de toda a faixa de temperaturas.

Medidas da permeabilidade em EC de porco têm revelado que a energia de ativação para o fluxo de água é  $17,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  sobre um intervalo de temperatura de  $22\text{-}70^\circ\text{C}$  e  $5,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$  acima de  $70^\circ\text{C}$ , indicando que a função de barreira do EC é reduzida apenas em altas temperaturas [110]. Experimentos de RPE mostraram que os terpenos, na razão de 0,75:1 para terpeno:DPPC, agem de forma a aumentar tanto a partição quanto o movimento rotacional dos marcadores de spin, exceto para temperaturas acima de  $42^\circ\text{C}$ . Na presença dos terpenos, a transição de DPPC em  $\sim 42^\circ\text{C}$  torna-se menos pronunciada e é abaixada para cerca de  $33^\circ\text{C}$ , enquanto que a transição em  $\sim 34^\circ\text{C}$  não ocorre dentro do intervalo de temperatura medido (Figs. 5.14 e 5.15). Os terpenos agem principalmente na fase gel, a qual parece ter sido transformada em uma estrutura do tipo  $P_\beta$ . Os gráficos das Figs. 5.14 e 5.15 não mostram estas transformações muito claramente, uma vez que os terpenos alteraram a principal transição de fase do EC ( $\sim 60^\circ\text{C}$ ). Como a curva do coeficiente de partição do 1,8-cineole teve um comportamento similar ao da curva do controle, nós podemos deduzir que esta temperatura de transição foi reduzida para cerca de  $45^\circ\text{C}$ . Experimentos de DSC têm identificado quatro transições de fase em EC de rato neonatal (mesmo tipo de EC utilizado neste trabalho), em torno de  $42^\circ\text{C}$  ( $T_1$ ),  $55^\circ\text{C}$  ( $T_x$ ),  $70^\circ\text{C}$  ( $T_2$ ) e  $78^\circ\text{C}$  ( $T_3$ ), que foram atribuídas à fusão dos lipídios [111]. A maioria das transições de fase em EC humano ocorre por volta de  $72^\circ\text{C}$  ( $T_2$ ) e  $83^\circ\text{C}$  ( $T_3$ ), e tem sido relatado que os terpenos D-limoneno e 1,8-cineole reduzem estas duas temperaturas de transição em cerca de  $20^\circ\text{C}$  [36].

Nesta parte do trabalho, nós estudamos diferentes terpenos com o intuito de avaliar o comportamento das membranas de EC sob efeito de diferentes aumentadores de permeação. A fim de comparar o potencial de modificações entre estes diferentes tipos. Nós estudamos dois terpenos contendo grupos doadores de pontes de hidrogênio (os álcoois DL-mentol e  $\alpha$ -terpineol), um com um grupo aceitador de pontes de hidrogênio (o éter 1,8-cineole) e um que não interage por ligações de hidrogênio (o hidrocarboneto (+)-limoneno). Os parâmetros medidos aqui mostraram resultados similares para os quatro terpenos, e uma discrepância foi observada para o parâmetro de movimento rotacional do DL-mentol e  $\alpha$ -terpineol no EC, que mostraram uma pronunciada redução deste parâmetro para temperaturas abaixo de seus pontos de fusão. Embora os terpenos possam, em princípio, enfraquecer as interações de hidrogênio na interface membrana-água, estes resultados sugerem que o efeito dos terpenos na membrana não necessariamente depende da direta competição destas moléculas como os grupos polares das membranas pelas pontes de hidrogênio.

O coeficiente de partição do marcador tempo entre as fases aquosa e hidrocarbônica, bem como seu parâmetro de movimento rotacional refletiu as transições de fase das membranas de EC, o que está em acordo com dados obtidos por outras técnicas, tais como difração de raios-X e FTIR. Na presença de 0,4% de terpenos, tanto a partição quanto a dinâmica das bicamadas aumentaram. A interação dos terpenos com as bicamadas de fosfolípidios foi similar a interação nas membranas de EC em vários aspectos e indicaram que a ação dos terpenos atinge fortemente a ordenação lipídica. Estes resultados sugerem que os efeitos dos terpenos não dependem das características específicas das membranas de EC e que as principais características que faz com que os terpenos afetem as membranas são suas habilidades para penetrar nas bicamadas, devido à característica altamente hidrofóbica e seu baixo peso molecular dos terpenos, cerca de 150 g, eles podem se distribuir através das bicamadas, especialmente em altas concentrações. Na escala de movimento rápido, estas moléculas, agem efetivamente como moléculas espaçadoras, desestabilizando o empacotamento das cadeias lipídicas, e enfraquecendo a rede de ligações de hidrogênio na interface polar. Este processo pode facilitar a partição de pequenas moléculas polares e, portanto, sua permeação através das membranas.

1.

## 7 – CONCLUSÕES

Os espectros de RPE dos marcadores lipídicos são caracterizados pela coexistência de duas componentes espectrais indicando que há duas populações de marcadores no interior da membrana diferindo em mobilidade. Usando o programa de simulação, NLLS, foi possível analisar em separado estas duas componentes, determinando as populações relativas entre elas, a dinâmica molecular e o perfil termodinâmico, isto é, a mudança na energia livre padrão de Gibbs, entalpia e entropia associadas à transferência do marcador de uma componente para a outra.

2. Como deduzido dos parâmetros de RPE de quatro marcadores de spin lipídicos (5-DSA, 16-DAS, 5-DMS e ASL) o etanol não alterou a dinâmica molecular das membranas de EC, nem as frações relativas entre as duas componentes espectrais. Ao passo que o etanol agiu como um extrator seletivo dos lipídios do EC, aumentando a quantidade de marcadores livres no solvente. A capacidade de extração foi dependente do tipo de marcador lipídico, sendo baixa para o marcador mais hidrofóbico 5-DMS.
3. A adição de 1% (v/v) de terpeno no tampão contendo 20% de etanol promove um aumento na fluidez das membranas do EC e uma migração dos marcadores de spin da componente 1 mais restrita para a componente 2 mais móvel. Em concentrações mais altas como 5% a maioria dos marcadores são transferidos para a região hidrofóbica.
4. Análises comparativas com membranas de DPPC mostraram que uma razão molecular mínima, de cerca de 0,5:1 de 1,8-cineole:DPPC, é necessária para que haja alterações significativas nos marcadores de spin que possam ser detectadas pela espectroscopia de RPE e que para uma razão molar de 0,75:1, o terpeno atua aumentando tanto a partição quanto o movimento rotacional dos marcadores de spin. Indicando que os terpenos afetam membranas em geral.
5. Como deduzido dos valores do parâmetro  $R_{\text{bar}1}$ , do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente às proteínas do EC, o 1,8-cineole não foi capaz de promover alterações significativas na dinâmica das proteínas do EC quando estas foram tratadas com até 5% de terpeno, mostrando apenas um aumento da fração e da mobilidade da cadeia lateral do nitróxido livre no solvente. Indicando que, em concordância com seu baixo potencial de irritação, este terpeno é incapaz de induzir mudanças conformacionais nas proteínas do EC,
6. Através do método de simulação foram determinadas as taxas de difusão rotacional,  $R_{\text{bar}}$ , das componentes H e P do marcador de spin TEMPO, bem como as populações relativas destas duas componentes. Os parâmetros de partição e de movimento retrataram fielmente as transições de fase já conhecidas das membranas de

DPPC, enquanto as membranas de EC foram caracterizadas por suaves variações em todo o intervalo de temperaturas medido (26 a 82°C), com um coeficiente de inclinação mais alto entre ~55 e ~72°C.

7. O perfil termodinâmico do marcador TEMPO associado à sua partição na membrana foi também determinado. As mudanças na entalpia e na entropia,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , foram bem menos pronunciadas para as amostras de EC em comparação com as de DPPC, indicando que as reorganizações da membrana termicamente induzidas são bem mais suaves para o EC. Na faixa de temperatura de ~54 a 70°C o EC foi caracterizado por maiores mudanças de entalpia.
8. As análises dos parâmetros de RPE mostraram resultados similares para membranas tratadas com os quatro terpenos estudados. Como os estudos envolveram dois terpenos contendo grupos doadores de ligações de hidrogênio (os álcoois DL-mentol e  $\alpha$ -terpineol), um com um grupo aceitador de ligações de hidrogênio (o éter 1,8-cineole) e um que não interage por ligações de hidrogênio (o hidrocarboneto (+)-limoneno), os resultados indicam que, embora os terpenos possam enfraquecer as interações de hidrogênio na interface membrana-água, o efeito dos terpenos na membrana não necessariamente depende da direta competição destas moléculas como os grupos polares das membranas pelas ligações de hidrogênio.
9. Em regime de movimento rápido, os monoterpênos agem efetivamente como espaçadores dos lipídios da membrana, reduzindo o empacotamento das cadeias lipídicas, e enfraquecendo a rede de ligações de hidrogênio na interface polar. Isso tudo gera aumento de fluidez da membrana e deslocamento dos lipídios para o interior da membrana, introduzindo seus grupos polares no core hidrofóbico que pode facilitar a partição e, conseqüentemente, a permeação de pequenas moléculas polares como o AZT.

[1]

## 8 - REFERÊNCIAS

- [1] **KALIA, Y.N., GUY, R.H.** Modeling transdermal drug release. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 159–172, 2001.
- [2] **R.J. SCHEUPLEIN, I.H. BLANK,** Permeability of the skin, *Physiol. Rev.* 51 702-747, 1971.
- [3] **P.M. ELIAS, D.S. FRIEND,** The permeability barrier in mammalian epiderms, *J. Cell Biol.* 65 180-191, 1975.
- [4] **KARANDE, P., JAIN, A., MITRAGOTRI, S.** Discovery of transdermal penetration enhancers by high- throughput screening. *Nature Biotech.*, New York, v.22, p.192-197, 2004.
- [5] **BLUM, M. R.; LIAO, S. H. T.; GOOD, MIRANDA S. S. P.:** Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. *Am. J. Med.* 85: 189–194, 1988.
- [6] **NARISHETTY, S. T. K.; PANCHAGNULA, R.:** Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. *J. Control. Release.* 95; 367– 379. 2004.
- [7] **COUTO, S.G., OLIVEIRA, M.S., ALONSO, A.** Dynamics of proteins and lipids in the stratum corneum: Effects of percutaneous permeation enhancers. *Biophys. Chem.* 116, 23-31, 2005.
- [8] **MOORE L., CHIEN Y.W.** Transdermal drug delivery: A review of pharmaceuticals, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 4, 285-349, 1988.
- [9] **FITZPATRICK J. E.; AILING, J. L.** *Segredos em dermatologia*, 5ª edição, Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 2000.
- [10] **ALBERT, R.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D. J.** *Biologia Molecular da Célula*, 3ª edição, Porto Alegre: Ed. Artes Médicas Sul Ltda, p. 1139-1184, 1997.
- [11] **ECKERT R.L.** Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* 69, 1316-1346, 1989.
- [12] **MENON, G.K.** New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Amsterdam, v.54, p.S3-S-17, 2002.
- [13] **MATOLTSY, A. G.; MATOLTSY, M. N.:** The chemical nature of the keratohyalin granules of the epidermis. *J. Cell. Biol.* 47: 593 – 603, 1970.
- [14] **STEVEN, A. C.; STEINERT, P. M.:** Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell. Sci.* 107: 693 – 700, 1994.
- [15] **STEINERT, P. M.; MAREKOV, L. N.:** Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous ephelia. *Mol. Biol. Cell.* 10: 4247-4261, 1999.
- [16] **MACHELEIDT O., KAISER H.W., SANDHOFF K.** Deficiency of epidermal protein-bound omegahydroxyceramides in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 119 166-173, 2002.
- [17] **ELIAS P.M.** Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80, 44-49, 1983.
- [18] **CLIVE R. HARDING:** The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologyc Therapy.*17, 6-15, 2004.
- [19] **FLYNN GL.** *Physiochemical determinants of skin absorption.* Principles of Route-to Route Extrapolation for Risk Assessment. Gerrity, TR., Henry, CJ. (Eds.). Elsevier, New York, p. 93-127, 1990.
- [20] **SWARTZENDRUBER D.C., WERTZ P.W., MADISON K.C., DOWNING D.T.** Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J. Invest. Dermatol.* 88, p. 709-713, 1987.
- [21] **WERTZ P.W., MADISON K.C., DOWNING D.T.** Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 92, 109-111, 1989.

- [22] **WERTZ P.W., DOWNING D.T.** Stratum corneum: biological and biochemical considerations. In: Hadgraft J., Guy R.H. Transdermal drug delivery: developmental issues and research initiatives. Marcel Dekker Inc., New York, 1-22, 1989.
- [23] **ELIAS P.M., M.E. LEVENTHAL,** Intercellular volume changes and cell surface area expansion during cornification, *Clin. Res.* 27, 525A, 1979.
- [24] **SUHONEN, M. T.; BOWSTRA, J. A.; URTTI, A.:** Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum alterations. *J. Control. Release.* 36:149 – 161, 1999.
- [25] **RAWLINGS AV, WATKINSON A, ROGERS J, MAYO A, HOPE J, SCOTT IA.** Abnormalities in Stratum corneum structure, lipid composition, and desmosome degradation in soap-induced winter xerosis. *J Soc Cosmet. Chem.*; 45:203-20, 1994.
- [26] **PONEC, M.:** Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Adv. Drug Delivery Reviews* 54: 19 - 30. 2002.
- [27] **JAGER, M. W.; GOORIS G. S.; DOLBANYA, I. P.; PONEC, M.; BOUWSTRA, J. A.:** Modelling the stratum corneum lipid organisation with synthetic lipid mixtures: the importance of synthetic ceramide composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1684: 132 -140, 2004.
- [28] **J. A. BOWSTRA, NGUYEN, P. L. H.:** Skin structure and mode of action vesicles. *Ad. Drug Delivery Rev.* 54: 41-55, 2002.
- [29] **HILL, J. R.; WERTZ, P.W.:** Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1616:121 -126, 2003.
- [30] **SWARTZENDRUBER, D. C.:** Studies of epidermal lipids using electron microscopy. *Semin. Dermatol.* (11): 157 -161, 1992.
- [31] **SWARTZENDRUBER, D. C.; MADISON, K. C.; KREMER, M.; Wertz, P. W.; SQUIER, C. A.:** Organization of the intercellular spaces of porcine epidermal and palatal stratum corneum: a quantitative study employing ruthenium tetroxide. *Cell. Tissue Res.* 279: 271 – 276, 1995.
- [32] **J.A. BOUWSTRA, G.S. GOORIS, J.A. VAN DER SPEK, W. BRAS,** Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering, *J. Invest. Dermatol.* 97, 1005–1012, 1991.
- [33] **J.A. BOUWSTRA, G.S. GOORIS, J.A. VAN DER SPEK, S. LAVRIJSEN, W. BRAS,** The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: A wide and small angle diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 183–192, 1994.
- [34] **JAGER, M. W.; GOORIS, G. S.; DOLBANYA, I. P.; BRAS W.; PONEC, M.; BOUWSTRA, J. A.:** Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization, *J. Lipid Res.* 45: 923 – 932, 2004.
- [35] **BOUWSTRA J.A., GOORIS G.S., DUBBELAAR F.E.R., PONEC M.** 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.
- [36] **P.A. CORNWELL, B.W. BARRY, C.P. STODDART, J.A. BOUWSTRA,** Wide-angle X-ray diffraction of human stratum corneum: effects of hydration and terpene enhancer treatment, *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 938–950, 1994.
- [37] **W.J. ALBERY, J. HADGRAFT,** Percutaneous absorption: in vivo diffraction, *J. Invest. Dermatol.* 96, 43–49, 1991.
- [38] **R.O. POTTS, R.H. GUY,** Predicting skin permeability, *Pharm. van der Spek, W. Bras,* Structure of human stratum corneum *Res.* 9, 663–669, 1992.
- [39] **H. BODDE, M. KRUIHOF, J. BRUSSEE, H. KOERTEN,** Visualisation of normal and enhanced HgCl transport through human skin in vitro, *Int. J. Pharm.* 253, 13–24, 1989.

- [40] **C.Y. GOATES, K. KNUTSON**, Enhanced permeation and stratum structural alterations in the presence of dithiothreitol *Biochim. Biophys. Acta* 1153, 289–298, 1993.
- [41] **K. KNUTSON, R.O. POTTS, D.B. GUZEK, G.M. GOLDEN, J.E.** Macro- and molecular physical–chemical considerations in understanding drug transport in the stratum corneum, *J. Control. Rel.* 2, 67–87, 1985.
- [42] **BARRY**, Reprinted from Journal of Controlled Release, 6, Mode of action of penetration enhancers in human skin, 85– 97, Copyright 1987.
- [43] **KARANDE P., JAIN A., ERGUN K., KISPERSKY V., MITRAGOTRI S.** Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery *PNAS* 102, 4688-4693, 2005.
- [44] **WILLIAMS, A.C., BARRY, B.W.**, Penetration enhancers, *Adv. Drug Delivery Reviews*. Vol. 56, No. 5, 603-618, 2004.
- [45] **L. KANG, A. L. POH, S. K. FAN, P. C. HO, Y. W. CHAN, S. Y. CHAN** -Reversible effects of permeation enhancers on human skin – *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 149-155, 2006.
- [46] **NARISHETTY S.T.K., R. PANCHAGNULA**, Effect of l-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine, *J. Control. Release* 102, 59–70, 2005.
- [47] **MOHAMMED AQIL, ABDUL AHAD, YASMIN SULTANA AND ASGAR ALI**, Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug discovery today*, xx-xx, 2007.
- [48] **FEMENIA-FONTA, A. ET AL.** Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61, 50–55, 2005.
- [49] **WILLIAMS, A.C. ET AL.** Molecular interaction between the penetration enhancer 1,8-cineole and human skin. *J. Raman Spectrosc.* 37, 361–366, 2006.
- [50] **AMNUAIKITA, C. ET AL.** Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. *Int. J. Pharm.* 289, 167–178, 2005.
- [51] **AMIT KUMAR J., NARISHETTY S. T. AND R. PANCHAGNULA.** Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride.: I. Effect of terpenes *Journal of Controlled Release*, Volume 79, Issues 1-3, 93-10, 2002.
- [52] **H. K. VADDI, P. C. HO, Y. W. CHAN AND S. Y. CHAN.** Terpenes in ethanol: haloperidol permeation and partition through human skin and stratum corneum changes; *Journal of Controlled Release*, Volume 81, Issues 1-2, 121-133, 2002.
- [53] **SWARTZ, H. M.; BOLTON, J. R.; BORG, D. C.:** Biological Applications of Electron Spin Resonance 1ª edição, New York: Ed. Wiley, 1972.
- [54] **COMMONERB, TOWNSENDJ, PAKE, G . E.,** *Nature, Lond.*, 174, 689, 1954.
- [55] **J. R. MALLARD, F.INST.P., M.I.E.E. AND M. KENT,** *Review Article* Electron Spin Resonance in Biological Tissues, *Phys. Med. Biol.*, Vol. 14, n. 3, 373-396, 1969.
- [56] **XIYING LI:** Few Electron Paramagnetic Resonances Detection Techniques On The Ruby Surface. Tese (PhD em Engenharia). Department of Electrical Engineering and Computer Science - Case Western Reserve University, Ohio, 2005.
- [57] **VIEIRA, I. F.; MALNIC, G.:** Biofísica 1º edição, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1981.
- [58] **WERTZ, J. E; BOLTON, J. E.:** Electron spin resonance Elementary theory and Practical Applications, 1ª edição, New York: Editora McGraw-Hill Book Company, 1972.
- [59] **ABRAGAM, A.; BLEANEY, B.:** Electron Paramagnetic resonance of Transition ions 1ª edição, New York: Editora Dover publications Inc., 1986.
- [60] **ATHERTON, N.M.:** Electron spin resonance – Theory and Applications, New York: John Wiley & Sons, 1973.

- [61] **SKOOG, HOLLER, NIEMAN**, Princípios de Análise Instrumental – 5ª Ed.–Bookman, 400-408, 2002.
- [62] **ARAÚJO, M. B.**: Paramagnetismo e Relaxação spin-rede em complexos de níquel com cianetos em rede de NaCl. Tese (Doutorado em Física). Instituto de Física - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- [63] **VICTOR M. S. GIL, FUND. CALOUSTE**, Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos Métodos e Aplicações, 2002, pg. 50-51,
- [64] **ATTKINS, P. W.**: Físico química vol. 2, 6ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 1997.
- [65] **ALONSO, A.** Estudo por RPE de um radical nítróximo em monocristal: interação com prótons e relaxação eletrônica.: Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1982.
- [66] **ROSANTEV, E. G.; SHOLLE, V. D.**: Syntesis and reactions of stable nitroxyl radicals. *Syntesis*, 190 e 401, 1981.
- [67] **O GRIFFITH, D. CORNELL, AND H. MACCONNELL**, *J. Chem. Phys.*, 43, 2909, 1965.
- [68] **R. BRIERE, H. LEMAIRE, AND A. RASSAT**, *Bull. Soc. Chim. France*, 11, 3273, 1965.
- [69] **KHALED KHAIRY, DAVID BUDIL, PIOTR FAJER**, Nonlinear-least-squares analysis of slow motional regime EPR spectra; *Journal of Magnetic Resonance* 183, 152–159, 2006.
- [70] **J. STRANCAR, M. SENTJURC, AND M. SCHARA**, Fast and Accurate Characterization of Biological Membranes by EPR Spectral Simulations of Nitróxides.; *J. of Magn. Resonance* 142, 254-265, 2000.
- [71] **BUDIL, D.E.; LEE, SANGHYUK.; SAXENA, S.; FREED, J. H.**; *J. Magn. Reson. A*, 155-189, 1996.
- [72] **ALONSO, A.; MEIRELES, N.C.; TABAK, M.** Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. *Chem.And Phys. Lipids* 104, 101-111, 2000.
- [73] **SCHNAIDER, TAYLOR BRANDÃO, SOUZA, CLÁUDIO D.E.** Ethics and animal experiments. , *Rev. Bras. Anestesiol.* , vol.53, n.2, ISSN 0034-70942, 2003.
- [74] **FUNG, L.W.M., JOHNSON, M.E.**, Recent developments in spin label EPR methodology for biomembranes studies. In: Lee, P. (Ed), Currents Topics in Bionergetics. Academic Press, New York, 107-157, 1984.
- [75] **D.J. SCHNEIDER, J.H. FREED**, Spin Labeling: Teory and application, in: L.J. Berliner, J. Reuben (Eds.), *Biological magnetic Resonance*. New York, Plenum Press, vol. 8, 1-76, 1989.
- [76] **W. P. QUEIROS, DIÓGINES S.N., A. ALONSO**. Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum. *J. Controlled Release*. 106, 374 – 385, 2005.
- [77] **A. SMIRNOV, T. SMIRNOVA, P.D. MORSE**, Very high frequency Electron Paramagnetic Resonance of 2,2,6,6-Tetramethyl-1-Piperidinyloxy in 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine liposomes: Partitioning and molecular dynamics, *Biophysical J.* 68, 2350-2360, 1995.
- [78] **E.J. SHIMSHICK, H.M. MCCONNELL**, Lateral phase separation in phospholipid membranes, *Biochemistry* 12, 2351-2360, 1973.
- [79] **D.-C. WANG, T.F. TARASCHI, E. RUBIN, N. JANES**, Configuration entropy is the driving force of ethanol action on membrane architecture, *Biochim. Biophys. Acta* 1145, 141- 148, 1993.

- [80] **A. FINKELSTEIN**, Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes, *J. General Physiology* 68, 127-135, 1976.
- [81] **J.A. ROGERS, A. WONG**, The temperature dependence and thermodynamics of partitioning of phenols in the n-octanol-water system, *Int. J. Pharm.* 6, 339-348, 1980.
- [82] **Y.-Z. DA, K. ITO, H. FUJIWARA**, Energy aspects of oil/water partition leading to the novel hydrophobic parameters for the analysis of quantitative structureactivity relationships, *J. Med. Chem.* 35, 3382-3387, 1992.
- [83] **D. KURAD, G. JESCHKE, D. MARSH**, Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR. *Biophys. J.* 85, 1025-1033, 2003.
- [84] **S.E. FELLER, C.A. BROWN, D.T. NIZZA, K. GAWRISCH**, Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy cross-relaxation rates and ethanol distribution across membranes, *Biophys. J.* 82, 1396-1404, 2002.
- [85] **H.V. LY, M.L. LONGO**, The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers, *Biophys. J.* 87, 1013-1033, 2004.
- [86] **C.Y. GOATES, K. KNUTSON**, Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I. Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols, *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 169-179, 1994.
- [87] **S.L. KRILL, K. KNUTSON, W.I. HIGUCHI**, Ethanol effects on the stratum corneum lipid phase behavior, *Biochim. Biophys. Acta* 112, 169-179, 1992.
- [88] **Y.-H. KIM, W.I. HIGUCHI, J.N. HERRON, W. ABRAHAM**, Fluorescence anisotropy studies on the interaction of the short chain n-alkanols with stratum corneum lipid liposomes (SCLL) and distearoylphosphatidylcholine (DSPC)/distearoylphosphatidic acid (DSPA) liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1148, 139-151, 1993.
- [89] **S.N. AHMED, D.A. BROWN, E. LONDON**, On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes, *Biochemistry* 36, 10944-10953, 1997.
- [90] **T.X. XIANG, J. CHEN, B.D. ANDERSON**, A quantitative model for the dependence of solute permeability on peptide and cholesterol content in biomembranes, *J. Membr. Biol.* 177, 137-148, 2000.
- [91] **A.S. KLYMCHENKO, G. DUPORTAIL, A.P. DEMCHENKO, Y. MÉLY**, Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers, *Biophys. J.* 86, 2929-2941, 2004.
- [92] **B. W. BARRY**, Breaching the skin's barrier to drugs, *Nat. Biotechnol.* 22 (2), 165-167, 2004.
- [93] **L. KANG, A.L. POH, S.K. FAN, P.C. HO, Y.W. CHAN AND S.Y. CHAN**. Reversible effects of permeation enhancers on human skin, *Eur. J. Pharm. and Biopharmaceutics.* 67 (1), 149-155, 2007.
- [94] **M.A. YAMANE, A.C. WILLIAMS, B.W. 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.
- [95] **KITAGAWA, S., HOSOKAI, A., KASEDA, Y., YAMAMOTO, N., KANEKO, Y., MATSUOKA, E.**, Permeability of benzoic acid derivatives in excised guinea pig dorsal skin and effects of L-menthol. *Int. J. Pharm.* 161, 115-122, 1998.
- [96] **ALONSO, A., SANTOS, W.P., LEONOR, S.J., SANTOS, J.G., TABAK, M.**, Stratum corneum protein dynamics as evaluated by a spin label maleimide derivative. Effect of urea. *Biophys. J.* 81, 3566-3576, 2001.

- [97] **ALONSO, A., SILVA, J.V., TABAK, M.**, Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1646, 32-41, 2003.
- [98] **KITAHARA, M., ISHIGURO, F., TAKAYAMA, K., ISOWA, K., NAGAI, T.**, Evaluation of skin damage of cyclic monoterpenes, percutaneous absorption enhancers, by using cultured human skin cells. *Biol. Pharm. Bull.* 16, 912-916, 1993.
- [99] **J.A. BOUWSTRA, M. PONEC**, The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim. et Biophys. Acta* 1758, 2080-2095, 2006.
- [100] **J.A. BOUWSTRA, G.S. GOORIS, M.A. SALOMONS-DE VRIES, J.A. VAN DER SPEK, W. BRAS**, Structure of human stratum corneum as function of temperature and hydration: A wide angle x-ray diffraction study, *Int. J. Pharm.* 84, 205-216, 1992.
- [101] **S.H. WHITE, D. MIREJOVSKY, G.I. KING**, Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum, An X-ray diffraction study. *Biochemistry* 27, 3725-3732, 1998.
- [102] **PILGRAM G.S.K., ENGELSMA-VAN PELT A.M., BOUWSTRA J.A., KOERTEN H.K.** Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J. Invest. Dermatol.* 113, 403-409, 1999.
- [103] **B. ONGPIATTANAKUL, M.L. FRANCOEUR, R.O. POTTS**, Polymorphism in stratum corneum lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 115-122, 1994.
- [104] **J. SUURKUUSK, B.R. LENTZ, Y. BARENHOLZ, R.L. BILTONEN, T.E. THOMPSON**, A calorimetric and fluorescent probe study of the gel-liquid crystalline phase transition in small, single-lamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Biochemistry* 15 (7), 1393-1401, 1976.
- [105] **M. NIELSEN, L. MIAO, J. H. IPSEN, M.J. ZUCKERMANN, O.G. MOURITSEN**, Off-lattice model for phase behavior of lipid-cholesterol bilayers, *Phys. Rev. E* 59 (5), 5790-5803, 1999.
- [106] **SUKIT LEEKUMJORN, AMADEU K. SUM**, Molecular studies of the gel liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers, *Bioch. Bioph. Acta* 1768, 354-365, 2007.
- [107] **A.J. METSO, A. JULIA, J.P. MATTILA, J.M. HOLOPAINEN, P.K.J. KINNUNEN**, Nature of the main transition of dipalmitoylphosphocholine bilayers inferred from fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 107 (5), 1251-1257, 2003.
- [108] **S.G. CLERC, T.E. THOMPSON**, Permeability of Dimyristoyl Phosphatidylcholine/Dipalmitoyl Phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases, *Biophysical J.* 68, 2333-2341, 1995.
- [109] **E. SPARR, H. WENNERSTRÖM**, Responding Phospholipid Membranes-Interplay between Hydration and Permeability, *Biophysical J.* 81, 1014-1028, 2001.
- [110] **G.M. GOLDEN, D.B. GUZEK, A.H. KENNEDY, J.E. MCKIE, R.O. POTTS**, Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties, *Biochemistry* 26, 2382-2388, 1987.
- [111] **S.M. AL-SAIDAN**, Transdermal self-permeation enhancement of ibuprofen, *J. Control. Release* 100, 199-209, 2004.

## APÊNDICE A

Planilha de dados de entrada do programa NLLS:

```
echo off
echo --- Open file 'nome do arquivo.log' to save a record of this session
echo
log 'nome do arquivo'
echo
echo --- Set magnetic parameters for a generic nitroxide
echo
let gxx(1),gyy(1),gzz(1) = 2.0082,2.006,2.0032
let gxx(2),gyy(2),gzz(2) = 2.0082,2.005,2.0022
let in2=2
let axx(1),ayy(1),azz(1) = 6.5,6.5,34.7
let axx(2),ayy(2),azz(2) = 6.8,6.8,38.1
let wxx(1),wyy(1),wzz(1)=0.4,0.8,0.4
let wxx(2),wyy(2),wzz(2)=0.4,0.4,0.4
let B0(1)=3420 → campo magnético central
echo
echo --- Specify that two components are to be calculated
echo
sites 2 → número de componentes
echo
echo --- Specify basis set truncation parameters
echo
let lemx,lomx,kmx,mmx=6,5,4,4,2 → Índices de truncamento dos cálculos

echo
echo --- Read in the datafile
echo
data 'nome do arquivo' ascii nspline 1000 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) = 8.86 → chute inicial para Rbar1
let rbar(2) = 9.40 → chute inicial para Rbar2
let c20(1),c22(1)=0.0,0.6
let c20(2),c22(2)=0.0,-0.3 } → coeficientes do potencial de reorientação
vary c20(*),c22(*),rbar(*),wyy(*),wzz(*),gzz(*) → variação dos parâmetros, *indica
echo variação de todas as componentes
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 200 maxfun 2000 ftol .001
echo
echo --- fit again for full convergence
echo
fit
echo
```

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.