



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Rafael Augusto Rocha Maia

**Efeito da floretina na hidratação de vesículas
neutras de agregados anfifílicos de DMPC.**

Botucatu

2008

Rafael Augusto Rocha Maia

**Efeito da floretina na hidratação de vesículas
neutras de agregados anfifílicos de DMPC.**

**Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu,
para obtenção do título de
Bacharel em Física Médica.**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez

Botucatu

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Maia, Rafael Augusto Rocha.

Efeito da floretina na hidratação de vesículas neutras de agregados anfífilos de DMPC / Rafael Augusto Rocha Maia.. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Física médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Roberto Morato Fernandez

1. Física médica 2. Ressonância Paramagnética eletrônica 3. Vesícula

Palavras-chave: Dimiristoil fosfatidilcolina; Floretina; Hidratação; Ressonância paramagnética eletrônica

**“A melhor de todas as coisas é aprender.
O dinheiro pode ser perdido ou roubado,
a saúde e força podem falhar,
mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre.”**

(Louis L'Amour)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família pela educação que me foi fornecida e que durante todos esses anos me incentivaram e me apoiaram, com palavras, gestos, incentivos e paciência.

Também gostaria de agradecer aos amigos, como aqueles sob o qual eu dividi o mesmo teto, mesmo que por um dia ao longo desses anos, ou aqueles com que compartilhei vários momentos especiais, dividindo conhecimento, diversão, companhia, felicidades, dificuldades e lembranças, e aos amigos que durante essa fase estavam me ajudando de alguma maneira. Agradeço também a II Turma de Física Medica da UNESP-Botucatu por todos os méritos conquistados e empecilhos ultrapassados, sem os quais não poderia ter a formação que hoje tenho.

Gostaria de agradecer também a todos que estão envolvidos no funcionamento de UNESP, como os diretores, funcionários, alunos, contribuintes, docentes, em especial ao meu orientador, por ter tornado esse trabalho possível.

Agradecerei também aos autores dos artigos, livros, textos, mesmo os autores que eu não conheço ou aqueles que não está mais entre nós, mas esses deixaram um legado que viesse a permitir a elaboração desse documento.

Finalmente gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente acreditaram em mim e colaboraram para realização desse trabalho.

Resumo

O efeito da floretina sobre estrutura e hidratação de vesículas de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) foi investigado através da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Variações desses parâmetros no centro da bicamada da membrana foram observadas através da inserção de uma sonda paramagnética derivada da fosfatidilcolina (marcador de spin do tipo 14-PCSL). Os espectros obtidos por essa sonda em vesículas de DMPC puro, e com adição de floretina, entre as temperaturas de 15°C a 50°C, foram simulados através de um método não linear de ajuste dos mínimos quadrados, utilizando o programa Nonlinear Least-Square (NLSL). Através das simulações foi possível analisar a hidratação e a ordem da bicamada, na região central da vesícula, a fim de caracterizar a interação da floretina com as membranas. Esses parâmetros indicam que a presença floretina nestas vesículas diminui a hidratação das mesmas, seja na fase gel ou fluida. Essa redução de moléculas de água no centro da bicamada é acompanhada pelo aumento da ordem da bicamada nessa micro-região analisada.

Palavras-chave: dimiristoil fosfatidilcolina, ressonância paramagnética eletrônica, floretina, hidratação.

Abstract

The effect of phloretin in the structure and hydration of dimiristoyl phosphatidylcholine vesicles (DMPC) was investigated by electron paramagnetic resonance technique (EPR) at the bilayer core of membrane, using 14-PCSL spin label derivative of phosphatidylcholine.

The spectra obtained by pure DMPC vesicles and with addition of phloretin were simulated using the Nonlinear Least-Square program, at the temperature between 15 °C to 50 °C. Through these simulations it was possible to analyse the membrane hydration and bilayer order, to understand the interaction between DMPC aggregates and phloretin.

The results show that the phloretin decreases the membrane hydration in both gel and fluid phases. This reduction of water molecules is accompanied by increasing of the bilayer order at this micro-region.

Key-words: dimiristoyl phosphatidylcholine, electron paramagnetic resonance, phloretin, hydration,

Sumário

Resumo

Abstract

1. Introdução	7
1.1. A membrana lipídica	8
1.2. A Floretina e o DMPC	10
2. Objetivos.....	12
3. Fundamentos teóricos	13
3.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	13
3.1.1. A Interação Zeeman	13
3.1.2. A Interação Hiperfina	16
3.1.3. Fator g.....	17
3.2. Espectrômetro de RPE	18
3.3. Simulação dos espectros de RPE.....	20
3.4. Sistemas de coordenadas	20
3.5. Parâmetros da simulação.....	21
3.5.1. Tensores magnéticos: tensor g e tensor de desdobramento hiperfino.....	22
3.5.2. Modelo de Difusão	24
3.5.2.1 Difusão rotacional Browniana	24
3.5.2.2. Difusão rotacional não-Browniana	24
3.5.2.3. Difusão por saltos discretos.....	25
3.5.2.3. Difusão anisotrópica	25
3.5.3. Parâmetros de ordenamento	25
3.5.4. Outros Parâmetros.....	26
4. Metodologia.....	27
5. Resultados e Discussões.....	29
6. Conclusões.....	33
7. Referências Bibliográficas.....	34

1. Introdução

O estudo da hidratação em membranas é de grande interesse biológico. A hidratação é responsável pela estabilidade de biomembranas e de proteínas em estado nativo. A permeabilidade da membrana lipídica a moléculas de água é

grande, embora a densidade de água no interior da bicamada seja possivelmente muito pequena, e varie conforme a região da bicamada. A diminuição da quantidade de água no interior da bicamada foi correlacionada a um decréscimo da permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas polares, sendo possivelmente relevante para a atuação biológica das membranas.

É sabido que existem duas diferentes populações de água no interior da bicamada: uma população de água estacionária, que hidrata a cabeça polar (Disalvo & Gier, 1989), e outra população de água não estacionária, que atravessa a bicamada.

Dada à importância do papel da água no funcionamento de agregados biomoleculares, é nosso interesse estudar a variação da quantidade de água em bicamadas lipídicas neutras de DMPC interagindo com a molécula floretina, através da técnica de RPE. Utilizando marcadores de spin, a presença de água no interior da bicamada lipídica foi estudada, sendo possível correlacionar a ordem e a polaridade de uma determinada micro-região (Berliner, 1976).

O entendimento da interação da floretina sobre as membranas biológicas pode propiciar o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que a floretina é encontrada na casca da maçã e tem efeitos específicos sobre o metabolismo humano. Um dos efeitos observados é a regulação de açúcar no sangue humano (LeFevre & Marshall, 1959).

1.1. A membrana lipídica

Os principais componentes de uma membrana são os glicerofosfolípidios, ele é composto por uma molécula de glicerol esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e no carbono 3 possui um grupo fosfato.

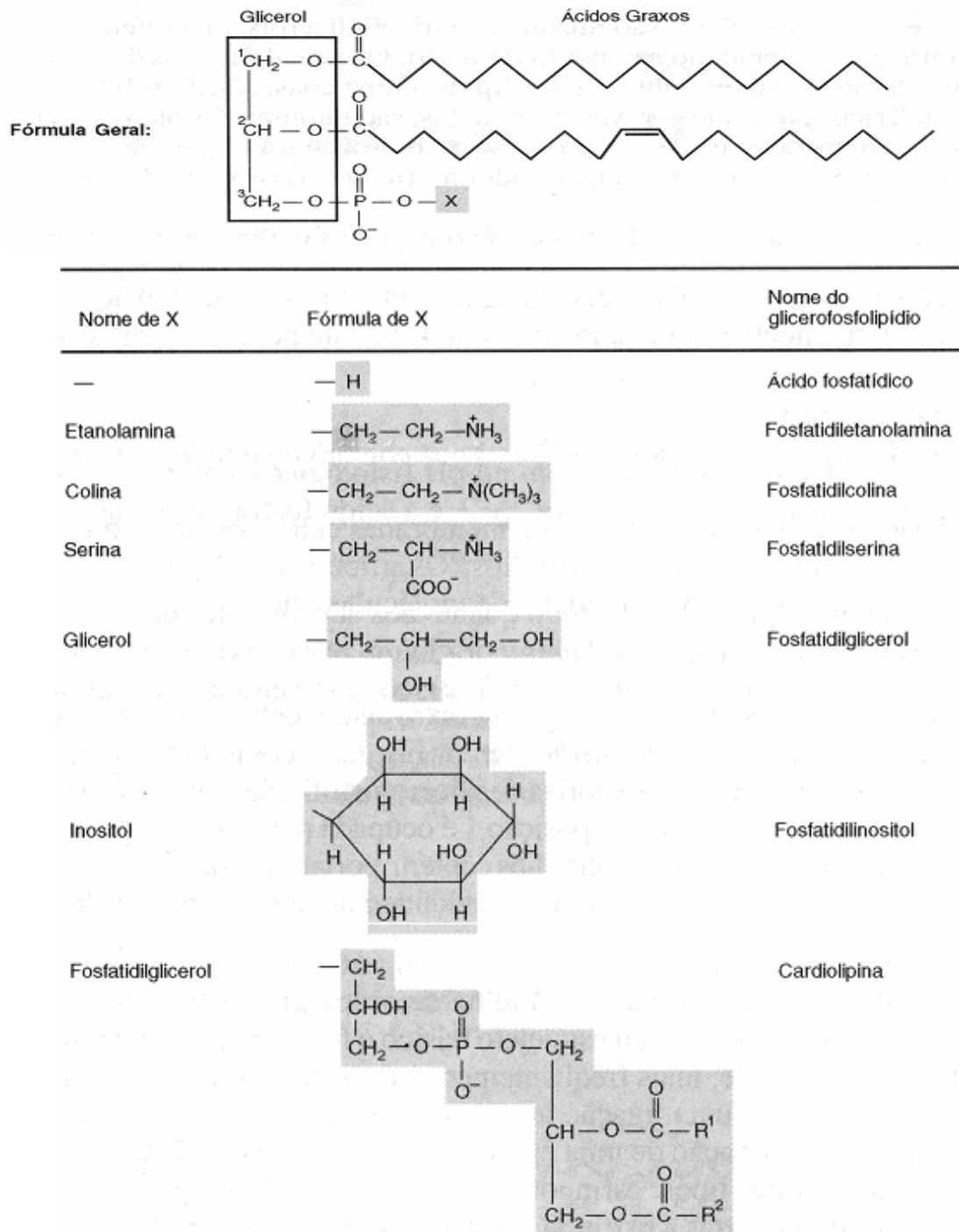


Figura 1 – Fórmula química geral e principais classes de glicerofosfolípidios.

Os glicerofosfolípidios apresentam duas grandes cadeias hidrocarbônicas hidrofóbicas (apolar) de ácidos graxos e uma “cabeça” hidrofílica (polar) que contém fosfato. Portanto, os glicerofosfolípidios são moléculas anfifílicas, ou anfipáticas (contém uma região hidrofílica e outra hidrofóbica).

Os lipídios em água tendem a formar estruturas moleculares, resultado da atração entre as moléculas devido à interação de van der Waals. Lipídios com uma cadeia hidrocarbônica apresentam uma região de interação cônica, assim quando disperso em água ocorrerá a formação de estruturas denominadas micelas (Figura 2a). Porém, lipídios com dupla cadeia carbônica em água tendem a formar bicamadas, devido ao a sua região de interação cilíndrica (Figura 2b). As bicamadas tendem a se organizar em vesículas, ou lipossoma (Figura 2c), podendo conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente. Esta configuração confere às membranas biológicas muitas de suas propriedades.

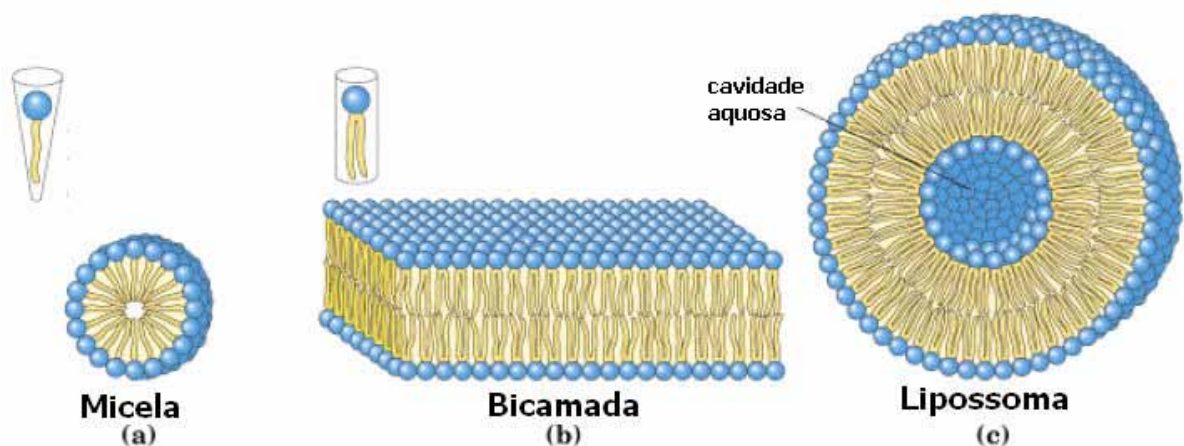


Figura 2 – Estruturas lipídicas formada em meio aquoso: a) Micela; b) Bicamada lipídica; e c) Vesícula unilamelar.

Uma membrana não é uma estrutura estática, os lipídios se movem proporcionando uma fluidez à membrana, sendo essa fluidez dependente da temperatura (ALBERTS, 1999).

1.2. A Floretina e o DMPC

Neste trabalho foi utilizado o glicerofosfolípídio dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) como modelo de membrana biológica. O DMPC quando disperso em água forma vesículas multilamelares, com um caráter eletrônico neutro.

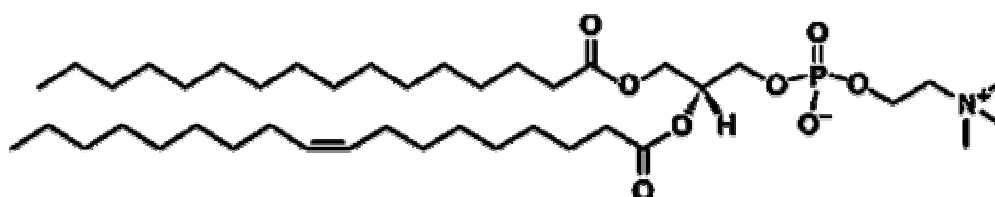


Figura 3 – Estrutura química do dimiristoil fosfatidilcolina

A floretina é conhecida como uma molécula que altera as propriedades elétricas e a permeabilidade das membranas. Ambos os efeitos são resultados da adsorção nas superfícies de monocamadas e bicamadas lipídicas causando uma alteração do potencial elétrico. Estudos sobre o transporte de glicose nas membranas de células de glóbulos vermelhos do sangue em seres humanos mostram que a floretina é um importante inibidor do transporte de glicose (LeFevre & Marshall, 1959).

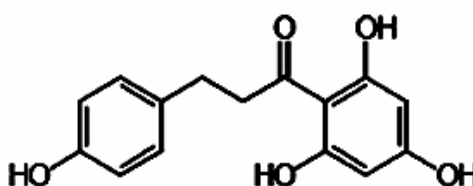


Figura 4 - Fórmula química da molécula floretina.

O efeito primário da floretina em membranas de DMPC é causado pela diminuição do potencial de dipólo da camada lipídica, que resultará em um alinhamento uniforme dos dipólos em direção oposta ao do lipídio. Assim, a região positiva da floretina adsorveria a porção aquosa e a região negativa se posicionaria nas cadeias carbônicas da membrana (Andersen et al, 1976).

Estudos com calorimetria diferencial de varredura demonstraram que a floretina reduz a temperatura de transição de fases em membranas de DMPC, indicando uma redução na ordem da bicamada (Cseh et al., 2000). Porém estudos posteriores demonstraram que a floretina altera a organização da água na região da cabeça, devido à desidratação dos grupos PO_2 , resultando num aumento do empacotamento na porção da cabeça (Diaz et al., 2001, Disalvo et al., 2004) .

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho é estudar as alterações na hidratação e estrutura de membranas lipídicas neutras de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) promovidas pela floretina. Através da técnica de RPE, com o auxílio do marcador de spin 14-PCSL, pretende-se simular os espectros destes marcadores nas vesículas no intervalo de temperatura entre 15°C e 50°C, a fim de correlacionar a permeabilidade da membrana com a ordem e hidratação na região considerada.

O presente trabalho utilizou os dados obtidos na dissertação de mestrado de Andreza Barbosa Gomide, realizado no Grupo de Biofísica e Física Médica do Instituto de Física da USP-SP.

3. Fundamentos teóricos

3.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A Ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica que detecta transições entre elétrons desemparelhados na presença de um campo magnético. Como as bicamadas não possuem elétrons livres é necessário utilizar um marcador de spin, que irá introduzir um grupo paramagnético no sistema, fazendo com que seja possível a análise da bicamada.

Um experimento de RPE é realizado mantendo-se constante a frequência da radiação eletromagnética e variando-se o campo magnético aplicado perpendicularmente ao campo elétrico, adquirindo assim os valores de absorção de energia em função do campo magnético. O espectro obtido é resultado das transições eletrônicas do estado fundamental para estados excitados. Em RPE a frequência de radiação está compreendida na faixa de 1 a 100GHz.

3.1.1. A Interação Zeeman

Na presença de um campo magnético os spins eletrônicos tendem a se alinhar com o campo de forma quantizada em diferentes estados de energia. Esse efeito é chamado efeito Zeeman. Esse número de estados possíveis varia conforme o número quântico de spin da partícula (S), obedecendo a distribuição de $2S + 1$ estados de energia. Para um elétron, $S = 1/2$, e portanto duas orientações em relação ao campo magnético aplicado são possíveis, uma paralela e outra antiparalela, correspondente aos estados de energia $M_S = +1/2$ e $M_S = -1/2$.

Para ocorrer uma transição eletrônica entre esses estados magnéticos, é necessário que a energia do fóton $h\nu$ corresponda à diferença de energia entre esses dois estados da molécula, condição conhecida como ressonância. Isto implica que a radiação eletromagnética deve estimular os dipólos magnéticos presentes na molécula, resultante do movimento de rotação intrínseca do elétron.

Os dipolos magnéticos são representados pela grandeza conhecida como momento de dipolo magnético ($\vec{\mu}$). O momento de dipolo magnético é diretamente proporcional ao seu momento angular de spin ($\vec{S}$), de forma que temos:

$$\vec{\mu} = -g_e \beta_e \vec{S} \quad (3.1)$$

sendo que $g_e \beta_e$ é o conhecido como a razão giromagnética, em que g_e é o fator g do elétron livre, e β_e é o magneton de Bohr, que é o momento magnético esperado para uma unidade de momento angular quântico dado por $\beta_e = \frac{eh}{4\pi m_e}$, sendo m_e a massa do elétron, e a carga do elétron e h a constante de Planck.

O sinal negativo da equação (3.1) indica que para um elétron, o momento magnético é antiparalelo ao spin.

A energia de uma partícula com momento magnético μ e o campo B é dado por:

$$\begin{aligned} U &= -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \\ U &= -\mu B \cos \theta \end{aligned} \quad (3.2)$$

Sendo θ o ângulo entre o momento de dipolo e o campo magnético (equação 3.2), quando θ for igual a 0° (dipolo paralelo à direção do campo magnético), o valor da energia é mínimo, e quando θ for igual a 180° (dipolo antiparalelo), o valor da energia é máximo.

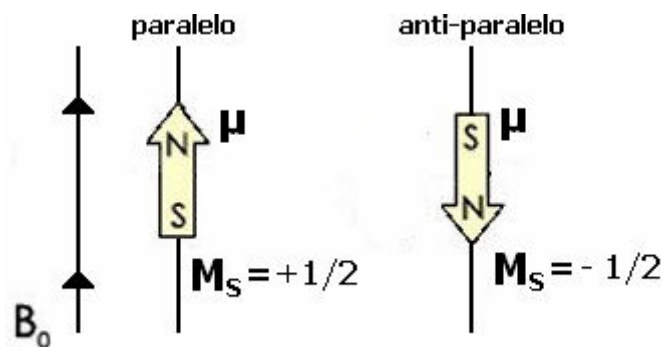


Figura 5 – Alinhamento dos momentos de dipolo magnético (μ) do elétron em relação ao campo magnético B_0 .

Para um sistema quântico, a substituição do momento magnético $\vec{\mu}$ da equação (3.1) na equação (3.2) resulta no termo da Hamiltoniana de spin eletrônico em presença do campo magnético externo aplicado:

$$H = g_e \beta_e \vec{S} \cdot \vec{B} \quad (3.3)$$

Supondo o campo magnético orientado no eixo z, a equação pode ser simplificada.

$$H = g_e \beta_e S_z B_0 \quad (3.4)$$

em que B_0 é a intensidade do campo B, e S_z é a componente de $\vec{S}$ no eixo z, representando o operador de spin, onde os auto-valores são iguais a $\pm 1/2$. Portanto temos:

$$U = \pm \frac{1}{2} g_e \beta_e B_0 \quad (3.5)$$

Através da diferença de energia entre esses dois níveis energéticos podemos obter a condição básica de ressonância para um elétron livre.

$$\Delta U = h\nu = g_e \beta_e B_0 \quad (3.6)$$

Isso implica que a incidência de uma radiação eletromagnética de energia $h\nu$ faz com que os elétrons sofram uma transição, indo de uma posição paralela para uma posição antiparalela ao campo magnético. Essa energia é normalmente fornecida por um campo de microondas de frequência fixa perpendicular ao campo magnético, sendo o campo variado até que ocorra a transição. Quando ocorre a transição o sistema absorve energia do campo de microondas, e esta é detectada por um sistema eletrônico, obtendo a derivada do espectro de absorção (Weil et al., 1994).

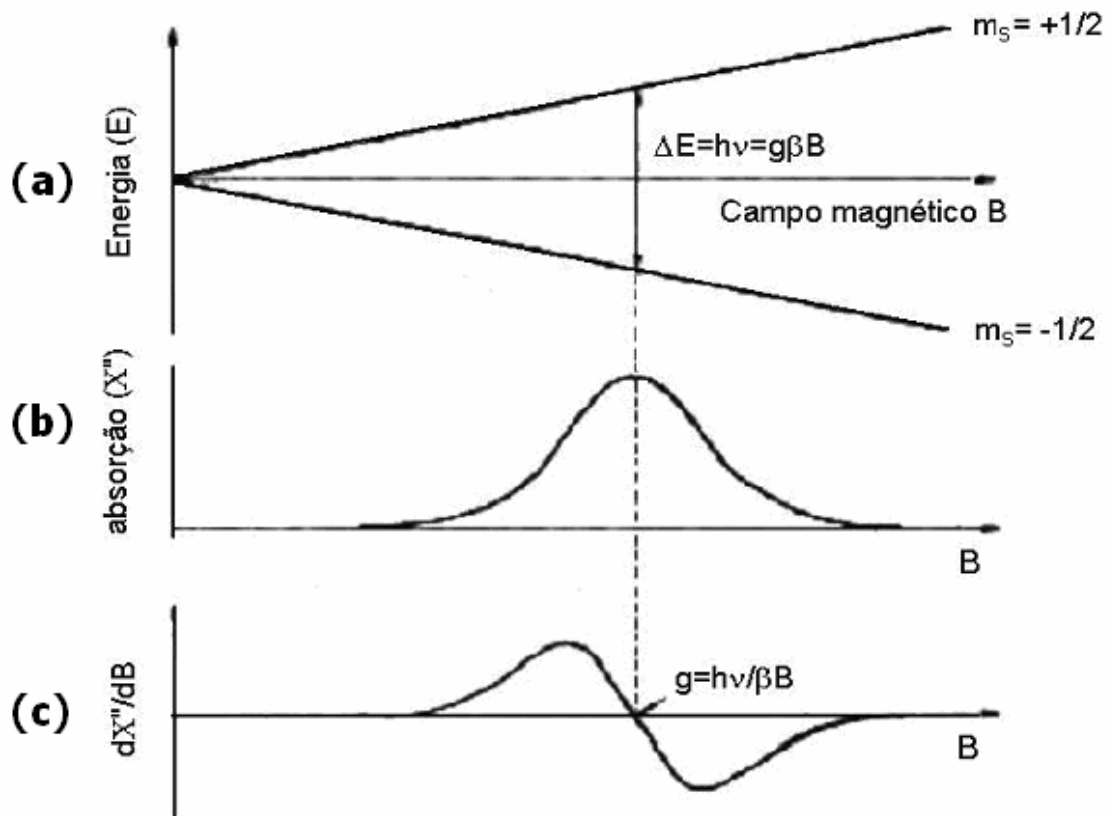


Figura 6 – (a) Desdobramentos dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético B , (b) espectro de absorção de energia do campo de microondas, e (c) derivada de espectro de absorção.

3.1.2. A Interação Hiperfina

O desdobramento hiperfino origina-se da interação entre o momento magnético eletrônico e o momento magnético dos núcleos vizinhos. O número de linhas hiperfinas de um núcleo depende do seu spin nuclear (I), obedecendo a distribuição de $2I + 1$ estados nucleares de spins possíveis. Para o nitrogênio, $I=1$, cada spin nuclear tem três possíveis orientações, $M_I = -1$, $M_I = 0$, e $M_I = +1$ (Weil et al. 1994).

A energia de interação hiperfina será dada por $\vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I}$, onde A é denominado como constante de desdobramento hiperfino, $\vec{S}$ é o momento angular

do elétron desemparelhado e $\vec{I}$ é o momento angular do núcleo vizinho, que será quantizado pelo número quântico M_I . Levando em consideração a contribuição da interação hiperfina, o Hamiltoniano torna-se:

$$H = g_e \beta_e \vec{S} \cdot \vec{B} + \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} \quad (3.7)$$

Portanto a condição de ressonância, se tornará: $h\nu = g_e \beta_e B_0 \pm \frac{1}{2} M_I A$

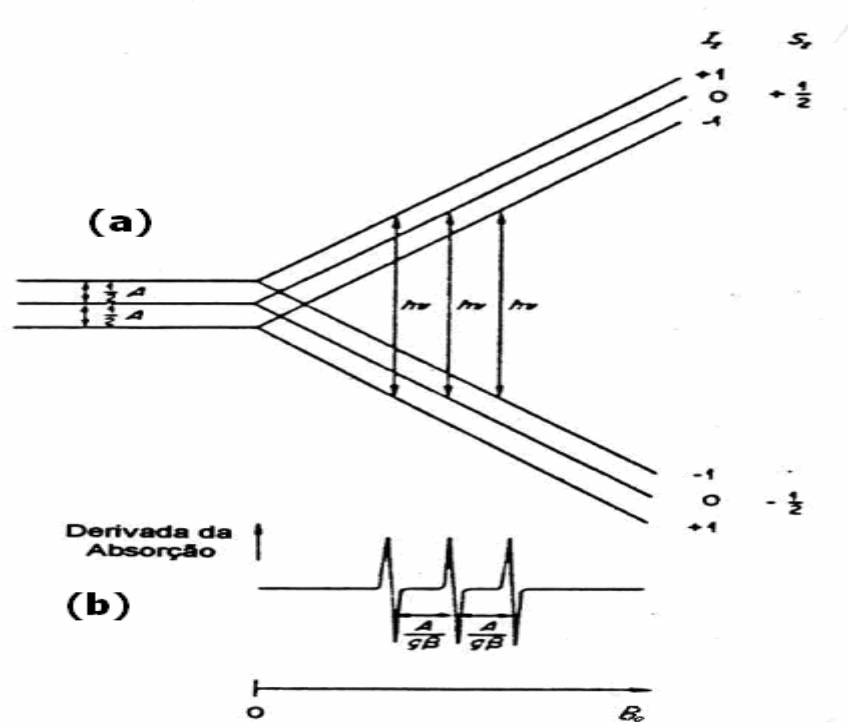


Figura 7 – (a) Desdobramento de energia e transições permitidas para um átomo de $S=1/2$ e $I=1$, (b) Primeira derivada do espectro de absorção.

3.1.3. Fator g

O fator g é uma constante intrínseca do elétron, considerando um campo magnético externo B_0 que age sobre o elétron. Esse campo magnético externo pode gerar um campo magnético interno na amostra, e esse campo será adicionado ou subtraído ao campo externo, assim o fator g efetivo será:

$$g = \frac{h\nu}{\beta B_0} \quad (3.8)$$

Deste modo, o fator g desloca-se em relação ao elétron livre de acordo com as interações com a vizinhança, podendo refletir as características da molécula

na qual os elétrons desemparelhados estão presentes. A medida de um fator g para um sinal desconhecido pode ser valiosa para auxiliar na identificação da origem deste sinal. A principal origem dos campos magnéticos locais é o momento magnético orbital, causando uma variação de g em relação a g_e , introduzido por uma mistura de estados excitados no estado fundamental. Para a maioria das moléculas, os desvios do fator g em relação a g_e dependem da orientação da molécula em relação ao campo magnético externo, ou seja, de sua anisotropia (Weil et al. 1994).

3.2. Espectrômetro de RPE

O espectrômetro pode ser resumido em três componentes principais: uma fonte de radiação eletromagnética, uma amostra e um detector. A amostra é colocada em uma cavidade ressonante que contém as dimensões necessárias para que a radiação incidente entre em ressonância, gerando ondas estacionárias. Toda a energia das microondas que entra na cavidade é armazenada, sendo dissipada na forma de calor, e nenhuma potência é refletida de volta. Se houver alguma variação no campo magnético que leve os elétrons da amostra à ressonância, parte da radiação da cavidade será absorvida, sendo essa intensidade detectada. O espectro de absorção da amostra será obtido através da diferença entre a radiação incidente e a radiação refletida. Em geral o espectro é na forma da primeira derivada (Figura 9b). A integral do espectro de absorção que corresponde a área sob o espectro (Figura 9a), fornece a concentração de marcador na amostra, pois a absorção é proporcional ao número de elétrons desemparelhados.

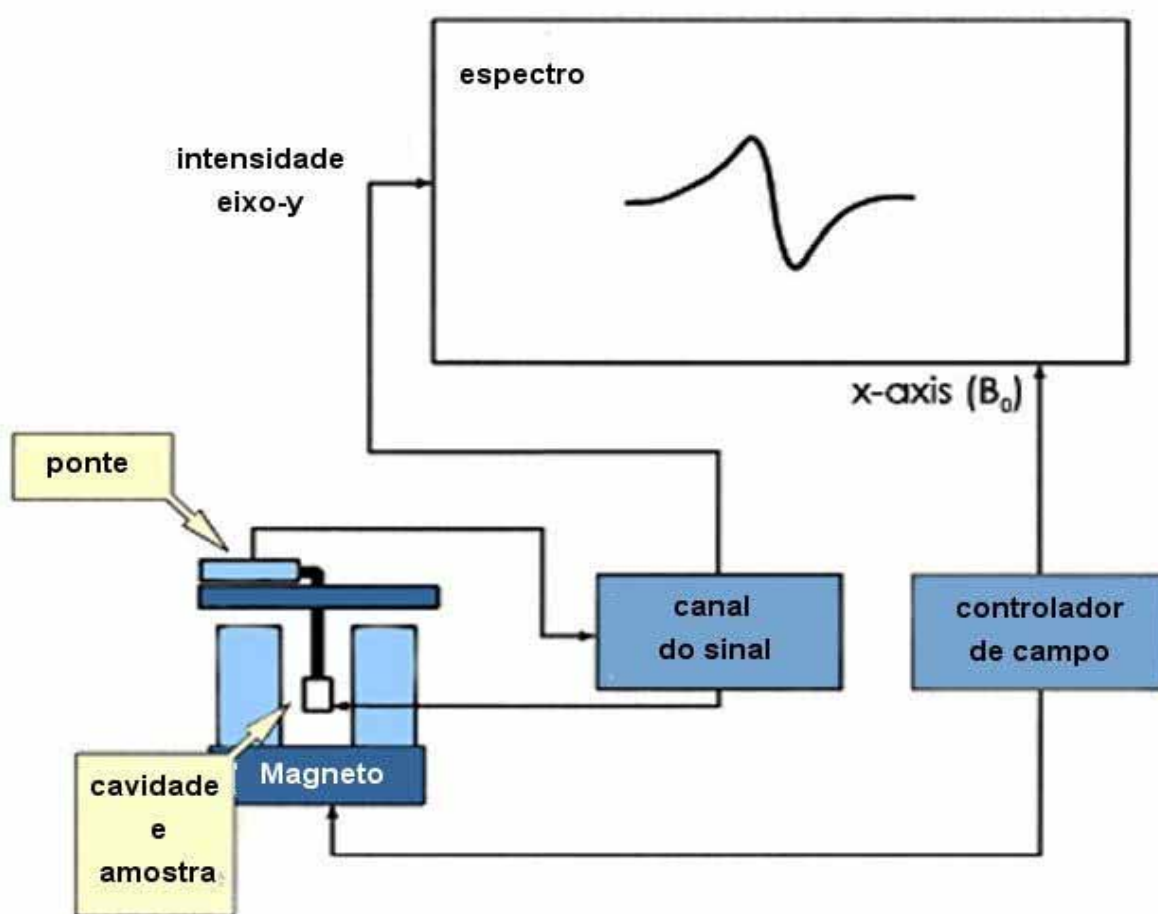


Figura 8 – Esquema simplificado de um espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica

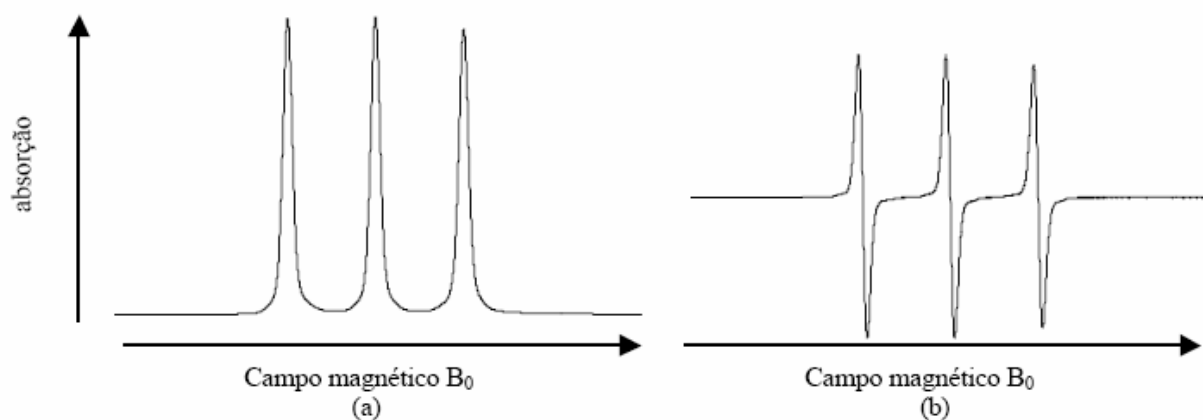


Figura 9 – (a) Espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro em função do campo magnético, ambos obtidos para o radical nitróxido.

3.3. Simulação dos espectros de RPE

Os espectros de RPE podem ser diferenciados em termos da dinâmica dos marcadores de spin, por três tipos de movimento: espectros de movimento rápido (“motional narrowing region”), de movimento lento (“slow-motion”) e limite rígido (“rigid limit”). As análises desses espectros de movimento lento, cujo tempo de correlação rotacional está entre 10^{-9} e 10^{-6} s, são dificultadas, pois devido ao movimento da molécula em estudo ou o movimento do marcador podem produzir linhas irregulares e complicadas. As simulações de espectro de RPE têm permitido visualizar mudanças que ocorrem nas propriedades do movimento dos marcadores de spin, mostrando aspectos dinâmicos dos sistemas em estudo, os quais com outras técnicas espectroscópicas não são facilmente percebidos, sendo necessário o uso de tecnologia computacional, pois o cálculo de uma simulação do espectro requer a solução de inúmeras equações de matrizes.

Nesse trabalho foi utilizado o programa “NLSL” (Nonlinear Least-Square) para fazer as simulações dos espectros. Este programa gera um espectro teórico a partir dos parâmetros definidos pelo usuário utilizando a equação estocástica de Liouville. O programa ajusta o espectro teórico ao experimental através de um algoritmo de minimização denominado método não linear dos mínimos quadrados.

O programa modela a reorientação de um sistema composto por um elétron e um núcleo (normalmente um nitróxido) através de três tipos de interação: (a) interação Zeeman do spin eletrônico, incluindo um fator g anisotrópico; (b) interação hiperfina elétron-núcleo; (c) interação Zeeman isotrópica do spin nuclear. (Budil et al., 1996).

3.4. Sistemas de coordenadas

Nas simulações realizadas pelo programa, são empregadas vários sistemas de coordenadas para representar completamente o problema: o *sistema diretor de coordenadas* (x_d, y_d, z_d) , que define a direção da molécula paramagnética na bicamada, sendo os eixos x_d e y_d tangenciais à superfície da mesma e o eixo z_d perpendicular a superfície da bicamada; o *sistema de coordenadas do*

laboratório (x_L, y_L, z_L) , onde o eixo z_L coincide com o campo magnético externo aplicado pelo espectrômetro; o *sistema magnético de coordenadas* (x_m, y_m, z_m) , que é definido pelos sistemas de eixos principais do tensor g ; o *sistema de coordenadas da interação hiperfina* (x_A, y_A, z_A) , que é definido pelos sistemas de eixos principais do tensor A ; e o *sistema de coordenadas de difusão rotacional* (x_R, y_R, z_R) , que é definido pelos sistemas de eixos principais do tensor rotacional R .

As relações entre esses sistemas de coordenadas são determinadas por diferentes conjuntos de ângulos de inclinação. Os ângulos de inclinação de difusão $\Omega = (\alpha_D, \beta_D, \gamma_D)$ são representados por ângulos de Euler e especificam a rotação do sistema do sistema magnético de coordenadas em relação ao sistema de coordenadas de difusão rotacional. Para levar o sistema de coordenadas hiperfinas para o sistema magnético de coordenadas é utilizada os ângulos de inclinação magnética $\Omega = (\alpha_m, \beta_m, \gamma_m)$. O sistema diretor de coordenadas e o sistema de coordenadas do laboratório se relacionam através do ângulo $\Omega = (0, \Psi, 0)$, sendo o ângulo Ψ referente ao ângulo entre o eixo diretor do fluido anisotrópico e o campo magnético. A transformação entre os diferentes sistemas é expressa por uma série de operações, uma rotação em torno do eixo z por um ângulo γ , uma rotação no eixo y através de um ângulo β , e uma rotação no eixo x por um ângulo α (Budil et al., 1996).

3.5. Parâmetros da simulação

Geralmente pode-se caracterizar 3 classes de parâmetros necessárias para a análise dos espectros: parâmetros magnéticos e estruturais, esses são representados pelos tensores magnéticos; parâmetros dinâmicos, que incluem os coeficientes de difusão rotacional; parâmetros de ordenamento; parâmetros inteiros, que define o tipo do modelo ou os cálculos utilizados (Budil et al., 1996).

3.5.1. Tensores magnéticos: tensor g e tensor desdobramento hiperfino

Os tensores g , referente ao fator g , e de desdobramento hiperfino (A), referente à interação hiperfina, são parâmetros magnéticos e estruturais que representam a anisotropia espectral. Esses tensores são definidos como matrizes cujas diagonais são (g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}) para o tensor g e (A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}) para o tensor desdobramento hiperfino.

Esses componentes podem ser determinados a partir do espectro de amostras de monocristais ou em um sistema onde os marcadores apresentam movimentos muito rápidos. Quando o marcador possuir uma dinâmica intermediária, esses valores de tensores não podem ser obtidos apenas pela observação do espectro experimental.

Se o sistema possuir um regime de movimento muito rápido, será encontrado um espectro isotrópico para a interação Zeeman do spin, isto é independe da orientação do campo magnético externo, então o tensor g pode ser substituído pelo g isotrópico (g_0), definido pela média de seus componentes do tensor g , dado por:

$$g_0 = \frac{g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}}{3} \quad (3.9)$$

Se o sistema possui simetria axial, então $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$, tendo $g_{//} = g_{zz}$ (paralelo ao eixo de simetria) e $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$ (perpendicular ao eixo de simetria), então a expressão 3.9 pode ser resumida em:

$$g_0 = \frac{g_{//} + 2g_{\perp}}{3} \quad (3.10)$$

Para o tensor desdobramento hiperfino, no caso de um sistema isotrópico o mesmo raciocínio pode ser seguido, onde a_0 será o valor do desdobramento hiperfino isotrópico:

$$a_0 = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{3} \quad (3.11)$$

$$a_0 = \frac{A_{//} + 2A_{\perp}}{3} \quad (3.12)$$

Em sistemas de limites rígidos (monocristal) com simetria axial é possível encontrar o valor do desdobramento hiperfino máximo ($A_{\max}$) e o valor do

desdobramento hiperfino mínimo ($A_{\min}$), como pode ser observado no gráfico da figura 10. Os valores de $A_{//}$ e $A_{\perp}$ podem ser encontrados através das relações abaixo, onde os valores de A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são componentes do tensor A para o radical nitróxido em um monocristal (Marsh, 1981).

$$A_{//} = A_{\max} \quad (3.13)$$

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1,4 \left[1 - \frac{A_{//} - A_{\min}}{A_{zz} - \frac{A_{xx} + A_{yy}}{2}} \right] \quad (3.14)$$

Em sistemas de movimentos rápidos, os valores de $A_{\max}$ e $A_{\min}$ não podem ser encontrados com a análise do espectro, porém é possível encontrar o valor de A_0 , como mostrado na figura 10 (Schneider e Freed, 1989; Budil et al., 1996).

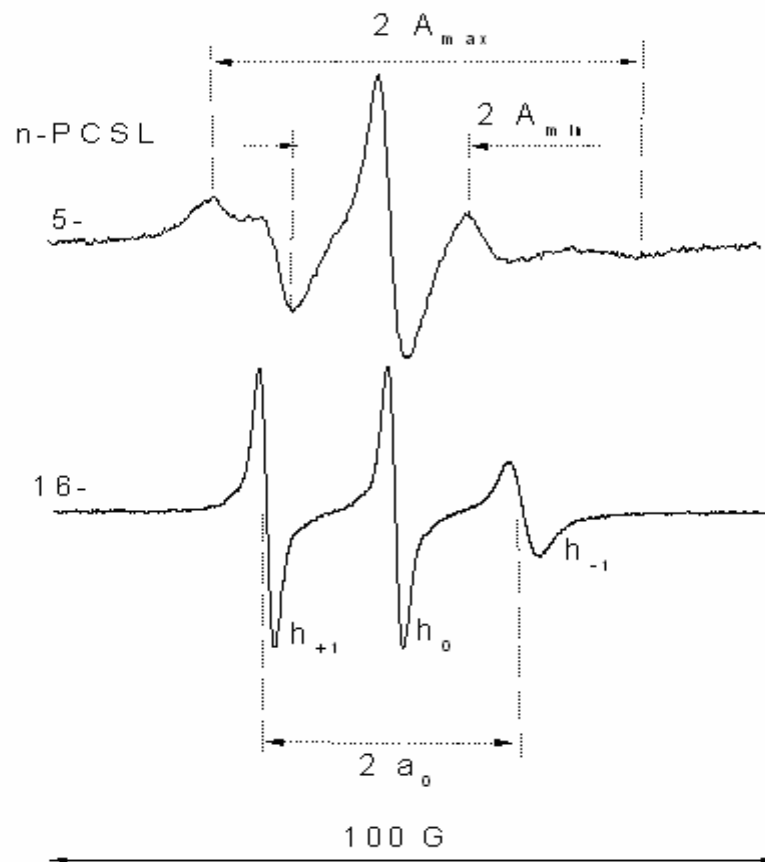


Figura 10 – Espectros dos marcadores 5-PCSL e 16-PCSL, indicando os parâmetros $A_{\min}$, $A_{\max}$ e a_0 obtidos a partir da análise dos espectros

3.5.2. Modelo de Difusão

Para os cálculos espectrais teóricos vários modelos de difusão foram incorporados ao programa: Difusão Browniana, difusão não-Browniana, difusão por saltos discretos, e difusão Anisotrópica. Esses modelos estabelecem como o marcador irá se reorientar em relação aos eixos moleculares de rotação (Budil et al., 1996).

3.5.2.1 Difusão rotacional Browniana

Essa difusão ocorre quando ocorre uma série infinita de reorientações dadas pelo tensor de difusão rotacional (D). Cada eixo molecular pode assumir um tempo de correlação característico diferente. No programa, o tensor D é dado em termos da variável R , mantendo a seguinte relação:

$$R = \log_{10}(D) \quad (3.15)$$

Assim como outros tensores, o tensor r pode ter sua anisotropia representada na forma cartesiana (r_{xx} , r_{yy} , r_{zz}) ou axial ($r_{//}$, $r_{\perp}$), caso se assuma uma simetria axial. Este modelo de difusão é recomendado para marcadores de spin com tamanhos intermediários e para macromoléculas marcadas, sendo o modelo mais usado.

3.5.2.2. Difusão rotacional não-Browniana

Nesse modelo de difusão, as reorientações são descontínuas, ocorrendo uma reorientação a cada intervalo τ_i em relação ao eixo específico, o eixo i . O valor quadrático médio da ângulo reorientado em relação a i é dado por:

$$\theta_{medio} = 6R_i\tau \quad (3.17)$$

Os parâmetros que definem esta reorientação são as variáveis $pmxy$ em relação ao plano xy e pml em relação ao eixo z .

$$\begin{aligned} pmxy &= R_{xy}\tau_{xy} \\ pml &= R_z\tau_z \end{aligned} \quad (3.18)$$

3.5.2.3. Difusão por saltos discretos

Pode ser adicionado aos modelos de difusão Browniana e difusão não-Browniana. Neste caso, a molécula salta para os primeiros sítios simétricos ao eixo molecular z_r , com uma taxa dada pela variável D .

3.5.2.3. Difusão anisotrópica

Este modelo representa uma anisotropia externa, em relação ao eixo fixo de coordenadas, útil no caso de fluidos ordenados. O marcador de spin gira, juntamente com o seu movimento browniano intrínseco em torno do eixo z_d do sistema diretor com $z_d = z_L(\psi = 0)$, isto é, a rotação em torno da direção do campo magnético externo. Este modelo não pode ser combinado com o modelo de difusão rotacional não-Browniana ou o modelo de difusão por saltos discretos.

3.5.3. Parâmetro de ordem

O parâmetro de ordem caracteriza o grau de organização do sistema, representando o potencial orientador presente em membranas biológicas, que restringe o movimento rotacional das cadeias lipídicas. Esse parâmetro varia entre zero e um, quanto mais próximo do um, maior será a anisotropia do sistema. Nas simulações, o parâmetro de ordem está relacionado aos coeficientes do potencial de orientação. Quanto menor for o valor desse coeficiente, maior será a entropia do sistema e maior será o desalinhamento do radical nitróxido em relação ao sistema de coordenadas diretor.

Adicionalmente a esta ordem microscópica pode existir uma desordem macroscópica, isto é, o marcador tem orientações preferenciais em relação à molécula onde está ligado, embora as diferentes moléculas na amostra possuam uma distribuição aleatória de orientações em relação ao campo magnético externo. Este caso específico é conhecido como ordem microscópica com desordem macroscópica (*MOMD*), sendo modelado integrando o espectro para um número

especificado de ângulos ψ . Ele é válido tanto para o modelo de difusão Browniana como para o de difusão anisotrópica (Salmon et al, 2007).

3.5.4. Outros Parâmetros

Além do tempo de correlação existem vários outros parâmetros na simulação que irão influenciar a largura das linhas, esses parâmetros representam não homogeneidades locais, tanto do campo magnético interno quanto do campo magnético externo gerado pelo espectrômetro. Essa correção pode ser obtida pelo coeficiente gib_0 que é usado quando as linhas têm uma forma mais aproximada à derivada gaussiana, ou seja mais abrupta nas bordas. Analogamente, existe uma matriz de largura de linha lorentziana adicional anisotrópica W . Esta matriz pode alargar seletivamente a linha do espectro de RPE correspondente a cada componente (W_{xx} , W_{yy} e W_{zz}). Por ex., W_{zz} alarga as linhas extremas (a de campo mais baixo e de campo mais alto) que correspondem a g_{zz} e A_{zz} (no caso do nitróxido) bem como a linha central. W também pode ser representada de três formas diferentes. Por último, o coeficiente gib_2 representa uma largura de linha gaussiana adicional dependente da orientação, onde:

$$gib = gib_0 - gib_2 \cdot \cos 2\psi \quad (3.19)$$

sendo que, ψ é o ângulo formado entre o eixo diretor e o campo magnético externo. Ele faz sentido unicamente quando temos medidas com diferentes orientações em relação ao eixo do campo externo ou no modelo *MOMD* ("Microscopic Order with Macroscopic Disorder"). O coeficiente pode ser associado à não homogeneidade do campo magnético externo. A diferença $gib_0 - gib_2$ deve ser positiva (Budil et al, 1996, Salmon et al, 2007).

4. Metodologia

As amostras foram preparadas com 10 mM de DMPC acrescido de 0,2 mol % de marcador 14-PCSL em solução de clorofórmio, com a subsequente remoção do solvente orgânico através da passagem de uma corrente de nitrogênio gasoso ultrapuro e permanência em vácuo por 2 horas. Posteriormente, foi adicionado 10mM de tampão HEPES acrescido de 2mM de NaCl, corrigindo o valor do pH da solução com NaOH, para um valor equivalente ao pH fisiológico igual a 7,4. (Fernandez & Lamy-Freund, 2000, Riske et al., 2004).

Os espectros de RPE foram obtidos no laboratório de Biofísica e Física Médica do Instituto de Física da USP/SP, utilizando o espectrômetro de RPE da Bruker modelo EMX, com frequência na faixa da banda X (9,4 GHz). A região monitorada pelo marcador incorporado à membrana foi a do centro da bicamada, mais especificamente a micro região em torno do 14º carbono da cadeia acila do fosfolípídeo.

Os espectros foram obtidos nas temperaturas entre 15°C e 50°C, variando a temperatura a cada 5°C, visando monitorar as diferentes fases de organização da vesícula. Amostras de DMPC com e sem a presença de floretina foram analisadas.

Para obter as simulações dos espectros foi usado o programa NLSL (Nonlinear Least-Square), desenvolvido pelo grupo do Dr. Jack H. Freed. (Schneider & Freed, 1989, Budil et al., 1996). A escolha inicial dos parâmetros usados nas simulações é feita usando parâmetros experimentais obtidos diretamente do espectro, valores mencionados em artigos já publicados, e o bom senso do usuário. Para este trabalho foi usado como base as simulações feitas para vesículas compostas pelo fosfolípídeo dimistiroil fosfoglicerol (Arima, 2007).

Os principais parâmetros usados nas simulações estão descritos abaixo:

Para os elementos da diagonal principal do tensor desdobramento hiperfino, cuja simetria axial foi considerada, os valores das componentes perpendiculares foram $A_{xx} = A_{yy} = 5,0$, deixando variar o valor da componente paralela A_{zz} .

Os valores para os elementos da diagonal principal do tensor g foram: $g_{xx}=2,0089$, $g_{yy}=2,0058$, e $g_{zz}=2,0021$.

Os ângulos de inclinação de difusão e magnético foram mantidos nulos, considerando que os sistemas de coordenadas estavam coincidentes.

Devido aos espectros obtidos, os parâmetros relacionados com o alargamento não homogêneo gaussiano, foram fixados em $gib_0=1,5$ e $gib_2=0.3$.

Os tempos de correlação rotacional e o coeficiente do potencial orientador foram variados.

5. Resultados e Discussões

A Figura 11 apresenta os espectros experimentais do marcador 14-PCSL (linhas pretas) incorporado em vesículas de DMPC em tampão HEPES pH 7,4, sem e com a adição de 2 mM de floretina, a diferentes temperaturas. As simulações (linhas vermelhas) também são apresentadas superpostas ao espectro experimental. Abaixo da temperatura de transição de fase principal gel-fluido T_m (em torno de 23 °C), os espectros apresentam linhas hiperfinas alargadas, resultante de um meio lipídico mais organizado, típico da fase gel. Acima da T_m , as linhas hiperfinas vão estreitando com o aumento da temperatura, indicando um ambiente mais desordenado, típico da fase fluida. Entretanto, nesta fase, não é possível observar diferenças óbvias entre os espectros com e sem a adição de floretina. Dessa forma, a simulação dos espectros torna-se imprescindível para obter diferenças entre estes espectros.

Com o uso da equação 3.11 é possível calcular o valor do desdobramento hiperfino isotrópico a_0 a partir dos valores A_{xx} , A_{yy} , e A_{zz} obtidos nas simulações dos espectros. Na figura 12 é apresentada a dependência a_0 em função da temperatura. Como pode ser observado, na presença de floretina o valor de a_0 é diminuído. Isto está relacionado a uma diminuição na polaridade da membrana, ocasionando uma redução na permeabilidade. Esse resultado é observado durante todas as fases da membrana, mantendo essa redução durante todas as temperaturas analisadas.

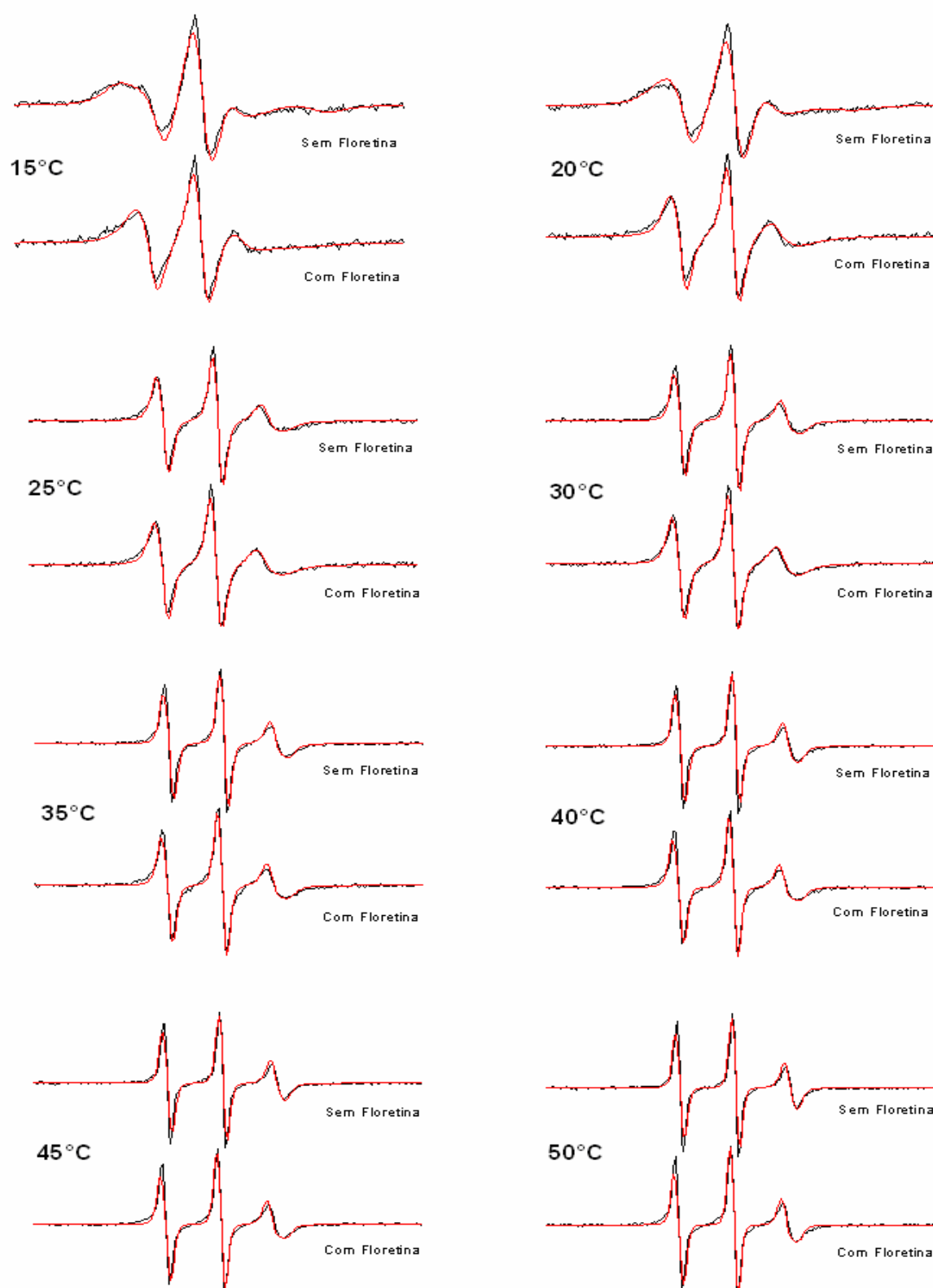


Figura 11 – Espectros experimentais e simulados do 14-PCSL incorporados em 10 mM DMPC em tampão HEPES acrescido de 2 mM de NaCl, com e sem adição de floretina, para as temperaturas de 15° a 50°. Os espectros experimentais estão representados em preto e os espectros simulados em vermelho.

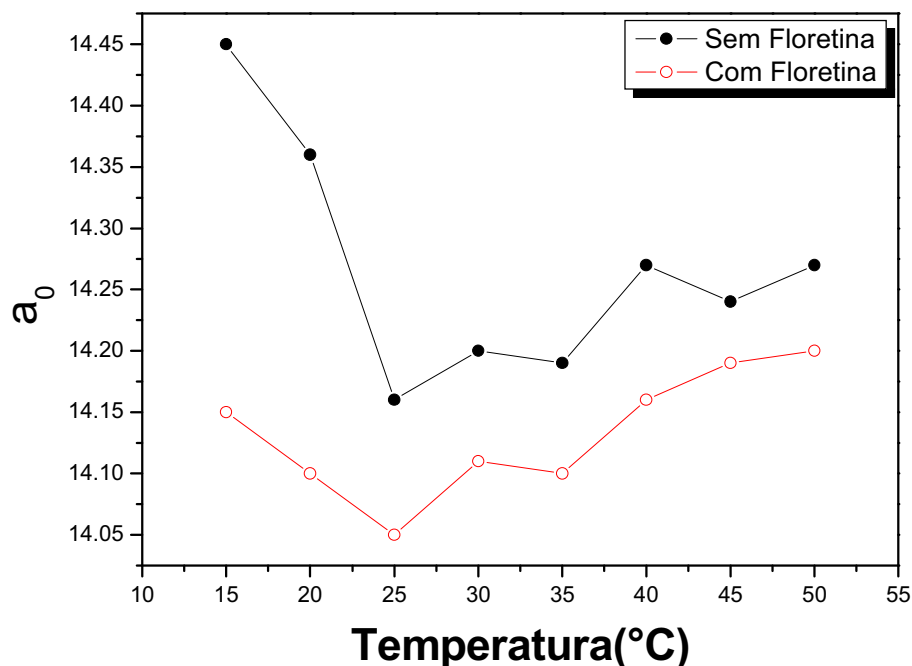


Figura 12 – Variação do desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) com a temperatura, para amostras de DMPC com e sem a adição de floretina.

Outro parâmetro analisado é a ordem da bicamada através do parâmetro d_{20} fornecido pelo programa ao término de cada simulação. Esse parâmetro está relacionado ao coeficiente do potencial diretor c_{20} . A figura 13 apresenta a variação de d_{20} com a temperatura. O meio lipídico está completamente ordenado se $d_{20}=1$, e completamente desordenado se $d_{20}=0$. As curvas representadas na figura 13 mostram um comportamento decrescente da ordem com a temperatura. Isso era esperado pois, como anteriormente mencionado, a fase gel da bicamada é mais ordenada que a fase fluida, devido à presença de conformações trans na cadeia acila.

Entretanto, somente a simulação permite concluir que a presença de floretina produz um aumento da ordem no centro da bicamada lipídica, aumentando assim o empacotamento da membrana, para todas as temperaturas observadas.

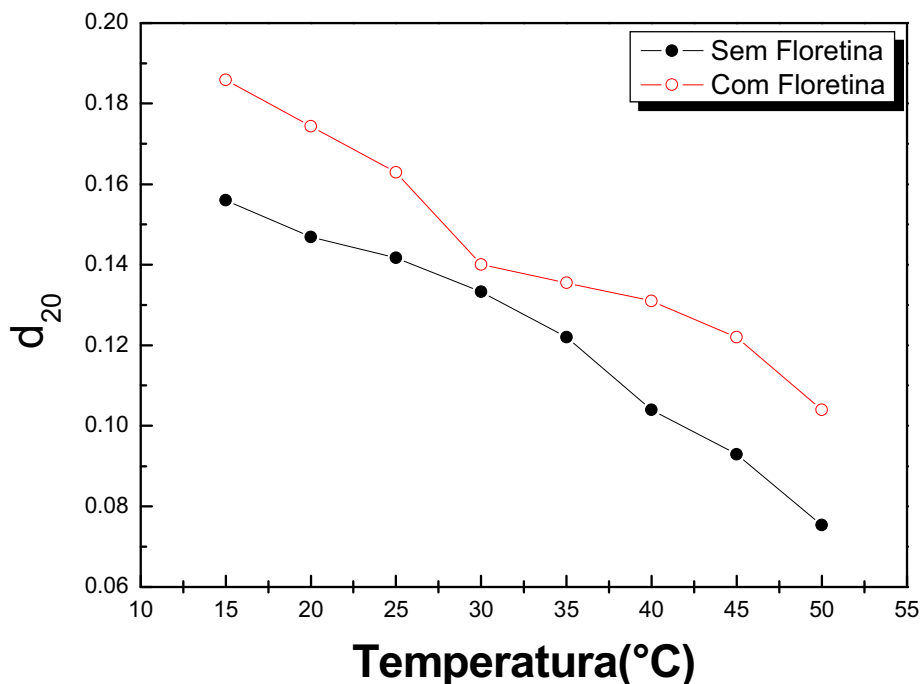


Figura 13 – Variação do parâmetro de ordem (d_{20}) com a temperatura, para amostras de DMPC com e sem a adição de floretina.

A taxa de difusão rotacional da sonda também foi analisada através dos parâmetros r_{prp} e r_{pll} , considerando uma simetria axial. A variação de r_{pll} mostra que a presença da floretina não alterou significativamente a difusão do marcador no meio lipídico na direção paralela à cadeia hidrocarbônica.

De maneira contrária, a análise de r_{prp} mostra uma variação perceptível da difusão do marcador na direção perpendicular à cadeia acila da bicamada, na presença de floretina. Entretanto, os resultados obtidos não permite, a priori, concluir sobre a difusão da sonda devido ao comportamento inesperado obtido na simulação.

6. Conclusões

A presença de floretina em vesículas neutras de DMPC altera a permeabilidade da membrana, ocasionando uma redução da quantidade de moléculas de água não estacionária na região central da bicamada. Essa redução pode ser explicada pela alteração da orientação do potencial de dipólo das cabeças polares da vesícula. Esse efeito pode ser observado tanto na fase fluida quanto na fase gel.

A redução de moléculas de água no centro da bicamada é acompanhada pelo aumento da ordem da bicamada, indicando um aumento no empacotamento da membrana, resultante da desidratação dos grupos PO_2 das cabeças polares devido à interação da floretina na superfície da vesícula. Esse resultado também é observado em todas as temperaturas analisadas.

Esses resultados concordam com resultados anteriormente obtidos (Disalvo et al., 2004), demonstrando que a simulação dos espectros obtidos pela técnica de RPE, pode ser usada como ferramenta para determinação da variação de parâmetros específicos da interação membrana/molécula.

7. Referências Bibliográficas

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAAF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Fundamentos de Biologia Celular: uma Introdução à Biologia Molecular da Célula, *Artes Médicas Sul, Porto Alegre*, 1999

ARIMA, A.A., Efeito da floretina em agregados anfifílicos negativamente carregados: um estudo por ressonância paramagnética eletrônica, *Trabalho de Conclusão de Curso, Univ. do estado de São Paulo, São Paulo*, 2007

ANDERSEN, O.S., FINKELSTEIN, A., KATZ, I., CASS, A., Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes, *J. Gen. Physiol.*, v.67, p.749 -771, 1976

ATHERTON, N.M., Principles of Electron Spin Resonance, Ellis Horwood, Chichester, 1993

BERLINER, L.J. *Spin Labeling, Theory and Applications*, Academic Press, 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. Mag. Res.*, v.120, p.155-189, 1996.

CSEH, R., BENZ, R., Interaction of Phloretin with Lipid Monolayers: Relationship between Structural Changes and Dipole Potential Change, *Biophys. J.*, v.77, p.1477-1488, 1999

CSEH, R., BENZ, R., Interaction of phloretin with membranes: on the mode action of phloretin at the water-lipid interface, *Euro. Biophys. J.*, v.29, p.172-173, 2000

DIAZ, S.B., LAIRION, F., ARROYO, J., LOPEZ, A.C.B., DISALVO, E.A., Contribution of Phosphate Groups to the Dipole Potential of Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes, *Langmuir*, v.17, p.852-855, 2001

DISALVO, E.A., DE GIER, J. Contribution of aqueous interphases to the permeability barrier of lipid bilayer for no-eletrolytes *Chem. Phys. Lipids*, v.32, p.39-47, 1989

DISALVO, E.A., LAIRION, F., MARTINI, F., AMALECK, H., Water in biological membranes at interfaces: does it play a functional role?, *J. Argentine Chem. Society*, v.92, p.1-22, 2004

GE, M., FREED, J.H., An electron Spin Resonance Study of interactions between Gramicidin A' and Phosphatidylcholine Bilayers, *Biophys. J.*, v.65, p.2106-2123, 1993

GE, M., FREED, J.H., Electron-Spin Resonance Study of Aggregation of Gramicidin in Dipalmitoyphosphatidylcholine Bilayers and Hydrophobic Mismatch, *Biophys. J.*, v.76, p.264-280, 1999

GE, M., FREED, J.H., Polarity Profiles in Oriented and Dispersed Phosphatidylcholine Bilayers are diferent: An Electron Spin Resonance Study, *Biophys.J.*, v.74, p.910-917,1998

FERNANDEZ, R.M., LAMY-FREUND, M.T. Correlation between the effects of a cationic peptide on the hidration and fluidity of anionic lipid bilayers: a comparative study with sodium ions and cholesterol *Biophys. Chem.*, v.87, p.87-102, 2000

FREED, J.H., Spin Labeling , Theory and Applications, *Academic Press*, p.53-132, 1976

KODAMA, M., MIYATA, T., Effect of Na⁺ concentrations on both size and multiplicity of multilamellar vesicles composed of negatively charged phospholipid as revealed by differential scanning calorimetry and electron microscopy, *Thermochimica Acta*, v.267, p.365-372, 1995

LEFEVRE, P. G., MARSHALI, J.K., The attachment of phloretin and analogs to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport. *J. Biol. Chem.*, v.234, p.3022–3026, 1959

MARSH, D., KLEINSCHMIDT, J.H., Spin Label Electron Spin Resonance Studies on Interactions of Lysine Peptides with Phospholipid Membranes, *Biophys. J.*, v.73, p.2546-2555, 1997

MARSH, D., Electron Spin Resonance: Spin Labels, *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, p.51-141, 1981

ONO, L. K., Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e análise do vidro aluminato de cálcio, *Univ. de São Paulo, São Paulo*, 2000

RISKE, K.A., AMARAL, L.Q., LAMY-FREUND, M.T. Mesoscopic Structure in the Chain-Melting Regime of Anionic Phospholipid Vesicles: DMPG. *Biophys. J.*, v.86, p.3722-3733, 2004

SALMON, C.E.G., NETO, D.S., TABAK, M., FILHO, A.J.C., Simulação de Espectros de Ressonância PARAMAGNÉTICA Eletrônica (RPE) através do programa NLSL, *Quim. Nova*, v.30, p.1240-1248, 2007

SCHNEIDER, D.J., FREED, J.H., Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra: A User's Guide, *Bio. Mag. Res.*, v.8, p1-76, 1989

VILHENA, F.S.D.S. , Mecanismo de Nitrosilação de Ferro-porfirinas por SNAP: Cinética de Reação e Estabilidade em Ambiente Aeróbico, *Dissertação (Doutorado) – Pontifícia Universidade do Rio De Janeiro, Rio e Janeiro*, 2008

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W., Fundamentals of Biochemistry, *John Wiley & Sons, New York*, 1999

WEIL, J.A., BOLTON, J.R., WERTZ, J.E., Electron Paramagnetic Resonance – elementary Theory and Pratical Applications, *John Wiley & Sons*, 1994

WIENER, M.C., SUTER, M., NAGLE, J.F., Structure of fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biophys. J.*, v.55, p.315-325, 1989