Universidade Federal de Goiás

DINÂMICA MOLECULAR E PARTICIONAMENTO DO MARCADOR DE SPIN DI-*TERC*-BUTIL NITRÓXIDO EM MEMBRANAS DE ESTRATO CÓRNEO. EFEITOS DE TERPENOS

Heverton Silva de Camargos

Goiânia

2009

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física
Laboratório de Biofísica

DINÂMICA MOLECULAR E PARTICIONAMENTO DO MARCADOR DE SPIN DI-*TERC*-BUTIL NITRÓXIDO EM MEMBRANAS DE ESTRATO CÓRNEO. EFEITOS DE TERPENOS

Heverton Silva de Camargos

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. Antônio Alonso*

Goiânia

2009

Camargos, Heverton Silva de.

C173d Dinâmica molecular e particionamento do marcador de spin di-terc-butil nitróxido em membranas de estrato córneo. Efeito de Terpenos [manuscrito] / Heverton Silva de Camargos. - 2009.

xv, 84 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alonso

Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2009.

Bibliografia

Inclui lista de figuras, tabelas, Abreviaturas e Sigras.

1. Resssonância Paramagnética Eletrônica 2. Terpenos 3. Ressonância de spin (elétron) I. Título.

CDU:537.635

A Deus.

Agradecimentos

- A Deus, pelas oportunidades concedidas e pela vida.
- Os mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Professor Dr. Antônio Alonso, pela sugestão do tema, paciência, amizade e orientação.
- Aos meus pais José Maria de Camargos e Geraci Domingas da Silva Camargos por todo incentivo e apoio demonstrados durante minha vida.
- À minha irmã Daiana Silva de Camargos pelo companherismo e amizade.
- À minha noiva Luciana Caponi pela paciência nos momentos de ausência, pelo amor e carinho demonstrados durante o período deste mestrado.
- Aos meus colegas e amigos do grupo de Biofísica, Adolfo Henrique de Morais Silva, Jorge Luiz dos Anjos e Sebastião Antônio Mendanha Neto pela ajuda e colaboração em todo esse trabalho.
- Aos professores do IF-UFG que proporcionaram um bom ambiente de trabalho.
- Ao Prof. Fernando Pelegrini pela utilização do laboratório de RPE.
- A todos os amigos do IF - UFG pelos momentos de descontração.

Este trabalho foi financiado pela CAPES.

Conteúdo

Lista de Figuras **III**

Lista de Tabelas **VII**

Lista de Abreviaturas e Siglas **VIII**

Resumo **1**

Abstract **2**

1 Introdução **3**

1.1 Histologia da Pele 4

1.2 O Estrato Córneo 7

1.2.1 Organização Lipídica e Rotas de Permeação no Estrato Córneo 8

1.3 Terpenos 13

1.4 Objetivos 16

2 Ressonância Paramagnética Eletrônica **18**

2.1 Introdução 18

2.2 Efeito Zeeman 19

2.3 Processos de Relaxação 24

2.3.1 Relaxação Spin-Rede 24

2.3.2 Relaxação Spin-Spin 25

2.4 Interação nuclear Hiperfina 26

2.5 O Método dos Marcadores de Spin 29

2.6 Anisotropia Espectral 33

2.7 Tempo de Correlação Rotacional 35

2.8 Simulação dos Espectros de RPE 36

3 Materiais e Métodos **40**

3.1 Condição de Operação do Espectrômetro 40

3.2 Preparação do Estrato Córneo 40

3.3 Marcação do Estrato Córneo 42

3.4 Preparação e Marcação das Vesículas de DMPC e DPPC 42

3.5 Simulação dos Espectros 43

4 Resultados **45**

4.1 Interpretação dos Espectros de RPE 45

4.2 Coeficiente de Partição do DTBN Entre as Fases Polar e Hidrocarbônica . . 48

4.3 Dinâmica Molecular do DTBN nas Fases Aquosa e Hidrocarbônica 53

4.4 Polaridade Local do DTBN no Meio Hidrocarbônico e Aquoso 56

5 Discussões **59**

6 Conclusões **64**

Referências Bibliográficas **66**

Lista de Figuras

1.1 Figura esquemática, mostrando uma pequena fração ampliada da pele, com suas principais camadas. 5

1.2 (a) Fotomicrografia da divisão da epiderme (ALBERTS, BRAY, LEWIS et al., 1997) [5]. (b) Esquema ilustrando o processo de diferenciação celular dos queratinócitos, onde as células têm origem na camada basal e se dividem continuamente, deslocando assim as células para as camadas mais externas, de forma que a divisão entre as camadas mencionadas no texto não é nítida, pelo fato do processo ser continuo. . 6

1.3 Representação esquemática do modelo "tijolos e argamassa"representando a estrutura do EC [9]. 7

1.4 Representação das estruturas moleculares das ceramidas presentes no EC humano [13]. 9

1.5 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 [14]. 9

1.6 Modelo molecular do padrão das três bandas larga-estreita-larga encontrados por micrografia de transmissão eletrônica de rutênio no estrato córneo, vistas entre as extremidades dos corneócitos adjacentes [14]. 10

1.7 Organização lipídica na fase lamelar de 13 nm com base no modelo de estrutura tri-lamelar (figura ao centro) de acordo com a seqüência largo-estreito-largo determinada pela densidade eletrônica da difração de elétrons (figura a esquerda). O painel da direita corresponde à imagem obtida por microscopia eletrônica de uma célula com queratina, Barra: 100 nm [19]. 11

1.8 Rotas de permeação de fármacos através do estrato córneo: através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e a matriz lipídica (penetração transcelular) [22]. 12

1.9 Representação esquemática da ação dos facilitadores de permeação nos domínios lipídicos [29]. 14

1.10 Estrutura química dos terpenos utilizados neste trabalho. 15

2.1 Separação entre os níveis de energia α e β, provocado pela ação de um campo magnético externo. 20
2.2 Movimento de precessão do mometo magnético angular do spin $\hat{\mu}$, em torno da direção em que é aplicado o campo externo $\vec{B}$ com velocidade de precessão de Larmor $\hat{\omega}_L$ 22
2.3 Interação dos momentos de dipolos do elétron ($\hat{\mu}_e$) e do núcleo ($\hat{\mu}_n$). O vetor $\hat{\mu}_e$ é indicado pelo estado $\hat{m}_S = -\frac{1}{2}$ e o vetor $\hat{\mu}_n$ é indicado pelo estado $\hat{I} = +\frac{1}{2}$. O ângulo θ é formado entre o vetor $\vec{r}$, que liga os dipolos, e o campo aplicado $\vec{B}$. . . 28
2.4 Fórmula química geral do radical nitróxido, onde R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador spin. 30
2.5 (a) Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) num campo magnético: (b) sem interação e (c) com interação com o spin do N (estrutura hiperfina). (d) espectro de adsorção e (e) primeira derivada do espectro de absorção; **a** é a constante de desdobramento hiperfino, a posição da linha central é definida pelo fator g [53]. 31
2.6 Figura esquemática mostrando o oxigênio do radical nitroxido realizando ligação de hidrogênio, onde o hidrogênio polariza a ligação N - O fazendo que o elétron se localize mais próximo do núcleo do átomo de nitrogênio aumentando assim a contribuição do acoplamento hiperfino isotrópico. 32
2.7 Esquema do radical nitróxido, mostrando as orientações dos eixos principais dos tensores de segunda ordem $\bar{g}$ e $\bar{a}$. Os grupos R_1 e R_2 permitem a reação do radical sem envolver o elemento para-magnético $N - O$. 33
2.8 Espectro de RPE retratando a anisotropia do fator g e da constante de acoplamento hiperfino. (a) Campo magnético aplicado paralelo ao eixo z, (b) na direção do eixo y e (c) quando o campo está ao longo do eixo x. (d) Espectro do marcador em solução e (f) espectro obtido a -70 °C (espectro de pó). 34
2.9 Espectro de RPE do marcador de spin 16-SASL em membranas musculares a 37º C com varredura de 100 G, indicando a medida dos parâmetros h_0, W_0 e h_{-1} . . . 36
2.10 Janela do programa EPRSIM , versão 4.99, onde é permitido introduzir os valores dos tensores magnéticos A e g, a magnitude e abundância da interação do spin nuclear C-13 e também definir o eixo de simulação da membrana. 37

2.11 Janela do programa EPRSIM onde os parâmetros obtidos da simulação são fornecidos. O menor valor obtido na otimização do χ^2 reduzido também é apresentado. Nesta janela também é permitido escolher o número (duas componentes espectrais) e o tipo (isotrópico) de domínio da membrana, como também visualizar o espectro simulado (linha branca), o experimental (linha verde), o espectro da componente com menor (linha vermelha) e alta (linha azul) mobilidade. 38

3.1 Rato da raça wistar com menos de 24 h de vida, do qual a epiderme foi retirada cirurgicamente. Depois de um tratamento químico a membrana de estrato córneo, já separada da epiderme, é levada a um dessecador para ser desidratada. 41

3.2 Estrutura química dos marcadores de spin (a) 2, 2, 6, 6-tetrametil-piperidine-1-oxil (TEMPO) e (b) Di-terc-butil nitróxido (DTBN). O marcador TEMPO foi utilizado em um trabalho anterior de nosso laboratório [54, 61]. 43

4.1 (a) Espectro de RPE do marcador de spin DTBN no Estrato Córneo (pH 5,1, 50°C) e os parâmetros H e P que define o parâmetro $f = H/(H + P)$). (b) Espectro experimental (linha) e simulado (círculos vazios). O melhor ajuste foi obtido através do programa EPRSIM, usando o modelo de duas componentes para todos os ajustes. (c) Componente H e (d) Componente P, com o respectivo parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico $2a_0$. Na figura também está indicada a porcentagem que cada componente representa no espectro composto e também o tempo de correlação, τ_c, na escala dos ns. A varredura de campo magnético é de 50 G. 46

4.2 Espectro de RPE experimental (linha) e simulado (círculos abertos) do DTBN em membranas de DMPC, DPPC e estrato córneo para várias temperaturas. A varredura de campo magnético é de 50 G. 47

4.3 Parâmetro espectral $f = H/(H + P)$ descrito na Fig. 4.1 e a população relativa do DTBN na componente H (quadrados abertos), N_H, determinada pela simulação espectral, para vesículas multilamelares de DMPC (gráfico à esquerda), DPPC (gráfico ao centro) e membranas de estrato córneo (gráfico à direita), versus a temperatura.. 49

4.4 Logaritmo natural do coeficiente de partição, ln K, do DTBN em vesículas mutilamelares de DMPC, DPPC e membranas de estrato córneo (EC) versus a temperatura absoluta recíproca. Os terpenos foram acrescentados a uma razão molar de terpenos:lipídios de 0,75:1 para DMPC e DPPC e a 1% terpeno (peso/volume) em estrato córneo. 52
4.5 Alterações no espectro de RPE ocasionados devido ao aumento da concentração de 1,8-cineole, onde o espectro experimental são as linhas e o simulado os círculos vazios 53
4.6 Tempo de correlação rotacional, τ_c, do DTBN em membranas de DMPC, DPPC e estrato córneo (EC) versus o recíproco da temperatura absoluta. Os terpenos foram adicionados a uma fração molar terpeno:lipídio 0,75:1 para DMPC e DPPC, e 1% (peso/volume) utilizado nas amostras de EC. Os painéis A e B se referem ao marcador na membrana e no solvente, respectivamente 54
4.7 Parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) versos a temperatura. Os símbolos cheios são os valores obtidos de a_0 para a região hidrofóbica enquanto que os vazios estão relacionados ao ambiente do solvente. Na figura da esquerda, está uma legenda dos símbolos que serve para DMPC, DPPC e EC. 57

Lista de Tabelas

4.1 Variação da energia livre de Gibbs (a 26°C), da entalpia e entropia relacionadas com a transferência do marcador DTBN da água para as membranas de DMPC, DPPC e EC. 51

4.2 Energia de ativação para o tempo de correlação rotacional do marcador de spin DTBN nas membranas de DMPC, DPPC e EC. 55

4.3 Valores do desdobramento hiperfino isotrópico do nitroxil nos marcadores de spin 5-DOXIL, DTBN e TEMPO em terpenos e outros solventes de variadas constantes dielétricas na temperatura de 25°C. 57

Lista de Abreviaturas e Siglas

a - Constante de desdobramento hiperfino;

a_0 - Constante de desdobramento hiperfino isotrópico;

AZT - Zidovudine;

ATR-FTIR - Sigla em inglês de *Atterential Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Radiation;*

CER - *Ceramidas;*

DMPC - *1,2-dimeristoil-sn-glicero-3-fosfocolina;*

DMSO - *Dimetilsulfóxido;*

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

DTBN - *Di-terti-butil nitróxido;*

DSC - *Sigla em inglês de Differential scanning colorimetry;*

EC - *Estrato Córneo;*

EO - *Ácido graxo ω-hidroxi;*

NEM - *N-etil maleimido;*

NLLS - *Nonlinear Least-Square;*

pH - *Concentração de íons, $-log[H^+]$;*

RPE - *Ressonância Paramagnética Eletrônica;*

T_1 - *Tempo de relaxação longitudinal;*

$\mathbf{T_2}$ - *Tempo de relaxação transversal;*

$\tau_\mathbf{c}$ - *Tempo de correlação rotacional;*

Resumo

Os terpenos são uma classe muito promissora de facilitadores de permeação da pele devido aos seus baixos potenciais de irritação na pele. Neste trabalho utilizamos a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do pequeno marcador de spin di-*terc*-butil nitróxido (DTBN) que particiona na fase aquosa e hidrocarbônica, para estudar a interação dos terpenos α-terpineol, 1,8-cineol, L(-)-carvona e (+)-limoneno com a camada superior da pele, o estrato córneo, e membranas modelos de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC). Os espectros de RPE indicaram que os terpenos aumentam o coeficiente de partição e a taxa de difusão rotacional do marcador de spin nas membranas de estrato córneo, enquanto que para as bicamadas de DMPC e DPPC o efeito foi semelhante somente nas temperaturas abaixo da fase líquido-cristalina. O parâmetro de EPR associado à polaridade do marcador de spin no interior das membranas mostrou mudanças induzidas termotropicamente, sugerindo que a posição média da molécula marcada muda com a temperatura e fases das membranas. Enquanto as bicamadas de DMPC e DPPC mostraram abruptas mudanças nos parâmetros da partição e do tempo de correlação rotacional com as transições de fase, as membranas de EC forão caracterizadas por suaves mudanças em todo o intervalo de temperatura medido, apresentando as maiores mudanças ou reorganizações das membranas na faixa de temperatura de $\backsim$50 a $\backsim$74^{o}C. Os resultados sugerem que a terpenos atuando como espaçadores dos lipídios que compõem as membranas, enfraquecem as redes de ligações de hidrogênio na interface polar, e isto leva a um aumento da fluidez dos lipídios do estrato córneo e, em conseqüência, a uma maior permeação de moléculas polares através das membranas.

Abstract

Terpenes are a very promising class of skin penetration enhancers especially due to their low potential of irritation in the skin. In this work, we have used the electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the small spin label di-tert-butyl nitroxide (DTBN), which partitions the aqueous and hydrocarbon phases, to study the interaction of the terpenes α-terpineol, 1,8-cineole, L(-)-carvone and (+)-limonene with the uppermost skin layer, the stratum corneum, and the membrane models of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC). The EPR spectra indicated that the terpenes increase both the partition coefficient and the rotational diffusion rate of the spin labels in the stratum corneum membranes whereas for DMPC and DPPC bilayers were observed similar effects only at temperatures below the liquid-crystalline phase. The EPR parameter associated to probe polarity inside the membranes showed thermotropic induced changes, suggesting relocations of spin probe, which were dependent of the membrane phases. While DMPC and DPPC bilayers showed abrupt changes in the partitioning and rotational correlation time parameters at the phase transitions, the SC membranes were characterized by slights changes in whole interval of measured temperatures, presenting the greatest changes or membranes reorganizations in the temperature range of $\backsim$50 to $\backsim$74°C. The results suggest that the terpenes act as spacers that weaken the hydrogen-bonded network at the polar interface thus fluidizing the stratum corneum lipids and, in consequence, increase the permeation of small polar molecules across the membranes.

Capítulo 1

Introdução

A área de liberação de fármacos através da pele tem recebido notório destaque nos últimos anos. Quando a permeabilidade do fármaco é suficiente para alcançar níveis sanguíneos terapêuticos, o tratamento via transdermal é bem mais eficiente e, de menores efeitos colaterais, em relação ao de via oral. Recentemente, foi viabilizado o tratamento transdérmico do mal de Parkinson usando o rotigotina como princípio ativo [1]. Os terpenos têm sido utilizados como facilitadores da permeação por serem muito eficientes em aumentar a permeabilidade do estrato córneo (EC), a primeira camada da pele e maior limitador da permeação. Além disso, os terpenos são compostos naturais de baixa toxidade. Foi mostrado recentemente que uma combinação de terpenos em etanol pode aumentar a permeação do AZT , primeiro medicamento anti-HIV aprovado para uso clínico, em até 100 vezes [2]. Compreender os mecanismos dos facilitadores de permeação na pele é de importância para o desenho de novos facilitadores ou, do uso de combinações destes. Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de um pequeno marcador de spin que pode mimetizar um fármaco. Através dos parâmetros de RPE foi possível analisar a dinâmica e partição do marcador de spin nas membranas lipídicas do EC, os quais em teoria, são parâmetros relacionados com a permeabilidade de moléculas através de membranas. Entretanto, o objetivo deste trabalho não foi apenas analisar os mecanismos de ação envolvidos na capacidade dos terpenos em aumentar a permeação de fármacos no EC, mas também estudar as propriedades termotrópicas do próprio EC comparando suas

membranas lipídicas com membranas modelos muito estudadas.

1.1 Histologia da Pele

A pele é um dos maiores órgãos do organismo humano, atingindo 16% do peso corporal. É constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Fig. 1.1). Apresenta múltiplas funções, entre as quais, a de proteger o organismo contra os germes patogênicos, graças à camada córnea que reveste a epiderme. O fato de o EC ser pouco permeável à água e outros solutos é de importância vital, pois permite a manutenção da hidratação do corpo em níveis de aproximadamente 70% [3]. Sem o EC a maior parte da água do corpo é perdida rapidamente.

Abaixo da derme, está um tecido conjuntivo frouxo ou adiposo, sendo denominado de hipoderme, porém não é considerado como parte da pele. Mais este se encontra fixado a pele através de feixes separados e irregulares de fibras colágenas [4], unindo assim a pele ao resto do corpo.

A derme é um tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. Suas células em maioria são fibroblastos, cuja principal função é sintetizar as fibras estruturais de colágeno e elastina. Na derme se encontram ainda as terminações nervosas, os vasos sanguíneos e as glândulas sudoríparas e sebáceas.

A epiderme é essencialmente constituída por um epitélio estratificado cheio de filamentos de queratina, de origem ectodérmica. A sua espessura e estrutura varia com o local, sendo mais espessa e complexa na palma da mão e planta do pé, podendo atingir espessuras de até 1,5 mm. A primeira camada da epiderme é a basal, que é caracterizada pela presença de células prismáticas que repousam sobre a lâmina basal a qual separa a epiderme da derme. Depois vem a camada espinhosa, que apresenta células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas, de núcleo central com pequenas expansões citoplasmáticas. Em seguida vem a camada granulosa, que é caracterizada pela presença de células poligonais

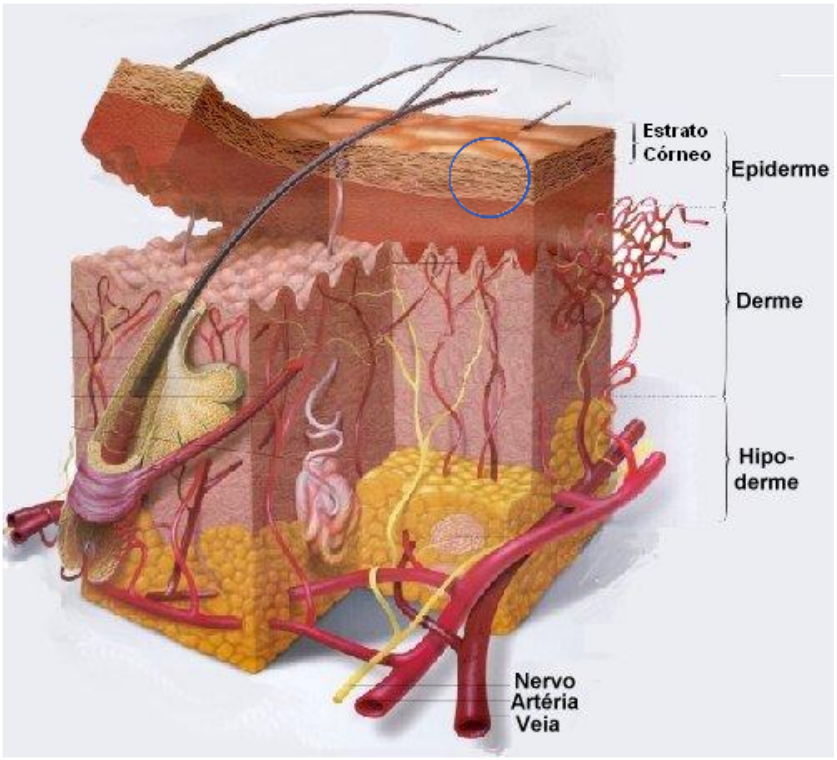

Figura 1.1: Figura esquemática, mostrando uma pequena fração ampliada da pele, com suas principais camadas.

com núcleo central, nitidamente achatada, cujo citoplasma possui grânulos de queratohialina associados ao fenômeno de queratinização dos epitélios. Após vem a camada lúcida, caracterizada por uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas, hialinas, cujos núcleos desapareceram. A última camada é o EC, ou camada córnea, que é constituída por células achatadas, anabolicamente mortas e sem núcleo [4](Fig. 1.2). Esta camada será estudada com mais detalhes posteriormente.

Como a epiderme está diretamente exposta ao ambiente externo, acaba recebendo ataques diretos, tais como a exposição aos raios ultravioletas, produtos químicos e microorganismos do ambiente. A radiação na região ultravioleta é tão agressiva que a defesa do organismo só é possível devido à capacidade de renovação do EC. A cada quinze dias aproximadamente o EC é substituído graças a um processo de diferenciação celular terminal (terminal porque acaba com a morte da célula).

Este processo de diferenciação celular da epiderme se inicia na camada basal,

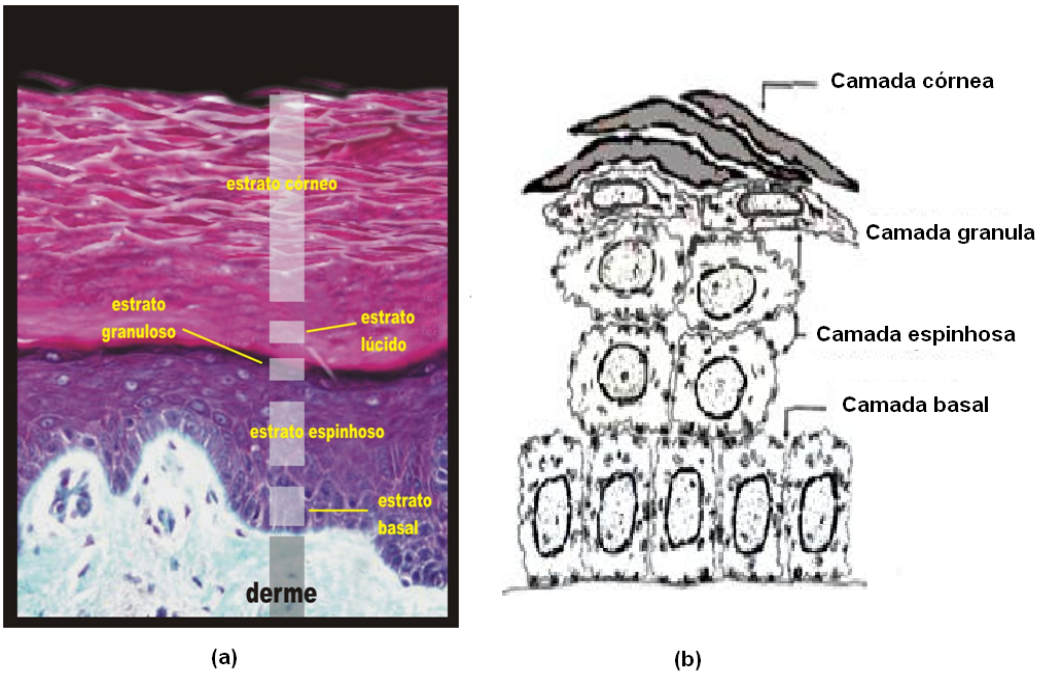

Figura 1.2: (a) Fotomicrografia da divisão da epiderme (ALBERTS, BRAY, LEWIS et al., 1997) [5]. (b) Esquema ilustrando o processo de diferenciação celular dos queratinócitos, onde as células têm origem na camada basal e se dividem continuamente, deslocando assim as células para as camadas mais externas, de forma que a divisão entre as camadas mencionadas no texto não é nítida, pelo fato do processo ser continuo.

logo acima da lâmina basal, a partir dos queratinócitos que são ali inicialmente formados. A principal atividade dos queratinócitos é sintetizar queratinas, que dá a epiderme a sua resistência. Na camada basal elas funcionam como células-tronco que vão se transformando nas outras células da epiderme e enquanto se diferenciam migram para as camadas mais externas da pele. Acima das células espinhosas se localiza uma camada delgada de células granulares, onde os lisossomas liberam enzimas e ocorre a digestão de várias organelas citoplasmáticas tais como: mitocôndrias, complexo de Golgi e também o núcleo. A partir deste ponto, as camadas subseqüentes são inativas metabolicamente, sendo células mortas sem a presença de organelas intracelulares. Continuando o processo, estas células são reduzidas a camadas achatadas cheias de filamentos de queratina densamente empacotados [5]. Após este preenchimento de queratinas, estas células que compõem o EC passam a ser chamadas de corneócitos. Dependendo da região do corpo, o tempo gasto para uma célula

ser produzida no estrato basal da pele humana e se descamar na superfície é de aproximadamente um mês.

Durante a vida humana, as camadas da epiderme são substituídas milhares de vezes, sendo que cerca de 0,5 a 1 g aproximadamente da camada córnea é perdida diariamente. A velocidade de descamação das células é a mesma da subdivisão, portanto, para que o organismo humano compense essa perda diária é necessário que ele sintetize de 50 a 100 mg de lipídios por dia, sendo a pele um dos órgãos dos mamíferos que mais sintetiza lipídios [6].

1.2 O Estrato Córneo

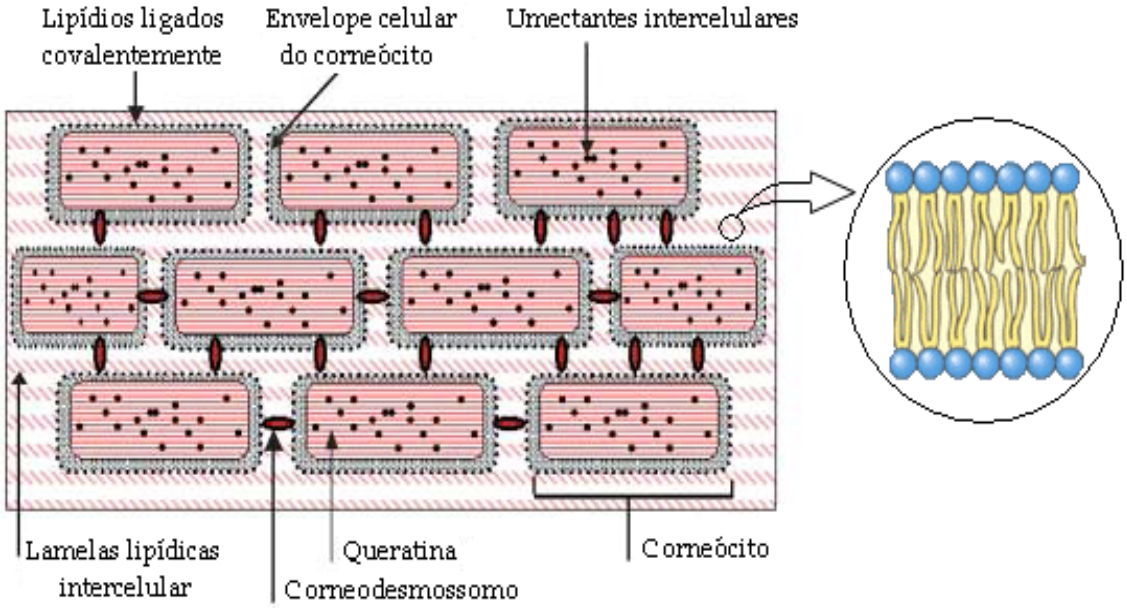

Figura 1.3: Representação esquemática do modelo "tijolos e argamassa"representando a estrutura do EC [9].

A propriedade de barreira física da pele dos mamíferos para a difusão de substâncias, incluído a água, é atribuída ao EC. No caso do EC humano, a espessura aproximada desta membrana é de 10 μm, podendo chegar até a 500 μm na região das palmas das mãos e plantas dos pés. Contém em torno de 10 a 25 camadas de células achatadas destituídas de organelas citoplasmáticas, anucleadas e anabolicamente mortas. Estas células ricas em filamentos de queratina se encontram envolvidas em uma matriz lipídica intercelular, cuja composição se

constitui, basicamente, de 40% de ceramidas, 25% de colesterol, 25% de ácidos graxos livres e 10% de sulfato de colesterol [7, 8].

A estrutura do EC, conforme esquematizado na Fig. 1.3, foi comparada a uma parede de tijolos, onde os corneócitos contendo as proteínas representariam os tijolos e as camadas lipídicas existentes entre os corneócitos fariam o papel da argamassa [9].

As principais funções do EC podem ser destacadas como: a) exercer o controle da perda de água transpidermal, limitando a permeação de substâncias em ambas as direções, b) impedir a entrada de microorganismos, c) filtrar a radiação ultravioleta proveniente do Sol e d) contribuir para as propriedades viscoelásticas da pele.

1.2.1 Organização Lipídica e Rotas de Permeação no Estrato Córneo

A matriz lipídica constitui aproximadamente cerca de 20% do volume do EC ou 16% de seu peso seco [9]. Devido a um processo de extrusão, os lipídios polares são transformados em lipídios altamente hidrofóbicos, sendo que os fosfolipídios são quase ausentes no EC [10]. Portanto, a maior classe de lipídios que constitui o EC é a das ceramidas, que são resistentes à oxidação. Isto é importante para a pele devido ao fato de estar diretamente exposta à radiação UV e, em contato com as moléculas de oxigênio do ar. Já os ácidos graxos, mesmo em quantidade menor, contribuem para que o EC tenha um pH ácido de aproximadamente 5,5, assim evitando que bactérias possam se alojar sobre a superfície da pele. Outro lipídio importante no EC é o sulfato de colesterol que é essencial para o processo de descamação [11].

No EC humano podem ser detectados nove tipos de ceramidas (Fig. 1.4), cujos grupos polares podem ser da esfingosina (S), fitoesfingosina (P) ou 6-hidroxiesfingosina (H), onde as bases dos ácidos não-hidroxi (N), ou α-hidroxi (A), se encontram ligados ao nitrogênio da amida. Estes ácidos graxos têm comprimento de cadeia variável, mas são predominantes as cadeias com 24 e 26 átomos de carbono. Também são observados três tipos de acilceramidas, CER1 (EOS), CER4 (EOH) e CER9 (EOP), os quais são as únicas

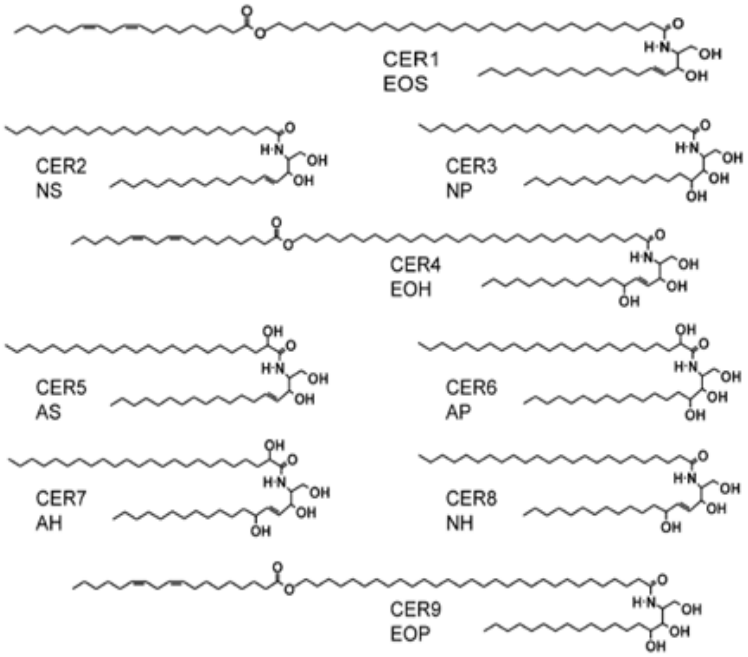

Figura 1.4: Representação das estruturas moleculares das ceramidas presentes no EC humano [13].

estruturas que contém ácido linoléico quimicamente ligado a um ácido graxo ω-hidroxi (EO), tendo cadeias de 30 a 32 átomos de carbono aproximadamente [12, 13].

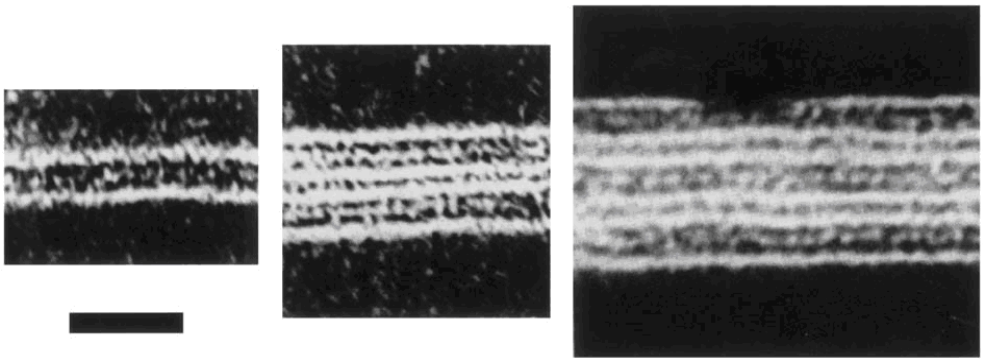

Figura 1.5: Micrografia de transmissão eletrônica mostrando os padrões de estruturas lamelares contendo três, seis, e nove lamelas dentro dos espaços intercelulares do estrato córneo. Barra = 100 nm [14].

Novas informações foram adicionadas por Breathnach et al. [17, 18] com estudos realizados utilizando a técnica de microscopia eletrônica de criofratura, mostrando a presença de lamelas lipídicas intercelulares entre as células. Em micrografia de transmissão eletrônica

(Fig 1.5) usando o tetróxido de rutênio (RuO_4), estas estruturas lamelares aparentam estar organizadas em unidades trilamelares repetidas, seguindo um padrão de bandas largo-estreito-largo [14, 15]. Os padrões lamelares freqüentemente vistos incluem três, seis, ou nove estruturas lamelares (Fig 1.5) [14, 16], 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.

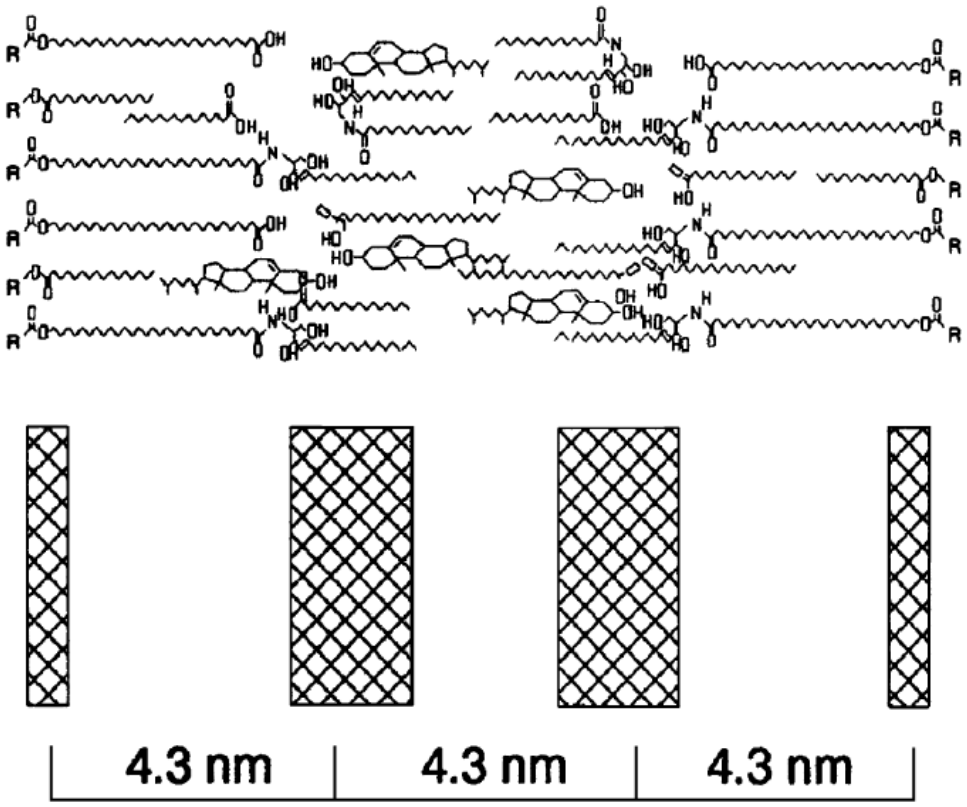

Figura 1.6: Modelo molecular do padrão das três bandas larga-estreita-larga encontrados por micrografia de transmissão eletrônica de rutênio no estrato córneo, vistas entre as extremidades dos corneócitos adjacentes [14].

Na Fig. 1.6 está mostrado um arranjo molecular dos lipídios no interior do EC, de acordo o modelo proposto por Hill e Wertz (2003) [14], tendo o objetivo de explicar o padrão largo-estreito-largo descoberto por micrografia de transmissão eletrônica de tetróxido de rutênio fixado no EC. Neste arranjo molecular os lipídios (ω-hidroxiceramidas) se ligam covalentemente ao envelope celular do corneócito (representado por R na figura 1.6). A

molécula da ω-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. A região onde os lipídios estão ligados covalentemente à superfície celular dos corneócitos é representada pelas bandas eletrodensas (simbolizadas pelos retângulos hachurados externos). As outras faixas eletrodensas são as dos grupos polares e, as regiões claras entre os retângulos são as bandas claras das regiões hidrofóbicas (as cadeias de hidrocarbonetos são transparentes aos elétrons nesse tipo de micrografia de transmissão).

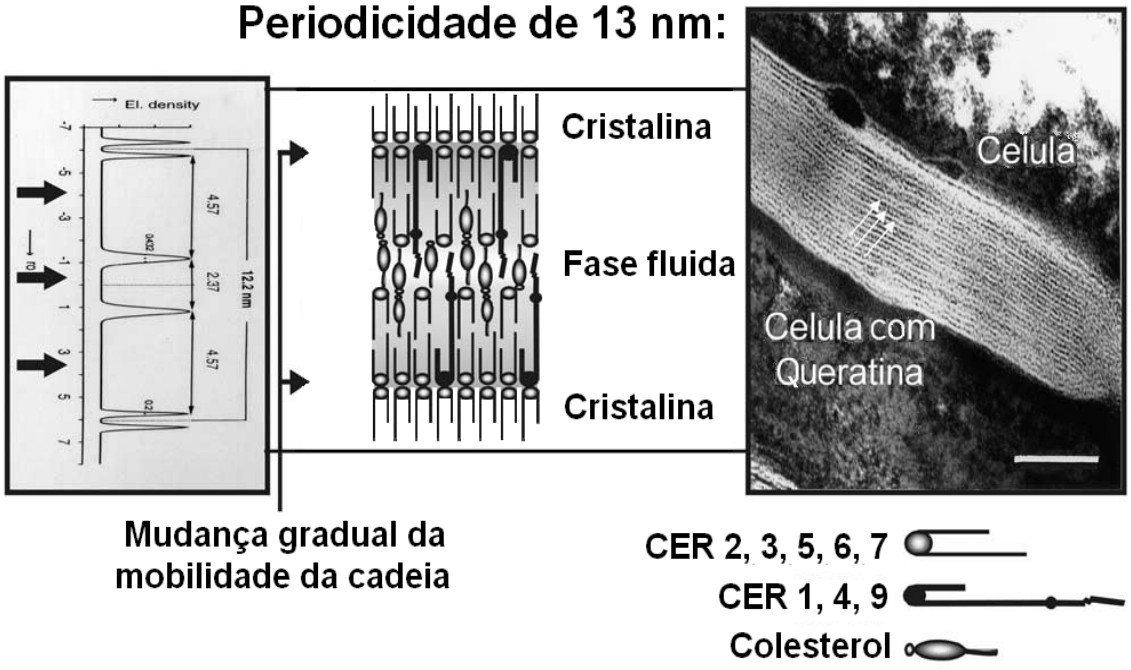

Figura 1.7: Organização lipídica na fase lamelar de 13 nm com base no modelo de estrutura tri-lamelar (figura ao centro) de acordo com a seqüência largo-estreito-largo determinada pela densidade eletrônica da difração de elétrons (figura a esquerda). O painel da direita corresponde à imagem obtida por microscopia eletrônica de uma célula com queratina, Barra: 100 nm [19].

A difração de raios-X a baixo ângulo indica fases lamelares com periodicidades de aproximadamente 6 e 13 nm [20], entretanto, somente a fase lamelar de 13 nm foi observada em todas as espécies estudadas, apresentando predominantemente empacotamentos lipídicos com estrutura ortorrômbica [21]. Em um trabalho mais recente foi mostrada a formação da fase de periodicidade longa, pela primeira vez, através de uma mistura de colesterol, ceramidas sintéticas e ácidos graxos livres [13]. Estas misturas foram preparadas em uma

proporção semelhante à encontrada no EC nativo, com o conteúdo de ceramidas sintéticas CER1, CER3 e CER4 preparadas em uma relação molar 1:7:2, respectivamente. A presença dos ácidos graxos livres foi crucial para alcançar uma organização lipídica similar daquela encontrada no EC nativo de suíno e humano. Em outro estudo foi proposto um modelo para descrever a organização dos lipídios intercelulares do EC, onde os lipídios da fase de longa periodicidade estão organizados em uma estrutura tri-lamelar: duas camadas largas com uma estrutura cristalina (ortorrômbica), separadas por uma camada lipídica central com domínios fluidos. Este padrão largo-estreito-largo de cadeias hidrocarbônicas corresponde às imagens obtidas por microscopia eletrônica.

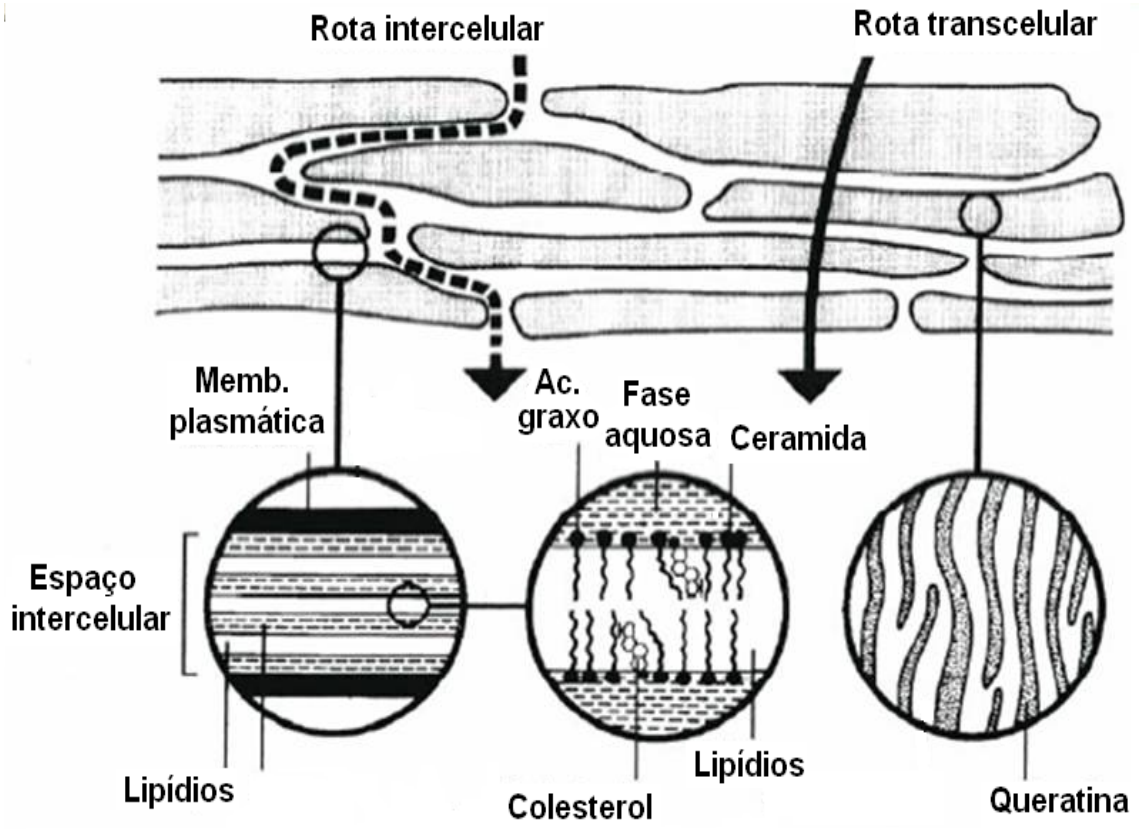

Figura 1.8: Rotas de permeação de fármacos através do estrato córneo: através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e a matriz lipídica (penetração transcelular) [22].

A grande parte dos fármacos liberados pelos sistemas transdérmicos são moléculas pequenas (Massa Molar $<$ 400 g/mol), potentes (capazes de atingir o efeito terapêutico

em baixas concentrações) e ligeiramente lipofílicas [23, 24]. Basicamente, um fármaco pode atravessar o EC através de duas rotas diferentes (Fig. 1.8). Na rota intercelular o fármaco se difunde ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica, enquanto na rota transcelular o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária. A importância de cada rota de permeação depende das propriedades físico-químicas dos fármacos.

1.3 Terpenos

Uma forma de facilitar a permeação de fármacos através da pele é alterar reversivelmente a sua função de barreira. Para este fim, se faz o uso dos facilitadores de permeação, que são compostos farmacologicamente inativos, mas que podem permear ou interagir com os constituintes do EC, quando incorporados numa formulação transdémica e, deste modo, diminuir a resistência da pele à partição do fármaco [22,25]. Mas um facilitador de permeação ideal precisa apresentar as seguintes características: não-tóxico, farmacologicamente inerte (que não sofra metabolismo com a pele), de ação imediata, não-irritante, não alérgico, de ação reversível, quimicamente e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes e aceitável cosmeticamente [26, 27].

A ação dos facilitadores de permeação "convencionais"(tais como, álcool e ácidos graxos) na bicamada lipídica envolve interações, tanto nos grupos das cabeças polares dos lipídios, quanto nas cadeias hidrofóbicas da camada Fig. 1.9 [29]. Esta ação pode ocorrer através de 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.

Dentro da classe dos facilitadores de permeação, os terpenos têm recebido notória atenção, por apresentarem baixo potencial de irritação. Estes são constituídos basicamente de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo componentes de óleos essenciais de plantas. A sua estrutura química consiste de grupos isoprenos (C_5H_8) repetidos e é classificada

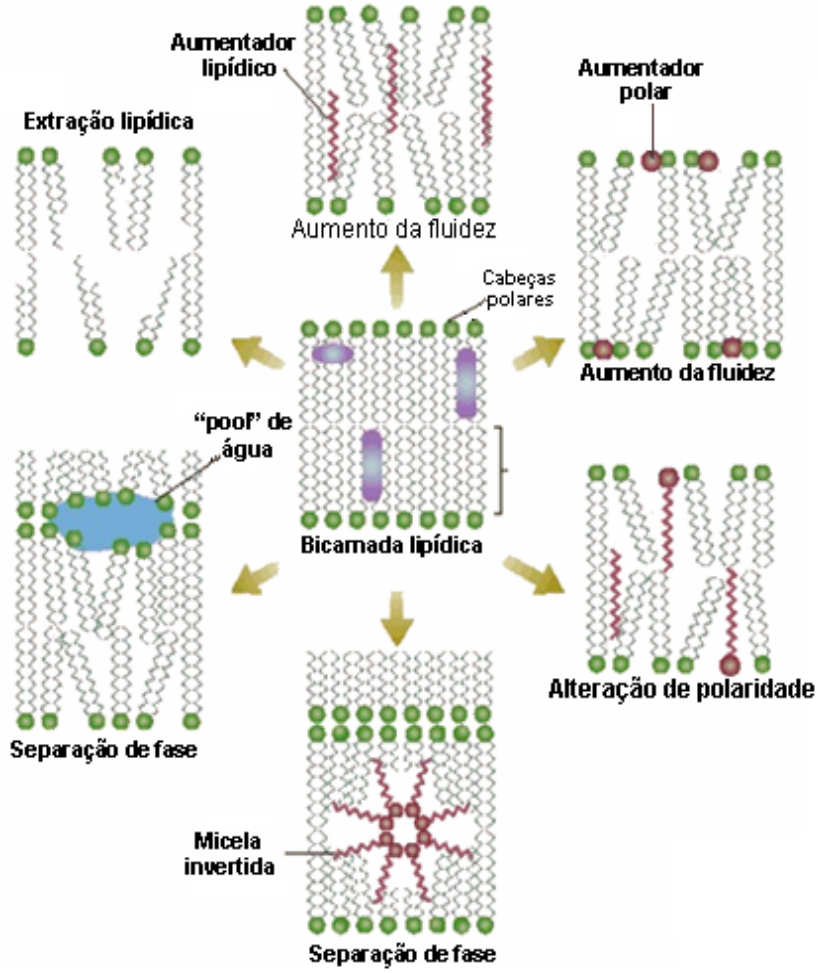

Figura 1.9: Representação esquemática da ação dos facilitadores de permeação nos domínios lipídicos [29].

de acordo com o número de grupos isoprenos. Neste trabalho foram estudados quatro terpenos diferenciando entre si na capacidade de formar ligações com o hidrogênio, sendo dois receptores de hidrogênio, um doador e o outro um não formador de ponte de hidrogênio. São eles:

- **Carvona**, que é um receptor de hidrogênio pertencente à classe das cetonas, sendo encontrado naturalmente em muitos óleos essenciais de plantas, é abundante em sementes de alcaravia (*Carum carvi*) Fig. 1.10. Gao e Singh compararam o efeito de quatro terpenos cíclicos (carvona, cineol, mentol e timol), em combinação com 50% de etanol, na entrega transdermal de tamoxifena em epiderme de porco. O carvona aumentou

a permeação de tamoxifena mais que o cineol, timol e mentol, sendo sugerido que o carvona poderia causar um possível rompimento na estrutura intercelular dos lipídios altamente ordenados do EC [30].

- **Cineol**, que também é um receptor de hidrogênio, sendo um monoterpeno cíclico do tipo éter obtido do óleo essencial da folha do *Eucalyptus globulus*, e outras espécies de eucalipto Fig. 1.10. Tem sido proposto que o cineol fornece um melhor aumento de permeantes hidrofílicos [29]. Narishetty e co-autores mostraram que o *L*-mentol e o $1,8$-cineol quando aplicados em 5% (peso/volume) em $66,6\%$ de etanol como veículo podem aumentar consideravelmente os níveis de permeação do zidovudina (AZT, primeiro fármaco anti-HIV utilizado) através da pele de ratos (menos permeável do que a humana) atingindo níveis terapêuticos de permeação [31]. Através de dados obtidos por DSC (do inglês "differential scanning calorimetry") e ATR-FTIR (do inglês "attenuated total reflectante infrared") verificou-se que o 1,8-cineol aumenta a permeação do AZT modificando a estrutura lipídica do EC de um arranjo ortorrômbico para um empacotamento do tipo hexagonal [2, 31].

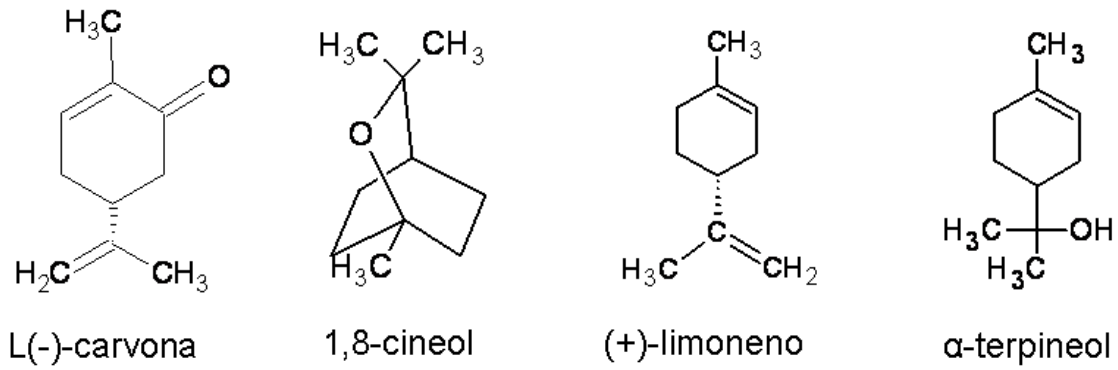

Figura 1.10: Estrutura química dos terpenos utilizados neste trabalho.

- **Limoneno** (Fig. 1.10) é um composto que não forma ligações de hidrogênio, por ser constituído somente de átomos de carbono e hidrogênio, portanto sendo um hidrocarboneto monoterpênico lipofílico, obtido da casca do limão, *Citrus limon* [32]. Kaidi

e Sing estudaram a combinação dos terpenos limoneno, eugenol, e mentono a uma concentração de 5% em combinação com 50% de propileno glicol (PG), verificando que os três aumentam a permeação do tamoxifeno em epiderme de porco, porém, o limoneno foi o que apresentou o maior aumento. O limoneno é um potente facilitador da permeação de moléculas lipofílicas e compostos anfifílicos, mas é pouco efetivo para compostos hidrofílicos, como o manitol. Entre os mecanismos de ação sugeridos para o limoneno no EC está a sua capacidade de extração lipídica [33].

- **Terpineol** (Fig. 1.10) é um monoterpeno alcoólico doador de hidrogênio de baixa toxidade, podendo ser isolado do óleo de pinho, sendo bastante utilizado na indústria de perfumaria. O terpineol e o mentol têm sido identificados como eficientes facilitadores da permeação de moléculas hidrofílicas [34, 35]. Os mecanismos de ação do terpineol estão relacionados com a ruptura das ligações de hidrogênio entre os grupos das cabeças polares.

1.4 Objetivos

Este trabalho tem o objetivo de utilizar o método de marcadores de spin, juntamente com a espectroscopia de RPE, para estudar o comportamento termotrópico e as propriedades físico-químicas da membrana de EC, comparando-a com membranas modelos de DMPC e DPPC, e também investigar os mecanismos de ação dos facilitadores de permeação da classe dos terpenos. Os terpenos escolhidos diferem na capacidade de formar ligações de hidrogênio, o L(-)-carvona (cetona, receptor de hidrogênio), o 1,8-cineol (éter, receptor de hidrogênio), o (+)-limoneno (hidrocarboneto, não participa de ligações de hidrogênio) e o α-terpineol (álcool, doador de hidrogênio). Espera-se assim encontrar o melhor facilitador da permeação entre esses terpenos e adquirir alguma compreensão adicional sobre os mecanismos de permeação de fármacos nas membranas. O marcador escolhido foi o di-terc-butil nitróxido (DTBN), uma molécula pequena (PM = 145,24 g) que sofre partição entre as fases aquosa

e hidrocarbônica dos sistemas de membranas e assim pode, em princípio, mimetizar um fármaco. A alta resolução de seus espectros de RPE permite alta aferição de seu coeficiente de partição nas membranas bem como da dinâmica molecular e polaridade em ambos os meios polar e aquoso.

Capítulo 2

Ressonância Paramagnética Eletrônica

2.1 Introdução

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma poderosa técnica, não invasiva, que permite a investigação de moléculas, ou íons, com elétrons não-emparelhados feita pela observação dos campos magnéticos que propiciam a ressonância na presença de radiação eletromagnética [36]. Também tem sido aplicada no estudo da dinâmica molecular, em fluidos isotrópicos, na determinação de fases, tais como líquidos, cristais ou membranas biológicas, em superfícies, ou associadas às macromoléculas [37].

A primeira observação de ressonância paramagnética eletrônica foi feita na Rússia em 1945, quando Zavoisky [38] detectou uma linha de absorção de freqüência de rádio de uma amostra de $CuCl_2.2H_2O$. Em radicais livres, a primeira observação foi feita em 1952 e, a partir de então, esta técnica tem sido aplicada em diversas áreas da física, química e biologia [39].

Devido à grande sensibilidade desta técnica, pode-se tirar vantagem do fato de que somente alguns íons e moléculas paramagnéticas das amostras podem interagir com o campo magnético externo. Com isto, esta técnica tem sido amplamente utilizada para estudar não somente espécies intrinsecamente paramagnéticas, tais como metaloproteínas e melaloenzimas, mas também os radicais livres formados em reações bioquímicas. Como os

sistemas biológicos em geral não apresentam centros paramagnéticos, foi desenvolvido o uso de sondas específicas, conhecidas como marcadores de spin, que serão comentados mais a frente. A utilização dos marcadores de spin em RPE tem sido uma importante ferramenta em vários estudos de Biofísica, em especial ao estudo de membranas e proteínas [40].

2.2 Efeito Zeeman

Os estados de energia de uma amostra paramagnética na ausência de um campo magnético estão degenerados. Entretanto, quando um campo magnético estático $\overrightarrow{B}$ é aplicado, a degenerescência é removida, devido a interação dos momentos magnéticos orbitais dos elétrons, $\overrightarrow{\mu}$, que se encontra precessionando em torno do campo. Este fenômeno é denominado Efeito Zeeman, que quanticamente pode ser descrito por um Hamiltoniano definido pelo produto escalar do campo magnético estático com o operador momento magnético orbital, $\hat{\mu}$:

$$\hat{\mathcal{H}} = -\hat{\mu}.\overrightarrow{B}. \tag{2.1}$$

Considerando a interação da componente z do momento magnético orbital, $\hat{\mu}_z$, com um campo magnético uniforme $\overrightarrow{B} = B_0\overrightarrow{z}$, temos

$$\hat{\mathcal{H}} = -\hat{\mu_z}B_0. \tag{2.2}$$

Para um elétron podemos escrever o momento magnético orbital como

$$\hat{\mu_z} = \gamma_e\hat{S}_z, \tag{2.3}$$

onde $\gamma_e = -\frac{e}{2m_e}$ é a razão giromagnética que é uma característica intrínseca de cada átomo, e m_e é a massa do elétron. $\hat{S}_z$ é o operador da componente z do spin, que apresenta duas possíveis autofunções que são $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ sendo que

$$\hat{S}_z|\alpha\rangle = \frac{1}{2}\hbar|\alpha\rangle, \tag{2.4}$$

$$\hat{S}_z|\beta\rangle = -\frac{1}{2}\hbar|\beta\rangle, \tag{2.5}$$

com $\hat{S}_z = \hbar \hat{m}_s$, onde $\hat{m}_s = \pm\frac{1}{2}$, que substituindo no Hamiltoniano forma

$$\hat{\mathcal{H}} = g_e \beta_e B_0 \hat{m}_s, \tag{2.6}$$

o termo g_e o fator de correção do momento angular para o elétron livre, cujo valor, neste caso, é 2,00232 e $\beta_e = \frac{eh}{4\pi m_e} = 9,27408 \times 10^{-28}$ J/G, é o magnéton de Bohr [41].

As energias dos estados podem ser obtidas da Equação de Schrödinger

$$\hat{\mathcal{H}} \mid \Psi\rangle = E \mid \Psi\rangle. \tag{2.7}$$

$$\hat{\mathcal{H}} \mid \alpha\rangle = \frac{1}{2} g_e \beta_e B_0 \mid \alpha\rangle. \tag{2.8}$$

$$\hat{\mathcal{H}} \mid \beta\rangle = -\frac{1}{2} g_e \beta_e B_0 \mid \beta\rangle. \tag{2.9}$$

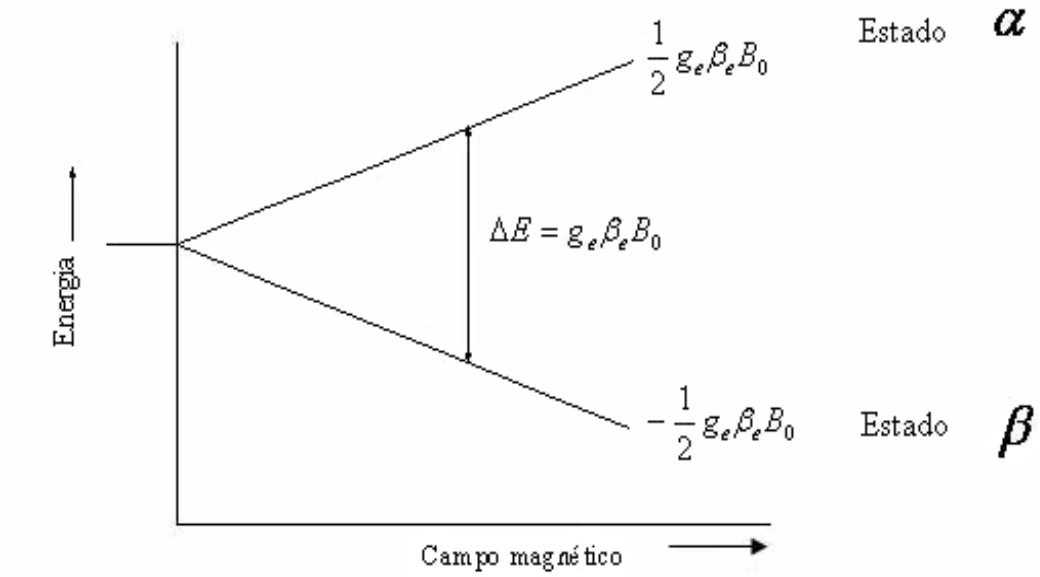

Figura 2.1: Separação entre os níveis de energia α e β, provocado pela ação de um campo magnético externo.

O campo levanta a degenerescência dos níveis de energia, formando os níveis de desdobramento Zeeman

$$E_{\beta}^{\alpha} = \pm\frac{1}{2} g_e \beta_e B_0, \tag{2.10}$$

$$\Delta E = g_e \beta_e B_0, \tag{2.11}$$

a Eq. 2.11 representa a variação de energia entre os níveis α e β, conforme mostrado na Fig. 2.1.

Como o momento magnético angular do spin não se orienta perfeitamente na direção do campo magnético, aparece à ação de um torque, que cria um movimento de precessão do momento magnético em torno da direção do campo aplicado. Este movimento de precessão pode ser descrito através da equação de Heisenberg, que pode ser usada para calcular a taxa de variações temporal das componentes μ_x, μ_y e μ_z:

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}\rangle = \frac{i}{\hbar}\langle[\hat{\mathcal{H}}, \hat{\mu}]\rangle. \tag{2.12}$$

esta equação pode ser escrita em termos das suas componentes como sendo:

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu_x}\rangle = -\gamma B_0\langle\hat{\mu_y}\rangle, \tag{2.13}$$

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu_y}\rangle = \gamma B_0\langle\hat{\mu_x}\rangle, \tag{2.14}$$

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu_z}\rangle = 0. \tag{2.15}$$

Portanto a Eq. 2.12 pode ser reescrita como:

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}\rangle = -\gamma B_0(\langle\hat{\mu_y}\rangle\vec{i} - \langle\hat{\mu_x}\rangle\vec{j}). \tag{2.16}$$

Sabendo que

$$\vec{B_0} \times \langle\hat{\mu}\rangle = \begin{vmatrix} \vec{i} & \vec{j} & \vec{K} \\ 0 & 0 & B_0 \\ \langle\hat{\mu_x}\rangle & \langle\hat{\mu_y}\rangle & \langle\hat{\mu_z}\rangle \end{vmatrix} = -B_0(\langle\hat{\mu_y}\rangle\vec{i} - \langle\hat{\mu_x}\rangle\vec{j}), \tag{2.17}$$

e substituindo Eq. 2.17 na Eq. 2.16, tem que:

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}\rangle = \vec{\omega}_L \times \langle\hat{\mu}\rangle, \tag{2.18}$$

onde

$$\vec{\omega}_L = \gamma\vec{B}_0 \tag{2.19}$$

A velocidade angular de precessão de Larmor, $\vec{\omega}_L$, que é dada pela Eq. 2.19 , é a velocidade com que o vetor momento angular precessiona em torno da direção do campo magnético

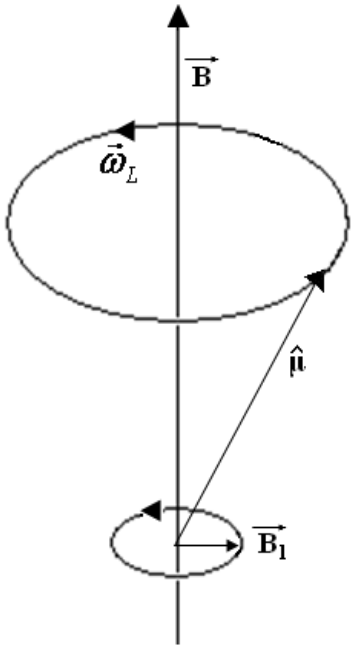

Figura 2.2: Movimento de precessão do mometo magnético angular do spin $\hat{\mu}$, em torno da direção em que é aplicado o campo externo $\vec{B}$ com velocidade de precessão de Larmor $\hat{\omega}_L$

aplicado (Fig. 2.2). Agora se multiplicarmos os dois membros da Eq. 2.19 por $\hbar$, obtemos a condição de ressonância, que pode ser expressa como:

$$h\nu_L = g_e \beta_e B_0, \tag{2.20}$$

sendo ν_L a freqüência de precessão de Larmor. Onde $h\nu_L = \Delta E$, ou seja, para que ocorra ressonância é necessário que a separação entre os dois níveis de energia seja exatamente igual a $h\nu_L$.

A atuação do campo eletromagnético nas amostras paramagnéticas produz uma troca de energia entre o campo e o sistema de spin, induzindo as transições eletrônicas de spins entre os dois níveis de energia Zeeman E_α e E_β. Nestas transições a probabilidade de ocorrer uma absorção ou emissão é a mesma. As populações dos níveis de energia (E_α e E_β) são dadas pela distribuição de Boltzmann, sendo que no equilíbrio térmico existe uma diferença entre as populações de spins, cuja razão pode ser determinada por:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right), \tag{2.21}$$

onde N_α é a população de spins do estado de energia superior ($m_\alpha = \frac{1}{2}$), N_β é a população do estado inferior ($m_\beta = -\frac{1}{2}$) , k é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}\ JK^{-1}$), T é a temperatura absoluta e ΔE é definida pela Eq. 2.11, que substituída em Eq. 2.21, resulta em

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = exp\left[-\frac{g_e\beta_e B_0}{kT}\right]. \tag{2.22}$$

Se as populações de spins nos dois estados fossem iguais, não seria observada nenhuma absorção resultante, pois o número de spins excitados pela radiação se igualaria exatamente ao número de spins que produziriam emissão induzida. Agora expandindo o lado direito da Eq. 2.22 em série de Maclaurin e trucando a série depois do segundo termo, tem que

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} \cong 1 - \frac{g_e\beta_e B_0}{kT} = 1 - \frac{g_e\beta_e B_0}{kT}. \tag{2.23}$$

Esta equação mostra que no equilíbrio térmico, o estado quântico de menor nível de energia apresenta uma população de spin ligeiramente superior que a do estado de maior energia, um sutil acréscimo de população de spin que permite a absorção de energia quando $\Delta E = h\nu$. Se a diferença de população entre os dois níveis de energia for definida por $n = N_\alpha - N_\beta$ e a população total de spins como sendo $N = N_\alpha + N_\beta$, tem que

$$\frac{n}{N} = \frac{g_e\beta_e B_0}{2kT} = \frac{\gamma\hbar B_0}{2kT}, \tag{2.24}$$

mostrando que a diferença de população relativa é proporcional à intensidade do campo magnético e também ao inverso da temperatura absoluta.

O sentido da absorção vai do estado β para α, devido ao fato que β apresenta spins excedentes. E com ela ocorrerá uma redução da população de spin do estado β e um progressivo aumento da população do estado α até que as populações nos dois estados se igualem. Ocorrendo este fenômeno, denominado de *saturação do sinal de ressonância*, não há mais absorção de energia e o sinal de ressonância desaparece. Mas graças às interações entre os spins e a suas vizinhanças, devido ao movimento aleatório dos átomos ou moléculas, as quais promovem troca de energia, a diferença de população de spin entre os níveis é

restaurada. Esses processos de restauração são denominados como *processos de relaxação* que são o responsável pela manutenção das populações de spins da condição de equilíbrio térmico.

2.3 Processos de Relaxação

Com a absorção de energia pelo sistema de spin, ocorrem mais transições do estado β para o estado α e se não houver um mecanismo que promova a dissipação ou remoção da energia absorvida pelos spins, em pouco tempo as populações dos dois estados se igualam. Com isto haveria a mesma probabilidade de transição nos dois sentidos, o que interromperia a absorção de energia de microondas extinguindo o sinal de RPE. Felizmente, através de mecanismos de troca de energia entre os spins e a vizinhança, devido ao movimento aleatório de átomos ou moléculas, a população de spin do nível inferior pode ser reposta. Este mecanismo está relacionado aos processos de relaxação que na espectroscopia de RPE são dois: a relaxação spin-rede, ou longitudinal, e a *relaxação spin-spin*, ou *transversal* [41].

2.3.1 Relaxação Spin-Rede

Quando o sistema de spin libera energia para a vizinhança, que pode ser uma rede cristalina no sólido ou moléculas vizinhas no líquido, passando do estado de maior energia $m_S = +\frac{1}{2}$ para o estado de menor energia $m_S = -\frac{1}{2}$ (no caso do spin eletrônico), sendo esta energia dissipada na forma de calor, dizemos que ocorreu a relaxação spin-rede.

A relaxação spin-rede é um decaimento exponencial de primeira ordem caracterizado por um tempo de relaxação $\mathbf{T_1}$, que é uma medida do tempo de vida médio dos elétrons no estado de maior energia [42]. Esta relaxação depende de quão fortemente o sistema de spin está "acoplado"a rede. Geralmente T_1 apresenta pequenos valores, sendo longo nos sólidos cristalinos e líquidos viscosos, onde a mobilidade é menor. À medida que a mobilidade aumenta, a freqüência vibracional e rotacional cresce, elevando assim a probabilidade de uma variação magnética de intensidade apropriada para uma transição de relaxação; T_1 fica

mais curto. Se T_1 ficar muito curto, as linhas podem tornar-se tão largas que a transição de RPE não é observada. Agora se T_1 é longo demais, há uma grande possibilidade de ocorrer o fenômeno de saturação, ou seja, as transições $m_S = -\frac{1}{2}$ para $m_S = +\frac{1}{2}$ acontecem tão rápido que o sistema não tem tempo de relaxar. Esta situação ainda fica mais intensa, quando é aumentada a potência de microondas. Através do princípio de incerteza de Heisenberg é possível visualizar o efeito de alargamento de linha de ressonância provocado pela relaxação. Considerando que um determinado estado de energia apresente um tempo de vida τ.

$$\Delta E.\tau \cong h, \tag{2.25}$$

ou

$$h.\Delta\nu.\tau \cong h, \tag{2.26}$$

portanto,

$$\Delta\nu \cong \frac{1}{\tau}, \tag{2.27}$$

onde $\Delta\nu$ e ΔE são as incertezas nos valores de freqüência e energia desse estado. Agora partindo da Eq. 2.20, podemos escrever

$$h.\Delta\nu = g\beta.\Delta B. \tag{2.28}$$

Substituindo a Eq. 2.27 tem que

$$\Delta B \cong \frac{h}{g\beta}.\frac{1}{\tau}. \tag{2.29}$$

Desta relação é fácil ver que quanto menor o tempo de vida T_1 do estado excitado tanto maior será a largura de linha, isto é, tempos de relaxação curtos levam às linhas de ressonâncias largas [43].

2.3.2 Relaxação Spin-Spin

Vários outros efeitos tendem a diminuir os tempos de relaxação e, portanto, a alargar as linhas de RPE. Entre os efeitos mais importantes está a interação magnética

dipolar entre dois momentos magnéticos que, em geral, podem ser divididas em estática e dinâmica. As interações estáticas resultam em linhas de RPE muito largas, obrigando, na maioria das vezes, a realização de uma diluição das amostras sólidas. Um dos efeitos dinâmicos da interação dipolar, entre spins idênticos, é o de causar mudanças de estados simultâneos dos spins, o que limita o tempo de vida de um spin no estado excitado.

A relaxação spin-spin não é capaz de dissipar a energia do sistema de spin, portanto, não consegue provocar uma redução na saturação, mas contribui para o alargamento de linha, devido à redução do tempo de vida do spin no estado excitado. Esta relaxação está relacionada com as orientações relativas dos spins, cuja distribuição aleatória de suas direções muda exponencialmente no tempo, com uma constante de tempo $\mathbf{T_2}$ conhecida como tempo de relaxação spin-spin ou transversal [41]. O T_2 se encontra associado com a largura de linha do sinal de RPE de modo que

$$\Delta\nu \cong \frac{1}{T_2}, \tag{2.30}$$

pois quanto menor é o tempo de relaxação spin-spin, maior será a largura de linha de ressonância. Este processo depende da intensidade e a distribuição dos campos locais em torno dos centros paramagnéticos, já que a largura de linha depende da coerência entre os movimentos de precessão dos spins em torno do campo magnético, e a freqüência de precessão é alterada conforme a intensidade do campo local [44].

Assim, geralmente, a largura de linha intrínseca é determinada por T_2, que é mais curto, e não por T_1. E no caso de radicais livres em solução, que é o caso mais comum em RPE, a forma de linha é Lorentziana. Para os sólidos, a forma de linha é geralmente Gaussiana, que é característica de uma distribuição aleatória de linhas superpostas [43].

2.4 Interação nuclear Hiperfina

A Interação Hiperfina é o desdobramento das linhas de ressonância nos espectros de RPE resultante da interação magnética do spin do elétron com os momentos de dipolo magnético dos núcleos do radical [41]. O spin de um núcleo é caracterizado pelo número

quântico I, podendo ter valores como $0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, ...$, e o número de estados possíveis é dado por $(2I+1)$. Análogo ao caso do elétron, o momento magnético de spin do núcleo poderá ter $(2I+1)$ orientações diferentes em relação a um eixo no espaço. Conforme a orientação do spin nuclear, a contribuição do spin de um núcleo para o campo magnético local $\vec{B}$, pode aumentar ou diminuir o campo aplicado. Assim haverá $(2I+1)$ campos locais, desdobrando as linhas do espectro em $(2I+1)$ linhas hiperfinas de intensidades iguais [45].

Para a Interação Hiperfina existem duas contribuições. Uma aparece quando um elétron num orbital $p, d, f, ...$ está próximo do núcleo, de modo que o momento de dipolo do elétron $(\hat{\mu}_e)$ e do núcleo $(\hat{\mu}_n)$ fiquem separados por uma distância $\vec{r}$. Neste caso, o campo local produzido pelo núcleo se parece com aquele de um dipolo magnético puntiforme Fig. 2.3. Mas esta interação clássica depende também do ângulo formado entre a linha que liga os dipolos e o campo magnético aplicado $\vec{B}$. A interação resultante é uma *interação dipolo-dipolo* ou *anisotrópica* devido as características deste tipo de interação, pois depende da orientação de $\vec{B}_{loc}$ [36, 41]. Esta interação pode ser representada pelo operador

$$\hat{\mathcal{H}}_D = -g_e\beta_e g_N\beta_N \left[\frac{\hat{S}.\hat{I}}{r^3} - \frac{3(\hat{S}.\vec{r})(\hat{I}.\vec{r})}{r^5}\right], \tag{2.31}$$

onde g_N e β_N são o fator g nuclear e o magnéton de Bohr nuclear, respectivamente, $\hat{S}$ e $\hat{I}$ são os operadores de spin eletrônico e nuclear, respectivamente, e r é a distância elétron-núcleo [36].

Expandindo o vetor em termos das coordenadas cartesianas, pode-se reescrever a Eq. 2.31 na forma tensorial, da seguinte forma:

$$\hat{\mathcal{H}}_D = \hat{S}.g_e\beta_e g_N\beta_N \begin{bmatrix} \left\langle\frac{3x^2-r^2}{r^5}\right\rangle & \left\langle\frac{3xy}{r^5}\right\rangle & \left\langle\frac{3xz}{r^5}\right\rangle \\ \left\langle\frac{3xy}{r^5}\right\rangle & \left\langle\frac{3y^2-r^2}{r^5}\right\rangle & \left\langle\frac{3yz}{r^5}\right\rangle \\ \left\langle\frac{3xz}{r^5}\right\rangle & \left\langle\frac{3yz}{r^5}\right\rangle & \left\langle\frac{3z^2-r^2}{r^5}\right\rangle \end{bmatrix} .\hat{I}, \tag{2.32}$$

$$\hat{\mathcal{H}}_D = \hat{S}.\hat{T}.\hat{I}. \tag{2.33}$$

Cada elemento da matriz representa uma média da função de onda do elétron

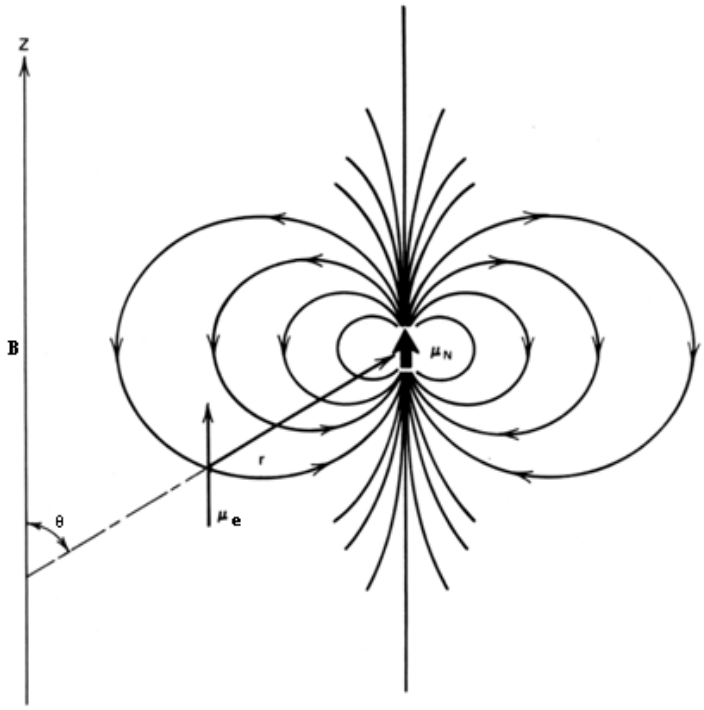

Figura 2.3: Interação dos momentos de dipolos do elétron ($\hat{\mu}_e$) e do núcleo ($\hat{\mu}_n$). O vetor $\hat{\mu}_e$ é indicado pelo estado $\hat{m}_S = -\frac{1}{2}$ e o vetor $\hat{\mu}_n$ é indicado pelo estado $\hat{I} = +\frac{1}{2}$. O ângulo θ é formado entre o vetor $\vec{r}$, que liga os dipolos, e o campo aplicado $\vec{B}$.

desemparelhado, sendo $\bar{T}$ o tensor de acoplamento hiperfino. Os elementos da diagonal $\bar{T}_{ii}$ do tensor podem ser representados pela matriz

$$T_{ii} = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3i^2 - r^2}{r^5} \right\rangle, \tag{2.34}$$

onde os "bracket", denota o valor esperado em cima de toda a distribuição eletrônica [36,46]. Similarmente, os elementos do tensor fora da diagonal são

$$T_{ij} = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3ij}{r^5} \right\rangle. \tag{2.35}$$

A segunda contribuição para a Interação Hiperfina ocorre quando um elétron desemparelhado se encontra no orbital **s**. Como este orbital apresenta simetria esférica em torno do núcleo, à interação dipolo-dipolo tem média nula. Porém, a probabilidade do elétron deste orbital estar na posição do núcleo não é nula, portanto sendo incorreto tratar esta interação como a interação clássica entre dois dipolos. Esta interação, denominada

interação de contato ou *de Fermi* [41, 47], depende da aproximação entre um elétron e o núcleo e, sendo assim, ocorre somente se o elétron ocupar um orbital **s**. A energia da interação isotrópica pode ser aproximadamente determinada por

$$E_{iso} = -\frac{8\pi}{3} |\psi(0)|^2 \mu_e \mu_N, \tag{2.36}$$

aqui $|\psi(0)|^2$ representa a probabilidade de um elétron ser encontrado no núcleo. O operador Hamiltoniano para a interação de contato pode ser obtido da Eq. 4.2, bastando substituir os momentos magnéticos pelos seus operadores correspondentes

$$\hat{\mu}_{N_z} = g_N \beta_N \hat{I}, \tag{2.37}$$

o que permite escrever

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \hat{S}.\hat{I} \tag{2.38}$$

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = A\hat{S}.\hat{I} \tag{2.39}$$

A é chamado de *constante de acoplamento hiperfino* (medida em Hertz, podendo ser convertida em unidade de campo) [48].

Agora escrevendo o Hamiltoniano da interação hiperfina de uma forma mais generalizada, levando em conta as duas contribuições, dipolo-dipolo e a de Fermi temos:

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = \hat{S}.\hat{T}.\hat{I} + A\hat{S}.\hat{I} \tag{2.40}$$

2.5 O Método dos Marcadores de Spin

Para a aplicação da técnica de RPE é necessário que o sistema em estudo tenha elétrons desemparelhados, ou seja, que apresente centros paramagnéticos. Portanto, o maior problema desta técnica é que a maioria dos sistemas, inclusive os sistemas biológicos e bioquímicos, são diamagnéticos (não possuem elétrons desemparedados). Este problema tem sido contornado utilizando um radical livre estável (marcador de spin) que pode ser

incorporado na amostra através de ligação covalente ou, da difusão simples. Desta forma, é possível ampliar os sistemas de estudos para além dos que possuem paramagnetismo intrínseco.

O *método de marcadores de spin* foi proposto inicialmente em 1965 por McConnell [49], que consistia incorporar em um sistema biológico uma pequena proporção de moléculas contendo um radical paramagnético, para desempenharem o papel de sonda e, assim, permitirem a investigação do meio em que se encontram [50]. Estes marcadores de spin geralmente derivados do nitróxido possuem boa compatibilidade com os sistemas biológicos e um sinal de RPE extremamente adequado para gerar informações sobre o sistema. Por análise espectral ou simulação computacional são obtidas informações sobre a dinâmica molecular, polaridade local, orientação molecular, anisotropia do movimento molecular, medidas intermoleculares precisas, interações de espécies moleculares e outros parâmetros.

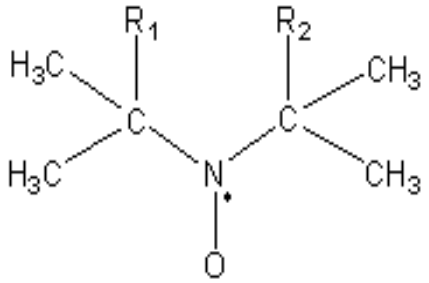

Figura 2.4: Fórmula química geral do radical nitróxido, onde R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador spin.

Um marcador de spin, em geral, pode ser qualquer espécie paramagnética (ex. Mn^{2+}, Co^{2+}, outros íons de metais de transição e lantanídeos). Porém, os mais usados,contém o nitróxido (Fig. 2.4) como elemento paramagnético que é um radical livre bastante estável podendo participar de reações químicas sem o envolvimento do elemento paramagnético, nos processos de síntese destes marcadores. Os radicais nitróxidos podem ser líquidos ou sólidos e apresentam um brilhante colorido que varia do amarelo ao vermelho escuro, dependendo do tamanho do anel e dos substituintes R_1 e R_2, que são radicais apropriados

para a ligação do marcador à molécula que se quer estudar [51, 52]. A presença dos quatro grupos metila adjacentes ao fragmento N-O, conferem estabilidade adicional aos marcadores formados e impedem que o elétron desemparelhado circule pelo anel piperidínico. O nitróxido é compatível tanto com meios polares quanto apolares; em meios polares o átomo de oxigênio forma ligação de hidrogênio e em meios apolares os grupos metilas garantem a sua dissolução.

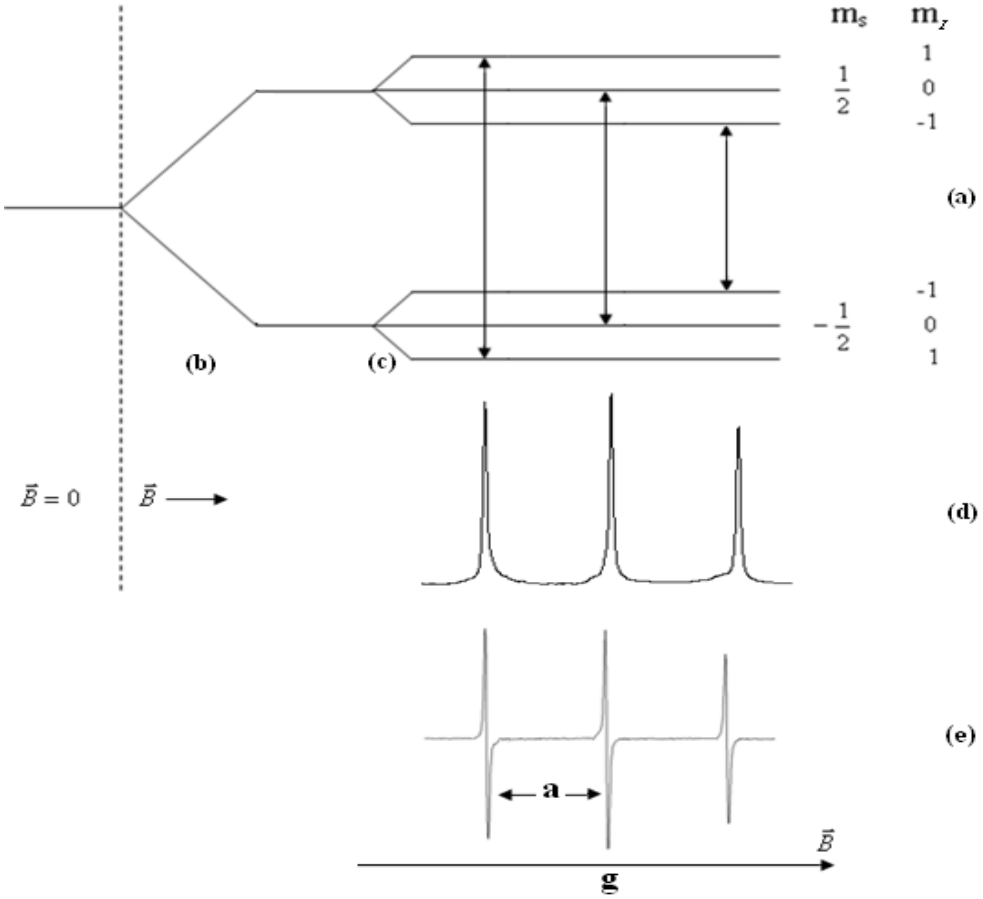

Figura 2.5: (a) Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) num campo magnético: (b) sem interação e (c) com interação com o spin do N (estrutura hiperfina). (d) espectro de adsorção e (e) primeira derivada do espectro de absorção; **a** é a constante de desdobramento hiperfino, a posição da linha central é definida pelo fator g [53].

Nos nitróxidos, o elétron desemparelhado que é o responsável pelo paramagnetismo interage com o núcleo do nitrogênio que tem spin nuclear $I = 1$, fazendo o radical sentir à atuação de três campos locais diferentes devido aos valores do número quântico de spin $m_I = -1, 0, +1$, resultando no desdobramento dos níveis de energia em três, o que faz do

espectro de RPE em solução um tripleto com intensidades muito próximas e separadas pela constante de acoplamento hiperfino isotrópico, a_0, Fig. 2.5. Para o caso de $m_I = +1$, como existe uma contribuição do campo local favorável ao externo, a ressonância se dá em campo externo menor; já quando $m_I = 0$ a contribuição do campo local para o campo externo é nula e, quando $m_I = -1$ a contribuição vai ser desfavorável ao campo externo. Mas a ressonância que ocorre para os três valores distintos de campo, deve satisfazer a regra de seleção $\Delta m_I = 0$ [54]. A distância entre duas linhas adjacentes do espectro de RPE é medida em Gauss (G), sendo exatamente a medida de a_0, enquanto o fator g define a posição da linha central em relação ao campo magnético aplicado (Fig. 2.5e).

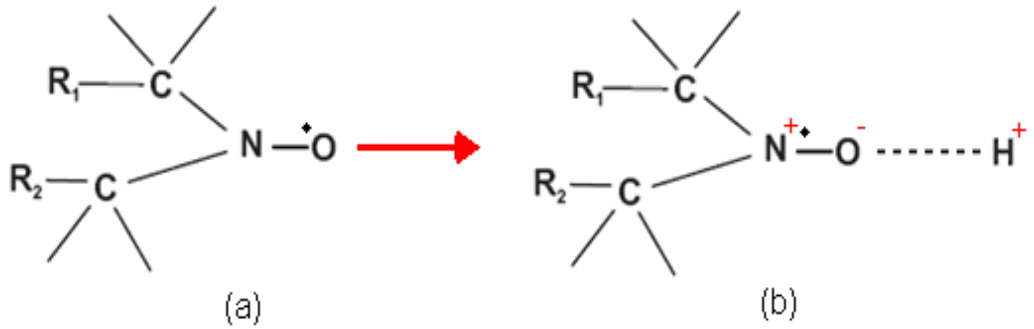

Figura 2.6: Figura esquemática mostrando o oxigênio do radical nitroxido realizando ligação de hidrogênio, onde o hidrogênio polariza a ligação N - O fazendo que o elétron se localize mais próximo do núcleo do átomo de nitrogênio aumentando assim a contribuição do acoplamento hiperfino isotrópico.

Mas o valor de a_0 pode sofrer influência do meio em que se encontra o radical nitróxido. Por exemplo, quando o marcador de spin está dissolvido em meio aquoso, o oxigênio da ligação N-O do nitróxido realiza ligação de hidrogênio com moléculas de água, conforme esquematizado na Fig. 2.6. O átomo de hidrogênio da molécula de água contribui com uma carga local positiva que gera um campo elétrico sobre a molécula do nitróxido polarizando a densidade eletrônica da ligação N-O. Com isto a região onde está o átomo de nitrogênio fica mais positiva. Assim o elétron desemparelhado do radical, cuja localização sobre a ligação N-O é pouco restrita, pelo fato do nitróxido ser um radical livre (o elétron está

fracamente ligado), se aproxima mais do núcleo do nitrogênio, aumentando assim a interação hiperfina isotrópica. Por este fato, o valor do desdobramento hiperfino isotrópico que pode ser medido no espectro de RPE, tem a influência da constante dielétrica do solvente, sendo um parâmetro importante para se acompanhar mudanças de polaridade no meio.

2.6 Anisotropia Espectral

Grande parte das aplicações do método de marcadores de spin é realizada em sistemas biológicos em solução, onde para se obter informação sobre a dinâmica molecular do meio se torna necessário o cálculo do tempo de correlação. Este cálculo é possível devido ao fato da posição e o desdobramento das linhas (especificadas pelos valores de **g** e constante hiperfina) dependerem da direção do campo magnético em relação a um sistema de eixos fixo na molécula marcadora.

Os efeitos do desdobramento anisotrópico podem ser representados pelos tensores de segunda ordem $\bar{g}$ e $\bar{a}$, que tem seus eixos orientados como mostrado na Fig. 2.7, onde a ligação N-O em geral se encontra sobre o eixo **x**, o eixo **z** direção do orbital **2p**π do nitrogênio e o eixo **y** se encontra perpendicular simultaneamente aos eixos **x** e **z**. Apesar dos eixos principais dos tensores $\bar{g}$ e $\bar{a}$ normalmente se coincidirem, isto não é obrigatório.

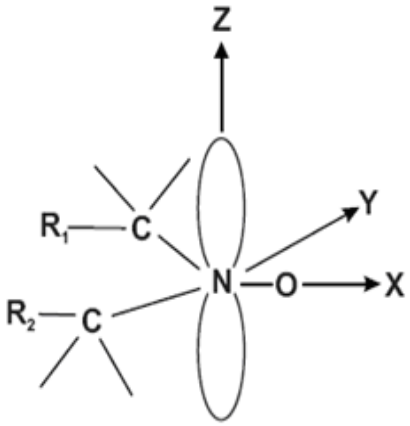

Figura 2.7: Esquema do radical nitróxido, mostrando as orientações dos eixos principais dos tensores de segunda ordem $\bar{g}$ e $\bar{a}$. Os grupos R_1 e R_2 permitem a reação do radical sem envolver o elemento para-magnético $N-O$.

A Fig. 2.8 apresenta espectros de um marcador de spin orientado em um cristal simples. Foram obtidos espectros com a direção do campo paralela aos eixos principais do radical nitróxido, como indicado na figura. Ao longo do eixo z, onde se encontra grande parte da densidade eletrônica, verifica-se o maior valor para a constante de acoplamento hiperfino, $\mathbf{A_{zz}} \cong 32$. Já os desdobramentos observados com a aplicação do campo nos eixos **x** e **y** são geralmente menores, sendo $\mathbf{A_{xx}} \cong \mathbf{A_{yy}} \cong \mathbf{6}$. A mudança na direção do campo em relação aos eixos do nitróxido causa também um deslocamento dos espectros devido a um aumento do fator g ($g_{xx} = 2,0090$ G, $g_{yy} = 2,0060$ G, $g_{zz} = 2,0027$ G), provocando um deslocamento para a esquerda.

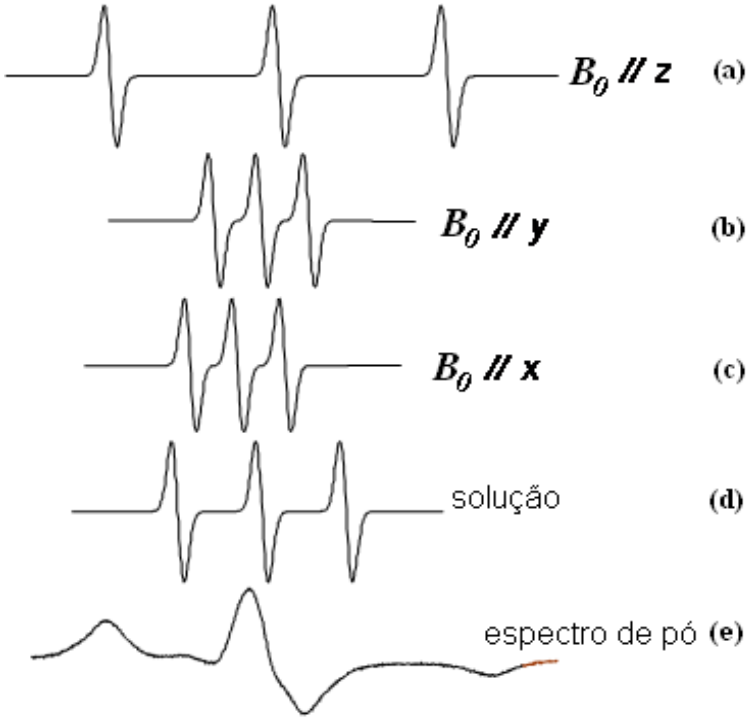

Figura 2.8: Espectro de RPE retratando a anisotropia do fator g e da constante de acoplamento hiperfino. (a) Campo magnético aplicado paralelo ao eixo z, (b) na direção do eixo y e (c) quando o campo está ao longo do eixo x. (d) Espectro do marcador em solução e (f) espectro obtido a -70 °C (espectro de pó).

Quando o radical se encontra em uma solução (por exemplo, em solução aquosa) pode girar rapidamente e a anisotropia do espectro desaparece, sendo observadas as médias

dos valores de fator g e da constante de acoplamento hiperfino, da seguinte forma:

$$a_0 = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (2.41)$$

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (2.42)$$

Entretanto, quando o marcador de spin tem o movimento mais lento, torna-se importante as contribuições de diferentes orientações, fazendo com que a média temporal não seja mais efetiva. No limite em que o movimento do marcador está muito lento (num líquido viscoso) ou congelado, tem-se a forma espectral denominada de espectro rígido ou "espectro de pó"(Fig. 2.8e) . O espectro de pó corresponde à soma de todas as orientações possíveis [43].

2.7 Tempo de Correlação Rotacional

A habilidade mais importante da espectroscopia de RPE de marcadores de spin é a avaliação dinâmica molecular nos sistemas de estudo, que pode ser feita medindo o tempo de correlação rotacional, τ_c. Este parâmetro de RPE está relacionado com o tempo que o marcador leva para se reorientar em seu movimento de rotação. A sensibilidade neste tipo de medição depende dos valores de τ_c. Na região do movimento rápido, com τ_c menor que 10^{-9} s, a sensibilidade dos espectros às mudanças de movimento é boa, sendo mais fácil avaliar τ_c. A segunda região compreendida de $10^{-9}s < \tau_c < 10^{-7}$ s, de movimento intermediário, ainda possui uma boa sensibilidade às mudanças de τ_c, mas para se obter uma melhor avaliação torna-se necessário a utilização de técnicas de simulação computacional. O terceiro intervalo que corresponde à região de movimento lento com $\tau_c > 10^{-7}$, é a região de menor mobilidade e de mais difícil determinação do movimento [51].

Mesmo sem realizar a simulação dos espectros é possível avaliar o τ_c, através de parâmetros definidos nos espectros, conforme mostrado na Fig. 2.9, e com o uso de fórmulas que foram determinadas de modo semi-empírico. O valor de τ_c é proporcional à largura de linha, W_0, por exemplo. A fórmula utilizada nesta determinação tem a seguinte

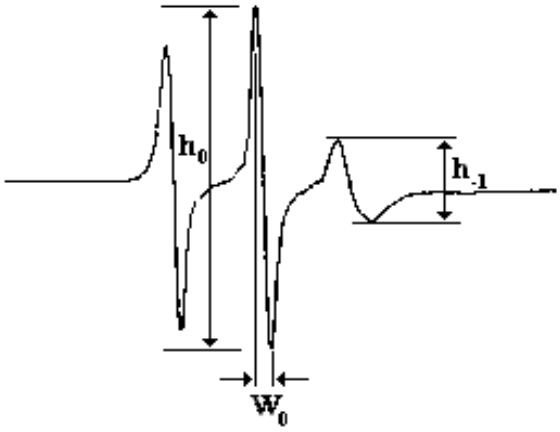

Figura 2.9: Espectro de RPE do marcador de spin 16-SASL em membranas musculares a 37º C com varredura de 100 G, indicando a medida dos parâmetros h_0, W_0 e h_{-1} .

expressão [55]:

$$\tau_c = kW_0 \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right], \tag{2.43}$$

onde $k = 6,5 \times 10^{-10}$ s. G^{-1}, W_0 é largura pico a pico da linha central medida em G (Gauss), h_0 é a intensidade da linha central e h_{-1} é a intensidade da linha de campo alto, ambas em unidades arbitrárias.

2.8 Simulação dos Espectros de RPE

Dependendo das características do marcador e do meio em que se encontra, os espectros de RPE podem apresentar formas de linhas bastante complexas, necessitando de simulação computacional para extrair o máximo de informações do sistema em estudo. Devido à heterogeneidade de membrana, o espectro experimental é composto por uma superposição de espectros do marcador em vários domínios [56]. Neste trabalho, os espectros de RPE foram simulados utilizado o programa EPRSIM (versão 4.99) que foi desenvolvido por Janez Strancar e colaboradores (Jozef Stefan Institute, Eslovênia). Este programa, de fácil manipulação, permite decompor um espectro em várias componentes espectrais e analisar os marcadores em diversas fases da amostra.

Finalizando este capítulo serão descritos alguns aspectos práticos da simulação

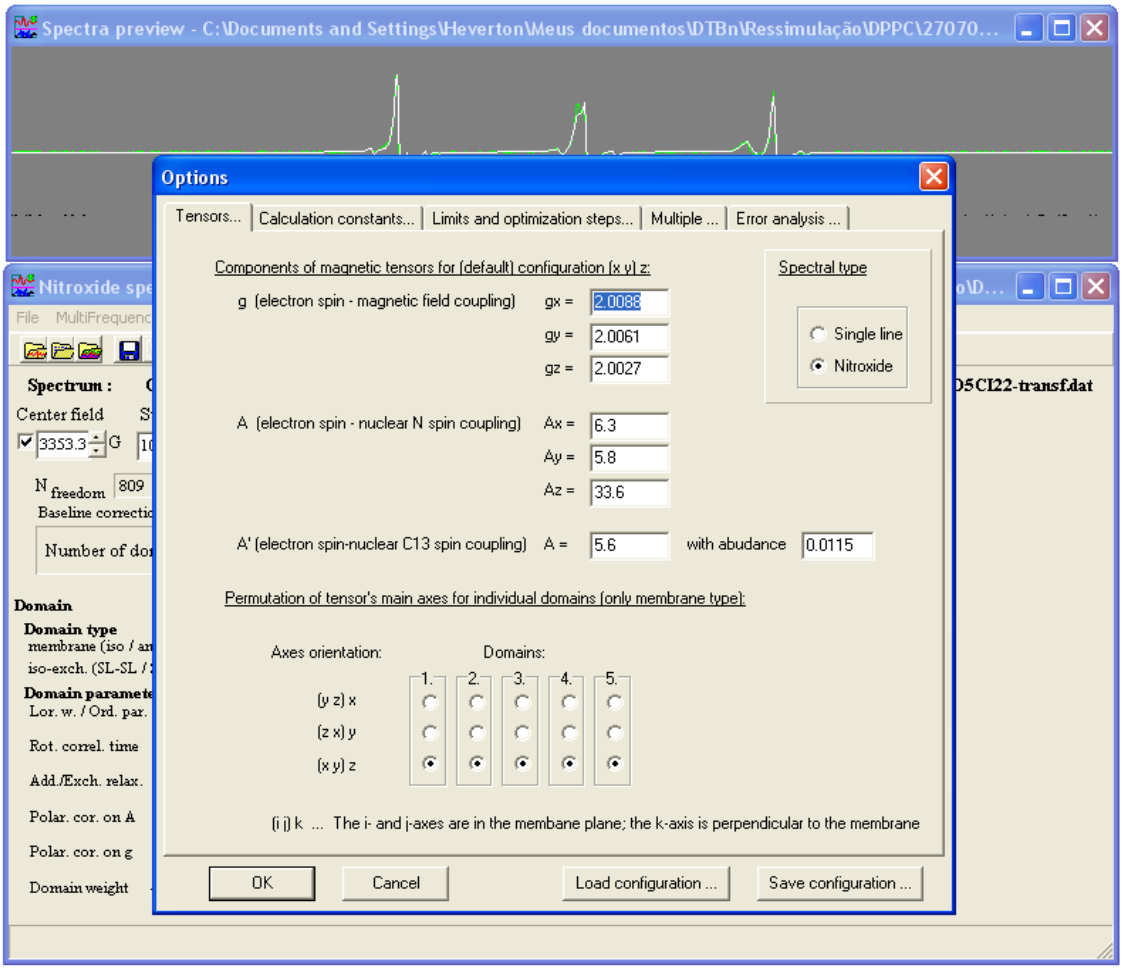

Figura 2.10: Janela do programa EPRSIM , versão 4.99, onde é permitido introduzir os valores dos tensores magnéticos A e g, a magnitude e abundância da interação do spin nuclear C-13 e também definir o eixo de simulação da membrana.

dos espectros de RPE deste trabalho, usando o programa EPRSIM. A base teórica da simulação de espectros de RPE do radical nitróxido em movimento rápido de rotação é avançada e a sua descrição está além dos objetivos deste trabalho.

Antes de realizar a simulação espectral, os espectros experimentais de RPE do marcador de spin DTBN (com varredura de campo magnético de 50 G) foram interpolados para que possuíssem 1024 pontos e 100 G de varredura, pois o programa somente simula espectros experimentais com este número de pontos [56,57]. Os valores dos tensores magnéticos A e g, utilizados como parâmetros de entrada, são inseridos no programa conforme mostra a Fig. 2.10. Da mesma forma, são inseridos os dados da magnitude e a abundância da

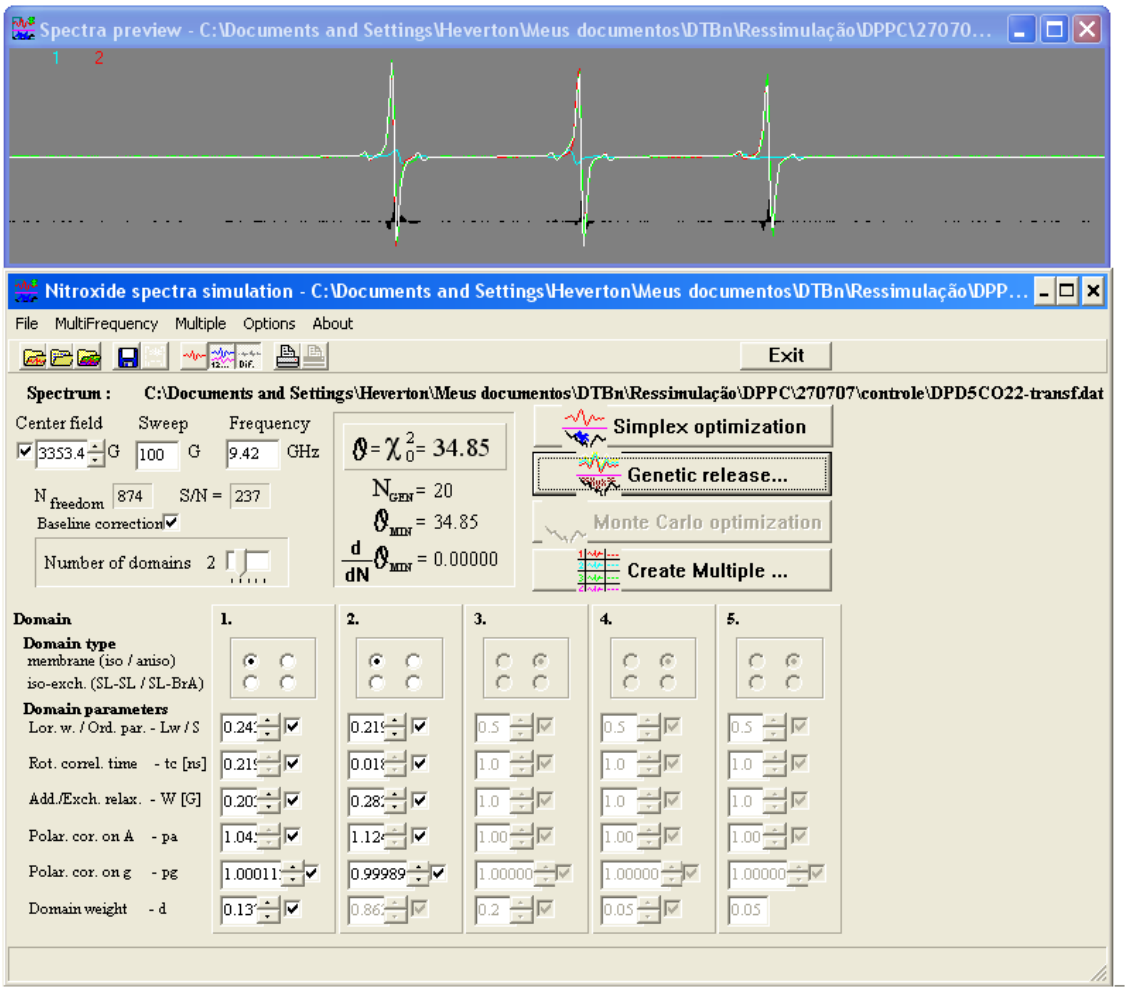

Figura 2.11: Janela do programa EPRSIM onde os parâmetros obtidos da simulação são fornecidos. O menor valor obtido na otimização do χ^2 reduzido também é apresentado. Nesta janela também é permitido escolher o número (duas componentes espectrais) e o tipo (isotrópico) de domínio da membrana, como também visualizar o espectro simulado (linha branca), o experimental (linha verde), o espectro da componente com menor (linha vermelha) e alta (linha azul) mobilidade.

interação spin nuclear C-13 que está presente nos espectros de RPE. Na mesma janela, o programa permite fixar o eixo da membrana.

Pelo fato dos espectros experimentais de RPE serem de um pequeno marcador de spin com alta mobilidade, a interação dos tensores magnéticos do radical nitróxido foi considerada como isotrópica. A escolha desta opção está mostrada na Fig. 2.11. Para este caso, o próprio programa inicialmente calcula a média dos tensores g e A, cujos traços são linearmente corrigidos com base nos parâmetros p_A e p_g , respectivamente, que são fatores gerados na obtenção do melhor ajuste (com estes valores e os dados iniciais dos tensores são

determinados os valores de a_0. Depois, o programa realiza o cálculo das formas de linhas básicas fornecendo os valores de dois parâmetros de linha, sendo um o tempo de correlação rotacional, τ_c, que está relacionado com as linhas do tipo Lorentziana, o outro é a constante de alargamento, W [56, 58]. Todos os parâmetros simulados são visualizados na janela de entrada, assim como o ajuste do espectro simulado com o experimental (Fig. 2.11).

A otimização dos parâmetros espectrais é obtida na melhor convergência entre os espectros experimental e teórico. Esta convergência é monitorada pelo parâmetro χ_0^2 reduzido, que é basicamente a soma dos quadrados residuais entre o espectro experimental e simulado, dividido pelo quadrado do desvio padrão do ponto experimental, σ, e pelo número de pontos no espectro experimental, N (para o nosso caso é igual a 1024 pontos) conforme a Eq. 2.44.

$$\chi_0^2 = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{(y_i^{exp} - y_i^{sim})^2}{\sigma^2}. \tag{2.44}$$

y_i^{exp} e y_i^{sim} são as respectivas intensidades do espectro experimental e simulado em um dado ponto. Tem sido verificado que a função χ_0^2 representa um bom critério para aperfeiçoar espectros com linhas pontiagudas, típico para soluções, mas é menos sensível para formas de linha mais largas [56, 59, 60].

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Condição de Operação do Espectrômetro

Todas as medidas deste trabalho foram feitas com um espectrômetro de RPE da marca BRUKER, modelo ESP300, com cavidade ressonante ER4102 ST, operando em banda X ($\backsim$9,4 GHz). As condições de operação foram: potência de microondas de 2 mW, freqüência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 0,25 G, campo central igual a 3365 G, varredura de campo magnético de 50 G; tempo de varredura de 168 segundos e constante de tempo de detecção, 41 ms. A temperatura foi controlada com uma precisão de $\pm$ 0,3°C pelo sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten, Germany).

3.2 Preparação do Estrato Córneo

Ratos da raça Wistar, recém nascidos, com menos de 24 h de vida (Fig. 3.1), foram utilizados na obtenção das membranas de EC. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e as membranas preparadas no laboratório de Biofísica do Instituto de Física (IF) da UFG. Primeiro os animais foram sacrificados por decapitação, usando um bisturi com lâmina nova, e depois foram removidos os membros (pernas e rabo) com o auxílio de uma tesoura. Com um corte longitudinal no abdômen foi feita a retirada da pele, a qual foi mergulhada em água destilada por aproximadamente 1 h. Depois a pele foi estendida sobre papel de filtro (Whatmam nº 2) com a parte

externa da mesma em contato com o papel, o qual foi colocado sobre um suporte. O suporte foi colocado em um dessecador contendo 0,5 L de hidróxido de amônia (NH_3, PA, Merck). Um segundo dessecador foi utilizado para fazer vácuo no dessecador contendo as peles e o hidróxido de amônia. As peles permaneceram no dessecador por 5 minutos e o vácuo foi reforçado aos 3 minutos. Após este processo as amostras foram retiradas do dessecador e colocadas em água destilada por aproximadamente 2 h.

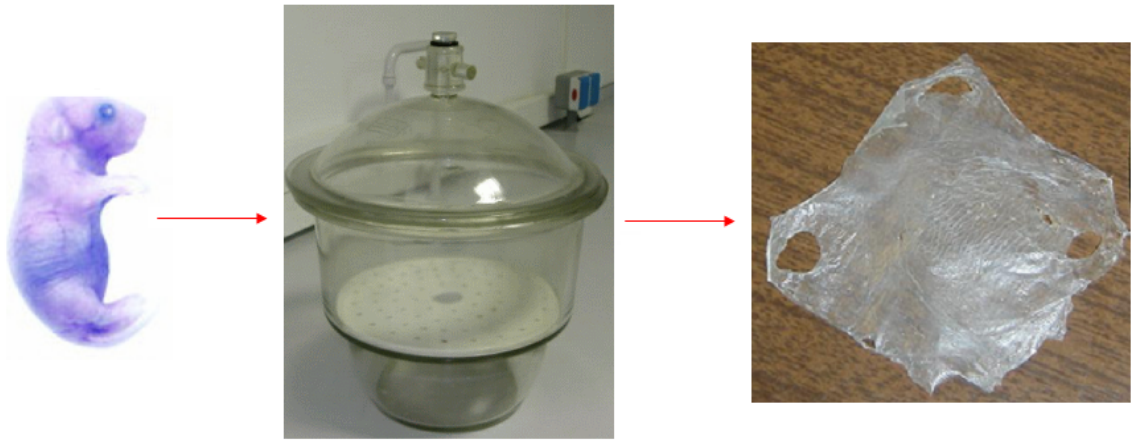

Figura 3.1: Rato da raça wistar com menos de 24 h de vida, do qual a epiderme foi retirada cirurgicamente. Depois de um tratamento químico a membrana de estrato córneo, já separada da epiderme, é levada a um dessecador para ser desidratada.

As peles foram retiradas da água e colocadas novamente sobre papel filtro com o lado do estrato córneo em contato com o papel. Friccionando o lado interno da pele contra o papel de filtro, pode-se separar o EC do restante da mesma. Em seguida os EC foram mergulhados em água destilada e depois recolhidos em telas de Teflon. Após a retirada do excesso de água das telas, elas foram colocadas em um suporte que foi introduzido em um dessecador contendo vácuo e sílica gel, onde permaneceram por aproximadamente 48 h. Após estarem totalmente desidratadas, as membranas de estrato córneo, foram retiradas das telas de Teflon e colocadas entre papéis de filtro e então mantidas sob vácuo em um dessecador contendo sílica gel, até serem utilizadas.

3.3 Marcação do Estrato Córneo

Para realizar a marcação das membranas de EC foi utilizado o Di-terc-butil nitróxido (DTBN), um pequeno marcador de spin que possui uma estrutura aberta relativamente simples (Fig. 3.2), adquirido da Sigma Chem. Co. (St Luiz, MO). Mas antes de realizar a marcação, a membrana desidratada foi dividida em pedaços de 3,0 mg e feita uma incubação prévia em uma solução de N-etilmaleimido (NEM) - Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA - a 50 mM por cerca de 15 h. Faz-se o uso do NEM, pois o mesmo reage com os grupos sulfidrilas (S-H) presente no EC impedindo que eles provoquem a redução do radical nitróxido, o que reduziria a intensidade do sinal de RPE. O DTBN se encontrava dissolvido a 10 mM em tampão salino-acetato (10 mM acetato, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA, pH 5,5). Um parte da membrana de EC tratada (3 mg) com NEM foi incubada em temperatura ambiente durante 1,5 h em 45 μL de tampão acetato contendo 0,2 mM do marcador DTBN e a desejada concentração de terpeno (Acros Organics, Gell, Belgium), o qual foi adicionado à amostra, dissolvido em 5 μL de etanol puro. As amostras de controle foram submetidas a uma preparação idêntica, no qual 5 μL de etanol foi adicionado sem os terpenos. Para finalizar, introduzimos o EC marcado, ainda úmido, dentro de capilares (1 mm de diâmetro interno) e retiramos o excesso de solvente com uma micro-seringa. Os capilares foram selados com chama e levados para as medidas de RPE, onde foram introduzidos em um tubo de quartzo (3 mm de diâmetro interno), juntamente com um fio de termopar, bem fino, para monitorar a temperatura da amostra.

3.4 Preparação e Marcação das Vesículas de DMPC e DPPC

Os lipídeos DMPC e DPPC com mais de 99% de pureza, foram obtidas da Avanti (Alabaster, AL, USA). Uma pequena quantidade de lipídeo (3,5 mg), foi dissolvida em um tubo de ensaio contendo uma mistura de solventes orgânicos de clorofórmio:metanol (2:1).

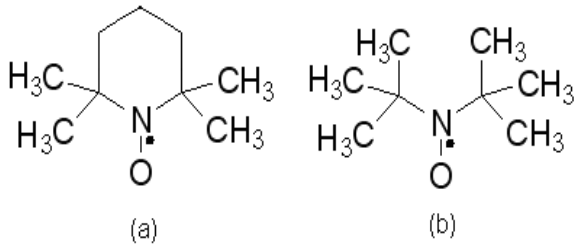

Figura 3.2: Estrutura química dos marcadores de spin (a) 2, 2, 6, 6-tetrametil-piperidine-1-oxil (TEMPO) e (b) Di-terc-butil nitróxido (DTBN). O marcador TEMPO foi utilizado em um trabalho anterior de nosso laboratório [54, 61].

O solvente foi evaporado para se obter a formação de um filme lipídico sobre as paredes internas do tubo de ensaio. Para a evaporação do solvente foi utilizado um jato moderado de gás de nitrogênio. Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados no vácuo em um dessecador contendo sílica gel por $\backsim$24 h (para garantir plena evaporação dos solventes). Os filmes lipídicos foram hidratados com 40 μL de tampão PBS (10 mM de fosfato, 150 mM de NaCl e 0,2 mM EDTA, pH 7.2) e, logo em seguida, os tubos de ensaio foram levados à estufa com temperatura de $\backsim$50°C (temperatura que corresponde à fase líquido-cristalina destas membranas), por cerca de 5 minutos, sendo depois agitados periodicamente em vórtex, à temperatura ambiente. Este processo de aquecimento e agitação foi repetido até se obter uma suspensão aparentemente homogênea de DMPC ou DPPC. Os terpenos foram adicionados dissolvidos em etanol a 33% (v/v, cerca de 1,5 μL de terpeno e etanol, dependendo da densidade do terpeno). Também foi adicionado 2,0 μL do marcador de spin DTBN dissolvido em tampão (10 mM). Estas amostras foram novamente vortexadas e as soluções foram transferidas para tubos capilares, os quais foram selados e deixados na geladeira por $\backsim$24 h (para se obter completa hidratação dos lipídeos das multicamadas). As medidas de RPE foram realizadas como no caso dos capilares com estrato córneo.

3.5 Simulação dos Espectros

As simulações dos espectros de RPE do marcador DTBN foram realizadas pelo

programa EPRSIM (versão 4.99) [56,59]. Este programa permite analisar um único espectro contendo duas componentes espectrais com diferentes mobilidades e parâmetros dos tensores magnéticos. O programa permite determinar as frações de cada componente que compõe o espectro composto e também o tempo de correlação rotacional, τ_c, de cada classe de marcadores de spin. Os autovalores dos tensores magnéticos utilizados na simulação para o fator **g** foram: $g_{xx} = 2,0088$, $g_{yy} = 2,0061$ e $g_{zz} = 2,0027$; e para o tensor **A** foram: $A_{xx} = 0,63$, $A_{yy} = 0,58$, e $A_{zz} = 3,36$ mT. Estes tensores de interação magnética **A** e **g** foram corrigidos linearmente pelo próprio programa com fatores de correção sobre os traços destes tensores, denotados por p_A e p_g, respectivamente. O sinal de RPE correspondente à interação do elétron com o spin nuclear do C-13 está presente em espectros de RPE do DTBN. Existe uma probabilidade de um dos átomos de carbono vizinhos ao nitrogênio no radical nitróxido (Fig. 3.2) ser um C-13. No programa, a magnitude esta interação superhiperfina foi assumida no valor de 0,56 mT e a abundância de C-13 assumida foi de 0,0115%.

Capítulo 4

Resultados

Neste capítulo será apresentado primeiramente os espectros de RPE do marcador de spin DTBN em membranas de DMPC, DPPC e EC, junto com a interpretação dos eventos biológicos envolvidos e, a seguir, são apresentadas as medidas de vários parâmetros espectrais relacionados com o coeficiente de partição do marcador entre as fases aquosas e hidrocarbônicas, a dinâmica rotacional e polaridade local em cada fase.

4.1 Interpretação dos Espectros de RPE

O espectro de EPR do marcador DTBN incorporado nas membranas de EC está mostrado na Fig. 4.1. A análise deste espectro revela que o mesmo é constituído de duas componentes espectrais indicando duas classes de marcadores, cada uma em um estado diferente de mobilidade. Tais componentes resultam de frações de marcadores de spin dissolvidos nos meios hidrofóbico (Fig. 4.1c) e polar (Fig. 4.1d); estas componentes espectrais foram denotadas por componentes H (fase hidrocarbônica) e P (fase polar), respectivamente. Através da simulação dos espectros de RPE com o programa EPRSIM foi possível separar as contribuições de cada componente no espectro composto bem como a taxa de difusão rotacional em cada uma. O espectro de melhor ajuste, formado pela soma das componentes teóricas H e P, está sobreposto ao espectro experimental (Fig. 4.1b).

A fração de marcadores da componente P, situados na fase aquosa, apresentam maior mobilidade sob a escala de tempo dos experimentos de RPE em banda X ($\backsim 9,4GHz$)

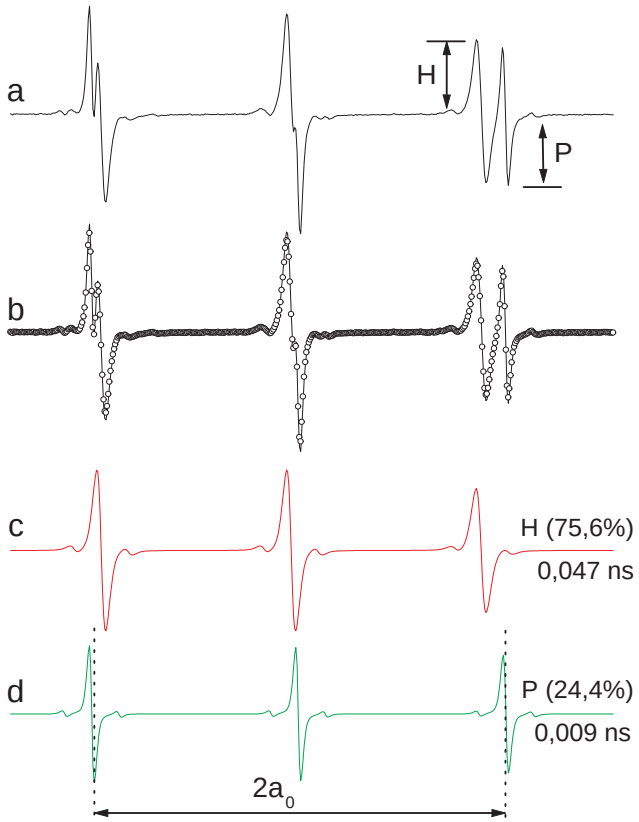

Figura 4.1: (a) Espectro de RPE do marcador de spin DTBN no Estrato Córneo (pH 5,1, 50°C) e os parâmetros H e P que define o parâmetro $f = H/(H + P)$). (b) Espectro experimental (linha) e simulado (círculos vazios). O melhor ajuste foi obtido através do programa EPRSIM, usando o modelo de duas componentes para todos os ajustes. (c) Componente H e (d) Componente P, com o respectivo parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico $2a_0$. Na figura também está indicada a porcentagem que cada componente representa no espectro composto e também o tempo de correlação, τ_c, na escala dos ns. A varredura de campo magnético é de 50 G.

para radicais nitróxidos. Todas as duas componentes apresentam três linhas de ressonância bem definidas, onde facilmente se pode aferir o parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico, $2a_0$ (Fig 4.1d), o qual é muito sensível à polaridade do ambiente local do nitróxido (em ambiente polar ocorre a formação de ligação de hidrogênio com o grupo $N - O$ do

nitróxido e isto causa um aumento da densidade de elétron desemparelhado sobre o núcleo do nitrogênio levando ao aumento da interação hiperfina, maiores detalhes são encontrados no Capítulo 2). O parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico observado para a componente P é similar ao obtido para marcadores de spin em tampão, indicando que os radicais nitróxidos desta componente estão expostos à água. Agora, os resultados obtidos para a componente H, mostra que as sondas de spin estão localizadas na membrana [61], tendo menor mobilidade e menor valor do parâmetro $2a_0$.

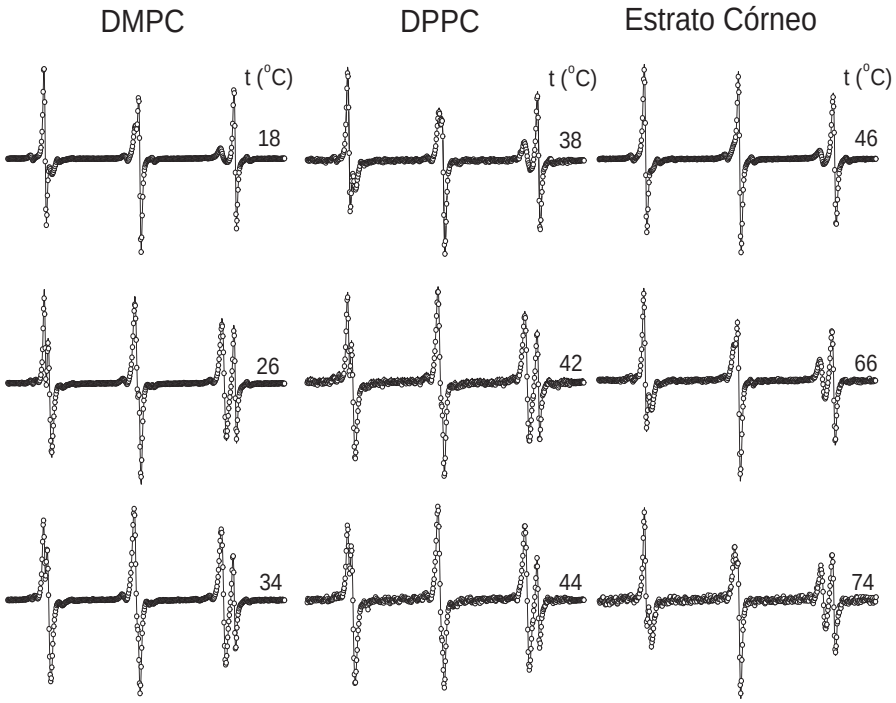

Figura 4.2: Espectro de RPE experimental (linha) e simulado (círculos abertos) do DTBN em membranas de DMPC, DPPC e estrato córneo para várias temperaturas. A varredura de campo magnético é de 50 G.

O parâmetro f, igual a $H/(H + P)$ (Fig. 4.1a)), tem sido utilizado inicialmente na literatura como a fração aproximada do marcador de spin dissolvido na membrana

[62]. Este parâmetro tem a vantagem de ser medido diretamente nos espectros e mais adiante será comparado com o parâmetro da fração de marcadores na membrana obtido por simulação espectral, N_H. Um modelo de duas componentes espectrais descrevendo uma difusão Browniana do DTBN foi adotado para simulação dos espectros de RPE. O próprio programa pode simular as linhas satélites laterais da contribuição do spin-eletrônico nuclear do C-13 (existe uma probabilidade considerável de um dos átomos de carbono vizinho ao nitrogênio ser o isótopo C-13, cujo spin nuclear vale $\frac{1}{2}$, causando desdobramento superhiperfino; por exemplo, na Fig 4.1c, ao lado de cada uma das linhas de ressonância do espectro é vista uma linha satélite do referido dubleto). O espectro de RPE de melhor ajuste (círculos abertos) e o experimental (linhas) do DTBN em membranas de DMPC, DPPC e EC estão mostrados na Fig 4.2 para três temperaturas distintas.

Pode-se verificar que a população relativa da componente H aumenta, com o aumento da temperatura, indicando uma elevação da partição do marcador para o meio hidrofóbico. O espectro de RPE é sensível ao tempo de correlação rotacional, o qual representa uma avaliação do tempo médio que o marcador gasta para se reorientar, sendo este da ordem de 10^{-10} a 10^{-8} segundos [63].

4.2 Coeficiente de Partição do DTBN Entre as Fases Polar e Hidrocarbônica

As mudanças na partição do marcador com relação à temperatura podem ser observadas na Fig 4.3, onde são mostradas as dependências do parâmetro espectral f e da população relativa da componente N_H. Como o parâmetro "f"é apenas uma estimativa aproximada da fração de marcadores na membrana, verifica-se uma diferença ao ser feita uma análise ponto a ponto dos gráficos, mas o comportamento geral é semelhante. Os parâmetros relacionados às membranas artificiais DMPC e DPPC mostram pronunciadas transições de fase, enquanto que na membrana de EC são observadas suaves variações no coeficiente de inclinação.

Para DMPC ocorre uma transição de fase suave a $\backsim$ 13 e outra abrupta a $\backsim$ 23°C. A transição a $\backsim$ 13ºC corresponde à transição da fase gel ($L_{\beta'}$) para a fase de pré-transição ($P_{\beta'}$) e, a principal transição de fase, à $\backsim$ 23°C, corresponde a transição da fase $P_{\beta'}$ para a fase fluida ou líquido-cristalina ($L_{\alpha'}$) [64, 65]. Em DPPC as temperaturas destas mesmas transições de fase são $\backsim$ 34 e $\backsim$ 42°C, correspondendo as transições da fase $L_{\beta'}$ para a fase $P_{\beta'}$ e da $P_{\beta'}$ para a $L_{\alpha'}$, respectivamente [64, 65]. Comparada aos fosfolipídios, a membrana de EC é caracterizadas por uma suave transição, visualizada pela maior inclinação da curva no intervalo de temperatura entre $\backsim$ 50 e $\backsim$ 74°C .

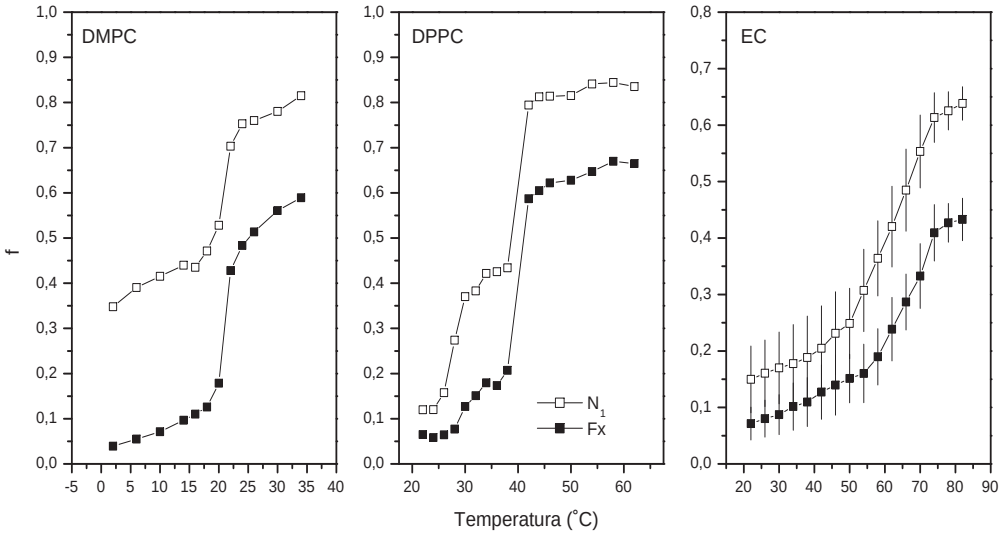

Figura 4.3: Parâmetro espectral $f = H/(H + P)$ descrito na Fig. 4.1 e a população relativa do DTBN na componente H (quadrados abertos), N_H, determinada pela simulação espectral, para vesículas multilamelares de DMPC (gráfico à esquerda), DPPC (gráfico ao centro) e membranas de estrato córneo (gráfico à direita), versus a temperatura..

De acordo com a teoria da difusão-solubilidade, o coeficiente de permeabilidade (P) de uma molécula ao atravessar uma membrana é diretamente proporcional ao coeficiente de partição na bicamada, K, e ao coeficiente de difusão através dela, D, e inversamente

proporcional à espessura da bicamada, Δx [66]. A expressão correspondente é a seguinte:

$$P = \frac{KD}{\Delta x}. \tag{4.1}$$

Da equação de Einstein-Stokes, tem-se que

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \tag{4.2}$$

onde kT representa a energia térmica, η viscosidade da membrana, e r é o raio da molécula. Já o coeficiente de partição K é definido como a razão entre a concentração do soluto na membrana, c_H, e a concentração do meio aquoso, c_P, de modo que

$$K = \frac{c_H}{c_P}, \tag{4.3}$$

ou

$$K = \frac{N_H/V_{membrana}}{N_P/V_{solvente}}, \tag{4.4}$$

sendo N_H e N_P as populações relativas do marcador de spin do meio hidrofóbico e polar, respectivamente. Como N_H e N_P são obtidos da simulação dos espectros, o valor de K pode ser determinado se houver o conhecimento dos volumes relativos de membrana e solvente na amostra.

Para estimar os volumes relativos solvente-membrana em DMPC e DPPC foi levado em conta volume da amostra dentro do tubo capilar ($\backsim 25\mu L$), do qual foi subtraído o volume dos lipídios, sendo que a massa de lipídio usado foi de 3,5 mg e a densidade dos lipídios foi considerada como 0,8 mg/μL. O valor médio obtido destas avaliações foi 4,5 ($=V_{solvente}/V_{membrana}$). Já no caso do EC, em trabalhos anteriores [61] foi verificado que, em nosso método padrão de preparação das amostras de EC acondicionado no capilar, o conteúdo de água (peso/peso) fica entre 65 e 67% do total. Do peso seco restante, 17% correspondem aos lipídios. A partir destas considerações de volume de membranas, a razão do volume do solvente pelo volume da membrana calculada foi 10. Assumiu-se que o marcador está distribuído por toda membrana e que a temperatura causa alterações significativas nos volumes da membrana e do solvente.

Tabela 4.1: Variação da energia livre de Gibbs (a 26°C), da entalpia e entropia relacionadas com a transferência do marcador DTBN da água para as membranas de DMPC, DPPC e EC.

Amostras	$\Delta G^0_{w\to m}$(kcal mol^{-1})	$\Delta H^0_{w\to m}$(kcal mol^{-1})	$\Delta S^0_{w\to m}$ (cal mol^{-1} K^{-1})
DMPC 06-20 °C	$-0,8^a$	14,8	52,2
DMPC 22-34 °C	-0,2	5,8	20,2
DPPC 30-38 °C	-0,3	10,8	37,1
DPPC 42-62 °C	-0,2	3,1	11,0
EC 22-46 °C	-0,3	3,9	14,1
EC 50-70 °C	-0,7	14,8	52,1
EC 74-82 °C	-0,05	3,3	11,2

[a] Os valores foram calculados com base nas Eq. 4.6 e Eq. 4.7, usando os dados da Fig. 4.4

A mudança na energia livre padrão de Gibbs, ΔG^0, para transferir uma molécula da fase aquosa para a hidrocarbônica, pode ser calculada com base no coeficiente de partição [67, 68]:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RTlnK, \tag{4.5}$$

onde ΔG é a energia livre de Gibbs, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta e K aqui é a constante de equilíbrio.

Como as populações de spin se encontram em equilíbrio termodinâmico, a variação da energia livre de Gibbs é nula, ou melhor, $\Delta G = 0$. Mas ΔG^0 pode ser escrito em termos da energia livre padrão, da seguinte forma:

$$\Delta G^0 = -RTlnK, \tag{4.6}$$

ou

$$lnK = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}, \tag{4.7}$$

onde ΔS^0 corresponde a variação da entropia padrão associada à transferência das moléculas do solvente para o interior da membrana e ΔH^0é a variação de entalpia padrão referente ao mesmo fenômeno.

Na prática, os valores dos parâmetros termodinâmicos podem ser determinados pelo gráfico de van't Hoff, como plotado na Fig. 4.4, no qual o coeficiente angular é dado por $\frac{\Delta H^0}{R}$ e a interseção com o eixo das ordenadas é $\frac{\Delta S^0}{R}$. Na Tab. 4.1 estão alguns valores

calculados para as energias livre padrão de Gibbs, as entalpias e entropias. Os resultados na presença dos terpenos foram essencialmente os mesmos observados nas amostras controle, mas não sendo incluídos na tabela.

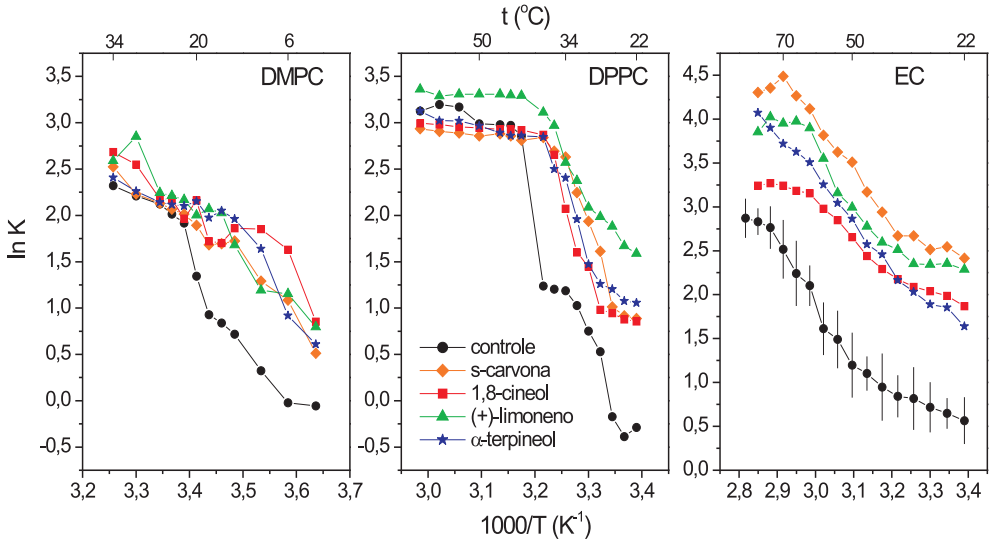

Figura 4.4: Logaritmo natural do coeficiente de partição, ln K, do DTBN em vesículas mutilamelares de DMPC, DPPC e membranas de estrato córneo (EC) versus a temperatura absoluta recíproca. Os terpenos foram acrescentados a uma razão molar de terpenos:lipídios de 0,75:1 para DMPC e DPPC e a 1% terpeno (peso/volume) em estrato córneo.

Nota-se que na presença de terpenos só está presente à transição de $P_{\beta'}$ para $L_{\alpha'}$, onde as temperaturas de transição foram abaixadas em, aproximadamente, 8°C. As membranas de DMPC e DPPC não foram afetadas pelos terpenos na fase líquido-cristalina. Em contraste, as amostras de EC tiveram um aumento da partição do DTBN, causadas pelos terpenos, em todos os intervalos de temperatura medidos. Isto, provavelmente, está relacionado ao fato que as bicamadas de DPPC, na fase líquido-cristalina, já alcançaram o efeito máximo de desordem para a relação molecular empregada de terpeno:DPPC (0,75:1). A 50°C o valor de ln K é, aproximadamente, 1,25 para as amostras controles de EC, sendo que para o DPPC, este valor é de aproximadamente 3,0.

O efeito da concentração dos terpenos nas membranas de EC também foi estudado

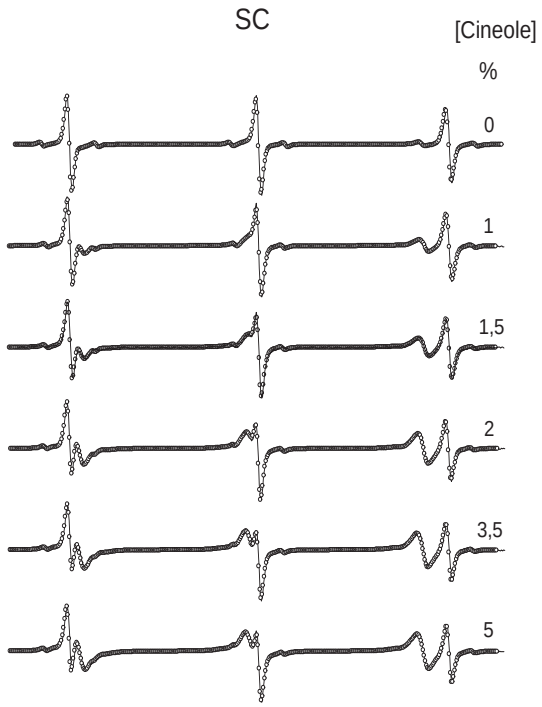

Figura 4.5: Alterações no espectro de RPE ocasionados devido ao aumento da concentração de 1,8-cineole, onde o espectro experimental são as linhas e o simulado os círculos vazios

no presente trabalho. Na Fig. 4.5 estão apresentados espectros de RPE para concentrações crescentes do terpeno 1,8-cineol. Examinando estes espectros verifica-se que à medida que a concentração do terpeno aumenta, a partição do marcador também aumenta, sendo que na concentração de 1% já é observado um efeito importante do terpeno na membrana e com concentrações superiores a 3% é observada a saturação do efeito.

4.3 Dinâmica Molecular do DTBN nas Fases Aquosa e Hidrocarbônica

O tempo de correlação rotacional, τ_c, do DTBN em membranas de DMPC, DPPC e EC está plotado na escala logarítmica como função do recíproco da temperatura absoluta (Figura 4.6). Os painéis A e B se referem ao marcador de spin na membrana e no solvente,

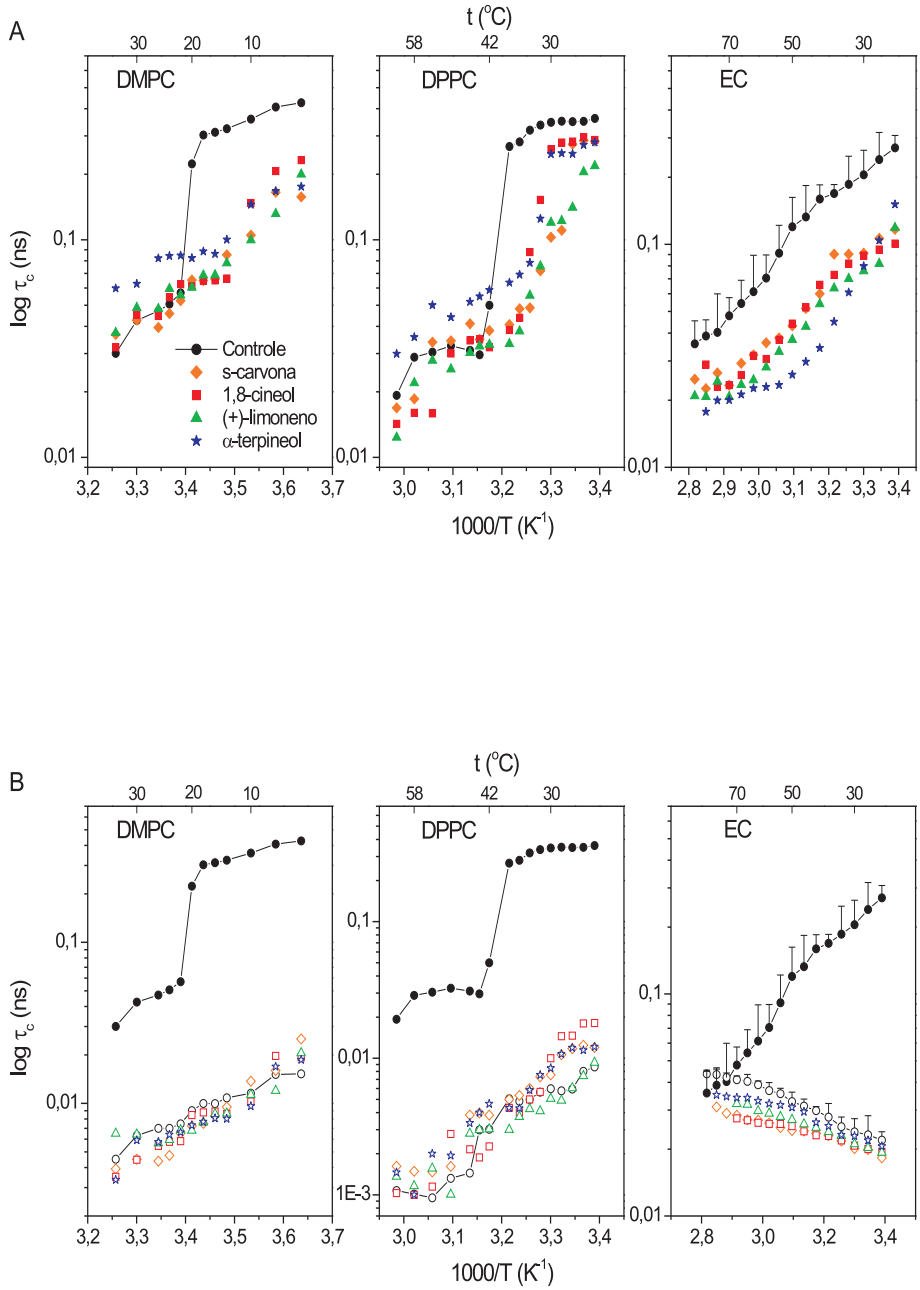

Figura 4.6: Tempo de correlação rotacional, τ_c, do DTBN em membranas de DMPC, DPPC e estrato córneo (EC) versus o recíproco da temperatura absoluta. Os terpenos foram adicionados a uma fração molar terpeno:lipídio 0,75:1 para DMPC e DPPC, e 1% (peso/volume) utilizado nas amostras de EC. Os painéis A e B se referem ao marcador na membrana e no solvente, respectivamente

Tabela 4.2: Energia de ativação para o tempo de correlação rotacional do marcador de spin DTBN nas membranas de DMPC, DPPC e EC.

Amostras	E_a (Kcal mol^{-1})
DMPC 02 - 18	$1,6^a$
DMPC 22 - 34	3,8
DPPC 22 - 34	0,6
DPPC 44 - 62	1,8
EC 22 - 42	2,2
EC 46 - 70	4,2
EC 74 - 82	1,6

[a] Os valores numéricos foram calculados com base na Eq. 4.8, usando os dados da Fig. 4.6A

respectivamente. Este gráfico de Arrhenius nos permite calcular a energia de ativação aparente, E_a, para os movimentos rotacionais nas regiões de dependência linear dos gráficos, usando a seguinte equação:

$$\tau_C = Aexp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \tag{4.8}$$

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. 4.6A são mostrados na Tabela 4.2. Nota-se que quanto maior é o coeficiente de inclinação da curva, maior será o valor de E_a e, mudanças neste coeficiente indicam possíveis transições de fase. É interessante notar que, a mobilidade do marcador de spin reflete as transições de fase da membrana (Fig 4.6A), dando suporte aos resultados verificados para o coeficiente de partição (Fig. 4.4). Para as membranas de DMPC e DPPC verifica-se que os terpenos não alteraram significativamente a mobilidade do marcador na fase fluida, onde a dinâmica molecular já é alta. A Fig. 4.6B mostra que o tempo de correlação rotacional do marcador na fase aquosa para as amostras de EC foram maiores que para as bicamadas de DMPC e DPPC devido a uma maior viscosidade do solvente nas amostras de EC. Além disso, o parâmetro τ_c da sonda de spin em EC, na fase aquosa, aumenta com a temperatura, sugerindo que marcador de spin da fase polar pode penetrar na região dos grupos de cabeça polares.

4.4 Polaridade Local do DTBN no Meio Hidrocarbônico e Aquoso

O acoplamento hiperfino isotrópico com o ^{14}N, a_0, aumenta com o aumento da constate dielétrica ou da polaridade do solvente em que os radicais nitróxidos estão dissolvidos. Para analisar a localização predominante do DTBN nas membranas e verificar se os terpenos podem alterar esta localização, o parâmetro a_0 foi medido para os três sistemas estudados, na presença e ausência de terpenos (Fig. 4.7). Em experimentos utilizando o marcador de spin glicerofosfolipídio com o grupo nitróxido (DOXIL) inserido na posição n da cadeia sn-2 (n-PCSL) em bicamadas de DPPC, o valor do parâmetro a_0 obtido foi de 15,1 G para n = 4 e 14,5 G para n = 16 [69], correspondendo a uma redução de 0,6 G ao longo da cadeia lipídica. Os valores de a_0 observados para o DTBN em DMPC, DPPC e membranas de EC estão na gama de 15,55 para 15,85 G (Fig. 4.7), porém, é necessário fazer uma correção nestes valores, a fim de comparár-los com os da classe DOXIL. A comparação com a classe do DOXIL se torna necessária, pelo fato de ser a única classe de marcadores que permite traçar o perfil de polaridade no interior da bicamada, isto porque o radical nitróxido deste grupo pode ser colocado em qualquer posição da cadeia graxa. Medidas do parâmetro a_0 para os marcadores de spin DTBN, TEMPO e DOXIL (5-DOXIL ácido esteárico) em terpenos e outros solventes variando a constante dielétrica foram realizadas a 25°C (Tabela 4.3). Os valores encontrados para o DTBN e TEMPO (Fig. 3.2) foram respectivamente 1,0 e 1,2 G mais altos que os do DOXIL. Portanto, subtraindo 1,0 G dos valores de a_0 apresentados na Fig. 4.7 pode-se notar que o máximo valor alcançado seria de 14,85 G que corresponde ao valor médio entre 14,5 (n = 16) e 15,1 (n = 4) observados para o DOXIL em bicamadas. Assim, o valor de a_0 de $\backsim$ 15,85 G observado acima da transição principal de fase para DMPC e DPPC (Fig. 4.7) é consistente com o DTBN distribuído por toda a bicamada e os valores de cerca de 15,6 G encontradas na fase gel é compatível com o marcador localizado predominantemente no centro da bicamada.

Tabela 4.3: Valores do desdobramento hiperfino isotrópico do nitroxil nos marcadores de spin 5-DOXIL, DTBN e TEMPO em terpenos e outros solventes de variadas constantes dielétricas na temperatura de 25°C.

Amostras	5-DOXIL	TEMPO	DTBN
s-carvona	14,4	15,8	15,6
1,8-cineol	14,2	15,5	15,3
(+)-limoneno	14,4	15,7	15,7
α-terpineol	14,1	16,1	15,9
Etanol	14,9	16,3	16,1
Água	15,8	17,3	17,2
DMSO	14,9	16,2	16,1
Nujol	14,0	15,4	15,2

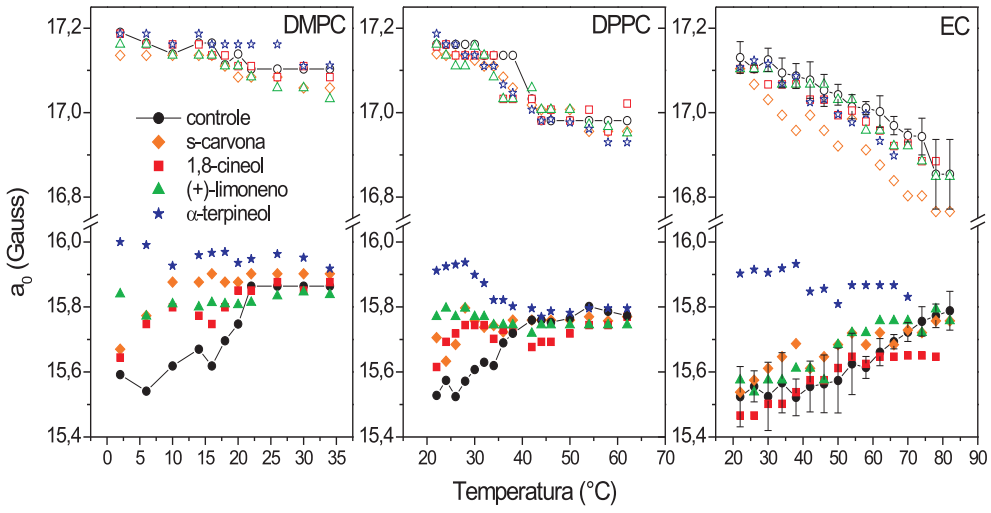

Figura 4.7: Parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) versos a temperatura. Os símbolos cheios são os valores obtidos de a_0 para a região hidrofóbica enquanto que os vazios estão relacionados ao ambiente do solvente. Na figura da esquerda, está uma legenda dos símbolos que serve para DMPC, DPPC e EC.

As vesículas de DMPC e DPPC na presença do α-terpineol e (+)-limoneno apresentaram níveis de polaridade similares acima e abaixo da principal transição de fase e no caso do L(-)-carvona e 1,8-cineol os valores foram menores, abaixo de 6°C para DMPC e, de 26°C para DPPC. Em contraste, para as amostras de EC só o α-terpineol manteve a polaridade da sonda nos níveis mais altos observados e os outros terpenos não alteraram

significativamente a polaridade do marcador. Uma característica particular do α-terpineol é conter um grupo doador de ligações de hidrogênio para formar pontes de hidrogênio com o nitróxido e assim, estes dados apóiam a idéia que o α-terpineol se distribui ao longo da membrana e com seus grupos polares aumentam a polaridade no interior da membrana.

Como pode ser observado na parte superior da Fig. 4.7, a polaridade detectada pelo marcador de spin em EC, na fase aquosa, decresce com o aumento da temperatura, sugerindo que as sondas de fora da membrana podem visitar seu interior nas vizinhanças dos grupos polares e a probabilidade desta ocorrência é crescente com a temperatura. Este comportamento também é aparente para DPPC e, neste caso, parece refletir a transição de fase principal da bicamada. Ou seja, os terpenos não alteram a polaridade do solvente.

Capítulo 5

Discussões

A organização do EC é complexa e sua composição não é comum. Em EC humano têm sido identificadas nove subclasses de ceramidas [70], junto com ácidos graxos livres de cadeias longas, colesterol e sulfato de colesterol, organizados em fases lamelares cristalinas. Estudos em EC humano, de rato e de porco utilizando a técnica de difração de raios-X de baixo ângulo indicaram a presença de duas fases lamelares lipídicas com distâncias repetidas de $\backsim$6 e 13 nm, as quais desaparecem entre 60 e 75°C [70–73]. Difração de raios-X de alto ângulo [72, 73] e difração de elétrons [74] evidenciaram 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 [70, 74]. Entre as temperaturas de 75 e 95°C a estrutura hexagonal desaparece [72, 73], com uma provável mudança para a fase líquida cristalina. Embora os lipídios nas fases lamelares formem, predominantemente, fases laterais cristalinas, uma pequena porção de lipídios na fase líquida provavelmente coexiste [70].

Os resultados de RPE obtidos neste trabalho usando o marcador de spin DTBN foram similares aos já reportados com o marcador TEMPO, outro marcador de baixo peso molecular [61]. Neste trabalho foi incluído o estudo dos terpenos em vesículas de DMPC, mostrando resultados semelhantes daqueles das membranas de DPPC, onde os terpenos não provocaram alterações significativas na dinâmica e no coeficiente de partição do marcador de spin nas bicamadas de fosfolipídios, quando na fase líquido - cristalina. Entretanto, nas outras fases destas membranas modelos, os terpenos provocaram aumento de ambos os

parâmetros, além de promoverem um atraso na transição de fase destas vesículas. A partição de fármacos em membranas está correlacionada com sua absorção na pele [75], sendo um passo essencial para sua difusão [76] e este trabalho mostra que a partição também esta associada com a dinâmica molecular da membrana.

Como a resolução espectral do DTBN é melhor que a do TEMPO foi possível obter informações sobre a localização do marcador no interior das membranas fazendo uso da alta sensibilidade do nitróxido à polaridade local. O perfil de polaridade no interior de bicamadas lipídicas tem sido frequentemente mapeado usando marcadores da classe DOXIL, onde a posição do nitróxido é variada, carbono a carbono, ao longo da cadeia metilênica. Entretanto, o desdobramento hiperfino isotrópico a_0 para o DTBN dá valores sistematicamente maiores daqueles do DOXIL, sendo esta diferença de 1 Gauss (Tab. 4.3). Devido ao desconhecimento da necessidade desta correção têm sido muitas vezes interpretado que tanto o marcador TEMPO como o DTBN estão predominantemente localizados na região dos grupos polares das membranas. Como exemplo, podemos citar o trabalho de Miroslav Peric et al. publicado em 2005 [77]. Em trabalho anterior de nosso laboratório [61] foi medido o a_0 dos marcadores TEMPO e DOXIL para vários solventes e fazendo a devida correção foi interpretado que o TEMPO fica completamente distribuído pela bicamada de DPPC ou de EC em toda faixa de temperatura medida. Recentemente, Derek Marsh e Claudio Toniolo [78] analisaram os valores de a_0 de alguns marcadores, incluindo o DTBN, em solventes próticos e apróticos, com variações nas constantes dielétricas e trataram em detalhes as diferenças intrínsecas no desdobramento hiperfino dos diferentes marcadores de spin. Com base nestas informações, foi interpretado que o DTBN se distribui completamente pelas bicamadas de DMPC e DPPC quando na fase líquido-cristalina ou, em EC, nas temperaturas mais altas ($\backsim$ 60-80°C). Já para temperaturas mais baixas o marcador de spin tende a se concentrar na região central das bicamadas. Interessante notar que no caso das bicamadas de DMPC e DPPC os deslocamentos do DTBN no interior das bicamadas refletiram suas principais transições de fase (Fig. 4.7). Além disso, foi demonstrado que o DTBN da fase aquosa pode penetrar

na região dos grupos polares das membranas, como deduzido da redução na polaridade local (Fig. 4.7) e concomitante redução do movimento rotacional (Fig. 4.6B). Esta interação dos marcadores externos com a interface polar aumentou com a temperatura (Fig. 4.7).

Neste trabalho, os espectros RPE foram simulados com o programa EPRSIM em vez do NLLS que, no caso específico da DTBN foi menos adequado, principalmente devido ao rápido movimento de rotação desta sonda. O programa NLLS gera o parâmetro Log Rbar, cujo valor para TEMPO em amostras de EC a 70°C foi de 9,1 s^{-1}, enquanto o EPRSIM gera o τ_c, cujo valor correspondente para o DTBN foi de 0,035 ns (Fig. 4.6A). A relação entre estes dois parâmetros é dada por Log Rbar $=\frac{1}{6\tau_c}$, portando o valor do Log Rbar correspondente para o DTBN seria 9,7 s^{-1}, representando, portanto, uma maior taxa de difusão rotacional. Grande esforço foi realizado para delinear as transições de fase em membranas EC através desse marcador. Os aumentos nos coeficientes de inclinação observados nas curvas das amostras de controle plotados nas Fig. 4.5 e Fig. 4.6A, os quais foram aparentes na faixa de temperatura de $\backsim$ 50 para $\backsim$ 74°C, foram intensamente analisadas. A $\backsim$ 50°C, o aumento de inclinação foi evidente em todos os experimentos, enquanto o decréscimo a $\backsim$ 70°C é o resultado de uma média, mas não foi claramente visível em todos os experimentos. O comportamento termotrópico da partição e movimento rotacional do DTBN em membranas de EC, aqui apresentada, está em estreita concordância com os dados obtidos por transformada de Fourier de infravermelho (FTIR- do inglês *Fourier Transform Infrared*) em um estudo em EC de suínos e seus extratos lipídicos, onde foi relatado um aumento na freqüência de estiramento dos grupos metilênicos (νsCH_2), no intervalo de temperatura de 60 a 80°C, associado com fusão das cadeias alquilas (Ongpipattanakul et al., 1994) [79]. Em experimentos de DSC (do inglês *Differential scanning calorimetry*) foram identificadas quatro transições de fase em EC de ratos recém-nascidos (usado neste trabalho) sendo em torno de 42°C (T_1), 55°C (T_x), 70°C (T_2) e 78°C (T_3), as quais tem sido atribuídas à fusão lipídica [80]. As duas principais transições de fase do EC humano ocorrem a 72°C (T_2) e 83°C (T_3), sendo detectado que os terpenos (+)-limoneno e 1,8-cineol reduziram as

temperaturas destas duas transições por aproximadamente 20°C [81].

É bem conhecido que bicamadas de fosfolipídios podem exibir grandes aumentos de permeabilidade nas regiões de coexistência de duas fases gel-líquida cristalina [82–84]. Este fenômeno pode ser atribuído a um aumento na permeabilidade nos domínio de fronteiras onde estas duas fases coexistem em equilíbrio [83, 85]. Os mecanismos sugeridos para esta alta permeabilidade têm enfocado as flutuações de densidade das regiões de contorno onde as duas fases coexistem, as quais aumentam a probabilidade de formação de defeitos ou poros transientes que aumentam a permeabilidade para um valor máximo na temperatura de transição, T_m [83]. Neste contexto, a probabilidade esperada para a formação de defeitos nas membranas de EC deve ser baixa, tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, o qual indicou suaves reorganizações termicamente induzidas das membranas de EC, e alta estabilidade, ao longo de todo o intervalo de temperatura medido. Medidas da permeabilidade em EC de suínos têm revelado que a energia de ativação para o fluxo de água é 17,2 kcal mol^{-1} na grande faixa de temperatura de 22-70 °C e 5,7 kcal mol^{-1} acima de 70°C, indicando que a função de barreira do EC é reduzida apenas em altas temperaturas [86].

A espectroscopia de transformada de Fourier de infravermelho por reflectância total atenuada (ATR-FTIR) foi usada para estudar a organização molecular dos lipídios do EC em um sistema modelo e na presença dos terpenos 1,8-cineole e L-mentol onde foram detectadas alterações na freqüência da amida-I, sugerindo que eles causam rupturas na rede de ligações de hidrogênio na interface polar da membrana [31]. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por espectroscopia de RPE de marcadores análogos do ácido esteárico incorporados nas membranas de EC, em que 1% de L-mentol ou 1,8-cineol (peso/volume) provocaram um aumento dramático na fluidez da membrana, sendo interpretado pelos autores que os terpenos enfraquecem a rede de ligações de hidrogênio na região dos grupos polares. Com base na formação de ligações de hidrogênio, foi usado neste trabalho um terpeno que contém um grupo doador de hidrogênio (o álcool α- terpineol), dois com grupos receptores de hidrogênio (o éter 1,8-cineol e o cetona L (-)-carvona) e um

terpeno que não forma ligação de hidrogênio (o hidrocarboneto (+)-limoneno). Embora os terpenos podem, em princípio, diminuir a formação de ligações de hidrogênio na interface membrana-água, os resultados do presente trabalho sugerem que os efeitos dos terpenos sobre as membranas não depende necessariamente de uma competição direta por estas ligações, uma vez que os efeitos do (+)-limoneno que não as forma, não foram significativamente diferentes dos outros terpenos.

Capítulo 6

Conclusões

O presente trabalho faz uso de um pequeno marcador de spin para mimetizar um fármaco e assim estudar a atividade de terpenos como facilitadores da permeação em EC. Como o EC é um sistema complexo foram realizados experimentos paralelos em bicamadas modelos de DMPC e DPPC onde as propriedades de membranas são bem conhecidas na literatura.

Os terpenos em membranas EC na concentração de 1% (peso/volume) ou na razão molar terpeno:lipídico de 0,75:1 em DMPC ou DPPC aumentaram o coeficiente de partição e o movimento rotacional do marcador de spin DTBN nas membranas, ambos os parâmetros correlacionados com a permeação.

A ação dos terpenos é maior em membranas ordenadas como é o caso do EC e diminui quando a membrana já está desordenada como no caso das bicamadas de DMPC e DPPC na fase líquido-cristalina.

Em comparação com os outros dois sistemas de membranas, o comportamento termotrópico das membranas de EC foi caracterizado por suaves mudanças, tendo no intervalo de temperatura de $\backsim$50 a $\backsim$74°C as maiores mudanças termicamente induzidas.

Medidas da polaridade indicaram uma completa distribuição do DTBN no interior das membranas, quando em temperaturas acima da principal transição na DMPC e DPPC ou, de aproximadamente $\backsim$70°C no EC. Para temperaturas mais baixas ocorre uma predominante localização no centro das bicamadas. Além disso, as medidas da polaridade associadas com

medidas da dinâmica molecular também mostraram que, uma fração dos marcadores de spin fora da membrana podem penetrar na interface polar das membranas e, que esta fração de sondas gradualmente aumenta com a temperatura.

Os terpenos são pequenas moléculas hidrofóbicas que penetram em membranas e em altas concentrações podem atuar efetivamente como espaçadores, aumentando a fluidez da membrana e enfraquecendo a rede de ligações de hidrogênio na interface polar. Este processo pode facilitar a partição de pequenas moléculas polares e, conseqüentemente, a sua permeação através das membranas.

Uma vez que os efeitos de diferentes tipos de terpenos sobre as membranas não foram significativamente diferentes, este trabalho também mostra que os terpenos ou combinações deles podem ser escolhidos, buscando maiores aumentos de permeação com a mínima toxicidade sobre a pele.

Bibliografia

1 PHAM, D.Q.; NOGID, A. *Rotigotine transdermal system for the treatment of Parkinson's disease.* Clinical Therapeutics, V. 30, n. 5, 2008. p. 367 - 379.

2 NARISHETTY, S.T.K; PANCHAGNULA, R. *Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action.* J. Control. Release, V. 95, 2004. p. 813 - 824.

3 HAM, A. W. *Histologia.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,1967. p. 571 - 597

4 JUNQUEIRA, L. C. U. *Histologia básica.* 5. ed. Editora Guanabara Koogan, 1982. p. 381

5 ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula.* 3ªEdição, Porto Alegre: Ed. Artes Médicas Sul Ltda, 1997. p. 1139 - 1184.

6 HALLER, P. H. *Aplicações de lipídios e fosfolipídios em cosméticos.*Ċosmet. Toiletr., V. 1, n 4, 1989, pg 33 - 40.

7 PERTERSEN, R. D. *Key components for skin protection.*Ċosmet. Toiletr., Lips., V. 107, n 2, 1992, pg 45 - 49.

8 WERTZ, P. W.; BERGH, B. *The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers.* Cosmet. Phys. Lips., V. 91, n. 2, 1998. p. 85 - 96.

9 HARDING, C. R. *The stratum corneum: structure and function in health and disease.* Dermatologyc Therapy., V.1, n. 17, 2004. p. 6 - 15.

10 ELIAS, P.M.; LEVENTHAL, M.E. *Intercellular volume changes and cell surface area expansion during cornification.* Eur. J. Cell. Biol., V. 22, 1980. 439a.

11 SUHONEN, M.T.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. *Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations.* J. Control. Release., V. 59, n. 2, 1999. p. 149 - 161.

12 PONEC, M. *Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing.* Adv. Drug Delivery Reviews, V. 54, 2002. p. 19 - 30.

13 JAGER, M. W.; GOORIS, G. S.; DOLBNYA, 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, , V. 1684, n. 2, 2004. p. 132 - 140.

14 HILL, J. R.; WERTZ, P. W. *Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum.* Biochim. Biophys. Acta., V. 1616, n. 2, 2003. p. 121 - 126.

15 SWARTZENDRUBER, D. C. *Studies of epidemal lipids using electron microscopy.* Semin. Dermatol., V. 11, n. 2, 1992. p. 157 - 161.

16 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., V. 279, 1995. p. 271 - 276.

17 BREATHNACH, A. S.; GOODMAN, T.; STOLINSKY, C.; GROSS, M. *Freeze fracture replication of cells of stratum corneum of human cells.* J. Anat., V. 114, 1973. p. 65 81.

18 BREATHNACH, A. S.J *Aspects of epidermal ultrastructure.* Invest. Dermatol., V. 65, 1975. p. 2 15.

19 BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONC, M. *Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations.* Progress in Lipid Research., V. 42, 2003. p. 1 - 36.

20 OHMAN, H.;VAHLQUIST, A. *The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and outosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the "acid skin mantle"?* J. Invest. Dermatol. V. 111, 1998. p. 674-677.

21 BOUWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S.; DUBELLAAR, F.E.; WEERHEIN, A.; PONEC, M. *pH, cholesterol sulfate and fatty acids affect stratum corneum lipid organization.* J. Invest. Dermatol., V. 3, n. 2, 1998. p. 69 - 73.

22 BARRY, B. W. *Mode of action of penetration enhancers in human skin.* J. Controlled Release, V. 6, 1987. p. 67 - 87.

23 KANEBAKO, M.; INAGI, T.; TAKAYAMA, K.*Evaluation of skin barrier function using direct corrent III: Effects of Electrode distance, boundary length and shape.* Biol. Pharm. Bull., V. 26, 2003. p. 518 - 522.

24 GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPES, R. F. V. *Princípios básicos e aplicações da iontoforese na penetração cutânea de fármacos.* Quim. Nova, V. 31, n. 6, 2008. p. 1490 - 1498.

25 WALTERS,K. A. *Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic sydtema.* In: HADGRAFT, J., GUY, R. H., eds. Transdermal drug dlivery: Developmental issues and research initiatives. New York: Marcl Dekker, 1989. p. 197 - 246.

26 HADGRAFT, J. *Passive enhancement strategies in tropical and transdermal drug delivery.* Rint, J. Pharm., V. 184, 1999. p. 1 - 6.

27 SINHA, V. R., KAUR, M. P. *Permeation enhancers for transdermal drugs delivery.* Drug Dev. Ind. Pharm, New York, V. 26, n. 11, 2000. p. 1131 - 1140.

28 MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. *Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrina.* Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, V. 38, n. 1, 2002. p. 33 - 54.

29 WILLIAMS, A. C., BARRY, W. B. *Permeation enhancers.* Advanced Drug Delivery Reviews, V. 56, 2004. p. 603 - 618.

30 GAO, S.; SINGH, J. *In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes.* J. Control. Release, V. 51, n. 2/3, 1998. p. 193 - 199.

31 NARISHETTY, S.T.K; PANCHAGNULA, R.*Effect of L-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zigovudine.* J. Control. Release, V. 102, 2005. p. 59 - 70.

32 AQIL, M.; AHAD, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. *Status of terpenes as skin penetration enhancers.* Drug Discovery Today, V. 12, n. 23/24, 2007. p. 1061 - 1067.

33 ZHAO, K.; SINGH, J. *Mechanismo(s) of in vitro percutaneous absorption enhancement of tamoxifen by enhancers.* J. Pharm. Sci., V. 89, n. 6, 2000. p. 771 - 780.

34 KUMAR, J. A.; NARISETTY, S. T.; PANCHAGNULA, R. *Transdermal drug delivery of imipramine hydrocholoride: I. Effect of terpenes.* J. Control. Release, V. 79, n. 1/2, 2002. p. 93 - 101.

35 VADDI, H. K.; HO, P. C.; CHAN, Y. W.; CHAN, S. Y. *Terpenes in ethanol: haloperidol permeation and partition through human skin and stratum corneum changes.* J. Control. Release, V. 81, n. 1/2, 2002. p. 121 - 133.

36 SWARTZ; H.M.; BOLTON, J.R.; BORGCULLITY D.C. *Biological Applications of Electron Spin Resonance.* K. Binger, Springer-Verlag, Berlin, 1972.

37 BUDIL, D.E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J.H. *Nonlinear-least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm.* Journal of Magnetic Resonance, V. 120, 1996. p. 155-189.

38 ZAVOISKY, E. J. Phys., U.S.S.R., V. 9, 1945. p. 211-245.

39 FEHERE, G. *Electron Paramagnetic resonance with Aplications to Selected Problems in Biology.* 14ª edição, California: Ed. Gordon and Breach Science Publishers, 1970.

40 BERLINER, L. J. *Biological Magnetic Resonance* Plenum Press: New York, V. 14, 1998.

41 ATKINS, Perter; PAULA, Julio de. *Atkins, Físico-Química.* 7 ed., V. 2, LTC Editora, Rio de Janeiro, 2004. p. 303 a 345.

42 HALLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; SKOOG, D. A.. *Princípio de Análise Instrumental.* 5 ed., ARTMED Editora S.A, São Paulo, 2002. p. 399 - 439.

43 PERUSSI, J.R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. (1971, 1981): *O método de marcadores de spin aplicados a bioquímica.* Química Nova, 1985. p. 313 - 324.

44 DO COUTO, S. G. *RPE de proteínas marcadas nos resíduos de Lisina: Efeitos da Uréia em Estrato Córneo e Albumina.* Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2003.

45 PAKE, G. E.; ESTLE, T. L.*The Physical Principles of Electron: Paramnetic Resonance.* 2 ed., VLondon: Ed. Advanced Book Program, 1973. p. 10 - 63.

46 ATHERTON; N. M. *Electron Spin Resonance:Theory and Applications. Ellis Horwwood Limited*. U.S.A., 1973. p. 21-46.

47 BOLTON, J. R.; WEIL, J.A.; WERTZ, J. E. *Electron Paramafnetic Resonance.* Elementary Theory and Practical Applications. A Wiley-Interscience publication. Canada, 1993.

48 BOLTON, J. R.; WERTZ, J. E. *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. United States of America, 1972. p. 38-48.

49 McMONNELL, H.M.; OHNISHI, S.J. Am. Chem. Soc., 87, 2293 (1965) Cryst. B26, 274.

50 LACAZ-VIEIRA, F.; MALNIC, G. *Biofísica.* Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1981. p. 64-85.

51 ALONSO, A. *Estudo por RPE de um radical nitróxido em monocristal: interação com prótons e relaxação elétrônica.* Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos.

52 ROSANTEV, E.G.; SHOLLE, V.D. *Syntesis and reactions of stable nitroxyl radicals.* SYNTESIS, 1971. p. 190 - 202.

53 COUTO, S.G.; OLIVEIRA, M.S., ALONSO A.. *Dynamics of proteins and lipids in the stratum corneum: Effects of percutaneous permeation enhancers.* Biophys. Chem., V¿ 116, 2005. p. 23-31.

54 DOS ANJOS, J.L.V. *Efeito de terpenos nas membranas de estrato córneo estudados por Ressonância Paramagnética Eletrônica.* Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

55 SIMON, I. Biochim. Biophys. Act, V. 556, 1979. p. 466 - 470.

56 STRANCAR, J.; SENTJURC, M.; SCHARA, M.. *Fast and accurate characterization of biological membranes by EPR spectra.* J. Magn. Reson., V. 1422, n. 2, 2000. p. 254 - 265.

57 STRAMCAR, J. Nitrocide spectral simulation and optimization. Program EPRSIM. www2.ijs.si/ jstrancar/software.htm

58 KAVALENKA, A.A.; FILIPIC, B.; HEMMINGA, M.A.; STRANCAR, J. *Speeding Up a Genetic Algorithm for EPR-Based Spin Label Characterization of Biosystem Complexity.* J. Chem. Inf. Model., V. 45, n. 6, 2005. p. 1628 - 1635.

59 STRANCAR, J.; KOKLIC, T.; ARSOV, Z.; FILIPIC, B.; STOPAR, D.; HEMMINGA, M. A.*Spin Label EPR-Based Characterization of Biosystem Complexity.* J. Chem. Inf. Model., V. 45, n. 2, 2005. p. 394 - 406.

60 FILIPIC, B.; STRANCAR, J. *Tuning EPR spectral parameters with a genetic algorithm.* Applied Soft Computing, V. 1, 2001. p. 83 - 90.

61 DOS ANJOS, J.L.; ALONSO, A. *Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes.* International Journal Pharmaceut, V. 350, n. 1/5, 2008. p. 103-112.

62 SMIRNOV, A.; SMIRNOVA, T; MORSE, P.D. *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.* Biophys. J., V. 68, n. 6, 1995. p. 2350-2360.

63 MARSH, D.; HORVÁTH, L.L. *Spin-label studies of the structure and dynamics of lipids and proteins in membranes.* In: *Hoff, A.J. (Ed.), Advanced EPR. Applications in Biology and Biochemistry.* Elsevier, Amsterdam, 1989. p. 707-752.

64 SHIMSHICKL, E.J.; MCCONNELL, H.M. *Lateral phase separation in phospholipid membranes.* Biochemistry, V. 12, n. 12, 1973. p. 2351-2360.

65 WANG, D.C.; TARASCHI, T.F.; RUBIN, E.; JANES, N. *Configuration entropy is the driving force of ethanol action on membrane architecture.* Biochim. Biophys. Acta, V. 1145, 1993. p. 141-148.

66 FINKELSTEIN, A. *Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes.* J. General Physiology, V. 68, 1976. p. 127 - 135.

67 ROGERS, J.A.; WONG, A. *The temperature dependence and thermodynamics of partitioning of phenols in the n-octanol-water system.* Int. J. Pharm., V. 6, n. 3/4, 1980. p. 339 - 348.

68 DA, Y.Z.; ITO, K.; FUJIWARA, H. *Energy aspects of oil/water partition leading to the novel hydrophobic parameters for the analysis of quantitative struture activity relationships.* J. Med. Chem., V. 35, n. 18, 1992. p. 3382 - 3387.

69 KURAD, D.; JESCHKE, G.; MARSH, D. *Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR.* Biophys. J., V. 85, n. 2, 2003. p. 1025 - 1033.

70 BOUWSTRA, J.A.; PONEC, M. *The skin barrier in healthy and diseased state.* Biochim. Biophys. Acta, V. 1758, 2006. p. 2080 - 2095.

71 BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; VAN DER SPEK, J.A.; BRAS, W. *Structural investigations on human stratum corneum by small-angle X-ray scattering.* J. Invest. Dermatol., V. 97, n. 6, 1991. p. 1005 - 1012.

72 BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; SALOMONS-DE VRIES, M.A.; VAN DER SPEK, J.A.; BRAS, W. *Structural of human stratum corneum as function of temperature and hydration: a wide angle X-ray diffraction study.* Int. J. Pharm., V. 84, n. 3, 1992. p. 205 - 216.

73 WHITE, S.H.; MIREJOVSKY, D.; KING, G.I. *Structural of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study.* Biochemistry, V. 27, n. 10, 1988. p. 3725 - 3732.

74 PILGRAM, G.S.K.; PELT, A.M.E.; 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., V. 113, n. 3, 1999. p. 403 - 409.

75 LIU, X.-Y.; NAKAMURA, C.; YANG, Q.; KAMO, N.; MIYAKE, J. *Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions: Correlation with drug absorption in humans.* J. Chromatogr. A., V. 961, 2002. p. 113 - 118.

76 TAMMELA, P.; LAITINEN, L.; GALKIN, A.; WENNBERG, T.; HECZKO, R.; VUORELA, H.; SLOTTE, J.P.; VUORELA, P. *Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipids vesicles.* Arch. Biochem. Biophys., V. 425, n. 2, 2004. p. 193 - 199.

77 PERIC, M.; ALVES, M.; BALES, B.L. *Precision parameters from spin-probe studies of membranes using a partitioning technique. Application to two model membrane vesicles.* Biochim. Biophys. Acta, V. 1669, n. 2, 2005. p. 116 - 124.

78 MARSH, D.; TONIOLO, C. *Polarity dependence of EPR parameters for TOAC and MTSSL spin labels: Correlation with DOXYL spin labels for membrane studies.* J. Magnetic Resonance, V. 190, n. 2, 2008. p. 211 - 221.

79 ONGPIPATTANAKUL, B.; FRANCOER, R.O.P. *Polymorphism in stratum corneum lipids.* Biochim. Biophys. Acta, V. 1190, 1994. p. 115 - 122.

80 AL-SAIDAN, S.M. *Transdermal self-permeation enhancement of ibuprofen.* J. Control. Release, V. 100, n. 2, 2004. p. 199 - 209.

81 CORNWELL, P.A.; BARRY, B.W.; BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S. *Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies.* Int. J. Pharm., V. 127, 1996. p. 9 - 26.

82 BRAMHALL,J.; HOFMANN, J.; DEGUZMAN, R.; MONTESTRUQUE, S.; SCHELL, R. *Temperature dependence of membrane ion conductance analyzed by using the amphiphilic anion 5/6-carboxyfluorescein.* Biochemistry, V. 26, 1987. p. 6330 - 6340.

83 CLERC, S.G.; THOMPSON, T.E. *Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases.* Biophys. J., V. 68, n. 6, 1995. p. 2333 - 2341.

84 KRASKE, W.V.; MOUNTCASTLE, D.B. *Effects of cholesterol and temperature on the permeability of dimyristoyphosphatidylcholine bilayers near the chain melting phase transition.* Biochim. Biophys. Acta, V. 1514, n. 2, 2001. p. 159 - 164.

85 SPARR, E.; WENNERSTRÖM, H. *Responding phospholipid membranes-interplay between hydration and permeability.* Biophys. J., V. 81, n. 2, 2001. p. 1014 - 1028.

86 GOLDEN, G.M.; GUZEK, D.B.; KENNEDY, A.H.; MCKIE, J.E.; POTTS, R.O. *Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties.* Biochemistry, V. 26, n. 8, 1987. p. 2382 - 2388.