



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

**ESTUDOS DE MEMBRANAS MODELO E EFEITOS
DE TERPENOS EM MEMBRANAS DE *Leishmania*
POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA
ELETRÔNICA**

Heverton Silva de Camargos

GOIÂNIA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA
EXPERIMENTAL E APLICADA

**ESTUDOS DE MEMBRANAS MODELO E EFEITOS
DE TERPENOS EM MEMBRANAS DE *Leishmania*
POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA
ELETRÔNICA**

Heverton Silva de Camargos

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

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Antônio Alonso*

GOIÂNIA

2013

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

C172e Camargos, Heverton Silva de.
Estudos de membranas modelo e efeitos de terpenos em membranas de *Leishmania* por ressonância paramagnética eletrônica [manuscito] / Heverton Silva de Camargos. - 2013.

169 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2013.

Bibliografia.

1. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica 2. Análise de espectros 3. Componentes espectrais 4. *Leishmaniose* – Tratamento I. Título.

CDU: 543.42

“Quanto mais aprendemos, melhor dimensionamos nossa ignorância, melhor compreendemos nossas limitações perante o infinito poder criativo da Natureza.”

Marcelo Gleiser

À minha família.

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.
- À minha esposa Luciana e minhas filhas Camila e Helena pela paciência nos momentos de ausência, pelo amor e carinho demonstrados durante o período deste doutorado.
- Aos meus pais José Maria e Geraci por todo incentivo e apoio demonstrados durante minha vida.
- Aos meus familiares pelo apoio e incentivo a continuar em frente, mesmo nos momentos difíceis.
- Aos meus colegas e amigos do grupo de Biofísica, Adolfo, Agnaldo, Jorge Luiz, Kelly, Rodrigo e Sebastião, pela ajuda nos experimentos relacionados a este trabalho.
- Aos professores do IF-UFG que proporcionaram um bom ambiente de trabalho.
- Ao Prof. Dr. Fernando Pelegrini pela utilização do laboratório de RPE.
- A Prof^a. Dr^a. Miriam Cristina Leandro Dorta pelo cultivo e fornecimento da *Leishmania*.
- A todos os amigos do IF - UFG pelos momentos de descontração.

Este trabalho foi financiado pelo CNPq.

Resumo

Parte I

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de marcadores de spin foi usada para estudar as principais acomodações estruturais de sondas sensíveis ao ambiente nas bicamadas de fosfatidilcolinas com cadeias acilas saturadas e de comprimentos variando de 16 a 22 átomos de carbono. A análise mais detalhada foi feita sobre o marcador de spin 5-metil doxil estearato (5-DMS), cujos espectros de RPE permitiram identificar dois tipos distintos de componentes espectrais em equilíbrio termodinâmico para temperaturas abaixo e acima da principal transição de fase. A espectroscopia de RPE distingue duas componentes associando menor movimento com maior polaridade (denotado como componente 1) e maior movimento, com menor polaridade (componente 2), as quais podem ser atribuídas a duas populações de marcadores, sendo uma próxima (estrutura mais rígida) e outra longe da região polar da membrana, respectivamente. Em temperaturas de até 22°C apenas uma componente pode ser observada nos espectros enquanto que a 30°C a componente 1 coexiste com uma fração significativa da componente 2. Na fase líquido-cristalina o 5-DMS mostrou duas componentes espectrais para todos os lipídios estudados e em todo o intervalo de temperatura medido. Uma análise acurada dos espectros de RPE, realizadas utilizando dois programas de ajuste (NLLS e EPRSIM), permitiu-nos obter o perfil termodinâmico para estas principais acomodações do marcador. Focalizando nossa análise sobre espectros de RPE de duas componentes e usando o mesmo modelo de simulação dos espectros, foi estudada a influência do colesterol e um modificador de permeação de moléculas através da pele, examinando principalmente a mobilidade e a distribuição do marcador de spin nesses dois principais ambientes da bicamada.

Parte II

A leishmaniose cutânea é uma doença tropical negligenciada que infecta milhões de pessoas em todo mundo, representando um grave problema de saúde pública. O tra-

tamento atual, baseado em quimioterapia, utiliza compostos pentavalentes antimoniais que causam sérios efeitos colaterais. A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) do marcador de spin análogo do ácido esteárico (5-DSA) foi utilizada para monitorar o efeito dos terpenos α -terpineol, 1,8-cineol, (+)-limoneno e nerolidol sobre a fluidez da membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os efeitos citotóxicos sobre os parasitas também foram medidos para investigar as relações entre os potenciais citotóxicos dos terpenos e suas capacidades de alterar a fluidez da membrana. Todos os terpenos aumentaram a fluidez da membrana celular, sem diferenças significativas para concentrações mais elevadas. Entretanto, a concentração mínima necessária para causar a alteração na membrana foi muito diferente entre os terpenos e semelhante daquela que causou 50% de inibição do crescimento (IC_{50}), denotando uma correlação entre alterações na membrana e citotoxicidade. Os valores de IC_{50} dos terpenos analisados seguiram a relação nerolidol < (+)-limoneno < α -terpineol < 1,8-cineol, com um IC_{50} de 8 μ M para o nerolidol e 4700 μ M para o 1,8-cineol. Os espectros de RPE do marcador de spin derivado do maleimido (6-MSL) covalentemente ligado às proteínas de membrana da *Leishmania* indicaram que os terpenos essencialmente não alteram a dinâmica do esqueleto protéico e apenas aumentam a mobilidade da cadeia lateral do nitróxido. A lise celular não foi detectada nas concentrações de citotoxicidade, quando medida pela presença de fragmentos de membranas marcadas. Como os terpenos são considerados potentes facilitadores da permeação através da pele com baixo potencial de irritação, este trabalho sugere a realização de testes para verificar a possibilidade de aplicações no tratamento da Leishmaniose tegumentar, onde os terpenos talvez pudessem desempenhar uma ação dupla, de ser um princípio ativo e ao mesmo tempo facilitar a penetração de outras moléculas com atividade leishmanicida.

Palavras-chaves: Componentes Espectrais, RPE, Terpenos, *Leishmania*.

Abstract

Parte I

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin labels was used to study the main structural accommodations of environment-sensitive probes in the bilayers of saturated phosphatidylcholines with acyl chains lengths ranging from 16 to 22 carbon atoms. The more detailed analysis were made on the spin probe 5-doxyl methyl stearate (5-DMS) whose EPR spectra allowed to identify two distinct spectral components in thermodynamic equilibrium at temperatures below and above the main phase transition. The EPR spectroscopy distinguishes two components associating lower motion with higher polarity (denoted component 1) and higher motion with lower polarity (component 2), which may be assigned to one shallow (more rigid structure) and one deep population of spin probe, respectively. At temperatures until 22°C only one spectral component can be noted in the spectra whereas at 30°C the component 1 coexists with an appreciable fraction of component 2. In the liquid-crystalline phase the 5-MSL showed two spectral components for all studied lipids in the entire range of measured temperatures. An accurate analysis of EPR spectra, performed using two fitting programs (NLLS and EPRSIM), allowed us to obtain the thermodynamic profile to these major probe accommodations. Focusing the analysis on two-component EPR spectra, it was studied the influences of cholesterol and a membrane permeation enhancer on the mobility and distribution of spin label on these two main bilayer environments.

Parte II

Cutaneous leishmaniasis is a neglected tropical disease that infects millions of people worldwide, representing a serious public health problem. The current treatment is based on chemotherapy, using pentavalent antimonials compounds, which cause serious side effects. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the spin-label analog of stearic acid (5-DSA) was used to monitor the effect of the terpenes α -terpineol, 1,8-cineole,

(+)-limonene and nerolidol on the plasma membrane fluidity of *Leishmania amazonensis* promastigotes. Cytotoxic effects on the parasite were also measured to investigate the relationship between the cytotoxic potential of terpenes and their ability to alter membrane fluidity. All terpenes increased the fluidity of the cellular membrane, without significant differences at higher concentrations. However, the minimum concentration required to cause a change in the membrane was very different between the terpenes and similar to that caused 50% growth inhibition (IC_{50}) showing a correlation between membrane alterations and cytotoxicity. The IC_{50} values of terpenes analyzed showed the following relationship: nerolidol < (+)-limonene < α -terpineol < 1,8-cineole, with an IC_{50} of 8 μ M for nerolidol and 4700 μ M to 1,8- cineole. The EPR spectra of the maleimide derivative spin label (6-MSL) covalently attached to the *Leishmania* membrane proteins indicated that the terpenes essentially do not alter the dynamics of protein backbone and only increase the mobility of the nitroxide side chain. Cell lysis was not detected at cytotoxic concentrations, as measured by the presence of spin-labeled membrane fragments. Since the terpenes are considered potent skin permeation enhancers with low irritation potential, this work suggests checking the possibility of terpenes applications in the treatment of tegumentary leishmaniasis, where terpenes could perhaps perform a dual action of be an active principle and at the same time facilitate the penetration of other molecules with antileishmanial activity.

Keywords: Spectral Components, EPR, Terpenes, *Leishmania*.

Lista de Figuras

1.1	Representação esquemática do modelo do Mosaico Fluído de Membrana, proposto por Singer e Nicolson, em 1972(VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981).	5
1.2	Estruturas de fosfolipídios. No topo, algumas estruturas de ácidos graxos saturados e insaturados que podem associar-se ao glicerol. Mais ao centro pode ser observado alguns grupos que podem ligar ao fosfato(VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981).	7
1.3	Estrutura de esfingolipídios(VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981).	8
1.4	Estrutura química do colesterol, um importante lipídio das células animais.	10
1.5	Agregação de lipídios anfipáticos em um meio aquoso. (a) Corte transversal da estrutura de uma micela (b) Corte transversal da estrutura de uma bicamada lipídica. (c) Corte transversal de um lipossomo (NELSON; COX, 2006).	11
1.6	Principais características estruturas dos lipossomas (Adaptado de FRÉZARD <i>et al</i> , 2005) (FRÉZARD <i>et al.</i> , 2005).	12
1.7	Representação esquemática das vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) que são lipossomas classificados quanto ao diâmetro e ao número de bicamadas fosfolipídicas (SHARMA; SHARMA, 1997).	13
1.8	Representação das fases $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ e $L_{\alpha'}$ (CEVC; MARSH, 1987).	14
1.9	Parâmetro espectral f (círculos fechados), determinado diretamente dos espectros de RPE, indica a fração aproximada do marcador de spin dissolvido na membrana e a população relativa (círculos abertos) das sondas paramagnéticas no ambiente hidrofóbico, obtida por simulação espectral, para a vesícula multilamelar 1,2 dipamitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e membrana de estrato córneo (EC), versos a temperatura (ANJOS; ALONSO, 2008).	16
1.10	Diagrama de fase em função da temperatura do sistema DPPC e colesterol. Modificado de SANKARAM e THOMPSON, 1991 (SANKARAM; THOMPSON, 1991).	17

1.11	Representação esquemática dos mecanismos de movimentação lipídica. (A) Difusão lateral e (B) Difusão <i>flip-flop</i> ou movimentação trans bicamada (NELSON; COX, 2006).	18
1.12	Estrutura química do terpeno utilizado neste trabalho.	19
2.1	Diagrama de bloco simplificado de um espectrômetro de RPE de banda-X . Todos os componentes acima da linha pontilhada geralmente não ficam expostos, sendo construídos dentro de uma caixa retangular de onde sai uma guia de onda que liga a cavidade ressonante (HAGEN, 2009)	23
2.2	Efeito de um campo de modulação de pequena amplitude e frequência de 100 kHz na saída do detector de corrente. O campo magnético estático B é modulado entre os limites B_a e B_b , que gera uma variação na corrente do detector entre os limites i_a e i_b . O diagrama mostra o sinal de 100 kHz registrado e retificado em função de B (WEIL; BOLTON; WERTZ, 1994)	26
2.3	Separação entre os níveis de energia α e β , provocado pela ação de um campo magnético externo.	29
2.4	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 $\hat{\omega}_L$ (SILVA, 2007).	30
2.5	Interação dos momentos de dipolos do elétron ($\vec{\mu}_e$) e do núcleo ($\vec{\mu}_n$). O vetor $\vec{\mu}_e$ é indicado pelo estado $\hat{m}_S = -\frac{1}{2}$ e o vetor $\vec{\mu}_n$ 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} (BUDIL <i>et al.</i> , 1996).	37
2.6	Fórmula química geral do radical nitróxido, onde R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador spin.	40
2.7	(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 absorção 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 (COUTO; OLIVEIRA; ALONSO, 2005).	41
2.8	Figura esquemática mostrando o oxigênio do radical nitróxido 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.	42

2.9	O radical nitróxido e as orientações dos eixos principais dos tensores de segunda ordem \mathbf{g} e \mathbf{A} . Os grupos R_1 e R_2 permitem a reação do radical sem envolver o elemento paramagnético $N - O$	44
2.10	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 (NORDIO, 1976).	45
2.11	Espectro anisotrópico do marcador de spin em diferentes condições: (a) espectro de pó obtido a baixas temperaturas, (b) espectro do radical nitróxido em uma dispersão lipídica e (c) espectro isotrópico do marcador de spin em uma solução não viscosa (PERUSSI; RUGGIERO; TABAK, 1985).	46
2.12	Representação esquemática do marcador de spin 16-PC com alguns eixos dos sistemas de coordenadas. O eixo z_d é o diretor local da membrana, z_r é o eixo de simetria da cadeia acila sendo paralelo ao diretor local, $R_{//}$ e R_{\perp} são os valores principais do tensor de difusão, θ é o ângulo de inclinação da cadeia acila relativo ao eixo z_r está relacionado com o parâmetro de ordem e x_m , y_m e z_m são os eixos magnéticos do radical nitróxido (SALMON <i>et al.</i> , 2007).	50
4.1	Espectros de RPE dos marcadores de spin: 5-, 12- e 16-DMS, 5-, 12- e 16-DSA, 5-, 10- e 16-PC em membrana de DPPC para algumas temperaturas. As setas indicam as posições de campo magnético onde o perfil de linha característico de duas componentes é mais claramente visível. A varredura de campo magnético é de 100 G.	62
4.2	Espectros de RPE do marcador de spin 5-DMS em membrana de DPPC (pH 7,4) com variação da temperatura. Nos espectros da coluna esquerda as linhas de cor preta representam os espectros experimentais e as linhas de cor vermelha os espectros simulados com o programa NLLS, sendo que o espectro a 66°C também foi simulado com o programa EPRSIM. Os espectros da coluna direita são os espectros decompostos pela simulação em duas componentes espectrais, onde a componente 1 é a linha verde e a componente 2 está em azul. Também estão apresentados os parâmetros obtidos dos ajustes: N_1 , a população relativa da componente 1 e τ_c , o tempo de correlação rotacional, das duas componentes, obtidos da simulação.	64

4.3	Espectros de RPE experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) dos marcadores de spin 5-DMS, 7-DMS e 12-DMS em membrana de DPPC na fase fluida ou líquido-cristalina a 44°C. Os espectros foram simulados com o programa NLLS, que decompôs o espectro experimental em duas componentes espectrais, a componente 1 (linha verde) e a componente 2 (linha azul), sendo expressos os parâmetros N_1 , população de marcador da componente 1, e τ_c , o tempo de correlação rotacional de cada componente. Os valores de y , indicados na primeira linha de ressonância, mostram as intensidades relativas dos picos para cima e para baixo. Variação do campo magnético é de 100 G.	66
4.4	Espectros de RPE experimentais (linha preta) e simulados (linha vermelha) do marcador de spin 5-DMS nas membranas PC-18, PC-20 e PC-22 para várias de temperaturas. A varredura do campo magnético é de 100 G.	67
4.5	Representação esquemática das flutuações transversais propostas para o marcador de spin 5-DMS em membranas de DPPC. Os marcadores de spin da componente 1 estão localizados essencialmente na região rasa da bicamada (marcador de spin de cor verde) e os da componente 2 estão localizados na região mais profunda (marcador de cor azul).	68
4.6	Painel A: Tempo de correlação rotacional, τ_c , do 5-DMS nas membranas de várias fosfatidilcolina versus temperatura. Painel B: População relativa do marcador na componente 1, N_1 , determinado pela simulação espectral, para as vesículas de fosfatidilcolina versus a temperatura.	71
4.7	Logaritmo natural do coeficiente de partição, $\ln K$, do 5-DMS em vesículas de PC-16, PC-18, PC-20 e PC-22 versus o recíproco da temperatura absoluta	72
4.8	Tempo de correlação rotacional, τ_c , (painel A) e população relativa da componente 1, N_1 , (painel B) do marcador 5-DMS na membrana de DPPC (pH 7,4) versus a temperatura, simulados com os programas NLLS (círculos) e EPRSIM (quadrados).	74
4.9	População relativa da componente 1, N_1 , (painel B) e o tempo de correlação rotacional, τ_c , (painel A) do marcador 5-DMS em vesículas de PC-20. O terpeno (+)-Limoneno foi adicionado a uma fração molar terpeno:lipídio 0,8:1.	75
4.10	Membrana de PC-16 preparada com 40% de colesterol. No painel A tempo de correlação rotacional, τ_c . No Painel B, população relativa do marcador na componente 1, N_1	76
7.1	Manifestação clínica da Leishmaniose Visceral apresentando inchaço do fígado e do baço provocado pelos parasitos (DESJEUX, 2013).	85

7.2	(A) Lesão ulcerada típica da Leishmaniose Cutânea (LC) localizada, (B) LC disseminada e (C) LC difusa. (D) Lesão infiltrada e ulcerada na mucosa do palato duro decorrente da leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2007b; VELOSO <i>et al.</i> , 2006).	86
7.3	Ilustração esquemática das diferentes fases evolutivas de uma <i>Leishmania</i> . (A) A forma amastigota, que se desenvolve no vacúolo digestivo de macrófagos. (B) Forma promastigota, que é predominante no intestino de insetos infectados (REY, 2008).	90
7.4	Representação do ciclo biológico do gênero <i>Leishmania</i> (adaptado de Weingartner, 2011 (WEINGÄRTNER, 2011)).	92
7.5	Estrutura química dos terpenos utilizados neste trabalho.	96
7.6	Ilustração dos mecanismos de ação dos facilitadores de permeação nos dominós lipídicos (WILLIAMS; BARRY, 2004).	98
8.1	Estrutura química dos marcadores de spin utilizados neste trabalho.	102
9.1	Espectros de RPE experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) do marcador de spin 5-DSA em membranas de promastigotas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> de amostras sem tratamento (controle) e amostras tratadas com vários terpenos nas concentrações de $2,4 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna esquerda) e $4,8 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna direita). Os espectros foram simulados utilizando o programa de ajuste NLLS usando um modelo de duas componentes espectrais, que permitiu determinar a média do tempo de correlação rotacional, τ_c , para cada espectro. Outro parâmetro que é medido diretamente no espectro de RPE, $2A_{//}$, está indicado por linhas verticais na figura. A média e os desvios-padrão do τ_c e $2A_{//}$ são indicados. Para ambos os parâmetros, todos os terpenos foram significativamente diferentes da amostra controle ($p < 0,01$). A variação total do campo magnético em cada espectro é de 100 G.	110
9.2	(A) Curvas teóricas calculadas a partir da Eq. 9.4 para a razão da concentração molar (c_{cal}/c_w), em comparação com os valores do IC_{50} mostrados na Tabela 9.1 para diferentes concentrações de células tratadas com os terpenos Nerolidol (quadrado) e (+)-Limoneno (círculo) em função de V_w/V_m . (B) Curvas teóricas calculada a partir da Eq. 9.8 para a razão N/N_m em comparação com o IC_{50} do Nerolidol e (+)-Limoneno versus V_w/V_m	115

9.3	Espectros de RPE experimentais (linhas preta) e de melhor ajuste (linhas vermelha) do marcador 5-DSA nas membranas plasmáticas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> tratada com terpenos em várias concentrações em torno do IC_{50} (duas concentrações foram escolhidas abaixo e três acima do IC_{50}). O melhor ajuste espectral foi obtido pelo programa NLLS utilizando um modelo de duas componentes espectrais. Os valores médios do parâmetro de RPE tempo de correlação rotacional (τ_c) obtidos de três experimentos independentes foram indicados. Os espectros das amostras controle (sem tratamento) foram semelhantes a que já foi mostrado na Fig. 9.1 ($\tau_c = 8,1 \pm 0,2$ ns). A varredura do campo magnético é de 100 G.	117
9.4	Parâmetros de RPE $2A_{//}$ (painel A) e tempo de correlação rotacional, τ_c , (painel B) do marcador de spin 5-DSA em membranas de promastigotas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> em função da concentração de terpenos utilizada no tratamento. Os valores de IC_{50} de cada terpeno estão representados por pontos na parte inferior de cada gráfico indicados por linhas pontilhadas. Os erros experimentais estimados para $2A_{//}$ e τ_c são, 0,5 G e 0,2 ns, respectivamente.	118
9.5	(a) Espectro de RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha) a 26°C do marcador de spin 6-MSL ligado aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana da <i>Leishmania (L) amazonensis</i> . O espectro de melhor ajuste foi obtido pelo programa NLLS, usando um modelo de duas componentes espectrais. (b) As componentes espectrais fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas. Os parâmetros desdobramento hiperfino isotrópico $2a_0$ e o $2A_{//}$ são indicados. (c) Ilustração esquemática do modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente ao grupo sulfidrilas da proteína. O radical nitróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (S), ou com as moléculas de água para gerar a componente fracamente imobilizada (W). Também há uma possível formação de ligações de hidrogênio entre a proteína e os dois átomos do oxigênio do anel maleimido, prendendo fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica (COUTO; OLIVEIRA; ALONSO, 2005).	119
9.6	Espectros de RPE experimentais do marcador de spin 6-MLS covalentemente ligado às proteínas de membrana de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> , para as amostras sem tratamento e tratadas com terpenos. Os valores médios do parâmetro $2A_{//}$ são indicados.	120

9.7	Percentual de lise celular em amostras de promastigotas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> tratadas com terpenos. O IC_{50} de cada terpeno é representado pelo seu símbolo correspondente e uma linha vertical.	122
9.8	Espectros de RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha) a 26°C do marcador de spin 6-MLS, ligado às proteínas de membrana da <i>Leishmania (L) amazonensis</i> tratada com vários terpenos na concentração de $4,8 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna esquerda) e no sobrenadante (coluna direita).	124

Lista de Tabelas

2.1	Lista dos parâmetros de entrada usados no programa do NLLS para a realização da simulação dos espectros experimentais (BUDIL <i>et al.</i> , 1996).	49
3.1	As fórmulas estruturais e moleculares, as massa molares, os nomes completos e as abreviaturas de cada marcador de spin utilizado neste trabalho.	56
3.2	As fórmulas estruturais e moleculares, os nomes completos, as siglas, as massas molares e a temperatura de transição de fase, T_m , das moléculas anfífilas utilizadas neste estudo.	58
3.3	Principais componentes dos tensores magnéticos g (fator g) e A (interação hiperfina) usados no programa NLLS (Nonlinear Least-Squares)	59
4.1	Mudanças na energia livre padrão de Gibbs (a 34°C), entalpias e entropias associadas com a transferência do marcador de spin 5-DMS da componente 1 para a 2 em vesículas de fosfatidilcolina (PC-16, PC-18, PC-20 e PC-22) abaixo da transição de fase principal e após a transição para a PC-16.	73
8.1	Principais componentes dos tensores magnéticos g (fator g) e A (interação hiperfina) usados no programa NLLS (Nonlinear Least-Squares)	107
9.1	Efeito dos terpenos contra promastigotas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> (ensaio de MTT).	113

Lista de Abreviaturas e Siglas

Parte I

a	- Constante de desdobramento hiperfino;
a₀	- Constante de desdobramento hiperfino isotrópico;
n-DMS	- <i>methyl n-doxyl-stearate</i> ;
n-DSA	- <i>n-doxyl stearic acid</i> ;
n-PC	- <i>1-palmitoyl-2-stearoyl-(n-doxyl)-sn-glycero-3-phosphocholine</i> ;
NLLS	- <i>Nonlinear Least-Square</i> ;
PC-16 ou DPPC	- <i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> ;
PC-18	- <i>1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> ;
PC-20	- <i>1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> ;
PC-22	- <i>1,2-dibehenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> ;
pH	- Produto ou potencial hidrogeniônico;
PBS	- <i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salina);
RPE	- Ressonância Paramagnética Eletrônica;
2A _{//}	- Desdobramento hiperfino máximo;
L _{β'}	- Fase ordenada ou gel;
L _{α'}	- Fase fluida ou líquido-cristalina;
P _{β'}	- Fase de pré-transição;
τ _c	- Tempo de correlação rotacional.

Parte II

LV	- Leishmaniose visceral;
LT	- Leishmaniose tegumentar;
MT	- Miltefosina;
GP63	- Glicoproteína 63;
LPG	- <i>Lipophosphoglycan</i> (Lipofosfoglicanos);
DNA	- Ácido desoxirribonucleico;
6-MSL	- 2,2,6,6-tetramethyl-3-mal3imidopyrrolidinyl-N-oxyl;
SFB	- Soro fetal bovino inativado;
IC_{50}	- Concentração inibidora 50%;
MTT	- <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> ;
K	- Coeficiente de partição;
SDS	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio);
$P_{o/w}$	- Coeficiente octanol-água.

Índice

Parte I	1
1 Introdução	2
1.1 Modelo de Membrana Biológica	4
1.2 Os Lipídios das Membranas Biológicas	6
1.2.1 Colesterol	9
1.3 Lipossomas	10
1.4 Comportamento de Fase dos Fosfolipídios	14
1.5 Terpenos	18
1.6 Objetivos	20
2 Ressonância Paramagnética Eletrônica	21
2.1 Introdução	21
2.2 O Espectrômetro de RPE	22
2.2.1 Detecção sensível à fase	25
2.3 Fenômeno da Ressonância	27
2.4 Processos de Relaxação	32
2.4.1 Relaxação Spin-Rede	33
2.4.2 Relaxação Spin-Spin	35
2.5 Interação nuclear Hiperfina	36
2.6 O Método dos Marcadores de Spin	39
2.7 Anisotropia Espectral	43
2.8 Simulação	45
2.8.1 NLLS	47
2.8.2 EPRSIM	53
3 Materiais e Métodos	55
3.1 Materiais	55

3.2	Condição de Operação do Espectrômetro	55
3.3	Preparação das Vesículas de Fosfolipídios	56
3.4	Preparação das Vesículas com Colesterol e (+)-Limoneno	57
3.5	Simulação dos Espectros de RPE	59
4	Resultados	61
4.1	Análise dos Espectros de RPE	61
4.2	Dinâmica e Partição do 5-DMS nas Bicamadas de Fosfatidilcolina	69
4.3	Comportamento das Componentes Espectrais na Presença do Limoneno e Colesterol	73
5	Discussões	77
6	Conclusões	82
	Parte II	84
7	Introdução	85
7.1	Leishmaniose	85
7.2	Tratamento da Leishmaniose	87
7.3	Agente Etiológico	89
7.3.1	Ciclo evolutivo	92
7.3.2	Terpenos	94
7.3.3	Objetivos	100
8	Materiais e Métodos	101
8.1	Materiais	101
8.2	Tratamento e Marcação das cepas de <i>Leishmania</i> com terpenos	102
8.3	Marcação de proteínas da membrana plasmática de <i>Leishmania</i>	103
8.4	Citotoxicidade dos terpenos	103
8.5	Quantificação da lise celular produzida em <i>Leishmania</i> pela ação dos terpenos	105
8.6	Medidas e simulação dos Espectros de RPE	106
8.7	Análise estatística	108
9	Resultados	109
9.1	Espectros de RPE do 5-DSA em membrana de <i>Leishmania</i>	109
9.2	Análise da citotoxicidade dos terpenos sobre a <i>Leishmania</i>	111

9.3	Comparação entre os dados de IC_{50} dos terpenos e as concentrações que alteram a fluidez de membrana	116
9.4	Interação dos terpenos com as proteínas de membrana de <i>Leishmania</i>	118
9.5	Verificação da ocorrência de lise celular induzida em <i>Leishmania</i> pela interação com terpenos	122
10	Discussões	126
11	Conclusões	134
	Bibliografia	136

Parte I

COMPONENTES ESPECTRAIS DE RPE DE MARCADORES LIPÍDICOS EM VESÍCULAS DE FOSFOLIPÍDIOS SATURADOS

Capítulo 1

Introdução

O grande incentivo ao estudo das bicamadas de fosfolipídios é o fato de representarem modelos do componente lipídico das membranas biológicas. Com o desenvolvimento do método de marcadores de spin, criado em 1965 por McConnell (GRIFFITH; WAGGONER, 1969; HAMILTON; MCCONNELL, 1968; VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981), a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) proporcionou contribuições fundamentais para a compreensão da estrutura das membranas artificiais e naturais. Este método consiste em inserir na membrana celular ou membrana modelo um lipídio marcado com um fragmento paramagnético e, através dos espectros de RPE, obter informações sobre o meio em que estas moléculas se encontram. Para o estudo das membranas celulares há dezenas de marcadores lipídicos e outros específicos para proteínas integrais de membrana. Dada a importância desta espectroscopia, vem sendo desenvolvidos programas para a simulação dos espectros de RPE desde a década de 80, com o intuito de extrair a máxima quantidade de informações que estão codificadas nos espectros.

Durante várias décadas, a espectroscopia de RPE de sondas lipídicas contribuiu para uma melhor compreensão das membranas celulares, principalmente sobre suas propriedades estruturais e dinâmicas. No entanto, os espectros RPE destas sondas em biomembranas são geralmente muito complexos, tendo normalmente mais de uma componente espectral que podem aparecer resolvidas ou não nos espectros. Por exemplo, na presença de proteínas integrais de membrana é comum observar espectros contendo duas componentes, indicando

a coexistência de duas classes de marcadores em diferentes estados de mobilidade. A componente de menor mobilidade está associada aos lipídios de contorno das proteínas, onde a interação do marcador com regiões hidrofóbicas das proteínas restringem seu movimento, e a componente mais móvel decorre dos marcadores localizados no “*bulk*” da bicamada, longe das proteínas (JOST *et al.*, 1973; GRIFFITH; JOST, 1976). Além disso, espectros de RPE de duas componentes espectrais também são comumente observados para marcadores lipídicos em bicamadas simples e, desde que a dinâmica molecular da membrana está relacionada com permeabilidade e função de membrana, esta é uma questão que certamente merece estudos mais detalhados.

Na espectroscopia de fluorescência, moléculas fluorescentes são utilizadas como sondas para investigação de propriedades físico-química e bioquímica de amostras, geralmente biológicas. A fluorescência comumente se origina de uma transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado eletrônico excitado para um dos níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental onde este fenômeno se diferencia da fosforescência pelo fato das transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolverem uma mudança de spin eletrônico (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Estudos de membranas modelos usando espectroscopia de fluorescência também mostraram que várias sondas de membrana podem ocupar na bicamada lipídica pelo menos dois locais distintos, caracterizados por diferentes polaridades e graus de hidratação (ASUNCION-PUNZALAN; KACHEL; LONDON, 1998; DOROSHENKO *et al.*, 2002). A origem desta distribuição bimodal tem sido interpretada com base na capacidade destes marcadores participarem de ligações de hidrogênio dentro da membrana – um sítio polar na interface da bicamada onde a sonda está ligada aos grupos polares através de ligações de hidrogênio e um sítio apolar sem qualquer ligação de hidrogênio (KLYMCHENKO *et al.*, 2004). Interessante, a aplicação de uma pressão hidrostática às vesículas de DMPC faz a sonda fluorescente PRODAN se deslocar na bicamada para ambientes mais hidrofóbicos (CHONG, 1988). Em estudos anteriores, foram analisados espectros de RPE de duas componentes de vários marcadores de spin em membranas de

estrato córneo, a camada mais externa da pele, usando o programa de simulação NLLS (do inglês: “*Non-Linear Least Square*”) para monitorar a dinâmica e a fração da sonda em cada componente (QUEIRÓS; NETO; ALONSO, 2005; ANJOS; NETO; ALONSO, 2007, 2007). A presença dos terpenos L-mentol e 1,8-cineol, dois potentes aumentadores de permeação, no estrato córneo na concentração de 1% (p/p) ou em vesículas de DPPC na relação molar terpeno:lipídio de 0,7:1, aumentaram drasticamente a fluidez dos lipídios, especialmente transferindo os marcadores da componente mais restrita para a componente mais mobilizada no interior das membranas (ANJOS; NETO; ALONSO, 2007, 2007). Mais recentemente, espectros de RPE de marcadores de spin em membranas foram simulados utilizando o modelo de duas componentes para estudar os efeitos do fármaco leishmanicida miltefosina nas membranas intercelulares do estrato córneo e da *Leishmania (L) amazonensis* (ALONSO *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2014) e ação tripanocida de elatol (DESOTI *et al.*, 2012), bem como a toxicidade dos terpenos em cultivo de fibroblastos (MENDANHA *et al.*, 2013).

Para abordar mais cuidadosamente a questão das duas componentes espectrais comumente encontradas nos espectros de RPE de marcadores lipídicos em membranas modelos, realizamos um trabalho experimental intenso com o marcador metil 5-doxil estearato (5-DMS) em vesículas de fosfatidilcolinas saturadas, variando o comprimento de cadeia de 16 a 22 átomos de carbono e a temperatura na faixa de 10 a 78°C. Para obter um melhor entendimento sobre as interações moleculares deste marcador dentro da membrana, foi avaliada a dinâmica molecular em cada uma destas duas principais acomodações estruturais do marcador, bem como o perfil termodinâmico envolvido na sua distribuição entre estes ambientes. Além disso, o mesmo modelo de simulação foi utilizado para estudar as influências do colesterol e de um aumentador de permeação na pele tanto na mobilidade como na população de marcador em cada um destes principais locais dentro da bicamada lipídica.

1.1 Modelo de Membrana Biológica

A membrana biológica da célula possui a função de manter diversas moléculas,

como proteínas e pequenos solutos no seu interior celular além de regular o fluxo de substâncias entre os meios interno e externo. Por apresentar uma permeabilidade seletiva, ela pode reter certos compostos e íons dentro da célula e de compartimentos intracelulares específicos, enquanto excluem outras substâncias desses locais (NELSON; COX, 2006).

O modelo mais adequado já apresentado foi proposto por Singer e Nicolson em 1972, denominado modelo do Mosaico Fluido de Membrana (Fig. 1.1), que explica não só a constituição, como o funcionamento da membrana. Este modelo foi formulado com base nas evidências combinadas da microscopia eletrônica e de estudos da composição química, da permeabilidade e mobilidade individual de moléculas dentro da membrana (NELSON; COX, 2006; VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981). Neste modelo, os fosfolipídios formam bicamada que apresentam moléculas de proteínas incorporadas nessa estrutura por interações hidrofóbicas entre os lipídios. O fato das interações entre os componentes não serem do tipo covalentes, deixa as moléculas individuais dos lipídios e proteínas livres para se movimentarem, se alterando constantemente e tornando o mosaico da membrana fluido (NELSON; COX, 2006).

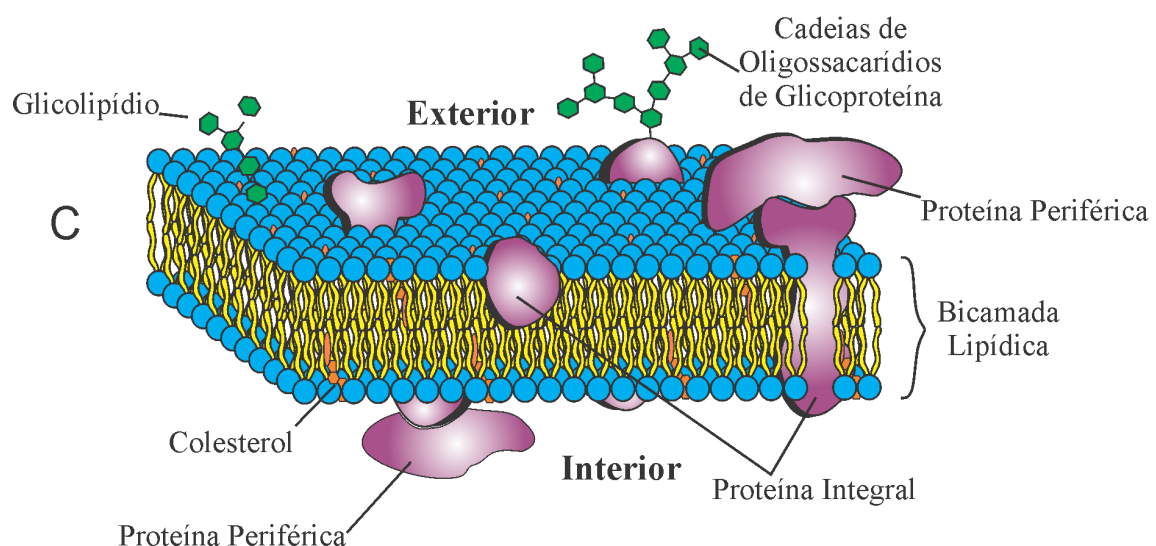


Figura 1.1: Representação esquemática do modelo do Mosaico Fluido de Membrana, proposto por Singer e Nicolson, em 1972(VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981).

A estrutura básica de todas as membranas celulares é a bicamada lipídica onde

pode existir, aproximadamente, 5×10^6 moléculas lipídicas em uma área de $1 \mu m^2$, correspondendo a cerca de 10^9 moléculas lipídicas na membrana plasmática de uma pequena célula animal. Além do efeito hidrofóbico, as forças atrativas de van der Waals, as interações eletrostáticas e a formação de ligação de hidrogênio também exercem importante contribuição para a estabilidade desta estrutura (ALBERTS *et al.*, 1997).

As proteínas de membrana se dividem em dois grupos operacionais, as integrais e periféricas. As proteínas integrais estão firmemente associadas à membrana através de interações hidrofóbicas, sendo críticas para a sua integridade estrutural, e exigem tratamento drástico para sua remoção, como a utilização de agentes como detergentes, solventes orgânicos ou desnaturantes. As proteínas periféricas estão ligadas às membranas por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas que estabelecem com a superfície polar da bicamada e com os domínios hidrofílicos das proteínas integrais, por isso, são removidas por tratamentos moderados que interferem nas interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. Entretanto, elas podem regular as enzimas ligadas à membrana ou limitar a mobilidade de proteínas integrais ao se ligar com estruturas intracelulares (NELSON; COX, 2006).

1.2 Os Lipídios das Membranas Biológicas

A característica principal da membrana biológica é a camada dupla de lipídios, que forma uma barreira estável entre dois compartimentos aquosos impedindo a passagem de moléculas polares e íons. Os lipídios são moléculas anfipáticas, ou seja, uma das extremidades é hidrofóbica e a outra hidrofílica. As partes hidrofílicas interagem com a água e as interações hidrofóbicas entre as cadeias graxas promovem sua organização em bicamadas lipídicas. Os lipídios são responsáveis por aproximadamente 50% da massa da maioria das membranas celulares, sendo que esta proporção varia com o tipo de membrana (VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981; NELSON; COX, 2006).

Em geral, os lipídios das membranas biológicas têm como base a molécula do glicerol, onde duas hidroxilas são substituídas por duas cadeias de ácidos graxos, com a

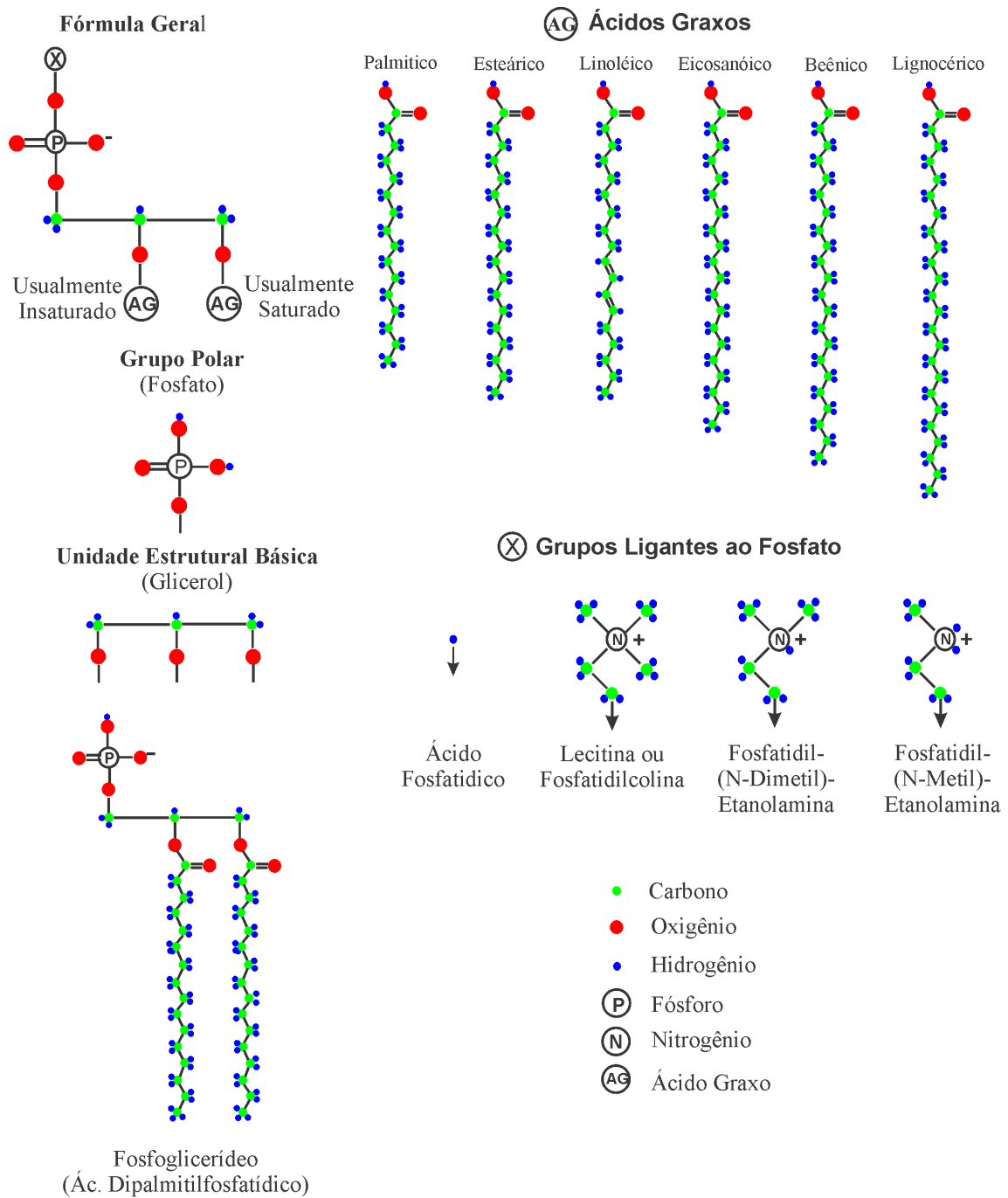


Figura 1.2: Estruturas de fosfolipídios. No topo, algumas estruturas de ácidos graxos saturados e insaturados que podem associar-se ao glicerol. Mais ao centro pode ser observado alguns grupos que podem ligar ao fosfato(VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981).

terceira posição sendo ocupada por um grupo polar. Os lipídios podem ser diferenciados pelas cadeias de ácidos graxos ou pelo grupo polar, ou ambos.

Nas membranas biológicas, a classe de lipídios mais numerosa é a dos fosfolipídios,

que são moléculas compostas de duas cadeias de ácidos graxos, ligados a um grupo hidrofílico contendo fosfato (Fig. 1.2). Geralmente, o fosfolipídio contém um ácido graxo saturado e um insaturado (Fig. 1.2), sendo este, normalmente situado na posição dois da cadeia do glicerol. A cabeça polar pode conter vários grupos polares como na lecitina, por exemplo, onde o fosfato tem um grupo colina ligado.

Outra classe de lipídios encontrados na membrana são os esfingolipídios, que apresentam um grupo-cabeça polar e duas caudas não polares, mas não contêm glicerol. Basicamente, a estrutura dos esfingolipídios é composta por uma molécula de cadeia longa de um amino-álcool, chamada de esfingosina, unida a uma molécula de ácido graxo e a um grupo-cabeça polar (Fig. 1.3) (NELSON; COX, 2006). Alguns esfingolipídios têm o grupo-cabeça polar ligado à porção hidrofóbica por uma ligação fosfodiéster, sendo chamados de fosfolipídios. Apesar de se conhecer a função específica de poucos esfingolipídios, sabe-se que são importantes sítios de reconhecimento na superfície da célula.

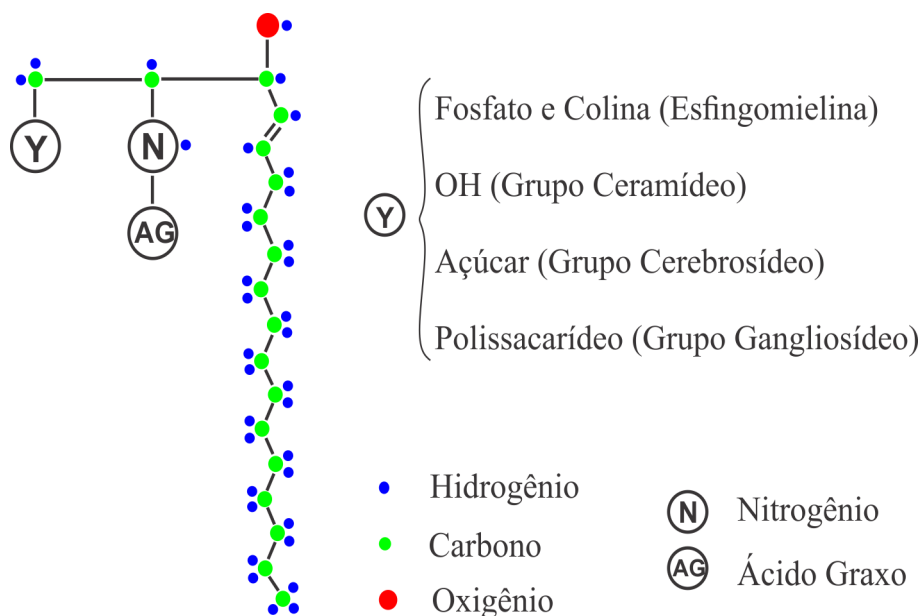


Figura 1.3: Estrutura de esfingolipídios(VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981).

Outra classe de lipídios de grande importância é a dos esteróis, que está presente na maioria das células eucarióticas. Estes lipídios têm como característica um núcleo este-

róide constituído por quatro anéis fundidos entre si, três deles com seis átomos de carbono e um com cinco. Sendo o núcleo esteróide quase plano e relativamente rígido, onde os anéis fundidos não permitem a rotação em torno das ligações carbono-carbono. O lipídio mais importante da classe dos esteróis é o colesterol, o qual será comentado mais adiante.

As membranas contêm uma variedade de lipídios. Por exemplo: a membrana plasmática de *Escherichia coli* é composta predominantemente de fosfatidiletanolamina, que constitui 80% dos lipídios totais. As membranas plasmáticas dos mamíferos são mais complexas, contendo quatro fosfolipídios principais – fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline – que juntos constituem 50 a 60% dos lipídios totais da membrana. Além dos fosfolipídios, as membranas plasmáticas das células animais contêm glicolipídios e colesterol, que geralmente correspondem a cerca de 40% do total das moléculas lipídicas. Estas diferenças em composição certamente refletem diferenças na função fisiológica das membranas, não sendo possível definir a relação entre composição e função, até o momento (VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981; COOPER; HAUSMAN, 2007).

1.2.1 Colesterol

O colesterol é um esteroide tendo como grupo polar a hidroxila e um corpo de hidrocarboneto que em sua forma estendida é quase tão longo quanto um ácido graxo com 16 carbonos. É o esteroide característico das células animais, com sua concentração variando de ~10% a ~50% (YEAGLE, 1993), mas os vegetais, fungos e protistas, em vez do colesterol, sintetizam outros esteróis intimamente relacionados. Todos os tecidos animais em crescimento necessitam dele para a síntese de membranas e alguns órgãos o utilizam como um precursor para a produção dos hormônios esteróides, sendo ele também um precursor da vitamina D, além de regular a fluidez da membrana para diversas temperaturas.

Assim como os fosfolipídios, o colesterol é insolúvel em água, portanto, sendo insolúvel no sangue. Para ser transportado pelo plasma sanguíneo, do tecido de origem para os tecidos em que será armazenado ou consumido, ele se liga a várias apolipoproteínas,

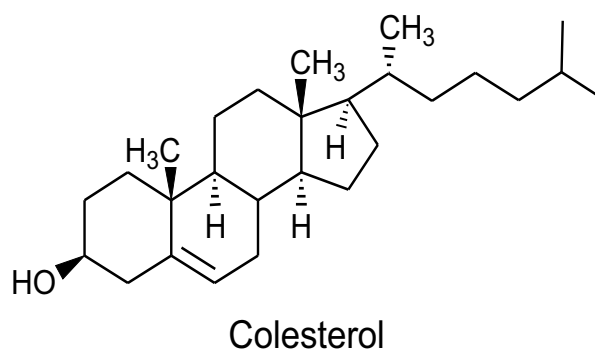


Figura 1.4: Estrutura química do colesterol, um importante lipídio das células animais.

que são proteínas transportadoras específicas, formando as lipoproteínas plasmáticas (proteínas mais lipídios combinados). As lipoproteínas são agregados esféricos complexos onde os lipídios hidrofóbicos ficam no centro, e as cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas, na superfície. Existem várias classes de lipoproteínas, mas pode se destacar as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são ricas em colesterol e em ésteres do colesterol, associadas à aterosclerose, uma doença inflamatória das paredes dos vasos sanguíneos (NELSON; COX, 2006; YEAGLE, 1993).

1.3 Lipossomas

Quando os lipídios entram em contato com a água, os grupos da cabeça polar ficam na interface entre o meio aquoso e o lipídio, e as caudas hidrofóbicas interagem, criando um ambiente interior hidrofóbico que exclui a água. Esta agregação das moléculas lipídicas reduz a superfície hidrofóbica exposta à água, o que minimiza o número de camada de água organizada na interface água-lipídio, resultando no aumento da entropia (NELSON; COX, 2006; DEVLIN, 2007; MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2007).

Estruturas micelares são formadas por moléculas lipídicas com formato de cunhas tais como os ácidos graxos livres, os lisofosfolipídios e os detergentes (Fig. 1.5a). As micelas são estruturas esféricas onde os lipídios se arranjam com suas regiões hidrofóbicas agregadas no interior, de onde a água é excluída, colocando os grupos polares na superfície em contato

com a água. O segundo tipo de agregação dos lipídios na água é a bicamada (Fig. 1.5b), onde duas monocamadas de lipídios formam uma lâmina bidimensional. Este tipo de estrutura lipídica geralmente se forma quando a área ocupada pela cabeça polar no plano da membrana é aproximadamente a mesma das cadeias graxas do lipídio. Esta conformação em bicamada constitui a estrutura lipídica básica de todas as membranas biológicas. As bicamadas lipídicas são estruturas bastante estáveis, que são mantidas juntas por interações hidrofóbicas das cadeias hidrocarbônicas e interações iônicas dos grupos carregados da cabeça com a água. As lâminas de bicamadas se dobras entre si mesma, espontaneamente, formando uma esfera oca chamada de vesícula ou lipossoma (Fig. 1.5c), que é o terceiro tipo de agregação lipídica.

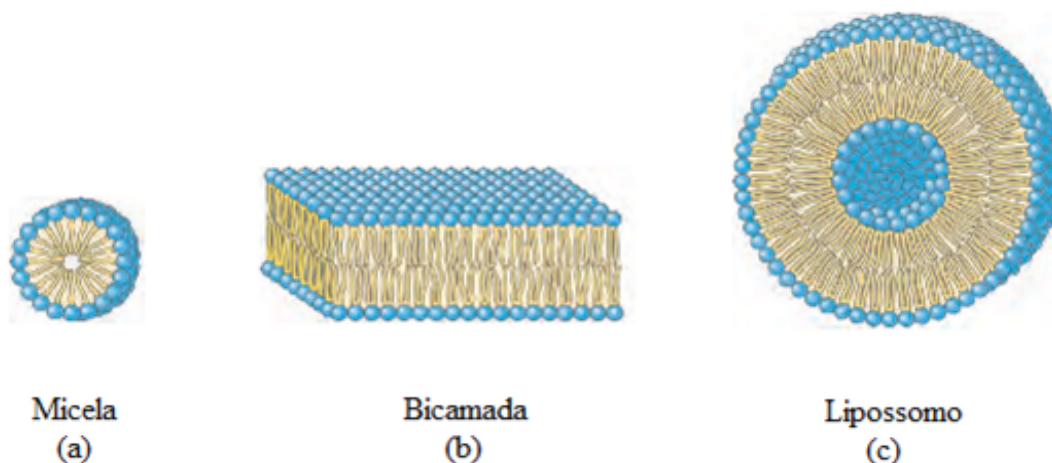


Figura 1.5: Agregação de lipídios anfipáticos em um meio aquoso. (a) Corte transversal da estrutura de uma micela (b) Corte transversal da estrutura de uma bicamada lipídica. (c) Corte transversal de um lipossomo (NELSON; COX, 2006).

Os lipossomos são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas composta de lipídios como o glicerofosfolípídeo e a fosfatidilcolina. Na presença de água se organizam espontaneamente em estruturas fechadas, isolando os compartimentos aquosos internos do meio externo, podendo o diâmetro médio variar em torno de 20 a 5000 nm (Figura 1.6) (SANTOS; CASTANHO, 2002; FRÉZARD *et al.*, 2005; ISRAELASCHVILI, 1991). Dependendo do formato, tamanho, morfologia e características físico-químicas, estas

estruturas possuem a capacidade de encapsulamento de compostos hidrofílicos no seu núcleo aquoso e compostos hidrofóbicos nas bicamadas lipídicas (Fig. 1.7), assim, sendo possível a sua utilização como transportadores de fármacos (BRUNI *et al.*, 1976).

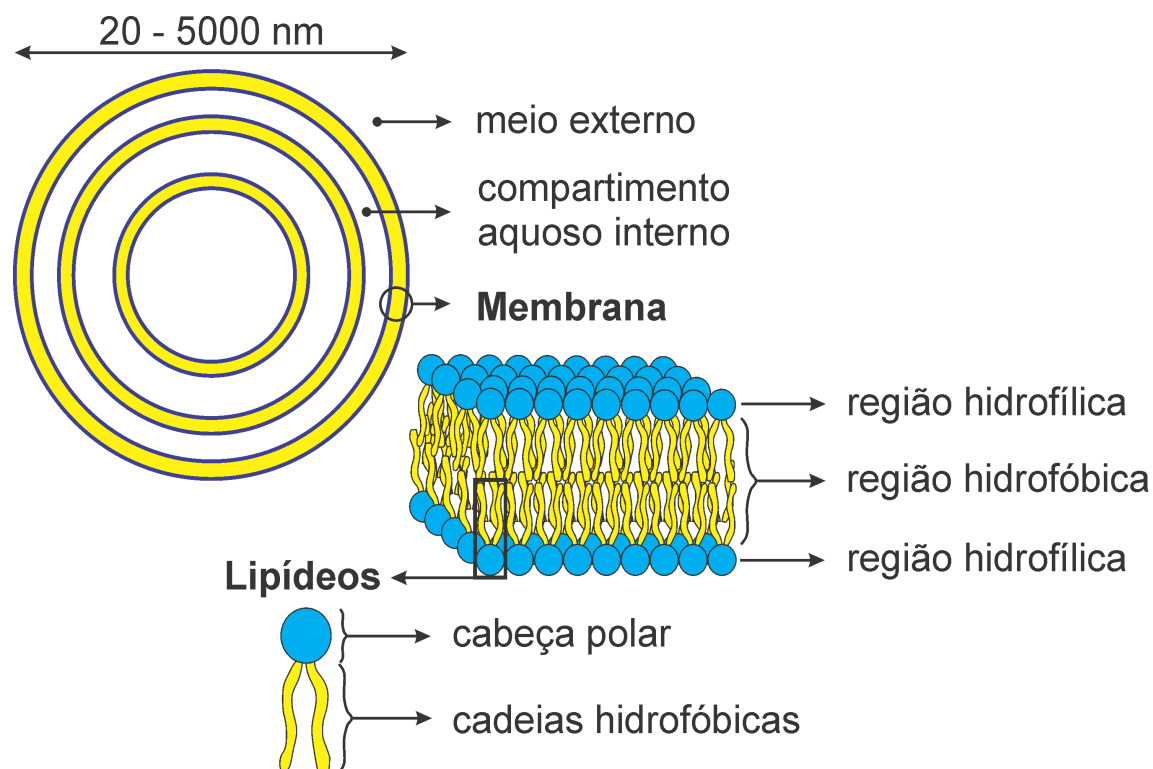


Figura 1.6: Principais características estruturas dos lipossomas (Adaptado de FRÉZARD *et al.*, 2005) (FRÉZARD *et al.*, 2005).

A classificação mais comum dos lipossomas é feita segundo o número de lamelas e tamanho das vesículas (Fig. 1.7) (FRÉZARD *et al.*, 2005). Onde podemos destacar as vesículas multilamelares (MLV - “*multilamellar vesicles*”) que possuem várias bicamadas lipídicas com o diâmetro superior a 100 nm, apresentando maior capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos. Estas vesículas são bastante utilizadas por apresentar um método de preparação simples e rápido, consistindo na formação de um fino filme de fosfolipídio através da evaporação de uma solução orgânica, sendo depois hidratado sobre agitação para melhorar a dispersão dos lipídios (SANTOS; CASTANHO, 2002; SHARMA; SHARMA, 1997). Também existem os lipossomos unilamelares, formados por apenas uma bicamada lipídica, sendo uma estrutura mais simples que permite uma interpretação mais bem definida. Neste

grupo se destaca as vesículas unilamelares grandes (LUV – “*large unilamellar vesicles*”), com diâmetro maior que 100 nm, e as vesículas unilamelares pequenas (SUV – “*small unilamellar vesicles*”), que apresentam tamanho menor ou igual a 100 nm. A preparação de vesícula unilamelares grandes e pequenas inicialmente parte de uma suspensão de vesículas multilamelares e diferem no final quanto ao método de preparo. Ou seja, na preparação de SUV, os MLV passam por uma sonicação enquanto para a obtenção de LUV é necessário um processo de extrusão (SANTOS; CASTANHO, 2002; SHARMA; SHARMA, 1997; HOPE *et al.*, 1985). Além dessas vesículas unilamelares mencionadas, existe as vesículas unilamelares gigantes (GUV – “*giant unilamellar vesicles*”), com dimensões superiores a 1000 nm.

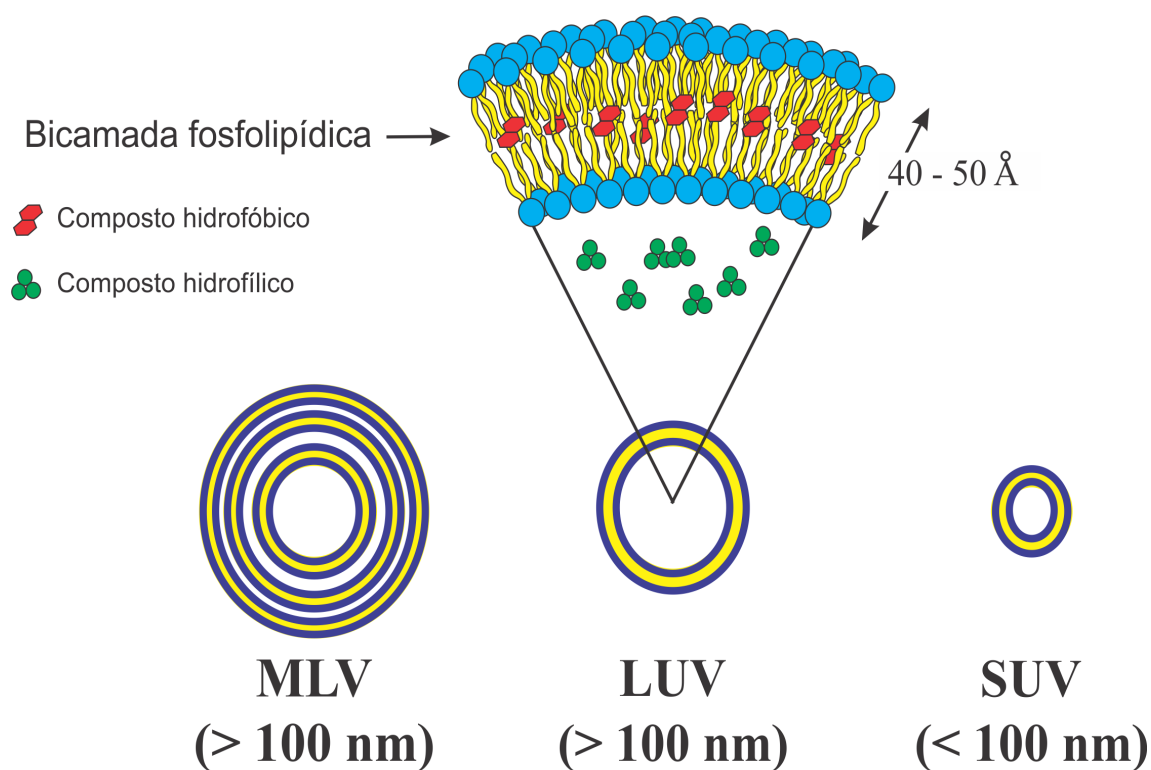


Figura 1.7: Representação esquemática das vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) que são lipossomas classificados quanto ao diâmetro e ao número de bicamadas fosfolipídicas (SHARMA; SHARMA, 1997).

Devido à semelhança e uma menor complexidade estrutural em relação às membranas celulares, as vesículas fosfolipídicas ou lipossomas são constantemente utilizadas em estudos como modelos de biomembranas artificiais. Neste trabalho, os lipossomas foram

preparados a partir de fosfatidilcolinas saturadas, variando o comprimento de cadeia de 16 a 22 átomos de carbono, utilizando o método de evaporação da solução orgânica associada a um processo de extrusão para garantir a homogeneidade das vesículas.

1.4 Comportamento de Fase dos Fosfolipídios

Embora a estrutura das bicamadas seja bem estável, suas moléculas de fosfolipídios e de esteróis exibem alguma liberdade de movimentação. A bicamada totalmente hidratada com um único tipo de fosfolipídio sempre mostra uma transição de fase bem definida, onde as cadeias lipídicas passam de um estado ordenado ou gel para um fluido ou estado líquido-cristalino. A fase ordenada é designada por $L_{\beta'}$ e a fase fluida ou líquido-cristalina é designada por $L_{\alpha'}$. Além disso, para alguns fosfolipídios, é encontrada uma fase de pré-transição ou líquido-ordenado $P_{\beta'}$, onde a bicamada fica ondulada, entre a fase gel e a fase fluida (Fig. 1.8) (AGUIRRE; MAY, 2008).

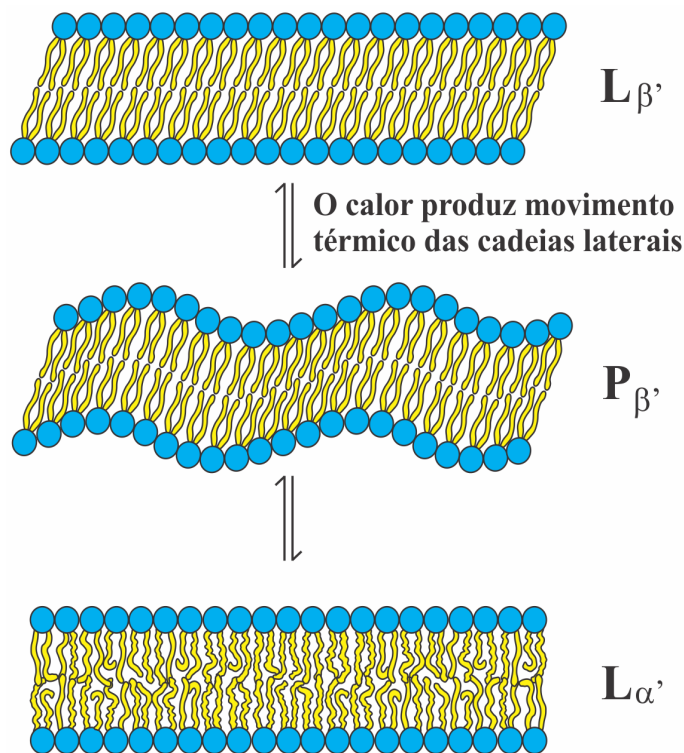


Figura 1.8: Representação das fases $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ e $L_{\alpha'}$ (CEVC; MARSH, 1987).

Em temperaturas relativamente baixas, os lipídios na bicamada se encontram na fase gel (Fig. 1.8), onde as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios estão todas estendidas numa conformação *trans*, a área transversal das moléculas de fosfolipídios é mínima, a espessura da bicamada fosfolipídica é máxima, e ambos os movimentos intra- e intermoleculares são severamente restringidos. Em temperaturas intermediárias, os lipídios estão na fase líquido-ordenada, onde ocorre um aumento da movimentação térmica das cadeias acila da bicamada lipídica, ocorrendo uma movimentação lateral dentro do plano da bicamada. Já na fase líquido-cristalina há uma maior movimentação térmica no interior da bicamada, de forma que a bicamada é semelhante a um "mar lipídico" em constante movimento (NELSON; COX, 2006; CEVC; MARSH, 1987; LEWIS; MCELHANEY, 2004).

A temperatura em que ocorre a transição de fase é influenciada pela saturação e também pelo tamanho da cadeia acila graxas. Os ácidos graxos saturados de cadeia longa ficam mais bem agrupados em um conjunto líquido-ordenado, o que eleva a temperatura de transição da fase $L_{\beta'}$ para a fase $L_{\alpha'}$. Enquanto que os ácidos graxos insaturados, as dobras dificultam o agrupamento dos lipídios, reduzindo a temperatura da transição da fase gel para a fase fluida (NELSON; COX, 2006).

As transições de fase em bicamadas são de fácil observação em lipossomos compostos de um único lipídio, entretanto, quando se tem muitos lipídios com diferentes cadeias graxas, elas não exibem mudanças nítidas de fase com as variações de temperaturas. Isto é notado na membrana de estrato córneo (EC), que é a última camada da epiderme, contendo em sua composição lipídica até nove tipos de ceramidas, além de ácidos graxos livres, colesterol e sulfato de colesterol. Anjos e Alonso (2008) utilizando a espectroscopia de RPE de marcadores lipídicos e o programa de simulação de espectros NLLS, compararam as transições de fase observadas em membranas de estrato córneo e de fosfolipídios através do sinal do marcador TEMPO. Os gráficos apresentados na Fig. 1.9 mostram que enquanto a membrana de fosfolipídio possui mudanças abruptas no coeficiente de partição do marcador durante a passagem da transição de fase, a membrana de estrato córneo tem como característica uma

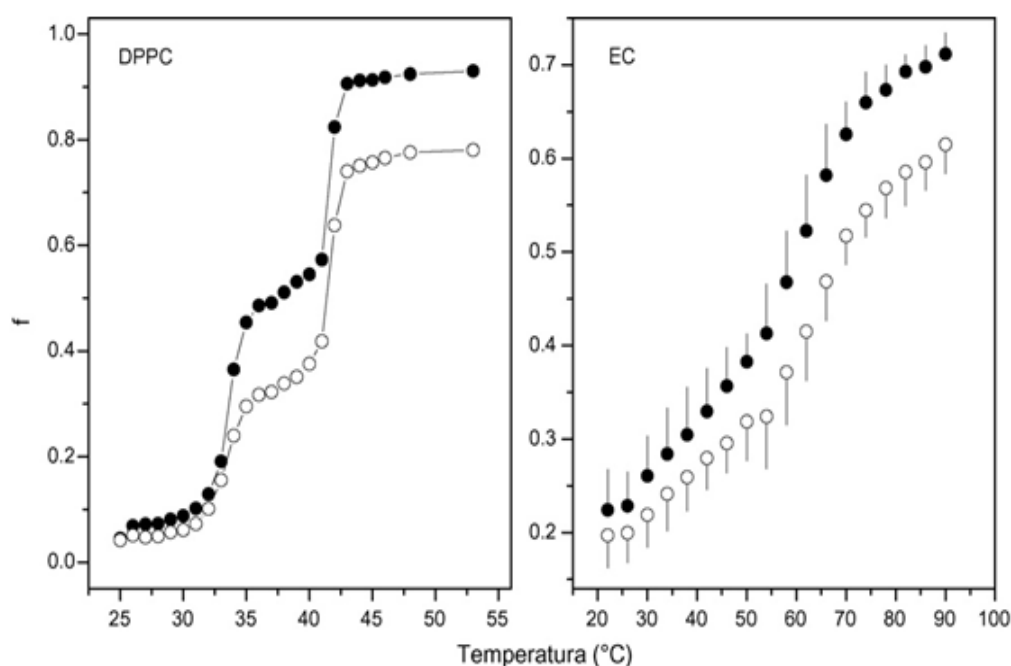


Figura 1.9: Parâmetro espectral f (círculos fechados), determinado diretamente dos espectros de RPE, indica a fração aproximada do marcador de spin dissolvido na membrana e a população relativa (círculos abertos) das sondas paramagnéticas no ambiente hidrofóbico, obtida por simulação espectral, para a vesícula multilamelar 1,2 dipamitoil-sn-glicero-3-fosfolipina (DPPC) e membrana de estrato córneo (EC), versus a temperatura (ANJOS; ALONSO, 2008).

suave transição de fase, visualizada por uma maior inclinação da curva no intervalo de $\sim 55^{\circ}\text{C}$ e $\sim 72^{\circ}\text{C}$ (ANJOS; ALONSO, 2008).

Outro fator que influencia a transição de fase lipídica é a concentração de esteróis, em especial o colesterol, que varia muito dependendo do organismo. A estrutura planar rígida do núcleo esteróide, inserido entre as cadeias graxas, reduz a liberdade daquelas que lhe são vizinhas de se movimentarem por rotação ao redor das ligações carbono-carbono e forçam essas cadeias a assumirem conformações mais lineares. Portanto, a presença de esteróis reduz a fluidez no interior da bicamada e aumenta a densidade da monocamada. As alterações nas transições de fase devido à concentração do colesterol em vesícula multilamelar de DPPC podem ser notadas no diagrama de fase da Fig. 1.10 (SANKARAM; THOMPSON, 1991). O diagrama de fase para misturas de colesterol com DPPC mostra que sem colesterol a bicamada apresenta uma transição de fase importante em torno de 41°C e nas concentrações

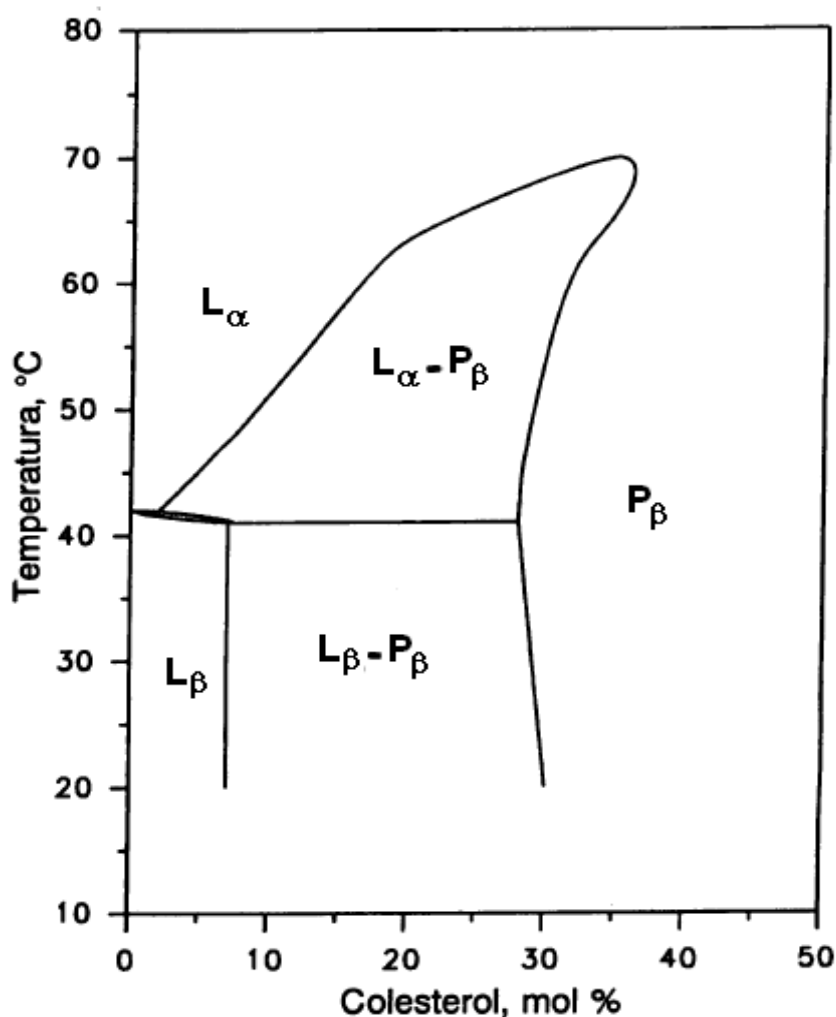


Figura 1.10: Diagrama de fase em função da temperatura do sistema DPPC e colesterol. Modificado de SANKARAM e THOMPSON, 1991 (SANKARAM; THOMPSON, 1991).

de colesterol de 10 a 25% molar a bicamada apresenta misturas de fase, enquanto acima de 30% de colesterol há apenas a fase líquida ordenada.

No sistema biológico, que opera dentro dos limites da temperatura fisiológica (20 a 40 °C) (NELSON; COX, 2006), as transições de fase lipídica são importantes por determinar a correta fluidez de uma membrana celular e as características de separação de fase dos lipídios. Tendo influência sobre a elasticidade, permeabilidade, inserção, agregação e os movimentos de difusão dos componentes lipídicos e proteicos da membrana (ALBERTS *et al.*, 1997).

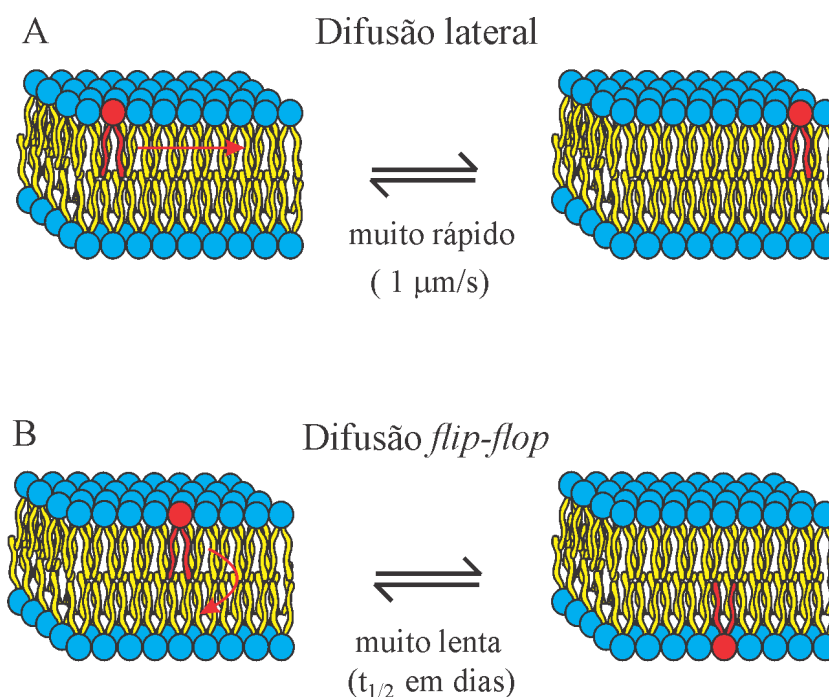


Figura 1.11: Representação esquemática dos mecanismos de movimentação lipídica. (A) Difusão lateral e (B) Difusão *flip-flop* ou movimentação trans bicamada (NELSON; COX, 2006).

Na bicamada, os lipídios podem se difundir lateralmente (Fig. 1.11A), onde a molécula se desloca rapidamente no plano da membrana, e também podem lentamente transpor de uma monocamada lipídica para outra. A difusão lateral permite que moléculas lipídicas vizinhas troquem rapidamente de lugar em uma monocamada com velocidade de até 10^{-4} cm/s. Este movimento distribui aleatoriamente, em poucos segundos, as posições das moléculas individuais dentro do plano da bicamada. Já na movimentação trans bicamada ou *flip-flop* (Fig. 1.11B), um grupo-cabeça polar ou carregado, deixa seu ambiente aquoso e se desloca para o interior hidrofóbico da bicamada com variação de energia livre. Em algumas situações este movimento é essencial, por permitir que fosfolipídios sintetizados na superfície interna da membrana sofram difusão *flip-flop* para a monocamada externa da bicamada. (NELSON; COX, 2006; ALBERTS *et al.*, 1997).

1.5 Terpenos

Dentro da classe dos facilitadores de permeação através da pele, os terpenos

têm recebido notável atenção, especialmente por apresentarem baixo potencial de irritação. Sendo componentes de óleos essenciais de plantas, apesar de não serem aromáticos, são constituídos basicamente de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. A sua estrutura química consiste de grupos isoprenos (C_5H_8) repetidos, que pode ser classificada de acordo com o número destes grupos (WILLIAMS; BARRY, 2004). Vários terpenos têm sido utilizados como medicamentos, agentes de fragrância e aromatizantes. Como exemplo, pode ser citado o α -terpineol, um monoterpene alcoólico de baixa toxicidade doador de hidrogênio, bastante utilizado pela indústria de perfumaria que é isolado do óleo de pinho (ROTTAVA *et al.*, 2010; VADDI *et al.*, 2002). O terpineol tem sido identificado como eficiente facilitador da permeação de moléculas hidrofílicas e seus mecanismos de ação estão relacionados com a ruptura das ligações de hidrogênio entre os grupos das cabeças polares (VADDI *et al.*, 2002).

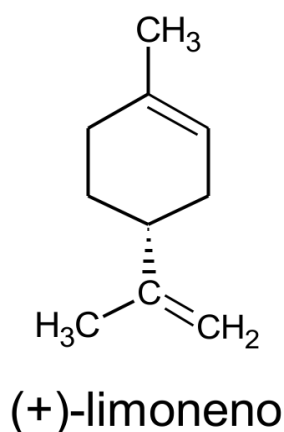


Figura 1.12: Estrutura química do terpeno utilizado neste trabalho.

Em trabalhos anteriores foram estudados os mecanismos pelos quais os terpenos aumentam a permeação da água e outras moléculas através da pele (ANJOS; NETO; ALONSO, 2007, 2007; ANJOS; ALONSO, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2010). Como estes compostos interagem com as componentes espectrais de marcadores inseridos em bicamadas e este trabalho focaliza sobre estas componentes, escolhemos o limoneno (Fig. 1.12), um monoterpene que não forma ligações de hidrogênio, para testar nosso modelo. Kaidi e Sing (2007) estudaram a combinação dos terpenos limoneno, eugenol, e mentone 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. Embora seja um potente aumentador de permeação de moléculas lipofílicas e compostos anfifílicos, o limoneno é pouco efetivo para compostos hidrofílicos, tal como o manitol (ZHAO; SINGH, 1998).

1.6 Objetivos

Nos espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos inseridos em bicamada simples são observadas muitas vezes para certas temperaturas a resolução de duas componentes espectrais, indicando duas populações de spin diferindo em mobilidade. O entendimento deste fenômeno pode ser de importância pela sua possível relação com a permeabilidade da bicamada. Focalizando neste estudo, mostramos primeiro que diversos marcadores de spin das classes metil doxil estearato (n-DMS), doxil ácido esteárico (n-DAS) e dipalmitoilfosfatidilcolina marcada com o grupo doxil (n-PC) podem apresentar duas componentes espectrais claramente resolvidas para algumas temperaturas em vesículas de DPPC. Almejando uma análise mais detalhada, concentramos nossas investigações sobre o comportamento do marcador 5-DMS em vesículas de fosfolipídios saturados com comprimentos de cadeias variando de 16 a 22 átomos de carbono. Os espectros de RPE foram obtidos para um grande intervalo de temperatura e simulados com os programas NLLS e EPRSIM. Além da análise da dinâmica molecular, o perfil termodinâmico da distribuição do marcador nas duas componentes foi determinado para cada um dos lipídios com diferentes tamanhos de cadeia a fim de obter uma base para o entendimento ou interpretação deste fenômeno. Adicionalmente, investigamos os efeitos do colesterol (incorporado na razão 40% molar) e do terpeno (+)-limoneno sobre a dinâmica de membrana e formação das componentes utilizando o mesmo tipo de análise.

Capítulo 2

Ressonância Paramagnética Eletrônica

2.1 Introdução

Em 1945 na Rússia, Zavoisky detectou uma linha de absorção de frequência de rádio de uma amostra de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sendo a primeira observação de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (ZAVOISKY, 1945). Em radicais livres, a primeira observação foi realizada em 1952 e, desde então, a RPE se mostrou uma poderosa técnica não invasiva que permite a investigação de moléculas ou íons com elétrons não-emparelhados. A RPE é aplicada no estudo da dinâmica molecular ou de determinação de fases em líquidos, cristais, membranas biológicas ou macromoléculas e também encontra aplicações em diversas áreas da física, química e biologia (FEHERE, 1970; SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972; BUDIL *et al.*, 1996).

A absorção ressonante de uma radiação em um campo magnético pode ser chamada de ressonância paramagnética, ressonância paramagnética eletrônica ou ressonância de spin eletrônica. O termo “ressonância” é apropriado, por ser bem definida a separação entre os níveis de energia que corresponde a um quantum de energia da radiação incidente monocromática. O termo *ressonância paramagnética eletrônica* foi introduzido por Harry E. Weaver da *Varian Associates* (fundada em 1948, foi uma das primeiras empresas de alta tecnologia no Vale do Silício nos EUA, inicialmente destinava a comercialização do klystron e

o desenvolvimento de outras tecnologias) como sendo o termo que representa as contribuições dos orbitais, como o momento angular de spin (BOLTON; WERTZ, 1986).

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 metaloenzimas, mas também os radicais livres formados em reações bioquímicas. Como nos sistemas biológicos em geral não apresentam centros paramagnéticos, foi desenvolvido o uso de sondas específicas, conhecidas como marcadores de spin, que serão comentados mais adiante. 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 (BERLINER, 2009).

2.2 O Espectrômetro de RPE

Muitos dos projetos de espectrômetros foram produzidos ao longo dos anos, mas a maioria dos instrumentos de laboratório se baseia no diagrama de blocos simplificados apresentado na Figura 2.1. Assim como em outras formas de espectroscopia, a RPE tem como base uma fonte de radiação, uma unidade de absorção onde é colocada a amostra e um detector. O espectro de absorção poderia ser obtido varrendo a frequência de radiação que incide sobre a amostra e medindo a quantidade de radiação que fica retida com a utilização de um detector. No entanto, por praticidade, a frequência é fixada e o campo magnético externo é variado.

Em resumo, neste sistema as microondas plano-polarizadas são produzidas no klystron, sendo transferidas através de uma guia de onda retangular e oca para o atenuador, que ajusta o nível de potência. Depois são encaminhadas para o circulador que funciona como um direcionador de “tráfego”, direcionando as microondas para a cavidade, onde é colocada a amostra. Antes que a microonda chegue à cavidade, ela encontra a íris, um dispositivo

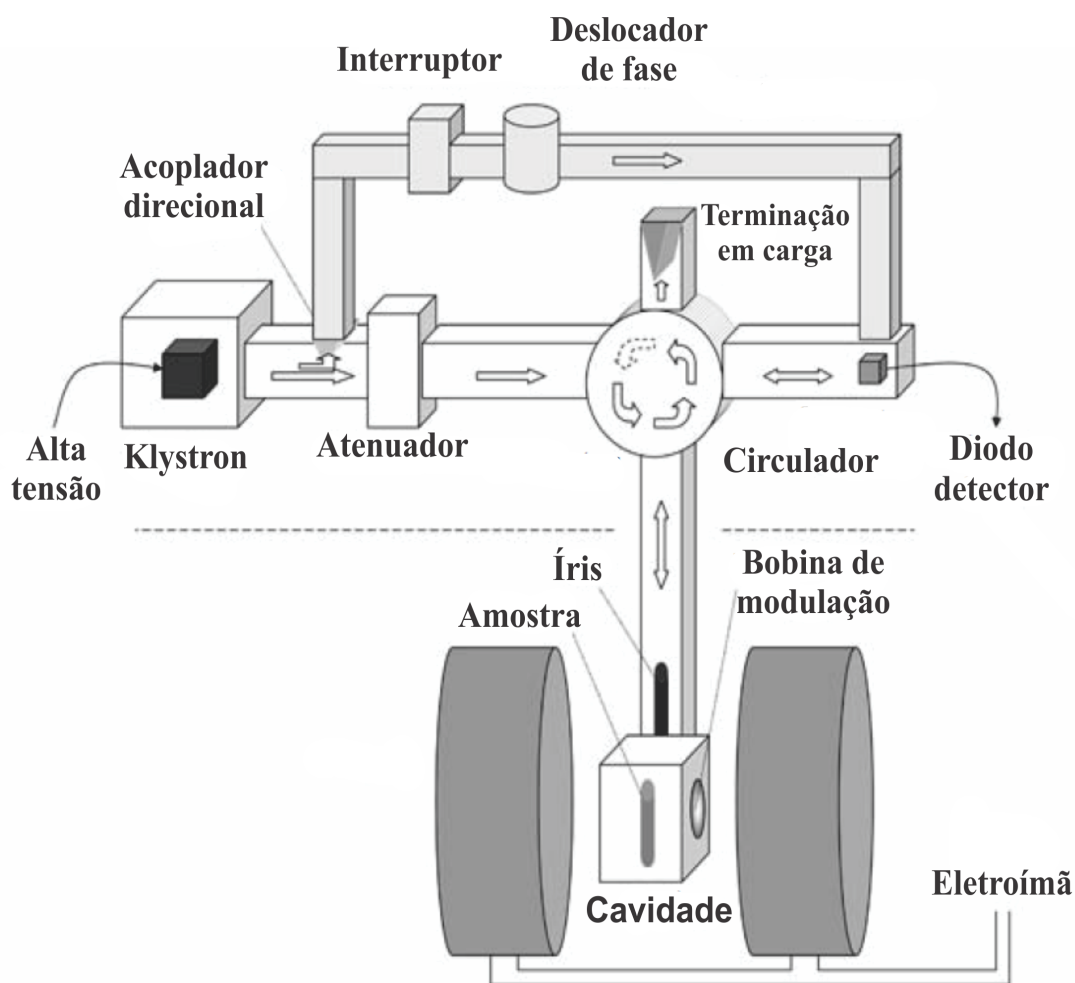


Figura 2.1: Diagrama de bloco simplificado de um espectrômetro de RPE de banda-X . Todos os componentes acima da linha pontilhada geralmente não ficam expostos, sendo construídos dentro de uma caixa retangular de onde sai uma guia de onda que liga a cavidade ressonante (HAGEN, 2009)

que ajusta a quantidade de radiação refletida para fora da cavidade. A radiação refletida da cavidade retorna ao circulador para ser encaminhado ao diodo de detecção e qualquer microonda refletida do diodo é totalmente absorvida (transformada em calor) na terminação em carga. Uma pequena quantidade da radiação produzida no Klystron é desviada antes do atenuador por uma guia de onda de referência que direciona a radiação diretamente para o diodo detector para produzir uma corrente de trabalho constante. Esta guia apresenta uma porta que pode ser fechada, juntamente com um dispositivo para inverter a fase da microonda. Como o diodo produz uma corrente proporcional à potência de microonda refletida

da cavidade, a microonda absorvida pela amostra é detectada observando um decréscimo da corrente no microamperímetro (HAGEN, 2009; RIEGER, 2007).

Outra parte importante deste conjunto é o eletroímã, conectado a uma fonte de alimentação regulada e um sistema de refrigeração a base de água. Como o tempo necessário para coletar um ponto de dado é mais rápido que o tempo para variação do campo magnético, ele pode ser considerado como estático. No espaço entre as bobinas do eletroímã, fica a cavidade que possui a opção de criogenia para esfriar a amostra. Estes dois componentes são bem visíveis no espectrômetro, os demais, acima da linha pontilhada da Figura 2.1, são montados dentro de uma caixa retangular que apresenta um orifício, onde se conecta a guia de onda que leva a radiação para a cavidade ressonante (HAGEN, 2009).

Para melhorar a absorção do sinal de RPE, a cavidade é projetada para que na região onde a amostra é inserida, a radiação de microonda tenha um valor máximo de campo magnético e uma intensidade mínima de campo elétrico. E o campo magnético da microonda precisa ser também perpendicular ao campo estático, para promover a transição dos spins. Outro fator relevante é a eficiência da cavidade, determinada pelo fator de qualidade ou fator Q. Este fator mede o grau com que uma cavidade amplifica a intensidade do campo de microonda, sendo que seu valor está intimamente relacionado à condutividade elétrica das paredes internas e inversamente proporcional às perdas. Assim, o fator de qualidade pode ser definido pela expressão:

$$Q = \frac{2\pi(\textit{máxima energia de microondas armazenada na cavidade})}{(\textit{energia perdida por ciclo})}. \quad (2.1)$$

Observando a definição, percebe-se que a energia armazenada aumenta com o volume da cavidade para uma determinada frequência fixa e a diminuição das perdas de energia da corrente flutuante nas paredes da cavidade ou na amostra gera um aumento no fator Q (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972; SILVA, 2007).

O fator Q da cavidade também pode ser afetado pela interação da amostra com os

componentes da microonda, que aumenta com a constante dielétrica da amostra, principalmente, quando a amostra se estende para uma região que apresenta campo elétrico diferente de zero. Como grande parte das amostras de interesse biológico é constituída de soluções aquosas ou suspensões, tendo como principal solvente a água que possui uma constante dielétrica considerável, isto pode ocasionar uma redução no fator Q . Uma forma de contornar este problema é reduzir a quantidade de água na amostra, através da utilização de tubos capilares, mas este método tem a desvantagem de reduzir o tamanho da amostra que, as vezes, pode gerar uma redução do sinal de ressonância (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972).

2.2.1 Detecção sensível à fase

Da forma como é realizada a detecção da radiação absorvida pela amostra, também é detectado ruídos em todas as frequências, tendo uma baixa relação sinal-ruído. A solução para este problema é a introdução de um campo magnético modulado de pequena amplitude. Este campo magnético oscilante, em geral com frequência de 100 kHz, é sobreposto ao campo contínuo através de duas pequenas bobinas de Helmholtz construídas nas paredes da cavidade (Fig 2.1). Esta técnica é conhecida como detecção sensível à fase.

A detecção sensível a fase permite a amplificação do sinal de RPE, utilizando a técnica de corrente alternada, assim eliminando a maioria dos ruídos provenientes dos componentes e reforçando a resolução do espectro, como pode ser visto na Figura 2.2. Nesta figura um campo de modulação de 100 kHz com uma pequena amplitude, modula o campo magnético estático B entre os limites B_a e B_b , que provoca no detector uma variação da corrente entre os extremos i_a e i_b . Se a variação $(i_a - i_b)$ for pequena, será proporcional a curva de absorção, exibindo um sinal que se aproxima da primeira derivada da curva deste sinal. Como o cristal de detecção também produz um ruído inversamente proporcional à frequência do sinal detectado, os equipamentos geralmente usam 100 kHz como frequência do campo de modulação (WEIL; BOLTON; WERTZ, 1994; POOLE, 1994). O amplificador

“*Lock-in*”, ou detector sensível à fase, produz um sinal DC proporcional à amplitude do sinal de RPE modulado. Ele compara o sinal modulado com o sinal de referência (o mesmo que produziu a modulação) e somente amplifica a onda que estiver na mesma frequência e fase do sinal de referência.

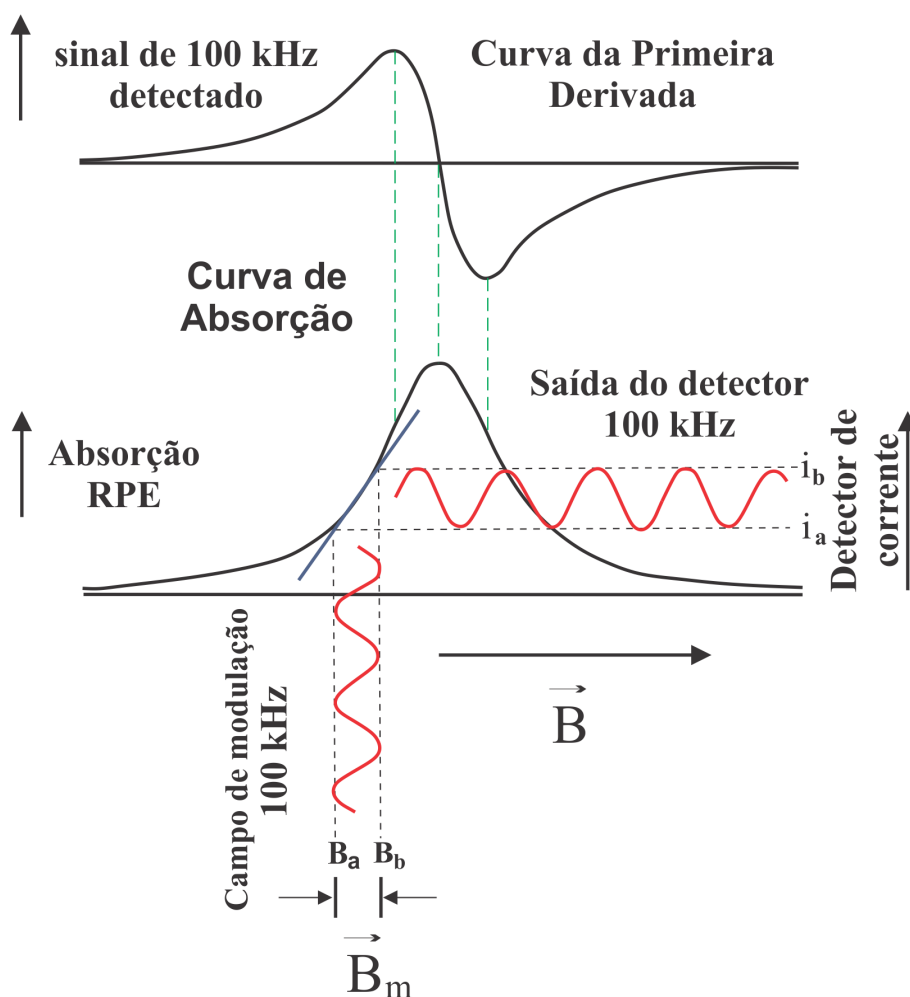


Figura 2.2: Efeito de um campo de modulação de pequena amplitude e frequência de 100 kHz na saída do detector de corrente. O campo magnético estático B é modulado entre os limites B_a e B_b , que gera uma variação na corrente do detector entre os limites i_a e i_b . O diagrama mostra o sinal de 100 kHz registrado e retificado em função de B (WEIL; BOLTON; WERTZ, 1994)

O valor de modulação deve ser de algumas vezes menor que as larguras das linhas de ressonâncias presentes do espectro medido. Se o valor for superior, ou até mesmo comparável, a largura de linha, o sinal ficará “sobre modulado”, ou deformado pela modulação, aumentando as larguras das linhas.

2.3 Fenômeno da Ressonância

Como em outras formas de espectroscopia, a RPE monitora a absorção da energia de um campo de radiação quando as moléculas mudam de um estado de energia para outro. Sendo a transição induzida por um campo eletromagnético de frequência ν , tendo um fóton de energia $h\nu$ correspondendo à separação do nível de energia ΔE , tal que:

$$\Delta E = h\nu. \quad (2.2)$$

com ν expresso em hertz (Hz) e h é a constante de Planck. Esta equação é conhecida como a condição de ressonância, sendo uma das duas condições necessárias para que a absorção da radiação ocorra.

A outra condição para que transição seja “permitida” é a interação de uma componente magnética (ou elétrica) do campo oscilante da radiação com um momento magnético (ou elétrico) oscilante da molécula. Portanto, se a molécula apresenta um momento magnético (que pode ser imaginado como um pequeno ímã), esperaria a interação com a componente magnética da radiação. Mas, para este momento magnético ocorrer é necessária a presença de um campo magnético estático, pois é ele quem orienta os dipolos e conseqüentemente cria os níveis de energia (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972).

O momento magnético eletrônico $\vec{\mu}$, diferente de zero, interage com o campo magnético externo \vec{B} . A energia potencial de orientação desta interação é obtida pelo operador Hamiltoniano da Mecânica Quântica, que é definido em termos do produto escalar do campo magnético estático com o operador momento magnético eletrônico (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972; NORDIO, 1976):

$$\hat{\mathcal{H}} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}. \quad (2.3)$$

Considerando a interação da componente z do momento magnético eletrônico,

com um campo magnético uniforme $\vec{B} = B_0\vec{z}$, temos

$$\hat{\mathcal{H}} = -\hat{\mu}_z B_0. \quad (2.4)$$

O elétron possui um spin intrínseco caracterizado por um momento angular de spin \vec{S} . \vec{S} e $\vec{\mu}$ são proporcionais, de modo que a relação entre suas componentes na direção z fica como

$$\hat{\mu}_z = \gamma_e \hat{S}_z, \quad (2.5)$$

onde $\gamma_e = -\frac{e}{2m_e}$ é a razão giromagnética, e é a carga e m_e é a massa do elétron. \hat{S}_z apresenta duas possíveis autofunções que são $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ sendo que

$$\hat{S}_z|\alpha\rangle = \frac{1}{2}\hbar|\alpha\rangle, \quad (2.6)$$

$$\hat{S}_z|\beta\rangle = -\frac{1}{2}\hbar|\beta\rangle, \quad (2.7)$$

com $\hat{S}_z = \hbar\hat{m}_s$, onde $m_s = \pm\frac{1}{2}$ são os valores esperados de \hat{S}_z , que surge após o operador atuar no autoestado. Assim, o Hamiltoniano em função do spin do elétron desemparelhado pode ser escrito como:

$$\hat{\mathcal{H}} = g_e\beta_e B_0\hat{m}_s, \quad (2.8)$$

o termo g_e o fator de correção do momento angular para o elétron livre, cujo valor, neste caso, é 2,00232. A origem deste fator está relacionado com os efeitos relativísticos e as interações do elétron com as flutuações eletromagnéticas no vácuo ao redor do elétron. Agora o termo $\beta_e = \frac{eh}{4\pi m_e} = 9,27408 \times 10^{-28}$ J/G, é o magnéton de Bohr sendo a unidade fundamental quântica de momento magnético (ATKINS; PAULA, 2008).

As energias dos estados podem ser obtidas da Equação de Schrödinger

$$\hat{\mathcal{H}}|\Psi\rangle = E|\Psi\rangle. \quad (2.9)$$

$$\hat{\mathcal{H}}|\alpha\rangle = \frac{1}{2}g_e\beta_e B_0|\alpha\rangle. \quad (2.10)$$

$$\hat{\mathcal{H}}|\beta\rangle = -\frac{1}{2}g_e\beta_e B_0|\beta\rangle. \quad (2.11)$$

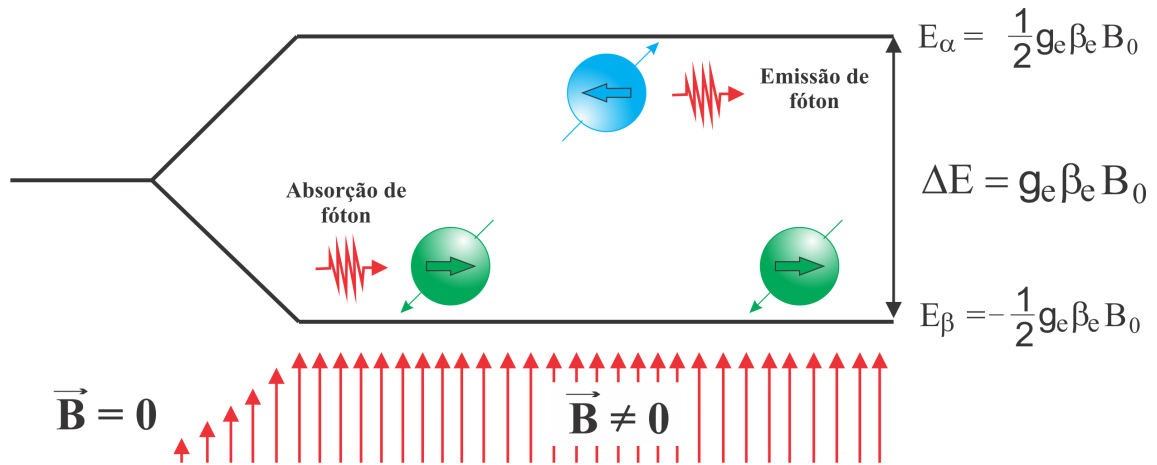


Figura 2.3: Separação entre os níveis de energia α e β , provocado pela ação de um campo magnético externo.

Portando as energias de um spin de um elétron num campo são:

$$E_{\beta} = \pm \frac{1}{2} g_e \beta_e B_0, \quad (2.12)$$

$$\Delta E = g_e \beta_e B_0, \quad (2.13)$$

a Eq. 2.13 representa a variação de energia entre os níveis α e β , conforme mostrado na Fig. 2.3.

Na ausência de um campo magnético os estados de energia de uma amostra paramagnética se encontram degenerados. Quando um campo é aplicado, a degenerescência é removida devido ao Efeito Zeeman. 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 temporais das componentes μ_x , μ_y e μ_z :

$$\frac{d}{dt} \langle \hat{\mu} \rangle = \frac{i}{\hbar} \langle [\hat{\mathcal{H}}, \hat{\mu}] \rangle. \quad (2.14)$$

Esta equação pode ser escrita em termos de suas componentes

$$\frac{d}{dt} \langle \hat{\mu}_x \rangle = -\gamma B_0 \langle \hat{\mu}_y \rangle, \quad (2.15)$$

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}_y\rangle = \gamma B_0\langle\hat{\mu}_x\rangle, \quad (2.16)$$

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}_z\rangle = 0. \quad (2.17)$$

Portanto a Eq. 2.14 pode ser reescrita como:

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}\rangle = -\gamma B_0(\langle\hat{\mu}_y\rangle\vec{i} - \langle\hat{\mu}_x\rangle\vec{j}). \quad (2.18)$$

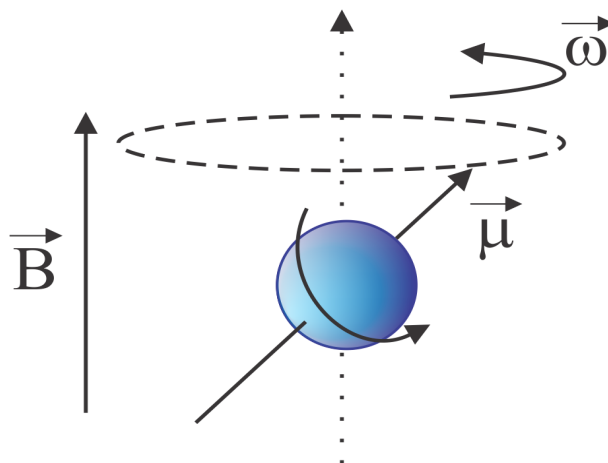


Figura 2.4: Movimento de precessão do momento magnético angular do spin $\hat{\mu}$, em torno da direção em que é aplicado o campo externo \vec{B} com velocidade de precessão de Larmor $\hat{\omega}_L$ (SILVA, 2007).

Sabendo que

$$\vec{B}_0 \times \langle\hat{\mu}\rangle = \begin{vmatrix} \vec{i} & \vec{j} & \vec{k} \\ 0 & 0 & B_0 \\ \langle\hat{\mu}_x\rangle & \langle\hat{\mu}_y\rangle & \langle\hat{\mu}_z\rangle \end{vmatrix} = -B_0(\langle\hat{\mu}_y\rangle\vec{i} - \langle\hat{\mu}_x\rangle\vec{j}), \quad (2.19)$$

e substituindo a Eq. 2.19 na Eq. 2.18, temos que:

$$\frac{d}{dt}\langle\hat{\mu}\rangle = \vec{\omega}_L \times \langle\hat{\mu}\rangle, \quad (2.20)$$

onde

$$\vec{\omega}_L = \gamma\vec{B}_0. \quad (2.21)$$

A velocidade angular de precessão de Larmor, $\vec{\omega}_L$, que é dada pela Eq. 2.21, é a velocidade com que o vetor momento angular precessiona em torno da direção do campo

magnético aplicado (Fig. 2.4). Agora se multiplicarmos os dois membros da Eq. 2.21 por \hbar , obtemos a condição de ressonância, que pode ser expressa como:

$$h\nu_L = g_e\beta_e B_0, \quad (2.22)$$

sendo ν_L a frequência 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. Assim, para que ocorra uma absorção líquida de energia é fundamental a existência de uma diferença de população entre os dois níveis, entre os quais a transição será induzida. 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:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(-\frac{(E_\alpha - E_\beta)}{kT}\right), \quad (2.23)$$

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 ($1,38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), T é a temperatura absoluta e $(E_\alpha - E_\beta) = \Delta E$ é definida pela Eq. 2.22, que substituída em 2.23, resulta em

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left[-\frac{g_e\beta_e B_0}{kT}\right]. \quad (2.24)$$

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 produziram emissão induzida. Expandindo o lado direito da Eq. 2.24 em série de Maclaurin e truncando a série depois do segundo termo, temos que

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} \cong 1 - \frac{g_e\beta_e B_0}{kT} = 1 - \frac{g_e\beta_e B_0}{kT}. \quad (2.25)$$

Esta equação mostra que no equilíbrio térmico, o estado quântico de menor 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 $\Delta E = h\nu_L$.

A transição ocorre 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 *processos de relaxação* que são responsáveis pela manutenção das populações de spins na condição de equilíbrio térmico (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972).

2.4 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 processo pode ser chamado de relaxamento sendo caracterizado por duas constantes, T_1 e T_2 . O tempo de relaxação spin-rede, ou longitudinal, descreve a rapidez com que a magnetização retorna seu alinhamento com o eixo z. O tempo de relaxação spin-spin, ou transversal, descreve o rápido desaparecimento da magnetização no plano x-y (ATKINS;

PAULA, 2008).

2.4.1 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 (no caso do spin eletrônico) o de menor energia $m_S = -\frac{1}{2}$, sendo esta energia dissipada na forma de calor, dizemos que ocorreu a relaxação spin-rede. Existem outros fatores que podem provocar uma transição entre os estados de spin, sendo que, na ausência do campo de microondas as populações dos estados de spins acabam chegando ao que é determinado pela distribuição de Boltzmann (Eq. 2.23). A probabilidade de deixar a rede induzir uma transição para cima ou para baixo pode ser representador como W_{\uparrow} e W_{\downarrow} , respectivamente. Portanto na ausência de um campo de radiação

$$\frac{dN_{\beta}}{dt} = N_{\alpha}W_{\downarrow} - N_{\beta}W_{\uparrow}, \quad (2.26)$$

ou

$$\frac{dN_{\alpha}}{dt} = N_{\beta}W_{\downarrow} - N_{\alpha}W_{\uparrow}. \quad (2.27)$$

Definimos $n = N_{\alpha} - N_{\beta}$, com isto a Eq. 2.26 e Eq. 2.27 pode ser rearranjada de forma que:

$$\frac{dn}{dt} = -(n - n_0)(W_{\uparrow} + W_{\downarrow}). \quad (2.28)$$

onde n_0 é o valor de n para a distribuição de Boltzmann na temperatura do ambiente. Este caso é quando $W_{\uparrow} \neq W_{\downarrow}$, de outra maneira n_0 seria igual à zero. W é uma transição de probabilidade por unidade de tempo, sendo assim, podemos definir um tempo de modo que

$$T_1 = (W_{\uparrow} + W_{\downarrow})^{-1}. \quad (2.29)$$

Assim,

$$\frac{dn}{dt} = -\frac{(n - n_0)}{T_1}. \quad (2.30)$$

A relaxação spin-rede é um decaimento exponencial de primeira ordem caracterizado por um tempo de relaxação T_1 , que é uma medida do tempo de vida médio dos elétrons no estado de maior energia (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972). Esta relaxação depende de quanto fortemente o sistema de spin está "acoplado" à 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 frequência vibracional e rotacional cresce, elevando assim a probabilidade de uma variação magnética de intensidade apropriada para uma transição de relaxação, fazendo T_1 ficar 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 apresenta um tempo de vida τ .

$$\Delta E \tau \cong \frac{h}{2\pi}, \quad (2.31)$$

ou

$$\Delta \nu \tau \cong \frac{1}{2\pi}, \quad (2.32)$$

portanto,

$$\Delta \nu \cong \frac{1}{2\pi\tau}, \quad (2.33)$$

onde $\Delta \nu$ e ΔE são as incertezas nos valores de frequência e energia desse estado. Agora partindo da Eq. 2.22, podemos escrever

$$h\Delta \nu = g\beta\Delta B. \quad (2.34)$$

Substituindo a Eq. 2.33 tem que

$$\Delta B \cong \frac{\hbar}{g\beta} \frac{1}{\tau}. \quad (2.35)$$

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 (PERUSSI; RUGGIERO; TABAK, 1985).

2.4.2 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 esta relacionada com as orientações relativas dos spins, cuja distribuição aleatória de suas direções muda exponencialmente no tempo, com uma constante de tempo T_2 conhecida como tempo de relaxação spin-spin ou transversal (ATKINS; PAULA, 2008). O T_2 se encontra associado com a largura de linha do sinal de RPE de modo que

$$\Delta\nu \cong \frac{1}{T_2}, \quad (2.36)$$

pois quanto menor é o tempo de relaxação spin-spin, maior será a largura de linha de ressonância. Este processo depende da intensidade e 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 frequência de precessão é alterada conforme a intensidade do campo local (COUTO, 2003).

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 (PERUSSI; RUGGIERO; TABAK, 1985).

2.5 Interação nuclear Hiperfina

A Interação Hiperfina é a interação magnética do spin do elétron com os momentos de dipolo magnético dos núcleos vizinhos resultando no desdobramento das linhas de ressonância nos espectros de RPE. O spin de um núcleo é caracterizado pelo número quântico I , podendo ter valores como $0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$, 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 (ATKINS; PAULA, 2008).

O campo B_0 observado na Eq. 2.22 representa o campo magnético a que um elétron desemparelhado é submetido. Havendo quaisquer campos magnéticos locais, estes irão se somar vetorialmente ao campo magnético externo \vec{B} para gerar o campo efetivo \vec{B}_{ef} . Isto é

$$\vec{B}_{ef} = \vec{B} + \vec{B}_{loc}. \quad (2.37)$$

Conforme a orientação do spin nuclear, a contribuição do spin de um núcleo para o campo magnético local, \vec{B}_{loc} , 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 (PAKE; ESTLE, 1973).

Para a Interação Hiperfina existem duas contribuições. Uma aparece quando um elétron num orbital p, d, f, \dots 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

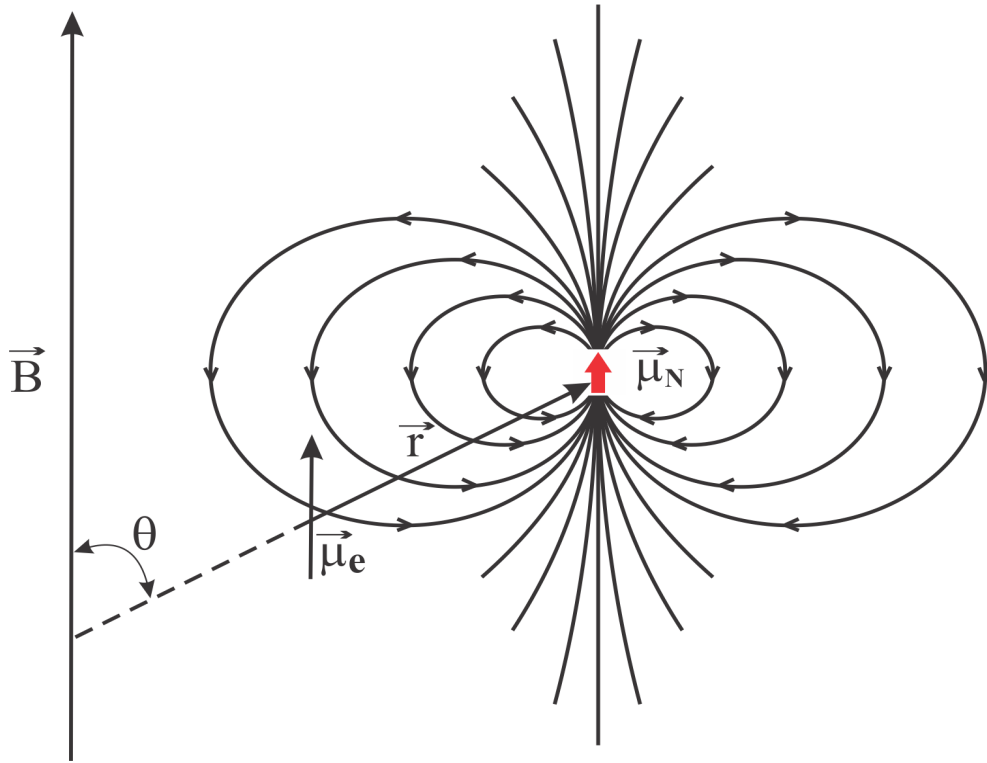


Figura 2.5: Interação dos momentos de dipolos do elétron ($\vec{\mu}_e$) e do núcleo ($\vec{\mu}_n$). O vetor $\vec{\mu}_e$ é indicado pelo estado $\hat{m}_S = -\frac{1}{2}$ e o vetor $\hat{\mu}_n$ é indicado pelo estado $\hat{I} = +\frac{1}{2}$. O ângulo θ é formado entre o vetor \vec{r} , que liga os dipolos, e o campo aplicado \vec{B} (BUDIL *et al.*, 1996).

local produzido pelo núcleo se parece com aquele de um dipolo magnético puntiforme Fig. 2.5, mas essa 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} (ATKINS; PAULA, 2008; SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972). Esta interação pode ser representada pelo operador

$$\hat{\mathcal{H}}_D = -g_e\beta_e g_N\beta_N \left[\frac{\hat{I} \cdot \hat{S}}{r^3} - \frac{3(\hat{I} \cdot \vec{r})(\hat{S} \cdot \vec{r})}{r^5} \right], \quad (2.38)$$

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 (SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972).

Expandindo o vetor em termos das coordenadas cartesianas, pode-se reescrever a

Eq. 2.38 na forma tensorial, da seguinte forma:

$$\hat{\mathcal{H}}_D = \hat{I} \cdot g_e \beta_e g_N \beta_N \begin{bmatrix} \left\langle \frac{3x^2 - r^2}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3xy}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3xz}{r^5} \right\rangle \\ \left\langle \frac{3xy}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3y^2 - r^2}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3yz}{r^5} \right\rangle \\ \left\langle \frac{3xz}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3yz}{r^5} \right\rangle & \left\langle \frac{3z^2 - r^2}{r^5} \right\rangle \end{bmatrix} \cdot \hat{S}, \quad (2.39)$$

$$\hat{\mathcal{H}}_D = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{T} \cdot \hat{S}. \quad (2.40)$$

Cada elemento da matriz representa uma média da função de onda do elétron desemparelhado, sendo \overleftrightarrow{T} o tensor de acoplamento hiperfino. Os elementos da diagonal T_{ii} do tensor podem ser representados pela matriz

$$T_{ii} = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3i^2 - r^2}{r^5} \right\rangle, \quad (2.41)$$

onde os “bracket”, denota o valor esperado em cima de toda a distribuição eletrônica (ATHERTON, 1973; SWARTZ; BOLTON; BORGCULLITY, 1972). Similarmente, os elementos do tensor fora da diagonal são:

$$T_{ij} = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3ij}{r^5} \right\rangle. \quad (2.42)$$

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* (WEIL; BOLTON; WERTZ, 1994; ATKINS; PAULA, 2008), 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

$$E_{iso} = -\frac{8\pi}{3} |\psi(0)|^2 \mu_e \mu_N, \quad (2.43)$$

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. 2.43, bastando substituir os momentos magnéticos pelos seus operadores correspondentes

$$\hat{\mu}_{N_z} = g_N \beta_N \hat{I}, \quad (2.44)$$

o que permite escrever

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \hat{I} \cdot \hat{S} \quad (2.45)$$

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = a \hat{I} \cdot \hat{S} \quad (2.46)$$

a é chamado de *constante de acoplamento hiperfino* (medida em Hertz, podendo ser convertida em unidade de campo) (BOLTON; WERTZ, 1986).

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:

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{T} \cdot \hat{S} + a \hat{I} \cdot \hat{S} = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{A} \cdot \hat{S}, \quad (2.47)$$

sendo $\overleftrightarrow{A} = (\overleftrightarrow{T} + a)$ definido como tensor hiperfino.

2.6 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 é que a maioria dos sistemas, inclusive os sistemas biológicos e bioquímicos, são diamagnéticos (não possuem elétrons desemparelhados). Este problema tem sido contornado utilizando um radical nitróxido ou uma molécula contendo 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 (MCCONNELL; OHNISHI, 1965), consistindo em 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 ambiente molecular onde estão (VIEIRA-LACAZ; MALNIC, 1981). Estes marcadores de spin podem ser qualquer espécie paramagnética, mas na prática, são comumente utilizados os derivados do nitróxido (Fig. 2.6). Isto por possuírem boa compatibilidade com os sistemas biológicos, além de serem estáveis em pH e temperatura fisiológica e apresentar um sinal de RPE muito adequado para gerar informações. O sinal de RPE gerado por estas sondas paramagnéticas, após uma análise espectral ou simulação computacional fornece informações sobre a dinâmica molecular, polaridade local, orientação molecular, anisotropia do movimento molecular, interações de espécies moleculares e outros parâmetros.

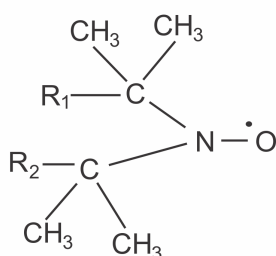


Figura 2.6: Fórmula química geral do radical nitróxido, onde R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador spin.

O nitróxido como elemento paramagnético propicia que o radical livre seja 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 apresentarem um brilhante colorido que varia do amarelo ao vermelho escuro dependendo do tamanho do anel e dos substituintes R_1 e R_2 (Fig. 2.6). Estes substituintes (R_1 e R_2), são radicais apropriados que permitem a ligação do marcador à molécula que se pretende estudar (PERUSSI; RUGGIERO; TABAK, 1985; ALONSO, 1986; ROSAN-

TEV; SHOLLER, 1971). A presença dos quatro grupos metilas adjacentes ao fragmento N-O, conferem estabilidade adicional aos marcadores formados e impedem que o elétron desemparelhado circule pelo anel piperidínico, permitindo com isto, estudos espectroscópicos semelhantes às fisiológicas. O nitróxido é compatível tanto com meios polares quanto apolares; em meios polares o átomo de oxigênio pode formar ligação de hidrogênio e em meios apolares os grupos metilas garantem a sua dissolução.

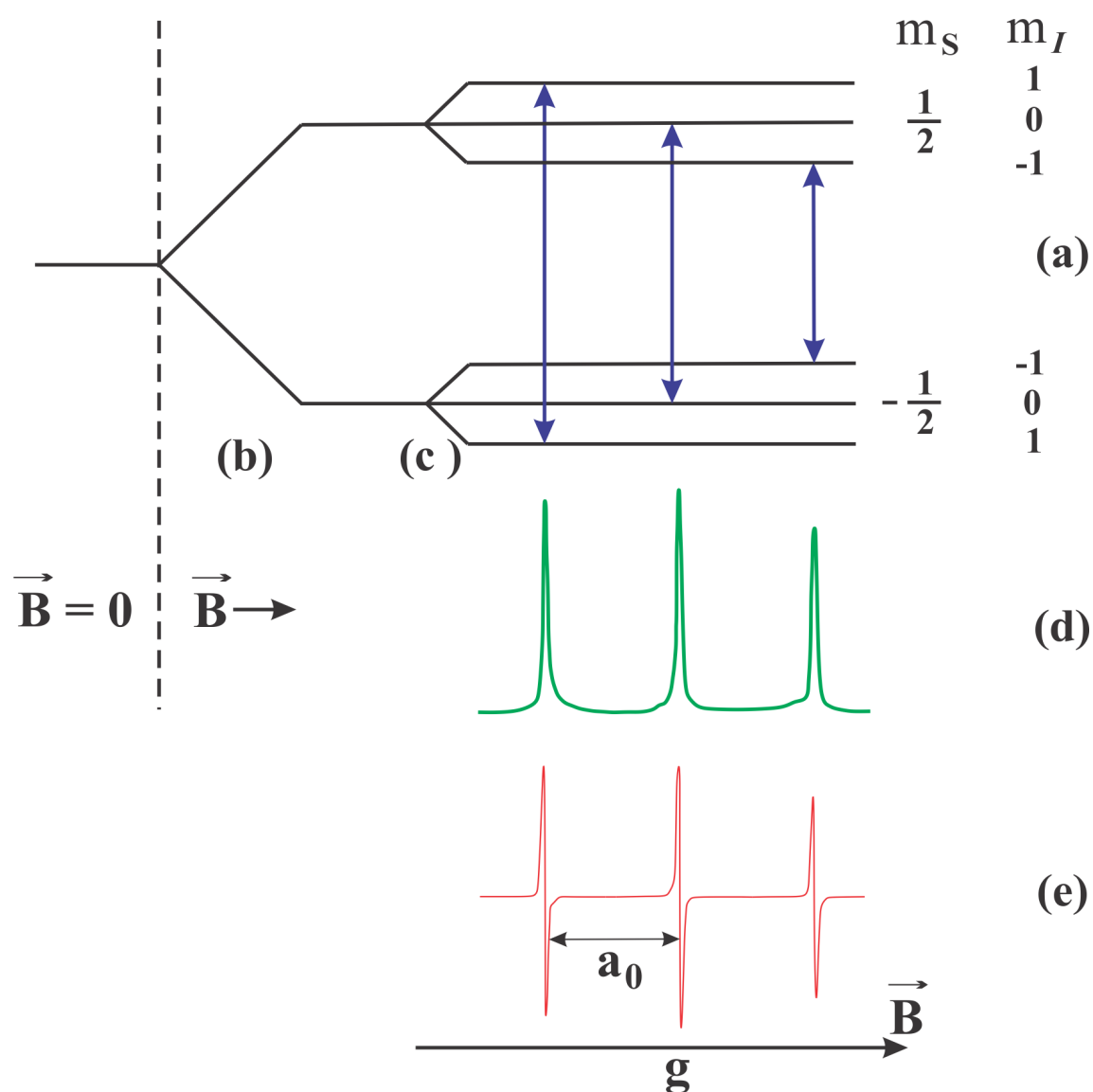


Figura 2.7: (a) Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) num campo magnético: (b) sem interação e (c) com interação com o spin do N (estrutura hiperfina). (d) espectro de absorção e (e) primeira derivada do espectro de absorção; a é a constante de desdobramento hiperfino, a posição da linha central é definida pelo fator g (COUTO; OLIVEIRA; ALONSO, 2005).

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 $m_I = -1, 0, +1$, os níveis de energia se desdobram em mais três, o que faz do espectro de RPE em solução apresentar três picos com intensidades muito próximas e separadas pela constante de acoplamento hiperfino isotrópico, a_0 , Fig. 2.7. Para o caso de $m_I = +1$, existe uma contribuição do campo local favorável ao campo externo; já quando $m_I = 0$ a contribuição do campo local é nula e, quando $m_I = -1$ a contribuição vai ser desfavorável a B_0 . Mas a ressonância que ocorre para os três valores distintos de campo, deve satisfazer as regras de seleção $\Delta m_S = \pm 1$ e $\Delta m_I = 0$ (ANJOS, 2008; NORDIO, 1976). 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. 2.7e).

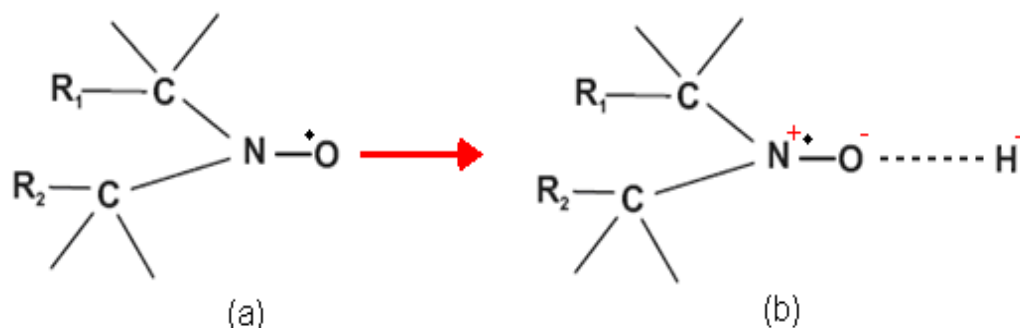


Figura 2.8: Figura esquemática mostrando o oxigênio do radical nitroxídeo realizando ligação de hidrogênio, onde o hidrogênio polariza a ligação N - O fazendo que o elétron se localize mais próximo do núcleo do átomo de nitrogênio aumentando assim a contribuição do acoplamento hiperfino isotrópico.

Mas o valor de a_0 pode sofrer influência do meio em que se encontra o radical nitroxídeo. Por exemplo, quando o marcador de spin está dissolvido em meio aquoso, o oxigênio da ligação N-O do nitroxídeo realiza ligação de hidrogênio com moléculas de água, conforme esquematizado na Fig. 2.8. O átomo de hidrogênio da molécula de água contribui

com uma carga local positiva que gera um campo elétrico sobre a molécula do nítróxido 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 nítróxido 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 tem a influência da constante dielétrica do solvente, sendo um parâmetro importante para se acompanhar mudanças de polaridade no meio.

2.7 Anisotropia Espectral

Grande parte das aplicações do método de marcadores de spin é realizada em sistemas biológicos em solução e a dinâmica molecular do meio é avaliada pelo cálculo do tempo de correlação rotacional (τ_c). Este cálculo é possível devido às anisotropias de fator-g e desdobramento hiperfino em relação ao campo magnético que o radical nítróxido apresenta.

Os efeitos de fator-g e desdobramento hiperfino anisotrópicos podem ser representados por tensores de segunda ordem \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} , cujos eixos principais estão orientados na molécula do nítróxido como mostrado na Fig. 2.9. A ligação N–O em geral se encontra sobre o eixo \mathbf{x} , o eixo \mathbf{z} direção do orbital $2p\pi$ do nitrogênio e o eixo \mathbf{y} se encontra perpendicular simultaneamente aos eixos \mathbf{x} e \mathbf{z} . Apesar dos eixos principais dos tensores \overleftrightarrow{g} e \overleftrightarrow{A} normalmente se coincidirem, isto não é obrigatório.

Os valores de \mathbf{g} e os efeitos do desdobramento anisotrópico podem ser mais facilmente entendidos considerando o espectro de um nítróxido introduzido em um cristal. A Fig. 2.10 apresenta espectros de um marcador de spin orientado em um cristal simples. Foram obtidos espectros hipotéticos do radical nítróxido com a direção do campo paralela aos seus eixos principais, como indicado na figura. Ao longo do eixo \mathbf{z} , onde se encontra grande parte da densidade eletrônica, verifica-se o maior valor para a constante de acoplamento hiperfino, $A_{zz} \cong 32$. Já os desdobramentos observados com a aplicação do campo nos eixos \mathbf{x} e \mathbf{y} são

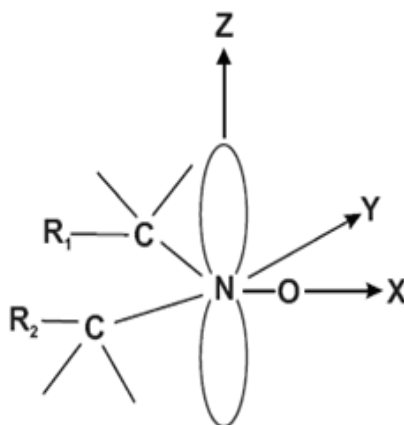


Figura 2.9: O radical nitróxido e as orientações dos eixos principais dos tensores de segunda ordem \mathbf{g} e \mathbf{A} . Os grupos R_1 e R_2 permitem a reação do radical sem envolver o elemento paramagnético $N - O$.

geralmente menores, sendo $A_{xx} \cong A_{yy} \cong 6$. 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), produzindo um deslocamento para a esquerda. Em muitos casos o sistema molecular é simétrico axialmente e os valores principais são designados como $A_{//} = A_{zz}$, $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$ (Fig. 2.11) e similarmente $g_{//} = g_{zz}$, $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$.

Quando o radical se encontra em uma solução (por exemplo, em solução aquosa), pode girar rapidamente, ocorrendo uma média temporal e a anisotropia do espectro tende a desaparecer com o aumento do movimento, sendo observadas as médias dos valores de fator \mathbf{g} e da constante de acoplamento hiperfino, da seguinte forma:

$$a_0 = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}), \quad (2.48)$$

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}). \quad (2.49)$$

Só para situações onde o movimento é muito rápido ($\tau_c < 10^{-9}$ s) é observado um espectro isotrópico com linhas bem finas e de igual intensidade. Entretanto, quando o marcador de spin tem o movimento lento ($\tau_c > 10^{-7}$ s), tornam-se importante as contribuições de diferentes orientações, fazendo com que a média temporal não seja mais efetiva.

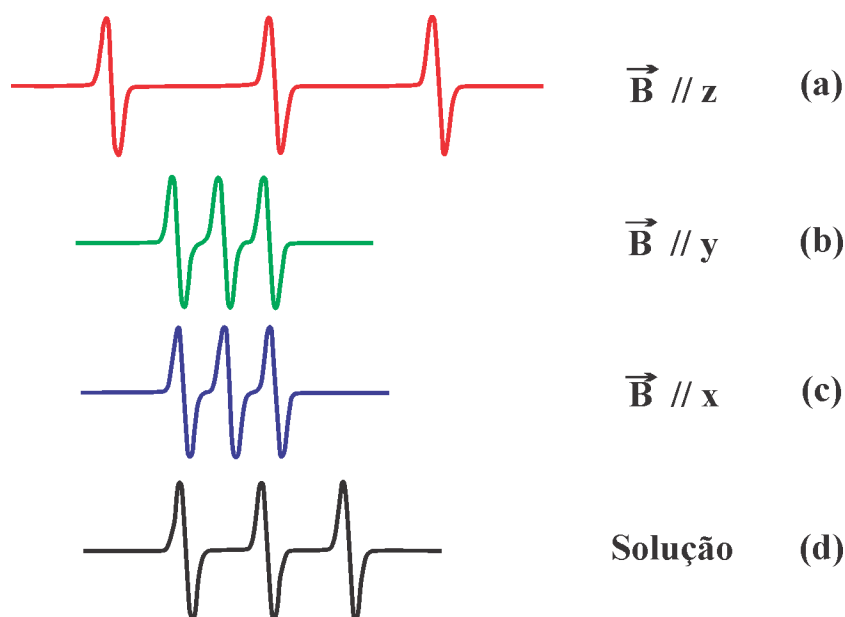


Figura 2.10: Espectro de RPE retratando a anisotropia do fator g e da constante de acoplamento hiperfino. (a) Campo magnético aplicado paralelo ao eixo z , (b) na direção do eixo y e (c) quando o campo está ao longo do eixo x . (d) Espectro do marcador em solução (NORDIO, 1976).

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. 2.11a). O espectro de pó corresponde à soma de todas as orientações possíveis (PERUSSI; RUGGIERO; TABAK, 1985).

Na prática, o espectro isotrópico e o "espectro de pó" são os dois casos extremos das situações do movimento do marcador de spin. Em ambos os casos se desenvolveram teorias para extrair o maior número de informações sobre o movimento do marcador. Nos casos em que o movimento é intermediário ($10^{-9} < \tau_c < 10^{-7}$ s), a simulação dos espectros tem se mostrado de grande importância e promissora.

2.8 Simulação

A espectroscopia de RPE possui amplas aplicações e geralmente os resultados podem ser obtidos através de análise simples dos espectros. No entanto, muitas vezes, os espectros são complexos, apresentando mais de uma componente espectral resolvida ou não

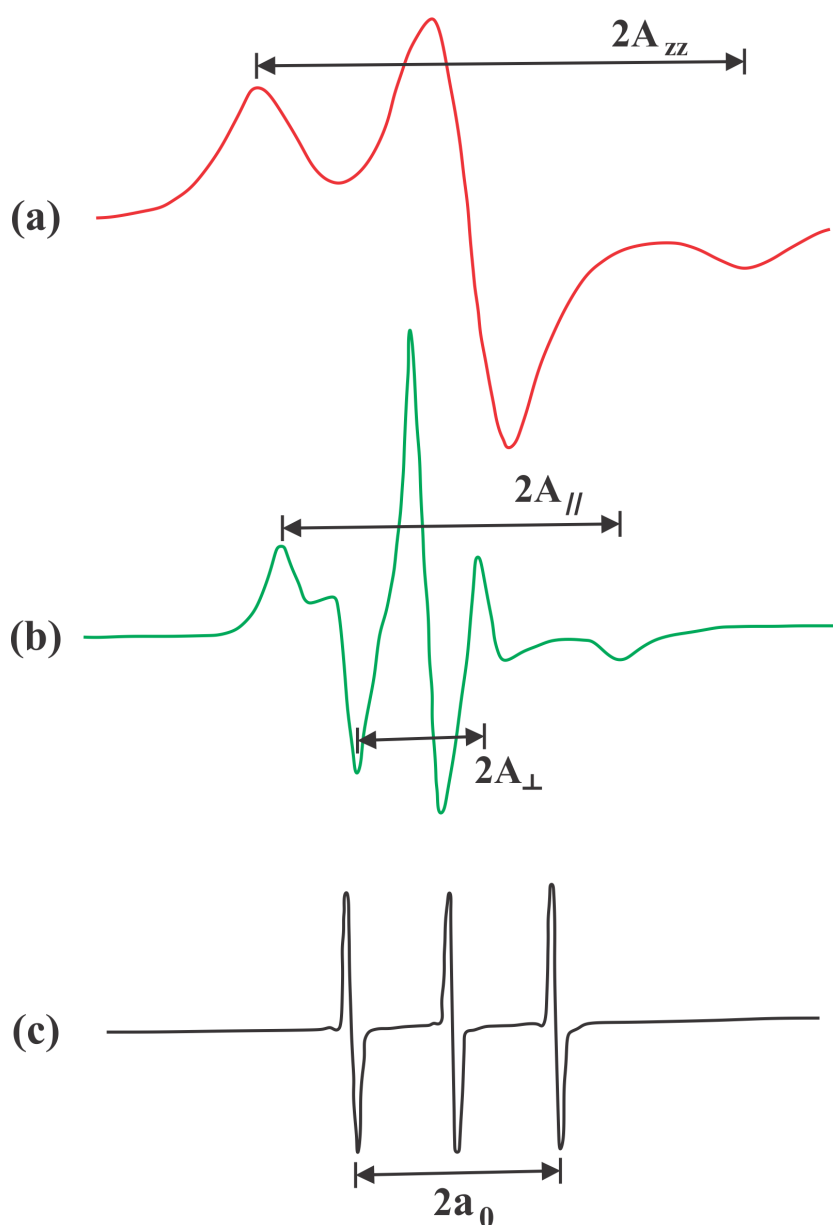


Figura 2.11: Espectro anisotrópico do marcador de spin em diferentes condições: (a) espectro de pó obtido a baixas temperaturas, (b) espectro do radical nitróxido em uma dispersão lipídica e (c) espectro isotrópico do marcador de spin em uma solução não viscosa (PERUSSI; RUGGIERO; TABAK, 1985).

resolvida. Nestes casos a simulação espectral se tornou um método importante para se extrair as informações codificadas nos espectros de RPE. A simulação dos espectros permite monitorar duas ou mais componentes espectrais ao mesmo tempo, informando o movimento dos marcadores de cada uma e também determinar a fração de cada componente no espectro. Em certos casos de movimento anisotrópico não é possível de se obter por análise simples,

determinações acuradas do movimento do marcador de spin.

A base da simulação espectral está na utilização de um modelo adequado para gerar um espectro teórico de melhor convergência com o experimental. Este modelo pode ser de uma ou de duas componentes, já que os programas não simulam bem os espectros de RPE com mais de duas componentes, a não ser que estejam muito bem resolvidas. Tendo em vista a complexidade das teorias envolvidas nos programas de simulação, será apresentado aqui somente alguns dos aspectos gerais de dois programas de simulação utilizados neste trabalho.

2.8.1 NLLS

A maioria dos espectros deste trabalho foi simulado utilizando o programa “*Non Linear Least Square*” (NLLS) desenvolvido por Jack H. Freed e colaboradores (Cornell University) (BUDIL *et al.*, 1996). Este programa tem como base a solução da equação estocástica de Liouville (“SLE, *Stochastic Liouville Equation*”), a partir dos valores de entrada de vários parâmetros, definidos pelo usuário, para gerar o espectro teórico. Assim, este método permite um estudo quantitativo dos espectros de RPE em função de taxas de movimento do radical nitróxido e das restrições ao movimento impostas pela estrutura do meio em que o marcador está inserido. As taxas de movimento e de restrição são associadas, respectivamente, a um tensor de difusão rotacional, utilizado para determinar o tempo de correlação rotacional, e a um parâmetro de ordem.

A SLE consiste de uma equação matricial construída em um conjunto de bases formado por produtos de funções envolvendo os harmônicos esféricos generalizados, que representam a difusão rotacional da sonda paramagnética, e de funções de spin, que representam propriedades da ressonância magnética (SALMON *et al.*, 2007). A SLE tem como origem a equação quântica de Liouville utilizada para determinar uma matriz densidade ρ , que pela teoria quântica, contém as informações para o cálculo de quantidades observáveis de um sistema quântico. Esta equação admite a existência de uma dependência temporal no

Hamiltoniano de spin, $\mathcal{H}(t)$, do radical nitróxido devido a sua interação com a vizinhança.

$$\frac{\partial}{\partial t}\rho = -i[\mathcal{H}(t), \rho]. \quad (2.50)$$

Para o radical nitróxido no regime de movimento lento, as flutuações na orientação da molécula podem ser descritas classicamente através do operador de Markoff, $\Gamma(\Omega)$, para a difusão rotacional independente do tempo, onde Ω representa os ângulos de Euler do radical (α, β, γ). Desta forma, assume-se que existe um conjunto completo de variáveis aleatórias suficientes para descrever o comportamento aleatório de $\mathcal{H}(t)$, descrito pelo processo de Markoff (FREED; BRUNO; POLNASZEK, 1971). Este processo estocástico possui a propriedade de que as probabilidades associadas com o processo num dado instante futuro dependam somente do estado presente, sendo independentes dos eventos no passado. Assim a probabilidade, $P(\Omega, t)$, do marcador estar em um estado Ω em um determinado tempo t , pode ser determinada pela expressão,

$$\frac{\partial}{\partial t}P(\Omega, t) = -\Gamma(\Omega)P(\Omega, t), \quad (2.51)$$

o termo $\Gamma(\Omega)$ é conhecido como operador markofiano de evolução.

Através da utilização destas hipóteses Kubo, 1969 (KUBO, 1969) e Freed, *et. al*, 1971 (FREED; BRUNO; POLNASZEK, 1971) mostraram que a equação do operador matriz densidade $\rho(\Omega, t)$ leva à equação estocástica de Liouville:

$$\frac{\partial}{\partial t}\rho(\Omega, t) = -i[\mathcal{H}(t), \rho(\Omega, t)] - \Gamma(\Omega)\rho(\Omega, t), \quad (2.52)$$

onde o Hamiltoniano de spin passa a depender de Ω , devido a movimentos rotacionais. Como as variáveis desta equação estão correlacionadas, ela não pode ser resolvida analiticamente, assim o programa NLLS se utiliza de cálculos numéricos para encontrar a solução da SLE, com base nos valores dos parâmetros de entrada definidos pelo operador.

Os parâmetros de entrada utilizados no regime de movimento lento são divididos

em quatro grupos: (i) parâmetros magnéticos e estruturais que descrevem os tensores magnéticos do fator \mathbf{g} e do desdobramento hiperfino \mathbf{A} (veja seção 2.7); (ii) parâmetros dinâmicos que incluem as taxas de difusão rotacional para vários modelos dinâmicos; (iii) coeficientes do potencial de ordenamento que descrevem a influencia da orientação dos fluidos anisotrópicos tais como cristais líquidos e membranas; e (iv) os parâmetros inteiros que definem o truncamento dos cálculos (BUDIL *et al.*, 1996). A tabela 2.1 mostra símbolos e descrições dos parâmetros utilizados na simulação dos nossos espectros.

Tabela 2.1: Lista dos parâmetros de entrada usados no programa do NLLS para a realização da simulação dos espectros experimentais (BUDIL *et al.*, 1996).

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

Para descrever a dinâmica rotacional e ordenamento do marcador de spin, o programa faz uso de um sistema de coordenadas fixo na molécula e outro fixo no laboratório. No sistema da molécula é representado o tensor \mathbf{g} nas coordenadas (x_m, y_m, z_m) , o tensor \mathbf{A} com as coordenadas da interação hiperfina (x_a, y_a, z_a) e o tensor de difusão rotacional \mathbf{R} com as coordenadas de difusão rotacional (x_r, y_r, z_r) . O sistema de laboratório é fixo no espectrômetro com coordenadas (x_L, y_L, z_L) , no qual o campo magnético estático externo é definido usualmente na direção z_L (BUDIL *et al.*, 1996; SALMON *et al.*, 2007) e há ainda um sistema diretor local (x_d, y_d, z_d) , que pode ser escolhido de forma arbitrária.

O programa NLLS apresenta quatro modelos de difusão que são: difusão rota-

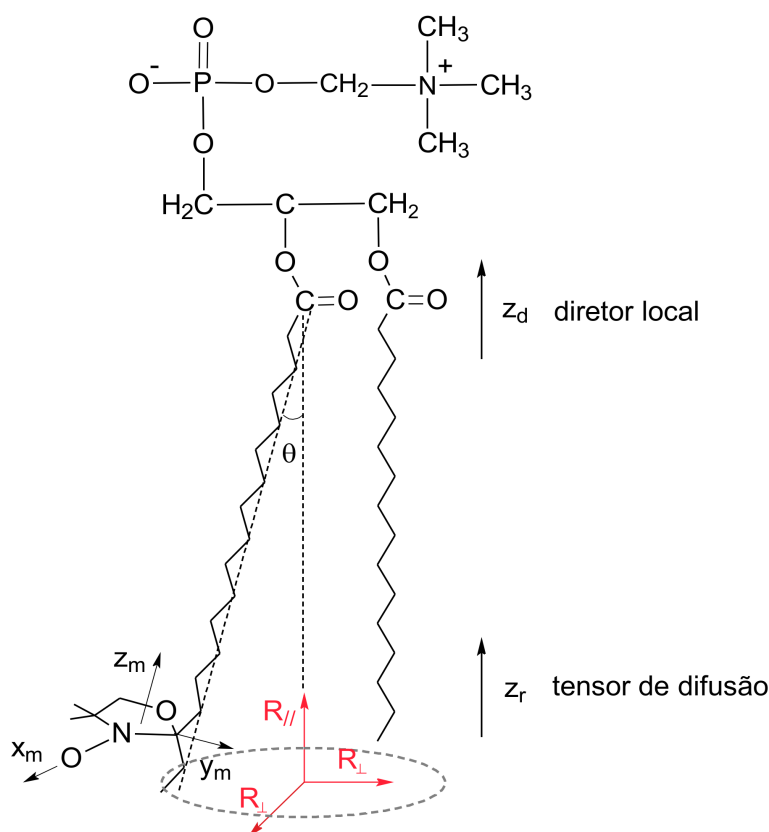


Figura 2.12: Representação esquemática do marcador de spin 16-PC com alguns eixos dos sistemas de coordenadas. O eixo z_d é o diretor local da membrana, z_r é o eixo de simetria da cadeia acila sendo paralelo ao diretor local, $R_{//}$ e R_{\perp} são os valores principais do tensor de difusão, θ é o ângulo de inclinação da cadeia acila relativo ao eixo z_r está relacionado com o parâmetro de ordem e x_m , y_m e z_m são os eixos magnéticos do radical nitróxido (SALMON *et al.*, 2007).

cional browniana, difusão rotacional não-browniana, difusão por saltos discretos e difusão anisotrópica. Estes modelos estabelecem que o marcador de spin se reorienta em relação aos eixos moleculares de rotação (x_r, y_r, z_r). O primeiro modelo é mais utilizado para marcador de spin de tamanho intermediário e para macromoléculas marcadas (BUDIL *et al.*, 1996), sendo o modelo aplicado em nossas simulações. Geralmente a difusão rotacional molecular do marcador inserido em membranas lipídicas é descrita pela média das taxas de difusão rotacional dada por $R_{bar} = \bar{R} \equiv (\overline{R_x R_y R_x})^{1/3}$ que representa a média geométrica das constantes de difusão rotacional sobre cada um dos eixos de difusão molecular. Da mesma forma, a anisotropia de rotação axial $N \equiv R_z / (R_x R_y)^{1/2}$ é a razão entre as taxas das constantes de difusão rotacional em relação aos eixos perpendiculares e paralelo ao eixo z_d . No caso da

simetria axial ($R_x = R_y$), a definição de R_{bar} pode ser escrita como $R_{bar} = \log \bar{R}$, onde a taxa de difusão rotacional (\bar{R}) é dada por $\bar{R} \equiv \sqrt[3]{R_{\perp}^2 R_{//}}$, sendo possível utilizar no programa esta forma de maior simplicidade, facilitando os cálculos, e ainda adicionar o termo que fornece a anisotropia de rotação axial. Quando o marcador de spin está inserido em uma membrana, o eixo z_r é definido paralelamente ao eixo de simetria do segmento da molécula onde o radical nitróxido encontra-se ligado. Por exemplo, em marcadores do tipo n-PC (n especifica a posição do radical nitróxido ao longo da cadeia lipídica), o eixo z_r é paralelo ao diretor local, ou seja, à própria cadeia lipídica. Assim, $R_{//}$ representa a taxa de difusão rotacional em torno do eixo z_r e R_{\perp} a taxa em torno de um eixo perpendicular a z_r , ou seja, o movimento de oscilação do radical nitróxido perpendicular ao eixo diretor (Figura 2.12).

O tensor de difusão rotacional caracteriza o tempo de correlação rotacional do marcador de spin. Este tempo possui uma relação com a largura de linha dos espectros de RPE, ou seja, quanto maior a largura de linha, maior o tempo de correlação, isto é, menor a mobilidade da sonda. Além desses parâmetros que afetam a forma de linha do espectro, existe também uma matriz de largura de linha lorentziana adicional anisotrópica \mathbf{W} (em Gauss). Esta matriz pode alargar seletivamente a linha do espectro de RPE correspondente a cada componente (wxx, wyy, wzz). No caso do nitróxido, por exemplo, wzz monitora o alargamento das linhas extremas (a de campo mais baixo e de campo mais alto) que corresponde a g_{zz} e A_{zz} (SALMON *et al.*, 2007).

Os marcadores lipídicos inseridos em uma bicamada lipídica sentem um potencial restaurador que restringe a amplitude de seu movimento rotacional. A tendência da sonda em se ordenar neste meio pode ser modelada por um potencial de orientação $U(\Omega)$, sendo $\Omega = (\beta, \gamma)$ o ângulo sólido formado entre o eixo diretor e o de difusão. Em sua forma mais geral, a função potencial $U(\Omega)$ pode ser expandida em uma série de harmônicos esféricos (JACKSON, 1975)

$$U(\Omega) = -k_B T \sum_{k,l} c_{k,l} Y_k^l(\Omega), \quad (2.53)$$

onde k_B é a constante de Boltzman, T corresponde à temperatura do sistema, $c_{k,l}$ representam

os coeficientes do potencial e Y_k^l os harmônicos esféricos normalizados. Por questões de simetria e utilização, geralmente são considerados somente os termos $c_{2,0}$ e $c_{2,2}$ na expansão de $U(\Omega)$, resultando em uma equação mais simples (SALMON *et al.*, 2007):

$$U(\beta, \gamma) = -k_B T \left[c_{2,0} \frac{3\cos^2(\beta) - 1}{2} + c_{2,2} \frac{\sqrt{3} \sin^2(\beta) \cos(2\gamma)}{2} \right]. \quad (2.54)$$

O coeficiente $c_{2,0}$ está relacionado com a dispersão angular em relação ao eixo diretor z_d , isto é, quanto maior o módulo de $c_{2,0}$ menor é o ângulo de oscilação em torno de z_d . Já o coeficiente $c_{2,2}$ representa a ordem na direção perpendicular a z_d , assim quanto maior for o seu módulo menor será a dispersão angular, ou seja, maior a probabilidade de se observar o eixo molecular orientado a $\beta = 90^\circ$ em relação a z_d . Com isto o $c_{2,2}$ representa uma medida da anisotropia no plano diretor perpendicular (xy) (SALMON *et al.*, 2007).

Depois que o programa NLLS encontra a solução SLE, ele ajusta o espectro teórico ao experimental através de um algoritmo de minimização envolvendo o método de mínimos quadrados não lineares. No algoritmo de otimização, o método utilizado é o quase-Newton que apresenta a vantagem de incluir convergência global, e um maior controle de flexibilidade sobre os critérios de convergência, assim, quando aplicados, permite que iterações excessivas sejam evitadas (BUDIL *et al.*, 1996).

A grande parte dos espectros simulados neste trabalho é composta por duas componentes espectrais, o que exigiu como dados de entrada dois conjuntos de tensores magnéticos e estruturais bem como de parâmetros dinâmicos e de coeficientes do potencial de ordenamento. Antes de iniciar a simulação é conveniente fazer inicialmente uma estimativa adequada dos parâmetros de entrada tomando com base nas posições das linhas do espectro experimental, e atribuir valores de entrada variando um tensor por vez, pois eles podem estar fortemente correlacionados. Com a determinação de todos os parâmetros de entrada, os seus valores são fixados e todos os espectros são simulados utilizando estes tensores pré-determinados. Mais detalhes dos parâmetros de entrada no programa NLLS serão descritos no Capítulo 3.

2.8.2 EPRSIM

Em regime de movimento mais rápido como no caso de uma membrana na fase líquido-cristalina, os espectros podem ser simulados utilizando o programa EPRSIM (versão 4.99) que permite ajustes tão bons quanto ao NLLS, para movimento mais rápido. Este programa foi desenvolvido por Janez Strancar e colaboradores (Jozef Stefan Institute, Eslovênia) e os parâmetros obtidos nesta ressimulação foram utilizados para confirmar os resultados da simulação com o NLLS.

O EPRSIM possui uma fácil manipulação e também permite a decomposição de um espectro em várias componentes espectrais, mas o programa somente simula espectro com 1024 pontos e 100 G de varredura (STRAMCAR; SENTJURC; SCHARA, 2000). Como no NLLS, o programa utiliza os valores dos tensores magnéticos \mathbf{A} e \mathbf{g} como parâmetros de entrada, que são inseridos em uma janela específica, onde também é permitido definir a magnitude e abundância da interação do spin nuclear C-13 (valores informados no Capítulo 3). Como a sonda está na membrana em uma fase com maior mobilidade, o movimento do radical nitróxido foi considerado isotrópico. Neste caso, o próprio programa inicialmente calcula a média dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} , cujos traços são linearmente corrigidos através dos parâmetros p_g e p_A , respectivamente, que são fatores gerados na obtenção do melhor ajuste. Após o cálculo das formas de linhas básicas, em outra janela, são fornecidos 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 (STRAMCAR; SENTJURC; SCHARA, 2000; KAVALENKA *et al.*, 2005). No limite do movimento rápido, onde a aproximação na redução do reequilíbrio é válida, o τ_c pode ser determinado da expressão (TABAK; ALONSO; NASCIMENTO, 1983):

$$\tau_c = \frac{\sqrt{3}g_{iso}\beta\Delta H(0)}{2h(C - B)} \left[1 - \sqrt{\frac{I(0)}{I(-1)}} \right], \quad (2.55)$$

onde $g_{iso} = 1/3(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$ é o fator g isotrópico β é o magnéton de Bohr, h é a constante de Planck, H é o campo magnético externo, $\Delta H(0)$ é a linha central de pico-a-pico da largura

de linha, e $I(0)$ e $I(-1)$ são, respectivamente, as intensidades das linhas de ressonância de campo central e alto. Os parâmetros B e C são derivados dos tensores magnéticos \mathbf{A} e \mathbf{g} anisotrópicos através das seguintes equações:

$$B = \frac{-16\beta H}{45h}(A_{zz} - A_{xx}) \left[\frac{1}{2}(g_{xx} - g_{yy}) \right], \quad (2.56)$$

e

$$C = \frac{2\pi^2}{9}(A_{zz} - A_{xx})^2. \quad (2.57)$$

O monitoramento da convergência entre os espectros experimental e teórico é feito pelo parâmetro χ_0^2 reduzido, que basicamente pode ser determinado pela expressão:

$$\chi_0^2 = \frac{1}{N} \sum_i^N \frac{(y_i^{exp} - y_i^{sim})^2}{\sigma^2}, \quad (2.58)$$

os termos y_i^{exp} e y_i^{sim} são as respectivas intensidades dos espectros experimental e simulado em um dado ponto, σ é o desvio-padrão do ponto experimental e N o número de pontos existentes (1024 pontos). Verificou-se que χ_0^2 representa um bom critério para aperfeiçoar espectros com linhas mais pontiagudos, típicos de marcador de spin em solução, mas é menos sensível para formas de linhas mais largas (STRAMCAR; SENTJURC; SCHARA, 2000; STRANCAR *et al.*, 2005).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os fosfolípidios 1,2-X-sn-glicero-3-fosfocolina, onde a letra X representa dipalmitoil (DPPC), e distearoil (PC-18), diaraquidoil (PC-20), dibeenoil (PC-22) e os marcadores de spin 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-sn-glicero-3-fosfocolina (5-PC), 10- e 16-PC foram comprados da Avanti (Avanti Polar Lipídeos, Inc., Alabaster, AL). O colesterol e os marcadores de spin metil 5-, 12- e 16-doxil-estearato (5-, 12- e 16-DMS) e 5-, 12- e 16-doxil ácido esteárico (5-, 12- e 16- DSA), foram adquiridos da Sigma (Chem. Co., St. Louis, MO). As fórmulas moleculares destas moléculas anfifílicas podem ser visualizadas nas Tabelas 3.1 e Tab. 3.2. O terpeno (+)-limoneno foi adquirido da Acros Organics (Geel, Bélgica).

3.2 Condição de Operação do Espectrômetro

Todas as medidas deste trabalho foram feitas com o espectrômetro de RPE da marca BRUKER, modelo ESP 300, com cavidade ressonante ER 4102 ST, operando em banda X ($\sim 9,4$ GHz). As condições de operação foram: potência de microondas de 2 mW, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 1,0 G, campo central igual a 3365 G, varredura de campo magnético de 100 G; tempo de varredura de 168 segundos e constante de tempo de detecção, 41 ms. A temperatura foi controlada com uma precisão de $\pm 0,3^\circ\text{C}$ pelo sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten, Germany).

Tabela 3.1: As fórmulas estruturais e moleculares, as massa molares, os nomes completos e as abreviaturas de cada marcador de spin utilizado neste trabalho.

Nome	Fórmula estrutural	Abreviação	Massa molar (g)	Fórmula Molecular
Metil 5-doxil-estearato		5-DMS	400	$C_{23}H_{45}NO_4$
Metil 7-doxil-estearato		7-DMS	400	$C_{23}H_{45}NO_4$
Metil 12-doxil-estearato		12-DMS	400	$C_{23}H_{45}NO_4$
Metil 16-doxil-estearato		16-DMS	400	$C_{23}H_{45}NO_4$
5-doxil ácido esteárico		5-DSA	385	$C_{22}H_{42}NO_4$
12-doxil ácido esteárico		12-DSA	385	$C_{22}H_{42}NO_4$
16-doxil ácido esteárico		16-DSA	385	$C_{22}H_{42}NO_4$
1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-sn-glicero-3-fosfocolina		5-PC	862	$C_{46}H_{90}N_2O_{10}P$
1-palmitoil-2-estearoil-(10-doxil)-sn-glicero-3-fosfocolina		10-PC	862	$C_{46}H_{90}N_2O_{10}P$
1-palmitoil-2-estearoil-(16-doxil)-sn-glicero-3-fosfocolina		16-PC	862	$C_{46}H_{90}N_2O_{10}P$

3.3 Preparação das Vesículas de Fosfolipídios

Na preparação das vesículas, em cada amostra foram utilizados 5,0 mg de fosfolípido e um marcador de spin na razão molar lipídio:marcador (150:1) dissolvidos em clorofórmio na proporção de 5 mg/mL. A fase orgânica foi gotejada em água Milli-Q aquecida

entre 75-85°C e constantemente agitada em agitador magnético. Após a completa evaporação da fase orgânica, a temperatura e agitação foram mantidas por 30 minutos para garantir a total eliminação do clorofórmio. Depois a amostra foi centrifugada duas vezes, retirado o sobrenadante e substituído pelo tampão PBS (5 mM de fosfato, 150 mM de NaCl e 0,2 mM de EDTA, pH 7.4). O volume da amostra foi ajustado para 0,7 mL e foi realizada a extrusão através de um filtro de membrana de polycarbonato com poro de 0,8 μm usando o mini-extrusor da Avanti (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) com o bloco aquecido a uma temperatura acima da transição da fase gel para a líquido-cristalina de cada fosfatidilcolina. O processo de extrusão, composto por cerca de 20 passagens de extrusões, foi repetido usando filtros de polycarbonato com poros de 0,4 e 0,2 μm , para obter vesículas unilamelares de aproximadamente 0,2 μm de diâmetro. Depois o volume de água na amostra foi reduzido para se obter uma concentração de cerca de 50 mM do lipídio, usando um fluxo de gás de nitrogênio. Finalmente, a suspensão de vesículas foi transferida para um tubo capilar, selado por chama e deixado na geladeira por ~ 24 h (para se obter completa hidratação dos lipídios das vesículas). Depois os capilares foram introduzidos em um tubo de quartzo (3 mm de diâmetro interno) contendo óleo mineral (para evitar gradientes de temperaturas), juntamente com um fio de termopar, bem fino, para monitorar a temperatura da amostra. A qualidade e a reprodutibilidade de cada preparação foram monitoradas pelos espectros de RPE do marcador de spin, os quais são muito sensíveis à presença de agregados de marcador.

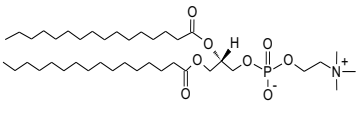
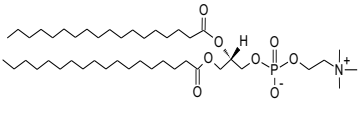
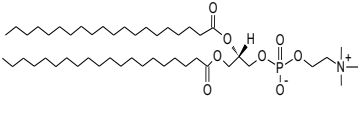
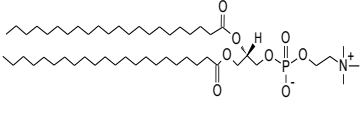
3.4 Preparação das Vesículas com Colesterol e (+)-Limoneno

O colesterol em conjunto com uma quantidade adequada de DPPC e do marcador de spin 5-DMS na razão molar lipídio:marcador (150:1) foram dissolvidos em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1) e a fase orgânica foi evaporada usando um fluxo de nitrogênio. O solvente residual foi removido por secagem a vácuo do tubo, durante a noite. Na etapa de hidratação para formar vesículas multilamelares, as amostras foram incubadas em PBS por

3.4. PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS COM COLESTEROL E (+)-LIMONENO

58

Tabela 3.2: As fórmulas estruturais e moleculares, os nomes completos, as siglas, as massas molares e a temperatura de transição de fase, T_m , das moléculas anfífilas utilizadas neste estudo.

Nome	Fórmula estrutural	Abreviação	Massa molar (g)	T_m^a	Fórmula Molecular
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina		PC-16 / DPPC	734	41°C	$C_{40}H_{80}NO_8P$
1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina		PC-18 / DSPC	790	54°C	$C_{44}H_{88}NO_8P$
1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocholina		PC-20 / DAPC	846	66°C	$C_{48}H_{96}NO_8P$
1,2-dibehenoil-sn-glicero-3-fosfocolina		PC-22	902	75°C	$C_{52}H_{104}NO_8P$

^a T_m é a temperatura, aproximada, da transição de fase, correspondendo a transição da fase gel ($L_{\beta'}$) para a fase fluida ou líquido-cristalina ($L_{\alpha'}$).

cerca de 5 minutos a 60°C e, posteriormente, centrifugadas várias vezes antes do processo de extrusão. Este método de preparação de vesículas é o mais comumente relatado na literatura, mas não foi adequado para a preparação das vesículas de PC-20 e PC-22. Para preparação das amostras com terpeno em vesícula de PC-20 com o marcador de spin 5-DMS, foi usado o primeiro método já citado. Após o processo de extrusão e redução do volume de água da amostra, através de um fluxo de gás de nitrogênio, foi incorporado o terpeno (+)-Limoneno (Acros Organics, Gell, Belgium), na razão molar terpeno:lipídeo de 0,8:1. Antes da adição o limoneno foi primeiramente dissolvido em etanol a 33% (v/v). Após ser agitada a amostra foi transferida para o tubo capilar, o qual foi selado e deixado na geladeira por ~24 h. As medidas de RPE foram realizadas conforme o procedimento citado anteriormente para vesículas de fosfolipídios.

3.5 Simulação dos Espectros de RPE

As simulações dos espectros de RPE dos marcadores citados foram realizadas principalmente com o programa NLLS, desenvolvido por Jack H. Freed e colaboradores (1989 e 1996). O programa permitiu analisar um único espectro contendo duas componentes espectrais com diferentes mobilidades e parâmetros dos tensores magnéticos, fornecendo a população relativa juntamente com as taxas associadas à difusão rotacional. Na realização dos cálculos espectrais do programa incluem-se os valores dos tensores magnéticos \mathbf{g} (fator \mathbf{g}) e \mathbf{A} (interação hiperfina) juntamente com o tensor de difusão rotacional, \mathbf{R} , que são expressos num sistema de eixos cartesianos fixo na molécula do marcador de spin (Fig. 2.9). Para reduzir o número de parâmetros e simplificar a simulação, uma forma esférica foi assumida para o tensor \mathbf{R} (movimento isotrópico). Antes da realização da simulação final, foi feita uma análise geral dos espectros obtidos neste trabalho, para determinar os valores principais dos tensores magnéticos e somente depois, todos os espectros de RPE foram simulados com os mesmos parâmetros (ALONSO *et al.*, 2001; ALONSO; SILVA; TABAK, 2003).

Tabela 3.3: Principais componentes dos tensores magnéticos \mathbf{g} (fator \mathbf{g}) e \mathbf{A} (interação hiperfina) usados no programa NLLS (Nonlinear Least-Squares)

Parâmetro	Componente 1		Componente 2
	abaixo T_m	acima T_m	
g_{xx}	2,0080	2,0080	2,0082
g_{yy}	2,0060	2,0060	2,0062
g_{zz}	2,0020	2,0020	2,0027
A_{xx} (G)	6,9	5,5	5,8
A_{yy} (G)	6,0	5,4	5,7
A_{zz} (G)	31,6*	34,1	31,6
a_0 (G)	14,8	15,0	14,4

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

*Para amostras contendo 40% de colesterol foi utilizado o A_{zz} de 32,2 G

Neste trabalho, os espectros foram simulados com um modelo de uma ou duas

componentes espectrais. A componente com maior rigidez e polaridade foi denominada componente 1 e a outra de componente 2. Porém, nas temperaturas acima da transição de fase (T_m) gel-líquido cristalino, os parâmetros magnéticos da componente 1 sofreram pequenas alterações. Os autovalores dos tensores magnéticos utilizados na simulação estão apresentados na Tab. 3.3.

Os espectros de RPE também foram simulados em regime de movimento rápido com o EPRSIM (versão 4.99) (ARSOV; SCHARA; STRANCAR, 2002; STOPAR *et al.*, 2006). Os parâmetros de entrada para os tensores magnéticos \mathbf{A} e \mathbf{g} , foram os mesmos indicados na Tabela 3.3 e seus valores foram corrigidos linearmente pelo próprio programa através de fatores de correção de polaridade aplicados sobre os traços destes tensores, denotados por p_A e p_g , respectivamente. Entretanto, o programa NLLS gera a taxa de difusão rotacional média, R_{bar} , enquanto o EPRSIM fornecendo parâmetro de tempo de correlação rotacional, τ_c , que segue a relação $\tau_c = 1/6\bar{R}$.

Capítulo 4

Resultados

Neste capítulo serão apresentados espectros de RPE de marcadores de spin das classes metil doxil estearato (n-DMS), doxil ácido esteárico (n-DSA) e dipalmitoilfosfatidilcolina o grupo doxil (n-PC) em bicamadas de fosfolipídios, mostrando que estes marcadores também podem formar, em determinadas temperaturas, espectros com duas componentes em bicamadas simples. Será visto também que o marcador 5-DMS apresenta espectros mais simples de serem analisados e seu comportamento é pouco influenciado pela posição do radical nitróxido ao longo da cadeia graxa. Por ser um marcador de spin bem comportado, devido à baixa influência da posição do nitróxido, nossos estudos foram focalizados sobre esse marcador. A análise dos espectros através da simulação do perfil de linha visa determinar a dinâmica molecular e população dos marcadores em cada componente.

4.1 Análise dos Espectros de RPE

Espectros de RPE com duas componentes espectrais são frequentemente observados para marcadores de spin lipídicos em membranas modelos. A Fig. 4.1 apresenta espectros de marcadores de spin de três classes (n-DMS, n-DSA e n-PC) incorporados em vesículas de DPPC em três temperaturas selecionadas para cada sonda. As setas duplas indicam a posição do campo magnético, onde as características indicativas da presença de duas componentes espectrais são mais claramente visíveis. Com o aumento da temperatura, a intensidade dos dois picos adjacentes indicados pelas setas na primeira linha de ressonância

dos espectros tende a se igualar em intensidade, devido a diminuição da fração relativa da componente 1 (componente menos móvel) nos espectros.

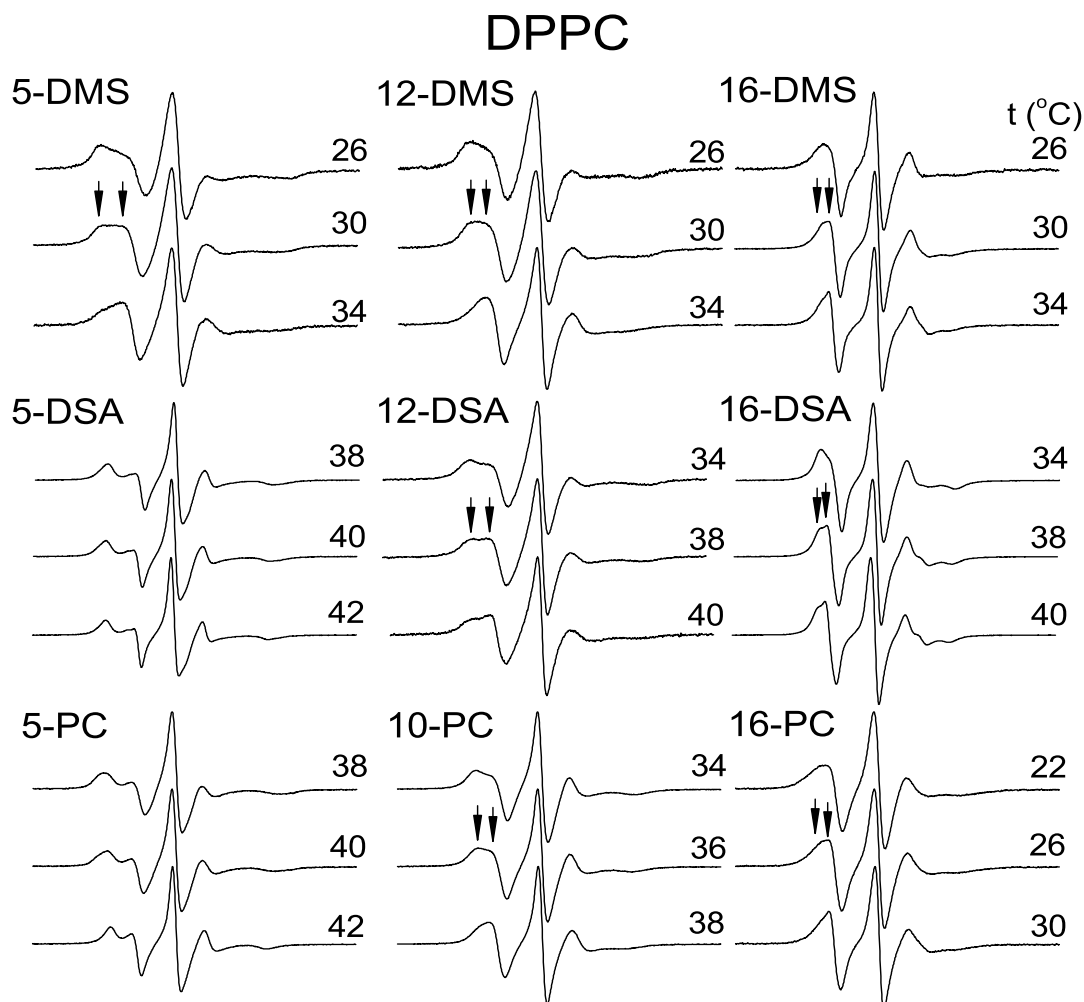


Figura 4.1: Espectros de RPE dos marcadores de spin: 5-, 12- e 16-DMS, 5-, 12- e 16-DSA, 5-, 10- e 16-PC em membrana de DPPC para algumas temperaturas. As setas indicam as posições de campo magnético onde o perfil de linha característico de duas componentes é mais claramente visível. A varredura de campo magnético é de 100 G.

Espectros de RPE evidenciando duas componentes apareceram a temperaturas mais elevadas para os marcadores de spin derivados dos ácidos esteáricos quando comparadas aquelas do éster metílico dos ácidos esteáricos e a temperaturas diferentes para os marcadores de cadeias PCs. Para o 5-DMS, 12-DMS e 16-DMS as duas componentes foram mais evidentes em torno de 30°C e as populações relativas foram essencialmente as mesmas para os

três marcadores de spin a esta temperatura. Este fato sugere que para estas sondas de spin, a posição do nitróxido na cadeia acila não afeta as populações relativas das componentes. Este comportamento em termos da baixa influência da posição do nitróxido não aconteceu com as duas outras sondas. Nos casos dos marcadores 5-DSA e 5-PC as duas componentes não são claramente visíveis. Estes marcadores provavelmente apresentam fortes interações com os grupos polares da membrana fazendo com que o radical nitróxido fique localizado mais próximo da interface polar e sujeito às interações de cargas que podem afetar seus parâmetros magnéticos, tornando as suas formas de linha diferente dos outros isômeros de posição e, portanto, são de mais difícil análise.

Os marcadores n-DSA possuem um grupo carboxila que possibilita a formação de duas ligações de hidrogênio com os grupos polares da membrana, enquanto os marcadores DMS possuem o grupo carbonila o qual forma apenas uma ligação de hidrogênio. Comparando os espectros de RPE dos marcadores 12- e 16-DSA (Fig. 4.1) nota-se que o perfil característico de duas componentes aparece em temperaturas mais altas (38°C). E no caso dos marcadores 10- e 16-PC este perfil é visto em temperaturas diferentes. Dessa forma, podemos notar que os espectros dos marcadores da classe DMS são os mais simples e bem comportados no sentido de que a posição do radical nitróxido ao longo da cadeia acila não muda a temperatura em que este perfil de duas componentes é observado e, dessa forma, decidimos fazer uma análise mais detalhada sobre o 5-DMS.

Através da simulação dos espectros de RPE com o programa NLLS foi possível separar as contribuições de cada componente no espectro composto, como pode ser visualizado na Fig. 4.2, a qual apresenta vários espectros do marcador 5-DMS em DPPC para temperaturas abaixo e acima da transição de fase (T_m). As duas componentes espectrais representam duas populações de marcadores, diferindo no estado de mobilidade e na polaridade. A componente 1 predominou entre as temperaturas 2 e 18°C, sendo os espectros simulados com apenas uma componente, enquanto que a partir de 30°C já foi possível observar uma pequena fração da componente 2 (20 – 30%) (Fig. 4.2). Espectros com duas componentes também

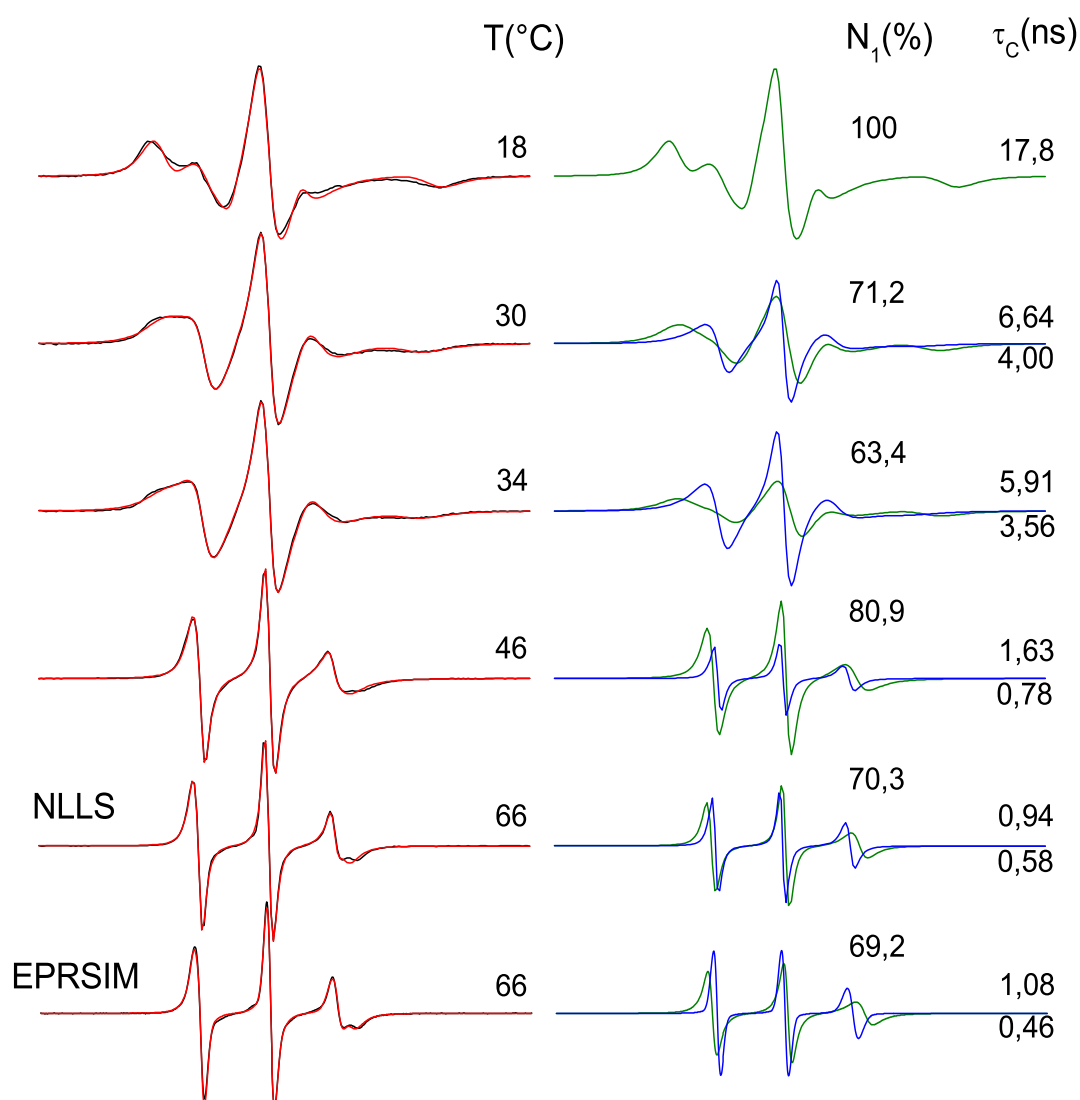


Figura 4.2: Espectros de RPE do marcador de spin 5-DMS em membrana de DPPC (pH 7,4) com variação da temperatura. Nos espectros da coluna esquerda as linhas de cor preta representam os espectros experimentais e as linhas de cor vermelha os espectros simulados com o programa NLLS, sendo que o espectro a 66°C também foi simulado com o programa EPRSIM. Os espectros da coluna direita são os espectros decompostos pela simulação em duas componentes espectrais, onde a componente 1 é a linha verde e a componente 2 está em azul. Também estão apresentados os parâmetros obtidos dos ajustes: N_1 , a população relativa da componente 1 e τ_c , o tempo de correlação rotacional, das duas componentes, obtidos da simulação.

foram claramente visíveis na fase líquido-cristalino da membrana, sendo que na simulação dos espectros da fase fluida os parâmetros magnéticos do tensor hiperfino da componente 1 sofreram pequenas alterações (Tabela 3.3). Com o intuito de confirmar os resultados obtidos

com o programa de simulação NLLS, os espectros também foram simulados com o programa EPRSIM, mas isto só foi realizado no regime de movimento rápido onde este programa apresentou um bom desempenho.

Pode-se verificar que a população relativa da componente 2 aumenta com o aumento da temperatura, indicando uma elevação da partição do marcador para o meio mais hidrofóbico. Nota-se também uma alteração significativa na forma dos espectros para as temperaturas de 34 e 46°C, a qual reflete a transição de fase da membrana. É bem conhecido que em DPPC ocorre uma transição em $\sim 34^\circ\text{C}$, correspondendo à transição da fase gel ($L_{\beta'}$) para a fase de pré-transição ($P_{\beta'}$), e a transição de fase principal, à $\sim 41^\circ\text{C}$, correspondendo à transição de fase $P_{\beta'}$ para a fase fluida ou líquido-cristalina ($L_{\alpha'}$) (SHIMSHICKL; MCCONNELL, 1973; WANG *et al.*, 1993). Nestes espectros também pode ser observado que com o aumento de temperatura os parâmetros – população da componente 1 e tempo de correlação rotacional – decrescem, e que com a transição da fase gel para a fluida ocorre um brusco aumento na população da componente 1.

É interessante que na fase líquido-cristalina da DPPC os marcadores 5- e 7-DMS formam duas componentes enquanto o marcador 12-DMS forma apenas uma (Fig. 4.3). A presença de duas componentes nesta fase é notada pela assimetria de linha de ressonância de campo baixo. Na figura foram apresentados os valores de y dos picos para cima e para baixo da linha de base. No primeiro espectro (5-DMS), $y = +0,59$ (para cima) e $y = -0,73$ (para baixo) indicando uma assimetria na forma de linha. Isto sugere que este sinal de ressonância é formado por duas linhas sobrepostas. No segundo espectro (7-DMS) esta assimetria é menor, pois os módulos dos valores de y são menos discrepantes e no caso do marcador 12-DMS a linha de ressonância pode ser considerada simétrica.

O grau de penetração das moléculas de água no interior hidrofóbico pode ser deduzido a partir da medição do perfil de polaridade em membranas modelos. O parâmetro de RPE – constante de acoplamento hiperfino isotrópico do ^{14}N , a_0 , aumenta com o aumento da constante dielétrica ou da polaridade do solvente em que os radicais nitróxidos estão

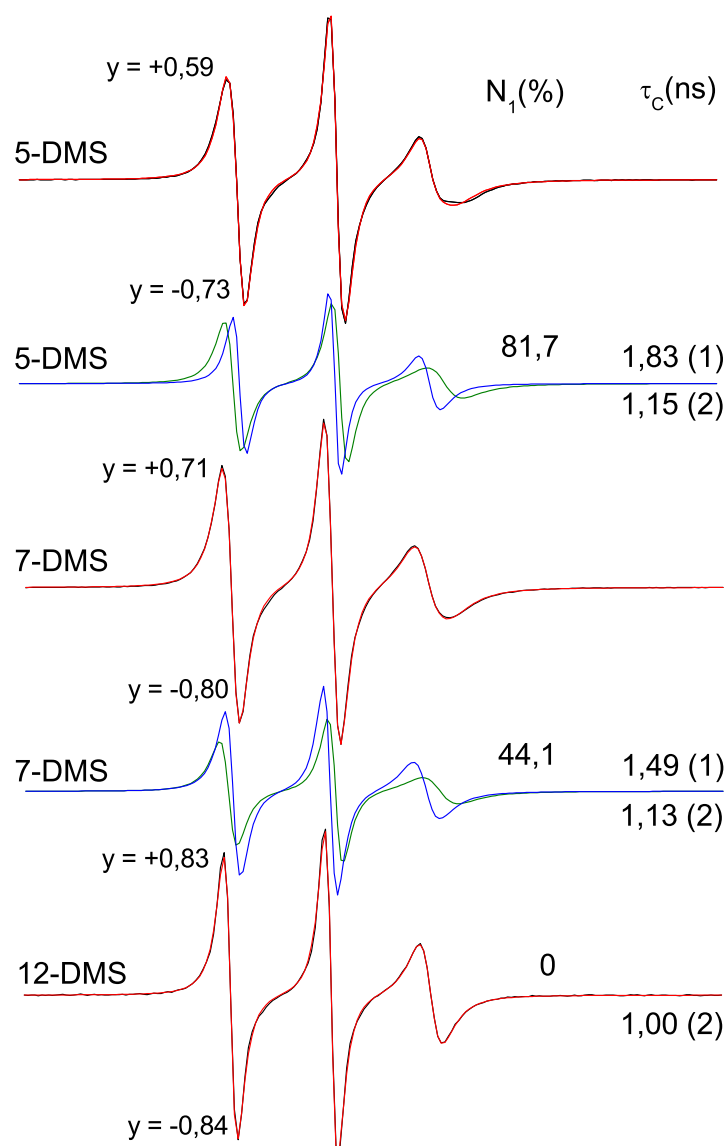


Figura 4.3: Espectros de RPE experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) dos marcadores de spin 5-DMS, 7-DMS e 12-DMS em membrana de DPPC na fase fluida ou líquido-cristalina a 44°C. Os espectros foram simulados com o programa NLLS, que decompõe o espectro experimental em duas componentes espectrais, a componente 1 (linha verde) e a componente 2 (linha azul), sendo expressos os parâmetros N_1 , população de marcador da componente 1, e τ_c , o tempo de correlação rotacional de cada componente. Os valores de y , indicados na primeira linha de ressonância, mostram as intensidades relativas dos picos para cima e para baixo. Variação do campo magnético é de 100 G.

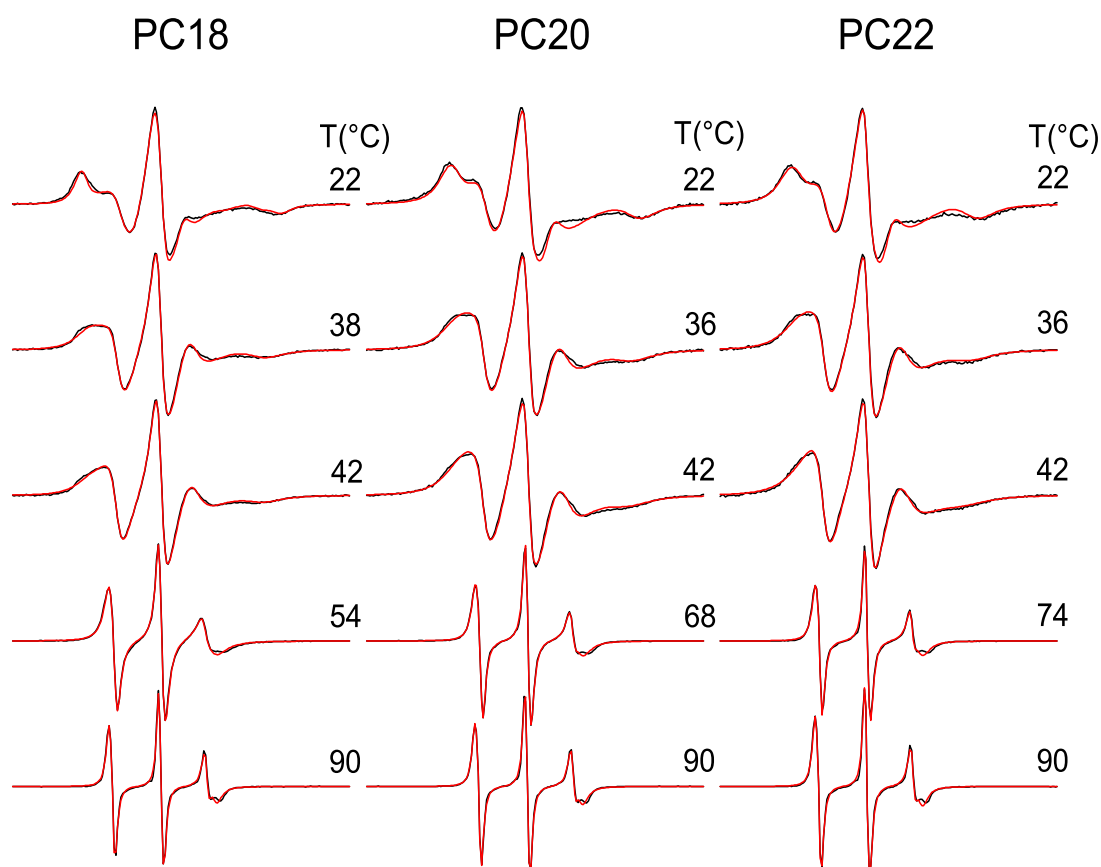


Figura 4.4: Espectros de RPE experimentais (linha preta) e simulados (linha vermelha) do marcador de spin 5-DMS nas membranas PC-18, PC-20 e PC-22 para várias de temperaturas. A varredura do campo magnético é de 100 G.

dissolvidos. Tem sido encontrado para o marcador de spin glicerofosfolípido com o grupo doxil-nitróxido na posição n da cadeia da $sn-2$ (n -PCSL) em membranas de DPPC, um valor de parâmetro a_0 de 15,0 G para a posição $n = 4$ e 14,5 G para $n = 16$, com uma abrupta redução da polaridade entre $n = 7$ e $n = 9$ (KURAD; JESCHKE; MARSH, 2003). Como é indicado na Figura 4.3, o espectro de RPE do 5-DMS pode ser simulado com duas componentes com diferente polaridade e mobilidade. Isto sugere que a espectroscopia de RPE identifica as duas componentes associando menor mobilidade com maior polaridade (componente 1) e maior mobilidade com menor polaridade (componente 2). Isto pode ser entendido imaginando uma flutuação transversal do 5-DMS entre as localizações rasas e

profundas na membrana. Sempre que o marcador de spin vai para a região mais profunda da membrana, onde o ambiente é caracterizado por uma menor polaridade e maior mobilidade, contribui para a componente 2, sendo assim visíveis duas populações do marcador de spin. Como há menor probabilidade do 7-DMS atingir a região com maior polaridade, a sua população na componente 1 também é menor. Da mesma forma, o fato do 12-DMS ter apenas uma componente sugere que maioria dos nitroxídeos deste marcador não alcança a região de maior polaridade na membrana. Na Fig. 4.5 há um desenho esquemático representando o 5-DMS em duas posições dentro da bicamada lipídica que supostamente gerariam as duas componentes.

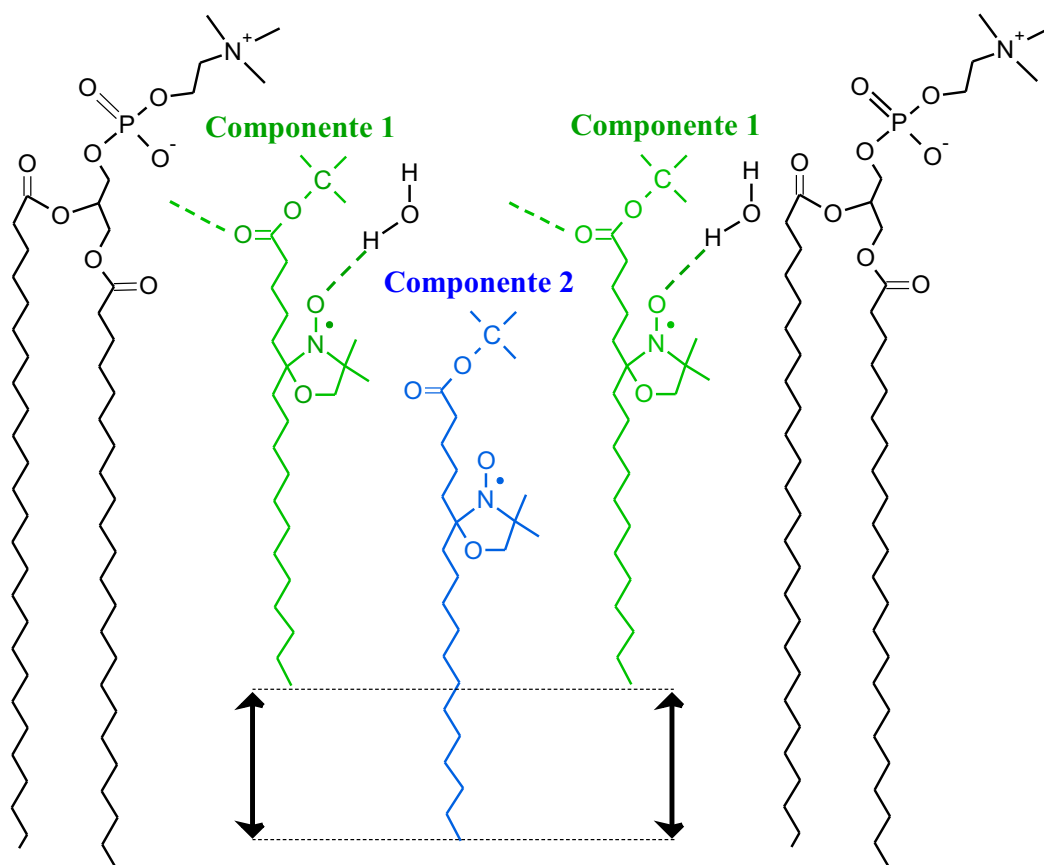


Figura 4.5: Representação esquemática das flutuações transversais propostas para o marcador de spin 5-DMS em membranas de DPPC. Os marcadores de spin da componente 1 estão localizados essencialmente na região rasa da bicamada (marcador de spin de cor verde) e os da componente 2 estão localizados na região mais profunda (marcador de cor azul).

A posição rasa do marcador foi associada à componente espectral 1. Nesta região o

marcador interage mais fortemente com os grupos polares, principalmente através de ligações de hidrogênio diretamente com os grupos polares da DPPC ou tendo a molécula de água como intermediária. Na localização mais embutida da componente 2 o marcador possui uma dinâmica molecular maior e seu grupo carbonila não está formando ligação de hidrogênio com a DPPC ou está formando ligação apenas com a água livre.

Para todas as PCs analisadas foi verificado que até a temperatura de 22°C os espectros do 5-DMS puderam ser simulados usando apenas uma componente e no restante do intervalo de temperatura medido foram necessárias duas componentes para um bom ajuste teórico do espectro de RPE (Fig. 4.5). A Figura 4.4 mostra os espectros experimentais de RPE e o melhor ajuste para outras PCs analisadas neste trabalho. Nota-se que a 42°C, o espectro tende a assumir a forma de linha de uma única componente para todas as PCs, indicando que, a esta temperatura, a diferença de mobilidade entre as duas componentes já está diminuindo. Quando a temperatura de transição de fase é superior à 50°C, os espectros convergem em mobilidade nesta temperatura e as duas componentes não podem ser separadas até a chegada da transição para a fase fluida.

4.2 Dinâmica e Partição do 5-DMS nas Bicamadas de Fosfatidilcolina

As dependências com a temperatura dos parâmetros de RPE – τ_c e N_1 (população relativa do marcador 5-DMS na componente 1) – nas fases gel e fluida estão apresentadas na Fig. 4.6 para as PCs estudadas. Abaixo de 26°C os espectros foram simulados com uma única componente. O tempo de correlação rotacional da componente 2, mostrou a transição de fase de cada vesícula e a 30°C foi aproximadamente a metade da componente 1. Já o parâmetro N_1 mostra o decréscimo da população de marcador na componente 1, com as membranas nas fases gel e fluida. Para a PC-18 verificou-se a transição da fase $L_{\beta'}$ para a fase $L_{\alpha'}$ em ~54°C. Já para a PC-20 a transição é observada em ~62°C, para PC-22 a mesma transição ocorre em ~74°C. Ou seja, da PC – 18 a PC – 22 as transições de fase

foram acima de 50°C, e nesta temperatura a mobilidade das duas componentes convergiram para valor similar, de modo que a resolução espectral foi insuficiente para identificar as duas componentes. Desta forma, os espectros foram tratados com uma única componente para estas temperaturas. Um aumento pronunciado na população da componente 2 em DPPC foi detectado quando a temperatura se aproxima da transição de fase. É notável que a dinâmica de 5-DMS, foi similar em todas as PCs no intervalo de temperatura de 2 a 30°C. O parâmetro de RPE – desdobramento hiperfino máximo, $2A_{//}$, é muito sensível à mobilidade do marcador e pode ser medido diretamente no espectro de uma única componente, sendo utilizado para confirmar que até 22°C as medidas mostradas na Figura 4.6 não diferem significativamente em mobilidade. A medida do $2A_{//}$ a 2°C em todas as PCs foi de 62,5 G, com um erro experimental de $\pm 0,5$ G. Os espectros de todos os lipídios também foram muito similares a -78°C. No entanto, mudanças significativas em ambas às mobilidades e populações de marcadores de spin foram detectadas em temperaturas próximas a T_m .

A mudança na energia livre padrão de Gibbs, ΔG^0 , para transferir o marcador de spin da componente 1 para a 2, pode ser calculada com base no coeficiente de partição (ROGERS; WONG, 1980; DA; ITO; FUJIWARA, 1992):

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K, \quad (4.1)$$

onde ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta e K aqui é a constante de equilíbrio. Uma vez que as duas componentes espectrais estão em equilíbrio termodinâmico e o programa de simulação permite a determinação das populações relativas do marcador de spin nas componentes 1, N_1 , e 2, N_2 , pode-se determinar K entre estas duas componentes ($K = N_2/N_1$). Também no equilíbrio térmico a variação da energia livre de Gibbs é nula, ou melhor, $\Delta G = 0$. Assim, ΔG^0 pode ser escrito em termos da energia livre padrão, da seguinte forma:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K, \quad (4.2)$$

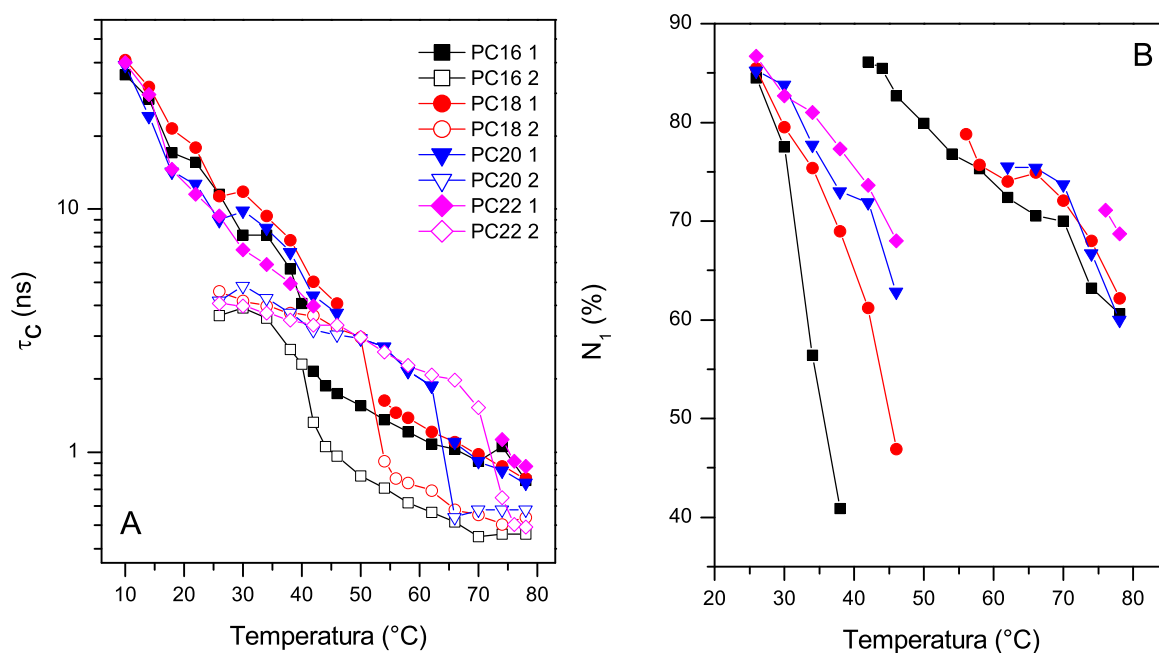


Figura 4.6: Painel A: Tempo de correlação rotacional, τ_c , do 5-DMS nas membranas de várias fosfatidilcolina versus temperatura. Painel B: População relativa do marcador na componente 1, N_1 , determinado pela simulação espectral, para as vesículas de fosfatidilcolina versus a temperatura.

ou

$$\ln K = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}, \quad (4.3)$$

onde ΔS^0 e ΔH^0 correspondem às variações de entropia e entalpia padrões, respectivamente, associadas à transferência da molécula marcada da componente 1 para a 2.

Na prática, os valores dos parâmetros termodinâmicos podem ser determinados pelo gráfico de van't Hoff de $\ln K$ versus $1/T$, como mostrado na Fig. 4.7, no qual o coeficiente angular é dado por $\frac{\Delta H^0}{R}$ e a interseção com o eixo das ordenadas é $\frac{\Delta S^0}{R}$. O ΔH^0 pode ser entendido como a energia aparente necessária para dissociar uma fração do nitróxido da componente de movimentação mais restrita para a menos restrita, por meio de um processo endotérmico com aumento de entropia. Na Tab. 4.1 estão alguns valores calculados da energia livre padrão de Gibbs, entalpias e entropias. Na fase líquido-cristalina, o gráfico van't Hoff da DPPC parece linear no intervalo de temperatura de 42 a 78°C, sugerindo

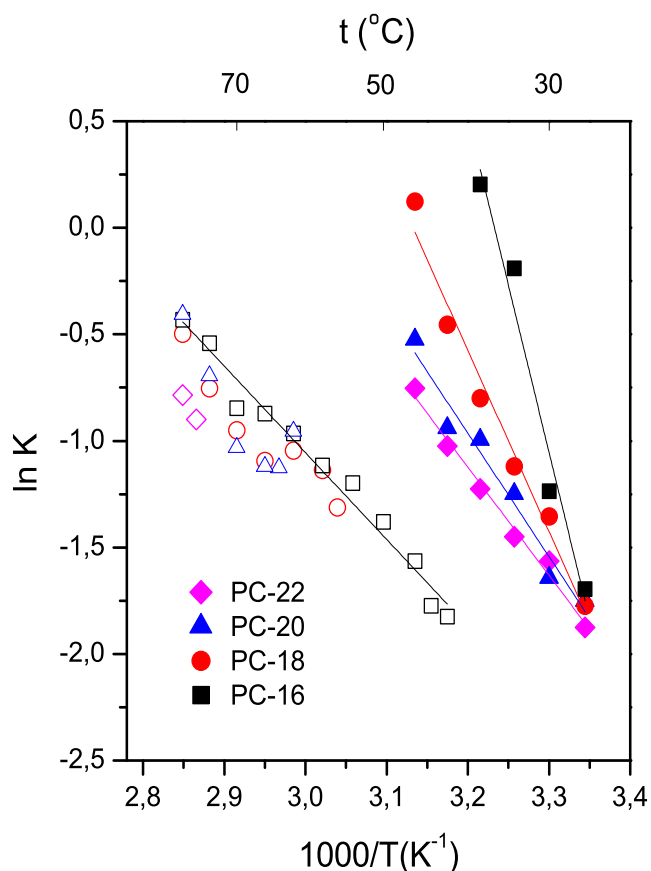


Figura 4.7: Logaritmo natural do coeficiente de partição, $\ln K$, do 5-DMS em vesículas de PC-16, PC-18, PC-20 e PC-22 versus o recíproco da temperatura absoluta

que as alterações de entalpia e entropia são constantes. Os parâmetros termodinâmicos dos outros lipídios não foram calculados, mas a partir dos gráficos pode-se inferir que eles foram semelhantes aos da DPPC. No estado gel o programa apenas distingue as duas componentes até 46°C para as PCs com T_m acima de 50°C , e no caso da DPPC, a proximidade da temperatura de fusão antecipa a transferência do marcador de spin para a componente 2, proporcionando assim maiores mudanças nos valores de entalpia e entropia.

Para a simulação dos espectros de RPE do marcador de spin 5-DMS foi usado principalmente o programa NLLS, mas para a membrana de DPPC, também foi realizada a simulação dos espectros de RPE com o programa EPRSIM, na fase líquido-cristalina da membrana, onde este programa apresenta um bom ajuste espectral. Este programa tem a

Tabela 4.1: Mudanças na energia livre padrão de Gibbs (a 34°C), entalpias e entropias associadas com a transferência do marcador de spin 5-DMS da componente 1 para a 2 em vesículas de fosfatidilcolina (PC-16, PC-18, PC-20 e PC-22) abaixo da transição de fase principal e após a transição para a PC-16.

Amostras	$\Delta G_{1 \rightarrow 2}^0$ ($kcal mol^{-1}$)	$\Delta H_{1 \rightarrow 2}^0$ ($kcal mol^{-1}$)	$\Delta S_{1 \rightarrow 2}^0$ ($cal mol^{-1} K^{-1}$)
PC-16	0,2	31,0 ^a	100,2
PC-18	0,6	16,8	52,7
PC-20	0,7	11,4	34,7
PC-22	0,8	10,0	29,9
PC-16 depois da transição	1,2	8,0	22,1
PC-16 + Colesterol ^b	0,5	2,8	7,6

^a Os valores numéricos foram calculados com base nas equações 4.2 e 4.3, usando os dados da Fig. 4.7

^b DPPC+40 mol% de colesterol (26-78°C)

vantagem de fazer correções menores nos valores médios dos tensores magnéticos g- e A- (Tabela 3.3), evitando possíveis imprecisões nos dados de entrada selecionados. Os parâmetros obtidos para a simulação utilizando os dois programas podem ser observados na Fig. 4.8. Nota-se que o parâmetro τ_c das componentes 1 e 2, utilizando tanto o programa NLLS e EPRSIM, apresentaram comportamentos similares, com poucos pontos se destoando (Fig. 4.8A). Para a população relativa do marcador de spin na componente 1, onde para os dois programas observa-se a redução deste parâmetro com o aumento da temperatura, nota-se que os comportamentos das curvas também se assemelham (Fig. 4.8B). A concordância entre os resultados obtidos a partir de simulações de espectros com dois programas diferentes dá suporte aos resultados obtidos para os parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 4.1.

4.3 Comportamento das Componentes Espectrais na Presença do Limoneno e Colesterol

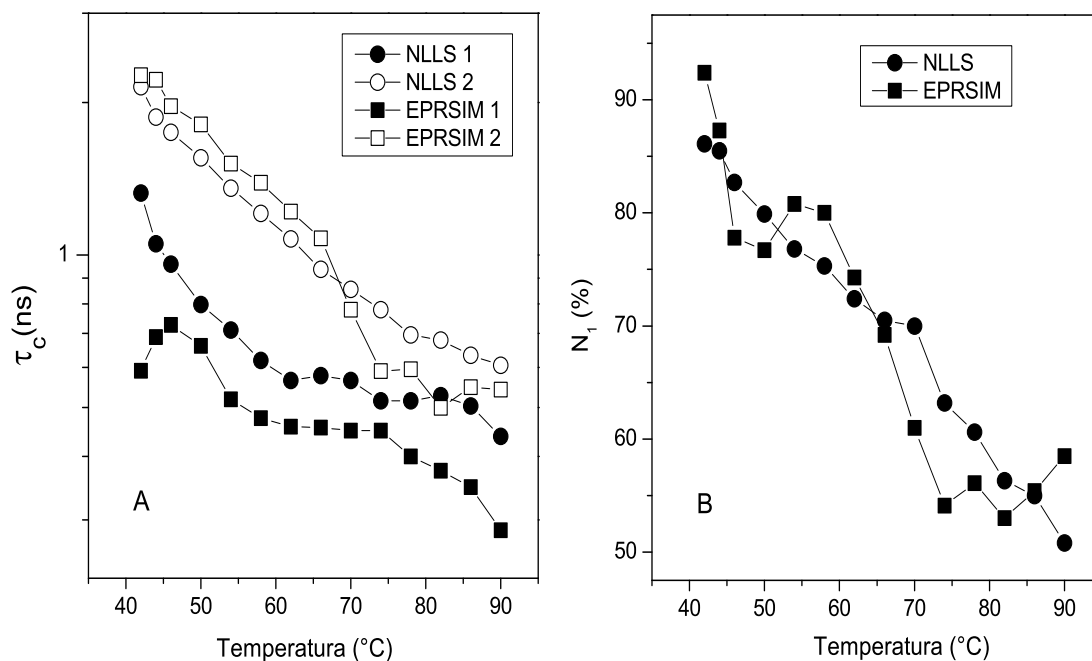


Figura 4.8: Tempo de correlação rotacional, τ_c , (painel A) e população relativa da componente 1, N_1 , (painel B) do marcador 5-DMS na membrana de DPPC (pH 7,4) versus a temperatura, simulados com os programas NLLS (círculos) e EPRSIM (quadrados).

Os terpenos são pequenas moléculas hidrofóbicas que penetram em membranas em altas concentrações e podem atuar como espaçadores, aumentando a fluidez da membrana e enfraquecendo a rede de ligações de hidrogênio na interfase polar (ANJOS; NETO; ALONSO, 2007, 2007; ANJOS; ALONSO, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2010). O comportamento das componentes espectrais na presença do terpeno (+)-Limoneno foi analisado em membranas de PC-20, na razão molar terpeno:lipídio 0,8:1 Fig. 4.9. Nota-se que com a inserção do terpeno, ocorreu um aumento da mobilidade do marcador 5-DMS nas componentes 1 e 2 na fase gel da membrana (Fig. 4.9A), acompanhada de uma redução na população relativa da componente 1 (Fig. 4.9B). A componente 1, na fase fluida, não apresentou alteração significativa com a adição do terpeno, tanto com relação à mobilidade do marcador, como também com respeito à população relativa de marcador existente na componente. Nota-se que o parâmetro τ_c refletiu a transição de fase da membrana e que o terpeno abaixou a

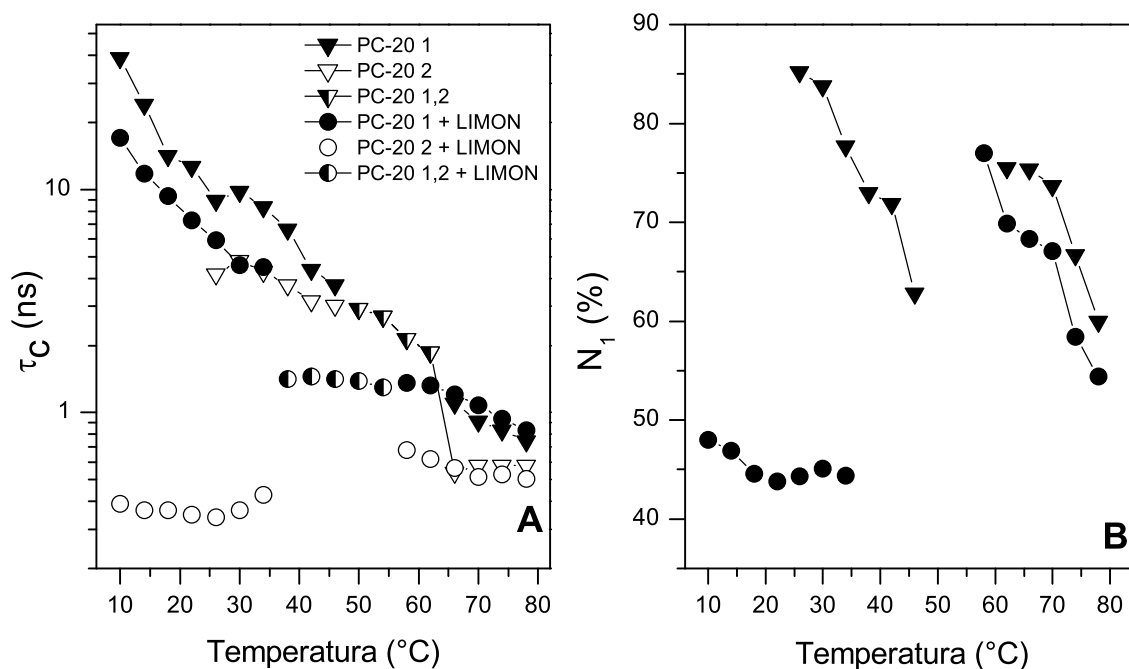


Figura 4.9: População relativa da componente 1, N_1 , (painel B) e o tempo de correlação rotacional, τ_c , (painel A) do marcador 5-DMS em vesículas de PC-20. O terpeno (+)-Limoneno foi adicionado a uma fração molar terpeno:lipídio 0,8:1.

transição de fase da membrana tratada de $\sim 66^{\circ}\text{C}$ para $\sim 57^{\circ}\text{C}$.

As dependências do τ_c e N_1 do 5-DMS na DPPC e DPPC contendo 40 mol% de colesterol são mostradas na Fig. 4.10. Abaixo de 41°C as duas componentes não diferenciam significativamente em mobilidade, mas apresentaram diferenças em suas populações relativas. Enquanto que na fase fluida a presença de colesterol reduziu a mobilidade do marcador de spin em ambas componentes. As mudanças de mobilidade nas duas componentes causadas pela transição de fase também não se verifica ou fica bastante suavizada com a presença de 40% de colesterol na membrana de DPPC. Observando a Fig. 4.10B referente à população relativa de marcador na componente 1, nota-se para a amostra não tratada com colesterol que na fase $L_{\beta'}$ ocorre uma rápida redução desta componente e com um brusco aumento na população com a transição de fase, e na fase $L_{\alpha'}$ também se verifica uma redução

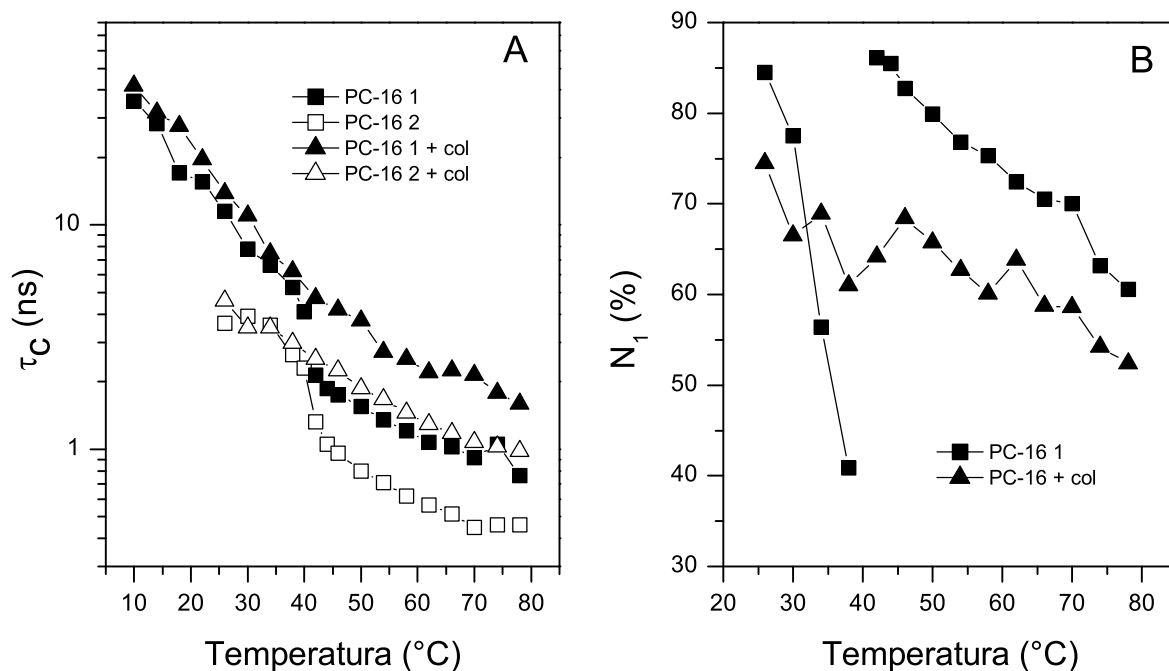


Figura 4.10: Membrana de PC-16 preparada com 40% de colesterol. No painel A tempo de correlação rotacional, τ_c . No Painel B, população relativa do marcador na componente 1, N_1 .

da componente 1. Ao incorporar o colesterol na membrana, nota-se um decréscimo gradual desta componente em todo intervalo de temperatura medido, não mostrando a transição de fase da membrana. Os dados da Fig. 4.10 são representativos de três preparações de amostra contendo diferentes razões molares de colesterol (30, 35 e 40%), que apresentaram resultados muito semelhantes.

Capítulo 5

Discussões

No presente trabalho, um estudo detalhado do comportamento térmico do marcador de spin 5-MSL em vesículas de fosfatidilcolina com vários tamanhos de cadeias indicou que quando a temperatura de transição de fase das membranas é superior a 50°C, a mobilidade das duas componentes espectrais converge para valor semelhante e assim as componentes não podem ser separadas no intervalo de temperatura de 50°C até a temperatura de transição da membrana. Isso indica que as interações responsáveis pelo movimento restrito de uma fração do marcador são diminuídas a 50°C. No entanto, no caso da membrana de DPPC com uma temperatura de transição, T_m , de 41°C, foram observadas alterações significativas na dinâmica e distribuição do marcador para temperaturas próximas da temperatura de transição de fase (Fig. 4.6). Estas alterações também se refletiram nos valores calculados dos ΔH° e ΔS° aparentes (Tabela 4.1). Esta instabilidade do marcador é consistente com as reorganizações da membrana que ocorrem em temperaturas perto da T_m e é provavelmente a causa para o aumento da permeabilidade das bicamadas de fosfolípidios para pequenas moléculas solúveis em água, nas regiões de coexistência de duas fases (BRAMHALL *et al.*, 1987; CLERC; THOMPSON, 1995). Este fenômeno bem conhecido e atribuído ao aumento da permeabilidade nas fronteiras de domínio onde duas fases coexistem em equilíbrio (CLERC; THOMPSON, 1995). Curiosamente, tem sido demonstrado que o fluxo de 5/6-carboxifluoresceína encapsulada em vesículas de fosfolípidios seladas tem permeação máxima em uma ampla faixa de temperatura perto de T_m , com taxas de fluxo

inversamente proporcional ao comprimento da cadeia acila (BRAMHALL *et al.*, 1987).

Espectros de RPE de duas componentes do marcador de spin colestano (análogo do colesterol) têm sido observados em multicamadas bem alinhadas contendo uma mistura dos lipídios 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, colesterol e dioctanoilglicerol. Estas componentes são visíveis tanto com o campo magnético externo paralelo quanto perpendicular ao plano da bicamada (BUDIL *et al.*, 1996). Embora os espectros para as duas orientações de campo magnético foram muito diferentes em 36°C, os autores relataram que as populações relativas das duas componentes espectrais em cada espectro foram essencialmente as mesmas e parecem variar quase reversivelmente em função da temperatura e composição da membrana. No entanto, a origem destas duas componentes dos espectros em bicamadas simples de fosfolipídeos ainda é pouco compreendida e tem sido geralmente atribuída à heterogeneidade da membrana.

A espectroscopia de RPE tem sido utilizada no estudo da dinâmica de lipídios do estrato córneo, com o objetivo de entender por que a permeabilidade da pele é reduzida pela desidratação da membrana (ALONSO; MEIRELLES; TABAK, 1995; ALONSO *et al.*, 1996). Ao diminuir o nível de hidratação do estrato córneo, uma diminuição gradual da dinâmica foi detectado e, principalmente em consequência da desidratação, a população da segunda componente espectral de diferentes marcadores de spin foi diminuída, tendendo a desaparecer, em resposta à desidratação total do estrato córneo. Resultados semelhantes foram observados para vesículas de fosfolipídios (dados não mostrados). Esses dados experimentais sugerem que a componente mais rígida poderia ser atribuída aos marcadores de spin que formam ligação de hidrogênio na interface polar, diretamente ou mediada por moléculas de água (estrutura rígida). E a componente mais móvel pode surgir quando o grupo polar do marcador no interior da membrana é ligado por hidrogênio à molécula de água livre (estrutura móvel) ou então não está ligado por hidrogênio. No entanto, mesmo assumindo que as ligações de hidrogênio representam um ponto chave para a resolução de duas componentes espectrais, obviamente há outras interações decorrentes das interações

hidrofóbicas e de van der Waals. Essas interações também estão envolvidas no conjunto de interações intermoleculares que definem os dois ambientes distintos do marcador no interior da membrana e, certamente, contribuem para os valores das mudanças de entalpia e entropia aparentes observados aqui (Tabela 4.1).

Bicamadas de DPPC contendo 40% molar de colesterol formam a fase líquido-ordenada caracterizada por várias mudanças, especialmente na faixa de temperatura da fase fluida para a DPPC pura (SANKARAM; THOMPSON, 1991; IPSEN; MOURITSEN; BLOOM, 1990). As principais alterações são: melhor empacotamento de fosfolipídios e sua ordem quanto à orientação, aumento da espessura da camada hidrofóbica e a redução da área transversal média por molécula (IPSEN; MOURITSEN; BLOOM, 1990). Os resultados obtidos com o marcador de spin 5-DMS indicaram que abaixo de 41°C, o colesterol adicionado na proporção de 40% molar não afetou significativamente a mobilidade. Vale ressaltar que o desdobramento hiperfino máximo do espectro, $2A_{//}$, aumentou cerca de 1 G, o que poderia indicar um ligeiro endurecimento da bicamada contendo colesterol. No entanto, uma análise mais precisa com o programa NLLS indicou que isto pode ser considerado um artefato do colesterol e que, de fato, o que o colesterol faz é aumentar a polaridade da bicamada, uma vez que o melhor ajuste dos espectros de RPE em temperaturas mais baixas (2-10°C) foi encontrado com um parâmetro magnético A_{zz} ligeiramente maior (Tabela 3.3). Este resultado está de acordo com as medidas de RPE reportadas do parâmetro - constante de acoplamento hiperfino isotrópico ^{14}N , a_0 , para DPPC, onde o colesterol na razão equimolar aumentou o valor de a_0 de 0,3 G para o nitróxido na posição C-5 da cadeia (posição do nitróxido no 5-DMS) (MARSH, 2001). Na presença de 40 mol% de colesterol, o aumento brusco na dinâmica do 5-DMS que ocorre em 41°C com DPPC pura não foi observado, e acima dessa temperatura, a dinâmica da sonda foi consideravelmente diminuída. É interessante comparar nossos resultados com os dados do parâmetro $2A_{//}$ relatados para esfingomielina contendo 40 mol% de colesterol e obtidos com marcadores de spin análogos da fosfatidilcolina e esfingomielina marcadas na posição C-5 da cadeia (COLLADO *et al.*, 2005). Para 22°C, o que

corresponde à fase gel da bicamada de esfingomielina pura, os valores reportados de $2A_{//}$ foram semelhantes aos obtidos aqui para o 5-DMS em DPPC com 40% molar de colesterol, e os valores de $2A_{//}$ reportados a 50°C foram consistentes com o aumento pronunciado causado pelo colesterol no tempo de correlação rotacional aqui observado.

O melhor empacotamento dos fosfolipídios causado pelo colesterol acima de 41°C induziu o 5-DMS a uma mudança para a segunda componente (Fig. 4.10B). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os estudos por espectroscopia de fluorescência, que também têm demonstrado que várias sondas de membrana podem ocupar locais rasos e profundos na bicamada (ASUNCION-PUNZALAN; KACHEL; LONDON, 1998; KLYMCHENKO *et al.*, 2004; CHONG, 1988; KAISER; LONDOR, 1998; DOROSHENKO *et al.*, 2002). Um estudo com a sonda fluorescente 4'-dimetilamino-3 dimetoxiflavona em bicamada de vesículas de EYPC tem demonstrado que a adição de 30 mol% de colesterol induziu fortes mudanças nas concentrações de sonda ligadas e não ligadas por hidrogênio, sugerindo uma redistribuição do corante da superfície da membrana para a região hidrofóbica da bicamada (KLYMCHENKO *et al.*, 2004). Além disso, deslocamentos semelhantes da sonda Prodan causados pelo colesterol também foram observadas em membranas modelo de fosfatidilcolinas (BONDAR; ROWE, 1999).

Acreditamos que o estudo da distribuição bimodal de moléculas marcadas em membranas, resultando nos espectros de RPE com duas componentes resolvidas, pode contribuir para uma melhor compreensão da permeação de moléculas em membranas celulares. Seria interessante verificar se os marcadores de spin com maiores formações da segunda componente espectral, também teria maiores taxas de difusão *flip-flop*. Pois nossa proposta de flutuação transversal de lipídios, entre dois locais principais dentro da membrana, está de acordo com alguns mecanismos estruturalmente relevantes propostos para a atividade antioxidante do tocoferol (ATKINSON; EPAND; EPAND, 2008). Para exercer o seu papel como antioxidante, o tocoferol deve ter a capacidade de acessar os lipídios insaturados peroxidados no interior da membrana e também a fase aquosa onde ocorre sua redução pelo ascorbato.

As possíveis profundidades que o grupo cromanol do α -tocoferol pode ocupar em bicamadas fosfolipídicas foram investigadas através de várias técnicas em termos da ocorrência de uma ligação de hidrogênio entre o fenol e os grupos polares dos fosfolipídios. (ATKINSON; EPAND; EPAND, 2008).

Capítulo 6

Conclusões

Nesta parte de nosso trabalho, examinamos a hipótese de duas acomodações principais de marcadores de spin lipídicos em bicamadas simples. Um modelo de simulação com duas componentes espectrais foi utilizado no programa de ajuste NLLS para monitorar a dinâmica e populações relativas de cada componente.

Na transição da fase gel para fluida, a população relativa dessas componentes para o marcador de spin 5-DMS em DPPC sofre uma mudança brusca que é atenuada na presença de 40 mol% de colesterol. Além disso, acima de 41°C, o colesterol favoreceu a formação da segunda componente, sugerindo que ele pode causar uma mudança na localização do 5-DMS na bicamada para ambientes mais dinâmicos e apolares. E também, a variação da entalpia calculada para transferir o 5-DMS da componente 1 para a 2 foi menor para a amostra contendo colesterol. Com base nos valores ΔH° , apurou-se também que, acima da transição de fase, a capacidade do marcador de avançar para a segunda componente é independente do comprimento da cadeia acila das fosfatidilcolinas, mas na fase gel a transferência do marcador foi favorecida para fosfolipídios de pequenas cadeias, como deduzido pelo menor valor do ΔG° . No entanto, as mudanças de entalpia e entropia aparentes envolvidas nessa transferência foram maiores.

Os terpenos são pequenas moléculas hidrofóbicas que penetram em membranas e aumentam a fluidez da membrana atuando como espaçadores e assim facilitam a permeação de pequenas moléculas polares através de membranas. O terpeno (+)-limoneno na razão

molar terpeno:lipídico de 0,8:1 em vesícula de PC-20 aumentou a população relativa da componente 2 do marcador 5-DMS na fase gel, mas não provocou alteração nas componentes espectrais na fase líquido-cristalina. A incorporação do terpeno na bicamada da vesícula mostrou uma importante redução na temperatura de transição de fase da membrana ($\sim 9^\circ\text{C}$).

As componentes espectrais se mostraram sensíveis à adição de colesterol na membrana de DPPC. As medidas indicaram que a membrana se manteve essencialmente em apenas uma fase, líquido-ordenada, em todo o intervalo de temperatura medido. O colesterol não modificou a mobilidade do marcador na fase gel da membrana, no entanto, causou uma grande redução do movimento rotacional na fase fluida para ambas componentes espectrais. Além disso, o aumento abrupto observado na população da componente 1 com a passagem da transição para a amostra de controle foi completamente atenuado com a presença de 40% molar de colesterol.

Espectros de EPR de duas componentes aparecem com mais frequência para marcadores de spin que interagem mais fracamente com grupos polares da bicamada, como é o caso do 5-DMS, cujos grupos polares são apenas a carbonila e o radical nitróxido. Nossa interpretação é que a espectroscopia EPR identifica as duas componentes associando menor mobilidade com maior polaridade e maior mobilidade com menor polaridade. Isto pode ser entendido imaginando uma oscilação transversal do 5-DMS entre regiões mais e menos superficiais na membrana. No entanto, a origem da formação destas componentes espectrais nos espectros de RPE permanece pouco compreendida e para alcançar uma interpretação mais segura são necessários mais estudos não só usando a espectroscopia de RPE, mas também empregando outras técnicas.

Parte II

INTERAÇÕES DE TERPENOS COM MEMBRANA PLASMÁTICA DE *Leishmania*

Capítulo 7

Introdução

7.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, transmitida aos humanos através da picada da fêmea do flebotomíneo, também chamado de mosquito palha. É uma doença com ampla variedade de sintomas clínicos e manifestações que representa um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), tem ocorrência estimada em 88 países em 4 continentes, causando aproximadamente 1,6 milhões de novos casos anualmente. Há basicamente duas formas clínicas da leishmaniose (Visceral e Tegumentar), que estão associadas a vários sintomas e gravidade da doença.



Figura 7.1: Manifestação clínica da Leishmaniose Visceral apresentando inchaço do fígado e do baço provocado pelos parasitos (DESJEUX, 2013).

A Leishmaniose visceral (LV) ou calazar (Fig. 7.1) é uma enfermidade crônica,

sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, o paciente pode evoluir a óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2007a). No Brasil em 2011 foram confirmados 3.894 casos de LV com 262 óbitos, sendo a região norte a mais afetada, correspondendo a mais de 47% dos casos (BRASIL, 2012a). As espécies *Leishmania (L) donovani*, *Leishmania (L) chagasi* e *Leishmania (L) infantum*, são as espécies de parasitos relacionados com a doença, mas nas Américas, a espécie que comumente está envolvida na transmissão é a *Leishmania (L) chagasi*. O tratamento tradicional é por quimioterapia baseada nos antimônios pentavalentes que são fármacos tóxicas administradas por via parenteral em doses elevadas, apresentando sérias limitações como a necessidade de hospitalização do paciente (KEDZIERSKI *et al.*, 2009; CHAPPUIS *et al.*, 2007).



Figura 7.2: (A) Lesão ulcerada típica da Leishmaniose Cutânea (LC) localizada, (B) LC disseminada e (C) LC difusa. (D) Lesão infiltrada e ulcerada na mucosa do palato duro decorrente da leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2007b; VELOSO *et al.*, 2006).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não con-

tagiosa, polimórfica que afeta a pele e as mucosas, sendo uma infecção que afeta outros animais onde o homem pode ser envolvido acidentalmente. Comumente a doença se manifesta sob as formas: leishmaniose cutânea (LC) localizada, LC disseminada, LC difusa e leishmaniose mucocutânea (Fig. 7.2) (BRASIL, 2007b; CASTELLANO, 1998). Esta doença é endêmica em 88 países, infectando cerca de 1,1 milhões de pessoas a cada ano em todo mundo (BRASIL, 2007a). No Brasil no ano de 2011 foram identificados 15.731 casos de LTA, sendo novamente a região norte responsável com mais da metade dos casos registrados (BRASIL, 2012b). No País existem sete espécies de *Leishmania* envolvidas na ocorrência de casos de LTA, sendo as mais importantes: *Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (V) guyanensis* e *Leishmania (V) braziliensis*. O seu tratamento também consiste na utilização dos medicamentos antimoniais pentavalentes e da anfotericina B.

7.2 Tratamento da Leishmaniose

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como o estibogluconato de sódio (®Pentostan) e o antimoniato de meglumina (®Glucantime), geralmente são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, devido à rápida eliminação renal do Sb pentavalente e sua baixa acumulação nos tecidos, permitindo a continuação do tratamento após curtos períodos de cura (REY, 2008). No Brasil, o medicamento antimonial de escolha é a ®Glucantime, sendo eficaz ao tratamento das formas de leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea quando administrada de forma adequada (BRASIL, 2007b). No entanto, as baixas dosagens e tratamentos descontínuos levam a falhas na terapia e ao aparecimento de formas resistentes do parasito (RATH *et al.*, 2003).

Apesar dos antimoniais pentavalentes serem bem tolerados, algumas reações colaterais podem ocorrer, como dor no local da injeção, febre, tosse, disfunção gastrintestinal, exantema e mialgias, que o brigam a suspender o tratamento. Doses excessivas causam envenenamento, com lesões neurológicas (polineurite), hepáticas e renais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda tratar os pacientes com 20 mg/kg/dia, por via intra-

muscular ou intravenosa, por um período mínimo de quatro semanas, onde a dose diária não deve exceder 850 mg/dia de Sb^{5+} , equivalente a 10 mL ou 2 ampolas de [®]Glucantime (REY, 2008). Os antimoniais pentavalentes não devem ser administrados em gestantes, pois estes fármacos atravessam a barreira transplacentária e podem impregnar o tecido nervoso do feto, levando a síndromes severas e retardamento mental (BRASIL, 2007b).

Os fármacos de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamindina e mesilato de pentamidina). A anfotericina B (deoxicolato) é um antibiótico poliênico cujo mecanismo de ação é decorrente de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração da permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (SAHA; MUKHERJEE; BHADURI, 1986; OLLIARO; BRYCESON, 1986; URBINA, 1997). No caso de pacientes gestantes com LTA e pacientes com coinfeção *Leishmania*/HIV este fármaco passa a ser a primeira escolha (BRASIL, 2009). A administração é realizada por via intravenosa, gota a gota, com um tempo de perfusão de 3 a 4 horas, podendo ser diário ou três vezes por semana, durante 3 a 12 semanas. Além de avaliação do início do tratamento, os pacientes requerem supervisão constante, o que eleva o custo do tratamento (REY, 2008). Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta, como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio (BERMAN, 2005). Visando diminuir a toxicidade, no final da década de 1990, foi desenvolvido a anfotericina lipossomal uma nova formulação onde a anfotericina B é incorporada a lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol (BRASIL, 2009). As pentamidinas são medicamentos que se destina a tratar os casos que não responderam aos antimoniais e à anfotericina B. Devido à maior toxicidade e menor eficácia, além de requerer administração parenteral, seu uso deve ser limitado a tais pacientes (REY, 2008).

Embora as formulações lipídicas da anfotericina B serem um importante avanço na terapia, o seu elevado custo dificulta a sua utilização (PALUMBO, 2008). Nos últimos anos, a miltefosina (hexadecilfosfocolina, MT) proporcionou o primeiro tratamento oral bem su-

cedido da leishmaniose visceral humana em ensaios de campo, com leves efeitos secundários, mas por tratar-se de um fármaco teratogênico o seu uso é, portanto, estritamente proibido em mulheres grávidas ou que possam engravidar dentro de dois meses de tratamento (CHAP-PUIS *et al.*, 2007; SINDERMANN; ENGEL, 2006; SOTO; SOTO, 2006). Atualmente a MT é licenciada para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral na Alemanha, Colômbia e Índia. Em um estudo piloto, realizado na Índia, envolvendo 249 pacientes infectados com LV, a miltefosina foi administrada oralmente na concentração de 100 – 150 mg/dia, por um período de 28 dias, obtendo cura de ~90% dos pacientes (SUNDAR *et al.*, 2006). Arruda *et al.* (2005) mostraram que o sesquiterpeno nerolidol na concentração de 75 μM inibiu o crescimento, *in vitro*, da *Leishmania (L) chagasi* na fase promastigota em 50% (ARRUDA *et al.*, 2005).

7.3 Agente Etiológico

Os agentes causadores da leishmaniose humana são protozoários da divisão *Kinetoplastea* (ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*) e gênero *Leishmania*. Estes parasitos intracelulares se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos suscetíveis, onde a característica deste gênero é apresentar apenas duas formas evolutivas durante seu ciclo de vida, a forma amastigota e promastigota (Fig. 7.3).

Na forma amastigota, o parasito apresenta pequenas dimensões com o corpo achatado e contorno arredondado, medindo de 3 a 6 μm , não tendo flagelo exteriorizado. Nesta fase o parasito se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (especialmente macrófagos) por divisão binária simples. Com o aumento do número de parasitos e a destruição citoplásmica produzida na célula hospedeira, rompe-se a membrana e os protozoários são liberados no meio intercelular, para serem novamente fagocitados por outros macrófagos ou ingeridos pelos flebotomos ao sugarem os mamíferos infectados (FOCACCIA, 2005; REY, 2008).

No trato digestivo dos flebotomos, as *Leishmania* se desenvolvem passando por

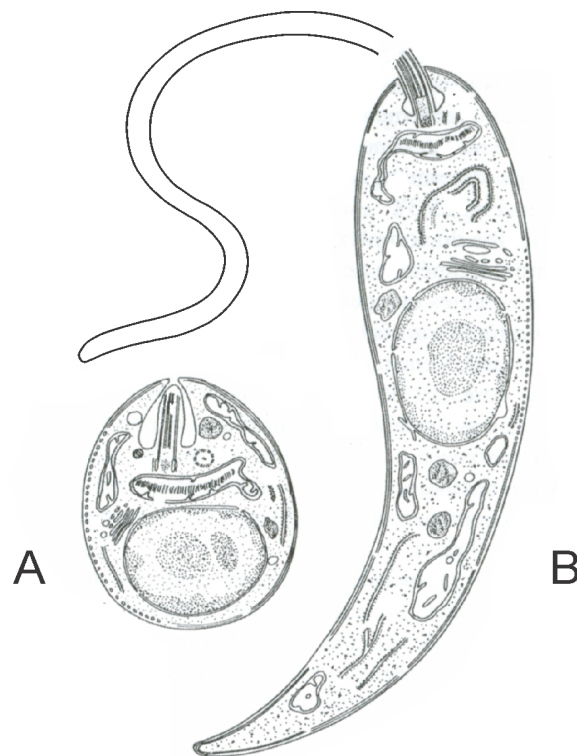


Figura 7.3: Ilustração esquemática das diferentes fases evolutivas de uma *Leishmania*. (A) A forma amastigota, que se desenvolve no vacúolo digestivo de macrófagos. (B) Forma promastigota, que é predominante no intestino de insetos infectados (REY, 2008).

múltiplos estágios até atingirem uma forma flagelada denominada promastigota. Nesta fase o parasito apresenta uma forma com citossomo (corpo celular) longo e achatado, com extremidade anterior mais arredondada e a posterior mais fina. Pode alcançar de 14 a 20 μm de comprimento e apresenta um corpo flexível que pode se movimentar tracionando o comprido flagelo que surge da extremidade anterior (FOCACCIA, 2005; REY, 2008).

As espécies de *Leishmania* possuem uma invaginação na membrana, localizada na região anterior do corpo do parasito formando a bolsa flagelar, onde se localiza o flagelo. Neste local, onde não são encontrados microtúbulos há maior atividade de excreção e de pinocitose. O flagelo que na forma amastigota não se exterioriza para além do corpo do parasito, é formado por nove pares de microtúbulos, dispostos em círculos, mais um par central, mergulhados em uma matriz citoplasmática. Na matriz citoplasmática nota-se a presença do aparelho de Golgi, do retículo endoplasmático, ribossomos, vacúolos e inclusões.

O núcleo pode apresentar varias configurações, mas geralmente contém dois nucléolos e abundante material granuloso forrando a membrana nuclear (REY, 2008; NEVES, 2005; FOCACCIA, 2005).

A membrana celular é unitária e sustentada em sua fase interna por vários microtúbulos, distribuídos paralelamente de um extremo a outro do protozoário. O número de microtúbulos varia entre cada espécie, por exemplo, na *L. donavani* é da ordem de 100 a 120, enquanto que na *L. mexicana* é de 150 a 200 (REY, 2008). Os lipídios predominantes na *Leishmania* são os fosfolipídios, correspondendo a aproximadamente 70% dos lipídios totais (WASSEF; FIORETTI; DWYER, 1985; BEACH; HOLZ; ANEKWE, 1979). Neste grupo se encontram os fosfatidilcolinas (30 a 40%), fosfatidiletanolamina (~10%) e os fosfatidilinositois (~10%) (ZHANG; BEVERLEY, 2010). O restante está dividido entre os lipídios neutros, dos quais aproximadamente 60% correspondem a esteróis, e os glicolipídios que juntamente com as proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GP63) fazem parte dos glicoconjugados de superfície, sendo importantes para o processo de infecção do parasito (YONEYAMA *et al.*, 2006).

Leishmania diferem nos padrões de desenvolvimento em hospedeiros invertebrados naturais, permitindo a divisão do gênero em dois grupos: o subgênero *Viannia*, distribuídas apenas no Novo Mundo (continente americano), e o subgênero *Leishmania*, localizadas tanto no Novo quanto no Velho Mundo (continentes europeu, africano, asiático e ilhas adjacentes). A diferença entre várias espécies dentro de um subgênero inclui a morfologia na microscopia ótica e eletrônica, o comportamento nos hospedeiros, a identificação tanto por anticorpos monoclonais como por isoenzimas e a análise de DNA (BEACH; HOLZ; ANEKWE, 1979). A espécie utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi a *Leishmania (L) amazonensis*, que apresenta uma ampla distribuição, sendo peculiar à Bacia Amazônica, mas encontrada nas Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e também apresenta ocorrência na Bolívia, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana Francesa e Suriname (FOCACCIA, 2005; REY, 2008). Esta espécie está relacionada com a formação de

lesões cutâneas (Fig. 7.3B) em pequeno número, que em algumas vezes se curam espontaneamente, mas também pode apresentar formas clínicas mais graves (cutâneo-difusa), de longa evolução, com lesões cutâneas bastantes destrutivas e de difícil manejo terapêutico.

7.3.1 Ciclo evolutivo

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida bem complexo, envolvendo varias forma de desenvolvimento para se adaptar as diversas condições ambientais encontradas dentro do inseto vetor e do hospedeiro vertebrado. O inseto responsável pela transmissão da doença e a fêmea do flebotomíneo hematófago que pode ser do gênero *Lutzomyia*, exclusivo das Américas, ou *Phlebotomus* de outros continentes (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012). Já o hospedeiro vertebrado atua como um reservatório, podendo ser roedores, canídeos, marsupiais e humanos que participam do ciclo de transmissão como um hospedeiro acidental quando entra em ambiente de alta transmissão, onde a doença se mantém em função dos reservatórios naturais (BRASIL, 2007b).

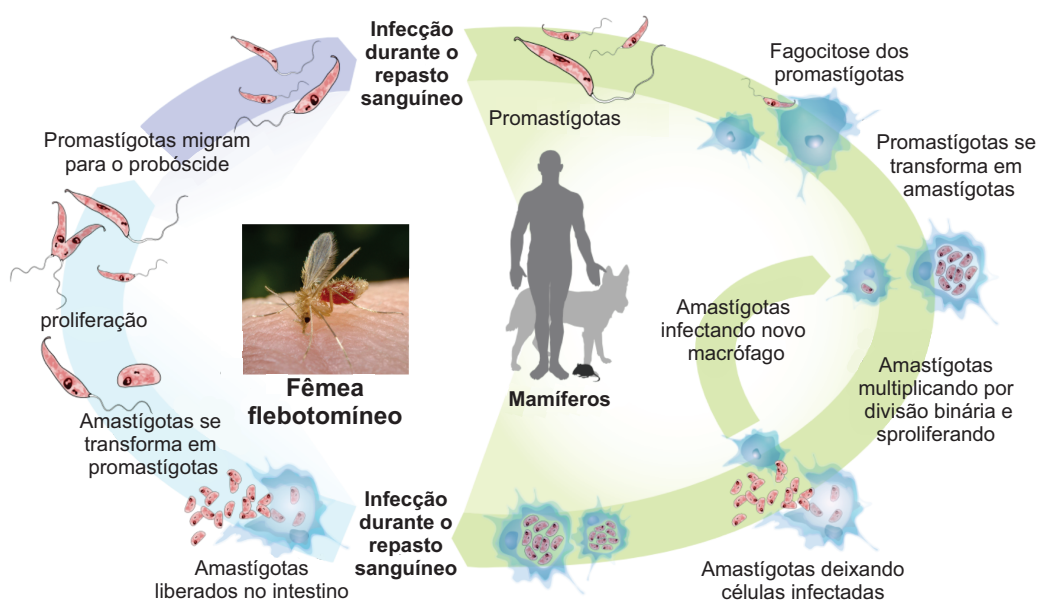


Figura 7.4: Representação do ciclo biológico do gênero *Leishmania* (adaptado de Weingartner, 2011 (WEINGÄRTNER, 2011)).

No vetor infectado pela *Leishmania*, o crescimento dos flagelos provoca o bloqueio do proventrículo, impedindo que o inseto se alimente normalmente, obrigando-o a regurgitar, junto com o sangue aspirado, as promastígotas metacíclicas na pele do hospedeiro. A saliva do inseto também auxilia na proliferação do protozoário, pois apresenta neuropeptídeos vasodilatadores que facilitam a alimentação do inseto e, ao mesmo tempo, suprime a resposta imune do hospedeiro (REY, 2008; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012). O parasito não consegue penetrar ativamente e fica dependente da ação fagocítica das células, principalmente através de interações entre receptores celulares do hospedeiro (CR1, CR3, manose-fucose) e moléculas de superfície do micro-organismo, principalmente os lipofosfolípidos (LPG) e a protease de superfície (GP63). Através destes receptores, o parasito se liga aos macrófagos, sendo fagocitado, porém, é retardada a ação do mecanismo microbicida dos macrófagos, permitindo a adaptação da *Leishmania* ao meio (CASTELLANO, 1998; NEVES, 2005).

Após o parasito estar internalizado no macrófago, se estabelecendo no vacúolo parasitóforo (fagolisossoma) que o separa do citoplasma celular, a forma promastigota se transforma rapidamente em amastigota. Esta nova forma do parasito mostra uma alta atividade enzimática que degrada metabólitos oxidativos tóxicos do macrófago e também é altamente adaptável ao pH ácido do fagolisossoma (NETO *et al.*, 2008). Assim, as amastigotas sobrevivem e se multiplicam no interior dos vacúolos fagocíticos ao ponto de romper a célula assim infectando mais células (Fig. 7.4).

As células infectadas ou as formas amastigotas livres podem ser ingeridas por um flebotomíneo, não infectado, durante o repasto sanguíneo. No tubo digestivo desse inseto a forma amastigota junto ao bolo alimentar, passa rapidamente para promastigota multiplicando-se ativamente. No intestino dos flebotomíneos são encontradas diversas formas do parasito variando da amastigota, passando pelas esferomastigotas, depois por organismos piriformes ou fusiformes, e até mesmo é identificada a forma paramastigota, que no subgênero *Leishmania* é frequentemente observada presa ao epitélio do intestino anterior de

flebotomíneos com infecção exuberante. Apesar da variedade, a forma promastigota ocorre predominante no intestino do inseto, pois é nessa fase que ocorre intensa atividade multiplicadora. Em número aumentado, os parasitos invadem as porções anteriores do estômago e do proventrículo do inseto, onde a multiplicação parasitária pode provocar uma obstrução mecânica ou dificultar a ingestão de sangue do hospedeiro invertebrado. Assim, após cada esforço para ingerir o sangue, os músculos encarregados da sucção relaxam e causam a regurgitação do material aspirado junto com muitos flagelos, assegurando a inoculação das formas infectantes em um novo hospedeiro vertebrado (REY, 2008).

7.3.2 Terpenos

Os terpenos são componentes de óleos essenciais de plantas, constituídos basicamente de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. A sua estrutura química consiste de grupos isoprenos (C_5H_8) repetidos, sendo classificada de acordo com o número destes grupos (WILLIAMS; BARRY, 2004). Os mais comuns são os monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), mas também existem os hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e os tetraterpenos (C_{40}) (BAKKALI *et al.*, 2008). Por possuírem uma baixa toxicidade, geralmente são utilizados como facilitadores de permeação percutânea, sendo frequentemente empregados para aumentar a permeação de fármacos antiinflamatórios não-esteroides (CAL; JANICKI; SZNITOWSKA, 2001). Uma quantidade considerável de monoterpenos vem demonstrando atividades anticâncer, sendo eficazes para a quimioprevenção e quimioterapia do câncer (CROWELL, 2009; RABI; BISHAYEE, 2009; THOPPIL; BISHAYEE, 2011; BARDON *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2012; YANG; DOU, 2010). Os monoterpenos linalol, carvacrol, gireaniol e terpinen-4-ol têm mostrado atividades leishmanicida na fase promastigota (ROSA *et al.*, 2010; MORALES *et al.*, 2009), juntamente com o sesquiterpeno nerolidol e os ácidos diterpenos derivados do óleo da copaíba. Além disso, os sesquiterpenos farnesol e nerolidol foram relatados por apresentarem atividades antimalária (GOULART *et al.*, 2009).

Neste trabalho foram estudados quatro terpenos (Fig. 7.5). A seguir é dada uma

descrição de cada um deles.

- **Cineol** é um receptor de hidrogênio sendo um monoterpeneo cíclico do tipo éter, obtido do óleo essencial da folha do *Eucalyptus globulus* ou de outras espécies de eucalipto (MORIMOTO *et al.*, 2002). Dados obtidos por DSC (do inglês “differential scanning calorimetry”) mostraram que o 1,8-cineol aumenta a permeação da zidovudina (AZT, primeiro fármaco anti-HIV), modificando a estrutura lipídica do estrato córneo (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2005, 2004). Narishetty e co-autores (2005) mostraram que o L-mentol e o 1,8-cineol quando aplicado a 5% (peso/volume), e usando uma solução de 66,6% de etanol como veículo, pode aumentar consideravelmente os níveis de permeação da zidovudina através da pele de ratos (menos permeável do que a humana) atingindo níveis terapêuticos de permeação (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2005).
- **Limoneno** é um monoterpeneo hidrocarboneto lipofílico, obtido da casca do limão, *Citrus limon* (CROWELL, 2009; NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004). Este composto que não forma ligações de hidrogênio, por ser constituído exclusivamente de átomos de carbono e hidrogênio. Zhao e Singh (2007) estudaram a combinação dos terpenos limoneno, eugenol, e mentone a uma concentração de 5% em combinação com 50% de propileno glicol (PG), verificando que os três aumentam a permeação da tamoxifena em epiderme de porco, porém, o limoneno foi o que apresentou o maior aumento. O limoneno é um potente aumentador de permeação de moléculas lipofílicas e compostos anfifílicos, mas é pouco efetivo para compostos hidrofílicos, como o manitol (ZHAO; SINGH, 1998). Estudos também mostram que o limoneno administrado puro ou em óleo de casca de laranja (contendo 95% de D-limoneno), inibiu o desenvolvimento de câncer de mama, pele, fígado, pulmão e estômago, induzidos quimicamente em roedores (CROWELL, 2009; MALTZMAN *et al.*, 1989; DIETRICH; SWENBERG, 1991; ELEGBEDE *et al.*, 1986; WATTENBERG; SPARNINS; BARANY, 1988).

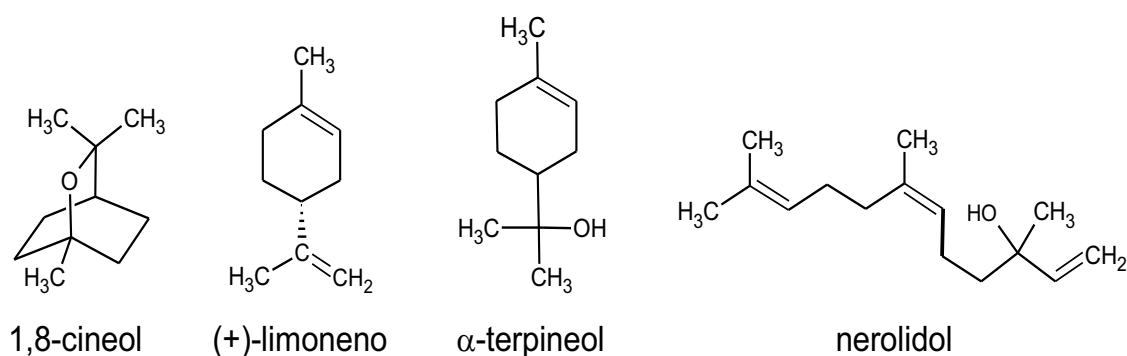


Figura 7.5: Estrutura química dos terpenos utilizados neste trabalho.

- **Terpineol** é um monoterpene alcoólico isolado do óleo de pinho (CAMARGOS *et al.*, 2010; ROTTAVA *et al.*, 2010). É um doador de hidrogênio que apresenta baixa toxicidade, sendo bastante utilizado pela indústria de perfumaria. O terpineol tem sido identificado como eficiente facilitador da permeação de moléculas hidrofílicas e seus mecanismos de ação estão relacionados com a ruptura das ligações de hidrogênio entre os grupos das cabeças polares (VADDI *et al.*, 2002). Estudos realizados com os terpenos citral, eugenol, nerolidol e α -terpineol, mostraram que eles possuem atividades antifúngicas, inibindo o crescimento de hifas *Trichophyton mentagrophytes* (PARK *et al.*, 2009).
- **Nerolidol** é um sesquiterpene presente nos óleos essenciais de muitas plantas, aprovado pelo FDA (do inglês “Food and Drug Administration”) dos EUA como um agente aromatizante de alimentos. Estudos utilizando a difração de raios-X a baixo ângulo indicaram que o D-limoneno, 1,8-cineol e nerolidol perturbam a bicamada lipídica do estrato córneo humano (CORNWELL *et al.*, 1996). Também têm sido observado que o nerolidol apresenta atividade contra malária e *Leishmania* (CASTELLANO, 1998; LOPES *et al.*, 1999).

Os facilitadores de permeação geralmente têm as suas ações na bicamada lipídica envolvendo interações tanto nos grupos das cabeças polares dos lipídios quanto nas cadeias

hidrofóbicas da camada (Fig. 7.6) (WILLIAMS; BARRY, 2004). Esta ação pode ocorrer através de rompimento da estrutura lipídica altamente ordenada, aumento da solubilidade do permeante ou aumento da partição do fármaco no estrato córneo. Em trabalhos anteriores foram estudados, através da espectroscopia de RPE, os mecanismos pelos quais vários monoterpenos aumentam a permeação da água e outras moléculas através da pele, onde ficou demonstrado que são potentes aumentadores da dinâmica molecular (ANJOS, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2010; ANJOS; NETO; ALONSO, 2007, 2007). Também foi mostrado que vários monoterpenos e o sesquiterpeno nerolidol causam grandes aumentos de fluidez em membranas de eritrócitos e fibroblastos (MENDANHA *et al.*, 2013). Neste mesmo trabalho também foram estudados os efeitos de toxicidade destes terpenos e foi observado que os terpenos α -terpineol e nerolidol foram os mais citotóxicos aos fibroblastos e também apresentaram maior potencial hemolítico, enquanto o 1,8-cineol mostrou o menor grau de citotoxicidade e menor efeito hemolítico (MENDANHA *et al.*, 2013). Além de apresentarem baixa toxicidade, os terpenos têm sido muito utilizados, recentemente, como facilitadores de permeação de vários fármacos na pele. Como exemplo, o L-mentol tem sido utilizado para facilitar a permeação *in vitro* do cloridrato de morfina (MORIMOTO *et al.*, 2002), do cloridrato de imipramina (JAIN; THOMAS; PANCHAGNULA, 2002) e de hidrocortisona (EL-KATTAN; ASBILL; MICHNIAK, 2000) através da pele de rato sem pelos. Estudos mostram que monoterpenos como o L-mentol (ANJOS; NETO; ALONSO, 2007) e 1,8-cineol (ANJOS; NETO; ALONSO, 2007) aumentam a fluidez e o coeficiente de partição de pequenos marcadores de spin solúveis em água em membranas intercelulares de estrato córneo de rato recém-nascido (ANJOS, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2010).

Uma série de monoterpenos da dieta humana tem demonstrado atividade antitumoral e eficácia na prevenção e quimioterapia do câncer (GOULD, 1997; CROWELL, 1999; BARDON *et al.*, 2002; RABI; BISHAYEE, 2009; YANG; DOU, 2010; THOPPIL; BISHAYEE, 2011; WU *et al.*, 2012). Além disso, os óleos essenciais ou os seus terpenos também demonstraram atividade antiviral, antialérgica e antiinflamatória, antiparasitária,

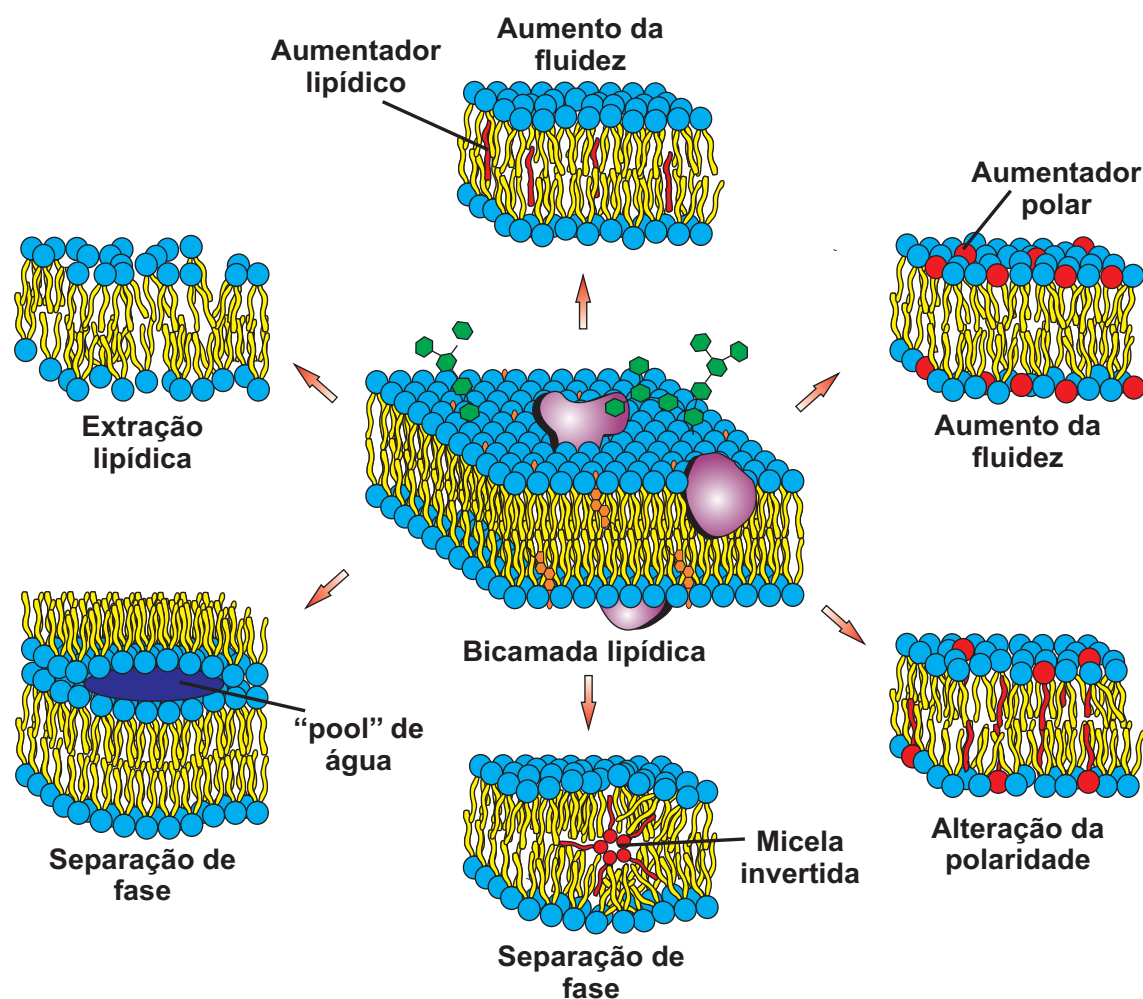


Figura 7.6: Ilustração dos mecanismos de ação dos facilitadores de permeação nos domínios lipídicos (WILLIAMS; BARRY, 2004).

antifúngica e antibacteriana (THOPPIL; BISHAYEE, 2011; WU *et al.*, 2012). O monoterpeneo terpinen-4-ol demonstrou atividade antifúngica (OLIVA *et al.*, 2003) e o monoterpeneo limoneno (CAMARGOS; ALONSO, 2003), bem como o sesquiterpeneo nerolidol (ARRUDA *et al.*, 2005) foram relatados com atividade leishmanicida. Estudos recentes mostraram que ácidos diterpenos derivados do óleo de copaíba apresentam atividade leishmanicida (SANTOS *et al.*, 2013). Uma mistura composta por terpinen-4-ol, α -terpineol, 1,8-cineol e linalool mostrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, isoladas da cavidade oral, pele e trato respiratório (PADUCH *et al.*, 2007).

Tem sido verificado em teste *in vitro*, que macrófagos infectados com *Leishmania*

(*L. amazonensis*), após um tratamento utilizando 100 μM de nerolidol resultou em uma redução de 95% na taxa de infecção. Nesse mesmo trabalho, um grupo de ratos, infectados com esta espécie de *Leishmania*, recebeu injeções diárias de nerolidol (100 mg/kg por dia, durante 12 dias, e num segundo grupo foi administrado diariamente sobre a lesão uma pomada com 5% de nerolidol. Em ambos os grupos foi constatada uma redução significativa na evolução das lesões, sem ser detectado algum efeito tóxico (ARRUDA *et al.*, 2005). Santos *et al.* (2013) mostraram que ácidos diterpenos extraídos do óleo de copaíba, ácidos hidroxil copálico e kaurenico, possuem atividade contra a *Leishmania (L) amazonensis* tanto na forma promastigota como amastigota axênica, com uma concentração inibidora de 50% (IC_{50}) de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 4,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2013).

A espectroscopia de RPE tem se mostrado como uma técnica importante para estudar a interação de compostos com membranas modelo e celular. Usando marcadores de spin derivados do ácido esteárico com o radical nitróxido inserido em diferentes posições da cadeia graxa, foi observado que o fármaco leishmanicida miltefosina essencialmente não modifica a dinâmica molecular de membranas modelos de DPPC e de lipídios extraídos do estrato córneo (camada mais externa da pele) de ratos Wistar recém nascidos, quando aplicada na concentração molar de até 25% e realizada rigorosa extrusão (ALONSO *et al.*, 2012). Entretanto, quando os marcadores foram inseridos diretamente no tecido intacto do estrato córneo, a miltefosina provocou drásticos aumentos de fluidez das membranas intercelulares, as quais são consideradas como controladoras da barreira física da pele (ALONSO *et al.*, 2012). Em membranas de eritrócitos e seus DRMs (membranas resistentes aos detergentes) também foram observados fortes aumentos de fluidez (MOREIRA *et al.*, 2014). Neste estudo foi também utilizado um marcador de spin que se liga covalentemente nos grupos tióis livres das proteínas para mostrar que a miltefosina causa um grande aumento na dinâmica das proteínas de membrana do eritrócito e de seus DRMs (MOREIRA *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi demonstrado que os mesmos efeitos da miltefosina em membrana de eritrócito ocorrem também em membrana de *Leishmania (L) amazonensis* na fase promastigota

(MOREIRA *et al.*, 2014). Neste trabalho foi utilizado um método de rápida incorporação da miltefosina nas membranas de *Leishmania* para mostrar que as concentrações que alteram membrana são similares aquelas que causam citotoxicidade (MOREIRA *et al.*, 2014).

7.3.3 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi utilizar a espectroscopia de RPE associada à técnica de marcadores de spin, para investigar os mecanismos de ação dos terpenos sobre a proteína e matriz lipídica da membrana da *Leishmania (L) amazonensis*. Os terpenos escolhidos foram os monoterpenos 1,8-cineol (éter, receptor de hidrogênio), o (+)-limoneno (hidrocarboneto, não participa de ligação de hidrogênio), o α -terpineol (álcool, doador de hidrogênio) e o sesquiterpeno nerolidol (álcool, doador de hidrogênio). Com isto, espera-se identificar o terpeno de maior efeito sobre a membrana, para assim propor um modelo de ação dos terpenos contra a *Leishmania*. Para isso foi utilizado um marcador de spin lipídico da membrana da *Leishmania*, o 5- doxil ácido esteárico (5-DSA), e um marcador de spin para o componente protéico da membrana, o 4-maleimido-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperina (6-MSL). Este último marcador se liga covalentemente aos grupos sulfidrilas livres das proteínas da membrana. Em paralelo, foram realizados experimentos usuais para avaliar a citotoxicidade dos terpenos a fim de comparar as concentrações de atividade citotóxicas com aquelas que levam a uma alteração na membrana. Para dar mais evidências de que os mecanismos da ação citotóxica dos terpenos em *Leishmania* é predominantemente a alteração na membrana, nós desenvolvemos um método de incorporação rápida dos terpenos nas membranas dos parasitos e pudemos verificar que os efeitos podem ser observados com tempo de incubação de apenas 5 minutos.

Capítulo 8

Materiais e Métodos

8.1 Materiais

Os marcadores de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA) e 4-maleimido-1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperina (6-MSL) (Fig. 8.1) foram comprados da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) e os terpenos foram adquiridos da Acros Organics (Geel, Bélgica) (Fig. 7.5). Todos os outros produtos químicos utilizados foram do maior grau de pureza disponível e os tampões foram preparados com água milli-Q. A cepa de *Leishmania (L) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) cedidas pelo Prof. Dr. Milton Adriano Pelli Oliveira (Leishbank-Banco Imunobiológico das Leishmanioses da Região Centro-Oeste) na forma promastigota, foi cultivada e preparada no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP/UFG). Após o descongelamento os parasitos foram cultivados em placas de microtitulação de 24 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) contendo meio Grace completo (Grace's Insect Medium, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) com 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). A cultura foi mantida em estufa a 26°C para crescimento dos parasitos (OLIVEIRA *et al.*, 2010), sendo depois centrifugados por três vezes a 5.000 \times g a 10°C por 15 minutos e ressuspensos em meio de cultura suplementado com 10% de SFB.

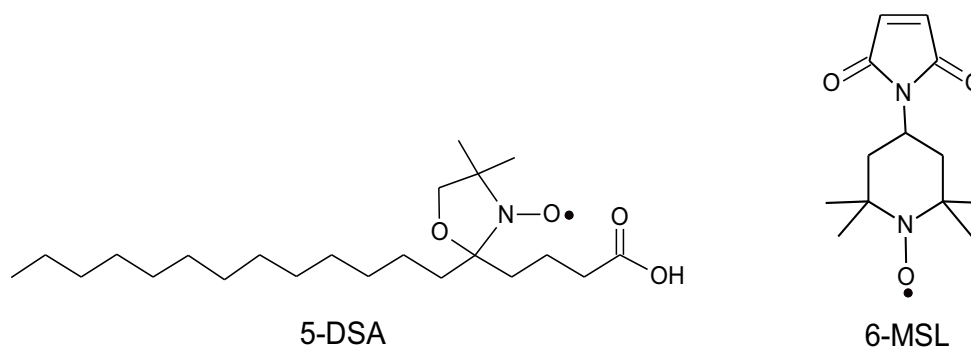


Figura 8.1: Estrutura química dos marcadores de spin utilizados neste trabalho.

8.2 Tratamento e Marcação das cepas de *Leishmania* com terpenos

As cepas de *Leishmania (L) amazonensis* na forma promastigotas, inicialmente em meio de cultura a 26°C suplementado com 10% de SFB, foram centrifugadas duas vezes a $5.000\times g$ a 10°C por 10 minutos e ressuspensas em tampão PBS, acertando a concentração final de células para $2,0\times 10^9$ parasitos/mL. No fundo do tubo de ensaio, inicialmente foi colocado 2,0 μL do marcador 5-DSA dissolvido em etanol (4 mg/mL) como feito em trabalhos anteriores (MOREIRA *et al.*, 2014). Após a evaporação do solvente orgânico, foram introduzidos 50 μL da suspensão de *Leishmania* contendo 10^8 células em PBS e agitada moderadamente por 2 min (este processo assegura a incorporação do 5-DSA nas membranas de *Leishmania*). A seguir foram adicionados os terpenos dissolvidos em etanol a 33% (v/v) sobre as células de *Leishmania* (o percentual máximo de etanol utilizado nas amostras foi de 4% e esta quantidade não alterou o sinal de RPE do 5-DSA em relação às amostras controle sem etanol) e a amostra foi novamente agitada. As concentrações de terpeno utilizadas nos experimentos de RPE foram de 0,12 - $14,5\times 10^9$ terpenos/célula (para concentrações superiores a $2,4\times 10^9$ terpenos/célula, os terpenos foram aplicados sem diluição em etanol). As amostras controle foram preparadas sem a adição dos terpenos e sem 4% de etanol. Após a marcação e tratamento, as amostras foram transferidas para tubos capilares com 1,0 mm de

diâmetro que depois de selados com chama, foram levados para a realização das medidas de RPE. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes e os resultados foram expressos em termos de médias e desvios-padrões.

8.3 Marcação de proteínas da membrana plasmática de *Leishmania*

Em uma amostra com 100 μL de *Leishmania* contendo $2,0 \times 10^9$ parasitos/mL em meio suplementado com 10% de SFB foi adicionada uma alíquota de 1,0 μL do marcador 6-MSL dissolvido em etanol a 5,0 mg/mL. Para garantir a reação do marcador de spin com os grupos sulfidrila da membrana, a amostra foi incubada por 2 horas a 26°C. Para extrair os marcadores que não reagiram, a suspensão de *Leishmania* foi centrifugada a $5000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C e ressuspensa em PBS, sendo este procedimento repedido 8 vezes. Após o termino da extração dos marcadores livres, os terpenos foram inseridos nas concentrações de $2,4 \times 10^9$ (7,9 mM), $3,6 \times 10^9$ (12,0 mM) e $4,8 \times 10^9$ (15,9 mM) terpenos/célula, diluídos em etanol na razão terpeno:etanol 1:2, e as amostras ficaram 30 minutos incubando à 26°C antes de serem inseridas nos tubos capilares para a realização das medidas de RPE. Depois das medidas de RPE as amostras de *Leishmania* foram centrifugadas no mesmo capilar e uma pequena alíquota do sobrenadante foi retirada e transferida para outro capilar, que foi selado novamente e realizada nova medida de RPE. Para a concentração de $2,4 \times 10^9$ terpenos/célula foram realizados três experimentos independentes, mas para as outras duas concentrações, como os resultados foram semelhantes, foi realizado um único experimento.

8.4 Citotoxicidade dos terpenos

O IC_{50} (metade da concentração máxima inibitória) de cada terpeno foi determinado através de um ensaio que utiliza o MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (Sigma), um sal de coloração amarela solúvel em água, conforme descrito previamente (OLIVEIRA *et al.*, 2010). O MTT é reduzido por uma enzima mitocondrial, formando

cristais de formazan que se acumulam no citoplasma do parasito e pode ser medido espectrofotometricamente. Para a realização dos experimentos foi inicialmente preparada uma suspensão estoque de 10^9 parasitos/mL, de onde foi retirada uma alíquota de $10\ \mu\text{L}$ e introduzida em um dos 96 poços de uma placa de cultura (Corning Life Sciences, Corning, EUA), juntamente com $90\ \mu\text{L}$ de terpenos diluídos em meio grace suplementado com 10% SFB para obter volume final de $100\ \mu\text{L}$. Os terpenos foram diluídos em oito diferentes concentrações variando de $8,2 \times 10^{10}$ terpenos/célula (13,6 mM) a $0,015 \times 10^{10}$ terpenos/célula (0,027 mM), inicialmente diluídos em etanol a 33% (v/v). Neste teste, o volume máximo de etanol no meio foi de menos de 1%, não causando toxicidade detectável ao parasito. Duas amostras controles foram preparadas, uma contendo o parasito no meio de cultura sem ser tratado com os terpenos e a outra com apenas o meio e sem a presença do parasito. A placa de cultura contendo todas as amostras de $100\ \mu\text{L}$ foi incubada por 24 h, no escuro e a 26°C , e depois foi colocado em cada poço $20\ \mu\text{L}$ de uma solução a $5\ \text{mg/mL}$ de MTT diluído em PBS. A placa foi coberta com papel alumínio, evitando a exposição à luz e incubada por 4 horas à 26°C . Depois deste processo as células foram lisadas, e os cristais de formazan solubilizados, primeiro pela adição de $100\ \mu\text{L}$ de uma solução de dodecil sulfato de sódio (10% SDS em 50% de dimetilformamida) em cada poço, e depois pela incubação das amostras por mais 18 h a 37°C . Com o término da incubação, a placa foi agitada e a absorbância correspondente de cada poço foi medida a $550\ \text{nm}$ no espectrofotômetro T80+ de PG Instruments (Wibtoft, Inglaterra). A absorbância média das células de controle, não tratadas com terpenos, foi considerada como 100% e a amostra composta somente do meio de cultura foi utilizada para realizar a leitura em branco (MOSMANN, 1983; MOREIRA *et al.*, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como média e desvio-padrão. A concentração inibidora 50% (IC_{50}) foi determinada a partir do ajuste sigmoidal (função Boltzmann) da curva de concentração-resposta utilizando o programa [®]Origin 8.0. Para algumas experiências, a atividade antiproliferativa dos terpenos foram determinadas pela adição de MTT depois de outros períodos de incubação (5 minutos e 48 horas).

Para realizar experimentos com rápida incorporação dos terpenos uma suspensão de parasitos em meio de cultura suplementado com 10% SFB foi inicialmente centrifugada duas vezes a $5000\times g$ a 10°C por 10 minutos e ressuspensa em tampão PBS. Após este processo uma suspensão estoque foi preparada com $2,0\times 10^9$ parasito/mL em PBS, de onde foi retirada uma alíquota de $50\ \mu\text{L}$ para cada amostra e colocada em um tubo eppendorff. O terpeno diluído em etanol foi adicionado sobre a suspensão de *Leishmania* em PBS de modo similar ao realizado nos experimentos de RPE (seção 3.2). A concentração máxima de etanol foi de 4% (v/v) e esta quantidade também foi adicionada em uma das amostras controle. Cada amostra foi incubada por apenas 5 min e durante esse período foi realizada uma agitação moderada. Foram utilizadas sete concentrações de terpenos variando de $7,2\times 10^{10}$ terpenos/célula (239,2 mM) a $0,018\times 10^{10}$ terpenos/célula (0,598 mM). Após a incubação de 5 min na temperatura ambiente, $350\ \mu\text{L}$ do meio grace suplementado com 10% SFB foram adicionados em conjunto com $80\ \mu\text{L}$ de MTT e a solução final dividida em quatro poços da microplaca ($100\ \mu\text{L}$ cada) que após ser envolvida em papel alumínio foi incubada por 4 horas a 26°C ; a seguir foi acrescentado em cada poço $100\ \mu\text{L}$ de SDS e levada novamente a estufa por 18 h a 37°C . No final, as amostras foram novamente agitadas e a absorbância correspondente de cada poço foi medida a 550 nm. Novamente, cada ensaio foi realizado com três repetições e o valor do IC_{50} foi determinado a partir do ajuste sigmoidal das médias. Três experimentos independentes permitiram os cálculos das médias e desvios-padrões.

8.5 Quantificação da lise celular produzida em *Leishmania* pela ação dos terpenos

O conteúdo de proteínas presente no sobrenadante, após o preparo das amostras, foi utilizado para avaliar a fração de lise celular produzida pelos terpenos ao interagirem com a membrana de *Leishmania*. Nos testes, foi usado um kit baseado na reação do ácido bicinconínico (BCA) (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) que é mais tolerante a agentes desnaturantes como ureia, e detergente iônico e não iônicos como NP-40, Triton X-100. A base

do teste esta na reação da proteína com o Cu^{2+} , que reduz para Cu^{1+} , sendo proporcional à concentração de proteínas na solução. Duas moléculas de BCA reagem com um íon de Cu^{1+} , resultando em uma mudança de cor da amostra para roxo, que absorve em 562 nm. Uma suspensão de parasitos, em meio de cultura suplementado com 10% SFB, foi inicialmente centrifugada duas vezes a $5000\times g$ a $10^{\circ}C$ por 10 minutos e ressuspensa em tampão PBS na concentração de $2,0\times 10^9$ parasito/mL. Desta suspensão estoque foi retirada uma alíquota de 50 μL para cada amostra e colocada em um tubo eppendorff, onde foi adicionado o terpeno diluído em etanol de forma similar ao realizado nos experimentos descritos na seção 3.2. Após 5 minutos de incubação as amostras foram novamente centrifugadas a $25.000\times g$ a temperatura ambiente por 15 minutos e uma pequena alíquota do sobrenadante foi retirada e adicionada a uma solução de reagente de BCA. A solução final foi incubada durante 30 min a $37^{\circ}C$, sendo sua absorbância medida a 562 nm. Uma amostra foi preparada sem ser tratada como os terpenos, considerada como 0% de lise para subtrair a pequena fração de lise provocada pelos procedimentos empregados. Outra amostra controle foi tratada somente com 10% de etanol e a amostra com 100% de lise foi obtida com a incorporação de 2% do detergente Triton X-100.

8.6 Medidas e simulação dos Espectros de RPE

Todas as medidas deste trabalho foram feitas com um espectrômetro de RPE da marca BRUKER, modelo ESP 300, com cavidade ressonante ER 4102 ST, operando em banda X ($\sim 9,4$ GHz). As condições de operação foram: potência de microondas de 2 mW, frequência de modulação de 100 kHz, amplitude de modulação de 1,0 G, varredura de campo magnético de 100 G; tempo de varredura de 168 segundos e constante de tempo de detecção, 41 ms.

Os espectros RPE foram simulados utilizando o programa *Nonlinear Least-Squares* (NLLS), desenvolvido por Jack H. Freed e colaboradores (SCHNEIDER; FREED, 1989; BUDIL *et al.*, 1996). O programa permite simular um único espectro contendo duas compo-

mentes espectrais com diferentes mobilidades e parâmetros de tensores magnéticos. Além de possibilitar a determinação das populações relativas das componentes espectrais também determina as constantes de difusão rotacional associadas aos marcadores de spin na membrana ou na proteína. O programa NLLS gera a taxa de difusão rotacional média, R_{bar} , com base na relação $R_{bar} = \log \bar{R}$ em que $\bar{R} = (R_{per}^2 \cdot R_{par})^{1/3}$ onde R_{per} e R_{par} são, respectivamente, as componentes perpendicular e paralela da difusão rotacional. R_{bar} foi convertida para o parâmetro tempo de correlação rotacional, τ_c , através da relação $\tau_c = 1/6\bar{R}$ (BUDIL *et al.*, 1996; SALMON *et al.*, 2007). Semelhantemente a estudos anteriores (ALONSO *et al.*, 2001; ALONSO; SILVA; TABAK, 2003; QUEIRÓS; NETO; ALONSO, 2005; COUTO, 2003), inicialmente foi feita uma análise geral dos espectros obtidos neste trabalho para determinar os valores de entrada dos principais tensores magnéticos para duas componentes espectrais (Tabela 8.1) e uma vez determinados estes valores foram mantidos em todas as simulações do experimento. Os tensores magnéticos \overleftarrow{g} (fator g) e \overleftrightarrow{A} (interação hiperfina) são definidos em um sistema de referência fixo na molécula.

Tabela 8.1: Principais componentes dos tensores magnéticos \mathbf{g} (fator g) e \mathbf{A} (interação hiperfina) usados no programa NLLS (Nonlinear Least-Squares)

Parâmetro	5-DSA		6-MSL	
	Componente 1	Componente 2	Componente S	Componente W
g_{xx}	2,0078	2,0078	2,0090	2,0082
g_{yy}	2,0058	2,0058	2,0060	2,0060
g_{zz}	2,0028	2,0028	2,0026	2,0026
$A_{xx}(\text{G})$	6,6	5,5	6,3	6,5
$A_{yy}(\text{G})$	7,0	5,5	6,3	6,5
$A_{zz}(\text{G})$	31,5	30,8	36,4	35,0
$a_0(\text{G})^a$	15,0	13,9	16,3	16

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

8.7 Análise estatística

Todos os dados apresentados neste trabalho estão expressos como a média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Utilizando o programa [®]Origin 8.0, os dados foram comparados através de uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para diferenças estatisticamente significativas em $P < 0,05$.

Capítulo 9

Resultados

Neste capítulo serão apresentados os espectros de RPE dos marcadores de spin 5-DSA e 6-MSL em membranas de *Leishmania (L) amazonensis* e serão analisadas as alterações causadas pelos quatro terpenos estudados. Os parâmetros espectrais foram obtidos pela análise dos espectros através da simulação do perfil de linha, o que permitiu constatar que os terpenos são capazes de provocar grandes alterações na fluidez da membrana da *Leishmania*, mas os efeitos são predominantemente sobre o componente lipídico da membrana, exercendo pouca influência sobre as proteínas de membrana do parasito. Os resultados de RPE e dos testes de citotoxicidade foram comparados e verificada uma correlação.

9.1 Espectros de RPE do 5-DSA em membrana de *Leishmania*.

Os espectros de RPE do marcador 5-DSA incorporados na membrana de *Leishmania (L) amazonensis* não tratada e tratada com os terpenos, em duas concentrações, estão mostrados na Fig. 9.1. Os espectros das amostras tratadas com os terpenos são caracterizados pela presença de duas componentes espectrais resolvidas, associadas a duas populações de marcadores de spin em diferentes estados de mobilidade. Os ajustes dos espectros para um modelo de dois estados permitiu determinar a população relativa e parâmetro de movimento de cada componente espectral. Em cada espectro foi indicado o valor médio do parâmetro

de movimento tempo de correlação rotacional, τ_c , determinado através da equação:

$$\tau_c = f_1 * \tau_{c1} + f_2 * \tau_{c2}, \quad (9.1)$$

onde os parâmetros f_1 e f_2 representam as frações relativas dos marcadores de spin nas

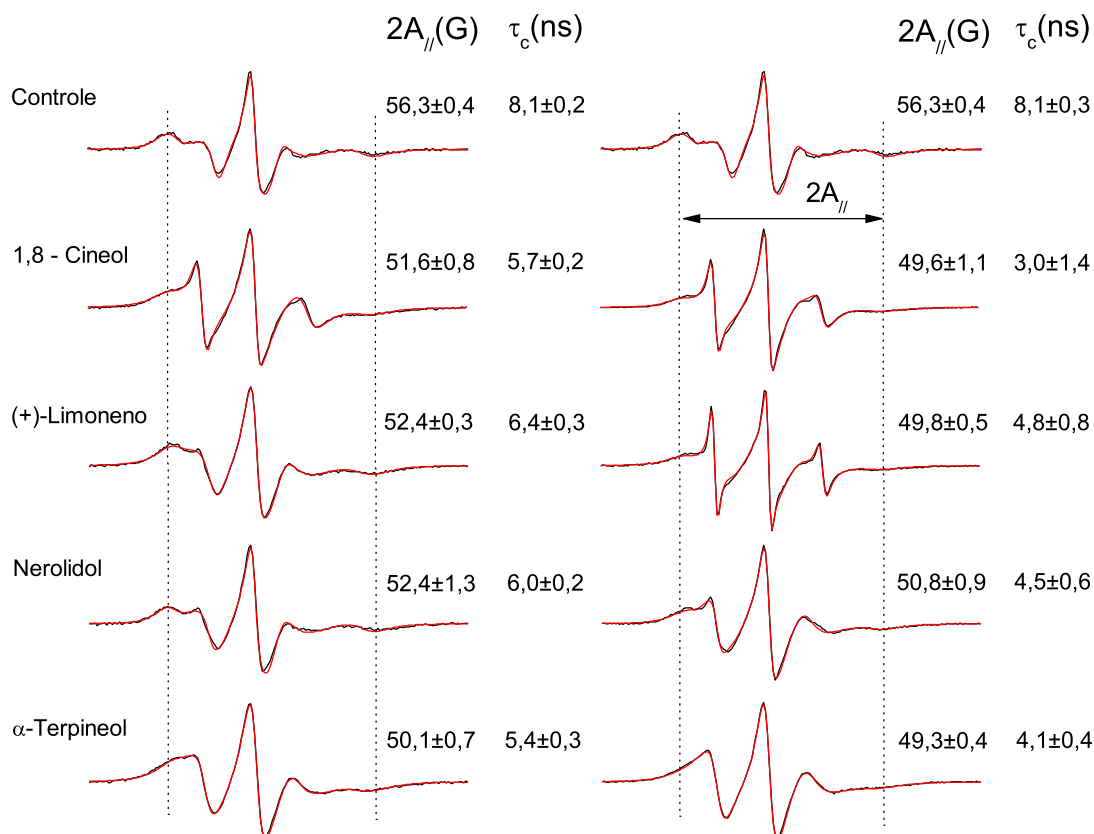


Figura 9.1: Espectros de RPE experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) do marcador de spin 5-DSA em membranas de promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* de amostras sem tratamento (controle) e amostras tratadas com vários terpenos nas concentrações de $2,4 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna esquerda) e $4,8 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna direita). Os espectros foram simulados utilizando o programa de ajuste NLLS usando um modelo de duas componentes espectrais, que permitiu determinar a média do tempo de correlação rotacional, τ_c , para cada espectro. Outro parâmetro que é medido diretamente no espectro de RPE, $2A_{||}$, está indicado por linhas verticais na figura. A média e os desvios-padrão do τ_c e $2A_{||}$ são indicados. Para ambos os parâmetros, todos os terpenos foram significativamente diferentes da amostra controle ($p < 0,01$). A variação total do campo magnético em cada espectro é de 100 G.

componentes 1 e 2, respectivamente, já o τ_{c1} e τ_{c2} são os respectivos tempos de correlação rotacional (MENDANHA *et al.*, 2013; ALONSO *et al.*, 2012). O tratamento com os terpenos

causou grandes reduções nos valores de τ_c , indicando um aumento dramático na fluidez da membrana de *Leishmania*.

Para a realização dos experimentos de RPE é necessário uma alta concentração de células e nós utilizamos 2×10^9 células/mL. Entretanto, notamos que quanto maior a concentração de células era usada no experimento, maior era a concentração molar de terpeno necessária para causar uma alteração na fluidez de membrana. A concentração de terpeno usada para obter os espectros apresentados na Fig. 9.1 (coluna esquerda) foi de $2,4 \times 10^9$ terpenos/célula que convertida para concentração molar dá 8 mM. Diante dos valores de IC_{50} comumente reportados na literatura que caem na faixa dos micromolares, esta concentração molar é demasiadamente grande. Em trabalho anterior (MOREIRA *et al.*, 2014), verificou-se que o IC_{50} da miltefosina em promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* aumenta com a concentração de células usadas no ensaio calorimétrico MTT. Assim, decidimos medir os valores de IC_{50} dos terpenos em função da concentração de célula utilizada no experimento.

9.2 Análise da citotoxicidade dos terpenos sobre a *Leishmania*

Quando células são tratadas com moléculas testes hidrofóbicas, ou com alta afinidade por membrana, como é o caso dos terpenos estudados neste trabalho, o tratamento é mais eficaz e rápido quando utilizado um número maior de células. Nos experimentos de RPE, onde uma alta concentração de células foi utilizada (2×10^9 células/mL), o efeito na membrana pôde ser observado em apenas 5 minutos após o tratamento. Assim, realizamos ensaios de viabilidade celular aplicando o MTT 5 minutos após o tratamento com os terpenos e em condições idênticas daquelas utilizadas nos experimentos de RPE. Também foram feitos experimentos aplicando o MTT 24 h após o tratamento para várias concentrações celulares. O mesmo resultado foi observado para uma baixa concentração de células (5×10^6 células/mL) para um período de incubação de 48 e 24 h, onde os valores do IC_{50} também não foram significativamente diferentes. Uma vez que os resultados encontrados para o IC_{50}

com 48 h, 24 h e 5 minutos de incubação não foram significativamente diferentes, esta experiência indica que a atividade de cada um dos terpenos contra a *Leishmania* não depende de um longo período de incubação. Os experimentos também mostraram que os valores do IC_{50} aumentam na medida em que se aumenta a concentração do parasito na amostra (Tab. 9.1). Como os terpenos apresentam uma elevada afinidade pela membrana, também expressamos os valores do IC_{50} em número de moléculas/célula. Os valores do IC_{50} , em número de terpenos/parasitos, apresentaram uma redução associada ao aumento da concentração de células, o que pode ser explicado pelo fato das amostras com elevadas concentrações de parasito possuíam uma proporção inferior de albumina e, assim, uma maior concentração de terpeno consegue atingir a membrana. Os valores IC_{50} dos terpenos estudados indicaram que o nerolidol possui o maior e o 1,8-cineol o menor potencial citotóxico.

Quando é calculada a concentração molar de uma molécula com alta afinidade por membrana em uma suspensão de células, pode ocorrer imprecisão no valor calculado porque uma parte considerável das moléculas se aloja nas membranas reduzindo a concentração do meio aquoso. Quanto menor a concentração de células na suspensão, ou seja, quanto mais diluído está o sistema, mais preciso é o cálculo da concentração molar da molécula em estudo.

Para examinar em mais detalhes este assunto, vamos considerar um sistema de células com n_w moles da molécula teste no meio aquoso e n_m moles desta molécula no interior da membrana. A concentração molar calculada (c_{calc}) será:

$$c_{calc} = \frac{n_w + n_m}{V_w + V_m}, \quad (9.2)$$

onde V_w é o volume de água e V_m é o volume de membrana na suspensão. Reescrevendo a Eq. 9.2 em termos das concentrações molares na membrana, c_m , e no meio aquoso, c_w , e introduzindo o coeficiente de partição K, dado por $K = c_m/c_w$, temos:

$$c_{calc} = \frac{c_w V_w + K c_w V_m}{V_w + V_m}, \quad (9.3)$$

ou

$$\frac{c_{calc}}{c_w} = \frac{(V_w + K V_m)}{V_w + V_m}. \quad (9.4)$$

Tabela 9.1: Efeito dos terpenos contra promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* (ensaio de MTT).

Terpenos	Incubação ^a	IC_{50} (μ M)	IC_{50} (10^9 terpenos/célula)
		$5,0 \times 10^6$ células/mL	
Nerolidol	48 h	$10,9 \pm 0,4$ (A) ^b	$1,31 \pm 0,05$ (A)
	24 h	$7,9 \pm 0,8$ (A)	$0,95 \pm 0,09$ (A)
(+) -Limoneno	48 h	339 ± 27 (B)	$40,9 \pm 0,3$ (B)
	24 h	549 ± 169 (BC)	61 ± 17 (BC)
α -Terpineol	48 h	638 ± 112 (C)	77 ± 13 (C)
	24 h	678 ± 59 (C)	83 ± 6 (C)
1,8 - cineol	48 h	4697 ± 1258 (D)	698 ± 116 (D)
	24 h	5798 ± 970 (D)	565 ± 151 (D)
		$1,0 \times 10^7$ células/mL	
Nerolidol	24 h	$9,5 \pm 0,9$ (A)	$0,57 \pm 0,06$ (A)
(+) -Limoneno	24 h	833 ± 146 (B)	50 ± 9 (B)
α -Terpineol	24 h	1115 ± 374 (B)	62 ± 18 (B)
1,8 - cineol	24 h	6885 ± 1011 (C)	400 ± 50 (C)
		$1,0 \times 10^8$ células/mL	
Nerolidol	24 h	$29,2 \pm 5,2$ (A)	$0,17 \pm 0,03$ (A)
(+) -Limoneno	24 h	1920 ± 130 (B)	$11,6 \pm 0,8$ (B)
α -Terpineol	24 h	2203 ± 395 (B)	$13,3 \pm 2,4$ (B)
1,8 - cineol	24 h	9637 ± 780 (C)	58 ± 5 (C)
		$2,0 \times 10^9$ células/mL	
Nerolidol	24 h	1109 ± 148 (A)	$0,31 \pm 0,02$ (A)
	5 min	1049 ± 280 (A)	$0,32 \pm 0,08$ (A)
(+) -Limoneno	24 h	4803 ± 315 (B)	$1,42 \pm 0,09$ (B)
	5 min	5322 ± 559 (B)	$1,57 \pm 0,19$ (B)
α -Terpineol	24 h	2950 ± 499 (C)	$0,89 \pm 0,15$ (C)
	5 min	3402 ± 449 (C)	$1,02 \pm 0,14$ (C)
1,8 - cineol	5 min	8048 ± 848 (D)	$2,42 \pm 0,25$ (D)

^a Tempo de incubação depois do tratamento e antes da adição do MTT.

^b Significância estatística: Os dados de mesma coluna e concentração de célula foram comparados estatisticamente com $P < 0,05$. Os dados de mesma coluna e concentração de célula que não estão indicados com letras maiúsculas em comum são estatisticamente diferentes. Para todos os terpenos as médias para as concentrações de células de $5,0 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^9$ células/mL são significativamente diferentes com $P < 0,05$.

Se $V_w \gg V_m$, então da Eq. 9.4, $c_{calc} \cong c_w$, ou seja, o valor calculado é preciso para sistemas bem diluídos. Na Fig. 9.2A estão mostradas as curvas teóricas de c_{calc}/c_w fornecidas pela Eq. 9.4 para dois valores de K e diferentes razões entre V_w e V_m . Neste mesmo gráfico também foram plotados os valores relativos das concentrações molares de IC_{50} para o nerolidol e limoneno (Tabela 9.1). Os valores de IC_{50} , tanto do nerolidol quanto do limoneno,

foram multiplicados por constantes convenientes para facilitar a comparação com a curva teórica. Neste ajuste foi assumida uma razão $V_w/V_m = 5,0 \times 10^5$ para a menor concentração de célula utilizada (5×10^6 células/mL) e para as outras concentrações celulares as razões volumétricas foram calculadas com base nesta relação. Para o caso do nerolidol, o valor de K de melhor ajuste foi $K = 2 \times 10^5$, ou $\text{Log}K = 5,3$, um valor próximo do coeficiente de partição octanol-água para este terpeno ($\text{Log} P_{o/w} = 5,33$) (UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2013b) e para o limoneno foi utilizado $\text{Log}K = 4,2$ ($\text{Log} P_{o/w} = 4,23$) (UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE, 2013a). Para o limoneno, o valor de c_{calc}/c_w se aproxima de 1 para a menor concentração de célula utilizada, significando que esta concentração pode ser considerada suficientemente diluída para o caso deste terpeno. Entretanto, para o nerolidol o valor experimental para a menor concentração de célula utilizada (5×10^6 células/mL) tem valor próximo de 2, sugerindo que esta concentração de célula ainda não está suficiente diluída para evitar erros de cálculo no caso deste terpeno.

Como os valores calculados são imprecisos para concentrações maiores de células, tais como as utilizadas nos experimentos de RPE (2×10^9 /mL), na Tabela 9.1 eles também foram expressos os valores de IC_{50} em número de terpeno por célula. Entretanto, os valores de IC_{50} assim calculados também são dependentes da concentração celular utilizada no experimento. Neste caso, o cálculo é mais preciso para altas concentrações celulares. Isto ocorre porque quanto mais baixa for a concentração celular, mais moléculas testes estarão diluídas no meio aquoso e fora das células. Este cálculo pode ser feito através da seguinte equação:

$$\frac{N}{N_{célula}} = \frac{N_w + N_m}{N_{célula}}, \quad (9.5)$$

onde N , N_w e N_m representam o número de moléculas na suspensão, no meio aquoso e na membrana, respectivamente, e $N_{célula}$ representa o número de células da suspensão. Reescrevendo a Eq. 9.5 em termos das concentrações molares e número de Avogadro temos:

$$\frac{N}{N_{célula}} = \frac{(c_w V_w + c_m V_m) N_A}{N_{célula}}, \quad (9.6)$$

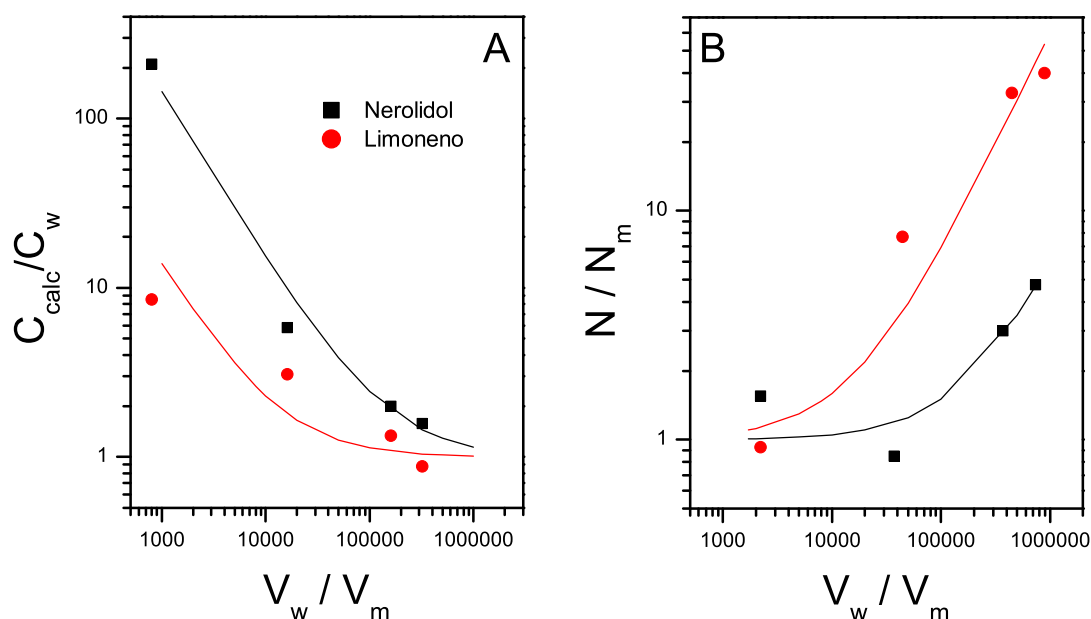


Figura 9.2: (A) Curvas teóricas calculadas a partir da Eq. 9.4 para a razão da concentração molar (c_{cal}/c_w), em comparação com os valores do IC_{50} mostrados na Tabela 9.1 para diferentes concentrações de células tratadas com os terpenos Nerolidol (quadrado) e (+)-Limoneno (círculo) em função de V_w/V_m . (B) Curvas teóricas calculada a partir da Eq. 9.8 para a razão N/N_m em comparação com o IC_{50} do Nerolidol e (+)-Limoneno versus V_w/V_m .

$$N = c_m N_A \left(\frac{V_w}{K} + V_w \right), \quad (9.7)$$

e

$$\frac{N}{N_m} = \left(1 + \frac{V_w}{KV_m} \right). \quad (9.8)$$

Se V_w for muito pequeno, então da Eq. 9.8, $N \cong N_m$, ou seja, quase todas as moléculas teste estão nas membranas celulares, indicando um cálculo preciso para suspensão com alta concentração de células. Neste cálculo, o número de moléculas que entram no interior da célula foi negligenciado (estima-se ser inferior a 1% em relação ao número que entra na membrana). No gráfico da Fig. 9.2 estão apresentadas as curvas teóricas de N/N_m dadas pela Eq. 9.8, usando $\text{Log}K = 5,3$ para o nerolidol e $\text{Log}K = 4,0$ para o limoneno. Neste caso, os dados experimentais desses dois terpenos, obtidos da Tabela 9.1, se ajustaram

melhor quando utilizada a razão de $V_w/V_m = 7,4 \times 10^5$ (para 5×10^6 células/mL). Como mostrado no gráfico, no caso do nerolidol, valor de N/N_m se aproxima de 1 para as duas maiores concentrações de células utilizadas (2×10^9 e 1×10^8 células/mL), sugerindo que para estas duas concentrações de células os cálculos foram mais precisos, enquanto no caso do limoneno, N/N_m foi próximo de 10 para a concentração de 1×10^8 células/mL, sugerindo que para este terpeno a concentração de células está muito baixa para um cálculo mais preciso.

Para altas concentrações de células, a incorporação dos terpenos é rápida e o ensaio de citotoxicidade pôde ser realizado adicionando o MTT 5 min após o tratamento. Os valores de IC_{50} encontrados para tratamento rápido foram significativamente mais altos quando expressos em concentração molar e numericamente mais baixos quando expressos em número de terpenos por célula. Entretanto, os valores calculados foram consistentes com a previsão teórica. A medida da dinâmica lipídica na membrana de *Leishmania* através da espectroscopia de RPE requer o uso de uma concentração alta de células, tal como 2×10^9 células/mL, de modo que estes estudos foram necessários para efeito de comparação dos resultados de RPE com os dos ensaios de citotoxicidade. Lembrando que no plasma sanguíneo há aproximadamente $5,5 \times 10^9$ eritrócitos/mL, pode-se verificar que a concentração usada nos experimentos de RPE está mais próxima da condição fisiológica do que as concentrações normalmente utilizadas nos ensaios com cultura de *Leishmania* (aproximadamente 5×10^6 células/mL).

9.3 Comparação entre os dados de IC_{50} dos terpenos e as concentrações que alteram a fluidez de membrana

Para comparar a concentração de terpeno capaz de produzir um efeito citotóxico na *Leishmania* com a concentração que altera a fluidez da membrana, foram feitas medidas da fluidez nas mesmas condições dos testes de viabilidade celular. A Fig. 9.3 mostra os espectros de RPE do marcador 5-DSA na membrana da *Leishmania (L) amazonensis* tratada com

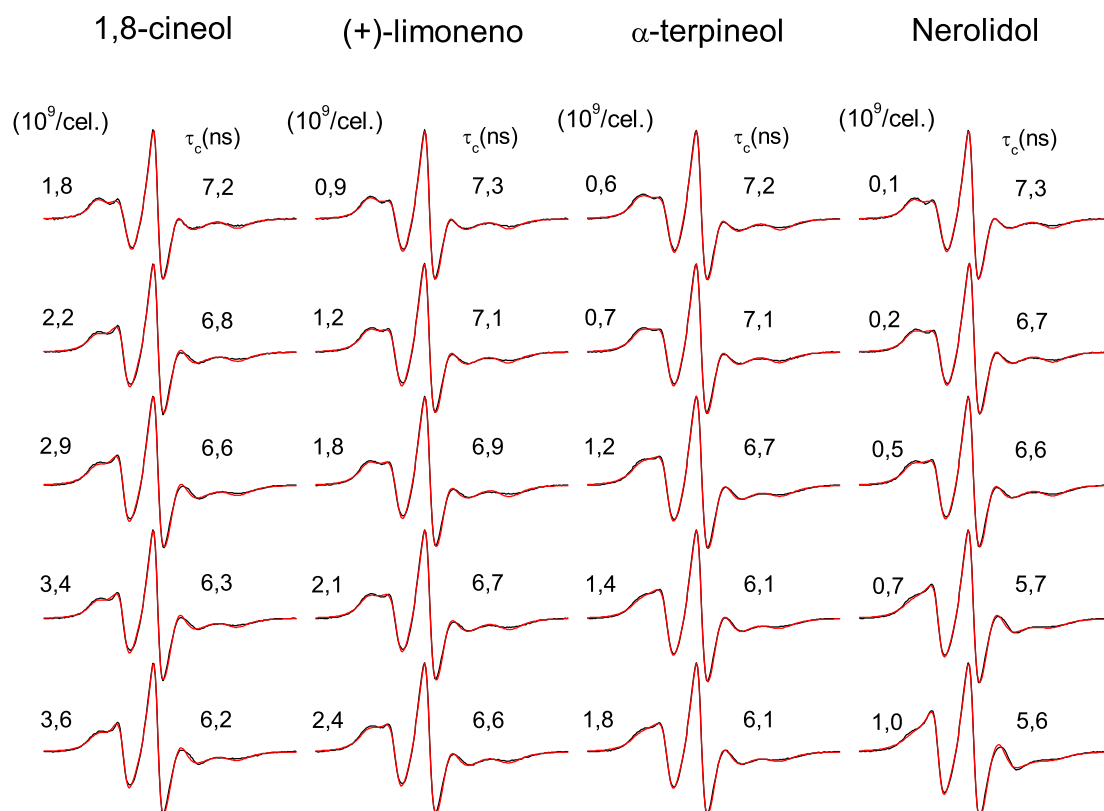


Figura 9.3: Espectros de RPE experimentais (linhas preta) e de melhor ajuste (linhas vermelha) do marcador 5-DSA nas membranas plasmáticas de *Leishmania (L) amazonensis* tratada com terpenos em várias concentrações em torno do IC_{50} (duas concentrações foram escolhidas abaixo e três acima do IC_{50}). O melhor ajuste espectral foi obtido pelo programa NLLS utilizando um modelo de duas componentes espectrais. Os valores médios do parâmetro de RPE tempo de correlação rotacional (τ_c) obtidos de três experimentos independentes foram indicados. Os espectros das amostras controle (sem tratamento) foram semelhantes a que já foi mostrado na Fig. 9.1 ($\tau_c = 8,1 \pm 0,2$ ns). A varredura do campo magnético é de 100 G.

os terpenos por 5 minutos em cinco concentrações próximas aos valores de IC_{50} para cada terpeno (Tab. 9.1). O tempo de correlação rotacional médio, obtido de três experimentos independentes, está também apresentado para uma melhor comparação entre os espectros. Todos os terpenos apresentaram aumento na mobilidade do marcador na membrana, conforme indicado pela redução do parâmetro τ_c com o aumento da concentração de terpeno. Além do parâmetro τ_c , há outro parâmetro de RPE muito utilizado para avaliação da fluidez de membrana. O desdobramento hiperfino paralelo, $2A_{//}$, é medido diretamente no espectro

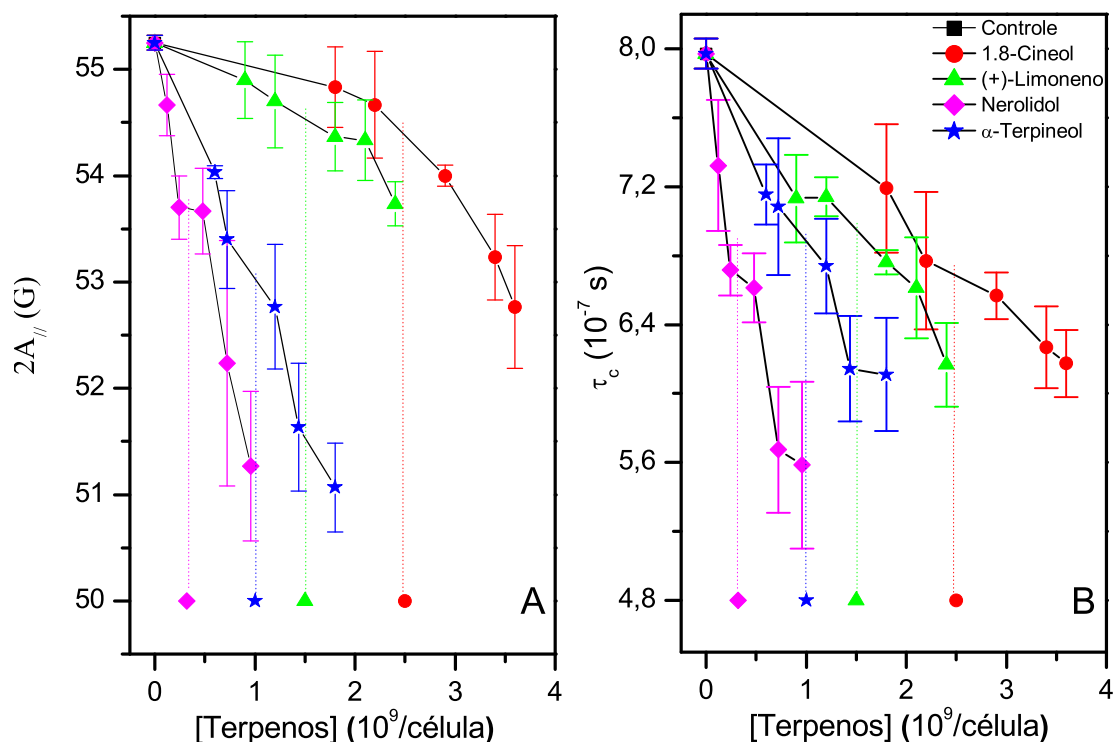


Figura 9.4: Parâmetros de RPE $2A_{||}$ (painel A) e tempo de correlação rotacional, τ_c , (painel B) do marcador de spin 5-DSA em membranas de promastigotas de *Leishmania* (*L*) *amazonensis* em função da concentração de terpenos utilizada no tratamento. Os valores de IC_{50} de cada terpene estão representados por pontos na parte inferior de cada gráfico indicados por linhas pontilhadas. Os erros experimentais estimados para $2A_{||}$ e τ_c são, 0,5 G e 0,2 ns, respectivamente.

experimental. Na Fig. 9.4 estão apresentados os gráficos da variação do $2A_{||}$ (painel A) e τ_c (painel B) em função da concentração de terpene na amostra. Pode-se verificar que os terpenos com os menores valores de IC_{50} apresentaram a alteração na membrana em menor concentração de terpene. Além disso, nota-se que para cada terpene a concentração que altera a membrana está bem próxima da concentração que causa 50% de inibição do crescimento.

9.4 Interação dos terpenos com as proteínas de membrana de *Leishmania*

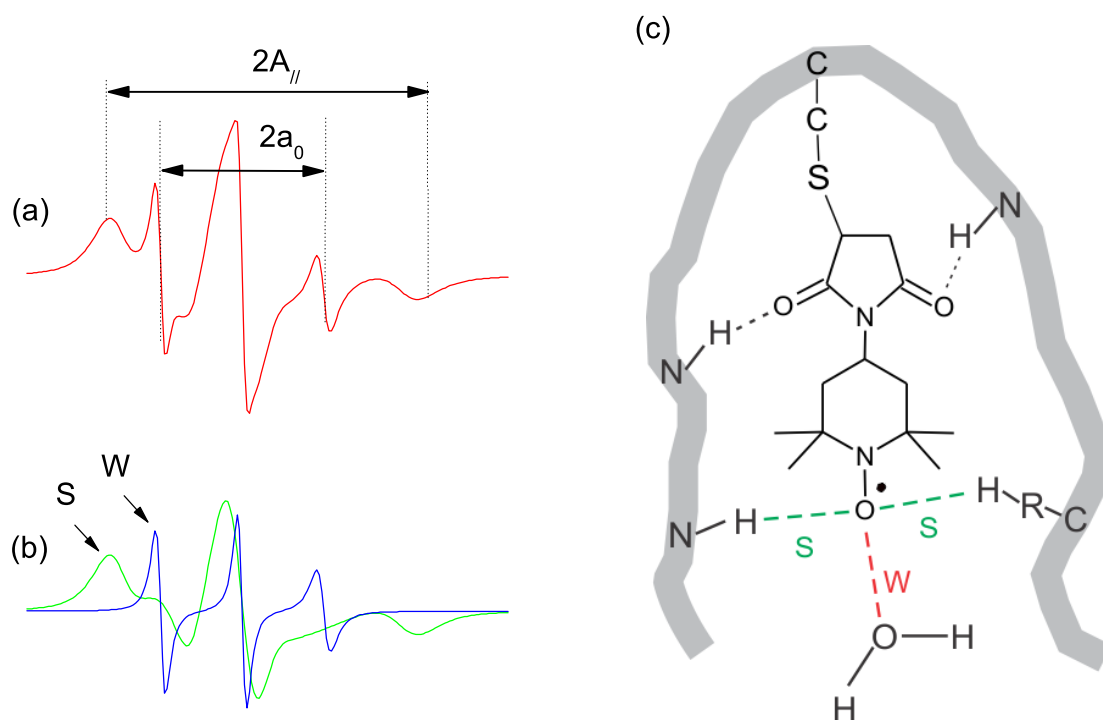


Figura 9.5: (a) Espectro de RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha) a 26°C do marcador de spin 6-MSL ligado aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana da *Leishmania (L) amazonensis*. O espectro de melhor ajuste foi obtido pelo programa NLLS, usando um modelo de duas componentes espectrais. (b) As componentes espectrais fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas. Os parâmetros desdobramento hiperfino isotrópico $2a_0$ e o $2A_{//}$ são indicados. (c) Ilustração esquemática do modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente ao grupo sulfidrilas da proteína. O radical nitroxídeo pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (S), ou com as moléculas de água para gerar a componente fracamente imobilizada (W). Também há uma possível formação de ligações de hidrogênio entre a proteína e os dois átomos do oxigênio do anel maleimido, prendendo fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica (COUTO; OLIVEIRA; ALONSO, 2005).

Em um estudo anterior demonstrou-se que a miltefosina apresenta uma forte ação sobre as proteínas ligadas às membranas de promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*, quando examinadas por um marcador de spin derivado do maleimido covalentemente ligado aos grupos sulfidrilas da membrana plasmática (MOREIRA *et al.*, 2014). Para examinar se os terpenos alteraram a dinâmica das proteínas de membrana, realizamos experimentos nas

mesmas condições experimentais deste trabalho anterior.

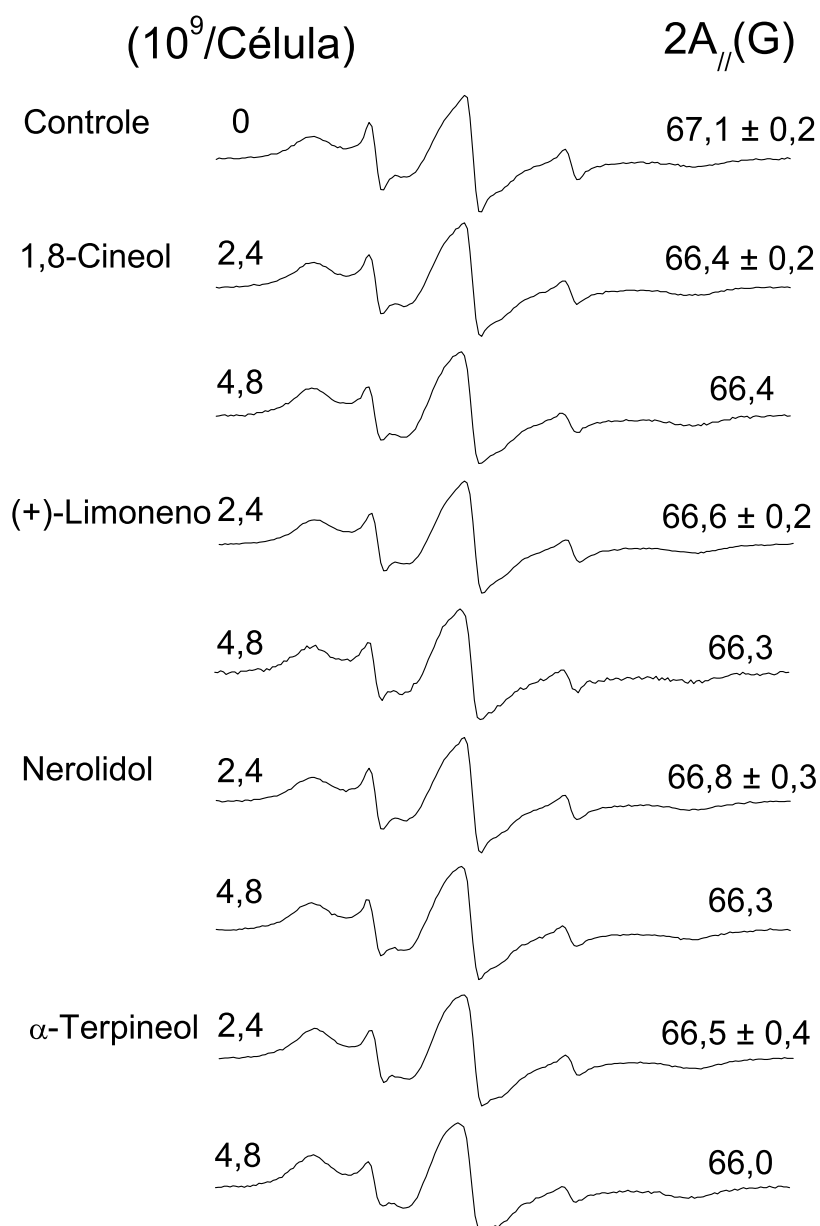


Figura 9.6: Espectros de RPE experimentais do marcador de spin 6-MLS covalentemente ligado às proteínas de membrana de *Leishmania (L) amazonensis*, para as amostras sem tratamento e tratadas com terpenos. Os valores médios do parâmetro $2A_{//}$ são indicados.

A Fig. 9.5 mostra um espectro típico do marcador de spin 6-MSL ligado covalentemente aos grupos sulfidrilas da membrana plasmática de *Leishmania (L) amazonensis*. A análise do espectro revela que o mesmo é composto por duas componentes espectrais for-

madras por duas classes de marcadores, cada uma se encontrando em um diferente estado de mobilidade. Pela simulação do espectro, utilizando um modelo de duas componentes espectrais, uma com rápido e outra com lento tempo de correlação rotacional, foi possível separar as duas componentes. Estas componentes são denotadas tecnicamente como fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas. A qualidade do ajuste da simulação pode ser observada pela superposição do espectro simulado (linha vermelha) sobre o espectro experimental (linha preta). O desdobramento hiperfino isotrópico, a_0 , é sensível à polaridade do ambiente no qual o radical nitróxido está dissolvido, de forma que o valor observado permite assegurar que os marcadores de spin na componente W, com três linhas de ressonância bem definidas, estão em contato com o solvente. Os experimentos também indicam que a componente com menor mobilidade (S), na escala de tempo do RPE em banda X ($\sim 9,6$ GHz) para o radical nitróxido (Fig. 9.5b), apresentou tempo de correlação rotacional uma ordem de grandeza maior que a da componente W, indicando fortes interações da cadeia lateral do marcador de spin com a estrutura da proteína. A componente S permite medir o desdobramento hiperfino das linhas de ressonância extremas do espectro, $2A_{//}$, o qual reflete a mobilidade do esqueleto proteico (COUTO; OLIVEIRA; ALONSO, 2005). Uma ilustração representando um possível modelo molecular do marcador de spin 6-MSL ligado aos resíduos de cisteína das proteínas está apresentada na Fig. 9.5c.

Na Fig. 9.6 são mostrados os espectros de RPE experimental e simulado do 6-MLS, ligado a proteína de membrana da *Leishmania (L) amazonensis* de amostras não tratadas e tratadas com vários terpenos. As concentrações de terpenos utilizadas foram muito elevadas, sendo o menor deles ($4,8 \times 10^9$), aproximadamente, duas vezes o valor do IC_{50} de menor ação entre os quatro terpenos (1,8-cineol). Comparando com a amostra controle, onde o valor do $2A_{//}$ é 67,1 G a 26°C, a incorporação dos terpenos na membrana de *Leishmania* produziu somente uma pequena alteração na mobilidade local do esqueleto da proteína ligada ao marcador de spin, que pode ser identificada pela baixa alteração do $2A_{//}$, para valores em torno de $\sim 66,4$ G.

9.5 Verificação da ocorrência de lise celular induzida em *Leishmania* pela interação com terpenos

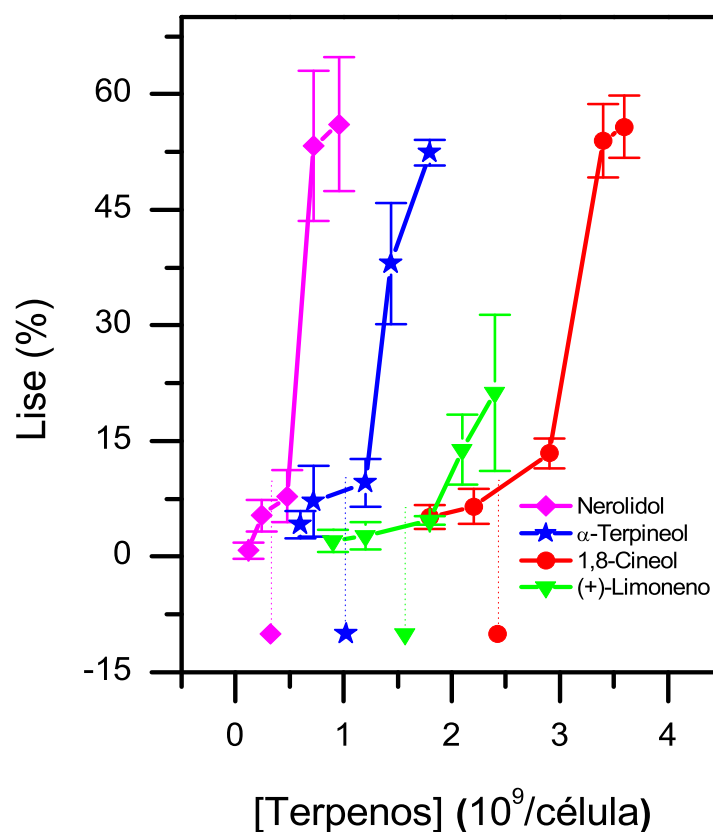


Figura 9.7: Percentual de lise celular em amostras de promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* tratadas com terpenos. O IC_{50} de cada terpeno é representado pelo seu símbolo correspondente e uma linha vertical.

A lise celular também foi observada no âmbito do intervalo das concentrações de terpeno que alteram a fluidez da membrana de *Leishmania*. As amostras de *Leishmania* tratadas com terpenos preparadas sob as mesmas condições experimentais utilizadas para medições de RPE e ensaio de citotoxicidade (concentração de células de $2,0 \times 10^9$ células/mL e com um período de incubação de 5 minutos), foram centrifugadas para medir a lise de células com base no teor de proteína no sobrenadante (Fig. 9.7). As amostras não tratadas com os terpenos foram consideradas como 0% de lise, havendo uma pequena fração de lise que foi considerada associada aos procedimentos empregados no preparo das amostras, sendo que

no cálculo da percentagem de lise celular este valor descontado. A lise de 100% foi obtida adicionando 2% de Triton X-100 às amostras. Uma amostra controle foi preparada com 10% de etanol, entretanto, não apresentou diferença significativa em relação à amostra sem tratamento (0% de lise). Em todas as concentrações testadas verificou-se que a interação dos terpenos com a membrana do parasita foi capaz de induzir a lise celular, e esta aumentou com a elevação da concentração destas moléculas na amostra. Na concentração de terpeno que corresponde ao valor de IC_{50} de cada terpeno, a percentagem de lise celular observada para o nerolidol, α -terpineol, (+)-limoneno e 1,8-cineol foi de aproximadamente 6%, 8,5%, 4% e 9%, respectivamente, e na maior concentração de terpeno medida a lise celular chegou a ~20% para o limoneno e ~50%. O (+)-limoneno apresentou menor capacidade de lise, por ser um hidrocarboneto e atuar como um espaçador lipídico não interagindo diretamente com grupos polares, necessitando de uma maior concentração para interferir com as interações da região polar da bicamada. Entretanto, nas concentrações estudadas o (+)-limoneno alterou significativamente a mobilidade lipídica da membrana do parasito, sugerindo que a alteração na fluidez da bicamada lipídica seja o principal mecanismo de ação dos terpenos contra a *Leishmania*.

Um método alternativo para avaliar a lise celular e fragmentação de membrana foi realizado. Após o tratamento com os terpenos, os parasitos marcados com o 6-MSL foram centrifugados, sendo retirada uma alíquota do sobrenadante para obtenção dos espectros de RPE. A Figura 9.8 mostra os espectros do marcador de spin 6-MSL ligado às proteínas da membrana tratada com vários terpenos na concentração $4,8 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna esquerda) e após centrifugação para verificar se havia fragmentos de membranas marcadas no sobrenadante (linhas pretas da coluna da direita). Os espectros obtidos do sobrenadante apresentavam três linhas de ressonância bem definidas com o valor médio do a_0 em torno de $(17,0 \pm 0,5)$ G, indicando que os radicais nitróxidos estão expostos ao solvente e os espectros apresentaram intensidades semelhantes às dos espectros de controle. A presença de um sinal de RPE na amostra não tratada provavelmente se deve ao fato de que nem todos os

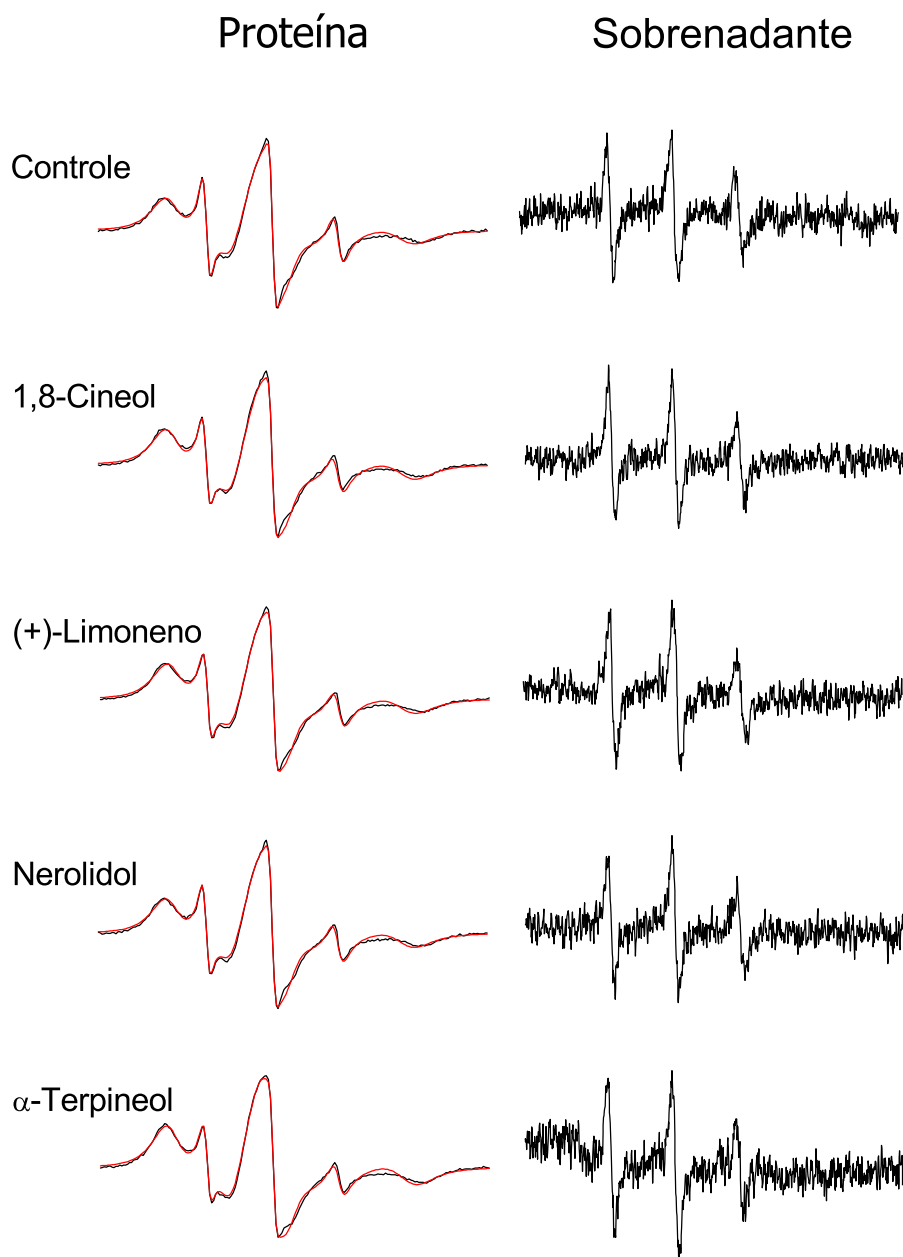


Figura 9.8: Espectros de RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha) a 26°C do marcador de spin 6-MLS, ligado às proteínas de membrana da *Leishmania (L) amazonensis* tratada com vários terpenos na concentração de $4,8 \times 10^9$ terpenos/célula (coluna esquerda) e no sobrenadante (coluna direita).

marcadores de spin livres foram removidos da amostra durante o processo de preparação. Em todas as amostras, independente da concentração e tipo de terpeno, as características do espectro foram semelhantes, indicando que o tratamento com os terpenos não desintegra a membrana celular como observado para a miltefosina em um trabalho anterior (MOREIRA *et al.*, 2014). Isto mostra que os terpenos não interagem com as proteínas de membrana e sim com seu componente lipídico.

Capítulo 10

Discussões

O complexo das Leishmanioses representa um grave problema de saúde pública, infectando milhões de pessoas em todo mundo. Dentre as várias manifestações clínicas desta doença, pode ser destacada a leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania (L) amazonensis* e *Leishmania (V) braziliensis*, sendo uma infecção que causa segregação social, com maiores impactos sobre as populações menos favorecida economicamente, e também elevadas taxas de mortalidade (BRASIL, 2007b). O tratamento atual, baseado em quimioterapia, utiliza compostos pentavalentes como primeira escolha e Anfotericina B e a Pentamidina, que causam sérios efeitos colaterais e outras séries de limitações (KEDZIERSKI *et al.*, 2009; ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; PALUMBO, 2008). Nestas perspectivas, o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos ainda se faz necessário. Estudos de Izumi e colaboradores (2012) buscando novas terapias viáveis para a doença de Chagas avaliaram *in vitro* a ação de sete ácidos diterpenos e um sesquiterpeno, isolados do óleo-resina de Copaifera, em diferentes formas do *Trypanosoma cruzi*. Verificaram que os terpenos alteram o metabolismo oxidativo das células do parasito levando a um processo de morte autofágica, com maior eficiência sobre a forma amastigota e com moderada citotoxicidade em relação aos eritrócitos e células nucleadas (IZUMI *et al.*, 2012). Trabalhos mostraram que o sesquiterpeno nerolidol inibe a biossíntese de isoprenóides em *Leishmania (L) amazonensis* (ARRUDA *et al.*, 2005) e que ácidos diterpenos extraídos do óleo da Copaiba apresentam propriedades leishmanicidas para este parasito tanto na forma amastigota quanto na promastigota (SANTOS *et al.*,

2013, 2012).

A espectroscopia de RPE de marcadores de spin lipídicos tem sido amplamente utilizada para avaliar a fluidez da membrana celular de eritrócito em suspensão com o hematócrito, geralmente variando de 20 - 50% ($\sim 2,2 - 5,5 \times 10^9$ eritrócitos/mL), e as concentrações de fármacos que provocam uma alteração na fluidez na membrana estão, em geral, na faixa dos milimolares (MOREIRA *et al.*, 2013). Esta condição é fisiologicamente relevante uma vez que o sangue humano tem um hematócrito normal de 42% e $\sim 5 \times 10^9$ eritrócitos/mL. Para medir a atividade antiproliferativa de fármacos em *Leishmania* pelo ensaio calorimétrico MTT uma menor concentração celular de aproximadamente 5×10^9 células/mL é geralmente utilizada. Para meio de cultura suplementado com SFB, a relação albumina/célula em suspensão aumenta com a diluição do sistema e para fármacos hidrofóbicos a quantidade de fármaco sequestrado pela albumina se torna maior o que requer mais tempo para incorporação do fármaco pela membrana celular. Em um estudo prévio (MOREIRA *et al.*, 2014), ficou demonstrado que a utilização de 20% de SFB no ensaio de MTT em vez de 10%, o valor do IC_{50} da miltefosina contra promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* foram significativamente mais elevados devido a maior concentração de miltefosina que foi retirada na albumina. No mesmo estudo, também foi mostrado que o IC_{50} da miltefosina foi significativamente maior, quando um período de incubação de 1 h foi utilizado em vez de 24 h. No entanto, usando um método de rápida incorporação da miltefosina na membrana de *Leishmania*, os efeitos de citotoxicidade foram observados com apenas 5 minutos de incubação (MOREIRA *et al.*, 2014).

Conforme a teoria de partição, a constante de permeabilidade de uma molécula através de uma membrana é proporcional ao coeficiente de partição K (ANJOS; ALONSO, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2010). O coeficiente $\log P_{o/w}$ é comumente utilizado como uma estimativa do $\log K$ por ser mais fácil de medir. Na suspensão com pequenas quantidades de células, a fração de moléculas que vai para a membrana pode ser negligenciada, o sistema pode ser considerado homogêneo e, assim, o cálculo da concentração molar de fármacos na

suspensão é preciso, expressando a concentração exata de fármacos na fase aquosa. Entretanto, com o aumento do número de células, a fração de fármacos que entra na membrana não pode ser desprezada, o sistema não é mais homogêneo e a concentração de fármaco no meio aquoso é menor do que a calculada. Como o coeficiente de partição, determinado por $K = c_m/c_w$, é uma constante, uma pequena concentração no meio aquoso também conduz a uma redução na concentração do fármaco na membrana. Neste estudo foi demonstrado que o IC_{50} de quatro terpenos em promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* aumenta com a concentração de células utilizadas no ensaio de MTT. Este efeito foi atribuído a um erro de cálculo da concentração molar de fármacos hidrofóbicos na suspensão de células, e os valores de IC_{50} obtidos foram consistentes com nossa previsão teórica (Fig. 9.2A). No caso do nerolidol, com o maior $\text{Log } P_{o/w}$ entre os terpenos estudados, pode ser observado na Fig. 9.2A que a pequena concentração de célula utilizada nas nossas experiências não pode ser considerada suficientemente diluída, sugerindo que o valor de IC_{50} de $7,9 \mu\text{M}$ encontrado utilizando 5×10^9 células/mL, pode ser ainda menor com a redução da concentração de célula. Um IC_{50} de $59,3 \mu\text{M}$ da miltefosina foi relatado para $1,0 \times 10^8$ células/mL (MOREIRA *et al.*, 2014), sendo comparável ao IC_{50} do nerolidol de $29,2 \mu\text{M}$ encontrado aqui (Tab. 9.1) para o mesmo parasito e condições experimentais, contudo, (+)-limoneno, α -terpineol e 1,8-cineol mostraram IC_{50} muito maior do que os da miltefosina e nerolidol (Tab. 9.1).

Para amostras com elevada concentração de células é mais conveniente expressar o valor do IC_{50} de fármacos hidrofóbicos em número de moléculas por célula. Neste cálculo, o número de moléculas que permaneceu na fase aquosa fora da célula foi descartado. Medições do IC_{50} dos terpenos (Tab. 9.1) e a previsão teórica (Fig. 9.2B) indicaram que apenas a concentração de 2×10^9 células/mL foi suficientemente concentrada para um cálculo preciso. Nesta concentração de célula o IC_{50} do nerolidol foi de $0,32 \times 10^9$ terpenos/célula, semelhante ao da miltefosina nas mesmas condições experimentais (MOREIRA *et al.*, 2014). Para obter o melhor ajuste do IC_{50} para o nerolidol e (+)-limoneno com suas curvas teóricas fornecidas pelas Equações 9.4 e 9.8 (Figuras 9.2A e 9.2B) foram assumidas proporções de

V_w/V_m (Volume de água/Volume de membrana) de $5,0 \times 10^5$ e $7,4 \times 10^5$, respectivamente, para as amostras com 5×10^6 células/mL. Se tomarmos a média destes índices volumétricos na suspensão ($6,2 \times 10^5$), podemos calcular que existe $3,2 \times 10^{-19} m^3$ de membranas por *Leishmania*. Assumindo uma espessura de membrana de *Leishmania* de $8 \times 10^{-9} m$ e levando em conta apenas a membrana plasmática, pode-se calcular a área superficial do parasito como $4,0 \times 10^{-11} m^2$. Supondo uma forma esférica para a *Leishmania*, seu diâmetro seria de $3,6 \mu m$. As promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* são células fusiformes, com aproximadamente $8 \mu m$ de comprimento e $2 \mu m$ de diâmetro (SANTOS *et al.*, 2013). Esta estimativa relativamente boa do tamanho do parasito, com base no valor do IC_{50} do limoneno e nerolidol, denota uma consistência entre os dados do ensaio de MTT para altas e baixas concentrações de células e um período de incubação de 24 h.

Medições de citotoxicidade em concentrações de células elevadas foram necessárias para mostrar que os terpenos estudados, em concentrações próximas aos seus IC_{50} , causam importantes aumentos na fluidez da membrana do parasito e também pequenas quantidades de lise celular de 4 - 9% (Fig. 9.7). Além disso, quando a citotoxicidade foi medida usando 2×10^9 células/mL, o resultado encontrado para 24 h e 5 min de incubação não eram significativamente diferentes, sugerindo que a incorporação de terpenos nas membranas de *Leishmania* é muito rápida em concentrações células elevadas, provavelmente devido ao menor volume da fase aquosa e menor quantidade de albumina na suspensão. Semelhantemente, medidas utilizando a concentração de células de 5×10^6 células/mL, também não foram identificadas diferenças significativas no valor do IC_{50} para 48 h e 24 h de incubação, indicando os terpenos não necessitam de um elevado período de incubação para atuarem contra o parasito. Estes resultados indicam que a citotoxicidade dos terpenos contra promastigotas de *Leishmania* está associada com o aumento na fluidez da membrana e também por sua ruptura.

Outros estudos têm relatado o IC_{50} do limoneno (ARRUDA *et al.*, 2009) e nerolidol (ARRUDA *et al.*, 2005) contra promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* utilizando

o ensaio de MTT. Limoneno induziu efeitos antiproliferativos com um IC_{50} de $252 \mu\text{M}$ para $1,0 \times 10^6$ células/mL, que é menor do que o encontrado neste trabalho ($549 \mu\text{M}$, Tabela 9.1) utilizando uma concentração de células maior ($5,0 \times 10^6$). Entretanto, no caso do nerolidol o valor de IC_{50} que encontramos ($7,9 \mu\text{M}$, Tabela 9.1) foi menor do que a relatada na literatura (ARRUDA *et al.*, 2005). Um ponto crítico nos experimentos de citotoxicidade é a maneira como o tratamento é realizado, especialmente de moléculas hidrofóbicas como os terpenos. Neste estudo, os terpenos foram diluídos primeiro em etanol a 33% (v/v), antes de serem aplicados ao meio de cultura e, finalmente, os parasitos foram adicionados. A presença do etanol melhorou a reprodutividade dos ensaios e o seu volume máximo utilizado no meio de cultura foi de 1% (v/v) para adicionar a concentração mais alta de 1,8-cineol cujo IC_{50} foi de $\sim 8 \mu\text{M}$ (2×10^9 células/mL, Tabela 9.1).

Os terpenos também apresentam destaque dentro da classe dos facilitadores de permeação devido aos seus baixos potenciais de irritação da pele (MENDANHA *et al.*, 2013), tendo sua atividade baseada na perturbação reversível do arranjo lipídico da região intercelular do estrato córneo (EC). A interação com os lipídios do EC pode estar associada com a capacidade do terpeno de realizar ligações de hidrogênio, por exemplo, o α -terpineol e o sesquiterpeno nerolidol possuem um grupo OH, que forma ligação de hidrogênio, sendo um doador de hidrogênio. Talvez por esse motivo estes dois terpenos interajam mais com a interface polar da membrana, perturbando as redes de ligação de hidrogênio e, desse modo, facilitam a permeação de fármacos através da pele. Já o éter 1,8-cineol possui um grupo receptor de hidrogênio e o (+)-limoneno não forma ligação de hidrogênio, e assim, nesta concepção, perturbariam menos os arranjos lipídicos e teriam menor capacidade para facilitar a permeação de fármacos (JAIN; THOMAS; PANCHAGNULA, 2002). Apesar dos terpenos serem considerados como tendo baixo potencial de irritação da pele, em concentrações na faixa dos milimolares apresentaram potencial hemolítico e citotoxicidade em fibroblastos em cultura (MENDANHA *et al.*, 2013). Em um estudo comparando a citotoxicidade em células de fibroblastos e potencial hemolítico de sete monoterpenos e o sesquiterpeno nerolidol, o

maior potencial citotóxico e hemolítico foi do nerolidol e α -terpineol, enquanto os menores foram do 1,8-cineol e limoneno (MENDANHA *et al.*, 2013). Esta experiência também sugere que a citotoxicidade dos terpenos é associada com a agressividade na membrana celular.

Em trabalhos anteriores (ANJOS; NETO; ALONSO, 2007, 2007; ANJOS; ALONSO, 2008; CAMARGOS *et al.*, 2010; MENDANHA *et al.*, 2013), foi mostrado que quatro monoterpenos (1,8-cineol, α -terpineol, limoneno e mentol) causam fortes aumentos de fluidez em membranas de estrato córneo, de eritrócito humano e em vesícula de DPPC, mas não foram identificadas diferenças significativas entre eles quanto à magnitude do efeito. Adicionalmente, aqui foi mostrado que embora os terpenos em altas concentrações alcancem efeitos semelhantes em aumentos de mobilidade lipídica, entretanto, as concentrações necessárias para causar esses aumentos são muito diferentes, especialmente se compararmos os terpenos nerolidol e 1,8-cineol (Fig. 9.4).

O espectro de RPE de marcador de spin lipídico em membrana celular pode ser composto por duas componentes espectrais, formadas pela coexistência de duas populações de marcadores com diferentes estados de mobilidade (CAMARGOS; ALONSO, 2003). A componente mais restrita tem sido associada a uma fração de marcador em contato com as proteínas de membrana, enquanto a componente com maior mobilidade foi associada a uma fração de sondas paramagnéticas localizadas na bicamada lipídica, mas sem contato com proteínas (JOST *et al.*, 1973). Na primeira parte deste trabalho foi mostrado que duas componentes espectrais também podem aparecer em bicamadas simples, onde a componente mais restrita foi associada aos marcadores de spin ligados por hidrogênio com a interface polar da bicamada e a menos restrita seria formada pelos marcadores não ligados por hidrogênio à interface polar. Também foi mostrado que a presença do terpeno limoneno em bicamadas simples aumenta a dinâmica do marcador especialmente pela sua transferência da componente mais restrita para a menos restrita. Em membranas de *Leishmania*, o aumento na concentração dos terpenos resultou em uma substancial elevação da fluidez lipídica (Fig. 9.1), especialmente pela migração de uma fração de marcadores 5-DSA da componente 1

(mais restrita) para a componente 2 (mais móvel). Sem a presença dos terpenos, a contribuição ao tempo de correlação rotacional vem essencialmente dos marcadores da componente 1, em trono de 8,0 ns, indicando que na amostra não tratada a grande maioria dos marcadores estão em contato com proteínas. Outro parâmetro que utilizamos para monitorar a fluidez da membrana de *Leishmania* foi o $2A_{//}$, o qual é medido diretamente nos espectros de RPE e muito utilizado para avaliar a dinâmica molecular, embora seja um parâmetro estático associado com a distribuição de orientação dos marcadores de spin na membrana (ordem molecular). Nossos resultados mostraram que os terpenos incorporados na membrana, através do tratamento com $4,8 \times 10^9$ terpenos/célula, causam redução nos valores do $2A_{//}$, passando de $56,1 \pm 0,9$ G da amostra sem tratamento para $53,4 \pm 0,3$ no caso do nerolidol e $50,4 \pm 0,2$ G para o α -terpineol (Fig. 9.4A), também indicando fortes aumentos de fluidez.

É de interesse a comparação de nossos dados com os reportados em estudos *in vitro* sobre a atividade antiproliferativa dos terpenos em outros parasitos e células cancerosas. Geraniol e limoneno apresentaram atividades antiplasmodiais contra *Plasmodium falciparum* com IC_{50} de 52 e 66 μM , respectivamente, enquanto que os fármacos de controle cloroquina e artemisinina deram IC_{50} de 291 nM e 7 nM, respectivamente (OLAGNIER *et al.*, 2007). Estas duas ultimas concentrações são demasiadamente baixas para provocar uma alteração na fluidez da membrana plasmática detectável por espectroscopia de RPE; no entanto, os dois primeiros são suficientemente elevados para modificar a fluidez da membrana. O álcool perílico inibiu a proliferação de células humanas de câncer de pulmão de pequenas células não humanas (A549 e H520) com valores de IC_{50} superiores a 1 mM, induzindo a interrupção do ciclo celular e apoptose com o aumento da expressão de *Bcl2*, *bax*, *p21* e *caspase-3* (YERUVA *et al.*, 2007). O óleo da árvore do chá e seu principal componente terpeno ativo, terpinen-4-ol, demonstrou atividade antiproliferativa contra as duas linhagens de células de tumores murino, mesotelioma AE17 e melanoma B16, com valores de IC_{50} iguais ou maiores do que 0,01% ($\sim 588 \mu\text{M}$), e induziu a morte celular por necrose e interrupção do ciclo celular em ambas as linhas de células tumorais (GREAY *et al.*, 2010). Curiosamente, a miltefosina que

também é capaz de aumentar a fluidez da membrana e induz a lise celular em promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* em concentrações próximas a seu IC_{50} (MOREIRA *et al.*, 2014) demonstraram uma redução no potencial de membrana mitocondrial e inibição do citocromo c oxidase ligada ao processo de morte celular por apoptose (DORLO *et al.*, 2012). Os nossos resultados sugerem mais estudos para examinar se vários mecanismos reportados para explicar os efeitos antiproliferativos dos terpenos não seriam desencadeados por um ataque primário sobre a membrana celular.

Os efeitos citotóxicos do monoterpene terpinoleno foram recentemente estudados em cultura de neurônios primários de rato e células de neuroblastoma N2a (AYDIN; TÜRKÜZ; TASDEMİR, 2013). Uma diminuição significativa na proliferação celular foi observada em culturas de neurônios primários, começando com a dose de 100 mg/L (0,735 mM) e em células N2A de neuroblastoma a atividade anti-proliferativa começou com a metade dessa concentração. Os autores utilizaram concentrações de terpinoleno de até 400 mg/L (2,94 mM) e mesmo assim não houve queda de 50% na viabilidade celular. Os mecanismos de ação do monoterpene não foram investigados, mas as concentrações com atividade antiproliferativa são relativamente altas e nosso trabalho sugere uma possível ocorrência de aumento na fluidez de membrana plasmática e lise celular.

Capítulo 11

Conclusões

Neste trabalho, a espectroscopia de RPE de marcadores de spin incorporados no componente lipídico da membrana plasmática de *Leishmania (L) amazonensis* mostrou que os terpenos causam grandes aumentos na dinâmica dos lipídios. Entretanto, a técnica exige que a amostra contenha uma concentração de célula maior daquela que geralmente é utilizada nos ensaios de toxicidade celular. Os espectros podem ser obtidos a partir de concentrações de 10^8 células/mL e neste trabalho foi utilizada a concentração de 2×10^9 células/mL. Mas, para esta concentração celular alta, as concentrações de terpenos requeridas para causar alteração na membrana foram também altas, caindo na faixa dos milimolares e bem acima das concentrações que causam 50% de inibição do crescimento dos parasitos que geralmente ocorrem na faixa dos micromolares. Assim, nós realizamos testes de toxicidade dos terpenos para várias concentrações celulares no meio de cultura. Estes testes, baseados na clivagem do composto MTT pelos parasitos vivos, indicaram que para uma maior concentração de parasitos uma maior concentração de terpeno é necessária para inibir o crescimento. Além disso, foram realizados ensaios de toxicidade nas mesmas condições em que foram realizados os experimentos de RPE, ou seja, mesma concentração de célula e o mesmo tempo de incubação de 5 minutos após o tratamento com os terpenos. Os ensaios mostraram que as concentrações de terpenos que causam efeito na fluidez de membrana são similares daquelas que causam 50% de inibição do crescimento dos parasitos.

Tanto os resultados de RPE, indicando maior dinâmica dos lipídios da membrana

de *Leishmania* em presença dos terpenos, quanto os testes de citotoxicidade, mostraram que as concentrações de terpeno necessárias para gerar estes efeitos seguem a relação: nerolidol < α -terpineol = (+)-limoneno < 1,8-cineol. A concentração de atividade do nerolidol foi muito baixa e comparável com a atividade *in vitro* do fármaco miltefosina (licenciado para tratamento da leishmaniose), enquanto a concentração de atividade do 1,8-cineol foi muito alta e dos α -terpineol e (+)-limoneno foram intermediárias.

A dinâmica das proteínas de membrana da *Leishmania (L) amazonensis* na forma promastigota foi avaliada através de um marcador de spin específico para grupos tióis, sendo que os terpenos não causaram alterações significativas na dinâmica proteica nem mesmo em altas concentrações, diferente da miltefosina que em trabalho anterior foi avaliada por esta metodologia usando condições similares e demonstrou fortes aumentos na dinâmica das proteínas de membrana de *Leishmania*. Adicionalmente, quando as amostras tratadas com miltefosina foram centrifugadas apareceram no sobrenadante proteínas de membranas marcadas e no presente trabalho foi mostrado que o mesmo não ocorre para o tratamento com terpenos, sugerindo que os terpenos atuam essencialmente no componente lipídico da membrana.

Em elevadas concentrações de células (2×10^9 parasitos/mL), a incorporação dos terpenos na membrana celular se torna rápida e os valores de IC_{50} por um período de incubação de 24 h, não foram significativamente diferentes das observadas com apenas 5 minutos de incubação. Para baixa concentrações de células (5×10^6 células/mL), para 48 h e 24 h de incubação, também não foram identificadas diferenças significativas no valor do IC_{50} , sugerindo que o mecanismo de ação dos terpenos está associado com o ataque à membrana plasmática do parasito. Além disso, foi demonstrado que as mesmas concentrações de terpenos que inibem o crescimento dos parasitas e alteram a fluidez de membrana. Além disso, os terpenos tem causado uma pequena quantidade de lise celular que varia de 4 - 9% em concentrações próximas ao seus respectivos IC_{50} . Um mecanismo de ação baseado no ataque na membrana plasmática da *Leishmania* é consistente com o amplo espectro de atividade

relatada dos terpenos contra os protozoários, fungos patogênicos e células tumorais.

Bibliografia

AGUIRRE, R.; MAY, J. M. Inflammation in the vascular bed: Importance of vitamin c. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 119, p. 96–103, 2008.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3^a. ed. Porto Alegre - RS: Artes Médicas Sul Ltda, 1997. 584 - 614 p.

ALONSO, A. **Estudos por RPE de um radical nitróxido em monocristal: interação com prótons e relaxação eletrônica**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, Instituto de Física e Química de São Carlos, São Carlos, SP, 1986.

ALONSO, A.; MEIRELLES, N. C.; TABAK, M. Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an epr study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1237, p. 6–15, 1995.

ALONSO, A.; MEIRELLES, N. C.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, E. M. Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: correlation with water permeability, elastic, and electrical properties. **J. Invest. Dermatol.**, v. 106, p. 1058–1063, 1996.

ALONSO, A.; SANTOS, W. P. D.; LEONOR, S. J.; TABAK, M. Stratum corneum protein dynamics as evaluated by a spin-label maleimide derivative: Effect of urea. **Biophys. J.**, v. 81, p. 3566–3576, 2001.

ALONSO, A.; SILVA, J. V. D.; TABAK, M. Hydration effects on the protein dynamics in the outermost skin layer as evaluated by epr spectroscopy. **Biochim. et Biophys. Acta**, p. 32–41, 2003.

ALONSO, L.; MENDANHA, S.; MARQUEZIN, C.; BERARDI, M.; ITO, A.; ACUÑA, A.; ALONSO, A. Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. **Int. J. Pharm.**, v. 434, p. 391–399, 2012.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmania. **Adv. Parasitol.**, v. 61, p. 223–274, 2006.

ANJOS, J. L. D.; ALONSO, A. Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics o na amphipathic spin label in stratum corneum membranes. **International J. Pharmaceut**, v. 350, n. 1/5, p. 103–112, 2008.

ANJOS, J. L. V.; NETO, D. S.; ALONSO, A. Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. **Int. J. Pharm.**, v. 345, p. 81–87, 2007.

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

ANJOS, J. L. V. D.; NETO, D. S.; ALONSO, A. Effects of ethanol/l-menthol on the dynamics and partitioning of spin-labeled lipids in the stratum corneum. **European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 406–412, 2007.

ARRUDA, D. C.; D’ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679–1687, 2005.

ARRUDA, D. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. Inhibitory activity of limonene against leishmania parasites in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 643–649, 2009.

ARSOV, Z.; SCHARA, M.; STRANCAR, J. Quantifying the lateral lipid domain properties in erythrocyte ghost membranes using epr-spectra decomposition. **Magnetic Resonance**, v. 157, p. 52–60, 2002.

ASUNCION-PUNZALAN, E.; KACHEL, K.; LONDON, E. Groups with polar characteristics can locate at both shallow and deep locations in membranes: The behavior of dansyl and related probes. **Biochemistry**, v. 37, p. 4603–4611, 1998.

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

ATKINS, P.; PAULA, J. **Atkin, Físico-Química**. 8°. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC Editora, 2008. 467-503 p.

ATKINSON, J.; EPAND, R. F.; EPAND, R. M. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 739–764, 2008.

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; TASDEMİR, S. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 64, n. 3, p. 415–24, 2013.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARDON, S.; FOUSSARD, V.; FOURNEL, S.; LOUBAT, A. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. **Cancer Lett**, v. 181, p. 187–194, 2002.

BEACH, D. H.; HOLZ, G. G. J.; ANEKWE, G. E. Lipids of leishmania promastigotes. **J. Parasitol**, v. 65, n. 2, p. 201–217, 1979.

BERLINER, L. J. **Biological Magnetic Resonance**. New York, USA: Plenum Press, 2009.

BERMAN, J. D. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **VITAE Academia Biomédica Digital**, v. 12, n. 25, 2005.

BOLTON, J. R.; WERTZ, J. E. **Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications**. New York, USA: Chapman and Hall, 1986. 1-48 p.

BONDAR, O. P.; ROWE, E. S. Preferential interactions of fluorescent probe prondan with cholesterol. **Biophysical J.**, v. 76, p. 956–962, 1999.

BRAMHALL, J.; HOFMANN, J.; DEGUZMANN, R.; MONTESTRUQUES, S.; SCHELL, R. Temperature dependence of membrane ion conductance analyzed by using the amphiphilic anion 5/6-carboxyfluorescein. **Biochemistry**, v. 26, p. 6330–6334, 1987.

BRASIL. Leishmaniose visceral. In: SAÚDE, M. da (Ed.). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde /MS, 2007, (B55, v. 10). cap. Caderno 11, p. 31.

BRASIL. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. In: **Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, BR: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Guia de vigilância epidemiológica. In: **Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde**. Brasília, BR: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf>. Acessado em: 24 jan. 2013.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. 2012. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lta_entre_1990_e_2011.pdf>. Acessado em: 07 out. 2013.

BRUNI, A.; TOFFANO, G.; LEON, A.; BOARATO, E. Pharmacological effects of phosphatidylserine liposomes. **Nature**, v. 260, p. 331–333, 1976.

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. **J. of Magnetic Resonance**, v. 120, p. 155–189, 1996.

CAL, K.; JANICKI, S.; SZNITOWSKA, M. In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. **Int. J. of Pharmaceutics**, v. 224, p. 81–88, 2001.

CAMARGOS, H. S.; ALONSO, A. Electron paramagnetic resonance (epr) spectral components of spin-labeled lipid in saturated phospholipid bilayers. effect of cholesterol. **Quim. Nova**, XY, n. 00, p. 1–7, 2003.

CAMARGOS, H. S.; SILVA, A. H. M. S.; ANJOS, J. L. V.; ALONSO, A. Molecular dynamics and partitioning of di-tert-butyl nitroxide in stratum corneum membranes: Effect of terpenes. **Lipids**, v. 45, p. 419–427, 2010.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-leishmania e mecanismos de evasão. **Curr. Opin. Infec. Dis.**, v. 11, p. 707–710, 1998.

- CEVC, G.; MARSH, D. Phospholipid bilayers: Physical principles and models. In: BITTAR, E. E. (Ed.). **Cell Biology: a series of monographs**. New York-NY: John Wiley & Sons, 1987. v. 5, p. 2–26.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature**, v. 5, p. S7–S15, 2007.
- CHONG, P. L. Effects of hydrostatic pressure on the location of prodan in lipid bilayers and cellular membranes. **Biochemistry**, v. 27, p. 399–404, 1988.
- CLERC, S. G.; THOMPSON, T. R. Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phase. **Biophysical J.**, v. 68, p. 2333–2341, 1995.
- COLLADO, M. I.; GOÑI, F. M.; ALONSO, A.; MARSH, D. Domain formation in sphingomyelin/cholesterol mixed membranes studied by spin-label electron spin resonance spectroscopy. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 44, p. 4911–4918, 2005.
- COOPER, M. G.; HAUSMAN, R. E. A. **Célula: Uma Abordagem Molecular**. 3^o. ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2007. 79 p.
- CORNWELL, P. A.; BARRY, B. W.; BOUWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S. Modes of action of terpenes penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle x-ray diffraction and enhancer uptake studies. **Intern. J. Pharm.**, v. 127, n. 15, p. 9–26, 1996.
- 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, p. 23–31, 2005.
- COUTO, S. G. D. **RPE de proteínas marcadas nos resíduos de Lisina: Efeitos da Uréia em Estrato Córneo e Albumina**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, Goiânia, GO, 2003.
- CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v. 129, p. 775S–778S, 1999.
- CROWELL, P. L. In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. **Biochemistry and Physiology**, p. 775S–778S, 2009.
- DA, Y. Z.; ITO, K.; FUJIWARA, H. Energy aspects of oil/water partition leading to the novel hydrophobic parameters for the analysis of quantitative structure activity relationships. **J. Mes. Chem.**, v. 35, n. 18, p. 3382–3387, 1992.
- DESJEUX, P. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html>. Acessado em: 13 fev. 2013.
- DESOTI, V.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; SUDATTI, D.; PEREIRE, R.; ALONSO, A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. D.; NAKAMURA, C.; SILVA, S. D. O. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 1631–1646, 2012.

- DEVLIN, M. T. **Manual de Bioquímica com Correlação Clínicas**. São Paulo-SP: Blücher, 2007. 438-479 p.
- DIETRICH, D. R.; SWENBERG, J. A. The prevention of nitroso-methylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. **Cancer Res.**, v. 51, p. 3512–3521, 1991.
- DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DEVRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 67, p. 2576–2597, 2012.
- DOROSHENKO, A. O.; SYCHEVSKAYA, L. B.; GRYGOROVYCH, A. V.; PIVO-VARENKO, V. G. Fluorescence probing of cell membranes with azacrown-substituted ketocyanine dyes. **J. Fluorescence**, v. 12, p. 455–464, 2002.
- EL-KATTAN, A. F.; ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in hpmc gel systems. **Int. J. Pharm.**, v. 198, p. 179–189, 2000.
- ELEGBEDE, J. A.; MALTZMAN, T. H.; VERMA, A. K.; TANNER, M. A.; ELSON, C. E.; GOULD, M. N. Mouse skin tumor promoting activity orange peel oil and d-limonene: A re-evaluation. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 2047–209, 1986.
- FEHERE, G. **Electron paramagnetic resonance with applications to selected problems in biology**. 14^o. ed. California: Gordon and Breach Science Publishers, 1970.
- FOCACCIA, R. **Veronesi: Tratado de infectologia**. 3^a. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2005. 1562 p.
- FREED, J. H.; BRUNO, G. V.; POLNASZEK, C. F. Electron spin resonance lineshapes and saturation in the slow motional region. **Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 22, p. 3385–3399, 1971.
- FRÉZARD, F.; SHCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511–518, 2005.
- GOULART, H. R.; KIMURA, E. A.; PERES, V. J.; COUTO, A. S.; KARTZIN, F. A. A. D. A. M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoid in plasmodium falciparum. **AAC**, v. 48, n. 7, p. 2505–2509, 2009.
- GOULD, M. N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. **Environ. Health Perspect.**, v. 105, n. Suppl. 4, p. 977–979, 1997.
- GREAY, S. J.; IRELAND, D. J.; KISSICK, H. T.; LEVY, A.; BEILHARZ, M. W.; RILEY, T. V.; CARSON, C. F. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by malaleuca altemifolia (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 65, n. 5, p. 877–888, 2010.
- GRIFFITH, O. H.; JOST, P. Spin labeling, theory and application. In: BERLINER, L. J. (Ed.). **Lipid spin labels in biological membranes**. New York: Academic Press, 1976, (II, v. 6^o). cap. 12, p. 454–523.

- GRIFFITH, O. H.; WAGGONER, A. S. Nitroxide free radicals: Spin labels for probing biomolecular structure. **Acct. Chem. Res.**, v. 2, p. 17–24, 1969.
- HAGEN, W. R. **Biomolecular EPR Spectroscopy**. New York, USA: CRC press, 2009.
- HAMILTON, C. L.; MCCONNELL, H. M. **Structural Chemistry and Molecular Biology**. San Francisco, CA: [s.n.], 1968. 115 p.
- HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; WEBB, G.; CULLIS, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 812, p. 55–65, 1985.
- IPSEN, J. H.; MOURITSEN, O. G.; BLOOM, M. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. the effects of cholesterol. **Biophysical J.**, v. 57, p. 405–412, 1990.
- ISRAELASCHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. 2°. ed. San Diego: Academic Press, 1991.
- IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F. J.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 2994–3001, 2012.
- JACKSON, J. D. **Classical Electrodynamics**. 2°. ed. New York, U.S.A.: John Wiley & Sons, 1975. 75–77 p.
- JAIN, A. K.; THOMAS, N. S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride: I. effect of terpenes. **J. Control. Release**, v. 79, p. 93–101, 2002.
- JOST, P. C.; GRIFFITH, O. H.; CAPALDI, R. A.; VANDERKOOI, G. Evidence for boundary lipid in membranes. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 70, p. 480–484, 1973.
- KAISER, R. D.; LONDOR, E. Determination of the depth of bodipy probes in model membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1375, p. 13–22, 1998.
- 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, p. 1176–1184, 2005.
- KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J. M.; ANDREWS, P. C.; JUNK, P. C.; KEDZIERSKA, K. Leishmaniasis: Current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 599–614, 2009.
- KLYMCHENKO, A. S.; DUPORTAIL, G.; DEMCHENKO, A. P.; MÉLY, Y. Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. **Biophysical J.**, v. 86, p. 2929–2941, 2004.

- KUBO, R. A. Stochastic processes in chemical physics, advances in chemical physics. In: SHULER, K. E. (Ed.). **Stochastic theory of lineshape**. New York: Wiley, 1969. p. 101–127.
- KURAD, D.; JESCHKE, G.; MARSH, D. Lipid membrane polarity profiles by high-field epr. **Biophys. J.**, v. 85, n. 2, p. 1025–1033, 2003.
- LEWIS, T. P. W. M. and R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Cholesterol – phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, p. 459–468, 2004.
- LOPES, N. P.; KATO, M. L.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A. R.; KATZIN, A. M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (rol.) warb. by waiãpi amazon indians. **J. of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 313–319, 1999.
- MALTZMAN, T. H.; HURT, L. M.; ELSON, C. E.; TANNER, M. A.; GOULD, M. N. The prevention of nitroso-methylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. **Carcinogenesis**, v. 10, p. 781–783, 1989.
- MARSH, D. Polarity and permeation profiles in lipid membranes. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 7777–7782, 2001.
- MCCONNELL, H. M.; OHNISHI, S. J. Interaction of the radical ion of chlorpromazine with dna. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 87, n. 2293, p. 26, 1965.
- MENDANHA, S.; MOURA, S.; ANJOS, J.; VALADARES, M.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicol. In Vitro**, v. 27, p. 323–332, 2013.
- MORALES, M.; NAVARRO, M. C.; MARTIN, J.; VALERO, A.; LARA, A. M.; MORILLAS, S. B. F. *Leishmania infantum* promastigotes. ver. ibero-latinoam. **Ver. Ibero-latinoam. Parasitol.**, v. 68, p. 65–72, 2009.
- MOREIRA, R. A.; MENDANHA, S. A.; FERNANDES, K. S.; MATOS, G. G.; ALONSO, L.; DORTA, M. L.; ALONSO, A. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *leishmania* membranes at similar concentrations to those needed for cytotoxicity activity. In: . [S.l.]: AAC Accepts, 2014. DOI: 10.1128/AAC.01332-13.
- MOREIRA, R. A.; MENDANHA, S. A.; HANSEN, D.; ALONSO, A. Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. **J. Pharm Sci.**, v. 102, n. 5, p. 1661–9, 2013.
- MORIMOTO, H.; WADA, Y.; SEKI, T.; SUGIBAYASHI, K. In vitro skin permeation of morphine hydrochloride during the finite application of penetration-enhancing system containing water, ethanol and l-menthol. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 134–136, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica Ilustrada**. 27°. ed. São Paulo-SP: McGraw-hill, 2007. 115-124 p.

- NARISHETTY, S. T. K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **J. Control. Release**, v. 95, p. 813–824, 2004.
- NARISHETTY, S. T. K.; PANCHAGNULA, R. Effect of l-menthol and 1,8-cineol on phase behavior and molecular organization of sc lipids and skin permeation of zidovufine. **J. Control. Release**, v. 102, p. 59–70, 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4^a. ed. São Paulo - SP: Sarvier, 2006. 341 - 419 p.
- NETO, V. A.; GRYSCHER, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: Uma Abordagem Clínica**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008. 103-126 p.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11^o. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2005. 41–84 p.
- NORDIO, P. L. General magnetic resonance theory. In: BERLINER, L. J. (Ed.). **Lipid spin labels in biological membranes**. New York: Academic Press, 1976, (II, v. 6^o). cap. 1, p. 7.
- OLAGNIER, D.; COSTES, P.; LINAS, M. D.; URRUTIGOITY, M.; DECHY-CABARET, O.; BENOIT-VICAL, F. Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. **Bioorg Med. Chem. Lett**, v. 17, n. 22, p. 6075–6083, 2007.
- OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T.; PONTIERI, E.; FERRINI, A. M. Antimycotic activity of melaleuca alternifolia essential oil and its major components. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 37, p. 185–187, 2003.
- OLIVEIRA, M. A.; ADA, S. P.; BASTOS, R. P. de; LIMA, G. M.; PINTO, S. A.; PEREIRA, L. I.; PEREIRA, A. J.; IDE, A. A.; DORTA, M. L.; RIBEIRO-DIAS, F. Leishmania spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 52, p. 83–88, 2010.
- OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Mechanism of action of amphotericin b on leishmania donovani promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 19, p. 195–200, 1986.
- PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 55, p. 315–327, 2007.
- PAKE, G. E.; ESTLE, T. L. **The Physical Principles of Electron: Paramnetic Resonance**. 2^o. ed. [S.l.]: W. A. Benjamin, Advanced Book Program, 1973. 10–63 p.
- PALUMBO, E. Oral miltefosina treatment in children with visceral leishmaníases: a brief review. **Brazilian J. of Infections Diseases**, v. 12, n. 1, p. 2–4, 2008.
- PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and ?-terpineol on the ultrastructural changes of trichophyton mentagrophytes. **Fitoterapia**, v. 80, p. 290–296, 2009.
- PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. O método de marcadores de spin aplicado a bioquímica. **Química Nova**, p. 313–324, 1985.

- PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A interação do protozoário leishmania com seus insetos vetores. In: **Tópico Avançados em Entomologia Molecular**. [S.l.]: INCTEM, 2012. cap. 12.
- POOLE, C. P. J. **Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques**. 2^o. ed. New York, U.S.A.: Wiley Interscience, 1994. 387–465 p.
- QUEIRÓS, W. P. D.; NETO, D. D. S.; ALONSO, A. Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum. **J. Control Release**, v. 106, p. 374–385, 2005.
- RABI, T.; BISHAYEE, A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 115, p. 223–239, 2009.
- RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.
- REY, L. **Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais**. 4^o. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008. 359–410 p.
- RIEGER, P. H. **Electron Spin Resonance: Analysis and Interpretation**. Reino Unido, UK: RSC Publishing, 2007. 7 p.
- 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, p. 339–348, 1980.
- ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from cróton cajucara. **AAC**, v. 47, n. 6, p. 1895–1901, 2010.
- ROSANTEV, E. G.; SHOLLER, V. D. Synthesis and reactions of stable nitroxyl radicals. **Syntesus**, p. 190–202, 1971.
- ROTTAVA, I.; TONIAZZO, G.; CORTINA, P. F.; MARTELLO, E.; GRANDO, C. E.; LERIN, L. A.; TREICHEL, H.; MOSSI, A. J.; OLIVEIRA, D.; CANSIAN, R. L.; ANTUNES, O. A. C.; OESTREICHER, E. G. Screening of microorganisms for bioconversion of (-)- β -pinene and r-(+)-limonene to α -terpineol. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1128–1131, 2010.
- SAHA, A. K.; MUKHERJEE, J.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin b on leishmania donovani promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 19, p. 195–200, 1986.
- SALMON, C. E. G.; NETO, D. S.; TABAK, M.; FILHO, A. J. C. Simulação de espectros de ressonância paramagnética eletrônica (rpe) através do programa nls. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1240–1248, 2007.
- SANKARAM, M. B.; THOMPSON, T. E. Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 8686–8690, 1991.

- SANTOS, A. O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, 2013.
- SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evid. Based Complement Alternat Med.**, n. 89841, 2012.
- SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181–1185, 2002.
- SCHNEIDER, D. J.; FREED, J. H. Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a users guide. In: BERLINER, L. J.; REUBEN, J. (Ed.). **Biological Magnetic Resonance**. New York, U.S.A.: Plenum Press, 1989. v. 8.
- SHARMA, A.; SHARMA, U. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. progress and limitations. **International J. of Pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123–140, 1997.
- SHIMSHICKL, E. J.; MCCONNELL, H. M. Lateral phase separation in phospholipid membrane. **Biochemistry**, v. 12, n. 12, p. 2351–2360, 1973.
- SILVA, F. R. **Construção de um Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica em Banda S**. 4-31 p. Doutorado em Engenharia Elétrica — Universidade de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, SP, 2007.
- SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosina as an oral treatment for leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. Suppl.1, p. S17–S20, 2006.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª. ed. Porto Alegre - RS: Bookman, 2002. 322 - 339 p.
- SOTO, J.; SOTO, P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 4, p. 177–185, 2006.
- STOPAR, D.; STRANCAR, J.; SPRUIJT, R. B.; HEMMINGA, M. A. Motional restrictions of membrane proteins: a site-directed spin labeling study. **Biophys. J.**, v. 91, p. 3341–3349, 2006.
- STRANCAR, J.; SENTJURC, M.; SCHARA, M. Fast and accurate characterization of biological membranes by epr spectra. **J. Magn. Reson.**, v. 1422, n. 2, p. 254–265, 2000.
- 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, p. 394–406, 2005.
- SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; BHATTACHARYA, S. K.; RAI, M. Oral miltefosina for the treatment of indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100S, p. S26–S33, 2006.
- SWARTZ, H. M.; BOLTON, J. R.; BORGCULLITY, D. C. **Biological Applications of Electron Spin Resonance**. United States of America: John Wile & Sons, 1972. 1-116 p.

- TABAK, M.; ALONSO, A.; NASCIMENTO, O. R. Single-crystal electron-spin-resonance studies of a nitroxide spin label. 1. determination of the g and A tensors. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 79, p. 1628–1635, 1983.
- THOPPIL, R. J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World J. Hepatol.**, v. 27, p. 228–249, 2011.
- UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. **Bio-Pesticides DataBase. D-limonene**. 2013. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/2114.htm>>. Acessado em: 08 nov. 2013. Acesso em: 08 nov. 2013.
- UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. **Bio-Pesticides DataBase. Nerolidol**. 2013. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/2114.htm>>. Acessado em: 08 nov. 2013. Acesso em: 08 nov. 2013.
- URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. S91–S99, 1997.
- 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, p. 121–133, 2002.
- VELOSO, D.; CABRAL, A.; RIBEIRO, M. C. M.; MOTTA, J. O. C.; COSTA, I. M. C.; SAMPAIO, R. N. R. Leishmanose mucosa fatal em criança. **Anais brasileiros de dermatologia**, Rio de Janeiro, RJ, v. 81, n. 3, p. 255–259, 2006.
- VIEIRA-LACAZ, F.; MALNIC, C. **Biofísica**. Rio de Janeiro – RJ: [s.n.], 1981. 64–83 p.
- 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, p. 141–148, 1993.
- WASSEF, M. K.; FIORETTI, T. B.; DWYER, D. M. Lipid analyses of isolated surface membranes of leishmania donovani promastigotes. **Lipids**, v. 20, n. 2, p. 108–114, 1985.
- WATTENBERG, L. W.; SPARNINS, V. L.; BARANY, G. Mouse skin tumor promoting activity orange peel oil and d-limonene: A re-evaluation. **Carcinogenesis**, v. 49, p. 2689–2692, 1988.
- WEIL, J. A.; BOLTON, J. R.; WERTZ, J. E. **Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications**. New York, U.S.A.: Wiley Interscience, 1994. 479-487 p.
- WEINGÄRTNER, A. **The plasma membrane lipid asymmetry of Leishmania donovani and its Relevance for phagocytosis**. 1-17 p. Dissertação-Doutor rerum naturalium im Fach Biophysik — Humboldt University, Berlin, 2011.
- WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, First WHO report on neglected tropical diseases**. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/index.html>. Acessado em: 24 jan. 2013.

- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603–618, 2004.
- WU, C. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, J. J.; HUANG, C. H.; LIN, P.; CHANG, G. C.; CHANG, J. T.; LIN, C. C. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. **Evid. Based Complement. Alternat Med.**, v. 2012, p. 13, 2012.
- YANG, H.; DOU, Q. P. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: Implications for treatment of breast and prostate cancer. **Curr. Drug Targets**, v. 1, p. 733–744, 2010.
- YEAGLE, P. L. Cholesterol in membrane models. In: FINEGOLD, L. (Ed.). **Biophysics and Cell Biology of Cholesterol: An hypothesis for the essential role of cholesterol in mammalian cells**. Boca Raton-FL: CRC Press, 1993. p. 1–12.
- YERUVA, L.; PIERRE, K. J.; ELEGBEDE, A.; WANG, R. C.; W, C. S. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Lett**, v. 257, n. 2, p. 216–242, 2007.
- YONEYAMA, K. A. G.; TANAKA, A. K.; SILVEIRA, T. G. V.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Characterization of leishmania (viannia) braziliensis membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **J. of Lipid Research**, v. 47, p. 2171–2178, 2006.
- ZAVOISKY, E. J. **Phys.**, U.S.S.R., p. 17–24, 1945.
- ZHANG, K.; BEVERLEY, S. M. Phospholipid and sphingolipid metabolism in leishmania. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 170, p. 55–64, 2010.
- ZHAO, K.; SINGH, J. Mechanismo of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: eugenol, d-limonene and menthone. **J. Controlled Release**, v. 55, n. 6, p. 253–260, 1998.