



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

ANDERSON AKIRA ARIMA

**Estudo comparativo entre as alterações produzidas pelas biomoléculas floretina e barbaloina na estrutura e na hidratação de membranas modelo negativamente carregadas de DMPG**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Farmacologia)

Botucatu  
2010

ANDERSON AKIRA ARIMA

**Estudo comparativo entre as alterações produzidas pelas biomoléculas floretina e barbaloina na estrutura e na hidratação de membranas modelo negativamente carregadas de DMPG**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Farmacologia)

**Orientador: André Sampaio Pupo**  
**Co-orientador: Roberto Morato Fernandez**

Botucatu  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO**

Arima, Anderson Akira.

Estudo comparativo entre as alterações produzidas pelas biomoléculas floretina e barbaloína na estrutura e na hidratação de membranas modelo negativamente carregadas de DMPG / Anderson Akira Arima. – Botucatu, 2010 / Anderson Akira Arima. – Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: André Sampaio Pupo

Co-orientador: Roberto Morato Fernandez

CAPES: 21000000

1. Biomoléculas. 2. Lipossomos. 3. Membranas (Biologia)

Palavras-chave: Floretina; Barbaloína; Ressonância paramagnética eletrônica; Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG); Hidratação.

# ***Dedicatória***

Aos meus pais,  
Roberto e Hilda, e à minha irmã, Andressa

# ***Agradecimentos***

Gostaria de expressar meus agradecimentos, de forma geral, a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e em particular:

- Ao Prof. Dr. Roberto Morato Fernandez, pela orientação, pelas discussões e pela amizade;
- Ao Prof. Dr. André Sampaio Pupo e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Gallacci pelas palavras de incentivo;
- À Prof. Dr.<sup>a</sup> Teresa Lamy e aos integrantes do laboratório de Biofísica e Física Médica (USP-SP), - em especial ao Tiago R. Oliveira, ao Evandro L. Duarte e ao Rafael P. Barroso-, pela ótima hospitalidade e pela colaboração na realização deste trabalho, sem as quais esta dissertação não seria possível;
- Aos colegas do Departamento de Física e Biofísica (UNESP-Botucatu): Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza, Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda, Prof. Dr. Marcos Roberto M. Fontes, Paulo (Sunga), Letícia (Skalar), Luiz (Chokito), Marcelo (Radianos), Márcio, Danilo (Biba), Viviam (Refugio), Guilherme (Culpado);
- Aos amigos e companheiros de república: Daniel (Panga), Eros (Motel), Felipe (Semsar), Rafael (Druida), Lécio (Tio Chico), Fabiano (Demorô), Scharles (Laion);
- À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia) pelo apoio financeiro concedido.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Ilustração da estrutura do glicerofosfolípido 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina ou fosfatidilcolina (PC). As numerações indicadas referem-se aos 3 carbonos pertencentes ao grupo glicerol (1,2,3-propanotriol). Substituições do grupo colina (caixa com linha sólida) por outros grupos de alcoóis são listados. Os nomes em parênteses referem-se à nomenclatura adquirida pelo lipídio devido à ligação do novo álcool. Figura editada de Vance & Vance (2008) ..... 16*
- Figura 2 – Ilustração da relação entre o envelope lipídico e a fase lipídica (organização) produzida em dispersão. Os termos (L $\beta$ ) e (L $\alpha$ ) indicam dois tipos de fases de bicamada: gel-cristalina (rígida) e líquido - cristalina (fluida), respectivamente. (Vance & Vance, 2008)..... 18*
- Figura 3– Ilustração da organização lipídica sob a forma de (A) micela e (B) vesícula unilamelar. Os envelopes cônico invertido (A) e cilíndrico (B) estão indicados. .... 19*
- Figura 4- Ilustração da estrutura básica das membranas biológicas: bicamada lipídica (folheto duplo) incorporada de proteínas integrais. As proteínas periféricas não atravessam a bicamada, ao contrário das integrais. As regiões hidrofílicas e hidrofóbicas estão indicadas. Os carboidratos também estão presentes, mas encontram-se associados a proteínas (glicoproteínas) ou a lipídios (glicolipídios). Figura adaptada de Lodish et al. (2000). .... 20*
- Figura 5- Ilustração dos diferentes modos de interação entre moléculas com lipossomos (Kulkarni, 2010). .... 21*
- Figura 6 – Ilustração dos tipos de conformações das ligações C-C em ácidos graxos: (A) trans, (B) gauche+ (rotação 120° horária) e (C) gauche- (rotação 120° anti-horária) ..... 23*
- Figura 7 – Ilustração do arranjo de (A) 3 moléculas com cadeias hidrocarbônicas saturadas (conformação trans), e de (B) 3 moléculas sendo apenas uma delas com cadeia hidrocarbônica insaturada (conformação cis). .... 23*
- Figura 8- Ilustração de um glicerofosfolípido juntamente com suas regiões de possíveis hidratações: 1. carbonila paralela ao plano da membrana, 2. carbonila normal ao plano da membrana, 3. Grupo fosfato (P=O), 4. grupo esterificado. A legenda indica o número de moléculas de água que podem se ligar aos diferentes átomos de oxigênio. A camada primária refere-se à camada de hidratação dos grupos C=O, C-O-C, P-O, C-O-P, enquanto a camada secundária refere-se à camada de hidratação que envolve a camada primária (Disalvo, Lairion, et al., 2004). .... 24*
- Figura 9 - Estrutura química do DMPG. (Fonte: Avanti Polar Lipids). .... 26*
- Figura 10 - Ilustração esquemática da diferenças do arranjo lipídico em bicamadas dependentes da variação da área ocupada pelas cabeças (a) em relação área ocupada pelas as cadeias hidrocarbônicas(b). A curvatura das bicamadas aumenta proporcionalmente ao incremento da área ocupada pelas cabeças: (C) <(B) < (A) (Kodama e Miyata, 1996). .... 26*
- Figura 11 – Curvas obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) de 50 mM DMPG em HEPES + 2 mM de NaCl e de 1 mM DMPC em HEPES. As curvas são plotadas em unidades de calor específico (Cp) e de temperatura (T) (Riske, Amaral e Lamy-Freund, 2001). .... 27*
- Figura 12– (A) Espectros que mostram a dependência do perfil calorimétrico do DMPG em relação à variação da concentração de Na<sup>+</sup> entre [0-500mM]. (B) Espectros que mostram a dependência do perfil calorimétrico com a variação do comprimento da cadeia hidrocarbônica. Os termos C13, C14, C15, C16 referem-se ao número de átomos de carbonos pertencentes aos diferentes lipídios de fosfatidilglicerol (PG): 13 carbonos para di(tridecanoil)PG, 14 carbonos para o DMPG , 15 carbonos para o di(pentadecanoil)PG e 16 carbonos para dipalmitoilPG, respectivamente. As setas indicam a presença do pico de pré-transição. A linha pontilhada indica o intervalo de temperatura para a transição de fase, enquanto a linha tracejada refere-se à temperatura de transição para o pico mais*

estreito. A concentração dos lipídios utilizada foi de 10 mM em pH=7.5. Os espectros são plotados em unidades de calor específico (Cp) e de temperatura (T) (Schneider, Marsh, et al., 1999)..... 28

Figura 13 - Modelo esquemático do comportamento das fases do DMPG. À esquerda são mostradas secções detalhadas da estrutura da bicamada (linha preta). Círculos azuis representam íons Na+, enquanto os círculos vermelhos e verdes representam regiões da cabeça desprotonadas (aniônicas) e protonadas (neutras), respectivamente. As cadeias acila são representadas por linhas conectadas às regiões da cabeça. À direita são mostrados esboços da geometria da vesícula. A, B, C, e D correspondem às fases gel, pré-transição (ripple), intermediária, e fluída, respectivamente (Alakoskela e Kinnunen, 2007). ..... 30

Figura 14 - Estrutura química da floretina (3-[4-hidroxifenil]-1-[2,4,6-trihidroxifenil]-1-propanona) (Cseh et al., 2000)..... 30

Figura 15 - Provável localização da floretina na interface lipídio-água em vesícula de DMPC (Diaz et al., 2001)..... 32

Figura 16- Ilustração da estrutura química da antraquinona glicosilada barbaloina ..... 33

Figura 17 – Ilustração do momento angular resultante ( $\mathbf{J}$ ) e de suas duas componentes: momento angular de spin ( $\mathbf{S}$ ) e momento angular orbital ( $\mathbf{L}$ ). ..... 35

Figura 18 – Ilustração do alinhamento dos momentos de dipolo magnético (paralela e antiparalela) do elétron devido à aplicação campo magnético  $\mathbf{H}_0$ . ..... 37

Figura 19- Ilustração da variação dos valores para a energia potencial magnética ( $U$ ) em função do ângulo  $\theta$ , o qual corresponde ao grau de alinhamento entre o momento magnético ( $\mu_j$ ) e à direção z do campo magnético ( $\mathbf{H}_0$ ) aplicado: (a) alinhamento a favor do campo ( $\theta=0^\circ$ ) produz um valor mínimo para ( $U$ ); (b) alinhamento arbitrário e (c) alinhamento no sentido oposto do campo ( $\theta=180^\circ$ ) produz um máximo valor para ( $U$ ). Figura adaptada de Weil e Bolton (2007). ..... 37

Figura 20- Ilustração da interação hiperfina: ação do campo magnético nuclear  $\mathbf{H}_1$  sobre o momento magnético eletrônico. .... 38

Figura 21- Ilustração dos níveis de energia adquiridos devido interação Zeeman ( $m_s=+1/2$ ) e hiperfina ( $m_l=+1, 0, -1$ ) típicas de um radical nitróxido onde  $S=1/2$  e  $l=1$ . As transições de energia permitidas estão indicadas e só ocorrem para  $\Delta m_l=0$ . ..... 41

Figura 22- (a) um momento magnético clássico  $\mathbf{M}$  (associado com um momento angular) diante da aplicação de um campo estático  $\mathbf{H}_0$  na direção z realiza um movimento de precessão na direção do campo aplicado com frequência angular correspondente a de Larmor ( $\omega_0$ ). (b) aplicação de um campo  $\mathbf{H}_1$  na direção perpendicular a  $\mathbf{H}_0$ , para um conjunto de coordenadas ( $x',y',z'$ ) com o eixo  $z'$  coincidente com o eixo z. (c) para um observador nos eixos ( $x',y',z'$ ), o vetor  $\mathbf{M}$  realiza um movimento de precessão em torno da direção do campo  $\mathbf{H}_1$  com frequência ( $\omega_1$ ). Figura adaptada de Brustolon e Giamello (2009). ..... 43

Figura 23- Ilustração de dois modos de realização de um experimento de RPE: (a) aplicação de um campo magnético estático ( $\mathbf{H}_0$ ) e de uma microonda, cuja frequência é variada linearmente. As linhas horizontais paralelas indicam que a diferença energética entre dois estados  $\alpha$  e  $\beta$  é mantida fixa, enquanto as linhas verticais de diferentes comprimentos indicam que a energia fornecida pela microonda é variada linearmente; (b) aplicação de uma microonda com frequência fixa e variação linear da intensidade do campo magnético aplicado. As linhas inclinadas indicam que a diferença energética entre dois estados  $\alpha$  e  $\beta$  é variada proporcionalmente à variação da intensidade campo magnético, enquanto as retas verticais indicam que a energia fornecida pela microonda é mantida fixa. O cruzamento entre as linhas sólidas indicam a ocorrência do fenômeno da ressonância para os dois modos. Figura adaptada de Brustolon e Giamello (2009). ..... 46

Figura 24 – Diagrama de blocos do espectrômetro de RPE: ponte, cavidade ressonante, magneto e espectro de RPE. .... 47

- Figura 25 - Exemplo de espectros de movimento rápido obtidos para o radical nitróxido: (a) espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro de absorção. .... 48
- Figura 26- Estrutura química do marcador de spin do tipo 16-PC (16-fosfatidilcolina). O sistema de eixos magnéticos ( $x_m, y_m, z_m$ ), o eixo rotacional  $z_R$  e o eixo diretor  $z_d$  estão indicados (Costa-Filho, Shimoyama e Freed, 2003)..... 50
- Figura 27 - Estrutura química do marcador de spin dipalmitoilfosfatidiltempocolina (DPPTC). O sistema de eixos magnéticos ( $x_m, y_m, z_m$ ), rotacional ( $x_d, y_d, z_d$ ) e o eixo diretor  $z_d$  estão indicados (Ge e Freed, 1998). .... 51
- Figura 28- Espectros de marcadores nitróxido do tipo  $n$ -PC(fosfatidilcolina), onde (A)  $n= 5$  para o marcador de superfície e, (B)  $n=16$  para o marcador no final da cadeia carbônica (marcador do centro da bicamada). Os parâmetros  $A_{MÁX}$ ,  $A_{MÍN}$  e  $a_0$  estão indicados. .... 54
- Figura 29 – Espectros de RPE obtidos para o campo magnético aplicado sobre o (a) eixo-x, (b) eixo-y, e (c) eixo-z. Em (d) representa-se um espectro de pó (anisotrópico) e em (e) espectro isotrópico independente da orientação do campo magnético aplicado (Marsh, 1981). .... 57
- Figura 30- Ilustração esquemática de um espectro isotrópico mostrando os picos baixo ( $m=+1$ ), central ( $m=0$ ) e alto ( $m=-1$ ) e suas respectivas alturas ( $h$ ) e larguras ( $\Delta h$ )..... 58
- Figura 31- Ilustração esquemática de um aparelho de DSC de compensação de potência: duas células (uma para a amostra e outra para a referência) contendo resistências e sensores de temperatura individuais. A temperatura entre as células é mantida invariável durante um resfriamento ou aquecimento das células através de variações na potência da resistência da amostra. Figura adaptada de Menczel e Prime (2009). .... 60
- Figura 32- Ilustração de um perfil calorimétrico contendo um processo endotérmico e outro exotérmico para uma mesma amostra. A primeira estrutura (pico) corresponde a um aumento do calor específico e, portanto, refere-se a uma transição típica de um estado mais organizado para um menos organizado. A segunda estrutura (vale) corresponde à perda de calor específico pela amostra, isto é, perda de solvatação (recristalização), referindo-se a uma transição de um estado menos organizado para um mais organizado. Figura adaptada de Gabbott (2008). .... 61
- Figura 33- Ilustração esquemática de um perfil calorimétrico de uma transição endotérmica para um sistema lipídio-água. Os parâmetros  $T_{on}$ ,  $T_m$  e  $T_{off}$  correspondem às temperaturas de início, de fase principal e do final de transição, respectivamente. A área abaixo da curva correspondente a energia principal absorvida na transição ( $\Delta H$ ). Figura adaptada de Chapman et al. (1974). .... 63
- Figura 34- Marcador de spin do tipo (A) 16-PCSL e (B) Tempo-PC Fonte: Avanti Polar Lipids ..... 64
- Figura 35 – Espectros experimentais do marcador de spin 16-PC incorporados em vesículas de DMPG puro (curva preta) e com a adição de 2 mM de floretina (curva vermelha) ou 2 mM de barbalóina (curva verde) para (A) 5 °C, (B) 25 °C e (C) 45 °C. A linha tracejada indica a posição do segundo pico na região do campo alto. .... 68
- Figura 36- Dependência da largura de pico de campo baixo ( $\Delta h_{+1}$ ) com a temperatura em espectros do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲)..... 69
- Figura 37- Dependência da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) com a temperatura em espectros do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲). .... 70
- Figura 38- Dependência do desdobramento hiperfino isotrópico ( $a_0$ ) com a temperatura para o espectro do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e com acréscimo de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲)..... 70

Figura 39- Valores de $R_{\perp}$ obtidos a baixas temperaturas (15 °C a 19 °C) para os espectros do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).....	72
Figura 40- Valores de $S_{20}$ obtidos a baixas temperaturas (15 °C a 19 °C) para o espectro do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).....	72
Figura 41- Valores de $S_{22}$ obtidos a baixas temperaturas (15 °C a 19 °C) para o espectro do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).....	73
Figura 42- Valores de $R_{\perp}$ obtidos a altas temperaturas (35 °C a 45 °C) para os espectros do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).....	74
Figura 43- Valores de $S_{20}$ obtidos a altas temperaturas (35 °C a 45 °C) para o espectro do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲). A linha tracejada indica a linha base sobre o valor zero....	74
Figura 44- Valores de $S_{22}$ obtidos a altas temperaturas (35 °C a 45 °C) para o espectro do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).....	75
Figura 45- Espectros experimentais obtidos para o marcador de spin Tempo-PC em DMPG puro (A) e acrescido de 2 mM de floretina (B) a diferentes temperaturas. ....	76
Figura 46- Valores obtidos para (a) a razão entre a largura ( $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$ ) de pico de campo baixo e central, (b) larguras dos picos para campo central ( $\Delta h_0$ ) e (c) larguras para campo baixo ( $\Delta h_{+1}$ ) em função da temperatura para espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●).....	77
Figura 47- Variação de $R_{\perp}$ com a temperatura para os espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●). ....	78
Figura 48- Variação de $R_{//}$ com a temperatura para os espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●). ....	79
Figura 49- Variação de $S_{20}$ com a temperatura para os espectros do TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●). ....	80
Figura 50- Variação de $S_{22}$ com a temperatura para os espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●). ....	80
Figura 51- Perfis calorimétricos de vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲). As curvas são plotadas em unidades de calor específico (kcal/mol/°C) para as ordenadas e unidades de temperatura (°C) nas abscissas. As curvas calorimétricas para DMPG acrescido de moléculas interagentes (floretina ou barbaloína) são mostradas numa escala quatro vezes maior que a empregada para DMPG puro.....	81
Figura 52- Valores obtidos para a entalpia de transição em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲). As curvas são plotadas em unidades de energia (kcal/mol) para as ordenadas e unidades de temperatura (°C) nas abscissas. .	82
Figura 53 – Ilustração (A) do efeito da presença de moléculas de gramicidina A (GA) em bicamadas lipídicas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a valores de concentrações inferiores e superiores a DPPC/GA = 15; (B) estrutura do marcador 16-PC na conformação trans com o sistema de eixos diretor ( $z_d$ ) e magnéticos ( $x_m, y_m, z_m$ ).....	84

Figura 54 - Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores 16-PC incorporados em vesículas de DMPG puro..... 90

Figura 55 - Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores 16-PC incorporados em vesículas de DMPG acrescidas de 2 mM de floretina..... 91

Figura 56 - Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores 16-PC incorporados em vesículas de DMPG acrescidas de 2 mM de barbaloína..... 92

Figura 57- Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores Tempo-PC incorporados em vesículas de DMPG puro. .... 93

Figura 58- Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores Tempo-PC incorporados em vesículas de DMPG acrescidas de 2 mM de floretina..... 94

## Resumo

A floretina (3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-1-propanona) é uma dihidrocalcona presente principalmente em maçãs que ultimamente vem sendo empregada para fins terapêuticos e cosméticos. Essa molécula tem demonstrado interagir com membranas modelo neutras e carregadas, alterando a hidratação, a qual é importante tanto para a estabilidade de bicamadas, como para suas permeabilidades seletivas. Neste trabalho, o efeito da floretina foi estudado em lipossomos (vesículas) negativamente carregados de DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol) a baixa força iônica (10 mM HEPES pH 7.4 + 2 mM NaCl). Os resultados foram comparados com os obtidos para a barbalóina [10-glicopiranosil-1,8-dihidroxi-3-(hidroximetil)-9(10H)-antraceno], - uma antraquinona glicosilada extraída de folhas de diferentes plantas do gênero *Aloe* -, porque essa biomolécula demonstrou ser capaz de interagir fortemente com vesículas de DMPG a baixa força iônica. As alterações dinâmicas e estruturais foram monitoradas pela técnica espectroscópica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) através da incorporação de marcadores de spin nas membranas lipídicas. Os dados foram analisados através de parâmetros medidos diretamente sobre os espectros e por meio de parâmetros simulados (soluções da equação estocástica de Liouville para um conjunto de spins magnéticos). Os resultados de RPE no intervalo entre 5 °C e 10 °C mostraram que a floretina aumenta sensivelmente a anisotropia tanto na superfície quanto no centro das bicamadas; enquanto que entre 15 °C a 19 °C, tanto a floretina como a barbalóina aumentam a mobilidade e a fluidez no centro da bicamada. Para altos valores de temperaturas (35 °C a 45 °C) a adição da floretina aparentemente não alterou a hidratação, mas mudou significativamente o empacotamento e a difusão molecular na região das cabeças polares; enquanto a barbalóina aumentou a hidratação tanto nas regiões próximas à superfície quanto no centro da bicamada, e produziu grandes alterações estruturais (“dobras”) principalmente nas porções terminais das cadeias hidrocarbônicas. Os resultados obtidos para a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) indicam que ambas as moléculas acabam com a existência do pico de pré-transição (próximo dos 10 °C) e reduzem a cooperatividade dos lipídios na região de transição da fase gel

para a fase líquido-cristalina dos agregados de DMPG. As posições da floretina e da barbaloína nas bicamadas de DMPG são discutidas baseando-se nos diferentes resultados de RPE e DSC obtidos para a presença de cada uma dessas moléculas.

**Palavras-chave:** *floretina, barbaloína, ressonância paramagnética eletrônica, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), hidratação, calorimetria diferencial de varredura (DSC)*

## Abstract

Phloretin (3-(4-Hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanone) is a dihydrochalcone present mainly in apples, which lately has been used for medical and cosmetic purposes. It has been shown that phloretin interacts with neutral and charged model membranes, changing the hydration, which is important as for bilayer stability as for its permeability properties. In this work, the effect of phloretin was studied in negatively charged DMPG (dimyristoylphosphatidylglycerol) liposomes (vesicles) at low ionic strength (10mM Hepes pH 7.4 + 2 mM NaCl). The results were compared with the biomolecule barbaloin (10-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-9(10H)-anthracenone), - a known active ingredient extracted from leaves of different *Aloe* plants -, because this glycosilated anthraquinone has showed to interact strongly with DMPG vesicles at low ionic strength. The dynamics and structural changes were monitored by ESR (electron spin resonance), using spin labels incorporated in the membranes. The data were analyzed by using parameters measured directly on the spectra and by simulated parameters (solutions of the stochastic Liouville equation for a set of magnetic spins). The ESR results for the interval between 5 °C and 10 °C showed that phloretin increases strongly the anisotropy on the surface as well as at the bilayer core, while between 15 °C to 19 °C, phloretin and barbaloin increase the mobility and the fluidity at the bilayer core. For high temperature (35 °C to 45 °C) the presence of phloretin apparently did not alter the hydration, but changed significantly the packing and the motional diffusion of the lipid polar heads; while barbaloin increased the hydration on the surface as well

as the bilayer core, but produced great structural changes (“folds”) mainly at the end of the hydrocarbon chains. The results obtained for the differential scanning calorimetry (DSC) indicate that the both of them abolish the pre-transition pick (around 10 °C) and reduce the cooperativity of the gel to liquid-crystalline transition of DMPG aggregates. The position of the phloretin and the barbaloin in DMPG bilayers will be discussed on the basis of the difference of ESR and DSC results obtained for the presence of each one of these molecules.

***Key words: phloretin, barbaloin, electron paramagnetic resonance (ESR), dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), hydration, differential scanning calorimetry (DSC)***

# SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1. Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1 Glicerofosfolípidios: os lípidios de membrana mais abundantes.....	15
1.2 Agregados lipídicos e estruturas lamelares.....	17
1.3 Membranas biológicas: barreiras semipermeáveis .....	19
1.4 Lipossomos: membranas modelo .....	21
1.5 Características físico-químicas das bicamadas .....	22
1.5.1 A temperatura de transição de fase .....	22
1.5.2 Hidratação .....	23
1.6 A membrana modelo de DMPG .....	25
1.7 A Floretina.....	30
1.8 A Barbaloína .....	33
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>3 Técnicas experimentais.....</b>	<b>34</b>
3.1 Técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica .....	35
3.1.1 Interação Zeeman e interação hiperfina .....	35
3.1.2 O fenômeno da ressonância.....	39
3.1.3 As equações de Bloch .....	42
3.1.4 O espectrômetro de RPE .....	46
3.1.5 O espectro de RPE.....	48
3.1.6 Os parâmetros analisados dos espectros de RPE .....	49
3.1.6.1 O fator <i>g</i> e o fator <i>desdobramento hiperfino</i> .....	51
3.1.6.2 Parâmetro de ordem.....	54
3.1.6.3 Tempos de correlação rotacional.....	56
3.1.6.4 Larguras e alturas das linhas espectrais.....	58
3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	59
3.2.1 O aparelho de DSC .....	59
3.2.2 Os parâmetros analisados das curvas calorimétricas de DSC .....	60
<b>4 Materiais e métodos.....</b>	<b>63</b>
4.1 Materiais.....	63
4.2 Dispersão lipídica .....	64

4.3	Espectroscopia de Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) .....	65
4.4	Análise térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	66
<b>5</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>67</b>
5.1	Marcador 16-PC.....	67
5.1.1	Análise da fluidez e da polaridade .....	68
5.1.2	Análise dos parâmetros simulados.....	71
5.2	Marcador Tempo-PC.....	75
5.2.1	Análise da fluidez .....	77
5.2.2	Análise dos parâmetros simulados.....	78
5.3	Medidas de DSC .....	81
<b>6</b>	<b>Discussão dos Resultados</b> .....	<b>83</b>
6.1	Efeitos no centro da bicamada.....	83
6.2	Efeitos na superfície da bicamada .....	85
6.3	Efeitos sobre a transição de fase .....	86
<b>7</b>	<b>Discussões gerais e Conclusões</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Apêndice</b> .....	<b>89</b>
8.1	Espectros simulados .....	89
8.1.1	Espectros para o marcador 16-PC em DMPG .....	90
8.1.2	Espectros para o marcador 16-PC em DMPG acrescido de 2 mM de floretina .....	91
8.1.3	Espectros para o marcador 16-PC em DMPG acrescido de 2 mM de barbaloína .....	92
8.1.4	Espectros para o marcador Tempo-PC em DMPG.....	93
8.1.5	Espectros para o marcador Tempo-PC em DMPG acrescido de 2 mM de floretina .....	94
<b>9</b>	<b>Referências</b> .....	<b>95</b>

## 1. Introdução

A água é a substância mais abundante na superfície da Terra e representa o líquido mais essencial à vida: todas as reações bioquímicas são realizadas em ambiente aquoso e a hidratação de estruturas orgânicas é de grande interesse biológico, uma vez que ela contribui para a estabilidade estrutural de biomembranas e de proteínas em estado nativo. Considerando que as membranas lipídicas agem como barreiras semipermeáveis, não é surpresa que as superfícies dessas bicamadas apresentam alto grau de hidratação, já que, as cabeças dos lipídios de membrana são estruturas polares e estão em contato direto com os compartimentos aquosos delimitados por essas barreiras. Por outro lado, em se tratando da hidratação no interior das membranas, somente após a realização de pesquisas empregando técnicas tais como a ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e a fluorescência, através da incorporação de sondas de spin e de sondas fluorescentes, respectivamente, foi comprovado que moléculas de água podem ser encontradas mesmo no interior hidrofóbico das bicamadas lipídicas, tanto em membranas modelo, como naturais (Griffith, Dehlinger e Van, 1974; Harris, Power, *et al.*, 1983; Subczynski, Wisniewska, *et al.*, 1994; Ho, Slater e Stubbs, 1995; Ge e Freed, 1998). Por essa razão, o estudo de biomoléculas capazes de alterar o grau de hidratação ao longo de diferentes profundidades das bicamadas lipídicas tem sido alvo de muitas pesquisas (Fernandez e Lamy-Freund, 2000; Ge e Freed, 2003; Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008).

Lipossomos, também conhecidos como vesículas lipídicas, são estruturas lamelares concêntricas e separadas por um meio aquoso. Formam-se espontaneamente em ambiente aquoso e são bastante utilizados como membranas modelo em estudos de processos biofísicos, assim como, na elaboração de carreadores terapêuticos (“drug delivery”) para numerosas aplicações clínicas (Batista, Carvalho e Magalhães, 2007). Visando evitar agregação entre as vesículas em dispersão, fosfolipídios eletricamente carregados são comumente incorporados nos lipossomos, já que, cargas de mesmo sinal geram repulsão eletrostática, e por esse motivo, os lipídios carregados são bastante estudados. O lipídio dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) é a molécula aniônica mais abundante encontrada em células procarióticas e têm sido amplamente usado como modelo de membrana negativamente carregada (Seelig, Macdonald e Scherer, 1987; Heimburg e Biltonen,

1994; Fernandez e Lamy-Freund, 2000) a fim de mimetizar membranas naturais. Curiosamente, em pH fisiológico as características estruturais dos lipossomos desse fosfolípido são dependentes de concentrações do cátion  $\text{Na}^+$ : sob baixa concentração desse cátion, formam-se vesículas hidratadas unilamelares (Kodama e Miyata, 1995) que apresentam um peculiar intervalo de temperatura de transição de fase; enquanto que, sob altas concentrações catiônicas, os lipossomos organizam-se em estruturas hidratadas multilamelares e são dotados de características físico-químicas semelhantes a lipossomos do lipídio neutro dimiristoilfosfatidilcolina (Degovics, Latal e Lohner, 2000; Fernandez, Riske, *et al.*, 2008).

Desse modo, considerando que as moléculas de floretina e de barbaloina demonstraram ser capazes de interagir com vesículas lipídicas (Gomide, 2006; Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008) e, que essas alterações podem estar correlacionadas a alterações quanto à estrutura e à hidratação dos agregados biomoleculares, neste trabalho realizou-se um estudo comparativo entre os efeitos produzidos por essas moléculas em membranas modelo negativamente carregadas de DMPG sob baixa concentração de  $\text{Na}^+$ . Os resultados foram obtidos empregando-se a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) visando monitorar as alterações na estrutura dos agregados lipídicos em função da variação da temperatura do meio. Os dados obtidos por RPE foram analisados através de parâmetros medidos diretamente sobre os espectros (análise direta) e de parâmetros espectrais simulados (análise indireta). As simulações espectrais foram realizadas empregando-se o programa NLSL (“Nonlinear Least-Squares”), o qual é capaz de gerar um espectro teórico a partir da solução da equação estocástica de Liouville (Schneider e Freed, 1989a; Budil, Lee, *et al.*, 1996; Fernandez e Lamy-Freund, 2000; Ge e Freed, 2003). O projeto aqui apresentado foi desenvolvido em colaboração com o Grupo de Biofísica da USP/SP, com especial contribuição realizada por Dr. Evandro L. Duarte (Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008).

### **1.1 Glicerofosfolípidios: os lipídios de membrana mais abundantes**

(Voet e Voet, 1995)

Os lipídios representam uma classe de moléculas anfifílicas caracterizadas por uma grande diversidade quanto a sua estrutura e função biológica, podendo ser desde combustíveis celulares a moléculas sinalizadoras

(Stryer, 1981; Vance e Vance, 2008). Em relação à morfologia celular, são importantes constituintes estruturais da membrana plasmática e de organelas. Glicerofosfolipídios são os maiores componentes lipídicos das membranas biológicas e compõem-se de uma molécula glicerol (1,2,3-propanotriol) esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e a um grupo fosfato no carbono 3 (figura 1). O grupo fosfato, por sua vez, é esterificado a um grupo alcoólico, como a colina, etanolamina ou glicerol, sendo que o glicerofosfolipídio mais simples é o ácido fosfatídico que apresenta o átomo de hidrogênio ligado ao grupo fosfato, isto é, o grupo hidroxila (OH) substituindo o grupo colina na figura 1.

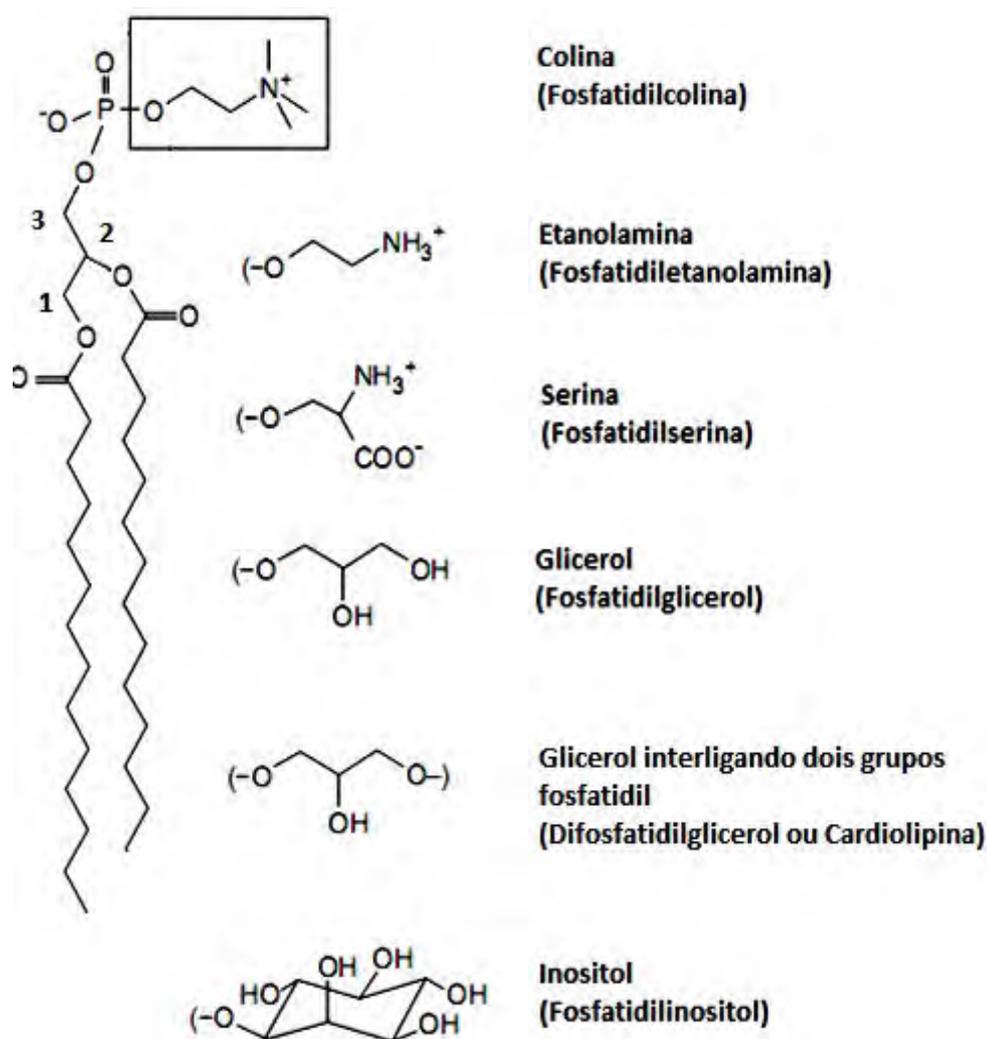


Figura 1- Ilustração da estrutura do glicerofosfolipídio 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina ou fosfatidilcolina (PC). As numerações indicadas referem-se aos 3 carbonos pertencentes ao grupo glicerol (1,2,3-propanotriol). Substituições do grupo colina (caixa com linha sólida) por outros grupos de alcoóis são listados. Os nomes em parênteses referem-se à nomenclatura adquirida pelo lipídio devido à ligação do novo álcool. Figura editada de Vance & Vance (2008)

Os glicerofosfolípidios apresentam característica anfifílica, isto é, possuem uma cabeça polar hidrofílica (grupo fosfato esterificado a um grupo alcoólico) e grupos não-polares (hidrofóbicas) correspondentes às cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos. Esse caráter anfifílico é o que determina a formação de bicamada dos lipídios em estruturas lamelares quando dispersos em água.

## **1.2 Agregados lipídicos e estruturas lamelares**

(Voet e Voet, 1995; Stryer, 1981; Lasic, 1998; Vance e Vance, 2008)

A formação de agregados lipídicos é resultante da força de atração entre moléculas, e esta interação (força de van der Waals) varia com o inverso da sexta potência da distância molecular. Assim, cada molécula possui uma região específica em que tal força atua. Essa região de interação é denominada envelope e determinam as diferentes fases de agregação lipídica: micelar, lamelar ou hexagonal.

Lipídios com uma única cadeia hidrocarbônica apresentam um envelope aproximadamente cônico invertido (figura 2A), o que favorece a formação de estruturas em fases micelares (figura 3A), isto é, agregados moleculares sem volume interno de água. Lipídios com duas cadeias de ácidos graxos apresentam um envelope cilíndrico (figura 2B), o que dificulta a formação de micela e favorece o processo de formação de bicamadas, isto é, formam-se estruturas lamelares gel-cristalinas ( $L_{\beta}$ ) ou líquido-cristalinas ( $L_{\alpha}$ ) (figura 2B). Essas bicamadas por sua vez, arranjam-se em estruturas vesiculares com volume interno de água (figura 3B). Nesse caso, enquanto as cadeias hidrocarbônicas interagem entre si de modo não covalente (forças de van der Waals) e formam uma região não polar (hidrofóbica) no interior da bicamada, as regiões das cabeças polares se arranjam de modo a formar regiões polares (hidrofílica) correspondentes às superfícies interna e externa das vesículas, as quais são favorecidas pelas interações eletrostáticas (pontes de hidrogênio) com as moléculas de água. Fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG) são exemplos de glicerofosfolípidios que apresentam organização em fase lamelar.

Por outro lado, lipídios que apresentam duas cadeias hidrocarbônicas, mas que apresentem um pequeno volume ocupado pelas cabeças em relação ao

das cadeias, irão apresentar um envelope levemente cônico, o qual determinará uma organização hexagonal ( $H_{II}$ ) desses lipídios, isto é, uma estrutura micelar invertida, com as cabeças polares capturando um volume aquoso no interior dessas estruturas (figura 2C). Desse modo, embora a maioria dos glicerofosfolípidios se organize em estruturas lamelares, aqueles que apresentam o envelope levemente cônico, poderão se organizar tanto em estruturas lamelares, como em estruturas hexagonais ( $H_{II}$ ). Um bom exemplo desse fenômeno, é verificado para agregados do lipídio fosfatidiletanolamina (PE) que, a baixas e médias temperaturas, são encontrados nas fases lamelares  $L_{\beta}$  e  $L_{\alpha}$ , respectivamente, enquanto que, para altas temperaturas, a fase hexagonal é predominante.

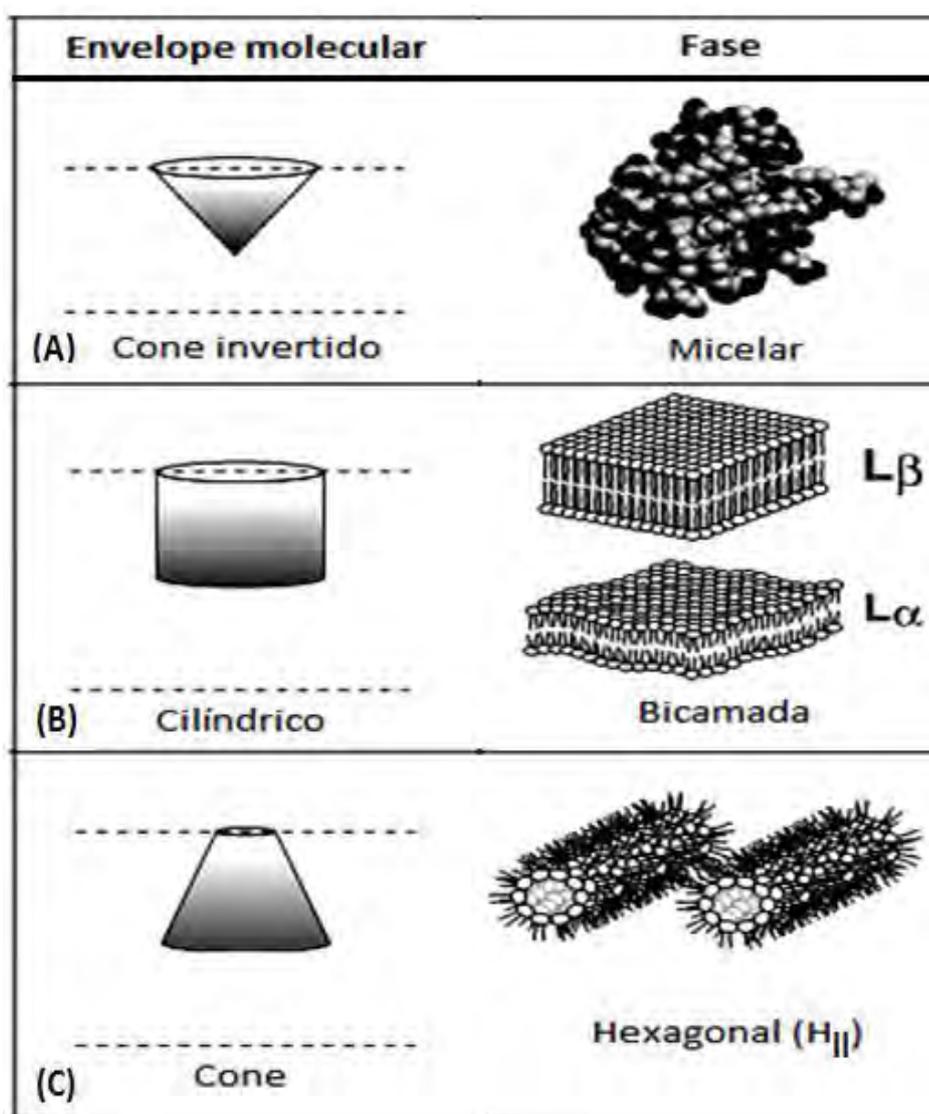


Figura 2 – Ilustração da relação entre o envelope lipídico e a fase lipídica (organização) produzida em dispersão. Os termos ( $L_{\beta}$ ) e ( $L_{\alpha}$ ) indicam dois tipos de fases de bicamada: gel-cristalina (rígida) e líquido - cristalina (fluida), respectivamente. (Vance & Vance, 2008)

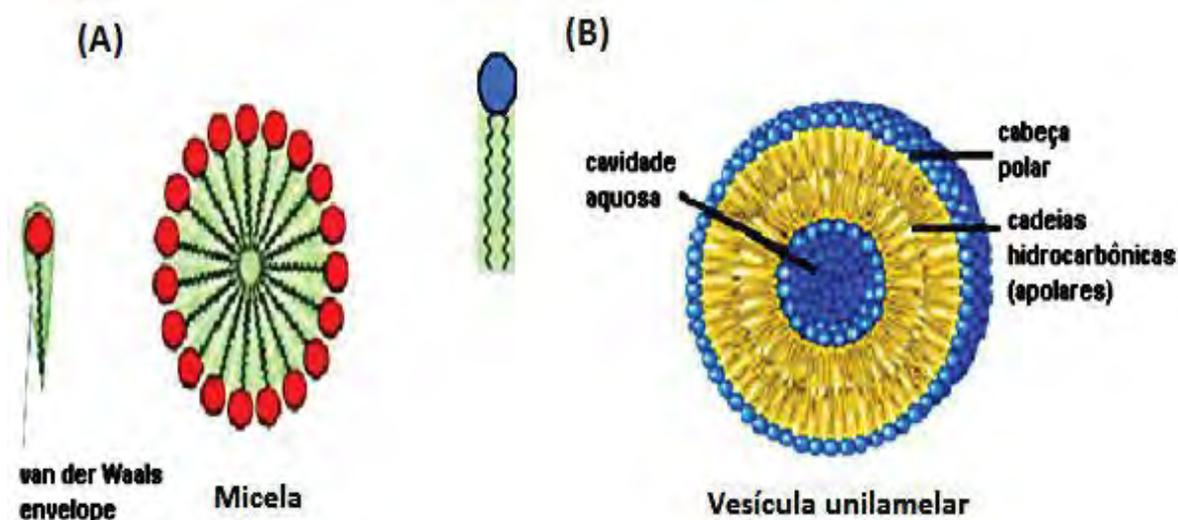
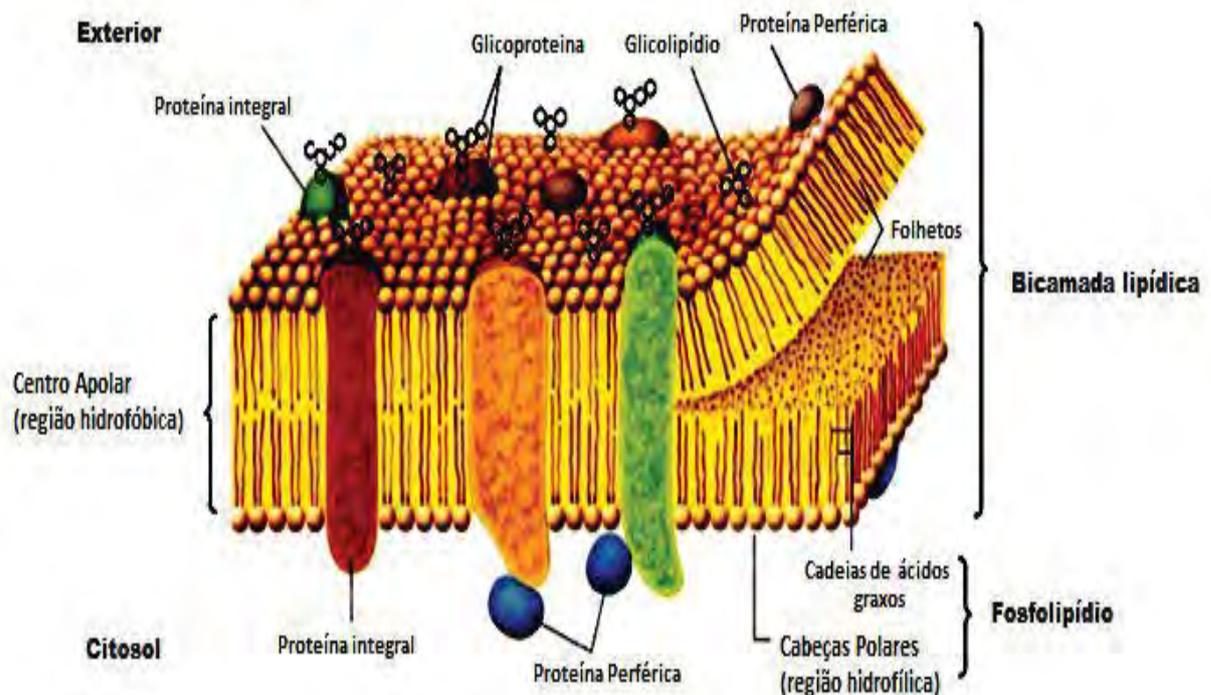


Figura 3– Ilustração da organização lipídica sob a forma de (A) micela e (B) vesícula unilamelar. Os envelopes cônico invertido (A) e cilíndrico (B) estão indicados.

### 1.3 Membranas biológicas: barreiras semipermeáveis

(Walsh e Schwartz-Bloom, 2005; Brunton, Lazo e Parker, 2006;  
Delucia, Oliveira-Filho, *et al.*, 2007)

As membranas biológicas são estruturas lamelares basicamente constituídas de uma bicamada de agregados lipídicos, entre os quais se encontram incorporadas moléculas protéicas (figura 4). Como citado anteriormente, os glicerofosfolípidios são os lipídios mais abundantes de membrana, e esse fato é justificado considerando-se que apresentam envelope cilíndrico (ver seção 1.2) e, que para esse tipo de envelope a organização sob fase lamelar é favorecida. Esses lipídios assim como os demais fosfolípidios, apresentam propriedades anfífilas, e, desse modo, ao organizarem sob a forma lamelar determinam a existência de duas regiões bem definidas: uma região hidrofílica nas superfícies internas e externas da membrana, correspondente as cabeças polares; e outra hidrofóbica, correspondente as cadeias hidrocarbônicas do centro da bicamada lipídica (figura 4). Outro constituinte lipídico de membranas que merece destaque é o colesterol, uma vez que, ao ser uma molécula esteroidal, sua presença aumenta a hidrofobicidade e o grau de ordenamento das bicamadas.



**Figura 4- Ilustração da estrutura básica das membranas biológicas: bicamada lipídica (folheto duplo) incorporada de proteínas integrais. As proteínas periféricas não atravessam a bicamada, ao contrário das integrais. As regiões hidrofílicas e hidrofóbicas estão indicadas. Os carboidratos também estão presentes, mas encontram-se associados a proteínas (glicoproteínas) ou a lipídios (glicolipídios). Figura adaptada de Lodish et al. (2000).**

O papel principal das membranas biológicas é delimitar as dimensões celulares e de organelas citoplasmáticas, determinado as particularidades de composição entre os diferentes compartimentos aquosos. Essa função de barreira é desempenhada graças à permeabilidade seletiva intrínseca das membranas biológicas: moléculas lipossolúveis (hidrofóbicas) podem atravessar passivamente a matriz lipídica a favor do gradiente de concentração; por outro lado, compostos polares ou ionizados (carregados) precisam ser transportados passivamente por intermédio de carreadores (difusão facilitada) ou ativamente, seja mediado por canais protéicos, como, por exemplo, proteínas co-transportadoras de outras substâncias. Além disso, substâncias de grandes pesos moleculares só conseguem transpor essas barreiras por processos que desencadeiem a endocitose. Embora todos os processos citados sejam importantes, considerando que a maioria das drogas são ácidos ou bases fracos, elas tendem a se manterem em sua forma química não-ionizada (lipossolúvel), e, portanto, são principalmente absorvidas pelo transporte passivo lipídico, o que torna esse processo muito importante para absorção de drogas em geral. Desse modo, os estudos biofísicos relacionados ao

modo como diferentes biomoléculas interagem com o ambiente lipídico podem contribuir para um melhor entendimento dos aspectos relacionados ao transporte dessas substâncias através da matriz lipídica (Fahr, Hoogevest, *et al.*, 2005).

#### 1.4 Lipossomos: membranas modelo

(Lasic, 1988; Lasic, 1998; Matteucci e Thrall, 2000; Batista, Carvalho e Magalhães, 2007)

Lipossomos são vesículas microscópicas geralmente constituídas de uma ou mais bicamadas de fosfolipídios concêntricas, que mimetizam a organização lipídica presente nas membranas biológicas. São utilizados há mais de 30 anos, sendo importante para diferentes áreas da ciência e da tecnologia. Na área de pesquisa são utilizados como membranas modelo, com as quais a interação entre lipídios, proteínas e outras biomoléculas são bastante estudados.

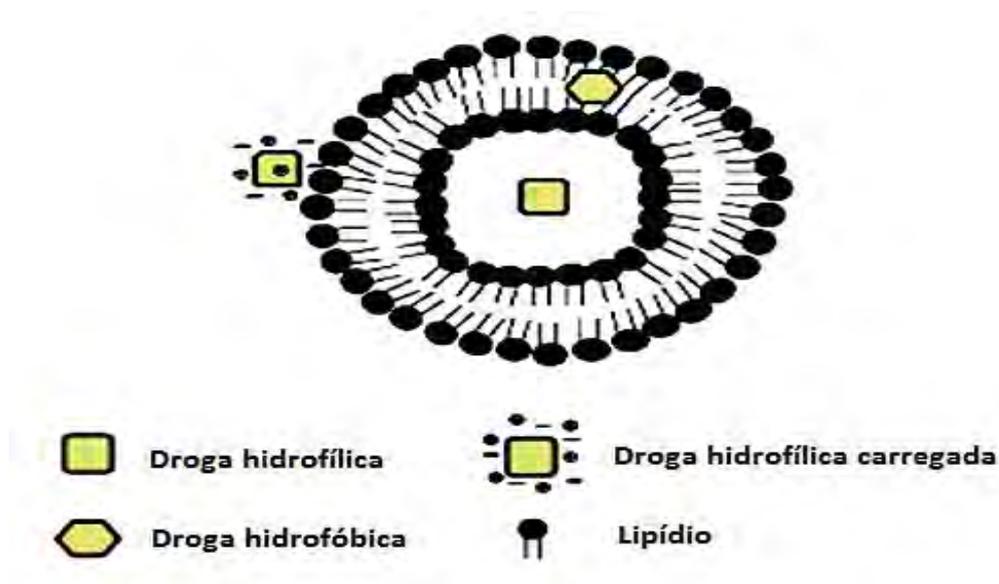


Figura 5- Ilustração dos diferentes modos de interação entre moléculas com lipossomos (Kulkarni, 2010).

Em relação à importância farmacológica, e considerando o avanço da nanotecnologia, o emprego de lipossomos se tornou importante como carreador de drogas e de pró-drogas (“drug delivery system”), assim como, de material genético (terapia gênica), cosméticos, e outras macromoléculas. Em relação a esse papel desempenhado pelos lipossomos como transportadores de macromoléculas,

conforme está ilustrado na figura 5, as substâncias a serem transportadas podem ser adsorvidas na superfície polar das vesículas (drogas hidrofílicas ionizadas), incorporadas na matriz lipídica (drogas hidrofóbicas) ou encapsuladas no interior aquoso da vesícula (drogas hidrofílicas não ionizadas) (Kulkarni, 2010). Desse modo, considerando o presente trabalho, espera-se que um melhor esclarecimento do modo como a floretina e a barbaloina interagem com vesículas lipídicas venham incentivar o desenvolvimento de novos mecanismos de transporte para essas moléculas.

## **1.5 Características físico-químicas das bicamadas**

### **1.5.1 A temperatura de transição de fase**

(Voet e Voet, 1995; Stryer, 1981)

Desde cedo aprendemos que a matéria pode se encontrar em três estados básicos: sólido (cristalino), líquido e gasoso. Por outro lado moléculas anfifílicas como os lipídeos podem se arranjar de diferentes maneiras e conseqüentemente a membrana lipídica pode apresentar diferentes fases ou graus de ordenamento em função da temperatura em que se encontra (Pascher, 1992). Dois importantes modos de arranjo (estado) para moléculas lipídicas de bicamadas são o estado rígido ou ordenado (fase gel-cristalina) e o estado fluído ou desordenado (fase líquido-cristalino), os quais são assim chamados por apresentarem propriedades físicas intermediárias entre estruturas sólidas (organização regular) e líquidas (fluidez), sendo a transição de um estado para outro caracterizada por um valor específico de temperatura denominada temperatura de transição de fase principal  $T_m$ . Na fase ordenada as ligações C-C dos ácidos graxos apresentam uma conformação *trans* (figura 6 A), enquanto que na fase desordenada há a presença de conformações *gauche* (figura 6B e 6C). Essa diferença de conformação (*trans/gauche*) se deve a grande liberdade de rotação sobre cada ligação C-C. Outro fator determinante na ordem da cadeia hidrocarbônica é a existência de ligações saturadas e insaturadas. Ligações saturadas C-C determinam obrigatoriamente a conformação do tipo *trans*. Ligações insaturadas C=C determinam a conformação do tipo *cis*.

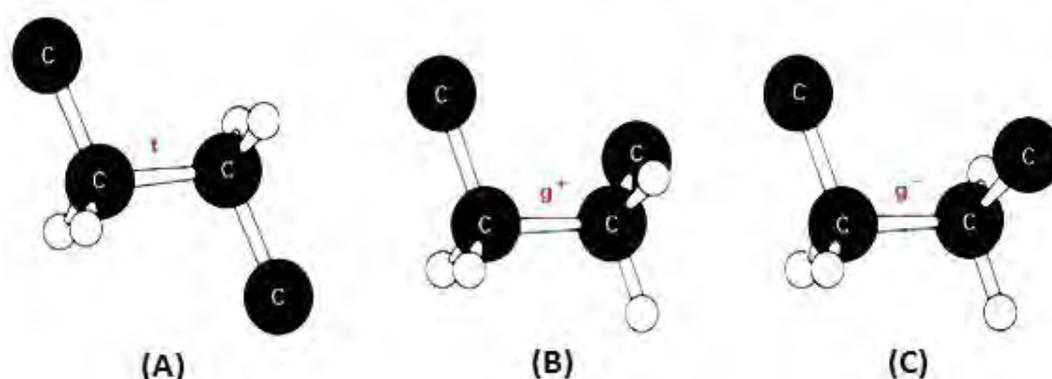


Figura 6 – Ilustração dos tipos de conformações das ligações C-C em ácidos graxos: (A) *trans*, (B) *gauche+* (rotação 120° horária) e (C) *gauche-* (rotação 120° anti-horária)

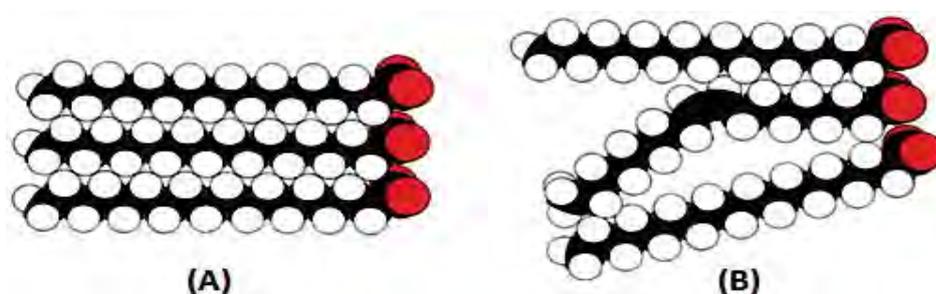


Figura 7 – Ilustração do arranjo de (A) 3 moléculas com cadeias hidrocarbônicas saturadas (conformação *trans*), e de (B) 3 moléculas sendo apenas uma delas com cadeia hidrocarbônica insaturada (conformação *cis*).

A fase gel é favorecida pela presença de ácidos graxos com resíduos saturados, devido às cadeias se manterem alinhadas (ligação *trans*) e interagirem via forças de van der Waals, de maneira mais intensa entre si (figura 7A). Por outro lado, uma ligação dupla produz uma dobra na cadeia hidrocarbônica (ligação *cis*), interferindo no empacotamento dessas cadeias (figura 7B) e, portanto reduzindo a  $T_m$ . O comprimento das cadeias hidrocarbônicas também interfere na temperatura de transição de fase, porque longas cadeias interagem mais fortemente entre si devido às fortes interações hidrofóbicas (forças de van der Waals) entre os numerosos carbonos. Desse modo, a temperatura de transição de uma bicamada aumenta com o comprimento e o grau de saturação das cadeias de ácidos graxos.

### 1.5.2 Hidratação

A hidratação é responsável pela estabilidade das membranas e da manutenção de sua permeabilidade seletiva. Em uma bicamada lipídica, na superfície da bicamada, a hidratação ocorre principalmente ao longo das cabeças

polares, isto é, circundando o grupo esterificado e o grupo fosfato, e, ainda, em menor proporção ao redor das carbonilas (figura 8) (Disalvo, Lairion, *et al.*, 2004).

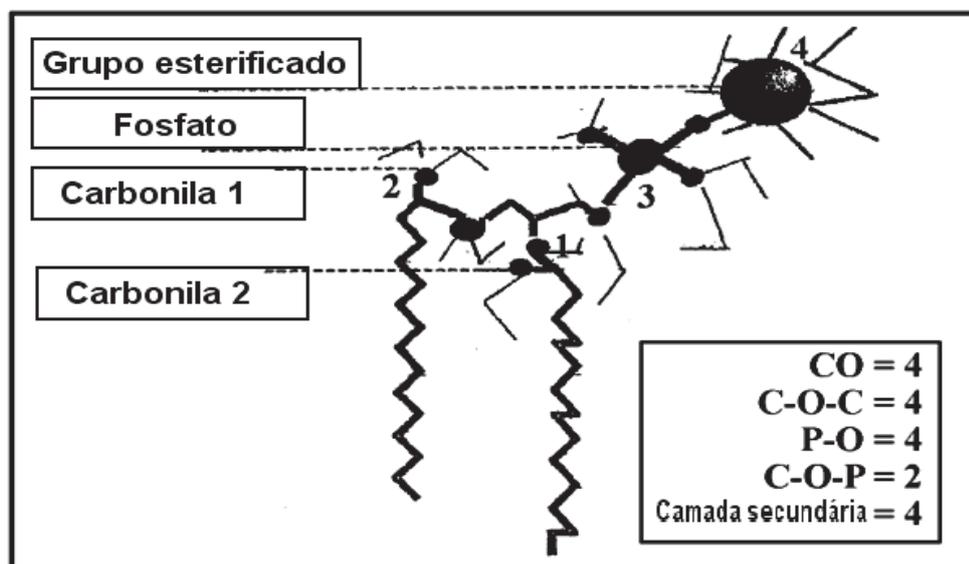


Figura 8- Ilustração de um glicerofosfolipídio juntamente com suas regiões de possíveis hidratações: 1. carbonila paralela ao plano da membrana, 2. carbonila normal ao plano da membrana, 3. Grupo fosfato (P=O), 4. grupo esterificado. A legenda indica o número de moléculas de água que podem se ligar aos diferentes átomos de oxigênio. A camada primária refere-se à camada de hidratação dos grupos C=O, C-O-C, P-O, C-O-P, enquanto a camada secundária refere-se à camada de hidratação que envolve a camada primária (Disalvo, Lairion, *et al.*, 2004).

Difração de raios-X e de nêutrons, e ressonância magnética nuclear de prótons, não são sensíveis à presença de água, e indicam a inexistência de moléculas de água abaixo do grupo carbonila dos fosfolipídios (Wiener e White, 1992; Volke e Pampel, 1995; Zhou, Sayer, *et al.*, 1999). Desse modo, em se tratando da hidratação no centro das membranas, somente após a realização de pesquisas empregando-se técnicas tais como a ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e a fluorescência, através da incorporação de sondas de spin e de sondas fluorescentes, respectivamente, foi comprovado que moléculas de água podem ser encontradas mesmo no interior hidrofóbico das bicamadas lipídicas, tanto em membranas modelo, como naturais (Griffith, Dehlinger e Van, 1974; Harris, Power, *et al.*, 1983; Subczynski, Wisniewska, *et al.*, 1994; Ho, Slater e Stubbs, 1995; Ge e Freed, 1998). Estas técnicas espectroscópicas comprovaram que a barreira hidrofóbica (descrita nas seções 1.2 e 1.3) imposta pela membrana lipídica é dependente de vários fatores, como a presença de duplas ligações de carbono, ou de moléculas hidrofóbicas, como o colesterol, incorporadas à 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.

Utilizando-se marcadores de spin, a presença de água no interior da bicamada lipídica tem sido estudada podendo-se correlacionar a ordem e a polaridade de uma determinada micro-região (Marsh, 1981; Ge e Freed, 1998; Ge e Freed, 2003). Também é possível a utilização de sondas fluorescentes para monitorar a presença de água no interior de bicamadas (Ho, Slater e Stubbs, 1995). Fernandez e Lamy-Freund (2000) mostraram que a diminuição da fluidez da bicamada provocada pela presença do peptídeo melanotrópico  $\alpha$ -MSH ( *$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone*), estava correlacionada com um aumento do desdobramento hiperfino isotrópico ( $a_0$ , ver seção 3.1.6.1) de marcadores de spin incorporados em diferentes profundidades da bicamada lipídica. Este resultado foi interpretado como um aumento do número de moléculas de água no interior da membrana lipídica (Griffith, Dehlinger e Van, 1974). Assim, pretende-se estudar a presença de água em bicamadas pela interação entre a floretina e vesículas negativamente carregadas usando a técnica de RPE.

## 1.6 A membrana modelo de DMPG

O DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol) é um glicerofosfolipídio que apresenta um grupo fosfato ligado a um glicerol e a duas cadeias acilas com 14 carbonos cada (figura 9). Geralmente os lipídios podem arranjar suas cadeias de diferentes formas dependendo da diferença da área ocupada entre a cabeça polar e as cadeias hidrocarbônicas: quanto maior a área ocupada pelas cabeças, maior será a curvatura das bicamadas lipídicas (figura 10). Kodama & Miyata (1996) ao estudarem vesículas de diferentes lipídios, comprovaram que as vesículas de DMPG apresentavam grande curvatura (figura 10 A). Esse fato foi correlacionado a carga total negativa presente na cabeça do DMPG, isto é, o grupo fosfato aniônico das cabeças polares produziria uma alta repulsão eletrostática entre as cabeças, o que resultaria numa grande área ocupada por essas cabeças em relação às cadeias hidrocarbônicas.

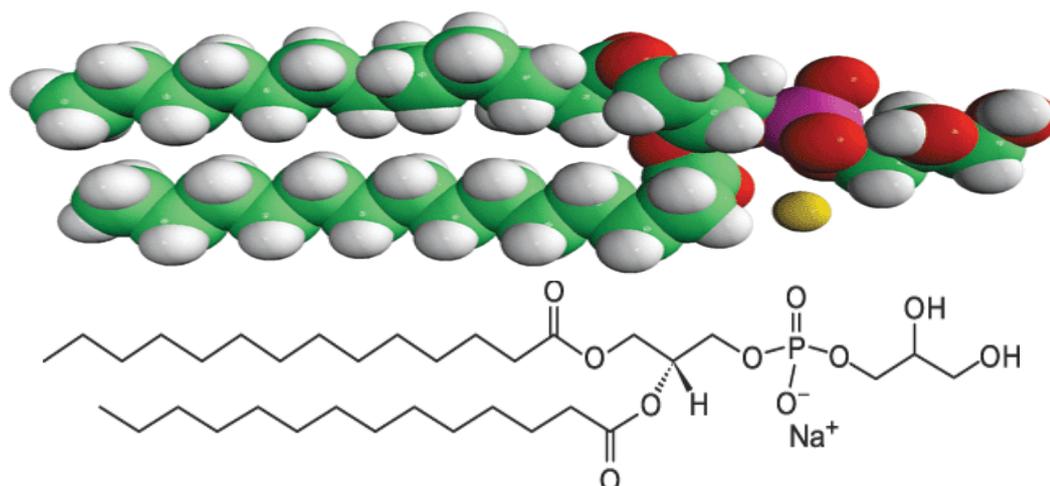


Figura 9 - Estrutura química do DMPG. (Fonte: Avanti Polar Lipids).

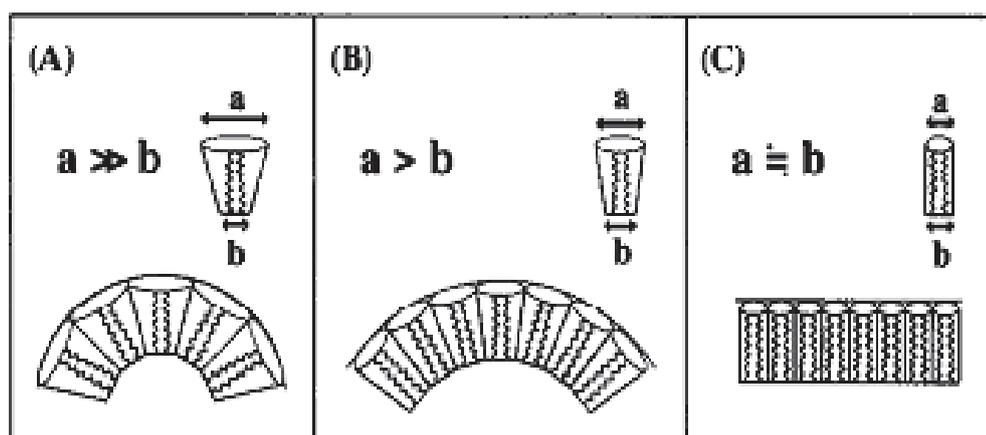


Figura 10 - Ilustração esquemática das diferenças do arranjo lipídico em bicamadas dependentes da variação da área ocupada pelas cabeças (a) em relação à área ocupada pelas cadeias hidrocarbônicas (b). A curvatura das bicamadas aumenta proporcionalmente ao incremento da área ocupada pelas cabeças: (C) < (B) < (A) (Kodama e Miyata, 1996).

Outra importante descoberta refere-se à identificação de um comportamento anômalo na temperatura de transição de fase do DMPG a baixa força iônica (baixas concentrações de NaCl) (Riske, Amaral e Lamy-Freund, 2001; Riske e Dobereiner, 2002; Riske, Fernandez, *et al.*, 2003; Riske, Amaral, *et al.*, 2004). Esse comportamento foi caracterizado pela existência de um intervalo de transição gel-líquido cristalina entre as temperaturas  $T_{on}=18^{\circ}\text{C}$  e  $T_{off}=35^{\circ}\text{C}$  (figura 11) no perfil calorimétrico obtido pela técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Riske, Amaral e Lamy-Freund, 2001). Essa técnica mede o calor absorvido

ou liberado por uma amostra quando a temperatura é variada, à pressão constante, comparativamente a uma referência, permitindo detectar a presença de transições de fase pela existência de picos de calor específico (ver sessão 3.2). Schneider et al. (1999) empregando essa mesma técnica demonstrou que tanto a força iônica, como o comprimento das cadeias hidrocarbônicas influenciam o intervalo de transição de fase para os lipossomos de fosfatidilglicerol: o incremento da força iônica (figura 12A) ou o aumento do comprimento da cadeia hidrocarbônica (figura 12B) reduzem o intervalo de transição de fase a uma pequena faixa (pico estreito), tornando o perfil calorimétrico de DSC semelhante ao observado para os lipossomos do lipídio neutro dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (figura 11) (Cseh, Hetzer, *et al.*, 2000).

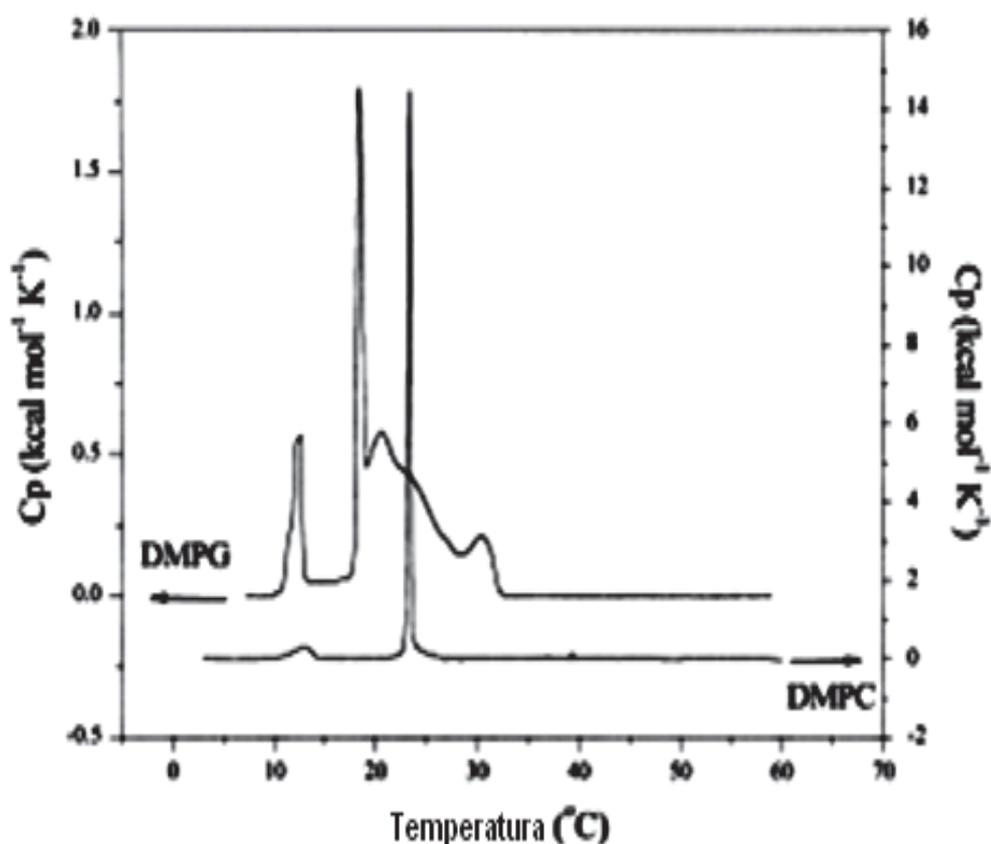


Figura 11 – Curvas obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) de 50 mM DMPG em HEPES + 2 mM de NaCl e de 1 mM DMPC em HEPES. As curvas são plotadas em unidades de calor específico ( $C_p$ ) e de temperatura ( $T$ ) (Riske, Amaral e Lamy-Freund, 2001).

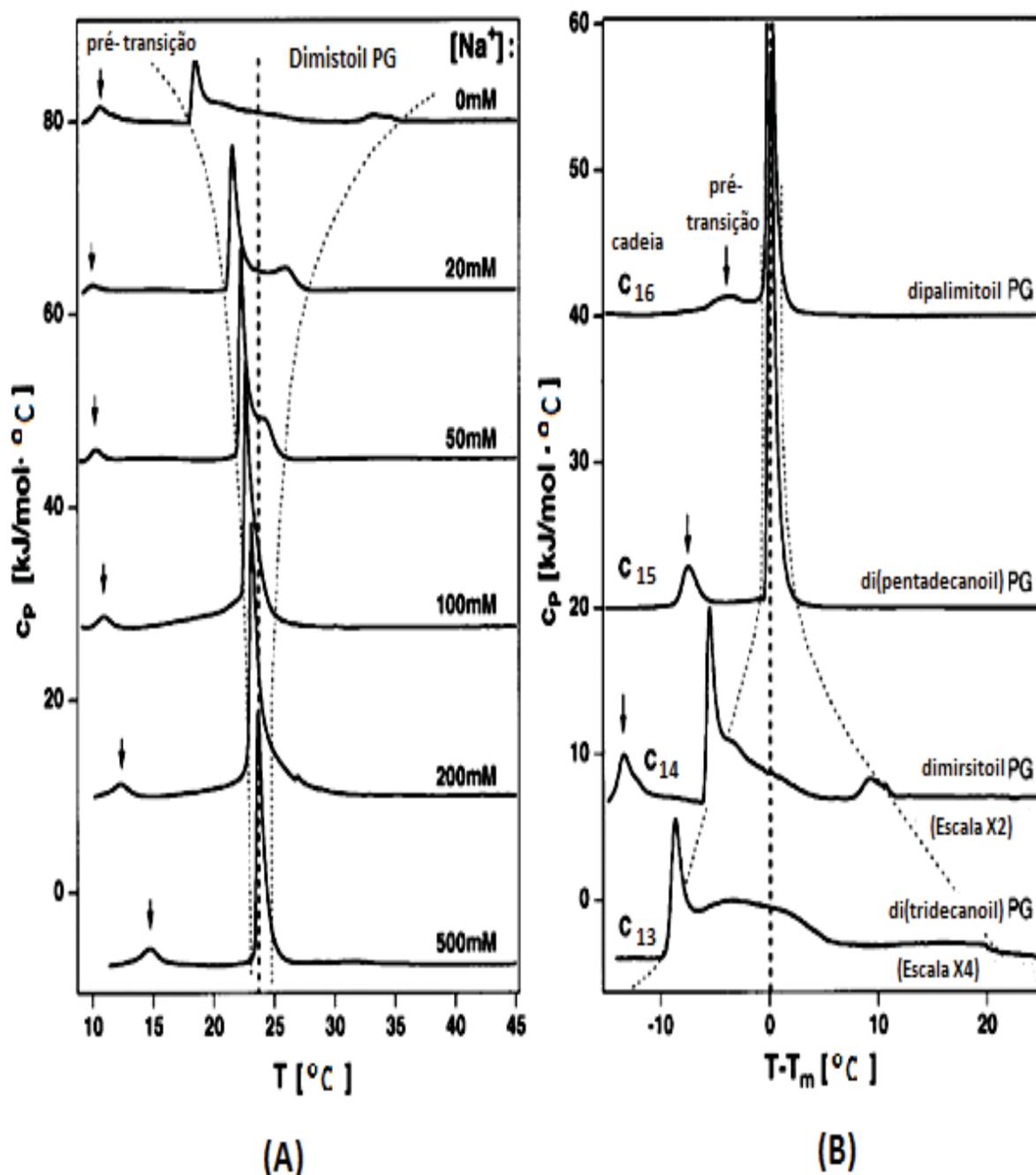


Figura 12– (A) Espectros que mostram a dependência do perfil calorimétrico do DMPG em relação à variação da concentração de  $\text{Na}^+$  entre [0-500mM]. (B) Espectros que mostram a dependência do perfil calorimétrico com a variação do comprimento da cadeia hidrocarbônica. Os termos C13, C14, C15, C16 referem-se ao número de átomos de carbonos pertencentes aos diferentes lipídios de fosfatidilglicerol (PG): 13 carbonos para di(tridecanoil)PG, 14 carbonos para o DMPG, 15 carbonos para o di(pentadecanoil)PG e 16 carbonos para dipalmitoilPG, respectivamente. As setas indicam a presença do pico de pré-transição. A linha pontilhada indica o intervalo de temperatura para a transição de fase, enquanto a linha tracejada refere-se à temperatura de transição para o pico mais estreito. A concentração dos lipídios utilizada foi de 10 mM em  $\text{pH}=7.5$ . Os espectros são plotados em unidades de calor específico ( $C_p$ ) e de temperatura ( $T$ ) (Schneider, Marsh, *et al.*, 1999).

Posteriormente, descobriu-se que em pH fisiológico as características estruturais dos lipossomos desse fosfolípido eram dependentes de concentrações do cátion  $\text{Na}^+$ : sob baixa concentração desse cátion, formam-se vesículas hidratadas unilamelares (Kodama e Miyata, 1995) e elas apresentam o peculiar intervalo de temperatura de transição de fase do DMPG; enquanto que, sob altas concentrações catiônicas, os lipossomos não apresentam essa transição de fase peculiar e organizam-se em estruturas hidratadas multilamelares dotadas de características físico-químicas semelhantes aos lipossomos do lipídio neutro fosfatidilcolina (Degovics, Latal e Lohner, 2000; Fernandez, Riske, *et al.*, 2008).

A organização do DMPG na região de transição (também chamada de fase intermediária) ainda não foi bem caracterizada, mas muitos modelos têm sido propostos. Riske *et al.* (2004) sugeriram um modelo, no qual os lipídios de DMPG manteriam sua estrutura de agregação sob forma vesicular, exceto pelo surgimento de fissuras durante a fase intermediária. Essas fissuras surgiriam na superfície da membrana devido ao aumento das interações eletrostáticas entre as cabeças polares com o aumento da temperatura (iniciando em  $T_{on}$ ) e, após um rearranjo das cadeias hidrocarbônicas, essas fissuras sumiriam (próximo de  $T_{off}$ ).

Alakoskela *et al.* (2007) propuseram um modelo diferente, no qual haveria uma descontinuidade da estrutura geral da membrana na fase intermediária, e assim definiram as fases apresentadas em vesículas compostas por lipídios de DMPG. A fase gel seria descrita pelas cadeias hidrocarbônicas empacotadas e inclinadas, sendo a maioria dos grupos fosfatos associada aos cátions  $\text{Na}^+$ , o que impediria a protonação (cátion  $\text{H}^+$ ) das cabeças polares (figura 13A). A fase pré-transição (ripple) apresentaria um início da dissociação dos cátions  $\text{Na}^+$  das cabeças lipídicas, o que resultaria em cadeias hidrocarbônicas interdigitadas (interpenetradas) e menos empacotadas (figura 13B). Já a fase intermediária seria caracterizada pelas cabeças pouco associadas aos cátions  $\text{Na}^+$ , mas também pouco protonadas, o que garantiria uma alta negatividade dessas cabeças e uma descontinuidade da organização da membrana sob forma vesicular (figura 13C). Por outro lado, durante a fase líquido-cristalina os grupos fosfatos se encontrariam fortemente dissociados dos cátions  $\text{Na}^+$ , mas altamente protonados, o que favoreceria a reorganização dos lipídios de DMPG sob forma vesicular (figura 13 D).

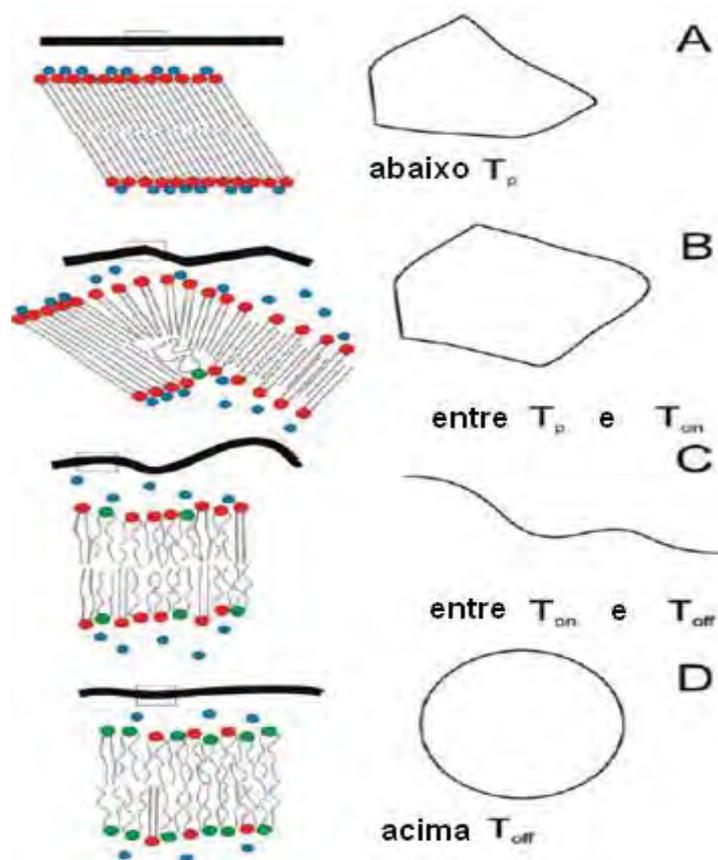


Figura 13 - Modelo esquemático do comportamento das fases do DMPG. À esquerda são mostradas secções detalhadas da estrutura da bicamada (linha preta). Círculos azuis representam íons  $\text{Na}^+$ , enquanto os círculos vermelhos e verdes representam regiões da cabeça desprotonadas (aniônicas) e protonadas (neutras), respectivamente. As cadeias acila são representadas por linhas conectadas às regiões da cabeça. À direita são mostrados esboços da geometria da vesícula. A, B, C, e D correspondem às fases gel, pré-transição (ripple), intermediária, e fluída, respectivamente (Alakoskela e Kinnunen, 2007).

## 1.7 A Floretina

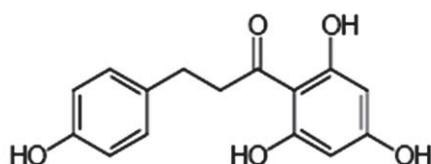


Figura 14 - Estrutura química da floretina (3-[4-hidroxifenil]-1-[2,4,6-trihidroxifenil]-1-propanona) (Cseh et al., 2000).

A floretina é um flavonóide bicíclico pertencente à família das dihidrocalconas, as quais são caracterizadas pela presença de dois anéis benzóicos interligados por uma cadeia insaturada de três carbonos (figura 14) (Nakamura, Watanabe, *et al.*, 2003; Tomás-Barberan e Clifford, 2000). Dihidrocalconas são flavonóides raros, que são encontradas em cerca de 30 espécies de plantas, sendo a floretina e a sua forma glicosilada (floridizina) ricamente presentes nas cascas e nas polpas de maçãs (Gosch, Halbwirth, *et al.*, 2009; Iwashina, 2003; Bourvellec, Guyot e Renard, 2009). Curiosamente, embora a floretina apresente potente atividade antioxidante, essa propriedade foi atribuída a um novo grupo farmacóforo: 2,6-dihidroxiacefenona (Rezk, Haenem, *et al.*, 2002). A floretina influencia o transporte de inúmeras substâncias através da membrana (Levine, Franki e Hays, 1973; Sukhorukov, Kürschner, *et al.*, 2001) e estudos com células vermelhas demonstraram que essa dihidrocalcona apresenta afinidade por proteínas e lipídeos de membrana (Jennings e Solomon, 1976; Auner e Valenta, 2004). Além disso, uma pesquisa demonstrou que a floretina é capaz de inibir a atividade das enzimas MPP-1 e elastase, sugerindo uma possível aplicação cosmética antienvhecimento (Leu, Lin, *et al.*, 2006). Outro estudo recente corroborou com essa propriedade, ao comprovar que uma formulação contendo vitamina C, ácido ferrúlico e floretina combatia os efeitos relacionados ao stress oxidativo e ao raio ultravioleta (Oresajo, Yatskayer, *et al.*, 2009).

Visando uma melhor compreensão do efeito da floretina em ambiente lipídico, estudos *in vitro* foram realizados, os quais mostraram que esse raro flavonóide ao ser adsorvido pela superfície de membranas modelo é capaz de alterar a orientação do potencial de dipólo das cabeças polares, e conseqüentemente modificar a permeabilidade de membranas a íons e moléculas. (Reyes, Greco, *et al.*, 1983; Bechinger, 1991). Entretanto, a mudança de dipolo nas membranas lipídicas não é uma simples função do momento dipolo da molécula adsorvida, mas também dependente do número e da posição dos grupos hidroxil no anel e da densidade superficial da membrana (Reyes, Greco, *et al.*, 1983). Desse modo, devem-se levar em consideração as diferentes conformações (Gómez-Zavaglia, 2009) e, portanto, diferentes momentos de dipolo que a molécula de floretina pode assumir. Estudos realizados com membranas neutras de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) sugerem que o efeito primário ocorreria pelo alinhamento do dipolo da floretina em oposição ao dos lipídios. Nesse caso, a região positiva da floretina estaria em contato com a

porção aquosa enquanto a região negativa se intercalaria entre as cadeias hidrocarbônicas (figura 15) (Reyes, Greco, *et al.*, 1983; Cseh e Bens, 1998; Cseh e Benz, 1999; Diaz, Lairión, *et al.*, 2001).

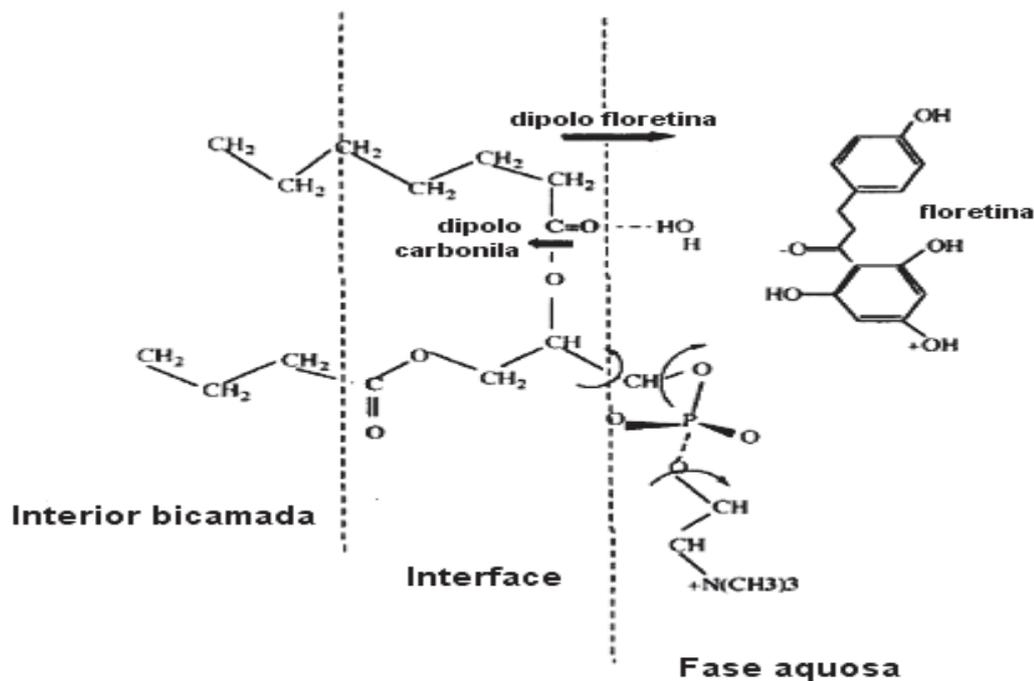


Figura 15 - Provável localização da floretina na interface lipídio-água em vesícula de DMPC (Diaz *et al.*, 2001).

Interessantemente, a floretina altera a organização da água na região da cabeça, possivelmente devido à desidratação dos grupos PO<sub>2</sub>, o que explicaria o aumento do empacotamento na porção da cadeia do glicerol (Diaz, Lairión, *et al.*, 2001; Disalvo, Lairion, *et al.*, 2004; Lairión e Disalvo, 2004). Estudos realizados no Instituto de Física da USP (Gomide, 2006) corroboram com os resultados de Disalvo *et al.* (2004), uma vez que crescentes concentrações de floretina produziram um aumento no empacotamento e uma provável desidratação em vesículas multilamelares de DMPC. Entretanto, a presença de floretina demonstrou reduzir a temperatura de transição de fase (Cseh, Hetzer, *et al.*, 2000) em vesículas neutras de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), o que não é esperado, uma vez que um efeito de desidratação e o conseqüente aumento do empacotamento deveriam ser acompanhados por um aumento da temperatura de transição de fase. Dessa forma, o mecanismo de ação da floretina em ambiente lipídico ainda não se encontra muito bem esclarecido.

No caso de vesículas negativamente carregadas de dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), a polaridade da cabeça devido ao grupo glicerol determinaria uma menor interação entre a floretina e os grupos fosfatos, o que resultaria em resultados diferentes ao verificados em vesículas neutras de DMPC. Uma hipótese sugere que o grupo glicerol da cabeça polar aumentaria o número pontes de hidrogênio e “protegeria” os grupos fosfatos do efeito de desidratação da floretina (Lairi3n e Disalvo, 2004).

### 1.8 A Barbaloína

A barbaloína (figura 16), que é também denominada aloína, é um derivado antraquinônico C-glicosídeo comumente encontrado em extratos de plantas *Aloe spp* (Wamer, Vath e Falvey, 2003). Extratos dessas plantas são utilizados há mais de 3000 anos como remédios populares, e, embora muitos componentes tenham sido identificados, a barbaloína é componente ativo mais conhecido (Haller, 1990; Bi, Song, *et al.*, 2005). À aloína foram atribuídas propriedades laxativas, antiinflamatórias e antioxidantes (Lam, Woo, *et al.*, 2007), sendo, por isso, amplamente utilizada para fins terapêuticos e cosméticos (Tian, Liu, *et al.*, 2003).

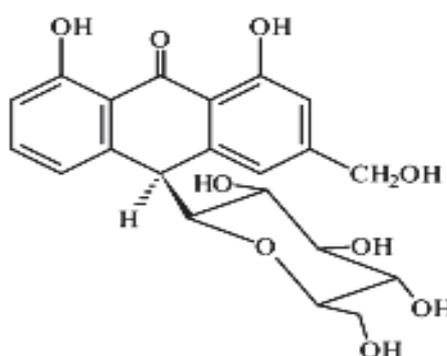


Figura 16- Ilustração da estrutura química da antraquinona glicosilada barbaloína

A barbaloína apresenta baixa absorvidade oral, mas que, ao ser metabolizada pela flora intestinal humana, é convertida à sua forma não glicosilada aloe-emodina, a qual é prontamente absorvida (Che, Akao, *et al.*, 1991). Alvez *et al.* (2004) demonstrou que, embora tanto a barbaloína como a aloe-emodina sejam capazes de interagir com vesículas aniônicas de DMPG, a aloina favorecia a

formação de estruturas lamelares, enquanto a sua forma não glicosilada estabilizava estruturas hexagonais II (ver sessão 1.2). Duarte et al. (2008) realizou um estudo detalhado e verificou que sob baixa força iônica a interação da barbalóina com essas vesículas prolongavam sensivelmente o intervalo de transição de fase peculiar do DMPG (Riske, Amaral e Lamy-Freund, 2001; Riske e Dobereiner, 2002; Riske, Fernandez, *et al.*, 2003; Riske, Amaral, *et al.*, 2004) e, ainda, que a presença dessa molécula alterava tanto o empacotamento, como a hidratação na superfície e no centro da bicamada lipídica. Esses resultados sugerem que, embora a barbalóina não possa atravessar a membrana das células intestinais, ela é capaz de parcialmente penetrar ao longo das estruturas hidrofóbicas da bicamada lipídicas (Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008).

## **2 Objetivos**

Este projeto propõe um estudo comparativo entre os efeitos produzidos pela interação das biomoléculas floretina e barbalóina com vesículas lipídicas, através da análise das alterações na estrutura e hidratação de lipossomos negativamente carregados de dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) produzidas pela presença de cada uma dessas moléculas. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho venham a contribuir para a elucidação dos diferentes modos de interação dessas moléculas com membranas modelo.

## **3 Técnicas experimentais**

A seguir segue-se uma breve descrição dos princípios básicos da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC), assim como, dos principais parâmetros que podem ser obtidos pela análise dos dados coletados por essas técnicas.

### 3.1 Técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica

(Marsh, 1981)

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE), também conhecida como ressonância do spin eletrônico, é o nome dado ao processo de absorção ressonante de microondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, com ao menos um elétron desemparelhado na presença de um campo magnético. Considerando que bicamadas e vesículas não apresentam caráter paramagnético, é necessária a utilização do método do marcador de spin, que consiste na introdução de um grupo paramagnético no sistema a ser analisado. No caso de estudo de membranas modelo, esse grupamento paramagnético geralmente é o radical nitróxido (N-O) e a molécula que o contém pode ser ligada ao sistema por meio de intercalação física entre os agregados.

#### 3.1.1 Interação Zeeman e interação hiperfina

(Atherton, 1993; Weil e Bolton, 2007)

O elétron possui um movimento de rotação intrínseco (spin) e um movimento orbital, aos quais é associado um momento de dipolo magnético (pequenos ímãs girantes). O Princípio de Exclusão de Pauli postula que cada orbital só pode ser ocupado por dois elétrons com spins opostos. Assim, um único elétron num orbital produz um momento de dipolo magnético de spin resultante não nulo.

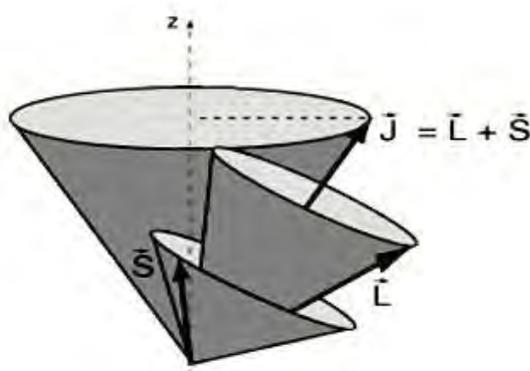


Figura 17 – Ilustração do momento angular resultante ( $\vec{J}$ ) e de suas duas componentes: momento angular de spin ( $\vec{S}$ ) e momento angular orbital ( $\vec{L}$ ).

Como o momento magnético é proporcional ao seu momento angular, conseqüentemente, o elétron possui um momento magnético  $\vec{\mu}_J$  (equação 1.1) proporcional ao seu momento angular resultante ( $\vec{J}$ ), o qual corresponde à soma vetorial do momento angular de spin ( $\vec{S}$ ) e do momento angular orbital ( $\vec{L}$ ), conforme mostrado na figura 17.

$$\vec{\mu}_J = -g_L \mu_B \vec{J} \quad (1.1)$$

onde  $g_L = \frac{3J(J+1)+S(S+1)-L(L+1)}{2J(J+1)}$ , é conhecido como fator de Landé ou simplesmente “fator g” e refere-se à projeção de  $\vec{S}$  e  $\vec{L}$  na direção de  $\vec{J}$ .

$$\mu_B = \frac{e \cdot \hbar}{2m_e} = 9,2740 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}, \text{ é conhecido como } \textit{magneton}$$

*de Bohr*, onde  $e$  é a carga do elétron,  $m_e$  a massa do elétron e  $\hbar$  a constante de Planck dividida por  $2\pi$ . Note que como  $\mu_B$  apresenta valor negativo para o caso de um elétron livre, o momento magnético total ( $\vec{\mu}_J$ ) apresentará sentido oposto ao seu momento angular resultante ( $\vec{J}$ ).

Num sistema paramagnético, embora o momento magnético de cada elétron desemparelhado seja diferente de zero, a magnetização total (ver seção 3.1.3) é nula devido à aleatoriedade da orientação de cada momento. Entretanto, se um campo magnético estático ( $\vec{H}_o$ ) for aplicado a esse sistema, observa-se o surgimento de uma magnetização total não nula devido ao alinhamento dos elétrons em estados quantizados diferentes, o chamado efeito Zeeman ou interação Zeeman. Esse número de estados varia conforme o número quântico de spin  $m$  da partícula e obedece à regra  $2m + 1$ . Como o número quântico de spin do elétron é  $m=1/2$ , o número de estados possíveis será dois, com suas energias proporcionais a  $m_S=+1/2$  e  $m_S=-1/2$ , e portanto, os elétrons irão possuir duas orientações possíveis (figura 18) em relação ao campo aplicado: uma paralela (menor energia) e outra antiparalela (maior energia) ao campo magnético externo aplicado.

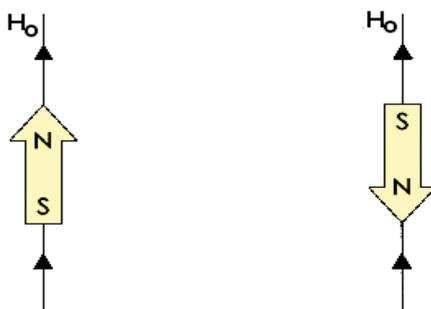


Figura 18 – Ilustração do alinhamento dos momentos de dipolo magnético (paralela e antiparalela) do elétron devido à aplicação campo magnético  $H_0$ .

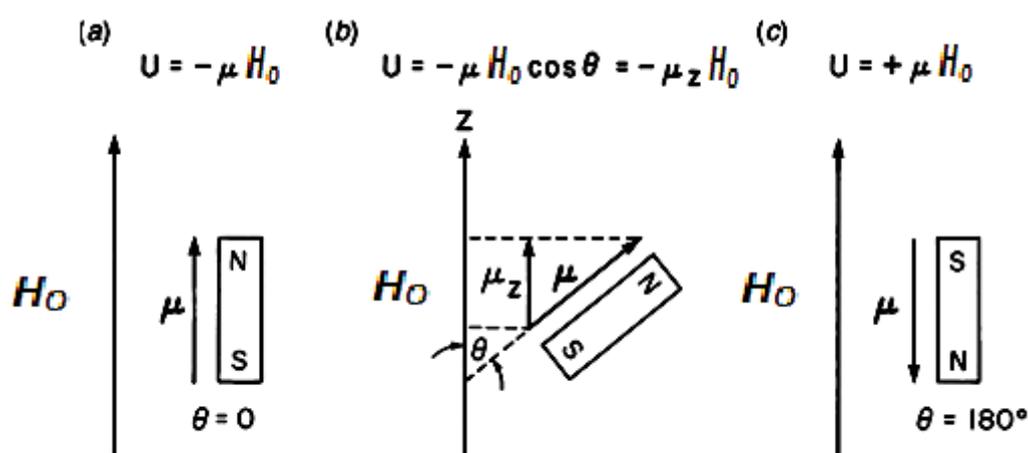


Figura 19- Ilustração da variação dos valores para a energia potencial magnética ( $U$ ) em função do ângulo  $\theta$ , o qual corresponde ao grau de alinhamento entre o momento magnético ( $\vec{\mu}_J$ ) e à direção  $z$  do campo magnético ( $\vec{H}_0$ ) aplicado: (a) alinhamento a favor do campo ( $\theta=0^\circ$ ) produz um valor mínimo para ( $U$ ); (b) alinhamento arbitrário e (c) alinhamento no sentido oposto do campo ( $\theta=180^\circ$ ) produz um máximo valor para ( $U$ ). Figura adaptada de Weil e Bolton (2007).

A energia potencial magnética ( $U$ ) em função do ângulo  $\theta$  entre o momento magnético ( $\vec{\mu}_J$ ) e a direção  $z$  do campo magnético ( $\vec{H}_0$ ) é dada pela fórmula (1.2).

$$U = -\vec{\mu}_J \cdot \vec{H}_0 \quad (1.2)$$

$$U = -|\mu_J \cdot H_0| \cos(\theta) \quad (1.3)$$

$$U = -|g_L \mu_B J \cdot H_0| \cos(\theta) \dots \dots \dots (1.4)$$

Segundo a fórmula (1.3), no caso de  $\cos(\theta) = 1$ , isto é, para um alinhamento paralelo entre o momento magnético e o campo ( $\theta = 0^\circ$ ), verifica-se que a energia ( $U$ ) apresenta seu valor mínimo (figura 19a) e, no caso de  $\cos(\theta) = -1$ , ou seja, para

um alinhamento antiparalelo ( $\theta = 180^\circ$ ), a energia ( $U$ ) apresenta seu valor máximo (figura 19c). Ainda, reescrevendo a equação (1.4) e empregando-se o formalismo hamiltoniano para um elétron desemparelhado sujeito a um campo magnético externo aplicado, a interação Zeeman pode ser caracterizada pela equação (1.5).

$$H = \mu_B \vec{J} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H}_0 \quad (1.5)$$

onde ( $\vec{g}$ ) é um tensor de segunda ordem, também conhecido como “fator g”, e define a diferença de orientação entre o campo externo ( $\vec{H}_0$ ) e o momento angular resultante do elétron ( $\vec{J}$ ).

Por outro lado, o núcleo também possui um momento de dipolo magnético intrínseco. Desse modo, o momento magnético nuclear pode interagir com o momento magnético eletrônico, provocando uma perturbação energética denominada como interação hiperfina ou acoplamento hiperfino (figura 20). Isso provocará novamente um desdobramento de energia para esse elétron segundo a regra  $2m_l+1$ , onde agora  $m_l$  corresponderá ao valor do número quântico de spin nuclear interagente. No caso do radical nitróxido, o nitrogênio apresenta número quântico de spin nuclear  $m_l=1$  e, portanto, apresentará três estados de energia ( $m_l = -1, m_l = 0$  e  $m_l = +1$ ).

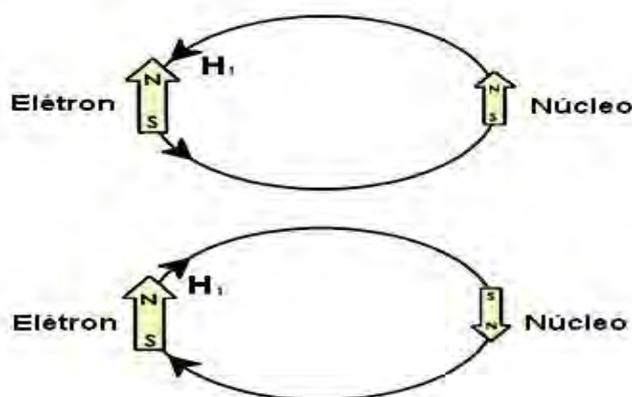


Figura 20- Ilustração da interação hiperfina: ação do campo magnético nuclear  $H_1$  sobre o momento magnético eletrônico.

Dessa forma, o termo da interação hiperfina no formalismo hamiltoniano pode ser definida pela equação (1.6).

$$\mathbf{H} = \vec{I} \cdot \vec{A} \cdot \vec{J} \quad (1.6)$$

onde  $\vec{A}$  é um tensor de segunda ordem, denominado desdobramento hiperfino, e, de modo semelhante ao “fator g”, define o acoplamento da interação entre o momento de spin de um núcleo vizinho ( $\vec{I}$ ) e o momento angular resultante do elétron desemparelhado ( $\vec{J}$ ).

Concluindo, após a interação Zeeman com o campo externo, para cada nível de energia de spin de um elétron desemparelhado (+1/2 ou -1/2) do radical nítróxido, surgirão três desdobramentos de energia devido à interação hiperfina, e desse modo, a hamiltoniana total (1.7) corresponderá à soma das equações (1.5) e (1.6):

$$\mathbf{H} = \mu_B \vec{H}_0 \vec{g} \vec{J} + \vec{I} \vec{A} \vec{J} \quad (1.7)$$

onde a solução da equação (1.7), corresponderá à energia média total que um elétron desemparelhado pode assumir devido à interação Zeeman e hiperfina.

### 3.1.2 O fenômeno da ressonância

(Atherton, 1993; Weil e Bolton, 2007)

Na ausência de um campo magnético externo, os momentos magnéticos spins eletrônicos se encontram distribuídos aleatoriamente e, portanto, a magnetização total do sistema é nula e não há uma diferença energética populacional bem definida. Entretanto, se um campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) for aplicado na direção z, após o equilíbrio térmico ser atingido, observa-se uma diferença energética entre duas populações devido à interação Zeeman (ver seção anterior), isto é, coexistirão dois estados, sendo um correspondente a uma população com alta energia ( $N_+$ ) e o outro a uma população com baixa energia ( $N_-$ ). No equilíbrio térmico, a ocupação desses estados de energia pode ser caracterizada pela equação de Boltzmann:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} = e^{-\frac{h\omega}{k_B T}} \quad (1.8)$$

onde  $k_B = 1.3806 \times 10^{-23} JK^{-1}$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura em que se encontra o sistema,  $N_-$  e  $N_+$  são as populações do estado menos energético e mais energético, respectivamente, e  $\Delta E = h\omega$  corresponde à diferença (separação) energética entre esses níveis. Segundo essa equação (1.8), no equilíbrio térmico, a população ocupando o nível energético mais baixo ( $N_-$ ) será ligeiramente maior, - proporcional ao fator de decaimento exponencial, referente ao segundo termo na equação (1.8).

Considere um sistema com diferentes estados energéticos desdobrados via interação Zeeman e hiperfina. Se nele aplicarmos um campo magnético oscilante ( $\vec{H}_1$ ), observa-se que quando a frequência ( $\omega_1$ ) do campo aplicado coincide com a diferença específica de energia ( $\Delta E$ ) entre dois estados, os elétrons desemparelhados entram em ressonância, transitando entre esses níveis. Nesse caso, quando o equilíbrio térmico é restabelecido, observam-se duas populações em equilíbrio: os elétrons do estado mais energético cedem energia (emissão) e “saltam” para o estado menos energético, enquanto que os elétrons do nível menos energético absorvem energia e “saltam” para o estado mais energético. Entretanto, como vimos anteriormente pela equação de Boltzmann, a população com nível energético é levemente mais numerosa que a com nível mais alto, e, portanto, o fenômeno de absorção supera o de emissão de energia, o que permite a utilização da RPE como técnica espectroscópica. Essa transição de energia entre os estados ressonantes é bem definida e só ocorre quando  $\Delta m_S = \pm 1$  entre os estados provenientes da interação Zeeman e, quando  $\Delta m_I = 0$  entre os estados produzidos pela interação hiperfina. A essas duas condições é denominada Regra de Seleção. Para o caso específico de um radical nítróxido, que apresenta números quânticos de spin eletrônico  $m_S = 1/2$  e nuclear  $m_I = 1$ , para cada um dos dois níveis energéticos devido à interação Zeeman ( $m_S = +1/2$  ou  $m_S = -1/2$ ), serão desdobrados três níveis energéticos devido à interação hiperfina ( $m_I = 1, 0, -1$ ) (ver seção 3.1), e desse modo, serão possíveis três transições energéticas distintas (figura 21).

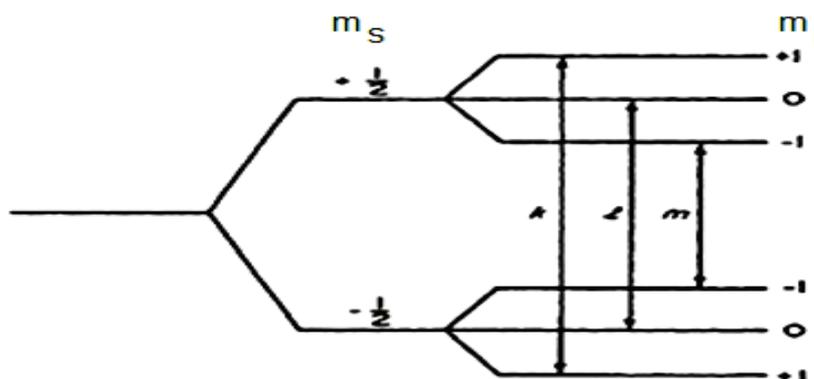


Figura 21- Ilustração dos níveis de energia adquiridos devido interação Zeeman ( $m_s = \pm 1/2$ ) e hiperfina ( $m_l = +1, 0, -1$ ) típicas de um radical nitróxido onde  $S=1/2$  e  $I=1$ . As transições de energia permitidas estão indicadas e só ocorrem para  $\Delta m_l = 0$ .

Se considerarmos que o campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) é aplicado apenas na direção  $z$ , a solução da hamiltoniana (1.6) será dada pela equação (1.9):

$$E = \mu_B g \cdot M_s H_0 \quad (1.9)$$

onde  $E$  corresponde à energia adquirida por um elétron desemparelhado devido a apenas interação Zeeman,  $M_s = \pm 1/2$  refere-se aos dois estados possíveis que o elétron pode assumir devido ação do campo magnético e,  $\mu_B$  e  $g$  são constantes conhecidas como *magnéton de Bohr* e *fator  $g$* , respectivamente. Desse modo, a energia absorvida ( $\Delta E$ ) pelo sistema será correspondente a :

$$\Delta E = \frac{1}{2} \mu_B g H_0 - \left( -\frac{1}{2} \mu_B g H_0 \right) = \mu_B g H_0 \quad (2.0)$$

e, conseqüentemente, a equação de Boltzmann (1.8) pode ser reescrita como:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{\mu_B g H_0}{kT}} \quad (2.1)$$

Analisando-se as equações (2.0) e (2.1), verifica-se que quanto maior for à intensidade do campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) aplicado, maior será a separação energética ( $\Delta E = h\omega$ ) entre as populações  $N_-$  e  $N_+$  e, portanto, maior deverá ser a frequência ( $\omega_1$ ) do campo oscilante ( $\vec{H}_1$ ) necessária para que o fenômeno da ressonância ocorra. Muitos experimentos de RPE, assim como o proposto neste trabalho, empregam um campo magnético ( $\vec{H}_0$ ) com intensidade próxima de 3300G (0,33 T), o que, segundo a equação (2.0), exige a aplicação de um campo oscilante

$(\vec{H}_1)$  com frequência ( $\omega_1$ ) da ordem de 9,0 GHz (Banda-X) característico da faixa das microondas.

Um fator que está correlacionado a equação de Boltzmann e que merece ser mencionado refere-se à sensibilidade do sistema em relação à técnica de RPE. Não é mistério que o aumento das concentrações de elétrons livres ou de marcadores na amostra aumenta a sensibilidade do sinal de RPE. Entretanto, fatores como a temperatura e a intensidade do campo magnético ( $\vec{H}_0$ ) também interferem. Segundo a equação de Boltzmann (2.1), quanto menor a temperatura de equilíbrio do sistema e maior a intensidade campo ( $\vec{H}_0$ ) aplicado, menor será o valor para o fator de decaimento exponencial (segundo termo da equação 2.1) e, conseqüentemente, maior será a diferença populacional contendo níveis energéticos distintos. Desse modo, como a sensibilidade depende essencialmente da diferença de quantidade da população que tende absorver energia (nível energético baixo) em relação a que tende emitir (nível energético alto), teoricamente um sistema paramagnético aumenta a sua sensibilidade em relação à técnica de RPE para valores de temperaturas baixos e para altas intensidades do campo magnético ( $\vec{H}_0$ ) aplicado. Por outro lado, deve-se considerar que altos valores para o campo ( $\vec{H}_0$ ) exigem que a ressonância ocorra à alta frequência de microondas, e, portanto, mesmo cessado a aplicação de ( $\vec{H}_1$ ), o sistema não entra em equilíbrio térmico imediatamente (ver tempo de relaxação spin-rede, seção 3.1.3), e acaba se tornando saturado, isto é, temporariamente insensível a uma nova aplicação da microonda, enquanto a diferença populacional energética não é reestabelecida.

### **3.1.3 As equações de Bloch**

(Atherton, 1993; Weil e Bolton, 2007; Brustolon e Giamello, 2009)

Felix Bloch propôs um conjunto de equações que descreviam classicamente a dependência da magnetização total de um sistema de spins em relação a um campo magnético aplicado. Essas equações foram originalmente criadas para descrever o comportamento magnético dos núcleos, mas também pode ser utilizada para escrever fenômenos paramagnéticos.

Um sistema paramagnético na ausência de um campo magnético apresenta uma magnetização total ( $\vec{M}$ ) nula devido à aleatoriedade dos momentos magnéticos de cada elétron desemparelhado. Entretanto, se um campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) for aplicado na direção z, após o equilíbrio térmico ser atingido, observa-se o surgimento de uma magnetização  $\vec{M}$  (módulo  $M_0$ ) paralela a direção do campo, mas nenhuma magnetização no plano x-y é observada. Entretanto, para um caso mais geral em que a magnetização  $\vec{M}$  estiver inclinada em relação ao eixo de aplicação do campo magnético estático, verificar-se-á uma variação temporal de  $\vec{M}$ , devido ao surgimento de um movimento de precessão desse vetor (figura 22a). Nesse caso, o movimento do vetor magnetização pode ser descrito por uma equação conhecida como equação fundamental de Bloch (2.2):

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{H}_{ef} \times \vec{M}) \quad (2.2)$$

onde  $\gamma = \frac{\mu_B}{\hbar}$ , é conhecido como constante giromagnética.

$\vec{H}_{ef}$ , é campo magnético efetivo (resultante) aplicado

$\vec{M}$ , é o vetor magnetização total do sistema

$\frac{d\vec{M}}{dt}$ , corresponde a variação temporal do vetor  $\vec{M}$

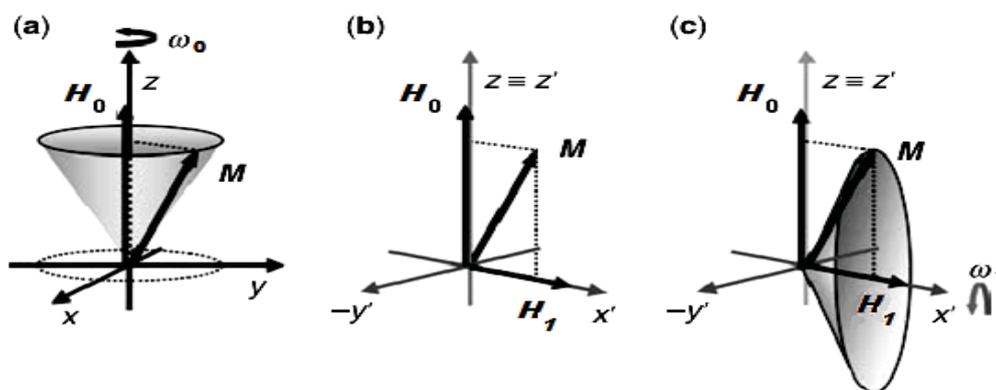


Figura 22- (a) um momento magnético clássico  $M$  (associado com um momento angular) diante da aplicação de um campo estático  $H_0$  na direção z realiza um movimento de precessão na direção do campo aplicado com frequência angular correspondente a de Larmor ( $\omega_0$ ). (b) aplicação de um campo  $H_1$  na direção perpendicular a  $H_0$ , para um conjunto de coordenadas ( $x', y', z'$ ) com o eixo  $z'$  coincidente com o eixo z. (c) para um observador nos eixos ( $x', y', z'$ ), o vetor  $M$  realiza um movimento de precessão em torno da direção do campo  $H_1$  com frequência ( $\omega_1$ ). Figura adaptada de Brustolon e Giamello (2009).

Se considerarmos que o campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) é aplicado apenas na direção z e rearranjando-se o resultado da equação (2.0), pode-se observar que os vetores magnetização dos elétrons desemparelhados apresentarão um movimento de precessão apenas na direção de ( $\vec{H}_0$ ) e com uma frequência correspondente a frequência de Larmor (figura 22a) :

$$\omega_0 = \frac{g \mu_B H_0}{\hbar} \quad (2.3)$$

onde  $\omega_0$  é a frequência de Larmor devido à presença de campo externo ( $\vec{H}_0$ ) e  $g$  é denominado “fator g” e refere-se à interação Zeeman entre elétron livre e o campo magnético estático.

Por outro lado, se alterarmos a configuração anterior, aplicando-se um novo campo girante ( $\vec{H}_1$ ) sobre o plano x-y (figura 22b), e com frequência de giro coincidente com a frequência de Larmor, verificaremos que em relação ao eixos coordenados o vetor  $\vec{M}$  será “derrubado” e precessionará na direção do campo oscilante com uma nova frequência  $\omega_1$  (figura 22c):

$$\omega_1 = \frac{g \mu_B H_1}{\hbar} \quad (2.4)$$

Entretanto, o vetor magnetização não precessionará apenas em torno da direção de ( $\vec{H}_1$ ), uma vez que este campo está em fase com a frequência de Larmor: o movimento do vetor magnetização total passará a ter um movimento complexo em forma de espiral, de forma que sua projeção sobre o eixo z passará a assumir valores oscilantes entre os extremos  $-M_0$  e  $+M_0$ , contra e a favor do campo estático ( $\vec{H}_0$ ), respectivamente, enquanto a aplicação do campo oscilante ( $\vec{H}_1$ ) for mantida. Esse fenômeno de oscilação entre os estados mais (sentido oposto de  $\vec{H}_0$ ) e menos (a mesmo sentido de  $\vec{H}_0$ ) energéticos (ver sessão 3.1.1, figura 19) corresponde à ressonância propriamente dita.

Entretanto, caso seja cessado apenas a aplicação de  $\vec{H}_1$ , verificar-se-á que o vetor  $\vec{M}$  retornará a sua posição inicial. Esse comportamento é conhecido como fenômeno de relaxação da magnetização e possuirá dois tempos

característicos conhecidos como tempo de relaxação longitudinal  $\tau_1$  e tempo de relaxação transversal  $\tau_2$ . O tempo  $\tau_1$  é também conhecido como tempo de relaxação spin-rede, pois ele refere-se ao tempo de restauração exponencial do valor da magnetização sobre o eixo z devido à interação entre os spins e a rede, enquanto o tempo  $\tau_2$  é também conhecido como tempo de relaxação spin-spin, pois ele refere-se ao tempo de decaimento exponencial do valor da magnetização sobre o plano x-y devido à perda de coerência de fase dos momentos magnéticos dos spins.

Finalmente, lembrando que o campo magnético efetivo interagente ( $\vec{H}_{ef}$ ) sobre a coleção de spins corresponderá à soma vetorial do campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) com o campo magnético oscilante ( $\vec{H}_1$ ), que está descrita na equação (2.5),

$$\vec{H}_{ef} = \vec{H}_0 + \vec{H}_1 = H_1 \cos(\omega t) \mathbf{i} + H_1 \sin(\omega t) \mathbf{j} + H_0 \mathbf{k} \quad (2.5)$$

e considerando os tempos de relaxação longitudinal  $\tau_1$  e transversal  $\tau_2$ , a equação fundamental de Bloch (1.9) pode ser reescrita como:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{H}_{ef} - \frac{1}{\tau_2} (M_x \mathbf{i} + M_y \mathbf{j}) - \frac{1}{\tau_1} (M_z - M_0) \mathbf{k} \quad (2.6)$$

ou seja, as equações de Bloch correspondentes será:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(-M_y H_0 + M_z H_1 \sin(\omega t)) - \frac{1}{\tau_2} M_x \quad (2.7)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(-M_z H_1 \cos(\omega t) + M_x H_0) - \frac{1}{\tau_2} M_y$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(-M_x H_1 \sin(\omega t) + M_y H_1 \cos(\omega t)) + \frac{1}{\tau_1} (M_0 - M_z)$$

onde  $M_0$  é a intensidade do vetor magnetização no eixo z, anteriormente à aplicação de ( $\vec{H}_1$ ). As soluções para conjunto de equações de Bloch (2.7) podem ser usadas para descrever classicamente os fenômenos paramagnéticos de RPE.

### 3.1.4 O espectrômetro de RPE

(Marsh, 1981; Weil e Bolton, 2007; Brustolon e Giamello, 2009)

A técnica espectroscópica de RPE detecta a absorção de energia de microondas em sistemas em que ocorre o fenômeno de paramagnetismo. Existem dois modos de se realizar um experimento de RPE. O primeiro modo consiste em manter a aplicação de um campo magnético estático constante (direção e intensidade constantes) e de uma microonda, cuja frequência é variada linearmente. Desse modo, quando o valor da frequência da microonda coincide com a diferença energética entre os estados produzida pelo campo magnético, o fenômeno da ressonância ocorre (figura 23a). Entretanto, visando menores custos e menor com-

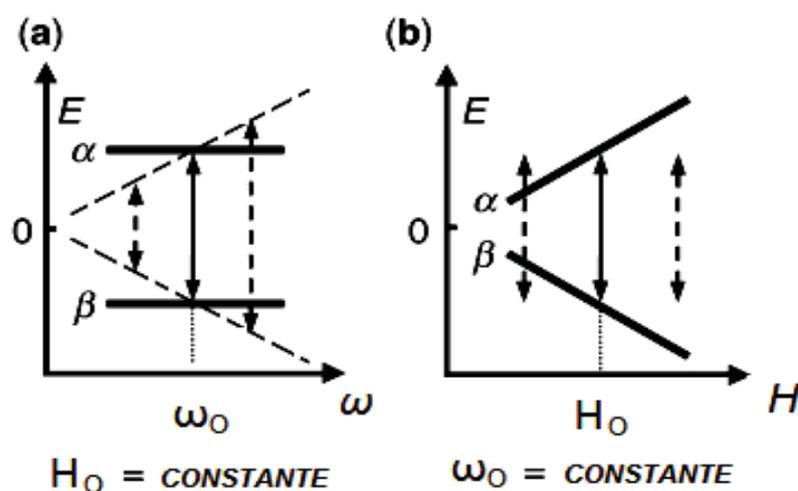


Figura 23- Ilustração de dois modos de realização de um experimento de RPE: (a) aplicação de um campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) e de uma microonda, cuja frequência é variada linearmente. As linhas horizontais paralelas indicam que a diferença energética entre dois estados  $\alpha$  e  $\beta$  é mantida fixa, enquanto as linhas verticais de diferentes comprimentos indicam que a energia fornecida pela microonda é variada linearmente; (b) aplicação de uma microonda com frequência fixa e variação linear da intensidade do campo magnético aplicado. As linhas inclinadas indicam que a diferença energética entre dois estados  $\alpha$  e  $\beta$  é variada proporcionalmente à variação da intensidade campo magnético, enquanto as retas verticais indicam que a energia fornecida pela microonda é mantida fixa. O cruzamento entre as linhas sólidas indicam a ocorrência do fenômeno da ressonância para os dois modos. Figura adaptada de Brustolon e Giamello (2009).

plexidade de fabricação, o aparelho comercial de RPE é produzido para funcionar em um modo alternativo, no qual a frequência da microonda é mantida fixa (frequência ou banda fixa), enquanto a intensidade do campo magnético é variado linearmente. Nesse caso, considerando que a diferença energética entre os estados

assume valores variáveis e proporcionais à intensidade do campo magnético, a ressonância magnética ocorre quando um dado valor de campo produz uma diferença energética coincidente com o valor energético determinado pela frequência fixa da microonda (figura 23b).

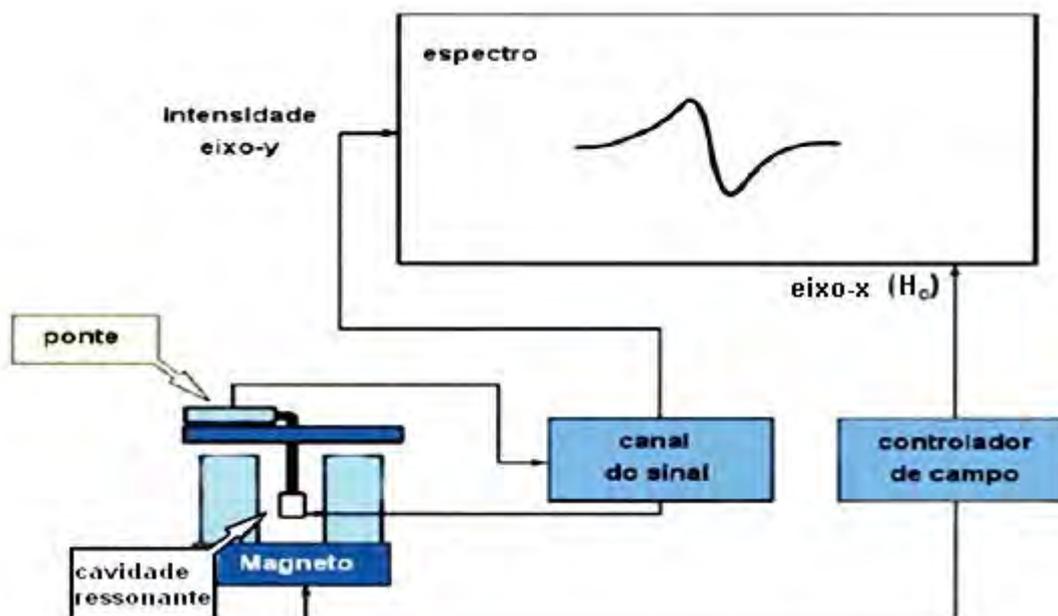


Figura 24 – Diagrama de blocos do espectrômetro de RPE: ponte, cavidade ressonante, magneto e espectro de RPE.

Os espectrômetros mais comuns são os de banda X, - frequência fixa de microondas produzida é da ordem de 9 GHz-, a qual requer aplicação de um campo magnético ( $\vec{H}_0$ ) com intensidade próxima dos 3300G (ver seção 3.1.2), cuja intensidade é convenientemente variada dentro de um intervalo correspondente a 100G. A figura 24 é um diagrama de blocos de um espectrômetro típico de RPE. A ponte de microondas contém tanto a fonte produtora de microonda, como um detector. A microonda produzida na ponte incide sobre a amostra que está numa cavidade localizada entre ímãs geradores do campo magnético variável. Após a ressonância e conseqüente absorção de energia pela amostra, a microonda é refletida para a ponte e terá sua intensidade detectada. A diferença entre a intensidade da microonda incidente e refletida será correspondente a intensidade de energia absorvida pela amostra, sendo essa quantidade adquirida para cada valor do campo magnético varrido num espectro que geralmente corresponde à primeira derivada de um espectro de absorção.

### 3.1.5 O espectro de RPE

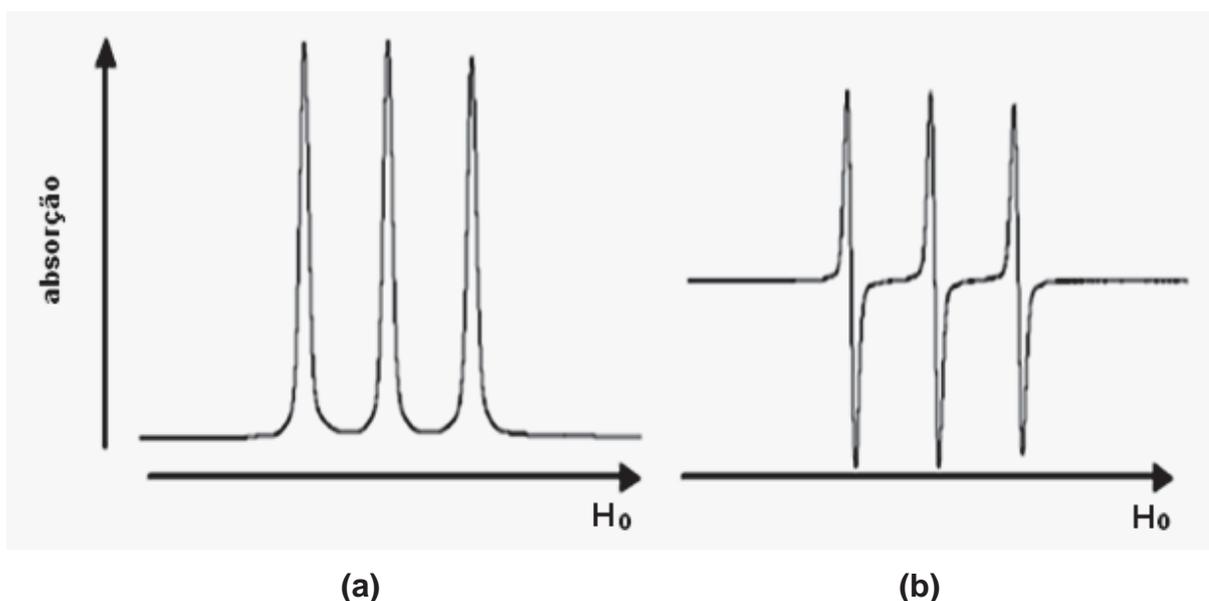


Figura 25 - Exemplo de espectros de movimento rápido obtidos para o radical nitróxido: (a) espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro de absorção.

O espectro de RPE de marcadores de spin anfífilo incorporados a agregados lipídicos corresponde à primeira derivada do espectro de absorção (figura 25) para um dado marcador de spin e ele informa sobre a micro-viscosidade e a polaridade da região onde se encontra o grupo paramagnético (Marsh, 1981; Ge e Freed, 1998; Brustolon e Giamello, 2009). Esse grupo-sonda pode tanto estar ligado à cabeça polar do anfífilo, portanto informando sobre propriedades da interface do agregado com o meio aquoso, como estar ligado a um dos carbonos da cadeia acila do anfífilo (Marsh, 1981; Ge e Freed, 1998; Ge e Freed, 1999; Fernandez e Lamy-Freund, 2000; Ge e Freed, 2003; Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008). No caso do radical nitróxido (grupo sonda), cujo espectro de RPE é caracterizado pela presença de três linhas hiperfinas (figura 25) devido às três transições energéticas possíveis durante a ressonância (ver sessão 3.1.2), a assimetria desse radical torna seu espectro de RPE sensível ao ordenamento da região onde ele se encontra (ver seção 3.1.8).

Portanto, a análise dos espectros de RPE permite a identificação tanto de regiões altamente organizadas e rígidas, típicas de anfífilo na fase gel-cristalina, como de regiões mais fluidas, relacionadas à fase líquido-cristalina de bicamadas lipídicas. Para informações sobre a correlação entre a forma que os espectros podem assumir e os parâmetros analisados, favor consultar a próxima seção.

### 3.1.6 Os parâmetros analisados dos espectros de RPE

(Marsh, 1981; Schneider e Freed, 1989a; Budil, Lee, *et al.*, 1996)

Uma importante aplicação de RPE e de outras ressonâncias magnéticas, em geral, é o estudo da dinâmica molecular de um determinado marcador em membranas biológicas, em superfícies ou ligado a agregados moleculares. Em espectros de movimento rápido podem-se obter os parâmetros de interesse de maneira direta (Turchiello, Juliano, *et al.*, 2000), isto é, medindo-se diretamente os parâmetros espectrais. Entretanto, no caso de espectros anisotrópicos de movimento lento, como a relação entre o espectro e a obtenção dos parâmetros de interesse é predominantemente indireta, se torna necessária a simulação desses parâmetros (Schneider e Freed, 1989a; Fernandez e Lamy-Freund, 2000).

Em geral, podem-se definir três classes de parâmetros espectrais necessárias para a análise de RPE num sistema: parâmetros magnéticos e estruturais, parâmetros de ordem e parâmetros dinâmicos. Espectros de movimento rápido (motional narrowing region) são altamente isotrópicos e, portanto, podem ser analisados pelos parâmetros dinâmicos (tempos de correlação rotacional), que se referem à mobilidade de um dado marcador. Por outro lado, espectros de limite rígido, por se caracterizarem como sistemas altamente ordenados, não exigem qualquer parâmetro dinâmico, mas requerem as componentes dos tensores magnéticos  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$ ; enquanto que, espectros de movimento lento (slow motion) geralmente requerem todas as informações referentes aos tensores magnéticos e à dinâmica rotacional para caracterizar o movimento e ou a ordem molecular. Nesse caso, a tecnologia computacional se torna necessária, pois a simulação requer a solução de equações de matrizes de grande porte, como é o caso do método de minimização não-linear dos mínimos quadrados, as quais são facilmente resolvidas pela escolha conveniente de diferentes algoritmos.

Os seguintes sistemas de eixos são utilizados nas simulações: o sistema molecular, o sistema diretor, o sistema magnético e o sistema de laboratório.

- O sistema de laboratório ( $x_L, y_L, z_L$ ) é o sistema fixo de referência, onde  $z_L$  é o eixo em que o campo magnético estático ( $\vec{H}_0$ ) é aplicado.
- O sistema diretor ( $x_d, y_d, z_d$ ) é o sistema de eixos de orientação média das cadeias acila em fluídos anisotrópicos sendo que o eixo  $z_d$  é tomado como

sendo normal a cada ponto da superfície da bicamada, enquanto os eixos  $x_d$  e  $y_d$  são tangenciais à superfície.

- O sistema magnético ( $x_m, y_m, z_m$ ) é o sistema de eixos em que os tensores  $g$  e  $A$  são diagonalizados, onde o eixo  $x_m$  define a direção do eixo N-O, o eixo  $z_m$  é paralelo ao orbital  $2p-\pi$  do átomo de nitrogênio e o eixo  $y_m$  é escolhido segundo a regra da mão direita, sendo perpendicular aos outros eixos (figura 26).
- O sistema de difusão molecular é o sistema de eixos referentes à difusão rotacional do marcador, onde o eixo  $z_R$  é tomado como sendo paralelo ao eixo de axial de rotação do radical. No caso do marcador 16-PC o eixo  $z_R$  é tomado como sendo paralelo ao  $z_d$  (figura 26). No caso específico do marcador do tipo dipalmitoilfosfatidiltempocolina (DPPTC) assume-se que o eixo  $z_R$  é paralelo à ligação N-O (Ge e Freed, 1998), eixo  $y_R$  é definido como sendo normal ao plano do anel piperidina (figura 27) e o movimento do radical nítróxido pode ser caracterizado pela rotação interna sobre os eixos  $z_R$ (rotação),  $x_R$ (batida) e  $y_R$ (corte) (Ge e Freed, 2003).

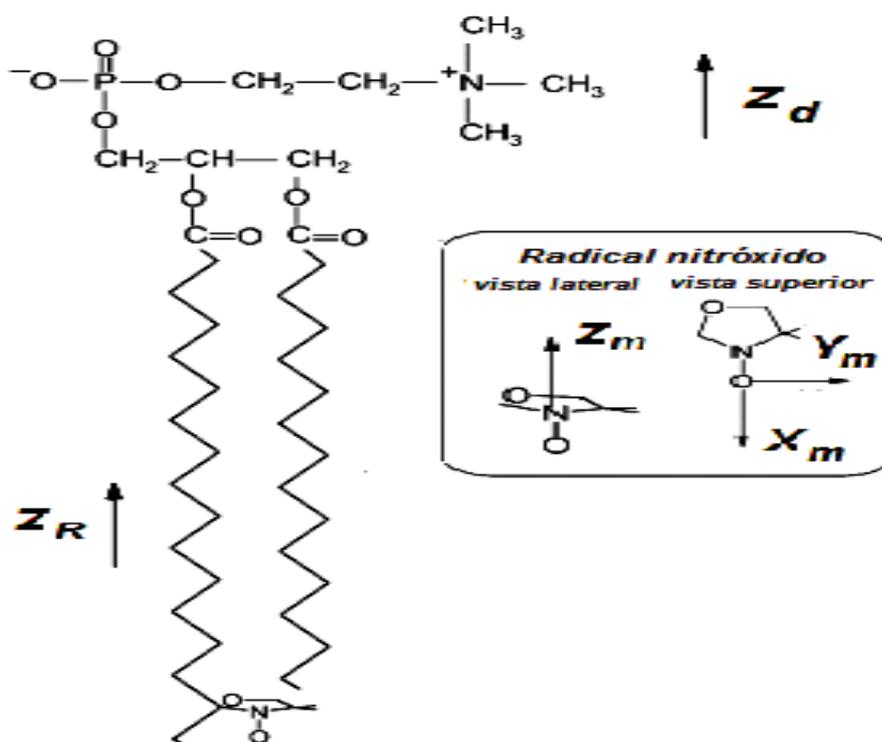


Figura 26- Estrutura química do marcador de spin do tipo 16-PC (16-fosfatidilcolina). O sistema de eixos magnéticos ( $x_m, y_m, z_m$ ), o eixo rotacional  $z_R$  e o eixo diretor  $z_d$  estão indicados (Costa-Filho, Shimoyama e Freed, 2003)

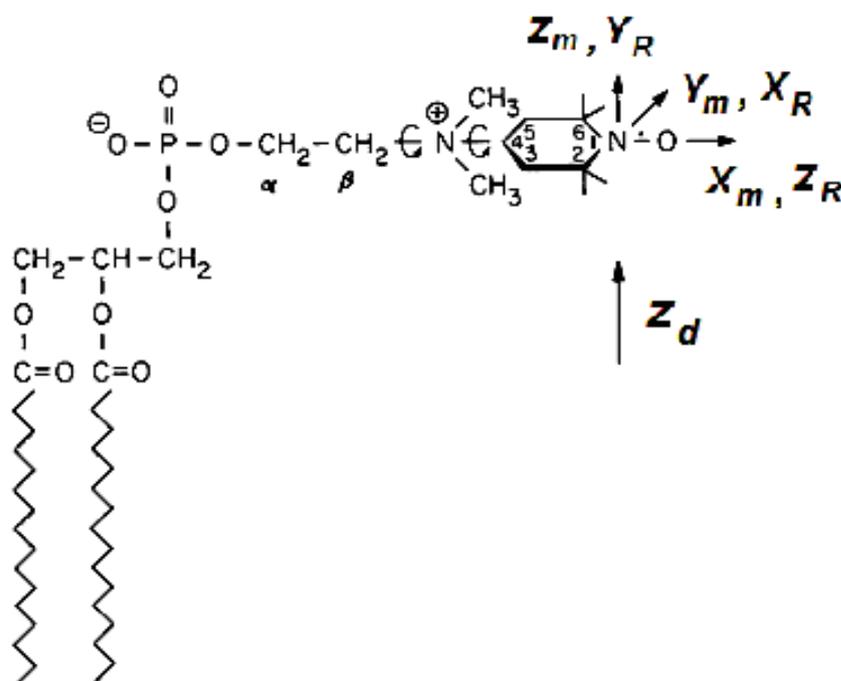


Figura 27 - Estrutura química do marcador de spin dipalmitoilfosfatidiltempocolina (DPPTC). O sistema de eixos magnéticos ( $x_m$ ,  $y_m$ ,  $z_m$ ), rotacional ( $x_d$ ,  $y_d$ ,  $z_d$ ) e o eixo diretor  $z_d$  estão indicados (Ge e Freed, 1998).

A relação entre esses quatro sistemas de coordenadas são determinados por diferentes conjuntos de ângulos de inclinação. Os ângulos de difusão ( $\alpha_D, \beta_D, \gamma_D$ ) especificam a rotação do sistema de eixos magnético em relação ao sistema de eixo molecular, enquanto que os ângulos de inclinação magnética ( $\alpha_m, \beta_m, \gamma_m$ ) são aqueles que especificam a rotação entre os eixos do tensor  $A$  e do tensor  $g$ , sendo  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  associados às rotações sobre os eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$ , respectivamente.

### 3.1.6.1 O fator $g$ e o fator desdobramento hiperfino

(Marsh, 1981; Schneider e Freed, 1989a; Budil, Lee, *et al.*, 1996)

Os tensores  $g$  e  $A$  são parâmetros magnéticos e estruturais, pois se referem à dependência direcional (anisotropia) da interação do momento magnético do elétron desemparelhado que um sistema possui em relação a um campo estático externo e/ou a um o momento magnético nuclear vizinho, respectivamente. Desse modo, é comum se definir esses tensores como matrizes diagonais com as

componentes ( $g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}$ ) para o tensor  $g$  e as componentes ( $A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}$ ) para o tensor  $A$ , visando fixar esses tensores sobre o sistemas de eixos magnéticos adotados.

Em sistemas com simetria axial, para o tensor  $A$  adota-se  $A_{xx}=A_{yy}=A_{\perp}$  e  $A_{zz}=A_{\parallel}$ , com  $A_{\perp} \neq A_{\parallel}$  e de forma similar  $g_{xx}=g_{yy}=g_{\perp}$  e  $g_{zz}=g_{\parallel}$ , com  $g_{\perp} \neq g_{\parallel}$ . Entretanto, se o sistema for isotrópico para a interação Zeeman, isto é, independente da orientação do campo estático externo aplicado, o tensor  $g$  pode ser substituído por um valor escalar ( $g_0$ ) que será definido pela média dos valores de suas três componentes (equação 2.8).

$$g_0 = \frac{g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}}{3} \quad (2.8)$$

Da mesma forma, se o sistema for isotrópico para a interação hiperfina, o tensor  $A$  pode ser substituído pelo desdobramento hiperfino isotrópico ( $a_0$ ) que será definido pela média dos valores de suas três componentes (equação 2.9).

$$a_0 = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{3} \quad (2.9)$$

Em sistemas de limite rígido (monocristal) com simetria axial para o tensor  $A$  pode-se medir o valor do desdobramento hiperfino máximo  $2A_{MÁX}$  e o valor do desdobramento hiperfino mínimo  $2A_{MÍN}$  diretamente do espectro (figura 28A) (Freed, 1976). O primeiro valor corresponderá ao dobro do valor de  $A_{\parallel}$  e o segundo valor pode ser usado para calcular o valor de  $A_{\perp}$  através da equação 3.0,

$$A_{\perp} = A_{min} + 1,4 \left[ 1 - \frac{A_{\parallel} - A_{min}}{A_{ZZ} - (A_{XX} + A_{YY})/2} \right] \quad (3.0)$$

sendo que na equação (3.0) os valores de  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  e  $A_{zz}$  são componentes do tensor  $A$  para o radical nitróxido em um monocristal (tabela 1).

Tabela 1 – Valores principais dos tensores  $g$  e  $A$  do radical nitróxido em um monocristal (Marsh, 1981).

	<b>Axx(G)</b>	<b>Ayy(G)</b>	<b>Azz(G)</b>	<b>Gxx</b>	<b>Gyy</b>	<b>Gzz</b>
<b>Doxil – cadeia alifática</b>	5,9	5,4	32,9	2,0088	2,0058	2,0021

Desse modo, mesmo o sistema não sendo isotrópico, pode-se calcular em uma primeira aproximação o valor do desdobramento hiperfino isotrópico  $a_0$  pela equação (3.1).

$$a_0 = \frac{2A_{\perp} + A_{//}}{3} \quad (3.1)$$

Em sistemas de movimento rápido, embora  $2A_{MÁX}$  e  $2A_{MÍN}$  não possam ser medidos, a isotropia do espectro permite a medição do valor  $2a_0$  diretamente no espectro (figura 28B).

Por outro lado, em sistemas de movimento lento, não é possível medir  $A_{MÁX}$ ,  $A_{MÍN}$ , e tampouco  $a_0$ . Nesse caso, por meio da simulação podem-se encontrar os valores de  $A_{\perp}$  e  $A_{//}$  em um sistema com simetria axial, os quais poderão ser utilizados para calcular o valor  $a_0$ , de acordo com a equação (3.1) também utilizada para os sistemas no limite rígido.

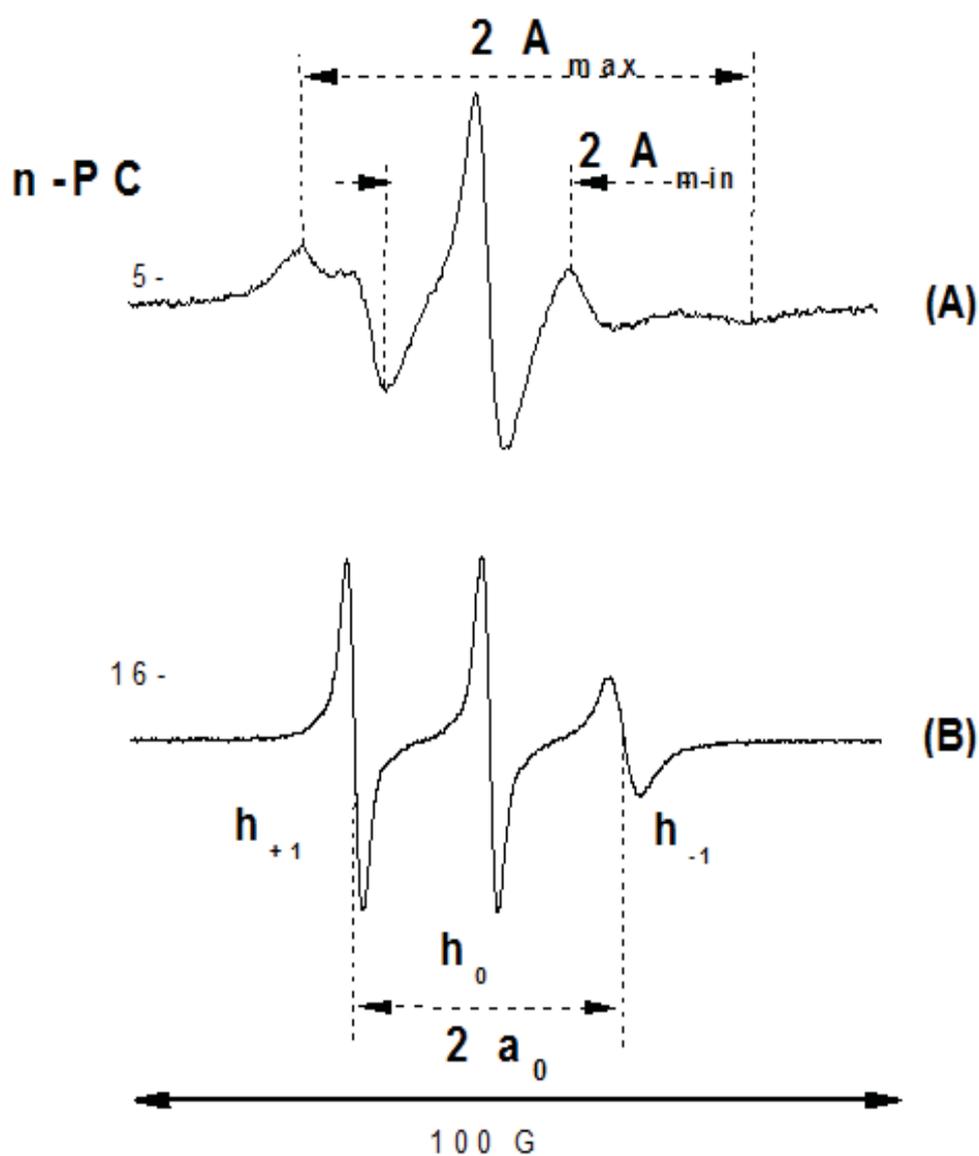


Figura 28– Espectros de marcadores nitróxido do tipo n-PC(fosfatidilcolina), onde (A)  $n=5$  para o marcador de superfície e, (B)  $n=16$  para o marcador no final da cadeia carbônica (marcador do centro da bicamada). Os parâmetros  $A_{MÁX}$ ,  $A_{MÍN}$  e  $a_0$  estão indicados.

### 3.1.6.2 Parâmetro de ordem

(Schneider e Freed, 1989a; Budil, Lee, *et al.*, 1996; Ge e Freed, 1999; Fernandez e Lamy-Freund, 2000)

O parâmetro de ordem  $S$  de um sistema descreve o grau de organização do sistema em que o radical nitróxido se encontra e possui valor entre 0 e 1, sendo que quanto maior for a anisotropia do sistema, mais próximo da unidade será o valor do parâmetro de ordem. Tal parâmetro pode ser obtido a partir dos valores

espectrais de  $A_{MAX}$  e  $A_{MIN}$  quando estes podem ser medidos (ver seção anterior), sendo conhecido como ordem efetiva do sistema ( $S_{eff}$ ):

$$S_{eff} = \frac{A_{//} - A_{min}}{A_{ZZ} - (A_{XX} + A_{YY})/2} \quad (3.2)$$

onde os termos  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  e  $A_{zz}$  na equação (3.2) são constantes, cujos valores correspondem às componentes do tensor hiperfino  $A$  para o radical nitróxido em um monocristal (tabela 1).

No caso da simulação de espectros de RPE o parâmetro de ordem está associado ao potencial de orientação, cujos parâmetros  $c_{20}$  e  $c_{22}$  são coeficientes de 1ª e 2ª ordem desse potencial. O parâmetro  $S_{20}$  está associado ao coeficiente  $c_{20}$ , de modo que um baixo valor para esse coeficiente indica um alto desalinhamento (alta dispersão angular) do radical em relação ao seu eixo diretor  $z_d$  (normal à superfície da bicamada) e, desse modo, um aumento da desordem (baixo valor para  $S_{20}$ ) do sistema. Além disso, enquanto para valores positivos de  $S_{20}$  o eixo  $z_R$  de rotação axial molecular apresenta-se paralelo ao eixo diretor  $z_d$  (ordem na mesma direção de  $z_d$ ), valores negativos indicam que o eixo de rotação  $z_R$  está deslocado no plano  $x_d$ - $y_d$  do eixo diretor (ordem na direção do plano perpendicular a  $z_d$ ). Por outro lado, o coeficiente  $c_{22}$  determina os valores que podem assumidos pelo parâmetro  $S_{22}$ , o qual quando presente e independentemente do sinal, indica que há uma tendência de alinhamento do eixo rotacional  $z_R$  em relação ao plano  $x_d$ - $y_d$  do eixo diretor, sendo que para valores positivos (negativos) o eixo  $x_R$  ( $y_R$ ) está preferencialmente alinhado com o eixo  $z_d$ .

É interessante citar, ainda, que durante as simulações o aumento no coeficiente  $c_{20}$  do potencial diretor produz sobre os espectros uma mudança no 1º pico (campo magnético baixo) transformando a forma aproximadamente simétrica em um pico mais largo e aparentemente composto, seguida de um aumento da altura do 2º pico (campo magnético central); enquanto a diminuição de  $c_{20}$  promove o aumento da altura e um estreitamento do 1º pico, e uma redução na altura do 2º. Em relação ao parâmetro  $c_{22}$ , uma redução em seu valor promove um melhor ajuste na altura do 1º pico, porém com uma perda na altura do 2º pico e vice-versa.

### 3.1.6.3 Tempos de correlação rotacional

(Marsh, 1981; Schneider e Freed, 1989b)

Os tempos de correlação ( $\tau$ ) são parâmetros dinâmicos, que para o caso especial de espectros que monitoram sistemas em que se encontram no regime de movimento rápido, estão intimamente associados com a largura das linhas espectrais, e, portanto podem ser estimados através de medidas diretas sobre esses espectros. Entretanto, em regimes de movimento lento, os espectros se tornam anisotrópicos, e, portanto, os tempos de correlação não podem ser obtidos diretamente, e só podem ser analisados através dos valores principais obtidos para o tensor de difusão rotacional axialmente simétrico: os parâmetros  $R_{\perp}$  e  $R_{\parallel}$ , que representam, respectivamente, a taxa de difusão perpendicular (translacional) e paralela (rotacional) em relação ao eixo de simetria (sistema de eixo molecular) do radical nitróxido (ver seção 3.1.6). Nesse caso, os tempos de correlação rotacional ( $\tau_{\perp}$  e  $\tau_{\parallel}$ ), portanto, podem ser calculados baseados nos valores de  $R_{\perp}$  e de  $R_{\parallel}$  por meio da equação (3.3)

$$\tau = \frac{1}{6R} \quad (3.3)$$

onde  $R_{\perp}$  e  $R_{\parallel}$  tem unidade de  $[\text{s}]^{-1}$ , e são obtidos empregando-se a base dez ( $10^x$ ), cujas potências (x) são correspondentes aos valores de  $r_{prp}$  e  $r_{pll}$ , respectivamente, sendo que esses últimos parâmetros fornecidos somente através de simulação espectral.

A ordem dos tempos de correlação é característica do movimento dos marcadores de spin:

- para  $\tau < 10^{-11}$  os marcadores apresentarão um movimento muito rápido e independente da orientação do campo aplicado, isto é, o espectro será isotrópico (figura 29 e) com as alturas das linhas iguais e os tensores  $g$  e  $A$  corresponderão respectivamente a  $a_0$  e  $g_0$ .
- para  $10^{-11} < \tau < 3 \cdot 10^{-9}$  os radicais se movimentarão rapidamente (motional narrowing) e o espectro apresentará uma isotropia parcial, isto é, alturas e larguras das linhas pouco diferenciadas.

- para  $3 \cdot 10^{-9} < \tau < 10^{-7}$  os marcadores se movimentarão lentamente (slow motion) e a simulação se torna necessária para a análise do espectro nesse regime.
- para  $\tau > 10^{-7}$  os marcadores se encontrarão praticamente imóveis e o espectro é altamente anisotrópico (espectro de pó), isto é, seu espectro corresponderá a soma dos sinais (figura 29 d) para todas as orientações (figura 29 a,b,c) do campo magnético.

Em relação a simulações espectrais é importante lembrar que considerando a fórmula (3.3), altos valores de  $r_{prp}$  e  $r_{pll}$  implicam em pequenos valores assumidos pelos tempos de difusão rotacional, desse modo, grandes valores para  $r_{prp}$  e  $r_{pll}$  representam que os marcadores apresentam grande mobilidade e, portanto, mais isotrópicos serão os espectros em relação os 1º e 2º picos, isto é, apresentarão linhas espectrais mais estreitas e com alturas semelhantes para os 1º e 2º picos.

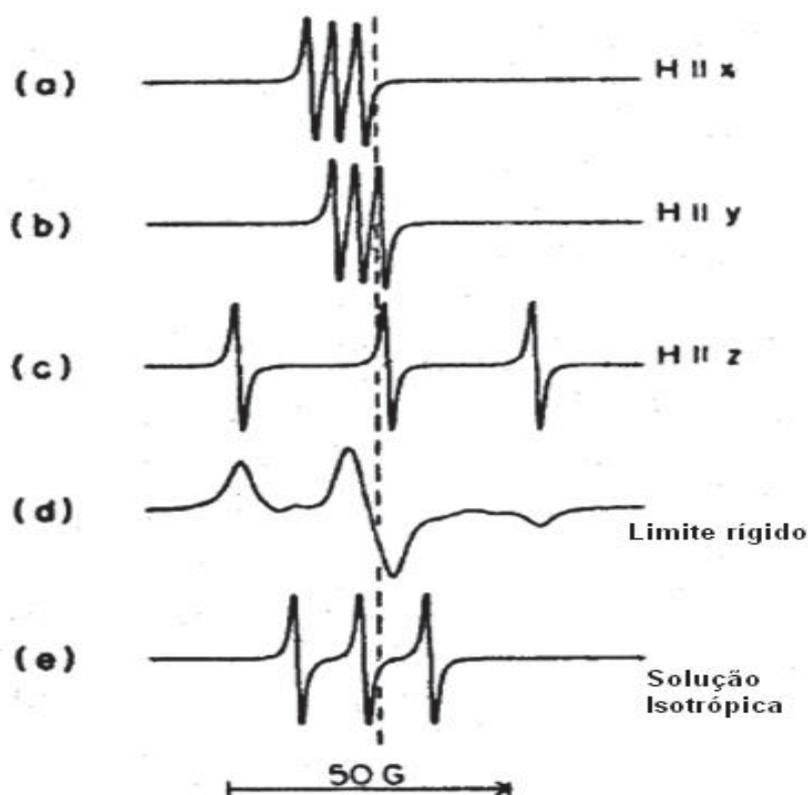


Figura 29 – Espectros de RPE obtidos para o campo magnético aplicado sobre o (a) eixo-x, (b) eixo-y, e (c) eixo-z. Em (d) representa-se um espectro de pó (anisotrópico) e em (e) espectro isotrópico independente da orientação do campo magnético aplicado (Marsh, 1981).

### 3.1.6.4 Largura e alturas das linhas espectrais

Como visto nas sessões anteriores, as linhas espectrais são muito sensíveis ao grau de ordenamento e de mobilidade dos marcadores de spin (Schneider e Freed, 1989b; Fernandez e Lamy-Freund, 2000), desse modo, a análise direta dos dados obtidos com a técnica de RPE podem ser realizada através do estudo comparativo entre as medidas das alturas e das larguras das linhas espectrais (Marsh, 1981; Turchiello, Juliano, *et al.*, 2000; Fernandez e Lamy-Freund, 2000; Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008). Considerando que os espectros isotrópicos monitoram regiões mais fluídas, enquanto espectros anisotrópicos são característicos de sistemas mais viscosos, dentre os parâmetros utilizados na análise direta destacam-se:

- a razão entre as alturas (figura 30) dos picos para o campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) ou entre o campo alto baixo e central ( $h_{-1}/h_0$ ): um valor próximo de uma unidade indica que as alturas dos diferentes picos apresentam valores semelhantes e, portanto, maior será a isotropia do sistema, ou seja, maior o grau de fluidez.
- larguras do pico (figura 30) para campo central ( $\Delta h_0$ ), para campo baixo ( $\Delta h_{+1}$ ) e para o campo alto ( $\Delta h_{-1}$ ): quanto maior a largura dos picos, maior será anisotropia do sistema, ou seja, maior a viscosidade.

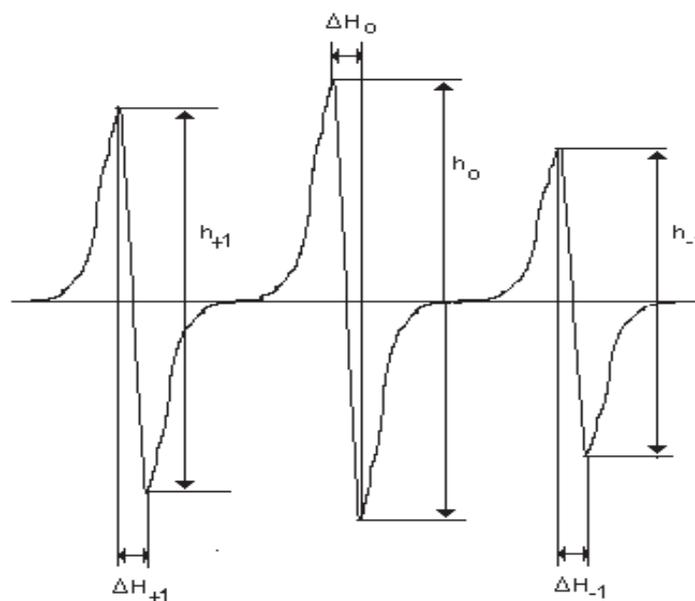


Figura 30- Ilustração esquemática de um espectro isotrópico mostrando os picos baixo ( $m=+1$ ), central ( $m=0$ ) e alto ( $m=-1$ ) e suas respectivas alturas ( $h$ ) e larguras ( $\Delta h$ ).

Cabe lembrar, ainda, que como as características espectrais são influenciadas tanto pelo tipo de marcador utilizado, assim como, pelas alterações de vizinhanças que eles monitoram, certos espectros de RPE podem apresentar picos pouco definidos, o que determina baixa sensibilidade para uma análise direta das medidas de suas linhas e, portanto, a análise direta nem sempre apresenta bons resultados, - principalmente em sistemas com regime de movimento lento (ver seção 3.1.6).

## **3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

A análise térmica de materiais pode ser realizada por um conjunto variado de técnicas, entretanto, todas elas visam um mesmo objetivo: medir a resposta de um material diante de um aquecimento ou de um resfriamento, permitindo, assim, determinar correlações entre propriedades físicas do material analisado em relação a variações de temperatura (Hatakeyama e Liu, 1998). A calorimetria diferencial de varredura ( *differential scanning calorimetry* - DSC) é a técnica mais amplamente utilizada para análise térmica de materiais e consiste na medição da diferença de fluxo de calor para uma amostra em relação a uma referência diante de uma variação linear de temperatura, à pressão constante (Gabbott, 2008; Menczel e Prime, 2009).

### **3.2.1 O aparelho de DSC**

(Gabbott, 2008; Menczel e Prime, 2009)

Um aparelho de DSC, que utiliza o princípio de compensação de potência, é basicamente composto por duas células, sendo uma destinada à amostra e outra à referência, as quais se apresentam isoladas adiabaticamente do ambiente. Cada uma contém acoplada uma resistência, que é responsável pelo fornecimento de calor individual, e um sensor de temperatura (figura 31). A temperatura entre as células é mantida invariável, mas ambas são aquecidas ou resfriadas linearmente conforme o intervalo de temperatura desejado. Quando a célula contendo a amostra absorve ou libera calor, ela exige que uma maior ou menor potência seja fornecida, respectivamente, para que a sua temperatura seja

mantida coincidente com a da referência. Desse modo, essa variação de potência de energia fornecida entre a referência é convertida em curvas de calor específico x temperatura, que são também conhecidas como perfis calorimétricos. Esse fato pode ser justificado, considerando que uma maior (menor) potência implica numa maior (menor) quantidade de calor a ser fornecida para que o sistema varie sua temperatura, indicando, portanto, um aumento (decréscimo) do calor específico ( $C_p$ ) dessa amostra. Essas variações quanto ao calor específico estão correlacionadas a alterações físico-químicas na amostra, e, portanto, resultam no monitoramento de diferentes propriedades assumidas pelo sistema em função da temperatura.

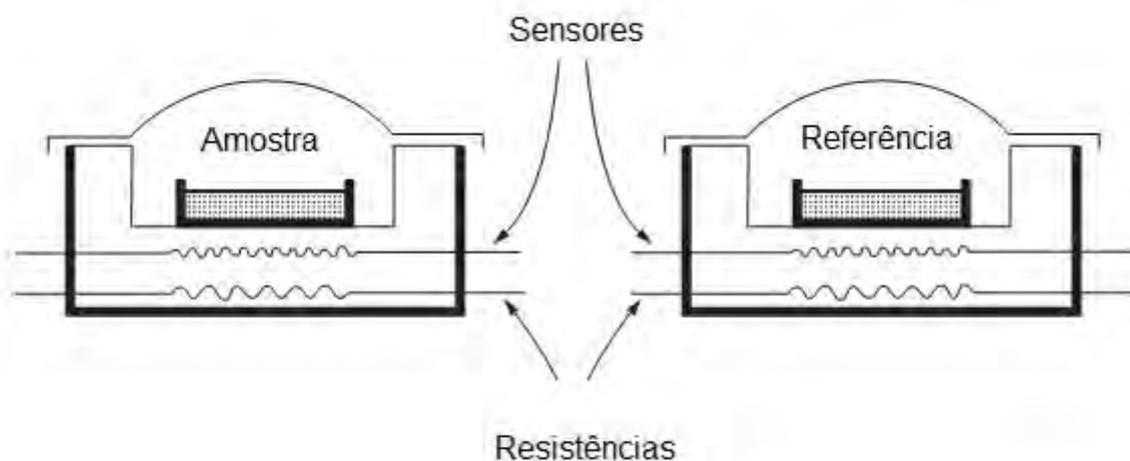


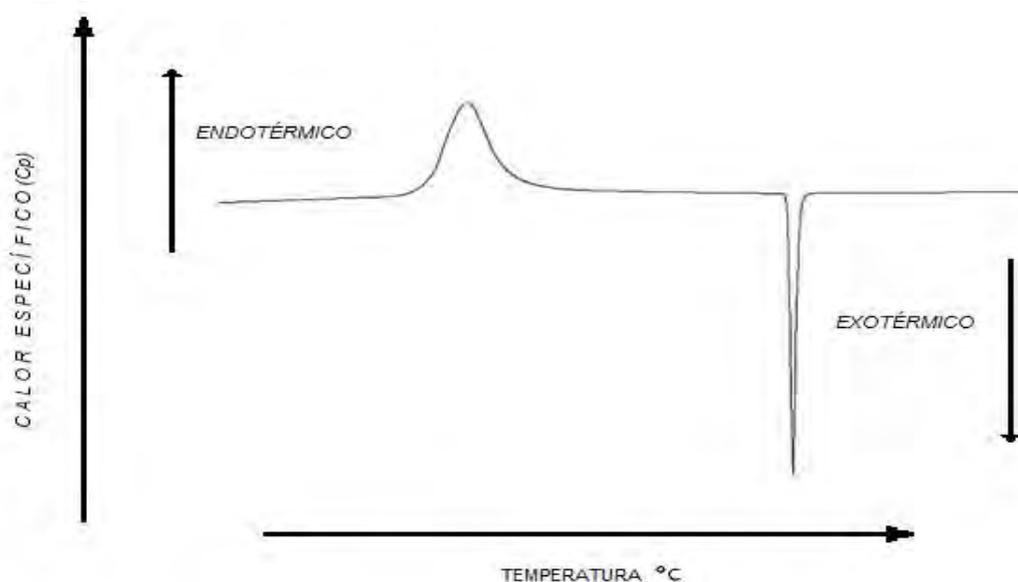
Figura 31- Ilustração esquemática de um aparelho de DSC de compensação de potência: duas células (uma para a amostra e outra para a referência) contendo resistências e sensores de temperatura individuais. A temperatura entre as células é mantida invariável durante um resfriamento ou aquecimento das células através de variações na potência da resistência da amostra. Figura adaptada de Menczel e Prime (2009).

### 3.2.2 Os parâmetros analisados das curvas calorimétricas de DSC

(Chapman, Urbina e Keough, 1974; Gabbott, 2008)

A técnica de DSC é bastante empregada para o estudo das transições de fase de membranas modelo e de diversos materiais orgânicos ou não. Nesse caso, essa técnica é utilizada para detectar os intervalos de temperatura em que as transições de fase ocorrem à pressão constante, através da medição de picos ou de vales de calor específico ( $C_p$ ) em função da temperatura, os quais corresponderão a

curvas de calor absorvido ou liberado, respectivamente (figura 32). Ainda, como tanto a altura e quanto a forma dessas curvas podem variar, elas são também conhecidas como perfis calorimétricos, cujas características estão intimamente associadas com as propriedades físico-químicas de cada sistema. Por exemplo, na figura 32, pode-se observar um processo endotérmico seguido por um exotérmico para uma mesma amostra. Esse comportamento pode ser explicado por uma transição com perda de organização estrutural (pico), seguida por uma transição com ganho de organização (vale). Esta última é característica de materiais que apresentam uma propriedade de recristalização, a qual é produzida geralmente devido a uma perda de solvatação em suas estruturas.



**Figura 32-** Ilustração de um perfil calorimétrico contendo um processo endotérmico e outro exotérmico para uma mesma amostra. A primeira estrutura (pico) corresponde a um aumento do calor específico e, portanto, refere-se a uma transição típica de um estado mais organizado para um menos organizado. A segunda estrutura (vale) corresponde à perda de calor específico pela amostra, isto é, perda de solvatação (recristalização), referindo-se a uma transição de um estado menos organizado para um mais organizado. Figura adaptada de Gabbott (2008).

Sistemas constituídos por apenas fosfolipídios e água costumam apresentar um pico característico de transição de fase em seus perfis calorimétricos. A carga das cabeças polares lipídicas, valor de pH, força iônica, assim como o comprimento as cadeias hidrocarbônicas são exemplos de fatores que podem alterar o modo como lipídios interagem entre si e com outras biomoléculas, o que é refletido também em alterações de perfis calorimétricos (Kodama e Miyata, 1996; Schneider, Marsh, *et al.*, 1999; Fernandez e Lamy-Freund, 2000; Cseh, Hetzer, *et al.*, 2000;

Riske, Amaral e Lamy-Freund, 2001). Em perfis calorimétricos representados por picos de formas simétricas pode-se estimar a cooperatividade de transição desses sistemas, a qual será proporcional à medida da largura a meia altura desses picos em curvas DSC: uma perda na cooperatividade de um sistema (alargamento do pico) corresponde a um decréscimo na quantidade média de lipídios que transicionam uniformemente de um estado a outro para um dado valor ou intervalo de temperatura, e vice-versa.

Além disso, como a integral da área das curvas calorimétricas de calor específico x temperatura correspondem à entalpia de transição ( $\Delta H$ ) (Heimburg e Biltonen, 1994; Heimburg, 1998), cujo valor refere-se à energia envolvida num processo de transição, pode-se determinar a quantidade de energia total (calor) que deve ser fornecida (processo endotérmico,  $\Delta H$  positivo) ou liberada (processo exotérmico,  $\Delta H$  negativo) da amostra para que haja uma mudança de fase (figura 33). Uma redução no valor de  $\Delta H$ , a qual foi correlacionada a uma perda na intensidade de interação (forças de van der Waals) entre as cadeias hidrocarbônicas (Ohline, Campbell, *et al.*, 2001), assume a mesma interpretação empregada para um efeito de alargamento no pico de transição calorimétrico, e, portanto, geralmente refere-se à presença de impurezas que determinem que um sistema lipídico transicione de modo não-uniforme (menos cooperativo) (Chapman, Urbina e Keough, 1974; McMullen e McElhaney, 1997; Prenner, Lewis, *et al.*, 1999; Mannock, Lewis e McElhaney, 2010).

Desse modo, os parâmetros mais estudados por essa técnica em processos de transição de fase são ( figura 19):

- $T_{on}$ : temperatura do início da transição,
- $T_{off}$ : temperatura do final da transição,
- $T_m$ : temperatura de transição de fase principal, geralmente correspondente à temperatura em que 50% da transição está completa,
- $\Delta H$ : entalpia de transição normalizada por mol ou por unidade de massa,
- $C_p$ : calor específico, que correspondente a quantidade de calor (por mol ou por unidade de massa) requerido para varia em 1º a temperatura da amostra à pressão constante.

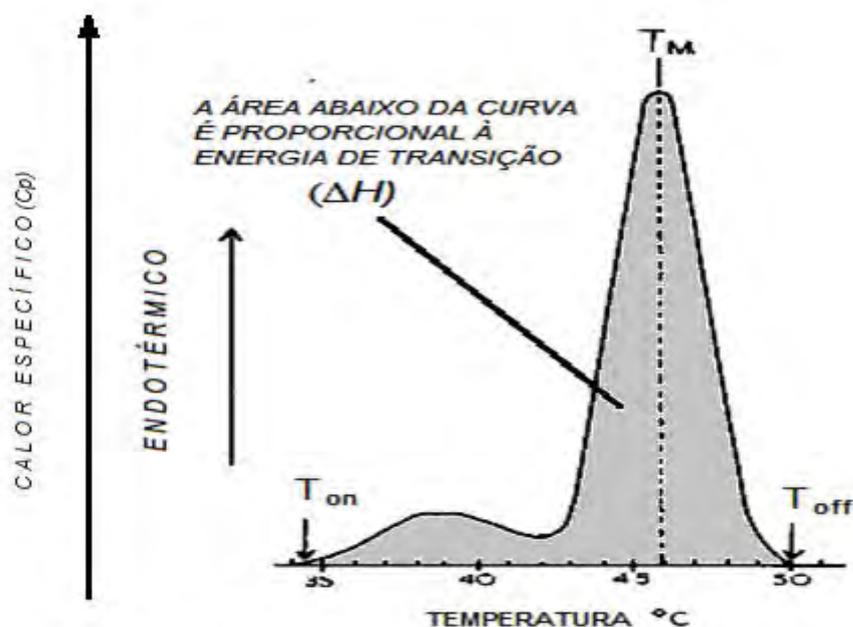


Figura 33- Ilustração esquemática de um perfil calorimétrico de uma transição endotérmica para um sistema lipídio-água. Os parâmetros  $T_{on}$ ,  $T_m$  e  $T_{off}$  correspondem às temperaturas de início, de fase principal e do final de transição, respectivamente. A área abaixo da curva correspondente a energia principal absorvida na transição ( $\Delta H$ ). Figura adaptada de Chapman et al. (1974).

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Materiais

O sal de 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DMPG), os marcadores de spin 1-palmitoil-2-(16-doxilestearoil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina (16-PCSL), 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfo(tempo)colina (Tempo-PCSL) foram comprados de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). A floretina (3-[4-hidroxifenil]-1-[2, 4, 6-trihidroxifenil]-1-propanona), a barbalóina [10-glicopiranosil-1,8-dihidroxi-3-(hidroxi-metil)-9(10H)-antraceno] e o tampão HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperizina-ácido etanosulfônico) foram adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), enquanto o cloreto de sódio (NaCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram comprados da Casa Americana (São Paulo, SP).

## 4.2 Dispersão lipídica

Primeiramente, foram preparados filmes em solução de clorofórmio para uma concentração de 10 mM de DMPG acrescido de 0,2 mol % para o marcador de spin 16-PCSL ou de 0,6 mol % para o Tempo-PC, incorporados ou não de 2 mM (20 mol %) de molécula interagente (barbaloína ou floretina); com a subsequente remoção do solvente orgânico através da passagem de uma corrente de nitrogênio gasoso ultra-puro e evacuação por no mínimo 2 horas. Posteriormente, o preparo das amostras foi realizado dispersando-se esses filmes lipídicos em 10 mM de tampão HEPES acrescido de 2 mM (baixa força iônica) de NaCl, sendo o valor do pH da solução final corrigido com NaOH para um valor equivalente ao pH=7,4 fisiológico. (Fernandez et al., 2000, 2008; Riske et al., 1997,1999, 2001, 2002, 2003, 2004). As amostras utilizadas nas medidas de DSC foram preparadas de modo similar, entretanto, sem a adição de marcadores de spin.

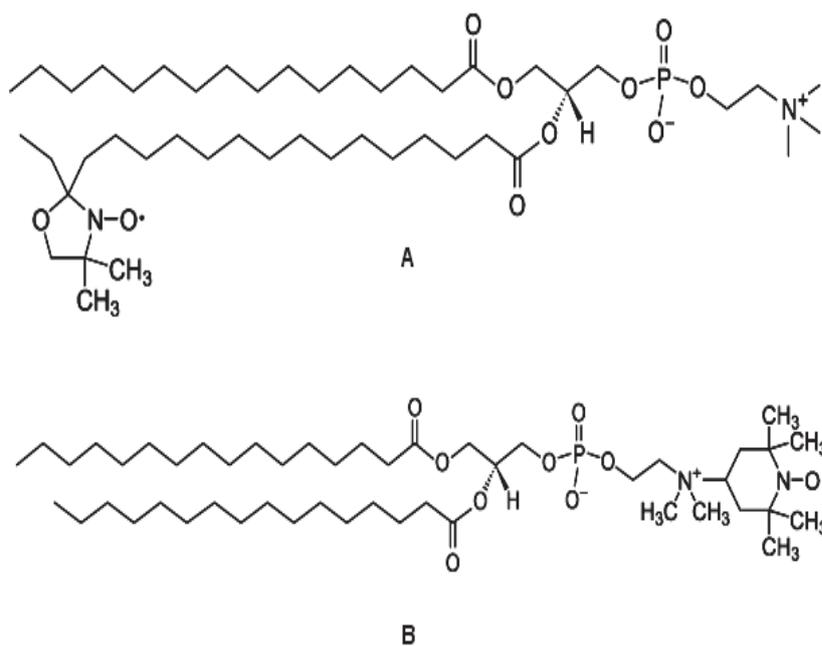


Figura 34- Marcador de spin do tipo (A) 16-PCSL e (B) Tempo-PC Fonte: Avanti Polar Lipids

### 4.3 Espectroscopia de Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os dados de RPE de radiação contínua, utilizando microondas na faixa de 9 GHz (banda-X), foram realizadas no laboratório de Biofísica e Física Médica, do IFUSP/SP, usando o espectrômetro de RPE da Bruker modelo EMX. A frequência da microonda foi mantida fixa (ordem 9 GHz e potência 10 mW) e o campo magnético (ordem 3300 G) aplicado foi variado dentro um intervalo correspondente a 100 G.

Os espectros para cada tipo de marcador foram obtidos para o intervalo de temperatura entre 5 °C a 45 °C e taxa de incremento correspondente a 5 °C, visando monitorar as diferentes fases de organização da vesícula de DMPG. Devido à grande complexidade encontrada para a fase de transição (18 °C a 33 °C) para as vesículas desse lipídio, as temperaturas nesse intervalo foram variadas de 1 °C. O tempo de espera antes de cada aquisição foi corresponde a 10 minutos, visando o equilíbrio térmico da amostra para o valor de temperatura monitorado (Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008).

As análises dos dados obtidos com a técnica de RPE foram realizadas diretamente ou indiretamente. A análise direta consistiu no estudo comparativo dos valores medidos para as alturas e as larguras das linhas espectrais (seção 3.1.6.4), sendo que o parâmetro de desdobramento hiperfino  $a_0$  foi medido apenas em espectros isotrópicos. As medidas diretas são médias de no mínimo três repetições e quando não mostrados, os erros são inferiores a 5%.

A análise indireta foi obtida através da simulação espectral. O programa utilizado nas simulações foi o NLSL (“Nonlinear Least-Square”) o qual por meio de valores iniciais fornecidos pela intuição do usuário e conhecimento prévio da organização do sistema (Ge e Freed, 1998, 1999, 2003; Fernandez e Lamy-Freund, 2000) é capaz de ajustar o espectro teórico ao experimental através de um algoritmo de um método não-linear de mínimos quadrados, empregando-se soluções da equação estocástica de Liouville (Schneider e Freed, 1989a; Budil, Lee, *et al.*, 1996). Esse ajuste permite a obtenção de parâmetros correlacionados à mobilidade e à organização dos lipídios, para cujos melhores valores se estimam erros inferiores a 5% (Ge e Freed, 2003). Os valores iniciais adotados para os parâmetros que não variaram durante as simulações foram:  $A_{\perp} = A_{XX} = A_{YY} = 5,0$  ,  $A_{zz} = 33,32$  ,  $g_{xx} = 2,0089$  ,  $g_{yy} = 2,0058$  e  $g_{zz} = 2,0021$  (Ge e Freed, 1998; Fernandez e Lamy-Freund, 2000) para o marcador de spin 16-PC;  $A_{\perp} = A_{XX} = A_{YY} = 6,1$  ,  $A_{zz} = 35,00$  ,  $g_{xx} =$

$2,0092$ ,  $g_{yy} = 2,0064$  e  $g_{zz} = 2,0020$  (Ge e Freed, 2003) para o marcador Tempo-PC. Os ângulos magnéticos ( $\alpha_m, \beta_m, \gamma_m$ ) foram mantidos nulos, pois se considerou coincidentes os sistemas de eixos do tensor  $g$  e  $A$  (simetria axial). Os ângulos de difusão ( $\alpha_D, \beta_D, \gamma_D$ ) foram mantidos nulos exceto para as simulações com o marcador Tempo-PC o qual foi mantido  $\beta = 65^\circ$ . Outros parâmetros que foram mantidos constantes durante as simulações se referem ao alargamento não homogêneo de linhas gaussianas ( $gib0, gib2$ ), cujos valores os foram mantidos  $gib0 = 1,0$ ,  $gib2 = 0,3$  para o marcador 16-PC e,  $gib0 = 1,5$ ,  $gib2 = 0,5$  para o marcador TEMPO-PC. Parâmetros de alargamento de linhas anisotrópicas lorentzianas ( $wprp, wpll$ ) também foram utilizados quando necessários (Budil, Lee, *et al.*, 1996).

Os parâmetros obtidos pelo ajuste entre a curva experimental e a curva simulada pelo programa NLSL, cujos valores foram utilizados para a análise indireta das alterações provocadas pela interação entre a floretina e a barbaloína com os lipossomos de DMPG foram:

- $S_{20}$  e  $S_{22}$ : são parâmetros relacionados aos potenciais de orientação do radical nitróxido em relação ao eixo diretor do sistema e, portanto, referem-se à organização lipídica (ordem) do sistema (ver seção 3.1.6.2).
- $R_{prp}$  e  $r_{pll}$ : referem-se à escala logarítmica em base 10 dos parâmetros  $R_{\perp}$  e  $R_{\parallel}$ , os quais representam a taxa de difusão rotacional perpendicular e paralela ao eixo de simetria (sistema de eixo molecular) do radical nitróxido (ver seção 3.1.6.3). No caso específico do marcador 16-PC, como o parâmetro  $r_{pll}$  se mostrou insensível (Ge e Freed, 1999; Costa-Filho, Shimoyama e Freed, 2003) durante as simulações, a taxa de movimento rotacional  $R_{\parallel}$  não foi utilizado como parâmetro comparativo.

Obs.: para uma melhor compreensão dos parâmetros que podem ser obtidos por uma análise direta ou indireta dos espectros de RPE e das interpretações dos valores que eles podem assumir, veja a seção 3.1.6.

#### **4.4 Análise térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

As medidas calorimétricas foram realizadas à pressão constante em um microcalorímetro de alta sensibilidade da Microcal e modelo VP-DSC, empregando-se uma taxa de varredura de 20 °C/h durante um intervalo de temperatura entre 5 °C

a 55 °C. As subtrações das linhas de base e as integrais (entalpia de transição) dos perfis calorimétricos foram realizadas no software ORIGIN também da Microcal. Embora a cooperatividade de um sistema seja proporcional à medida da largura a meia altura do pico de transição em curvas DSC, como para vesículas de DMPG a transição de fase é caracterizada por um intervalo de transição que apresenta um pico composto (formas assimétricas), a medida da largura a meia altura não é bem definida e, portanto, o efeito da floretina e da barbalóina sobre a cooperatividade de transição lipídica foi realizado empregando-se como parâmetros comparativos as alterações na largura total do pico e nos valores da entalpia de transição de fase (Heimburg, 1998; Prenner, Lewis, *et al.*, 1999; Cseh, Hetzer, *et al.*, 2000; Ohline, Campbell, *et al.*, 2001; Mannock, Lewis e McElhaney, 2010) provocado pela presença dessas moléculas em vesículas de DMPG.

## **5 Resultados**

Nesta seção será realizada uma análise dos dados obtidos pelas técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e de (DSC), assim como, dos parâmetros obtidos nas simulações dos espectros de RPE, visando um estudo comparativo entre o efeito da floretina e da barbalóina sobre a mobilidade e a organização da bicamada nas regiões monitoradas de cada marcador.

### **5.1 Marcador 16-PC**

O marcador de spin 16-PC monitora a região central da bicamada e alguns dos espectros obtidos em presença de membrana pura, e com adição de barbalóina e floretina são apresentados na figura 35. Conforme pode ser visto, a presença da floretina parece alargar mais os espectros a 5 °C (curva vermelha, figura 35 A), o que parece evidenciar um maior grau de anisotropia da membrana a baixas temperaturas. Na temperatura de 25 °C, dentro do intervalo da fase intermediária do DMPG puro (19 °C a 33°C), os espectros mostram que, tanto a presença da floretina (curva vermelha) como a da barbalóina (curva verde), reduzem a intensidade do segundo pico na região de campo alto (figura 35B). Em temperaturas mais altas, como a 45 °C, a floretina não aparenta realizar nenhuma mudança, enquanto a

barbaloína torna o espectro mais anisotrópico, o que indica um possível aumento de viscosidade (figura 35C).

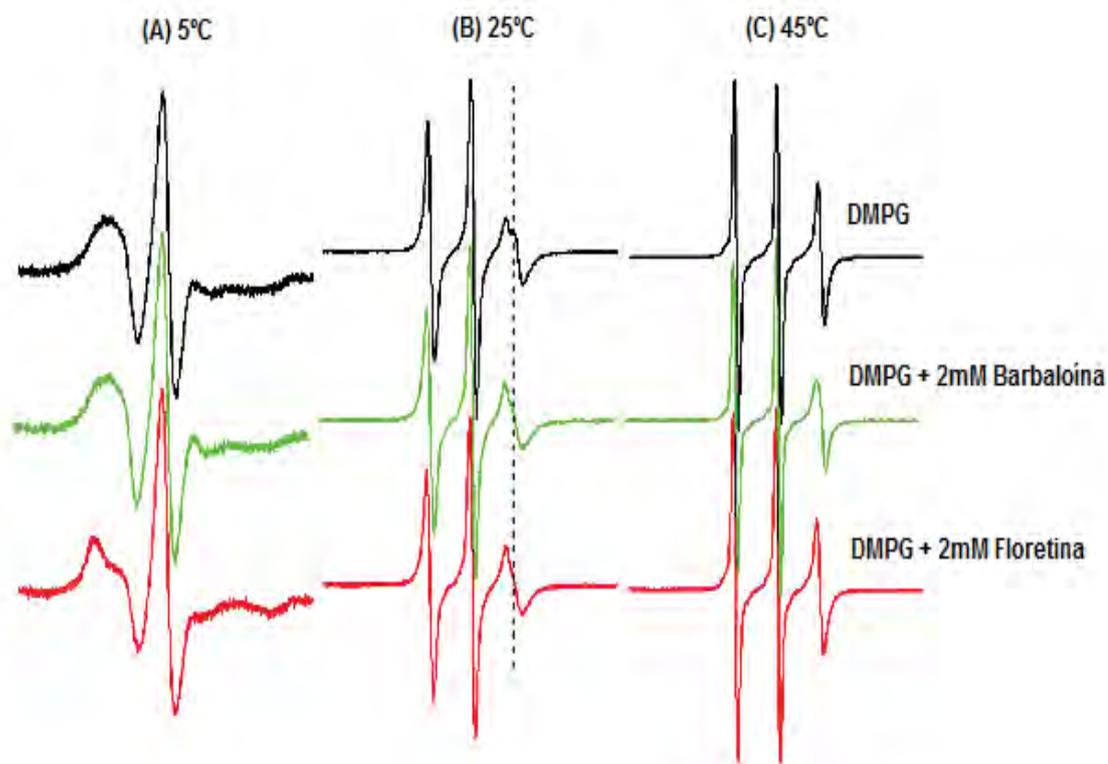


Figura 35 – Espectros experimentais do marcador de spin 16-PC incorporados em vesículas de DMPG puro (curva preta) e com a adição de 2 mM de floretina (curva vermelha) ou 2 mM de barbaloína (curva verde) para (A) 5 °C, (B) 25 °C e (C) 45 °C. A linha tracejada indica a posição do segundo pico na região do campo alto.

### 5.1.1 Análise da fluidez e da polaridade

Para as temperaturas entre 5 °C a 10 °C, a presença da floretina aumenta significativamente a viscosidade (anisotropia) do centro da bicamada, isto é, aumenta o valor da largura de pico de campo baixo (curva vermelha, figura 36) e reduz o valor da razão entre alturas de campo baixo e central (curva vermelha, figura 37) em relação ao DMPG puro (curva preta, figura 36 e 37); enquanto a barbaloína aparentemente não apresenta nenhum efeito significativo, uma vez que praticamente não altera os valores de  $\Delta h_{+1}$  e de  $h_{+1}/h_0$  (curva verde, figura 36 e 37, respectivamente). Por outro lado, para temperaturas entre 15 °C a 25 °C, tanto a floretina como a barbaloína apresentam um comportamento similar, ou seja, aumentam os valores de  $h_{+1}/h_0$  (figura 37) e reduzem os valores de  $\Delta h_{+1}$  (figura 36),

demonstrando que essas moléculas tornam o centro das bicamadas mais fluido (isotrópico) para esse intervalo de temperatura.

Em relação a temperaturas mais altas (35 °C a 45 °C), tanto o acréscimo da floretina, como o da barbaloína não alteram significativamente os valores de  $\Delta h_{+1}$  (figura 36). Isso poderia indicar que essas moléculas não produzem nenhum efeito para essa faixa de temperatura. Entretanto, uma análise atenta na figura 37 permite verificar que essas moléculas reduzem o valor da razão  $h_{+1}/h_0$  em relação ao DMPG puro e, portanto, aumentam a viscosidade (anisotropia) no centro da bicamada, contudo, sendo esse efeito mais intenso com a presença da barbaloína. Ainda considerando o intervalo para temperaturas altas, o parâmetro desdobramento hiperfino isotrópico ( $a_0$ ), que está relacionado à polaridade, foi determinado diretamente sobre os espectros (ver seção 3.1.6.1). A figura 38 mostra que a floretina não altera a polaridade local os quais demonstram que a floretina não altera a polaridade local (curva vermelha), enquanto a barbaloína a aumenta (curva verde) significativamente.

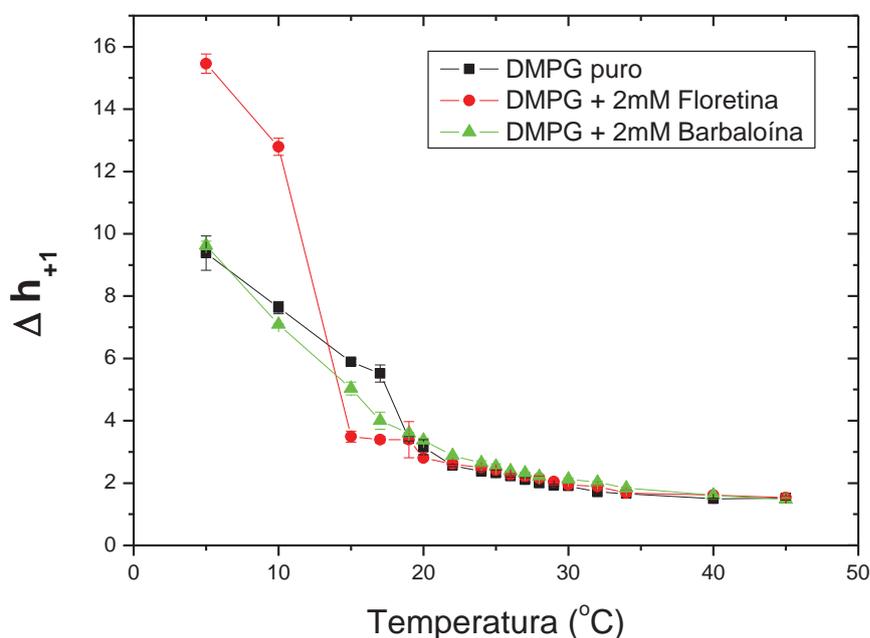


Figura 36- Dependência da largura de pico de campo baixo ( $\Delta h_{+1}$ ) com a temperatura em espectros do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).

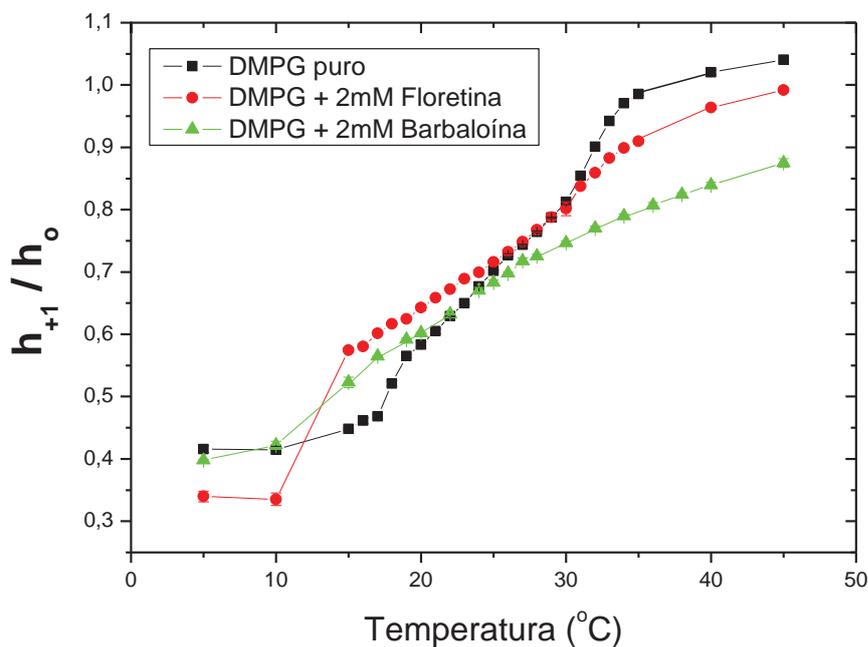


Figura 37- Dependência da razão entre as alturas de campo baixo e central ( $h_{+1}/h_0$ ) com a temperatura em espectros do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲).

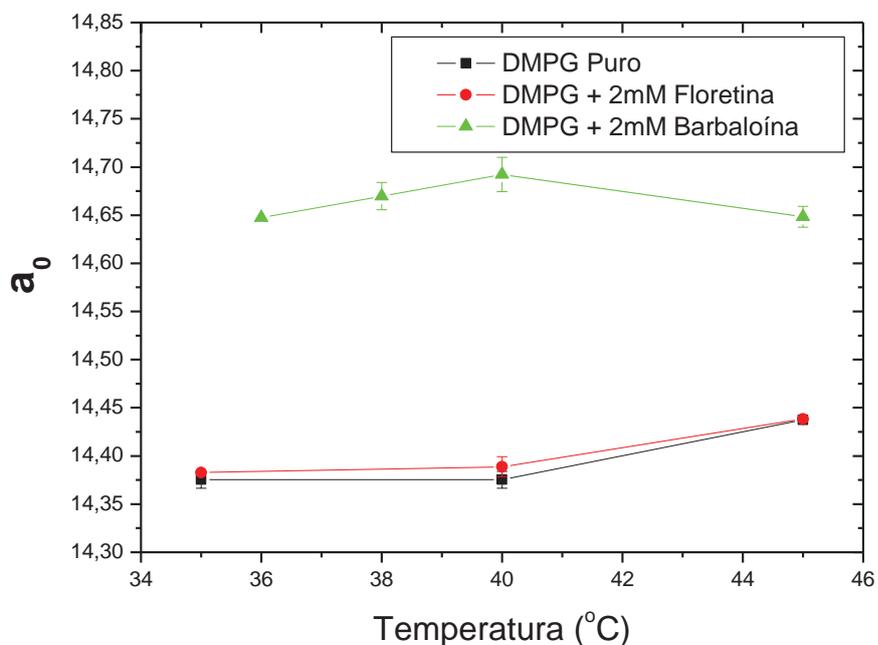


Figura 38- Dependência do desdobramento hiperfino isotrópico ( $a_0$ ) com a temperatura para o espectro do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e com acréscimo de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲).

### 5.1.2 Análise dos parâmetros simulados

Os valores para as taxas de mobilidade translacional ( $R_{\perp}$ ) e rotacional ( $R_{\parallel}$ ) dos espectros obtidos para o marcador de spin 16-PC foram calculados a partir dos valores simulados dos parâmetros  $rprp$  e  $rpll$ , respectivamente (ver seção 3.1.6.3). Entretanto, como os valores de  $rpll$  se mostraram insensíveis (Ge e Freed, 1999; Costa-Filho, Shimoyama e Freed, 2003), o parâmetro  $R_{\parallel}$  não foi utilizado no estudo comparativo. Em primeiro lugar, no intervalo entre 15 °C e 19 °C, verifica-se que, enquanto o parâmetro relacionado à mobilidade translacional ( $R_{\perp}$ ) assume valores crescentes com o incremento da temperatura (figura 39), os valores simulados para o parâmetro de ordem ( $S_{20}$ ) decrescem (figura 40), demonstrando ambos serem dependentes da temperatura. A presença tanto da floretina, como da barbalóina aumentam a mobilidade dos lipídeos (curvas vermelha e verde, aumento de  $R_{\perp}$ ), e reduzem a ordem na direção paralela à normal à superfície da membrana (curvas vermelha e verde, redução de  $S_{20}$ ). Por outro lado, as simulações mostraram que o parâmetro referente à ordem perpendicular à normal à superfície ( $S_{22}$ ) exibe pouca variação em função da temperatura (figura 41), embora tanto a presença da floretina (curva vermelha), como da barbalóina (curva verde) reduzam o seu valor. A redução do valor de  $S_{22}$  indica que houve uma perda de orientação do eixo  $x_R$  em relação ao eixo  $z_d$  diretor (Ge e Freed, 1998) no centro da bicamada, ou seja, um aumento do alinhamento do eixo  $y_R$  em relação ao eixo  $z_d$  diretor, sendo esse efeito mais acentuado com a presença da barbalóina. Como a partir de 19 °C os espectros de DMPG puro apresentam duplo pico para a região do campo alto (curva preta, figura 35 B), os quais sugerem a existência de duas distintas populações de marcadores (Fernandez e Lamy-Freund, 2000), não se realizou a simulação dos espectros durante a transição de fase intermediária característica do DMPG (entre 19 °C a 33°C), fato que explica a inexistência dos valores comparativos para os parâmetros  $R_{\perp}$ ,  $S_{20}$  e  $S_{22}$  a partir desse valor de temperatura. Por outro lado, a presença da floretina ou da barbalóina reduz a existência de um dos sítios comumente encontrados em amostras em amostras de DMPG puro a 19 °C, o que permitiu a simulação desses espectros. ( curvas vermelha e verde, figura 35 B).

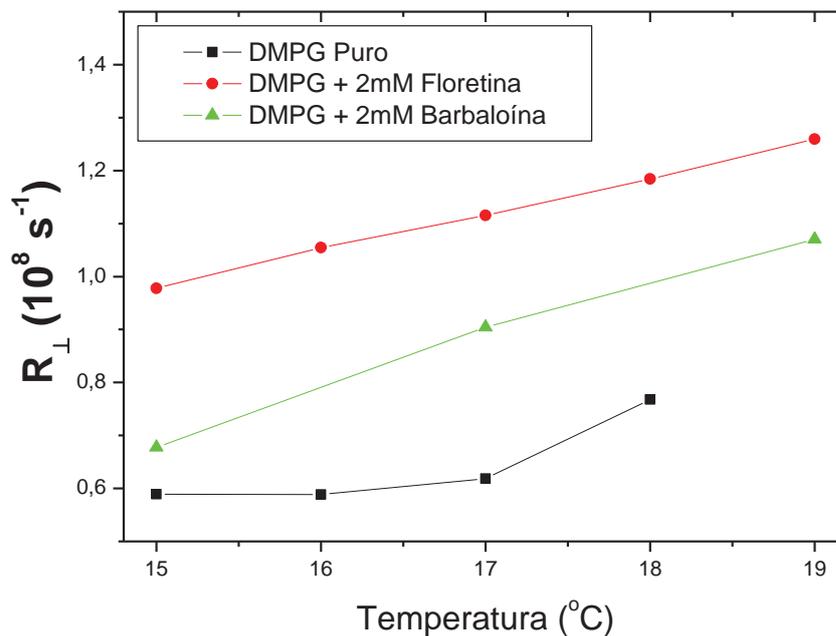


Figura 39- Valores de  $R_{\perp}$  obtidos a baixas temperaturas (15 °C a 19 °C) para os espectros do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).

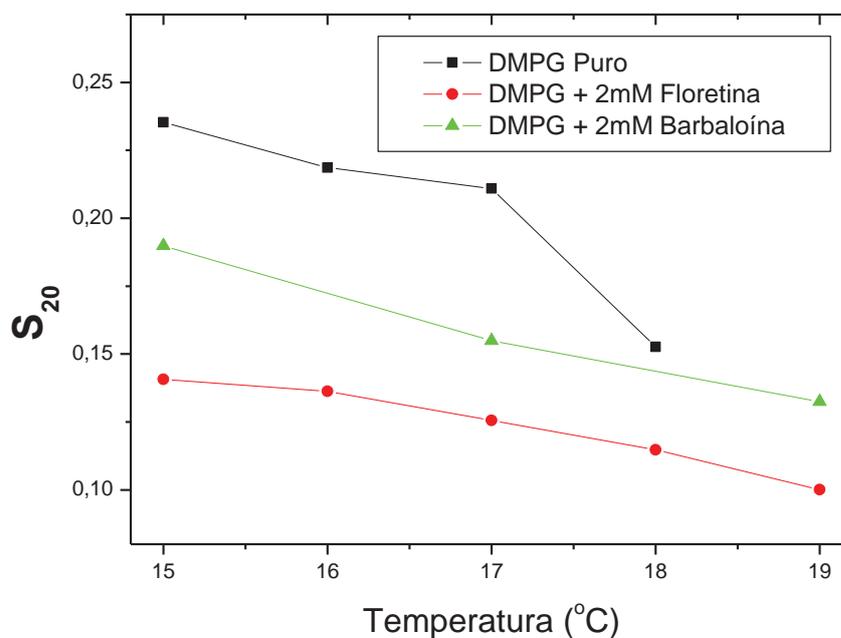
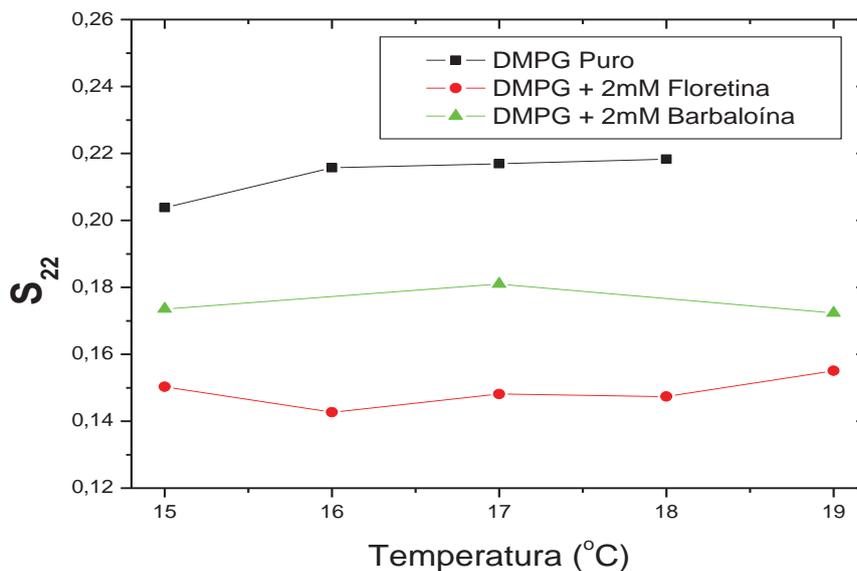


Figura 40- Valores de  $S_{20}$  obtidos a baixas temperaturas (15 °C a 19 °C) para o espectro do 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).



**Figura 41-** Valores de  $S_{22}$  obtidos a baixas temperaturas (15 °C a 19 °C) para o espectro do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲).

Em segundo lugar, considerando o espaço sistema submetido a temperaturas altas (35 °C a 45 °C), a presença da floretina reduz o valor da mobilidade translacional (redução de  $R_{\perp}$ , curva vermelha, figura 42), enquanto a barbalóina aumenta seu valor. Em relação ao parâmetro de ordem ( $S_{20}$ ) observa-se que, sob altas temperaturas, o seu valor permanece praticamente invariável com o aumento da temperatura (figura 43). Embora a floretina não altere o módulo do valor de  $S_{20}$  encontrado para DMPG puro, o fato de alterar o sinal desse parâmetro para valores positivos (curva vermelha, figura 43), é interpretado que a floretina favoreça o arranjo lipídico das cadeias hidrocarbônicas (eixo  $z_R$ ) no centro da bicamada a favor da direção  $z_d$  do eixo diretor (Ge e Freed, 1998). Por outro lado, a presença de barbalóina torna as cadeias hidrocarbônicas do centro da bicamada mais favoravelmente arranjadas no plano  $x_d$ - $y_d$  diretor, já que não altera o sinal negativo, mas aumenta o valor do módulo de  $S_{20}$  (curva verde, figura 43) (Ge e Freed, 2003). Ainda, verificando-se os valores de  $S_{22}$ , pode-se concluir que tanto a floretina, como a barbalóina reduzem o valor de  $S_{22}$  (curvas vermelha e verde, figura 44) o que indica um aumento de orientação do eixo  $y_R$  a favor da direção normal (eixo  $z_d$ ) à superfície da bicamada (Ge & Freed, 2003).

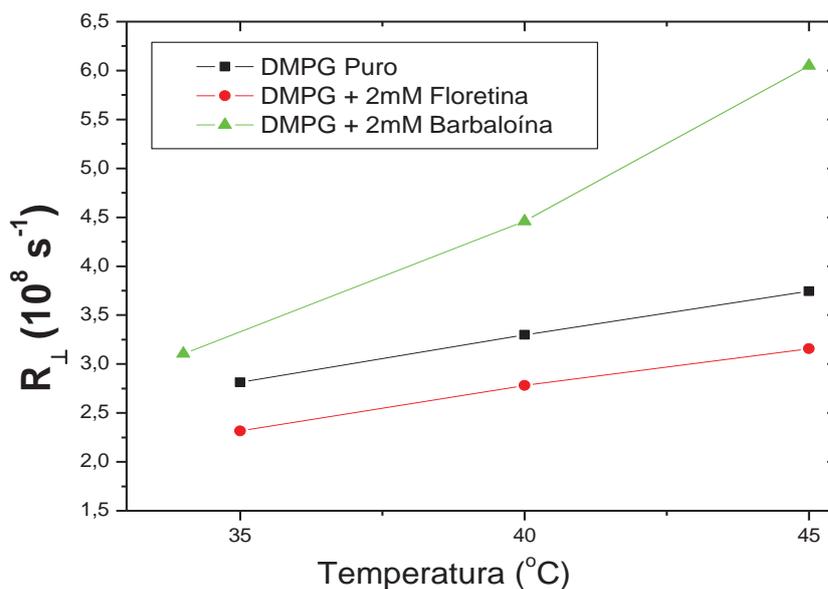


Figura 42- Valores de  $R_{\perp}$  obtidos a altas temperaturas (35 °C a 45 °C) para os espectros do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).

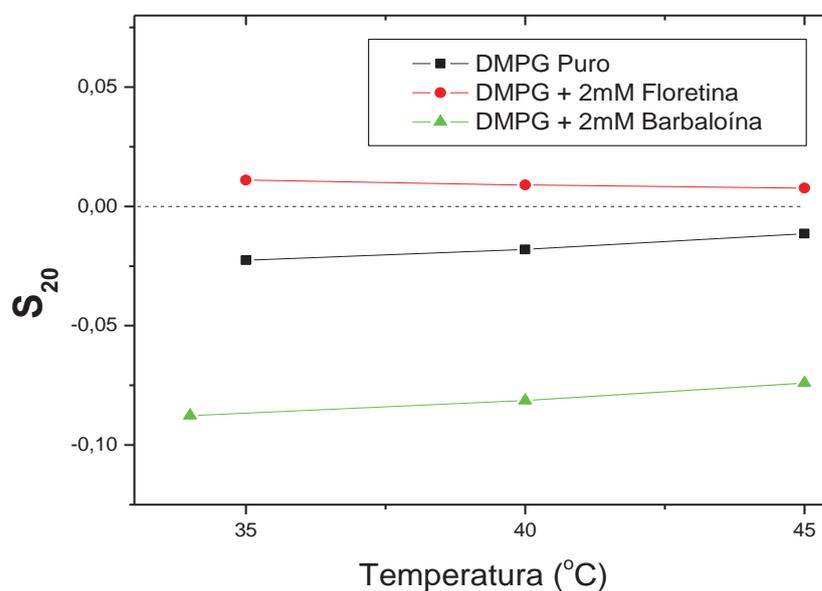


Figura 43- Valores de  $S_{20}$  obtidos a altas temperaturas (35 °C a 45 °C) para o espectro do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲). A linha tracejada indica a linha base sobre o valor zero.

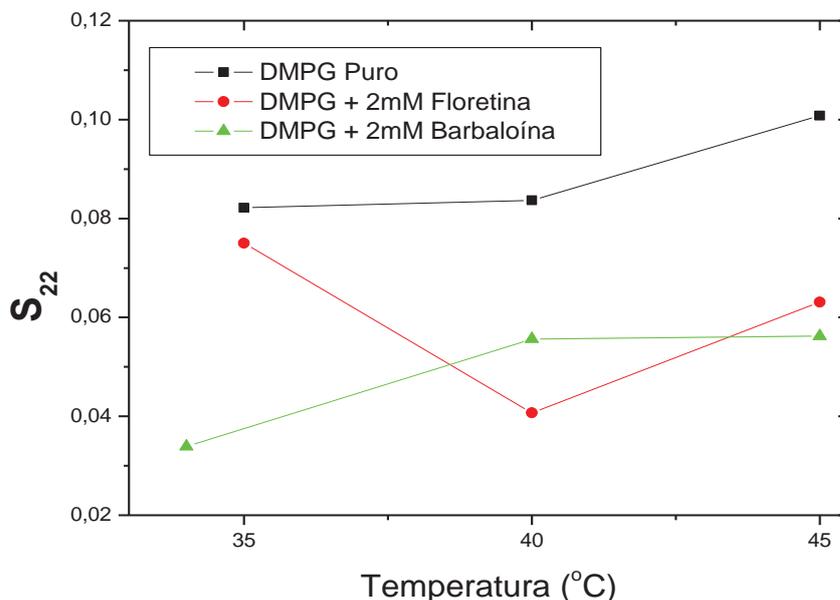


Figura 44- Valores de  $S_{22}$  obtidos a altas temperaturas (35 °C a 45 °C) para o espectro do marcador de spin 16-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲).

## 5.2 Marcador Tempo-PC

Os resultados obtidos pela análise direta e indireta dos espectros de RPE para o marcador de spin TEMPO-PC são apresentados apenas para as amostras de DMPG puro e com o acréscimo de floretina. O estudo do efeito da barbaloína empregando-se o marcador TEMPO-PC não foi realizado no presente trabalho, mas o efeito dessa molécula em regiões próximas à superfície foram alvos de estudo de Duarte et al. (2008). A figura 45 apresenta os espectros experimentais obtidos para o marcador de spin Tempo-PC (que monitora a região da cabeça polar) incorporados em vesículas de DMPG, sem e com a adição de floretina, em diferentes temperaturas. Uma análise qualitativa desses espectros, mostra que a presença da floretina parece alargar mais os espectros a 5 °C e 10° C (figura 45 B), o que pode evidenciar um maior grau de viscosidade da membrana. Além disso, curiosamente, observa-se que os espectros: de DMPG puro para 5 °C e 10° (figura 45 A) se assemelham respectivamente aos espectros contendo floretina a 15 °C e 20 °C

(figura 45 B). Desse modo, uma observação mais detalhada é necessária para avaliar o grau de fluidez da membrana.

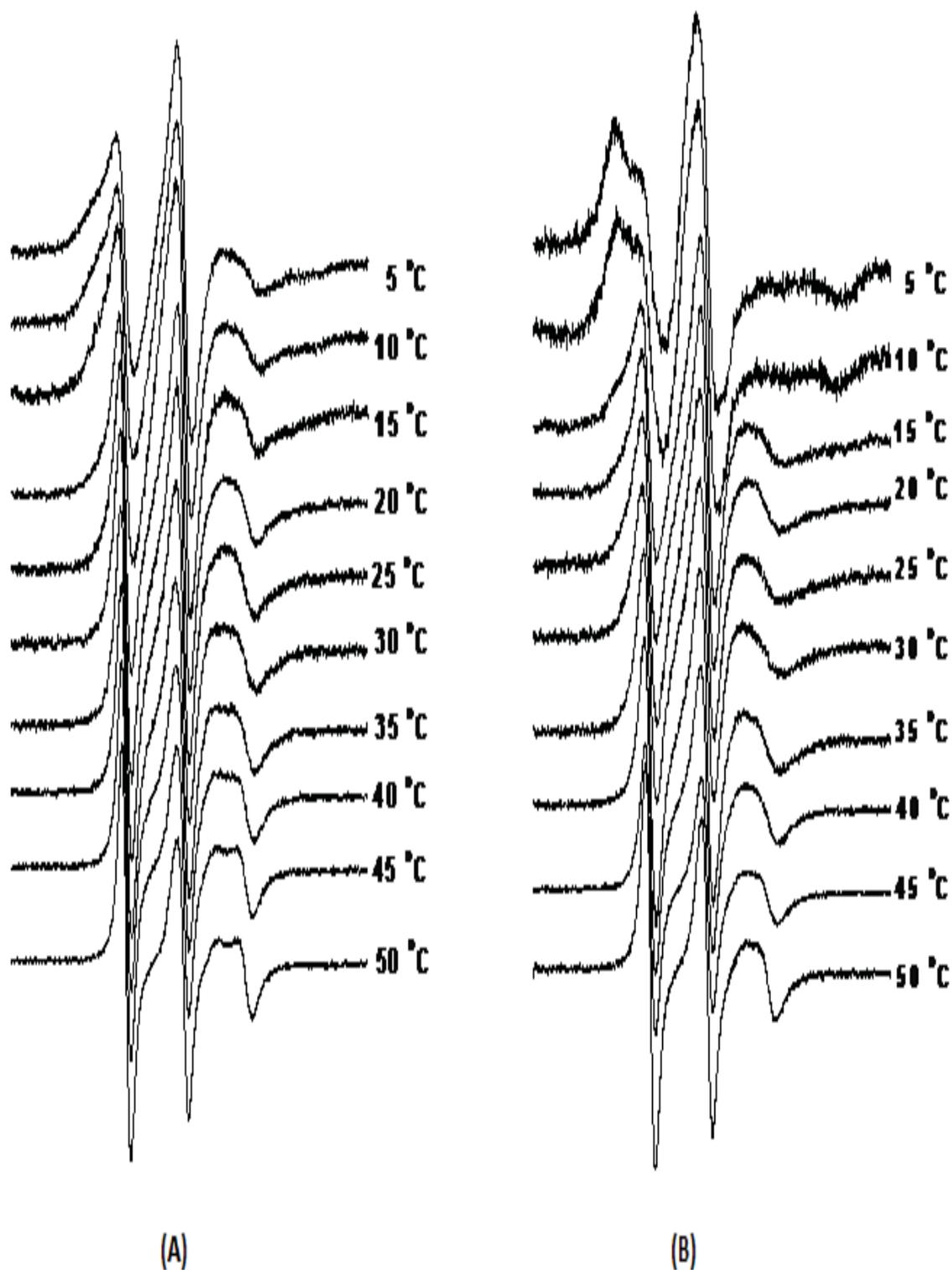


Figura 45– Espectros experimentais obtidos para o marcador de spin Tempo-PC em DMPG puro (A) e acrescido de 2 mM de floretina (B) a diferentes temperaturas.

### 5.2.1 Análise da fluidez

Observando-se os valores encontrados para a razão entre a largura de pico baixo e central ( $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$ ) verifica-se que a presença da floretina alarga significativamente (aumenta  $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$ , figura 46) os espectros para temperaturas baixas (5 °C e 10 °C), enquanto que para essas mesmas temperaturas esse parâmetro apresenta pouca variação em amostras de DMPG, o que indica que essa molécula aumenta a viscosidade na superfície das membranas de DMPG. Para as demais temperaturas (15 °C a 45 °C) nenhuma alteração brusca é observada nos valores de  $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$  tanto em amostras de DMPG puro, quanto em presença de floretina.

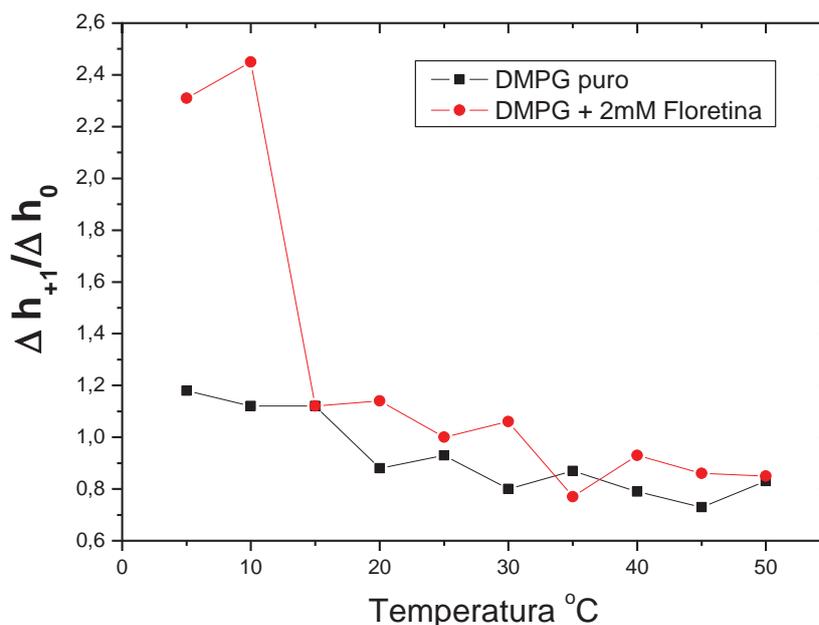


Figura 46- Valores obtidos para (a) a razão entre a largura ( $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$ ) de pico de campo baixo e central, (b) larguras dos picos para campo central ( $\Delta h_0$ ) e (c) larguras para campo baixo ( $\Delta h_{+1}$ ) em função da temperatura para espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●).

### 5.2.2 Análise dos parâmetros simulados

Assim como anteriormente descrito para o marcador 16-PC, os valores para as taxas de mobilidade translacional ( $R_{\perp}$ ) e rotacional ( $R_{\parallel}$ ) dos espectros obtidos para o marcador de spin TEMPO-PC foram calculados a partir de parâmetros obtidos na simulação espectral (ver seção 3.1.6.3). Os valores encontrados para as taxas de mobilidade crescem proporcionalmente com o incremento da temperatura, sendo que a presença da floretina aumenta a mobilidade translacional (perpendicular à normal de superfície) dos lipídeos (aumento  $R_{\perp}$ , figura 47) para temperaturas acima de 15 °C, mas reduz o movimento rotacional (paralela à normal de superfície) (redução de  $R_{\parallel}$ , figura 48) para todo o intervalo de temperatura considerado (15 °C a 45 °C).

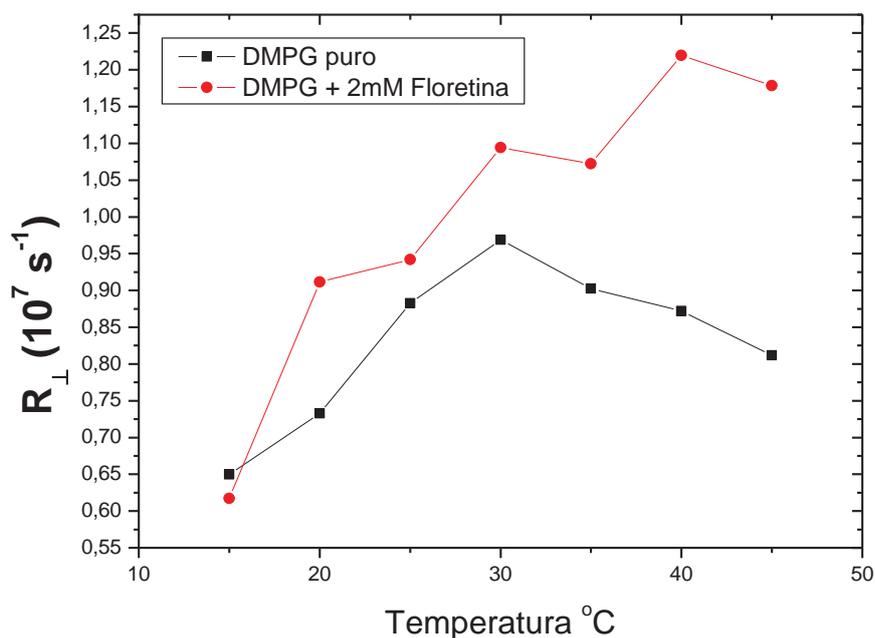


Figura 47- Variação de  $R_{\perp}$  com a temperatura para os espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●).

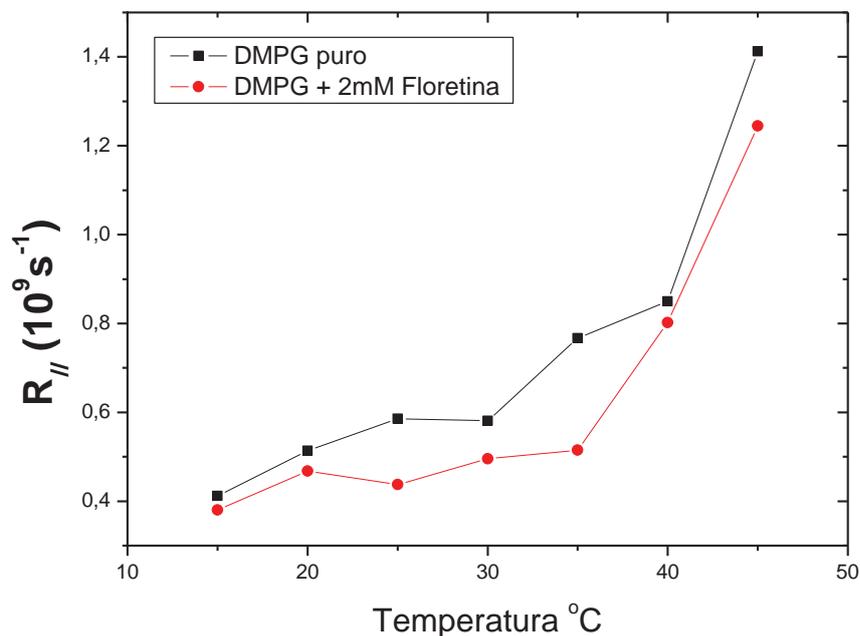


Figura 48- Variação de  $R_{//}$  com a temperatura para os espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●).

Devido ao comportamento obtido na simulação do parâmetro  $S_{20}$ , nenhum resultado significativo é apresentado (figura 49). Por outro lado, os valores para o parâmetro  $S_{22}$  decrescem com o avanço da temperatura (figura 50), sendo que a presença da floretina aumenta o seu valor para todo o intervalo de temperatura considerado. O aumento do valor de  $S_{22}$  produzido pela floretina indica que essa molécula provoca alterações que determinam um aumento do arranjo preferencial de orientação do eixo do eixo  $x_R$  do radical nitróxido (cabeças lipídicas) a favor da direção normal à superfície da bicamada (Ge e Freed, 1998; Ge e Freed, 2003)

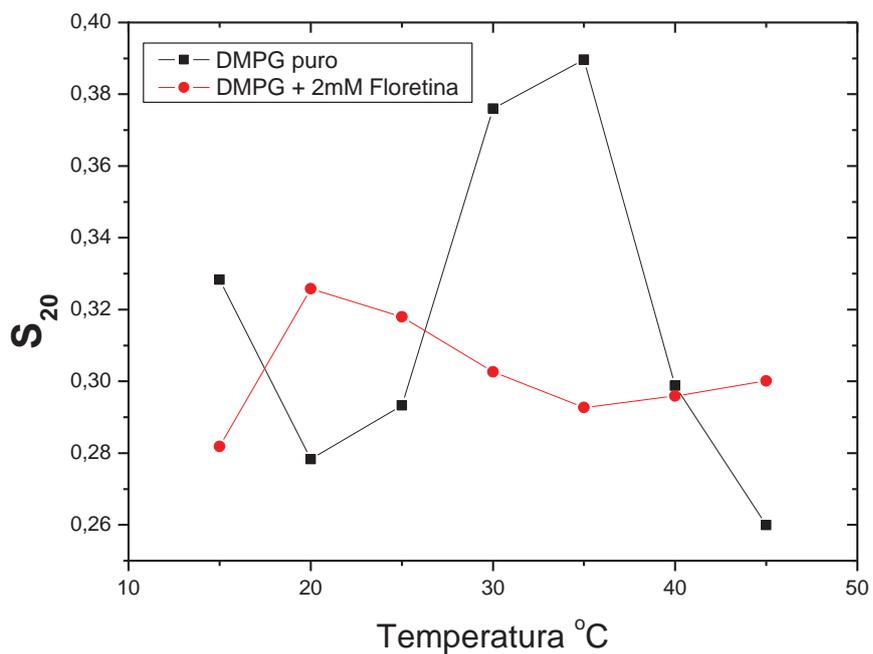


Figura 49- Variação de  $S_{20}$  com a temperatura para os espectros do TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●).

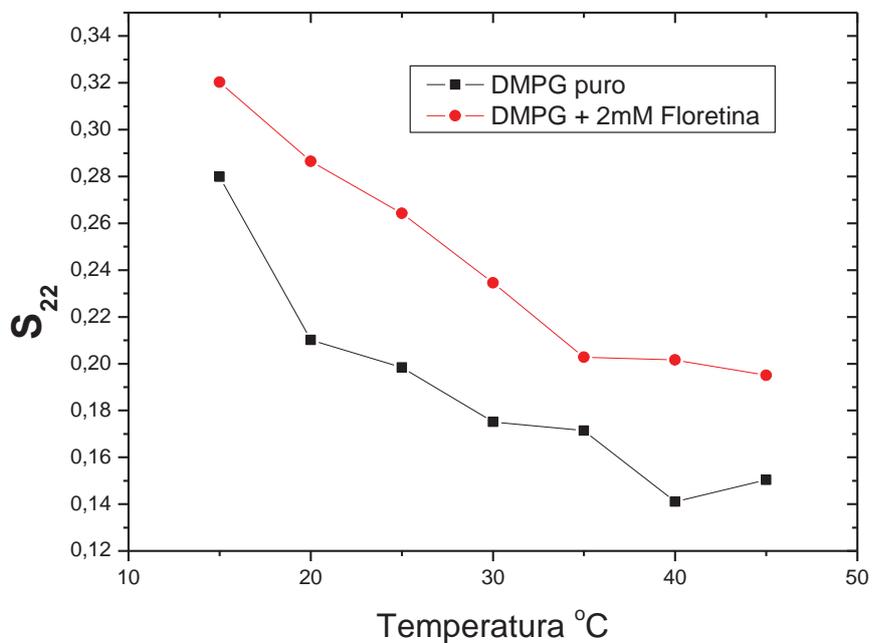


Figura 50- Variação de  $S_{22}$  com a temperatura para os espectros do marcador de spin TEMPO-PC incorporado em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●).

### 5.3 Medidas de DSC

Primeiramente, realizando-se uma análise qualitativa dos perfis calorimétricos obtidos (figura 51), pode-se verificar que, as três curvas caracterizam processos endotérmicos (picos de calor específico) e, ainda, que tanto a presença da floretina quanto a da barbalóina acabam com o pico de pré-transição a 10 °C típico de vesículas de DMPG puro. Além disso, a interação com a floretina não altera significativamente a forma geral do perfil calorimétrico do sistema (curva vermelha), mas alarga em cerca de 5 °C a região de transição e desloca o intervalo de transição do DMPG puro (18 °C a 33°C) para temperaturas entre 8 °C a 28 °C. Por outro lado, a presença da barbalóina altera sensivelmente a forma do perfil calorimétrico (curva verde), mostra que o início de transição ocorre a 12 °C, enquanto o fim da transição de fase aparentemente é deslocado para valores próximos a 30 °C.

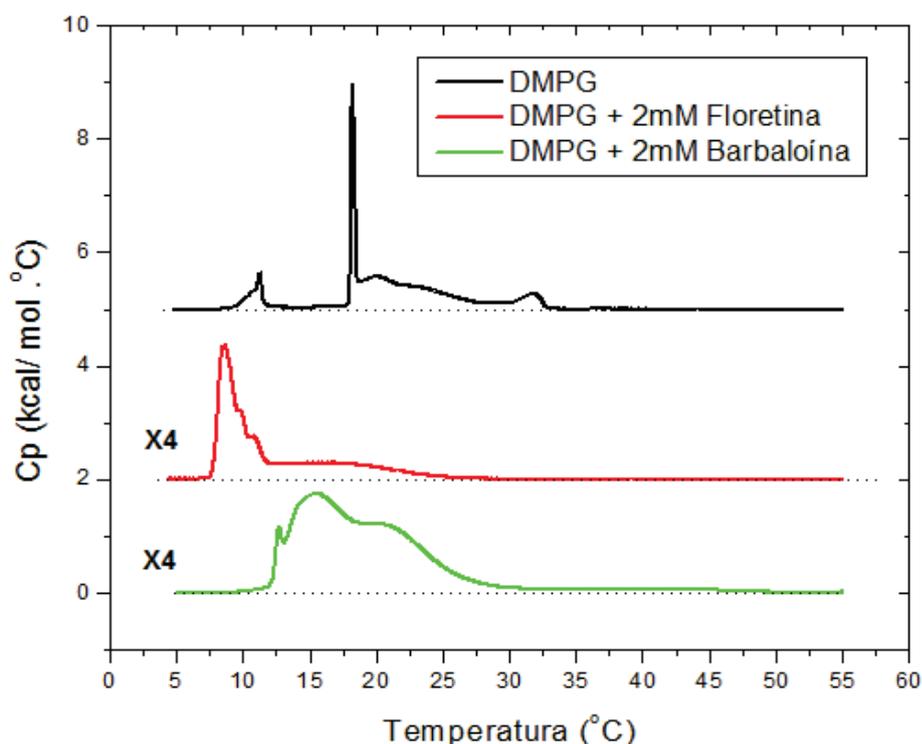
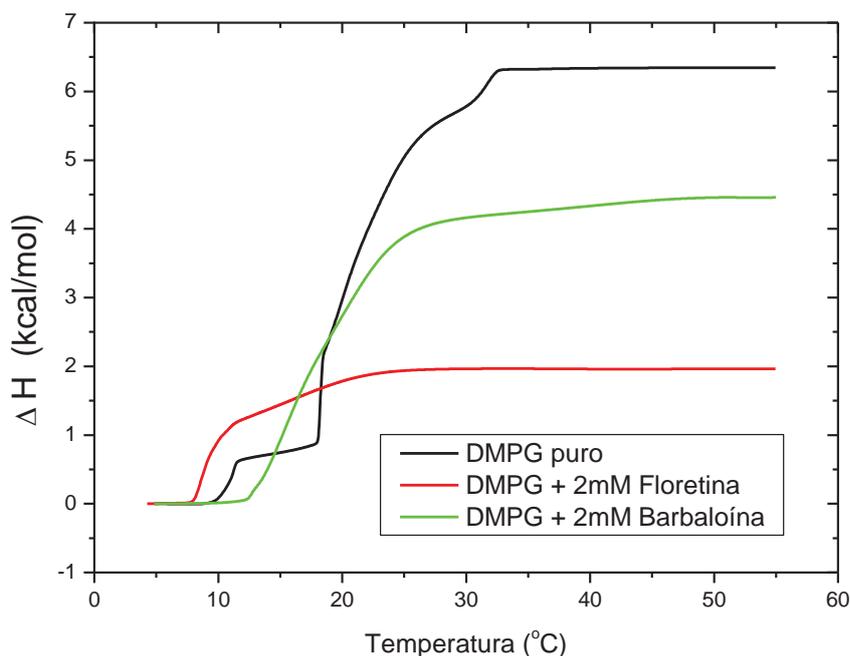


Figura 51- Perfis calorimétricos de vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbalóina (▲). As curvas são plotadas em unidades de calor específico (kcal/mol/°C) para as ordenadas e unidades de temperatura (°C) nas abscissas. As curvas calorimétricas para DMPG acrescido de moléculas interagentes (floretina ou barbalóina) são mostradas numa escala quatro vezes maior que a empregada para DMPG puro.



**Figura 52-** Valores obtidos para a entalpia de transição em vesículas de DMPG em HEPES puro (■) e acrescido de 2 mM de floretina (●) ou 2 mM de barbaloína (▲). As curvas são plotadas em unidades de energia (kcal/mol) para as ordenadas e unidades de temperatura (°C) nas abscissas.

Analisando-se quantitativamente as curvas de entalpia de transição de fase (figura 52), as quais são obtidas através da integral das curvas calorimétricas de  $C_p$  x temperatura (figura 51), verifica-se que as três curvas são características de processos endotérmicos ( $\Delta H > 0$ ), sendo que se observa que a presença da floretina promove significativos aumentos nos valores de entalpia entre 8 °C a 28 °C, enquanto nota-se que para o DMPG puro o incremento nos valores de entalpia ocorre entre 18 °C e 33 °C. Além disso, para temperaturas elevadas observa-se que o valor  $\Delta H$  torna-se invariável tanto para vesículas de DMPG puro (acima de 33 °C), como na presença da floretina (acima de 28 °C), sendo que o valor de entalpia total de transição de fase (valor de  $\Delta H$  a partir do qual não se observa sua variação em função da temperatura) na presença da floretina (curva vermelha) é bem inferior ao encontrado para o DMPG puro (curva preta). Por outro lado, embora a interação com a barbaloína determine que o sistema lipídico apresente grandes aumentos de entalpia entre 12 °C e 30 °C e reduza os valores de entalpia de transição para o intervalo de altas temperaturas (acima dos 30 °C) em relação ao DMPG puro, os valores de entalpia mostram um comportamento crescente mesmo para altas

temperaturas (curva verde), o que indica que na presença da barbalóina a transição de fase lipídica não cessa a 30 °C, mas prossegue para valores acima dos 50 °C. Desse modo, embora tanto a presença da floretina com da barbalóina alarguem os picos de transição de fase e reduzam os valores de entalpia de transição para altas temperaturas em relação a amostras de DMPG puro, o efeito de alargamento é significativamente maior com a presença da barbalóina, uma vez que para o intervalo total de temperatura considerado, o valor para a temperatura final de transição não pôde ser definida. Esses resultados sugerem que essas moléculas tornam o ambiente menos cooperativo, sendo a presença da barbalóina mais efetiva.

## **6 Discussão dos Resultados**

### **6.1 Efeitos no centro da bicamada**

Na região central da bicamada monitorada pelo marcador 16-PC, a análise direta de espectros para temperaturas entre 5 °C a 10 °C revela que a presença da floretina aumenta a viscosidade (aumento de  $\Delta h_{+1}$  na figura 36, e redução de  $h_{+1}/h_0$  na figura 37) no centro da bicamada, enquanto que a barbalóina aparentemente não altera. Para altas temperaturas (35 °C a 45 °C), como não houve alteração significativa no valor de  $a_0$  com a presença da floretina, mas houve aumento na viscosidade (aumento de  $\Delta h_{+1}$ , e redução de  $h_{+1}/h_0$ ), supõe-se que esse aumento de anisotropia não seja acompanhado de alteração na hidratação local (invariabilidade de  $a_0$ , figura 38), mas apenas devido a um rearranjo estrutural das cadeias hidrocarbônicas; enquanto que para a barbalóina o aumento da viscosidade (redução de  $h_{+1}/h_0$ ) pode estar correlacionado com um aumento na quantidade de moléculas de água na região (aumento de  $a_0$ ). Em relação aos parâmetros simulados, curiosamente para altas temperaturas, enquanto a floretina reduz levemente a mobilidade das cadeias hidrocarbônicas (redução de  $R_{\perp}$ , figura 42), e não altera significativamente a ordem local (figura 43), a presença da barbalóina aumenta essa mobilidade, indicando que provavelmente o rearranjo produzido por esta última molécula, aumenta as “dobras” na porção terminal da cadeia hidrocarbônica (Ge e Freed, 1998; Fernandez e Lamy-Freund, 2000), permitindo assim uma maior mobilidade. Outro fator que reforça a teoria de dobras na cadeia produzida pela interação com a barbalóina é a alteração de  $S_{20}$  para valores mais

negativos (figura 43) e a redução do valor positivo de  $S_{22}$  (figura 44), fenômeno esse conhecido como “ $y$ -ordering” (Costa-Filho, Shimoyama e Freed, 2003), o qual é ilustrado na figura 53. Por outro lado, para temperaturas entre 15 °C e 19 °C, tanto a floretina como a barbaloína aumentam a fluidez local (aumento de  $R_{\perp}$  na figura 39, redução de  $S_{20}$  na figura 40 e redução de  $S_{22}$  na figura 41).

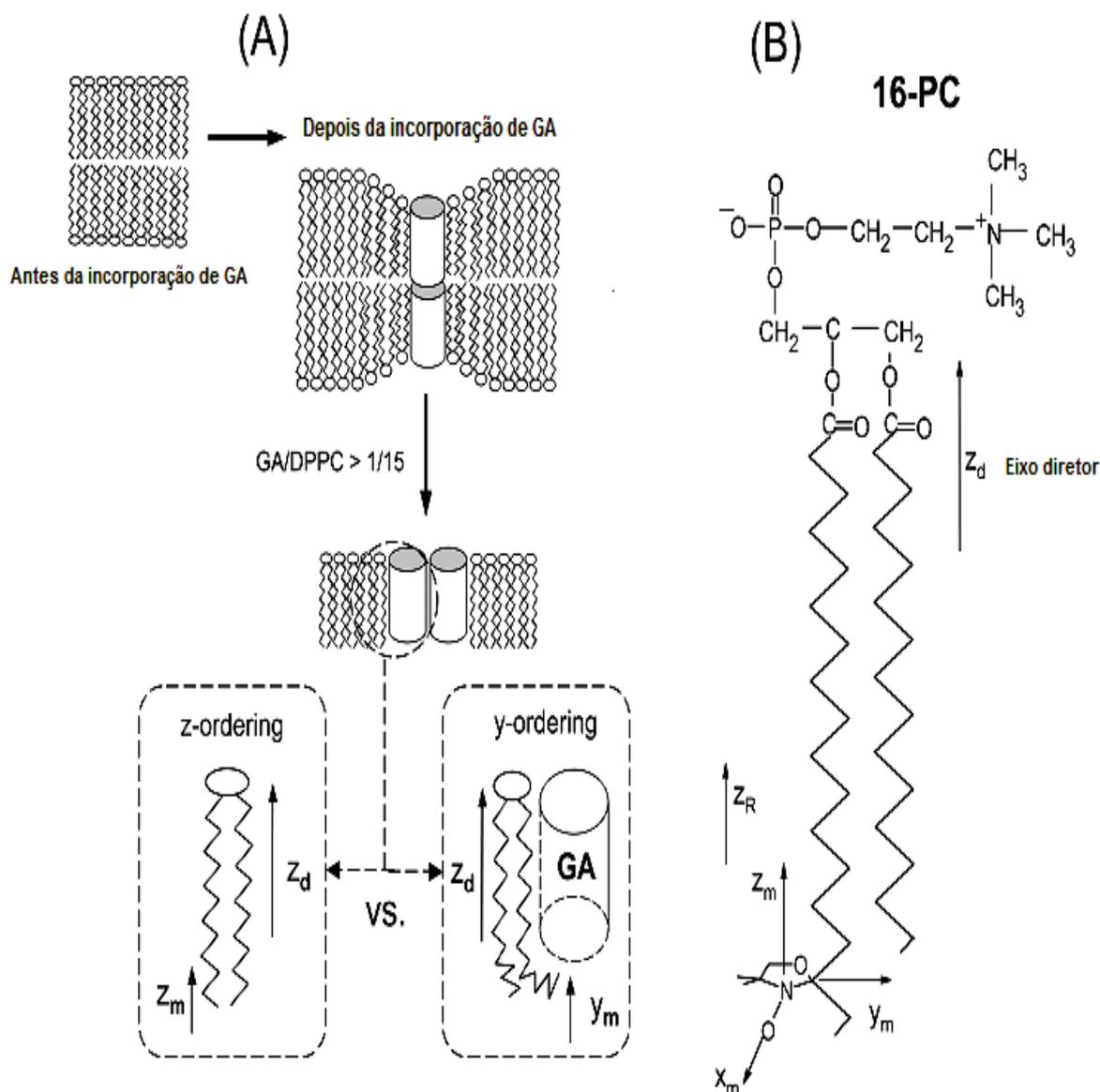


Figura 53 – Ilustração (A) do efeito da presença de moléculas de gramicidina A (GA) em bicamadas lipídicas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a valores de concentrações inferiores e superiores a  $DPPC/GA = 15$ ; (B) estrutura do marcador 16-PC na conformação trans com o sistema de eixos diretor ( $z_d$ ) e magnéticos ( $x_m, y_m, z_m$ )

## 6.2 Efeitos na superfície da bicamada

Na região da superfície da membrana, a análise direta indica que houve um aumento na viscosidade (aumento de  $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$ , figura 46) provocado pela floretina apenas para temperaturas baixas (5 °C a 10 °C). Para temperaturas acima dos 10 °C, pequenas variações dos valores de  $\Delta h_{+1}/\Delta h_0$  para DMPG puro assemelha-se ao observado em DMPG acrescido de floretina, porém considerando uma defasagem de cerca de 10 °C. O fato de que os espectros a 15 °C e a 20°C (figura 45 A) de amostras contendo floretina se assemelham aos de DMPG puro a 5 °C e a 15 °C (figura 45 B), respectivamente, sugere que para temperaturas acima dos 10 °C a floretina retarda a ocorrência das alterações estruturais do sistema lipídico em relação a amostras de DMPG puro, isto é, torna o sistema ligeiramente menos cooperativo.

Os resultados obtidos nas simulações indicam que a presença da floretina reduz o movimento rotacional (redução de  $R_{//}$ , figura 48), mas aumenta significativamente a mobilidade translacional (aumento de  $R_{\perp}$ , figura 47) e diminui o grau de variação da ordem (redução na variação de  $S_{20}$  em função da temperatura, figura 49) na direção normal à superfície. Esses efeitos podem estar correlacionados com o aumento na orientação do eixo  $x_R$  das cabeças em relação ao eixo  $z_d$  (aumento no valor de  $S_{22}$ , figura 50), isto é, a presença da floretina estabilizaria o modo como as cabeças polares se encontram na bicamada, ou seja, ligeiramente “dobradas” sobre o plano perpendicular à normal à superfície, o que favoreceria uma maior liberdade de movimento translacional (aumento de  $R_{\perp}$ ) das cabeças, mas dificultaria a mobilidade rotacional (redução de  $R_{//}$ ), sendo que essa nova configuração produziria uma perda da dependência da variação da ordem (cooperatividade) em função da temperatura (baixa variação de  $S_{20}$ ).

Além disso, como para o marcador TEMPO-PC os valores para os tensores hiperfinos foram mantidos constantes durante as simulações espectrais, o valor médio ( $a_0$ ) não variou com a temperatura (ver seção 3.1.6.1), o que sugere que a floretina não altera o grau de hidratação superficial. Uma justificativa para esse fato seria que a polaridade da cabeça dos lipídios devida ao grupo glicerol determinaria uma menor interação entre a floretina e os grupos fosfatos e, dessa forma, o grupo glicerol do DMPG “protegeria” os grupos fosfatos do efeito de desidratação atribuído a floretina, determinando alterações apenas organizacionais em torno do grupo

glicerol (Lairi3n e Disalvo, 2004). Esse resultado difere dos encontrados para a barbalo3na, pois, Duarte et. al (2008) empregando marcadores do tipo 5-PC, verificou que embora a barbalo3na n3o alterasse significativamente a ordem local, ela produzia um aumento na polaridade, o que corresponderia a um aumento na hidrata33o (aumento de  $a_o$ ) da regi3o pr3xima 3 superf3cie da bicamada.

### **6.3 Efeitos sobre a transi33o de fase**

Considerando os resultados obtidos por DSC, pode-se concluir que a intera33o da floretina com ves3culas negativamente carregadas de DMPG apresentam efeitos similares aos observados em perfis calorim3tricos de ves3culas neutras de DMPC (Cseh, Hetzer, *et al.*, 2000): a presen3a dessa mol3cula extingue o pico caracter3stico de pr3-transi33o, aumenta ligeiramente o intervalo de transi33o principal e desloca a ocorr4ncia dessa transi33o de fase para valores de temperaturas inferiores (curva vermelha, figura 51) ao observados em ves3culas lip3dicas puras (curva preta, figura 51); o que demonstra que o efeito da floretina 4 tornar o ambiente lip3dico menos cooperativo (ver se33o 3.2.2) mesmo em ves3culas carregadas de DMPG. Al4m disso, a floretina reduz a quantidade de energia necess3ria para que a transi33o de fase dos agregados de DMPG ocorra (redu33o de entalpia de transi33o, figura 52), o que refor3a a id4ia de que a floretina afeta a organiza33o lip3dica e, portanto, compromete a cooperatividade de transi33o. Os resultados encontrados para a barbalo3na s3o semelhantes ao encontrados para a floretina, mas com intensidade maior, isto 4, a perda de cooperatividade de transi33o de fase provocado pela barbalo3na (curva verde, figura 52) 4 mais efetiva que com a presen3a da floretina (curva vermelha, figura 52), uma vez que embora haja o deslocamento do in3cio da transi33o das bicamadas de DMPG (pr3ximos de 18 3C) para temperatura mais baixa (ao redor de 12 3C), a temperatura final de transi33o de fase, que 4 correspondente ao valor de temperatura a partir do qual n3o se observa varia33o para a entalpia de transi33o ( $\Delta H$ ), n3o p3de ser estimada, uma vez que a entalpia de transi33o ( $\Delta H$ ) cresce para todo intervalo de temperatura considerado, o que corrobora com os resultados obtidos por Duarte et. al (2008), os quais indicaram que a temperatura final de transi33o de fase do DMPG se encontraria acima dos 60 3C devido a presen3a da barbalo3na.

## 7 Discussões gerais e Conclusões

A análise térmica por DSC comprovou que a presença da floretina em vesículas negativamente carregadas de DMPG apresenta efeito semelhante aos obtidos em vesículas neutras de DMPC (Cseh, Hetzer, *et al.*, 2000), ou seja, essa molécula desloca a transição de fase para temperaturas mais baixas e torna o sistema lipídico menos cooperativo (figura 51). Entretanto, considerando a análise dos espectros de RPE, pode-se verificar que esses efeitos estão correlacionados a apenas alterações estruturais distintas no centro e na superfície da bicamada, mas aparentemente sem a ocorrência de mudanças no grau de hidratação para as duas regiões. Considerando a região da superfície das bicamadas de DMPG para todo intervalo de temperatura considerado observou-se que a floretina altera a conformação das cabeças polares e que essa nova configuração aumenta a mobilidade translacional e reduz a variação da ordem em função da temperatura, o que corrobora com o efeito de perda de cooperatividade verificado através das medidas de DSC. Por outro lado, na região correspondente ao centro da bicamada e submetida a altas temperaturas, essa molécula aumenta a viscosidade local, favorecendo a perda de dobras das porções terminais das cadeias hidrocarbônicas e reduzindo a mobilidade translacional a altas temperaturas, o que sugere um efeito de aumento no empacotamento lipídico. Ainda considerando o centro da bicamada, para temperaturas entre 15 °C e 19 °C, as quais se encontram dentro do intervalo de transição (8 °C a 28 °C) de amostras acrescidas de floretina, nota-se que essa molécula fluidifica essa região, isto é, reduz a viscosidade e a ordem local, o que sugere que as porções terminais das cadeias hidrocarbônicas do DMPG sejam sensíveis a transição de fase lipídica. Curiosamente, a baixas temperaturas (5 °C a 10 °C) observou-se um aumento da viscosidade tanto na superfície, como no centro da bicamada. Esse fato, somado à inexistência de um pico de pré-transição típico de vesículas de DMPG em medidas de DSC devido à presença da floretina (figura 51), sugere que essa molécula inibe a ocorrência de uma organização lipídica (*ripple*) entre a fase gel e a intermediária, de modo que uma organização típica de fase gel (mais anisotrópica ou viscosa) seja visualizada mesmo para valores de temperaturas entre 5 °C e 10 °C onde se deveria observar uma fase de pré-transição para vesículas lipídicas de DMPG puro.

Em relação à barbaloína, sua presença mostrou comprometer mais drasticamente a cooperatividade de transição de fase lipídica do que a floretina, uma vez que o final da transição de fase de agregados de DMPG ocorre para valores de temperaturas superiores aos monitorados pela técnica de DSC (além dos 55 °C). Esse efeito pode ser compreendido se considerarmos que a barbaloína penetra na matriz lipídica de modo a reduzir a interação entre as cadeias lipídicas e, conseqüentemente, aumente a desordem no centro da bicamada tanto para o intervalo entre 15 °C e 19 °C, como para temperaturas altas (35 °C a 45 °C), as quais ambas se encontram dentro do intervalo de transição de amostras acrescidas de barbaloína. Ainda, em relação a altas temperaturas, verificou-se um aumento na viscosidade e na hidratação, os quais podem ser explicados pela ocorrência de um fenômeno conhecido como “*y-ordering*” (Costa-Filho, Shimoyama e Freed, 2003), o que provavelmente se deve ao favorecimento de formação de “dobras”(figura 53) na porção terminal da cadeia hidrocarbônica (Ge e Freed, 1998; Fernandez e Lamy-Freund, 2000) produzido pela presença da barbaloína. Por outro lado, para baixas temperaturas (5 °C a 10°C), ao contrário da floretina, nenhum efeito sobre a viscosidade pôde ser observado pela presença dessa molécula, o que sugere que essa molécula não penetraria na matriz lipídica durante a fase gel (abaixo de 12°C), provavelmente devido ao grande grau de rigidez (empacotamento) entre as cadeias hidrocarbônicas. Já na região próxima à superfície, Duarte et. al (2008), empregando marcadores do tipo 5-PC, verificou que embora a barbaloína não altere significativamente a ordem local, ela também produz um aumento na polaridade (aumento de  $a_o$ ), o que também pode indicar um aumento da hidratação na região próxima da superfície.

Em vista dos resultados discutidos pode-se concluir que a floretina apresenta um efeito mais evidente na região superficial monitorada pelo marcador Tempo-PC que na região central monitorada pelo marcador 16-PC tanto na fase gel (abaixo da transição), como na fluída (acima da transição), enquanto a barbaloína aparentemente interage mais eficientemente com a região central durante a fase fluída, mas preferencialmente com a região superficial durante a fase gel. Essa diferença de resultados sugere que a floretina não penetra na bicamada, mas se encontra adsorvida sobre a superfície lipídica para todo o intervalo de temperatura considerado; enquanto a barbaloína pode estar parcialmente incorporada no ambiente hidrofóbico lipídico apenas durante a fase fluída.

Além disso, neste trabalho mostrou-se que a ação desidratante da floretina, a qual foi observada em diferentes profundidades de bicamadas neutras de DMPC (Gomide, 2006), não foi identificada em vesículas negativamente carregadas de DMPG tanto na superfície como no centro da bicamada, o que sugere que vesículas de DMPG podem ser empregadas para o transporte da floretina, sem que a presença dessa molécula comprometa significativamente o grau de hidratação das mesmas. Desse modo, visando um estudo mais refinado da influência do grupo glicerol das cabeças lipídicas em relação ao efeito desidratante da floretina, seria interessante analisar o efeito da floretina em vesículas neutras de DMPC acrescidas de concentrações variadas de DMPG e vice-versa. Em relação à barbalóina, considerando que estudos comparativos da sua interação com outros tipos de vesículas representariam uma importante fonte de informação do mecanismo de ação geral dessa molécula em ambiente lipídico, pesquisas empregando-se vesículas neutras de DMPC já estão sendo realizadas pelo grupo de Física e Biofísica da USP-SP (Duarte, Oliveira, *et al.*, 2008).

## **8 Apêndice**

### **8.1 Espectros simulados**

A seguir são mostrados os espectros experimentais e seus respectivos espectros teóricos obtidos para os marcadores de spin 16-PCSL e Tempo-PC em vesículas de DMPG acrescidas ou não de 2 mM de molécula interagente (floretina ou barbalóina). Os valores empregados durante as simulações para cada tipo de marcador são descritos na seção 4.

### 8.1.1 Espectros para o marcador 16-PC em DMPG

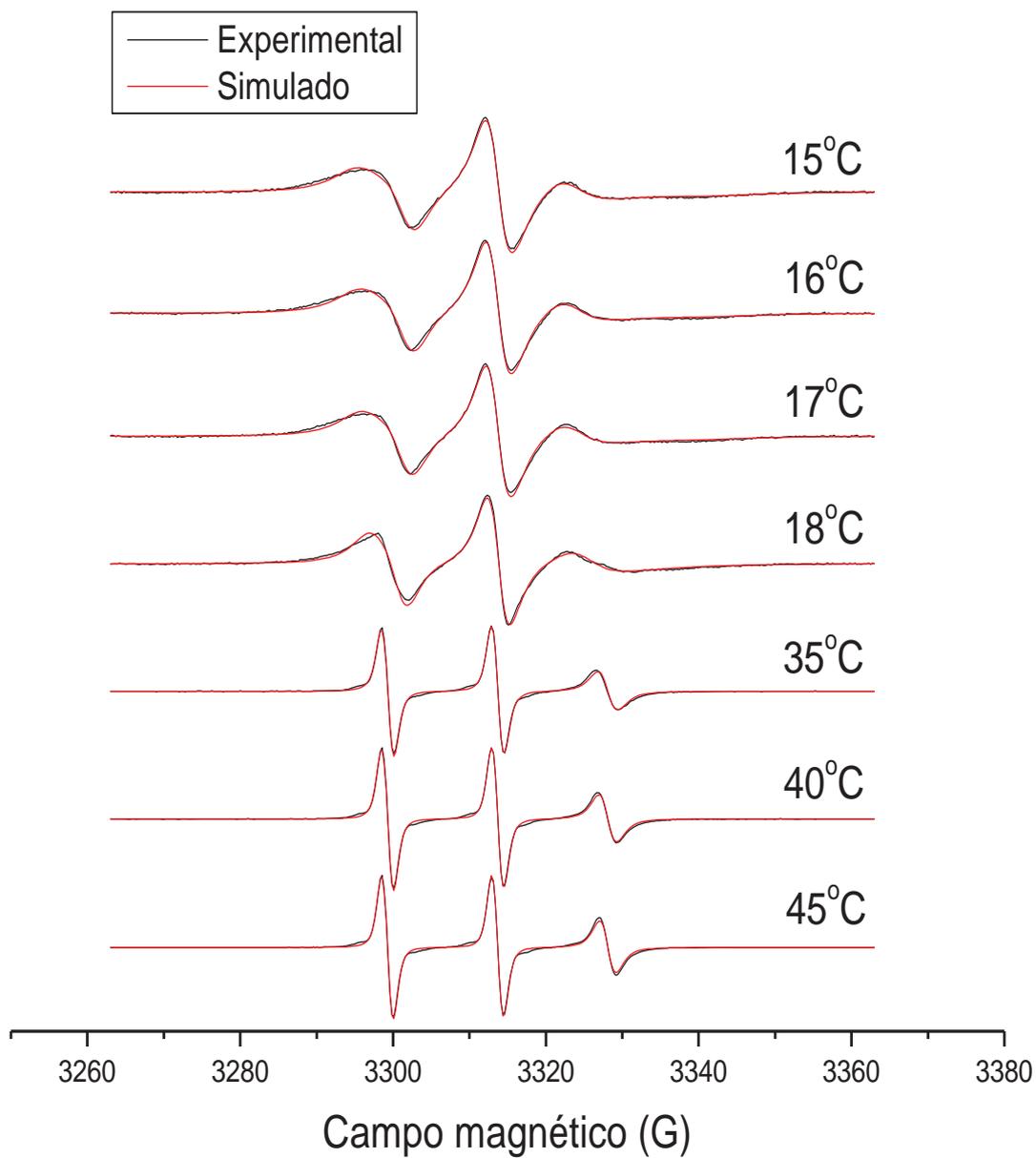


Figura 54 - Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores 16-PC incorporados em vesículas de DMPG puro.

### 8.1.2 Espectros para o marcador 16-PC em DMPG acrescido de 2 mM de floretina

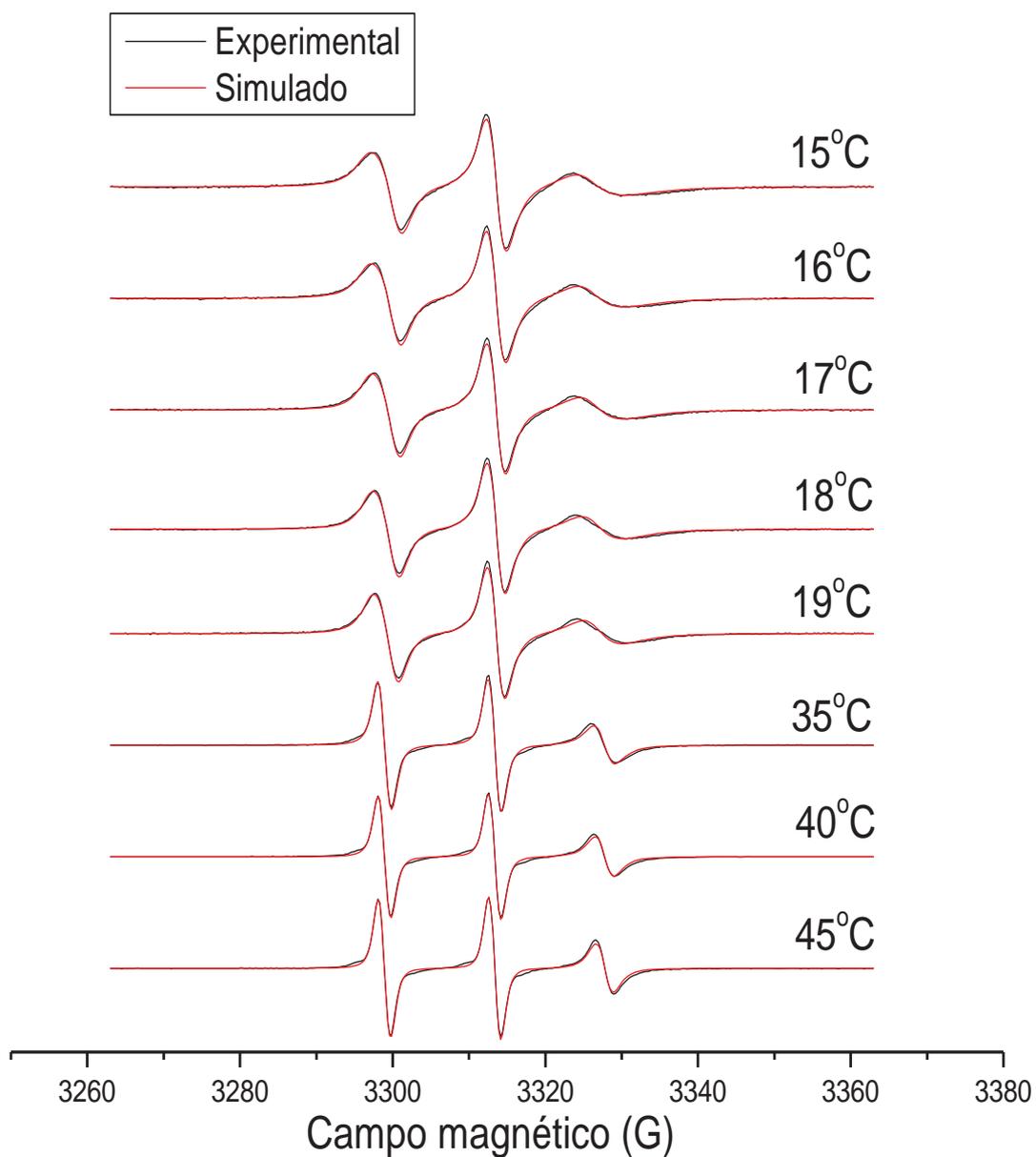


Figura 55 - Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores 16-PC incorporados em vesículas de DMPG acrescidas de 2 mM de floretina.

### 8.1.3 Espectros para o marcador 16-PC em DMPG acrescido de 2 mM de barbaloína

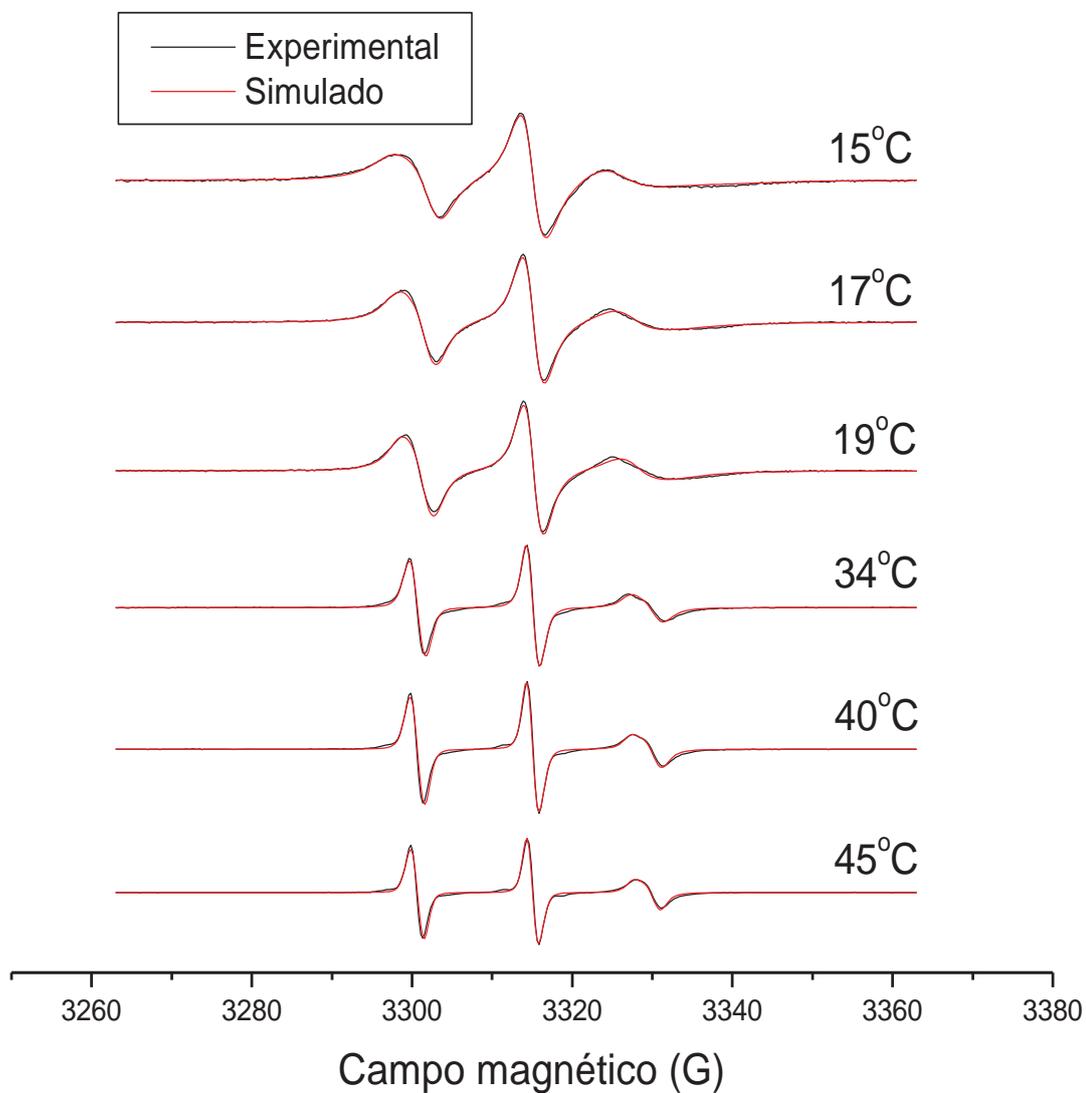


Figura 56 - Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores 16-PC incorporados em vesículas de DMPG acrescidas de 2 mM de barbaloína.

#### 8.1.4 Espectros para o marcador Tempo-PC em DMPG

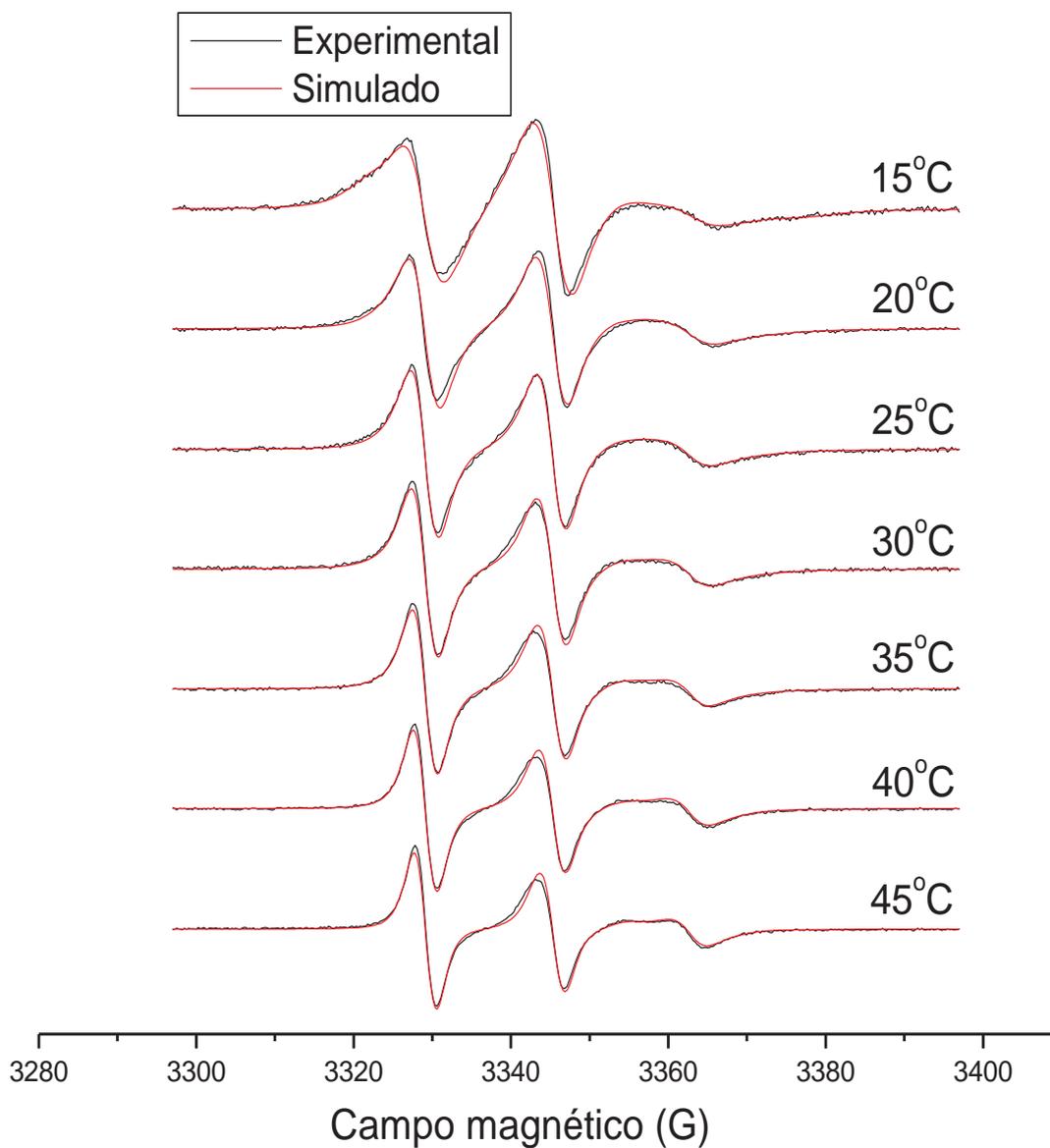


Figura 57- Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores Tempo-PC incorporados em vesículas de DMPG puro.

### 8.1.5 Espectros para o marcador Tempo-PC em DMPG acrescido de 2 mM de floretina

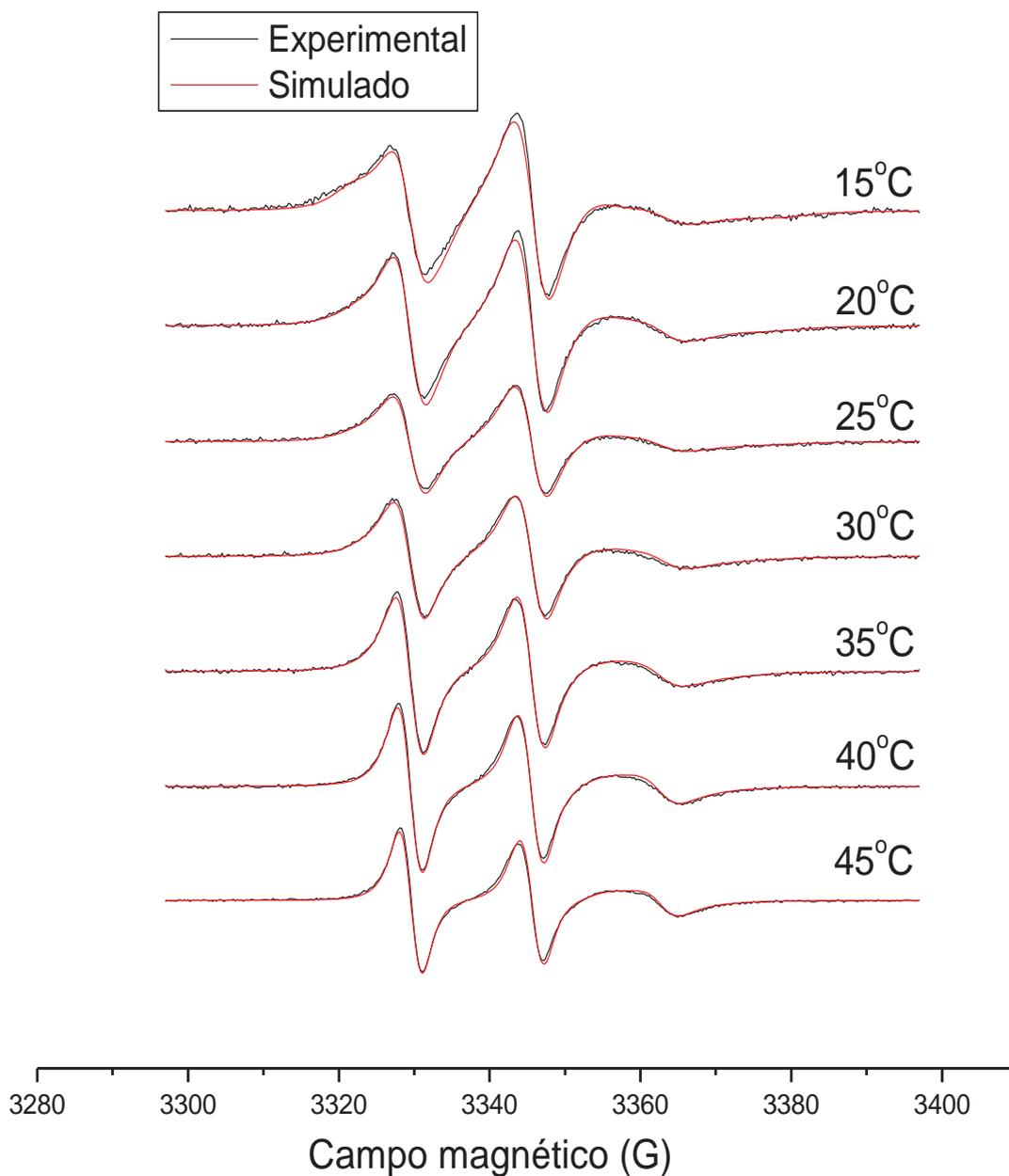


Figura 58- Espectros experimentais (■) e espectros simulados (■) de RPE obtidos a diferentes temperaturas para os marcadores Tempo-PC incorporados em vesículas de DMPG acrescidas de 2 mM de floretina.

## 9 Referências

- ALAKOSKELA, J.-M. I.; KINNUNEN, P. K. V. Thermal Phase Behavior of DMPG: The Exclusion of Continuous Network and Dense Aggregates. **Langmuir**, v. 23, p. 4203-4213, 2007.
- ALVES, D.S.; PEREZ-FONS, L.; ESTEPA, A.; MICOL, V. Membrane-related effects under lying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 549-561, 2004.
- ATHERTON, N. M. **Principles of Electron Spin Resonance**. [S.l.]: Ellis Horwood, 1993.
- AUNER, B. G.; VALENTA, C. Influence of phloretin on the skin permeation of lidocaine from semisolid preparations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 307-312, 2004.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BECHINGER, B. . S. J. Interaction of Electric Dipoles with Phospholipid HeadGroups. A <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P NMR Study of Phloretin and Phloretin Analogues in Phosphatidylcholine Membranes. **Biochemistry**, v. 30, p. 3923-3929, 1991.
- BI, S. et al. Spectroscopic characterization of effective components anthraquinones in Chinese medicinal herbs binding with serum albumins. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 62, p. 203–212, 2005.
- BOURVELLEC, C. L.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between apple (*Malus domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 251-261, 2009.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS**. 11ª Edição. ed. [S.l.]: McGraw-Hill, 2006.
- BRUSTOLON, M.; GIAMELLO, ELIO **Electron paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2009.
- BUDIL, D.E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J.H. Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg–Marquardt Algorithm. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 20, p. 155-189, 1996.
- CHAPMAN, D.; URBINA, J.; KEOUGH, K. M. Biomembrane Phase Transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 8, p. 2512-2521, 1974.
- CHE, Q.M.; AKAO, T.; HATTORI, M.; TSUDA, Y.; NAMBA, T.; KOBASHI, K. Barbaloin stimulates growth of *Eubacterium* sp. Strain BAR, a Barbaloin-Metabolizing

Bacterium from Human Feces. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, n. 3, p. 757-760, Março 1991.

COSTA-FILHO, A. J.; SHIMOYAMA, Y.; FREED, J. H. A2D-ELDOR Study of the Liquid Ordered Phase in Multilamellar Vesicle Membranes. **Biophysical Journal**, v. 84, p. 2619-2633, 2003.

CSEH, R.; HETZER, M.; WOLF, K.; KRAUS, J.; BRINGMMAN, G.; BENZ, R. Interaction of phloretin with membranes: on the mode of action of phloretin at the water-lipid interface. **Eur. Biophys. J.**, v. 29, p. 172-183, 2000.

CSEH, R.; BENS, R. The Adsorption of Phloretin to Lipid Monolayers and Bilayers Cannot Be Explained by Langmuir Adsorption Isotherms Alone. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 1399-1408, 1998.

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

DEGOVICS, G.; LATAL, A.; LOHNER, K. X-ray studies on aqueous dispersions of dipalmitoyl phosphatidylglycerol in the presence of salt. **J. Appl. Cryst.**, v. 33, p. 544-547, 2000.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACI, M.; AVELLAR, M.C.W **Farmacologia Integrada**. 3ª Edição. ed. [S.l.]: Revinter, 2007.

DIAZ, S.; LAIRIÓN, 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; LAIRION, F.; MARTINI, F.; ALMALECK, H. Water in biological membranes at interfaces: does it play a functional role? **The Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 92, p. 1-22, 2004.

DUARTE, E.L.; OLIVEIRA, T.R.; ALVES, D.S.; MICOL, V.; LAMY, M.T. On the Interaction of the Anthraquinone Barbaloin with Negatively Charged DMPG Bilayers. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4041-4049, 2008.

FAHR, A.; HOOGEVEST, P.; MAY, S.; BERGSTRAND, N.; LEIGH, M.L.S. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 251-265, 2005.

FERNANDEZ, R.M.; RISKE, K.A.; AMARAL, L.Q.; ITRI, R.; LAMY, M.T. Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 907-916, 2008.

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. Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides. In: BERLINER, L. J. **Spin Labeling, Theory and Applications**. [S.I.]: Academic Press, 1976. Cap. 3, p. 53-132.

GABBOTT, P. **Principles and Applications of Thermal Analysis**. 1ª Edição. ed. [S.I.]: Blachwell Pyblishing, 2008.

GE, M.; FREED, J. H. Polarity Profiles in Oriented and Dispersed Phosphatidylcholine Bilayers Are Different: An Electron Spin Resonance Study. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 910-917, 1998.

GE, M.; FREED, J. H. Electron Spin Resonance Study of Agregation of Gramicidin in Dipalmytoilphosphatidylcholine Bilayers and Hidrofobic Mismatch. **Biophysical Journal** , v. 76, p. 264-280, 1999.

GE, M.; FREED, J. H. Hydration, Structure, and Molecular Interactions in the Headgroup Region of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers: An Electron Spin Resonance Study. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 4023–4040, 2003.

GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Quantum chemical calculations in the structural analysis of phloretin. **Journal of Molecular Structure**, v. 930, p. 187-194, 2009.

GOMIDE, A. B. **Moléculas que alteram a superfície de membranas lipídicas: estudos estruturais com marcadores de spin incorporados à bicamada**. 2006. Dissertação. Instituto Física - Universidade São Paulo - USP, São Paulo, 2006.

GOSCH, C.; HALBWIRTH, H.; KUHN, J.; MIOSIC, S.; STICH, K. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). **Plant Science**, v. 176, p. 223-231, 2009.

GRIFFITH, O. H.; DEHLINGER, P. J.; VAN, S. P. Shape of the Hydrofobic Barrier of Phospholipid Bilayers (Evidence for Water Penetration in Biological Membranes) **J. Membrane Biol.**, v. 15, p. 159-192, 1974.

HALLER, J. S. A drug for all seasons. Medical and pharmacological history of aloe. **Bull. N.Y. Acad. Med.**, v. 66, n. 6, 1990.

HARRIS, J. et al. An Electron-Spin-Resonance Spin-Label Study of the Interaction of Purified Mojave Toxin with Synaptosomal Membranes from Rat Brain. **Eur. J. Biochem.**, v. 131, p. 559-565, 1983.

HATAKEYAMA, T.; LIU, Z. **Handbook of Thermal Analysis**. [S.I.]: Jonh Wiley & Sons, 1998.

HEIMBURG, T. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1415, p. 147-162, 1998.

HEIMBURG, T.; BILTONEN, R. L. Thermotropic Behavior of Dimyristoylphosphatidylglycerol and Its Interaction with Cytochrome c. **Biochemistry**, v. 33, p. 9477-9488, 1994.

HO, C.; SLATER, S. J.; STUBBS, C. D. Hydration and Order in Lipid Bilayers. **Biochemistry**, v. 34, p. 6188-6195, 1995.

IWASHINA, T. Flavonoid Function and Activity to Plants and Other Organisms. **Biological Science in Space**, v. 17, n. 1, p. 24-44, 2003.

JENNINGS, M. L.; SOLOMON, A. K. Interaction between Phloretin and the Red Blood Cell Membrane. **The Journal of General Physiology**, v. 67, p. 381-397, 1976.

KODAMA, M.; MIYATA, M. Effect of the head group of phospholipids on the acyl-chain packing and structure of their assemblies as revealed by microcalorimetry and electron microscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 109, p. 283-289, 1996.

KODAMA, M.; MIYATA, T. Effect of Na<sup>+</sup> 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.

KULKARNI, V. S. **Handbook of non-invasive drug delivery systems**. 1<sup>a</sup> Edição. ed. [S.I.]: Elsevier, 2010.

LAIRIÓN, F.; DISALVO, E. A. Effect of Phloretin on the Dipole Potential of Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, and Phosphatidylglycerol Monolayers. **Langmuir**, v. 20, p. 9151-9155, 2004.

LAM, R.Y.Y.; WOO, A.Y.H.; LEUNG, P.S.; CHENG, C.H.K. Antioxidant Actions of Phenolic Compounds Found in Dietary Plants on Low-Density Lipoprotein and Erythrocytes in Vitro. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 233-242, 2007.

LASIC, D. D. Review article. The mechanism of vesicle formation. **Biochem. J.**, v. 256, p. 1-11, 1988.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEU, S.J.; LIN, Y.P.; LIN, R.D.; WEN, C.L.; CHENG, K.T.; HSU, F.L.; LEE, M.H. Phenolic Constituents of *Malus doumeri* var. *formosana* in the Field of Skin Care. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 4, p. 740-745, 2006.

LEVINE, S.; FRANKI, N.; HAYS, R. M. Effect of Phloretin on Water and Solute Movement in the Toad Bladder. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 1435-1442, 1973.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, L.S.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4<sup>a</sup> Edição. ed. [S.I.]: W.H. Freeman, 2000.

MANNOCK, D. A.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 376-388, 2010.

MARSH, D. Electron spin Resonance: Spin Labels. **Membrane Spectroscopy. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics**, Berlin, Heidelberg, New York, v. 31, p. 51-142, 1981.

MATTEUCCI, M. L.; THRALL, D. E. The Role of Liposomes in Drug Delivery and Diagnostic Imaging: a Review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 41, p. 100-107, 2000.

MCMULLEN, T. P. W.; MCELHANEY, R. N. Differential Scanning Calorimetric Studies of the Interaction of Cholesterol with Distearoyl and Dielaidoyl Molecular Species of Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, and Phosphatidylserine. **Biochemistry**, v. 36, p. 4979-4986, 1997.

MENCZEL, J. D.; PRIME, R. B. **Thermal Analysis of Polymers. Fundamentals and Applications**. [S.I.]: John Wiley & Sons, 2009.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 3309-3312, 2003.

OHLIN, S.M.; CAMPBELL, M.L.; TURNBULL, M.T.; KOHLER, S.J. Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. A Biophysical Chemistry Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 78, n. 9, p. 1251-1256, 2001.

ORESANO, C.; YATSKAYER, M.; FOLTIS, P.; PINNELL, S.; STEPHENS, T. Effect of a topical antioxidant composition containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin in protecting human skin from ultraviolet light-induced skin damage and oxidative stress. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, 2009.

PASCHER, I. . L. M. . N. P. . S. S. Crystal structures of membrane lipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1113, p. 339-372, 1992.

PRENNER, E.J.; LEWIS, R.N.A.H.; KONDEJEWSKI, L.H.; HODGES, R.S.; MCELHANEY, R.N. Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1417, p. 211-223, 1999.

REYES, J.; GRECO, F.; MORTAIS, R.; LATORRE, R. Phloretin and Phloretin analogs: Mode of Action in Planar lipid Bilayers. **J. Membrane Biol.**, v. 72, p. 93-103, 1983.

REZK, B.M.; HAENEM, G.R.M.M.; VIJGH, W.J.F.; BAST, A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 9-13, 2002.

RISKE, K.A.; FERNANDEZ, R.M., NASCIMENTO, O.R.; BALES, B.L.; LAMY-FREUND, M.T. DMPG gel-fluid thermal transition monitored by a phospholipid spin labeled at the acyl chain end. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 124, p. 69-80, 2003.

RISKE, K.A.; AMARAL, L.Q.; DÖBEREINER, H-G.; LAMY, M.T. Mesoscopic Structure in the Chain-Melting Regime of Anionic Phospholipid Vesicles: DMPG. **Biophysical Journal**, v. 86, p. 3722–3733, 2004.

RISKE, K. A.; AMARAL, L. Q.; LAMY-FREUND, M. T. Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1511, p. 297-308, 2001.

RISKE, K. A.; DOBEREINER, H.-G. . L.-F. M. T. Gel Fluid Transition in Dilute versus Concentrated DMPG Aqueous Dispersions. **J. Phys. Chem. B**, v. 106, p. 239-246, 2002.

SCHNEIDER, D. J.; FREED, J. H. Calculating slow motional magnetic resonance spectra – A user's guide. **Biological Magnetic Resonance**, v. 8, p. 1-76, 1989a.

SCHNEIDER, D. J.; FREED, J. H. Spin relation and motion dynamics. **Advances in Chemical Physics**, v. 73, p. 387-527, 1989b.

SCHNEIDER, M.F.; MARSH, D.; JAHN, W.; KLOESGEN, B.; HEIMBURG, T. Network formation of lipid membranes: Triggering structural transitions by chain melting. **PNAS**, v. 96, p. 14312–14317, 1999.

SEELIG, J.; MACDONALD, P. M.; SCHERER, P. G. Phospholipid Head Groups as Sensors of Electric Charge in Membrane. **Biochemistry**, v. 26, n. 24, p. 7535-7541, 1987.

STRYER, L. **Biochemistry**. 2<sup>a</sup> Edição. ed. S. Francisco: W.H. Freeman and Company, 1981.

SUBCZYNSKI, W.K.; WISNIEWSKA, A.; YIN, J-J.; HYDE, J.S.; KUSUMI, A. Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol. **Biochemistry**, v. 33, p. 7670-7681, 1994.

SUKHORUKOV, V.L.; KÜRSCHNER, M.; DILSKY, S.; LISEC, T.; WAGNER, B.; SCHENK, W.A.; BENZ, R.; ZIMMERMANN, U. Phloretin-Induced Changes of Lipophilic Ion Transport across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. **Biophysical Journal**, v. 81, p. 1006–1013, 2001.

TIAN, J.; LIU, J.; ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. Fluorescence Studies on the Interactions of Barbaloin with Bovine Serum Albumin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 3, p. 579-582, 2003.

TOMÁS-BARBERAN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Review. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. **J. Sc.i Food Agric.**, v. 80, p. 1073-1080, 2000.

TURCHIELLO, R.F.; JULIANO, L.; ITO, A.S.; LAMY-FREUND, M.T. How Bradykinin Alters the Lipid Membrane Structure: A Spin Label Comparative Study with Bradykinin Fragments and Other Cations. **Biopolymers**, v. 54, n. 3, p. 211-221, 2000.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. **BIOCHEMISTRY OF LIPIDS, LIPOPROTEINS AND MEMBRANES**. 5ª Edição. ed. [S.l.]: Elsevier, 2008.

VOET, D.; VOET, J. D. **Biochemistry**. 2ª Edição. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.

VOLKE, F.; PAMPEL, A. Membrane Hydration and Structure on a Subnanometer Scale as Seen by High Resolution Solid State Nuclear Magnetic Resonance: POPC and POPC/C12E04 Model Membranes. **Biophysical Journal**, v. 68, p. 1960-1965, 1995.

WALSH, C. T.; SCHWARTZ-BLOOM, R. D. **Levine's Pharmacology. Drug Actions and Reactions**. 7ª Edição. ed. [S.l.]: Taylor & Francis Group , 2005.

WAMER, W. G.; VATH, P.; FALVEY, D. In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloina. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 2, p. 233-242, 2003.

WEIL, J. A.; BOLTON, J. R. **Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Pratical Applications**. 2ª Edição. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007.

WIENER, M. C.; WHITE, S. H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. **Biophys. J.** , v. 61, p. 434-447, 1992.

ZHOU, Z.; SAYER, B.G.; HUGHES, D.W.; STARK, R.E.; EPAND, R.M. Studies of Phospholipid Hydration by High-Resolution Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance. **Biophysical Journal**, v. 76, p. 387–399, 1999.