UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE MELATONINA
COM MEMBRANAS LIPÍDICAS

CLÁUDIO SABURO SHIDA

Comissão Examinadora:

Prfa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund - IFUSP

Profa. Dra. Adelaide Faljoni-Alário - IQUSP

Prof. Dr. Otaciro Rangel do Nascimento - IFQSCarlos - USP

Dissertação de Mestrado
submetida ao Instituto de Física
da Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund

São Paulo

1993

"Ao espírito vivo."

Agradecimentos

Inúmeras foram aquelas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível. Entre aquelas que diretamente contribuíram, agradeço:

- à professora Maria Teresa Lamy Freund pela orientação;
- à professora Shirley Schreier pelo uso de seu laboratório;
- ao professor Amando Ito pelas discussões e disponibilidade;
- aos amigos da Bioquímica-IQUSP: Thelma, Eneida, Lígia, Wilson, Maurício, Tais, Berê, Alice, Sílvia e Jeanette;
- aos amigos da Física: Pedro, Carlão, Whilk, João, Ernani, Márcia, Aninha, Carlos Duarte, Tânia e Zélia;
- aos amigos e colegas que esqueci de citar;
- à Martinha pelo carinho e companheirismo;
- aos meus irmãos e, principalmente, aos meus pais, sem os quais nada disso seria possível;
- à FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Resumo

A melatonina (N-acetil 5-metoxi-triptamina) é um hormônio derivado do amino-ácido triptofano, secretado pela glândula pineal, estando relacionado com importantes processos biológicos e farmacológicos. O seu mecanismo de ação não é bem conhecido, entretanto é sabido que a melatonina não têm uma ação específica, podendo interagir com diversos tipos de células (Reitel, 1992, *Bioessays*, 14: 169-175), sugerindo que possa não existir um tecido ou célula-alvo específica, na qual a melatonina exerça a sua ação hormonal. Assim, é possível que a melatonina não interaja através de um receptor proteico específico de membrana e possa interagir com a célula via a fase lipídica membranar.

O presente trabalho estuda a interação de melatonina com membranas lipídicas por espectroscopia de RPE (ressonância paramagnética eletrônica), utilizando o método do marcador de spin (Swartz, Bolton e Borg editores, *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, 1972, Willey-Interscience, New York; Berliner, L.J. editor, *Spin Labeling*, 1976 (vol. 1) e 1979 (vol. 2), Academic Press, New York); e espectroscopia de fluorescência estática, pois a melatonina é uma molécula fluorescente. Os fosfolipídios utilizados nos sistemas modelo de membrana (lipossomos e vesículas unilamelares) foram principalmente o DMPG (dimiristoil fosfatidil glicerol) e DMPC (dimiristoil fosfatidil colina).

Os sistemas estudados por RPE foram analisados por meio de medidas dos tempos de correlação rotacional perpendicular ($\tau_{R\perp}$) e paralelo ($\tau_{R\parallel}$) ao eixo principal de rotação do radical nitróxido (Marsh, em *Biological Magnetic Resonance*, 255-303, e Bales, em *Biological Magnetic Resonance*, 77-130, editores Berliner e Reuben, 1989, vol. 8, Plenum Publishing, New York), parâmetro de ordem efetivo (S^{ef}) e do parâmetro $2A_{m\acute{a}x}$ (Griffith e Jost, em *Spin Labeling*, 454-523, editor Berliner, 1976, vol. 1, Academic Press, New York).

Os resultados experimentais mostram que a melatonina:

a) é solúvel em meio aquoso até a concentração de 5mM, ao contrário do que está na literatura, tendo sido desenvolvido um novo método para solubilizá-la;

b) interage com membranas lipídicas provocando mudanças estruturais nas membranas. Esta interação ocorre próxima à região da cabeça polar, detectada pelos marcadores de spin utilizados, que monitoram diferentes regiões da bicamada lipídica; e pela fluorescência, que mostra que a melatonina não apresenta um deslocamento do $\lambda_{\text{máximo}}$ de emissão na presença de vesículas de DMPG ou DMPC;

c) interage mais fortemente com membranas lipídicas de fosfolipídio com cabeça polar carregada negativamente (DMPG), do que de fosfolipídio com carga líquida igual a zero (DMPC). Este resultado mostrado tanto por RPE quanto por fluorescência. Essa diferença é discutida em termos da estrutura das membranas, através dos parâmetros τ_R , S^{ef} e $2A_{\text{máx}}$, que descrevem descreve o grau de "fluidez" da bicamada;

d) em membranas de DMPG, torna mais "fluida" na região da cabeça polar dos fosfolipídios da bicamada lipídica, tanto abaixo como acima da temperatura de transição de fase (T_f) das mesmas. A alteração da "fluidez" ocorre nesta região da bicamada, pois os marcadores de spin utilizados mostram que: i) O SSL (4-estereamida-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil piperidina), que monitora a região da cabeça polar, acima da T_f , mostra que a presença de melatonina em DMPG provoca a diminuição de $\tau_{R\perp}$; e abaixo da T_f , não é possível o cálculo do tempo de correlação rotacional, entretanto o efeito da melatonina é observado através da diminuição das larguras de linha do espectro. ii) O 5-SASL (5-doxil ácido esteárico) e 6-DPPC (1-palmitioil-2-(6-doxil ácido esteárico) fosfatidil colina), que monitoram uma região da cadeia de hidrocarbonetos ainda próxima à região da cabeça polar, mostram que nesta região, acima da T_f , a presença de melatonina não

provoca alterações significativas na estrutura de bicamadas de DMPG ou DMPC; e abaixo da T_f , a presença da melatonina "fluidifica" a membrana provocando uma diminuição do parâmetro $2A_{máx}$, somente em DMPG. iii) O 12-SASL (12-doxil ácido esteárico) que monitora principalmente uma região próxima ao final da cadeia, não mostra alterações em seu espectro com a presença da melatonina;

e) por interagir com membranas lipídicas, pôde ter o seu coeficiente de partição determinado por medidas de RPE e fluorescência. Os coeficientes foram determinados por métodos diferentes. Por RPE foi baseado em Lissi e col. (1990, *Biochem. Biophys. Acta*, 1021: 46-50) e o por fluorescência foi baseado em Tabak e Borisevith (1992, *Biochem. Biophys. Acta*, 1116: 241-249). Os coeficientes determinados apresentaram uma grande discrepância, sendo baixo para RPE ($P=30$) e alto para fluorescência ($P=1090$), provavelmente devido à técnica utilizada, assunto que é discutido no trabalho.

Os resultados de RPE e fluorescência, citados acima, confirmando que a melatonina interage com membranas lipídica, associado ao fato de que a melatonina é bastante solúvel em meio aquoso, têm algumas implicações de cunho biológico que abrem a discussão sobre questões como a necessidade de um carregador do hormônio no plasma sanguíneo ou o mecanismo que leva o hormônio a atravessar a membrana plasmática e interagir no núcleo da célula (Tan e col, 1993, *Cancer Letters*, 70: 65-71).

Abstract

Melatonin (N-acetyl 5-methoxy-tryptamine), a tryptophan derivative hormone, is the main product of secretion by pineal gland. It has been related with important biological and pharmacological processes, although its mechanism of action is not well known. Melatonin is known to interact with different types of cells, playing different roles (Reitel, 1992, *Bioessays*, 14: 169-175), suggesting that the molecule does not interact through a specific membrane protein receptor in a specific cell, and could possibly interact with the cell through its membrane lipid phase.

The present work studies the melatonin interaction with model lipid membrane using EPR (Electronic Paramagnetic Resonance) spectroscopy, using the spin label method (Swartz, Bolton e Borg editors, *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, 1972, Willey-Interscience, New York; Berliner, L.J. editor, *Spin Labeling*, 1976, vol. 1 e 1979, vol. 2, Academic Press, New York); and steady state fluorescence spectroscopy, as melatonin is a fluorescence molecule. The phospholipids used (in liposomes and unilamellar vesicles) were mainly DMPG (dimiristoyl phosphatidyl choline) and DMPC (dimiristoyl phosphatidyl choline).

The EPR signals were analyzed through the calculations of rotational correlation times perpendicular ($\tau_{R\perp}$) and parallel ($\tau_{R\parallel}$) to the molecule principal axis of rotation (Marsh, in *Biological Magnetic Resonance*, 255-303, and Bales, in *Biological Magnetic Resonance*, 77-130, Berliner & Reuben editors, 1989, vol. 8, Plenum Publishing, New York), effective order parameter (S^{ef}) and $2A_{\text{máx}}$ parameter (Griffith e Jost, in *Spin Labeling*, 454-523, Berliner, L.J. editor, 1976, vol. 1, Academic Press, New York).

The experimental results show that the melatonin:

a) contrarily to the literature beliefs, is soluble in aqueous medium up to the concentration of 5mM, and a new solubility method is presented;

b) interacts with lipid membranes, near the polar head group, changing bilayer structure. The hormone displays a stronger interaction with the negatively charged phospholipid (DMPG) than with the zwitterionic one (DMPC), as detected by both EPR and fluorescence techniques. As melatonin is a non charged molecule, that difference is discussed in terms of the lipids different packing (or degree of "fluidity").

c) increases DMPG membrane "fluidity", both above and below the lipid phase transition temperature (T_f). The changes on the packing of the lipids are mainly seen by the spin label SSL (4-stereamine-1 oxyl-2,2,2,6,6-tetramethyl piperidine), which monitors the lipid polar head region. Above T_f , melatonin decrease SSL τ_{R_L} ; and below T_f , the decrease in "fluidity" is monitored via a decrease in the SSL EPR spectrum line width. The spin labels 5-SASL (5-doxyl stearic acid) and 6-DPPC (1-palmitoyl-2-(6-doxyl-stearic acid) phosphatidyl choline), which monitor the hydrocarbon chain region close to the membrane polar head group, show no change in the spectra parameters for temperatures above T_f . Below T_f , a decrease on $2A_{max}$ with the presence of melatonin is an indication of the hormone effect. The center of the bilayer is apparently not affected by the hormone as no change in the EPR spectrum of 12-SASL (12-doxyl-stearic acid) is detected, both above and below the lipid phase temperature.

The melatonin partition coefficient in lipid membranes was determined through EPR (Lissi *et al.*, 1990, *Biochem. Biophys. Acta*, 1021: 46-50) and fluorescence (Tabak and Borisevith, 1992, *Biochem. Biophys. Acta*, 1116: 241-249) data, and found to be 30 and 1090, respectively. The different values obtained with the distinct methods are discussed.

The results presented here, showing that melatonin is highly soluble in aqueous medium, through it can interact with lipid membranes, will certainly have consequences on the current biological discussions on the need of a melatonin-carrier in the blood stream or the mechanism that makes the hormone to cross the cell membrane and interact at the nucleus (Tan et al, 1993, Cancer Letters, 70: 65-71).

Símbolos e abreviações

β	Magnetron de Bohr eletrônico
β_N	Magnetron de Bohr nuclear
ν	Frequência de onda eletromagnética
γ	Razão giromagnética
τ_{20}, τ_{22}	Componentes independentes do tempo de correlação rotacional
ϕ_F	Rendimento quântico da fluorescência
τ_R	Tempo de correlação rotacional
$\tau_{R\perp}$	Tempo de correlação rotacional perpendicular ao eixo de rotação preferencial do radical nitróxido
$\tau_{R\parallel}$	Tempo de correlação rotacional paralelo ao eixo de rotação preferencial do radical nitróxido
μ	Vetor momento magnético
μ_Z	Componente do momento magnético na direção z
A	Tensor de interação hiperfina nuclear
$A_{\perp}, A_{\parallel}$	Componentes da média temporal do tensor de interação hiperfina; componentes perpendicular e paralela de A em relação a normal da bicamada lipídica
A'	Termo anisotrópico do tensor de interação hiperfina A
A_0	Constante de acoplamento hiperfino escalar (isotrópico)
$A_{\text{máx}}$	Metade da distância entre o primeiro máximo e o último mínimo do espectro de RPE da 1a. derivada de amostra orientada randomicamente (lipossomo)
$A_{\text{mín}}$	Metade da distância entre o primeiro mínimo e o último máximo do espectro de RPE da 1a. derivada de amostra orientada randomicamente (lipossomo)
ATP	Adenosina 3',5' trifosfato
A_{XX}, A_{YY}, A_{ZZ}	Componentes principais do tensor de interação hiperfina A
c	Velocidade da luz no vácuo
CSL	3-doxil-5-colestano
DMPC	Dimiristoil fosfatidil colina
DMPG	Dimiristoil fosfatidil glicerol
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
12-DPPC	1-palmitoil-2-(12-doxilesteroil)-fosfatidil colina
6-DPPC	1-palmitoil-2-(6-doxilesteroil)-fosfatidil colina

E	Energia
e	Carga do elétron
E_i	Energia do estado i
$\mathbf{g}$	Tensor do fator g
g	Fator g eletrônico
g_0	Fator g isotrópico
g_N	Fator g nuclear
g_{XX}, g_{YY} e g_{ZZ}	Componentes principais do tensor $\mathbf{g}$
$\mathcal{H}$	Hamiltoniana
$\mathbf{H}$	Vetor campo magnético externo
H	Campo magnético externo estático com direção z
h	Constante de Planck
h_{+1}/h_0	Razão entre a intensidade pico a pico da 1ª. derivada do espectro de RPE da linha $m=+1$ e $m=0$
$\mathcal{H}_{\text{Dipolar}}$	Hamiltoniana da interação dipolo-dipolo entre elétrons desemparelhados
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazimil)etanosulfônico
$\mathcal{H}_{\text{hf}}$	Hamiltoniana da interação hiperfina nuclear
$\mathcal{H}_{\text{iso}}$	Hamiltoniana hiperfina isotrópica (termo de Fermi)
H_r	Campo magnético externo aplicado onde ocorre a ressonância
$\mathcal{H}_{\text{troca}}$	Hamiltoniana da interação de troca entre elétrons desemparelhados
$\mathcal{H}_Z$	Hamiltoniana Zeeman
k	Constante de Boltzmann
k_{CI}	Taxa de conversão interna
k_F	Taxa de fluorescência
k_{IS}	Taxa de cruzamento inter-sistemas
K_M	Constante de associação efetivo
k_Q	Taxa de supressão de fluorescência
K_S	Constante de associação efetivo no modelo de Stern-Volmer
M_I	Número quântico de spin nuclear
M_S	Número quântico de spin eletrônico
$n_{\text{H}_2\text{O}}$	Número de moles de melatonina em meio aquoso
n_T	Número total de moles de melatonina na solução
P	Coeficiente de Partição
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
S	Parâmetro de ordem
$\hat{S}$	Operador momento angular de spin do elétron
S_0	Estado fundamental
S_1	Primeiro estado singleto excitado
S_{ap}	Parâmetro de ordem aparente
5-SASL	5-doxil ácido esteárico
S_{ef}	Parâmetro de ordem efetivo
SSL	4-estereamina-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil piperidina
S_z	Componente na direção z do operador momento angular de spin do elétron
T_f	Temperatura de transição de fase
V_{H_2O}	Volume do meio aquoso
V_T	Volume total da solução

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	VII
Símbolos e Abreviações.....	X

1. Introdução, 1

- 1.1. A melatonina, 1
 - 1.1.1. A ação hormonal, 1
 - 1.1.2. A Glândula Pineal, 4
 - 1.1.3. O hormônio melatonina, 6
 - 1.1.4. Função biológica da melatonina, 8
- 1.2. Membranas, 9
 - 1.2.1. Membranas biológicas, 9
 - 1.2.2. Lipídios de membranas biológica, 10
 - 1.2.3. Lipídios que formam a bicamada, 15
 - 1.2.4. Sistemas modelo de membranas, 15
 - 1.2.5. Movimentos dos componentes de membrana, 19
 - 1.2.6. Transição de fase em membranas lipídica, 21

2. Objetivos, 23

3. Materiais, 25

- 3.1. Substâncias empregadas, 25
- 3.2. Equipamentos Utilizados, 28

4. Métodos, 29

- 4.1. Preparação de Amostras, 29
 - 4.1.1. Lipossomos para RPE, 29
 - 4.1.2. Vesículas para Fluorescência, 30
- 4.2. Dosagem de fosfato, 31
- 4.3. Solubilização da Melatonina em solução aquosa. Novo método, 32
- 4.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica, 33
 - 4.4.1. O fenômeno da ressonância, 33

- 4.4.2. O fator g, 38
- 4.4.3. Interação hiperfina nuclear, 39
- 4.4.4. O método do marcador de spin, 42
 - 4.4.4.1. Informações de um espectro de marcador de spin nitróxido, 43
 - 4.4.4.2. Hamiltoniana do marcador de spin nitróxido, 44
 - 4.4.4.3. Tempo de correlação rotacional, 47
 - 4.4.4.4. Alargamento de linha de espectros de nitróxidos, 48
 - 4.4.4.5. Movimento muito rápido, 50
 - 4.4.4.6. Movimento rápido, 51
 - 4.4.4.7. Movimento lento e imobilizado, 54
 - 4.4.4.8. Parâmetro de ordem, 54
 - 4.4.4.9. Análise das intensidades de linha do SSL, 60
- 4.4.5. Método numérico de separação de linhas de RPE -
programa Lowfit, 61
- 4.4.6. Aquisição de espectros de RPE, 63
- 4.4.7. Manipulação de Espectros de RPE, 64
- 4.5. Fluorescência, 65
 - 4.5.1. Princípio da fluorescência, 65
 - 4.5.2. Fluorescência com vesículas, 70
 - 4.5.3. Análise da Fluorescência com vesículas, 71
- 4.6. Determinação do Coeficiente de Partição, 74
 - 4.6.1. Partição em sistema clorofórmio/água, 74
 - 4.6.2. Partição em sistema membrana/água, 75

5. Resultados, 77

- 5.1. Solubilização e estabilidade da melatonina em meio aquoso, 77
 - 5.1.1. Experimento biológico com a melatonina solubilizada em água, 81
- 5.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica, 82
 - 5.2.1. Lipossomos de DMPG com SSL, 82
 - 5.2.2. Lipossomos de DMPC com SSL, 89
 - 5.2.3. Lipossomos de DMPG com 5-SASL, 95
 - 5.2.4. Lipossomos de DMPC com 5-SASL, 99
 - 5.2.5. Lipossomos de DMPG com 6-DPPC, 103
 - 5.2.6. Lipossomos de DMPC com 6-DPPC, 106
 - 5.2.7. Outros lipossomos e marcadores de spin, 109
- 5.3. Fluorescência de melatonina com vesículas, 110

5.4. Determinação do Coeficiente de Partição (P),	114
5.4.1. Partição da melatonina em sistema clorofórmio/água,	115
5.4.2. Partição da melatonina em sistema membrana/solução aquosa por RPE,	116
5.4.3. Partição da melatonina em sistema membrana/solução aquosa por fluorescência,	118
6. Discussão,	120
6.1. Solubilização da melatonina em meio aquoso,	120
6.2. Interação da melatonina com membranas lipídicas,	122
6.2.1. Comparação entre estruturas de membranas de DMPG e DMPC.,	123
6.2.2. Marcador SSL incorporado em lipossomos de DMPG e DMPC,	131
6.2.3. Marcadores 5-SASL e 6-DPPC incorporado a lipossomos de DMPC,	135
6.4. Partição da melatonina com membranas lipídicas,	137
7. Conclusões,	145
8. Referências Bibliográficas,	147

1. Introdução

Com o atual progresso das técnicas espectroscópicas, a discussão sobre a importância da membrana lipídica na interação hormônios com a célula tornou-se um tema bastante atual. Este avanço técnico têm possibilitado ampliar a visão a nível molecular de estruturas complexas e biologicamente importantes, como a membrana, as proteínas, o DNA, etc.

Dentro deste contexto, o presente trabalho procura estudar a interação do hormônio melatonina com membranas modelo de fosfolipídios, através da utilização das técnicas espectroscópicas descritas no capítulo Métodos.

Nesta introdução são apresentadas a melatonina, de um ponto de vista mais biológico, e um panorama geral sobre as membranas lipídicas, que são objetos de estudos deste trabalho.

1.1. A Melatonina

1.1.1. A ação hormonal

A melatonina é um importante hormônio, que expressa o seu efeito através da ação hormonal, que é, em suma, o mecanismo que vai integrar e coordenar as diversas funções de organismos multicelulares.

Em organismos multicelulares, para a coordenação de todas as várias funções, deve haver mecanismos onde células individuais ou grupos de células possam comunicar-se. Em organismos superiores existem 2 mecanismos de comunicação entre as células (Lehninger, 1984; Snyder, 1985; Stryer, 1988): o sistema hormonal e o sistema nervoso. Ambos os sistemas atuam por meio de mensageiros químicos.

No sistema nervoso o nível de comunicação é direto. O neurônio comunica-se diretamente com a célula-alvo através de sítios específicos chamados sinapses. Nesses sítios a comunicação é realizada por meio dos neurotransmissores. A comunicação neuronal ocorre em tempos da ordem de poucos milissegundos e só atinge células as quais o sistema nervoso está ligado (Snyder, 1985; Stryer, 1988; Lehninger, 1984).

A ação hormonal é menos direta (Snyder, 1985), sendo realizada através de mensageiros químicos chamados hormônios. A comunicação hormonal pode ser classificada em: autócrino (onde o hormônio atua na própria célula secretora), paracrino (onde o hormônio atua em células adjacentes à secretora), e endócrino, que é a forma de comunicação hormonal mais comum, onde o hormônio pode atuar em outras células ou órgãos do organismo. São as chamadas glândulas endócrinas que sintetizam e secretam os hormônios na corrente sanguínea, onde são levados até a célula alvo. A comunicação hormonal ocorre em tempos que vão da ordem de segundo a horas, e pode afetar desde algumas células ou órgão, até o organismo inteiro (Snyder, 1985 ; Stryer, 1988; Lehninger, 1984).

Os hormônios são sintetizados e secretados sempre em resposta a um estímulo (Figs. 1.1.a e 1.1.b).

As principais glândulas do sistema endócrino em humanos são: a hipófise, o hipotálamo, a pineal, o timo, a tireóide, a paratireóide, a adrenal, o pâncreas, o ovário e os testículos (Stryer, 1988 ; Lehninger, 1984; Snyder, 1985).

Os hormônios podem ser classificados em 4 tipos (Stryer, 1988; Lehninger, 1984): **a)** pequenas moléculas derivadas de amino-ácidos (por ex.: a adrenalina, derivada da tirosina e a melatonina, derivada do triptofano); **b)** polipeptídeos ou proteínas (por ex.: a insulina e o α -MSH); **c)** esteróides, que são moléculas derivadas do colesterol (por ex.: o cortisol); e **d)** eicosanóides, que são moléculas derivados do araquidonato (por ex.: a prostaglandina).

Figura 1.1. (a) Estímulos reponsáveis pela secreção de hormônios: impulso nervoso (através de um neurônio), algum determinado hormônio, e presença de um determinado íon ou nutriente orgânico; (b) autômata do mecanismo de feedback da insulina: a alta concentração de Glicose no plasma age como um estímulo direto ao pâncreas, que secreta a insulina que atua nas células-alvo fazendo que estas absorvam a glicose do plasma, e por fim a diminuição de glicose atuará como um inibidor da secreção da insulina (cf. Vander e col., 1985).

Quanto a forma de ação, os hormônios podem ser classificados em: hormônios que atuam a nível da membrana celular, onde em geral, há receptores específicos (Lehninger, 1984; Berridge, 1985; Stryer, 1988); e hormônios que atravessam a membrana celular e interagem com receptores intracelulares, e atuam a nível do DNA (Stryer, 1988; Lehninger, 1984; Berridge, 1985).

A ação hormonal apresenta algumas propriedades fisiológicas, onde destacam-se: **a)** os hormônios são produzidas em pequenas quantidades (da ordem de 10^{-8}M no plasma sanguíneo); **b)** em organismos normais, a taxa de secreção é determinada somente pela necessidade do hormônio; **c)** em geral, o hormônio não tem efeito direto sobre o órgão que o produz; **d)** pode exercer efeito sobre todas as células do organismo ou atuar apenas em células-alvo específicas; **e)** o efeito é

determinado pela capacidade de resposta da célula-alvo e pela quantidade de hormônio presente; **f)** os hormônios agem como substâncias desencadeadoras de reações bioquímicas; e **g)** embora os hormônios sejam específicos, eles podem ter vários efeitos numa mesma célula.

A ação hormomal é de suma importância, pois é ela quem faz a integração dos diversos órgãos e funções. Sendo de vital importância para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da vida de organismos superiores.

1.1.2. A Glândula Pineal

A pineal é uma glândula neuro-endócrina onde a melatonina é sintetizada. Este hormônio é o seu principal produto de secreção e o que tem sido objeto de maior quantidade de estudos.

Figura 1.2: Localização da glândula pineal em humanos (Tamarkin e col, 1975). A linha tracejada mostra conexão via sistema nervoso central entre a retina do olho e a glândula pineal, passando pela coluna espinhal.

A glândula pineal é um órgão em forma de cone no ser humano, localizando-se abaixo do corpo caloso e acima do cérebro médio (Hadley, 1988) (Fig. 1.2). Pesa em média 170 a 175 mg em humanos adultos.

A glândula pineal é conhecida desde o século III d.C. (Tamarkin e col., 1975), quando Hierofilos afirma que ela poderia servir como um esfíncter que regularia o pensamento no sistema ventricular do cérebro; Galeno, 450 anos depois (entre os séculos VII e VIII d.C.) descreve a pineal como um tecido diferente, em estrutura, dos ventrículos do cérebro e possivelmente tendo uma função específica (Tamarkin e col., 1975); no século XVII, René Descartes revive o antigo conceito de Hierofilos da pineal como o "lugar da alma" (Tamarkin e col., 1975) e esta visão vai dominar o pensamento científico pelos 250 anos seguintes; em 1880, Ahlborn, de Graaf e outros (Tamarkin e col., 1975) fazem uma descrição mais acurada da pineal e notam uma similaridade com o "terceiro olho", um órgão epifiseal fotosensor, de invertebrados inferiores; por volta de 1890, estudos de extirpação e administração de extratos glandulares começaram a ser realizados para estudar sua função biológica, entretanto, os estudos que trazem avanços significativos são: o relato de Hubner de um caso de puberdade precoce em um garoto pinealoma (câncer na pineal), e o aparecimento da teoria de Marburg de que a puberdade é regulada pela pineal (Tamarkin e col., 1975); em 1943, Bergmann propõe que a função endócrina da pineal é regulada pela luz, via sistema nervoso central (Tamarkin e col., 1975) Fig. 1.2). Este conceito foi mais tarde verificado, ou seja, a pineal recebe informações do meio externo (retina) através do cérebro e retransmite essa informação para o organismo através de suas secreções (O'Brien e Klein, 1986 ; Hastings e col., 1989).

Atualmente existem uma grande quantidade de trabalhos sobre a pineal, como por exemplo o trabalho de revisão editado por O'Brien e Klein (1986) e o periódico *Journal of Pineal Research* (editado pela Munksgaard Int. Publ. Ltd., Londres), que mostram a importância de pesquisas com essa glândula e suas secreções.

1.1.3. O hormônio melatonina

A melatonina (N-acetil 5-metoxi-triptamina, Fig. 1.3) é um hormônio que faz parte da família das indolaminas (Heward e Hadley, 1975), que são compostos que ocorrem com frequência na natureza.

Figura 1.3. A melatonina (N-acetil 5-metoxi-triptamina).

A biossíntese da melatonina na glândula pineal (Fig. 1.4) inicia-se a partir do triptofano, que é capturado da corrente sanguínea. Este triptofano, através da enzima triptofano hidroxilase, é hidroxilado na posição do carbono 5, originando o 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Depois a enzima aminoácido-descarboxilase remove a cadeia lateral do grupo carboxil para dar o 5-hidroxitriptamina, mais conhecido como serotonina. A seguir, a serotonina é acetilada pela N-acetiltransferase (NAT), originando a N-acetil-serotonina (5-hidroxi-N-acetiltryptamina). E finalmente, a enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT) metila o hidróxido da posição 5 e completa-se a síntese da melatonina (Sugden, 1989). A biossíntese da melatonina é controlada modulando-se a atividade das enzimas NAT e HIOMT. A melatonina só é sintetizada e secretada em resposta à norepinefrina (NE), liberada por neurônios pós-ganglionares do gânglio cervical superior (SCG) na ausência de estímulo luminoso na retina (Moore, 1978), que indiretamente aumenta a atividade das enzimas NAT e HIOMT.

Figura 1.4. Síntese da melatonina na glândula pineal (Sugden, 1989). A nomenclatura da numeração do triptofano mostrada é conforme Morgan e Williams (1989).

1.1.4. Função biológica da melatonina

Em animais, existem principalmente dois mecanismos de mudança de cor. O primeiro é a adaptação ao fundo, que ocorre em vertebrados inferiores e é uma mudança rápida, que leva horas ou dias (dependendo do animal). Este tipo de mudança de cor auxilia a mimetizar a cor da pele ao ambiente e, com isto, aumentar as chances de sobrevivência do animal. Tal mudança de cor está associada aos hormônios MSH (hormônio estimulante de melanócitos) e MCH (hormônio concentrador de melanócito). A melatonina, quando utilizada junto com estes hormônios, pode aumentar ou diminuir a potência destes (Heward e Hadley, 1975).

O segundo tipo de mudança de cor é a adaptação rítmica, que está ligada a um aumento na secreção de melatonina pela glândula pineal, o chamado ciclo circadiano. Animais submetidos à ausência de luz apresentam uma maior secreção de melatonina (Hastings e col., 1989; Reiter, 1992), o que provoca um empalidecimento da pele. Assim, no inverno, quando ocorrem dias mais curtos, há empalidecimento da pele ou penugem. Em alguns animais que hibernam no inverno, como certas espécies de hamster, o fotoperíodo mais curto provoca atrofia gonadal e dos órgãos acessórios (Tamarkin e col., 1985; Bartness e Goldman, 1989). Animais em laboratório apresentam um nível muito maior de melatonina no plasma sanguíneo e no fluido cérebro-espinhal quando submetidos a períodos de escuridão (Tamarkin e col., 1985; Hastings e col., 1989). Em ensaios com melatonina marcada radioativamente em plasma sanguíneo de rato e humano, encontra-se sempre a melatonina associada à albumina do soro sanguíneo (Cardinali e col., 1972), sendo por isso considerada o sua carregadora no plasma.

A pinealectomia em animais no laboratório previne a regressão gonadal e a injeção de melatonina em hamster previne o escurecimento do animal (Tamarkin

e col., 1985). A melatonina está ligada, ainda, por mecanismos desconhecidos, com a chegada da puberdade e na alteração do crescimento de muitas espécies de mamíferos (Ebling e Foster, 1989).

Outros estudos em laboratórios com a melatonina mostram que ela tem uma atividade anticonvulsiva tempo-dependente em hamsters (Golombeck e col, 1992); tem sido relatada estar envolvida na modulação da emotividade (Durlach-Misteli e Ree, 1992), e tem implicações na ação de drogas anti-depressivas (Durlach-Misteli e Ree, 1992); estudos mostram ainda que a melatonina está relacionada com o processo de envelhecimento biológico (Reitel, 1992) e que pode retardar o desenvolvimento de processos como imunodeficiência e crescimento de tumores (Reitel, 1992).

1.2. Membranas

1.2.1. Membranas biológicas

As membranas biológicas são sistemas altamente organizados e essenciais para a vida. Definem um limite de separação entre dois meios, mantendo a integridade da célula ou organela da mesma. A membrana biológica é o elemento mediador da comunicação entre a célula e seu meio externo e constitui uma barreira altamente seletiva, que possibilita a criação de uma compartimentação intracelular com uma composição química própria, diferente do meio.

O modelo de membrana biológica mais aceito é o do "mosaico fluido" proposto por Singer e Nicolson (1972). Segundo este modelo, os lipídios, em sua maior parte, estão organizados em bicamadas, formando uma matriz fluida (Fig. 1.5). Nesta matriz é onde se fixam as proteínas de membranas. As proteínas de membranas podem ser integrais, quando estão total ou parcialmente imersas na

matriz lipídica, devido às interações hidrofóbicas com os lipídios (Tanford, 1980); ou periféricas, quando se localizam na superfície da bicamada, ligadas principalmente por interações eletrostáticas com as cabeças polares dos fosfolipídios.

Este modelo de membrana biológica, entretanto, com o progresso das técnicas espectroscópicas utilizadas no estudo das bicamadas lipídicas, tem sofrido modificações para ajustá-lo aos dados experimentais (Mouritzen e Jørgensen, 1992).

Figura 1.5: Representação esquemática do modelo do "mosaico fluido", segundo Singer e Nicolson (1972).

1.2.2. Lipídios de membranas biológicas

Os lipídios são, por definição, uma classe de compostos orgânicos de origem biológica com estruturas bastante variadas, caracterizada pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (Tanford, 1980; Lehninger, 1986; Marzzoco e Torres, 1990). Geralmente apresentam em sua molécula pelo menos um grupo álcool e um ácido graxo esterificado. Nesta definição estão também incluídos os esteróides e os terpenóides. Uma breve descrição dos principais categorias de lipídios é feita a seguir.

Ácidos graxos	Nº. de Carbonos	
Saturados		
Mirístico	14	
Palmítico	16	
Estearico	18	
Araquídico	20	
Lignoleico	24	
Insaturados		Insaturações*
Palmitoleico	16	Δ^9
Oleico	18	Δ^9
Linoleico	18	$\Delta^{9,12}$
α -Linolênico	18	$\Delta^{9,12,15}$
γ -Linolênico	18	$\Delta^{6,9,12}$
Araquidônico	20	$\Delta^{5,8,11,14}$

Tabela 1.1. Ácidos graxos saturados e insaturados naturais.

*Por exemplo: a insaturação $\Delta^{9,12}$ significa: uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10, e outra dupla entre os carbonos 12 e 13.

Os **ácido graxos** são ácidos carboxílicos de uma única e longa cadeia hidrocarbônica (Fig. 1.6), geralmente com um número par de átomos de carbono (entre 14 e 24). Esta cadeia pode ser saturada (somente com ligações simples entre os átomos de carbono) ou insaturada (com uma ou mais duplas ligações ao longo da cadeia). Os ácidos graxos livres são pouco encontrados nos organismos vivos.

Eles são encontrados sempre esterificados com um álcool, o glicerol, constituindo os glicerolipídios; ou com um outro álcool, a esfingosina, constituindo os esfingolipídios. Os ácidos graxos mais comuns estão mostrados na Tab. 1.1.

Figura 1.6. Exemplos de ácidos graxos em sua forma ionizada (Stryer, 1988). (a) Ácido Palmítico (saturado), (b) Ácido Oleico com insaturação Δ^9 , e (c) representação pictórica de um ácido graxo ou detergente.

Os ácidos graxos esterificados ao glicerol são chamados de acilglicerídeos. Quando o glicerol tem um ácido graxo esterificado é chamado de monoacilglicerol, quando tem dois de diacilglicerol e três de *triacilglicerol* (Fig. 1.7), sendo dois últimos os mais abundantes na natureza.

Figura 1.7. Estrutura química da (a) molécula de glicerol e da (b) molécula de triacilglicerol.

Os *fosfolipídios* são lipídios que contêm um grupo fosfato esterificado com um álcool em sua composição química, além do éster do ácido graxo e glicerol

ou esfingosina. Os fosfoglicerolípídios são derivados do glicerol e os fosfoesfingolípídios são derivados da esfingosina (Lehninger, 1985; Stryer, 1988; Marzzoco e Torres, 1990). Os *fosfoglicerolípídios* (Fig. 1.8) têm como os grupos álcoois mais comuns a serina, a etanolamina, a colina (Fig. 3.1.b), o glicerol (Fig. 3.1.a) e o inositol.

Figura 1.8. Várias representações de um fosfoglicerolípido: (a) estrutura química do DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina); (b) componentes; e (c) representação estilizada.

Os *fosfoesfingolípídios* não contém o glicerol em sua estrutura básica, em seu lugar está um aminoálcool alifático, a esfingosina (Fig. 1.9.a). O representante mais comum em membranas deste tipo de lipídio é a esfingomielina (Fig. 1.9.b).

Figura 1.9. O precursor dos fosfoesfingolipídios a **(a)** esfingosina e **(b)** o fosfoesfingolipídio esfingomielina.

Os **glicolipídios**, como o próprio nome diz, são lipídios que contêm glicídios (açúcares) em sua estrutura. Esta glicose localiza-se na região polar do lipídio. Em células de animais, os glicolipídios são derivados da esfingosina. O glicolipídio mais simples é o cerebrosídeo (Fig. 1.10), no qual há somente um resíduo de açúcar. Existem glicolipídios mais complexos, como os gangliosídeos, que contêm uma cadeia grande de açúcares, às vezes ramificada.

Figura 1.10. Um glicolipídio: o cerebrosídeo.

O composto mais importante do grupo dos **esteróides** é o colesterol (Fig. 1.11), não apenas por ser o mais abundante nas células animais mas, porque serve de precursor à síntese de uma série de derivados biologicamente importantes, como os sais biliares, os hormônios esteroídicos e a vitamina D (Lehninger, 1985; Stryer, 1988; Marzzoco e Torres, 1990). Em mamíferos, o colesterol é o principal esteróide presente nas membranas celulares.

Figura 1.11. A molécula do colesterol, um esteróide.

Os **terpenóides** são compostos que apresentam uma estrutura composta por múltiplos de unidades de 5 carbonos, semelhantes ao isopreno (fig. 1.12). Exemplos desta classe de lipídios são as vitaminas A, E e K, os carotenóides e a borracha.

Figura 1.12. A molécula do isopreno, um terpenóide.

1.2.3. Lipídios que formam a bicamada

Os fosfolipídios e os glicolipídios (Figs. 1.3, 1.8, 1.9 e 1.10) são os lipídios anfifílicos que podem formar estruturas de bicamada. O colesterol é um lipídio muito importante nas membranas das células de animais, entretanto, ele sozinho não forma estruturas de bicamada, mas insere-se na bicamada alterando as suas propriedades. As bicamadas de fosfolipídios e os glicolipídios em água formam estruturas macroscópicas de diversas formas (Figs. 1.13 b, c, d, e, f), que será mostrado na Sec. 1.2.4.

1.2.4. Sistemas modelo de membranas

Sistemas modelo de membranas podem ser formados por lipídios sintéticos ou extraídos de membranas biológicas. Com esses lipídios é possível obter-se membrana de somente um tipo de lipídios ou com uma composição bem

definida. Essas membranas artificiais são um modelo simplificado de membrana biológica.

Dependendo da componente e do método utilizado na preparação podemos ter os seguintes sistemas modelo de membranas:

-**micelas**: constituem o sistema modelo mais simples, sendo estruturas formadas por ácidos graxos ou detergentes em baixas concentrações, em solução aquosa ou em solventes polares (micelas reversas). Caracterizam-se por não possuírem compartimento interno. Podem ter a forma esférica (Fig. 1.13.a), globular ou cilíndrica, dependendo do tipo de lipídio, pH, concentração e temperatura (Tanford, 1980; Cevc e Marsh, 1987).

-**lipossomos**: são estruturas formadas por fosfolipídios multi-lamelares concêntricas compostas por bicamadas lipídicas separadas por camadas de água, Fig. 1.13.c, cujo diâmetro podem variar de 0,5 a 50 μm (Sessa e Weismann, 1968; Lasic, 1992). Estes lipossomos são também conhecidos como MLVs (multilamellar vesicle) (Lasic, 1992).

-**vesículas unilamelares**: são estruturas formadas por fosfolipídios constituídas de uma única bicamada esférica (Stryer, 1988, Lasic, 1992) (Fig. 1.13.b). Essas vesículas constituem um sistema modelo que apresenta algumas vantagens em relação aos lipossomos como, por exemplo, maior homogeneidade no tamanho e no volume interno. Existe na literatura vários métodos de preparação de vesículas unilamelares (Stryer, 1988; Lasic, 1992), sendo que todos os métodos dão muita atenção ao tamanho final da vesícula. As vesículas pequenas, de diâmetro em torno de centésimos de micrômetros são chamadas de SUVs (small

unilamellar vesicle) e as grandes, com diâmetros até 100 μm , de LUVs (large unilamellar vesicle) (Lasic, 1992).

-**monocamada em interface ar-água**: são estruturas formadas na interface que separa dois meios de polaridade diferentes. As monocamadas mais utilizadas são as em interface ar-água, (Fig. 1.13.d), obtidas através da chamada balança de Langmuir (Blodgett e Langmuir, 1937).

-**unibicamada plana ou filme negro**: esta estrutura é formada em um orifício de aproximadamente 1 mm de uma parede que separa dois compartimentos aquosos (Fig. 1.13.e). Tal membrana é bastante apropriada para fazer estudos de condutividade elétrica devido ao seu grande tamanho e sua geometria simples. Mueller e Rudin (1962) foram quem pela primeira vez descreveram esta técnica de preparação. O filme negro têm este nome porque, nas primeiras preparações, eram obtidas passando-se um pincel embebido com lipídios no orifício, e o filme formado apresentava uma coloração escura.

-**multibicamada plana**: são estruturas obtidas pela evaporação lenta de solvente orgânico com lipídios numa superfície plana, que em seguida têm o resíduo de solvente retirado no vácuo e o filme formado é reidratado (Blodgett, 1935; Blodgett e Langmuir, 1937), Fig. 1.13.f.

Figura 1.13. Representação esquemática de alguns tipos de sistemas modelo de membranas. (a) micela; (b) vesícula; (c) lipossomo; (d) filme de monocamada; (e) unibicamada (filme negro); e (f) multibicamada orientada.

1.2.5. Movimentos dos componentes de membrana

As membranas biológicas são estruturas dinâmicas, não apenas uma matriz na qual se fixam as proteínas, onde os seus componentes estão em constante movimento. Suas componentes descrevem os movimentos: translacional, transversal, rotacional e segmental (Fig. 1.14).

O movimento translacional (Fig. 1.14.a), também conhecido como difusão lateral, é um processo rápido. Foi determinado por Devaux e McConnell (1972), por RPE, como sendo aproximadamente $1,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para fosfatidilcolina, a 25°C , e ocorre em todas as direções do plano da bicamada. O coeficiente de difusão lateral aumenta com a temperatura, especialmente acima da T_f e decresce com a incorporação de colesterol (Rubenstein e col., 1979)

O movimento transversal (Fig. 1.14.b), também conhecido como "*flip-flop*", é um processo lento em membranas modelo e consiste no movimento de componentes de uma monocamada para a outra. É um processo que requer uma alta energia de ativação, pois a cabeça polar do fosfolípido deve atravessar a região apolar interna da bicamada. Em vesículas de lecitina de ovo a probabilidade de um lipídio fazer o "*flip-flop*" foi estimado em 0,07 lipídios/hora (Seigneuret e Devaux, 1984). Em membranas biológicas foi mostrado que este processo é ATP-dependente (Seigneuret e Devaux, 1984).

O movimento rotacional (Fig. 1.14.d), que é relativo ao eixo molecular mais longo do lipídio, é um processo rápido (Finean e col., 1984) e é observado quando a membrana se encontra no estado *líquido cristalino*, que será melhor caracterizado mais adiante. Para proteínas também é observado este tipo de movimento. O coeficiente de rotação difusional pode ser determinado através de técnicas de RMN (Jain e Wagner, 1980), fluorescência (Shinitzky e Barenholtz,

1978) e RPE utilizando o método do marcador de spin (Schindler e Seelig, 1974; Polnaszek e Freed, 1975; Polnaszek e col., 1978).

Figura 1.14. Movimentos que um lipídio pode fazer numa bicamada: (a) translacional (difusão lateral); (b) transversal ("flip-flop"); (c) segmental (movimento das cadeias de hidrocarbonetos); (d) rotacional relativa ao eixo molecular mais longo do lipídio.

O movimento segmental (Fig. 1.14.c) é caracterizado pelas mudanças de conformações que as cadeias de ácidos graxos, que estão ligadas ao esqueleto de glicerol, podem assumir (Finean e col., 1984). A Fig. 1.15 mostra as possíveis conformações que uma cadeia de hidrocarbonetos pode assumir. Em temperaturas baixas, as ligações simples carbono-carbono (C-C) das cadeias apresentam a conformação *trans* (figura 1.15.a), que tem pouca mobilidade e acarreta um alto grau de empacotamento da bicamada. Isto ocorre na chamada fase *gel*. Em temperaturas mais altas, as ligações C-C podem facilmente adquirir outras conformações menos favoráveis energeticamente. Nesta fase, denominada *líquido cristalina*, aumenta a probabilidade das ligações encontrarem-se na conformação *gauche*, Fig. 1.15.b, que impede o empacotamento da bicamada. Uma conformação

que pode ocorrer é a "*kink*", que é uma combinação "*trans-gauche-trans*", que permite uma melhor acomodação da bicamada e um desordenamento menor da bicamada.

Figura 1.15. Representação esquemáticas das possíveis conformações que uma cadeia de ácido graxo pode assumir: **(a)** conformação toda "*trans*"; **(b)** conformação introduzindo uma *gauche* em (a); **(c)** "*kink*", conformação da combinação "*trans-gauche-trans*".

1.2.6. Transição de fase em membranas lipídica

A transição entre as fases gel $\Leftrightarrow$ líquido cristalino é um processo endotérmico e ocorre numa temperatura denominada temperatura de transição de fase (T_f). Em sistemas modelo de membranas pode-se determinar experimentalmente a T_f por técnicas calorimétricas, dilatométricas e espectrocópicas (Cevc e Marsh, 1987). A natureza das cabeças polares, o comprimento das cadeias hidrofóbicas e o grau de insaturação das cadeias são fatores determinantes para a T_f . A Tab. 1.2 mostra as T_f de fosfolípidios mais utilizados em sistemas modelo.

Fosfolipídio*	Nº. e tamanho de cadeia acil	Insaturações**	T _f (°C)
DMPC	2 C ₁₄	-	24,0
DMPG	2 C ₁₄	-	23,0
DMPE	2 C ₁₄	-	51,0
DMPS	2 C ₁₄	-	31,0
DPPC	2 C ₁₆	-	41,4
DPPG	2 C ₁₆	-	41,0
DPPE	2 C ₁₆	-	63,0
DSPC	2 C ₁₈	-	54,3
DAPC	2 C ₂₀	-	64,1
DOPC	2 C ₁₈	Δ^9	-22,0
DOPE	2 C ₁₈	Δ^9	15,0
DOPA	2 C ₁₈	Δ^9	8,0

Tabela 1.2. Temperatura de transição de fase de alguns fosfolipídios mais utilizados em sistemas de membranas modelo (Cevc e Marsh, 1987; Gennis, 1989). ** Insaturações ver Tab.1.1. * Abreviações: 1a. letra: D-di; 2a. letra: M-miristoil, P-palmitoil, S-esteroil, A-aracdoil, O-oleil (ver Tab. 1.1); 3a. e 4a. letras: PC-fosfatidil colina, PG-fosfatidil glicerol, PE-fosfatil etanolamina, PS-fosfatidil serina, PC-fosfatidil colina, PA-ácido fosfatídico.

2. Objetivos

As informações que as diversas técnicas físicas, utilizadas na exploração de membranas lipídicas, fornecem atualmente uma visão molecular dessas estruturas complexas e fundamentais à vida. A importância do seu estudo, atualmente, é inquestionável.

Um tema bastante atual, que é um caso particular do estudo mais geral da interação lipídio-proteína, é a interação de hormônios com membranas lipídicas. Foi mostrado que a fase lipídica pode ser importante em pelo menos dois aspectos: i) facilitar a interação hormônio-receptor, por meio da interação eletrostática entre hormônios carregados e lipídios com cabeças polares carregadas, ou através de interações hidrofóbicas (Biaggi, 1992; Ito e col., 1993), e ii) modificar a estrutura do hormônio, favorecendo a sua interação com o receptor (Schwyzer, 1986; Sargent e Schwyzer, 1986; Berchiasschvili e Seelig, 1990).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a interação do hormônio melatonina com membranas lipídicas, através do uso das técnicas espectroscópicas de RPE (ressonância paramagnética eletrônica) e fluorescência estática.

Biologicamente a melatonina tem um efeito não específico, ou seja, interage com diversos tipos de células, principalmente com as nervosas, neuro-endócrinas, pigmentares do tegumento e da retina (prof. Dra. Ana Castrucci, comunicação oral; Reiter, 1992), sugerindo que não existe um tecido ou célula-alvo específica, na qual a molécula exerce sua ação hormonal. Assim, é possível que a melatonina não interaja através de um receptor proteico específico de membrana e possa interagir com a célula via a fase lipídica membranar.

Por outro lado, a melatonina é uma molécula que não tem em sua estrutura nenhum grupo químico altamente polar ou carregado, qualquer que seja o valor de pH do meio. Por isto, acredita-se que a melatonina possa interagir com

membranas lipídicas, já que estas têm uma região com grande caráter hidrofóbico (cadeias de hidrocarbonetos). Tal interação com membranas deve provocar alterações na fase lipídica, que podem ser estudadas com a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), utilizando-se o método de marcador de spin.

O estudo foi realizado com membranas de diferentes tipos de fosfolipídios, de diferentes cargas na cabeça polar, portanto com diferentes graus de fluidez. As membranas, por sua vez, foram estudadas através do sinal de RPE de vários tipos de marcadores de spin a ela incorporadas, monitorando diferentes regiões da bicamada lipídica.

Por fim, a melatonina, por ser derivada do triptofano, é uma molécula fluorescente e têm as características óticas bastante semelhantes as deste amino-ácido. Isto permitiu a realização de experimentos de fluorescência estática para estudar a interação da melatonina com vesículas unilamelares de DMPG e DMPC. Essa técnica é bastante utilizada no estudos da interação de peptídeos que contêm triptofano com membranas lipídicas (McKnight e col., 1991; Chattopadhyay e London, 1987; Ito e col., 1993).

3. Materiais

3.1. Substâncias empregadas

A melatonina (Fig. 1.3) utilizada em nossos experimentos, cedida pela Dra. Ana Maria Castrucci do IBUSP, foi obtida da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (P6414, lote 98F8374, PM=232,27).

Os fosfolipídios utilizados, dimiristoil fosfatidil colina (DMPC; PM=678) e dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG; PM=683), foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Fig. 3.1.a e 3.1.b.)

Fosfatidil colina (PC) de ovo foi cedida pela prof. Dra. Shirley Schreier do IQUSP, purificada pelo Sr. W.R. Toselli, IQUSP. A composição dos ácidos graxos, tanto no comprimento da cadeia quanto no grau de saturação, é variada (Mason e Huang, 1978).

Os marcadores de spin utilizados foram (Figura 3.2): 5-SASL (5-doxil ácido esteárico), SSL (4-estereamina-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil piperidina), 6-DPPC (1-palmitoil-2-(6-doxilesteroil)-fosfatidil colina). O marcador 5-SASL foi obtida da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; o marcador SSL foi cedido pela Dra. Shirley Schreier do IQUSP. O marcador 6-DPPC foi cedido pelo Dr. Antony Watts da Universidade de Oxford.

Figura 3.1. Fosfolipídios utilizados. (a) DMPG e (b) DMPC.

Figura 3.2. Marcadores de spin utilizados: (a) SSL, (b) 5-SASL, (c) 12-SASL, e (d) 6-DPPC.

3.2. Equipamentos Utilizados

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes equipamentos:

- medidas de RPE foram feitas no espectrômetro ER-200 SRC da BRUKER, do departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, interfaceado com um microcomputador PC Novadata modelo ND 4000 AT.
- medias de RPE foram obtidas utilizando-se celas de quartzo para solução aquosa com volume de 80 µl, de James Scanlon, Costa Mesa, CA, EUA..
- vesículas unilamelares foram obtidos utilizando "extrusor" de vesículas especialmente construída no IFUSP.
- medidas de Fluorescência foram feitas no espectrofotômetro de fluorescência HITACHI F-3010 do laboratório de Biofísica do IFUSP com banho térmico instalado.
- as medidas de Absorção óptica foram obtidas no espectrofotômetro Aminco SW-100 no IQUSP; e no Zeiss do Laboratório de Dosimetria do IFUSP.

4. Métodos

4.1. Preparação de Amostras

4.1.1. Lipossomos para RPE

Lipossomos contendo fosfolipídios, marcadores de spin e melatonina, foram obtidos utilizando-se o método clássico de preparação (Bianconi, 1990; Biaggi, 1992; Lasic, 1992), descrito a seguir.

A partir de soluções estoque, em clorofórmio, de fosfolipídios, marcadores de spin e melatonina toma-se alíquotas num tubo de vidro, de tal modo que a concentração final na cela de RPE seja 10^{-2}M de fosfolipídio, 10^{-4}M de marcador de spin (1% da concentração final de lipídios) e a melatonina variando de zero para a amostra de referência (sem o hormônio), 2mM (20% do número de moles de fosfolipídios) e 5mM (50% do número de moles de fosfolipídios). Essas amostras foram sempre denominadas de: **0% (sem melatonina)**, **20% de melatonina** e **50% de melatonina**, respectivamente. Em seguida, seca-se o clorofórmio desta mistura com nitrogênio gasoso, formando um filme homogêneo nas paredes do tubo. O filme é então colocado em vácuo (10^{-3} Torr) por pelo menos 2 horas, para a evaporação do clorofórmio remanescente. Para obtenção dos lipossomos adiciona-se tampão ao filme e a suspensão é agitada no vórtex por 5 a 10 minutos, numa temperatura acima da T_f do fosfolipídio utilizado.

Quando não especificado, o tampão utilizado foi o HEPES [ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazimil)etanosulfônico] 10mM, pH 7,4.

4.1.2. Vesículas para Fluorescência

As vesículas unilamelares pequenas, utilizadas nos experimentos de fluorescência, foram preparadas pelo método de filtração sob pressão (Mcknight e col, 1991; Batzi e Korn, 1973; Ito e col., 1993), também conhecido como método de "extrusão".

O método consiste em filtrar uma suspensão de lipossomos contendo somente fosfolipídios (preparados conforme sec. 4.1.1.), com concentração aproximada de 4mg/ml, sob pressão de 30 psi a 30°C (a temperatura deve ser acima da temperatura de transição de fase do fosfolipídio), sequencialmente em um filtro com poro de 0,2µm, dois de 0,2µm, um de 0,1µm e dois de 0,1µm.

O espectro de absorção ótica (Fig. 4.1) mostra que o espalhamento devido a vesículas filtradas sob pressão é relativamente pequeno, mesmo para concentrações como 0,5mM , em $\lambda=280\text{nm}$.

Figura 4.1. Espectros de absorção ótica de de vesículas unilamelares obtidas por filtração sob pressão. Espectros com concentrações de 0.1mM e 0.5mM de DMPC. Caminho ótico 1cm.

Micrografia eletrônica de amostras obtidas por esta técnica mostrou que as vesículas são unilamelares, e que o seu tamanho corresponde, aproximadamente, ao tamanho do menor poro dos filtros utilizados.

Após a filtragem, dosa-se a quantidade de fosfato da amostra (Sec. 4.2), a fim de determinar-se a concentração final exata de fosfolipídio da amostra.

4.2. Dosagem de fosfato

Os fosfolipídios contêm um grupo fosfato em sua estrutura (Fig. 3.1) permitindo, através da dosagem deste, a determinação da concentração de fosfolipídios da amostra. O método utilizado basea-se em Chem Junior e col. (1956) e Bianconi (1990).

A cada dosagem é feita uma curva padrão (10 a 90 nmoles de fosfato) a partir de uma solução 1mM de fosfato de sódio ou potássio, da qual pipeta-se alíquotas de 10, 30, 50, 70 e 90 μ l. Das amostras a serem dosadas, tomam-se alíquotas tais que contenham de 10 a 90 nmoles de fosfato.

Componentes do Reagente I		Conc. final (M)
1	Molibdato de amônio ($\text{Mo}(\text{NH}_4)_2$)	$2,78 \times 10^{-2}$
2	Ácido sulfúrico concentrado	0,43
3	Ácido ascórbico	$8,2 \times 10^{-2}$

Tabela 4.1. Componentes do reagente adicionado à amostra após digestão com ácido perclórico. O reagente é preparado adicionando-se os três componentes, preparados separadamente, na ordem crescente.

Após a secagem das amostras na estufa, adiciona-se 50µl de ácido perclórico (HClO₄) às amostras, que são deixadas por 1 hora, no mínimo, em um bloco de aquecimento (180°C). Às amostras secas, acrescenta-se 900µl do Reagente I, preparado conforme Tab. 4.1. Em seguida elas são colocadas num banho térmico por 20 minutos a 45°C. Após a reação, mede-se a absorbância ótica do fosfato em $\lambda=795\text{nm}$.

Comparando-se as absorbâncias das amostras com as da curva padrão, determina-se a concentração de fosfato na amostra.

4.3. Solubilização da Melatonina em solução aquosa. Novo método

A melatonina em sua forma cristalizada, como é fornecida pelo fabricante (Sigma Co.), é insolúvel em meio aquoso. Normalmente, ela é primeiro solubilizada em etanol (ou outro solvente menos polar do que a água, mas miscível em água), para depois ser diluída com a solução tampão, na concentração desejada. Neste método há sempre o inconveniente de que todo experimento que utilize a melatonina em solução aquosa apresente sempre uma pequena quantidade de etanol.

No decorrer do trabalho foi desenvolvido um método que permite a solubilização da melatonina em meio aquoso sem a necessidade da utilização de etanol ou qualquer outro tipo de solvente orgânico.

O método de solubilização da melatonina diretamente em solução aquosa é o seguinte:

- prepara-se uma solução estoque de 10⁻²M de melatonina em clorofórmio;
- pipeta-se uma alíquota da solução estoque de melatonina (cujo volume depende da concentração final desejada) num tubo de vidro;

- seca-se o clorofórmio com nitrogênio gasoso, formando um filme com a maior área possível. Se o volume da alíquota de melatonina da solução estoque for muito pequeno, deve-se acrescentar mais clorofórmio ao tubo, para facilitar a obtenção de um filme homogêneo e de área grande;
- coloca-se a amostra em vácuo por, no mínimo, duas horas, para evaporar o clorofórmio remanescente. Após a secagem da amostra, o filme deve estar transparente e homogêneo em toda a sua extensão;
- adiciona-se a solução aquosa desejada ao filme seco, e o tubo é agitado no vórtex por 3 minutos.

A solução aquosa final fica transparente e homogênea, e sua concentração pode ser dosada por meio de absorção ótica em $\lambda=278\text{nm}$, onde $\epsilon=6300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Merck Index, 1989).

4.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica física que detecta espécies com elétrons desemparelhados, sem alterar ou destruir as moléculas. Em sistemas biológicos, encontramos moléculas com elétrons desemparelhado como, por exemplo, os radicais livres e as metaloproteínas.

A RPE é uma espectroscopia que opera na região de microondas. É um fenômeno baseado na interação do momento magnético do elétron desemparelhado com o campo magnético aplicado. Esta técnica permite, quando aplicada em estudos de moléculas biológicas, a obtenção de informações sobre o grau de mobilidade e ordem do sistema, polaridade do meio, relação entre função-estrutura de proteínas, reações e mudanças conformacionais de moléculas implicadas em processos bioquímicos, etc (Swartz e col., 1972).

4.4.1. O fenômeno da ressonância

Espera-se que toda molécula que tenha um dipolo magnético resultante, diferente de zero, tenha uma interação de sua componente magnética com um campo de radiação. Tal interação produz absorções que são induzidas e de fato observadas somente na presença de um campo magnético estático externo. Os dipolos magnéticos nas moléculas podem ser de origem eletrônica ou nuclear. A espectroscopia RPE trata primariamente com os dipolos magnéticos eletrônicos e a RMN (ressonância magnética nuclear) trata com os dipolos magnéticos nucleares. A diferença fundamental entre as duas espectroscopias está na energia do campo de radiação aplicada: o RPE opera na faixa de microondas (GHz)¹ e o RMN na faixa das ondas de rádio (MHz)².

O dipolo magnético eletrônico pode ser imaginado como um elétron, uma partícula carregada, em movimento gerando um campo magnético. Dois tipos de momentos magnéticos são possíveis ao elétron: um devido ao movimento do elétron em torno do núcleo do átomo (chamado de dipolo magnético orbital) e outro devido a rotação do elétron em torno de um eixo que atravessa seu centro (chamado de dipolo magnético de spin). Na maior parte dos casos, 99% ou mais, o momento de dipolo magnético total do elétron é devido ao spin, com somente uma pequena contribuição orbital.

Um dipolo magnético μ na presença de um campo magnético $\mathbf{H}$ provoca o aparecimento de uma energia de interação dada por

$$E = -\mu \cdot \mathbf{H} , \quad (4.1)$$

que resulta numa Hamiltoniana muito simples:

¹ 1 GHz=10⁹ Hz

² 1 MHz=10⁶ Hz

$$\mathcal{H} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H} . \quad (4.2)$$

O operador de momento angular de spin do elétron e o operador momento de dipolo magnético são proporcionais, expresso na forma

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{S} , \quad (4.3)$$

onde γ é a razão giromagnética, que para o elétron vale

$$\gamma = -\frac{ge}{2mc} , \quad (4.4)$$

e assim,
$$\boldsymbol{\mu} = -\frac{geh}{4\pi mc} \mathbf{S} = -g\beta \mathbf{S} \quad (4.5)$$

onde h é a constante de Planck³; onde e é a carga do elétron⁴, m é a massa do elétron⁵ e c é a velocidade da luz⁶; β é o magnetron de Bohr e $g=2,0023$ para o elétron livre.

Se o campo magnético externo H é estático e têm a direção z , a energia de interação será

$$E = -\mu H \cos(\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H}) = -\mu_z H \quad (4.7)$$

e a Hamiltoniana,
$$\mathcal{H} = -\mu_z H . \quad (4.8)$$

O operador para a componente z do spin do elétron é designado S_z , e as duas possíveis autofunções de spin são $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$, dadas por

$$S_z |\alpha\rangle = +\frac{1}{2} |\alpha\rangle \quad (4.9a)$$

³ $h=6,625 \times 10^{-27}$ erg·seg

⁴ $e=1,6021892 \times 10^{-19}$ C

⁵ m para o elétron em repouso é $0,109534 \times 10^{-30}$ kg.

⁶ $c=299.792.458$ m/s.

$$S_Z|\beta\rangle = -\frac{1}{2}|\beta\rangle \quad (4.9b)$$

onde os autovalores de S_Z são $M_s = \pm 1/2$. Dessa forma, a Hamiltoniana deste sistema fica

$$\mathcal{H} = g\beta H S_Z . \quad (4.10)$$

A energia do sistema pode ser calculado a partir da equação de Schrödinger

$$\mathcal{H}\psi_i = E_i\psi_i , \quad (4.11)$$

onde $\mathcal{H}$ é o operador Hamiltoniano para a energia do sistema; E_i é o autovalor de energia correspondente para a autofunção ψ_i . Sendo $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ autofunções de $\mathcal{H}$ e $g\beta H$ uma constante, obtêm-se que

$$\mathcal{H}|\alpha\rangle = g\beta H S_Z|\alpha\rangle = +\frac{1}{2} g\beta H|\alpha\rangle , \quad (4.12a)$$

$$\mathcal{H}|\beta\rangle = g\beta H S_Z|\beta\rangle = -\frac{1}{2} g\beta H|\beta\rangle , \quad (4.12b)$$

$$\text{ou ,} \quad E = \pm \frac{1}{2} g\beta H , \quad (4.13)$$

onde a energia é uma função do campo magnético externo (Fig. 4.2). A Eq. (4.13) é chamada também de energia Zeeman do sistema.

Figura 4.2. Níveis de energia de um elétron livre sem e com a presença de um campo magnético estático H .

Se a amostra é irradiada com microondas de frequência fixa (fótons de energia fixa), existe um determinado valor de campo magnético externo H_r , onde ocorre a absorção (Fig. 4.2). Neste campo magnético, o fóton de energia $h\nu$ tem exatamente a energia da separação dos níveis do elétron $\Delta E = g\beta H_r$, que é uma das condições de ressonância para ocorrer a absorção, ou seja,

$$h\nu = g\beta H_r. \quad (4.14)$$

onde H_r é, também, o chamado campo magnético externo ressonante. Outra condição necessária para ocorrer a ressonância é que a componente magnética da microonda deve ser perpendicular à direção do campo magnético externo. Essa condição é facilmente satisfeita em aparelhos de RPE, onde são utilizados guias de onda e cavidade ressonante com a geometria adequada.

Valores típicos utilizados em equipamentos de RPE para detecção de radicais livres em solução são: $\nu = 9,5\text{GHz}$ e $H_r = 3400\text{G}$.

Para que a ressonância ocorra, é necessário ainda que haja uma diferença de população entre os níveis de energia. A razão entre populações dos dois níveis de energia, no estado estacionário, é dado pela lei de distribuição de Boltzmann

$$\frac{n_{+\frac{1}{2}}}{n_{-\frac{1}{2}}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}, \quad (4.15)$$

onde $n_{+\frac{1}{2}}$ e $n_{-\frac{1}{2}}$ são as populações do nível $M_S = +\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ respectivamente; e T é a temperatura na escala kelvin.

4.4.2. O fator g

O fator g , também conhecido como fator de Landé, que aparece na Eq. (4.4) é uma constante universal do elétron livre. A aplicação do campo magnético externo pode provocar o aparecimento de um campo magnético local na molécula, que pode somar ou subtrair com o campo externo, e alterar o valor do fator g . Para materiais magnéticos H_r da Eq. (4.14) é definido como o campo magnético aplicado quando ocorre a ressonância (Swartz e col., 1972). Assim pode-se redefinir g como

$$g = \frac{h\nu}{\beta H_r}, \quad (4.16)$$

onde g pode ser considerado como um fator g efetivo.

O desvio do valor do fator g do elétron livre para o g efetivo, fornece informações sobre a interação spin-órbita da molécula na qual o elétron desemparelhado está localizado.

A magnitude do campo local induzido pode ser isotrópico (não dependente da orientação da molécula em relação ao campo magnético externo), como na Eq. (4.14). Mas é comum ser anisotrópico (dependente da orientação) e o

fator g pode variar com a direção do campo magnético externo aplicado. Por exemplo, como moléculas orientadas de um monocristal, onde H_r varia conforme o cristal sofre uma rotação em relação ao campo magnético externo.

O fator g pode ser escrito como um tensor de segunda ordem. Em geral, em coordenadas cartesianas, ele pode ser escrito como

$$\mathbf{g} = \begin{bmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{bmatrix}. \quad (4.17)$$

E a Hamiltoniana Zeeman de um elétron:

$$\mathcal{H}_Z = \beta \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S}. \quad (4.18)$$

4.4.3. Interação hiperfina nuclear

A interação que ocorre entre o spin do elétron desemparelhado com o momento magnético nuclear é denominada de interação hiperfina nuclear.

Classicamente podemos ver a interação hiperfina nuclear como a soma vetorial do campo magnético gerado pelo momento magnético nuclear $\mathbf{H}_{\text{local}}$ com o campo magnético externo $\mathbf{H}_{\text{ext}}$, dando origem a um campo magnético total efetivo,

$$\mathbf{H}_{\text{eff}} = \mathbf{H}_{\text{ext}} + \mathbf{H}_{\text{local}} \quad (4.19)$$

A mecânica quântica diz que há $(2I+1)$ possíveis valores para o spin do nuclear M_I , conseqüentemente deve haver $(2I+1)$ valores para $\mathbf{H}_{\text{local}}$. Assim a ressonância será observada em $(2I+1)$ valores do campo magnético externo (Fig. 4.3) e o espectro de absorção gerado será separado em $(2I+1)$ linhas, devido as regras de seleção $\Delta M_S = \pm 1$ e $\Delta M_I = 0$, e a separação entre as linhas é normalmente chamada de desdobramento hiperfino.

Figura 4.3. Níveis de energia de um elétron desemparelhado interagindo com um núcleo com spin $I=1$ e o espectro característico de RPE da 1ª. derivada do espectro de absorção.

Do ponto de vista da mecânica quântica a interação dipolo-dipolo entre o elétron e o núcleo é representada pelo operador

$$H = -g_e \beta g_N \beta_N \left[\frac{\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}}{r^3} - \frac{3(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})}{r^5} \right], \quad (4.20)$$

onde g_N e β_N são o fator g e magneton nuclear, respectivamente, $\mathbf{S}$ e $\mathbf{I}$ são os operadores de spin do elétron e do núcleo, respectivamente, e $\mathbf{r}$ o vetor que liga o elétron ao núcleo.

A interação hiperfina isotrópica é representada pelo termo de contato de Fermi (1930) na Hamiltoniana

$$H_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \beta g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \mathbf{S} \cdot \mathbf{I} = hA_0 \mathbf{S} \cdot \mathbf{I}, \quad (4.21)$$

onde $\psi(0)$ é o valor da autofunção do elétron desemparelhado, determinado no núcleo que causa a interação. Somente os elétrons nos orbitais s podem contribuir para A_0 pois, as autofunções p, d, f,... têm densidade de probabilidade zero no núcleo.

Assim a Hamiltoniana de interação hiperfina pode ser escrita em termos do termo dipolo-dipolo e do de contato de Fermi como:

$$\mathcal{H}_{\text{hf}} = h\mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} , \quad (4.22a)$$

$$\text{com} \quad \mathbf{A} = A_0\mathbf{1} + \mathbf{A}' , \quad (4.22b)$$

onde $\mathbf{A}$ e $\mathbf{A}'$ são um tensores de segunda ordem; $\mathbf{A}'$ contém o termo anisotrópico da Hamiltoniana (dependente da orientação); A_0 é o desdobramento hiperfino isotrópico e contém o termo isotrópico da Hamiltoniana (independente da orientação); e $\mathbf{1}$ é o tensor unitário.

A interação hiperfina anisotrópica depende da direção do campo magnético em relação aos eixos principais do sistema onde está o elétron desemparelhado. Na maioria dos radicais livres orgânicos os elétrons desemparelhados são extremamente deslocalizados e a distribuição é quase isotrópica. Entretanto para metais de transição e marcadores de spin (Sec. 4.3.4) os elétrons estão localizados principalmente em orbitais *d* ou *p* e, e nestes casos a anisotropia torna-se importante.

4.4.4. O método do marcador de spin

O método do marcador de spin (Berliner, 1976 e 1979) foi utilizado pela primeira vez por Onishi e McConnell (1965). Os marcadores de spin são radicais livres estáveis que são ligados quimicamente a sítios específicos de uma molécula de um sistema complexo. O espectro de RPE destes radicais livres nesses sistemas pode fornecer informações sobre o meio no qual está o radical. A estas moléculas dá-se o nome de molécula sonda. Desde o aparecimento deste método, a literatura sobre marcadores de spin enriqueceu bastante e muito tem ajudado a elucidar importantes questões biológicas.

O radical livre nitróxido (Fig. 4.4) é o mais utilizado, por ser bastante estável sob as condições em que são estudadas as moléculas biológicas, tais como: solventes de diferentes naturezas, diferentes valores de pH, altas e baixas concentrações de sais, etc. Os grupos metila, nos carbonos vizinhos do átomo de nitrogênio, estabilizam o elétron desemparelhado na ligação N-O do nitróxido (Fig. 4.4).

Figura 4.4. Radical livre nitróxido

Vários tipos de marcadores de spin de estruturas e nomes complexos têm sido relatados na literatura. Para facilitar a citação dos mesmos, são em geral

adotadas suas abreviações. A Fig. 4.5 mostra alguns dos marcadores de spin mais utilizados.

Figura 4.5. Estrutura química de alguns marcadores de spin mais utilizados.

4.4.4.1. Informações contidas em um espectro de marcador de spin nitróxido

Um espectro de marcador de spin nitróxido contém 3 parâmetros importantes: as componentes principais do tensor g e do tensor hiperfino do nitrogênio A no sistema de eixos da bicamada lipídica e a forma do espectro de RPE (principalmente as larguras de linha de cada ressonância). A combinação dessas 3 parâmetros pode fornecer informações sobre a orientação e mobilidade do nitróxido. Em membranas, as moléculas de marcador de spin anfifílicas tendem a orientar-se e intercalar-se entre as moléculas de fosfolipídios que formam a bicamada. Com isso importantes informações podem ser obtidas sobre a ordem e mobilidade que um lipídio apresenta dentro da membrana lipídica. Em particular, neste trabalho, este método possibilitou monitorar as alterações que a melatonina provoca na bicamada quando interage com a membrana lipídica.

4.4.4.2. Hamiltoniana do marcador de spin nitróxido

A Hamiltoniana de spin completa que descreve a anisotropia espectral para uma coleção de elétrons desemparelhados, de spin S , é dada por:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{\text{hf}} + \mathcal{H}_{\text{troca}} + \mathcal{H}_{\text{Dipolar}} , \quad (4.23)$$

onde $\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{Dipolar}}$, são os termos de interações entre elétrons desemparelhados, que por sua vez só ocorrem em poliradicaís ou em concentrações elevadas de monoradicaís (Luckhurst, 1976). No presente trabalho esses dois termos foram desprezados, pois não foram utilizados nem marcadores de spin com mais de um radical nitróxido e nem altas concentrações de marcadores nas membranas modelo (a quantidade de marcador de spin utilizado foi sempre 1% da quantidade total de fosfolipídio). $\mathcal{H}_Z$ é o termo Zeeman; e $\mathcal{H}_{\text{hf}}$ é o termo de interação hiperfina nuclear com o nitrogênio. Assim, a Hamiltoniana completa é idêntica à de um elétron desemparelhado, ou seja,

$$\mathcal{H} = \beta \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + h \mathbf{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{S} , \quad (4.24)$$

onde os termos correspondem a interação Zeeman e a interação hiperfina nuclear, respectivamente, descrita nas Sec. 4.4.2 e 4.4.3.

O sistema de eixos convencionalmente definido para o radical nitróxido é mostrado na Fig. 4.6. O elétron desemparelhado do nitróxido ocupa principalmente um orbital molecular composto de orbitais p_π do nitrogênio e do oxigênio. A observação dos valores das componentes do tensor hiperfino indica que uma substancial fração do elétron desemparelhado está localizada no átomo de nitrogênio (Fig. 4.6) e, ainda, sugere que a ligação N-O tem um caráter polar.

Figura 4.6. Sistema de coordenadas (X,Y,Z) convencionalmente adotado para o radical nitróxido .

As componentes dos tensores g e de desdobramento hiperfino A de radicais nitróxidos, incluídos como impureza em monocristal diamagnético (Tab. 4.2), são anisotrópicos e aproximadamente diagonais nos eixos X, Y e Z adotados na Fig. 4.5.

Marcador de spin	A_{XX} (G)	A_{YY} (G)	A_{ZZ} (G)	g_{XX}	g_{YY}	g_{ZZ}
CSL *	6,3	5,9	31,9	2,0090	2,0060	2,0024
Doxil **	5,9	5,4	32,9	2,0088	2,0058	2,0022

Tabela 4.2. Valores principais dos tensores de desdobramento hiperfino A e g dos nitróxidos CSL (3-doxil-5-colestano) e Doxil (Fig. 4.5) em monocristal de composto diamagnético. Os dados são conforme (*) Griffith e col. (1965) e (**) Gaffney e McConnell (1974).

A Tab. 4.2 mostra que o tensor g é anisotrópico e que o tensor de desdobramento hiperfino A apresenta uma simetria quase axial, ou seja, $A_{xx} \approx A_{yy} \approx 6G$ e $A_{zz} \approx 32G$.

Existem alguns marcadores de spin onde um dos eixos principais do nitróxido (X, Y ou Z da Fig. 4.6) coincide aproximadamente com o eixo longo molecular. Alguns exemplos destes marcadores de spin estão ilustrados na Fig. 4.7.

Figura 4.7. Exemplos de marcadores de spin em que um dos eixos moleculares do nitróxido coincide com o eixo longo molecular (R): (a) SSL, onde o eixo x do nitróxido coincide com R; (b) CSL, onde o eixo y do nitróxido coincide com R; e (c) 5-SASL, onde o eixo z do nitróxido coincide com R. Figura adaptada de Van e col. (1974) e Griffith e Jost (1976).

4.4.4.3. Tempo de correlação rotacional

O tempo de correlação rotacional (τ_R) é definido como o intervalo de tempo no qual uma molécula persiste numa dada orientação (Nordio, 1976)⁷. De acordo com o modelo de difusão de Debye (1945), o tempo de correlação para difusão rotacional isotrópica pode ser calculado em termos das dimensões moleculares, temperatura e viscosidade do meio, quando as moléculas são aproximadas por esferas de raio R :

$$\tau_R = (6D)^{-1}, \quad D = kT/8\pi\eta R^3, \quad (4.25)$$

onde D é a constante de difusão rotacional; k é a constante de Boltzmann e η é a viscosidade. Valores típicos de τ_R para moléculas pequenas em rotação isotrópica em solventes de baixa viscosidade estão em torno de 10^{-10} a 10^{-11} segundos (Nordio, 1976).

O tempo de correlação rotacional é um dos fatores caracteriza o movimento das componentes da membrana. Uma diminuição de τ_R corresponde a um aumento de mobilidade das componentes, neste caso diz-se que a membrana ficou mais "fluida". Pode-se dizer, ainda que neste caso, a membrana ficou mais "empacotada" ou "rígida", entretanto, como as bicamadas são estruturas dinâmicas, com alto grau de mobilidade, estes termos não são muito adequados.

⁷ Existem outras definições do tempo de correlação rotacional, que são equivalentes. Por exemplo, Wertz e Bolton (1972) definem τ_R como sendo o tempo necessário para ocorrer uma rotação de um radiano numa molécula, em relação a sua orientação anterior.

4.4.4.4. Alargamento de linha de espectros de nitróxidos

O radical nitróxido pode ter um movimento molecular que faz com que o termo anisotrópico da Hamiltoniana da Eq. (4.21), seja uma função randômica do tempo. Como consequência deste movimento, ocorre uma modulação dos níveis de energia e das frequências de transição, gerando um alargamento das linhas de ressonância do espectro de RPE. Esse alargamento das linhas é gerado pelo aumento da contribuição Lorentziana, e está relacionada com o aumento do tempo de relaxação transversal (T_2), e é chamado de alargamento não-homogêneo. A contribuição da parte isotrópica (Gaussiana), ligado à relaxação spin-rede, não se altera (T_1).

O movimento molecular do radical nitróxido pode ser classificado em processos distintos denominados: *muito rápido*, *rápido*, *lento* e *imobilizado*. Essa classificação é feita em relação a resolução temporal do equipamento de RPE. A Fig. 4.8 mostra exemplos de espectros de RPE de alguns marcadores de spin com regimes de movimento classificado acima.

Figura 4.8. Espectros de RPE característicos de diversos regimes de movimento. Movimento muito rápido: (a) 5-SASL e (b) SSL em meio aquoso a 25°C. Movimento rápido: (c) 5-SASL e (d) SSL em lipossomos de DMPG a 40°C (temperatura acima da T_f). Movimento lento: (e) 5-SASL e (f) SSL em lipossomos de DMPG a 5°C (temperatura abaixo da T_f). Imobilizado: (g) espectro de pó.

4.4.4.5. Movimento muito rápido ($\tau_R < 10^{-11}$ s)⁸

O movimento de moléculas pequenas em um solvente de baixa viscosidade é, em geral, isotrópico e caracterizado como muito rápido. Neste regime de movimento o espectro de RPE apresenta linhas de ressonância estreitas (Fig.4.3) e, os valores de g e A da Eq. (4.22) são uma média do traço desses tensores:

$$g = g_0 = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) , \quad (4.26)$$

$$A = A_0 = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) . \quad (4.27)$$

onde A_0 é o parâmetro de desdobramento hiperfino isotrópico. Neste regime de movimento ocorre o chamado estreitamento das linhas por tombamento rápido do radical nitróxido (motional narrowing).

O desdobramento hiperfino A_0 pode ser medido diretamente no espectro de RPE (Fig. 4.3), e é um parâmetro bastante sensível a polaridade do meio em que se encontra o radical nitróxido.

Moléculas de marcadores de spin pequenas, em solução aquosa a temperatura ambiente, apresentam este tipo de movimento, onde o espectro é caracterizado por ter a 3 linhas de ressonância estreitas e praticamente com a mesma intensidade (Figs. 4.8a e 4.8b).

⁸ Segundo Marsh (1989).

4.4.4.6. Movimento rápido ($10^{-11} \lesssim \tau_R \lesssim 10^{-9}$ s)⁹

Para o caso de movimento rápido, mas onde o radical nitróxido apresenta baixo grau de ordenamento, ou seja, apresenta um espectro de RPE bastante próximo do espectro de movimento muito rápido (Fig. 4.8d), o alargamento das linhas pode ser determinado pela teoria de perturbação. A análise espectral é feita utilizando-se a teoria de Redfield (Hudson e Luckhurst, 1969). Nesta teoria a largura de linhas é descrita por:

$$\Delta H_m = A + Bm + Cm^2, \quad (4.28)$$

onde ΔH_m é a largura de linha; m é o número quântico de spin nuclear; A é a constante de alargamento fixa para as 3 linhas de ressonância do nitróxido e não pode ser facilmente distinguido de outros mecanismos de alargamento homogêneo (relaxação spin-rede, etc.); e B e C são parâmetros que dependem da magnitude da anisotropia magnética e da taxa de reorientações moleculares do nitróxido em solução, e dependem do alargamento não homogêneo das linhas de ressonância de RPE. Os parâmetros B e C podem ser calculados separadamente determinando as larguras de linha Lorentziana do espectro de RPE.

Tempos de correlação relativos ao movimento de rotação rápido anisotrópico, em bicamada lipídica podem ser calculados a partir da determinação dos parâmetros B e C . Esses parâmetros são determinados a partir da largura Lorentziana das linhas de ressonância do espectro de RPE do marcador de spin incorporado a membranas lipídicas. Segundo Kiverson (1972) e Goldman e col. (1972), B e C são determinado segundo:

$$B = \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left[\frac{\Delta H_{pp}^L(+1)}{\Delta H_{pp}^L(0)} - \frac{\Delta H_{pp}^L(-1)}{\Delta H_{pp}^L(0)} \right] \quad (4.29)$$

⁹ Segundo Nordio (1976), Schreier, (1978) e Marsh (1989).

$$e \quad C = \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left[\frac{\Delta H_{pp}^L(+1)}{\Delta H_{pp}^L(0)} + \frac{\Delta H_{pp}^L(-1)}{\Delta H_{pp}^L(0)} - 2 \right], \quad (4.30)$$

onde $\Delta H_{pp}^L(m)$ é largura de linha Lorentziana das ressonâncias $m=+1,0$ e -1 , respectivamente.

Para a difusão rotacional anisotrópica com simetria axial, existem duas componentes independentes, $1/\tau_0 = 6D_{R\perp}$ e $1/\tau_{22}=2D_{R\perp} + 4D_{R\parallel}$, que descrevem o alargamento de linha da RPE (Marsh, 1989), onde $D_{R\perp}$ e $D_{R\parallel}$ são as constantes de difusão rotacional perpendicular e paralelo relativas ao eixo longo molecular, respectivamente. Os correspondentes tempos de correlação efetivos são definidas por (Marsh, 1989),

$$\tau_{R\perp} = 1/6D_{R\perp} = \tau_{20}, \quad (4.31)$$

$$e \quad \tau_{R\parallel} = 1/6D_{R\parallel} = 2\tau_{20}\tau_{22}/(3\tau_{20} - \tau_{22}), \quad (4.32)$$

onde $\tau_{R\perp}$ é o tempo de correlação rotacional perpendicular; e $\tau_{R\parallel}$ é o tempo de correlação rotacional paralelo. Como os marcadores utilizados têm o seu eixo longo paralelo à normal da bicamada lipídica, esses tempos de correlação são perpendicular e paralelo ao eixo normal à bicamada lipídica, e são eles que vão caracterizar o movimento que ocorre na bicamada.

As expressões numéricas para determinar as componentes do tempo de correlação rotacional perpendicular e paralelo são escritos na forma (Marsh, 1989):

$$\tau_{20} = c_1(C + c_2B), \quad (4.33)$$

$$e \quad \tau_{22} = b_1(B + b_2C), \quad (4.34)$$

onde B e C são os parâmetros da Eq. (4.29) e (4.30); os valores das constantes numéricas c_1 , c_2 , b_1 e b_2 , correspondentes a tempos de correlação em segundos e larguras de linha em gauss, são dados pela Tab. (4.3). Como B e C podem ser

negativos ou positivos, e τ_R deve ser um valor positivo, isto define um limite dos possíveis valores relativos desses coeficientes. Esse limite é dado pelo módulo da razão C/B, compatíveis com diferentes anisotropias de rotação, dadas na Tab (4.3).

Eixo de Rotação	C/B	c_1 (sG ⁻¹)	c_2	b_1 (sG ⁻¹)	b_2	Tenso- res ^a
Isotrópico	» 1	$1,19 \times 10^{-9}$	0	$-1,22 \times 10^{-9}$	0	(1)
eixo z	< 1,01	$1,16 \times 10^{-9}$	-0,0316	$-0,437 \times 10^{-9}$	0,988	(1)
	< 0,89	$1,28 \times 10^{-9}$	-0,0115	$-0,335 \times 10^{-9}$	1,130	(2)
eixo y	0,8-8,8	$4,95 \times 10^{-9}$	0,775	$-1,38 \times 10^{-9}$	0,113	(1)
eixo x	0,5-1,5	$-2,85 \times 10^{-9}$	1,447	$1,28 \times 10^{-9}$	1,912	(2)

Tabela 4.3. Constantes numéricas que relacionam os coeficientes de larguras de linha com o Tempo Correlacional (Marsh, 1989) e a faixa de validade da razão |C/B|. ^(a) Os tensores de Hamiltoniano de spin foram tomados para os seguintes marcadores de spin: (1) Doxil propano (Jost e col., 1971); (2) TEMPONE (Snipes e col., 1974). Com excessão da rotação em torno do eixo z, os valores são pouco sensíveis em relação à escolha dos valores dos tensores do mono-cristal.

Para o movimento rápido, a posição das linhas espectrais não se altera, em relação aos espectros com movimento muito rápido, portanto, como no movimento muito rápido, é possível a medida direta de A_0 no espectro de RPE (Fig. 4.3). O tratamento descrito nesta Secção pode também ser aplicado a movimentos muito rápido, com a diferença de que neste caso, o tempo de correlação rotacional τ_R terá um único componente, ou seja, $\tau_R = \tau_{20} = \tau_{22} = \tau_{R\perp} = \tau_{R\parallel}$.

4.4.4.7. Movimento lento ($10^{-9} \lesssim \tau_R \lesssim 10^{-8}$ s)¹⁰ e imobilizado ($\tau_R \gtrsim 10^{-8}$ s)¹¹

Quando o movimento do radical nitróxido é lento (Figs. 4.8e e 4.8f), as formas das linhas espectro de RPE refletem diretamente a distribuição randômica, aproximando do caso limite do policristal. Para o movimento lento, uma análise mais exata deve ser utilizada, como o tratamento estocástico de Liouville desenvolvido Freed (1976), que utiliza o algoritmo de Lanczo para simular espectros de marcador de spin (Schneider e Freed, 1989). Neste regime de movimento a posição das linhas não depende mais somente da amplitude do movimento, mas da razão entre o movimento e o tempo de correlação rotacional.

Abaixo de $\tau_R \gtrsim 10^{-8}$ s a RPE tradicional não distingue mais movimento. Neste regime de movimento temos o chamado espectro de RPE imobilizado (Fig. 4.8g), onde os espectros têm a mesma forma de espectros de pó, ou seja, semelhantes a espectros de amostras onde o radical nitroxido está inserido num policristal. Entretanto, utilizando a técnica de RPE de transferência de saturação, é possível determinar τ_R para a faixa de $10^{-3} \lesssim \tau_R \lesssim 10^{-7}$ s (Marsh, 1989).

4.4.4.8. Parâmetro de ordem

O tratamento descrito para movimento rápido (Sec. 4.4.4.6), correlacionando a largura das linhas com τ_R , só é possível onde a ordem sistema é muito baixa, como o observado em espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos, acima da T_f dos fosfolipídios, onde o movimento rápido em torno do eixo X do radical nitróxido (Fig.4.7a) produz o estreitamento das linhas de ressonância. Em sistemas onde há um maior ordenamento e movimento rápido, a

¹⁰ Segundo Marsh (1989).

¹¹ Segundo Marsh (1989).

análise é feita através da determinação do parâmetro de ordem. As Figs. 4.8c e 4.10 ilustram espectros de RPE de sistemas com esta características.

O parâmetro de ordem é uma medida da distribuição das orientações moleculares relativas a algum eixo de referência (diretor) (Fig. 4.9). O eixo diretor é normalmente escolhido como sendo a normal à superfície da bicamada da membrana.

Em sistemas com alto grau de ordenamento e movimento rápido, onde $\tau_R \lesssim 3 \times 10^{-9}$ s (Griffith e Jost, 1976; Seelig, 1976), as posição das linhas podem ser determinadas por uma versão de $\mathcal{H}$ que é a média temporal da Hamiltoniana da Eq. (4.21), onde as componentes das médias temporais dos tensores de desdobramento hiperfino $\mathbf{A}$ e fator $\mathbf{g}$ são independentes da velocidade do movimento (τ_R) e são determinadas somente por considerações geométricas do espectro de RPE. Destas considerações geométricas do espectro é possível calcular o parâmetro de ordem (S).

Considerando o movimento anisotrópico de uma molécula de marcador de spin orientado na bicamada lipídica (Fig. 4.9), as reorientações instantâneas dos eixos x, y e z do nitróxido (Fig. 4.6) relativo à normal da bicamada são dados pelos ângulos θ_1 , θ_2 e θ_3 . Pode-se transformar os tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ dos eixos do nitróxido para o sistema de eixos da bicamada através da matriz de rotação $\mathbf{R}$: $\mathbf{A}' = \mathbf{R} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{R}^{-1}$ e $\mathbf{g}' = \mathbf{R} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{R}^{-1}$. Realizando a transformação dos tensores $\mathbf{g}$ e $\mathbf{A}$ para o eixo da bicamada obtemos (Seelig, 1970):

Figura 4.9. Reorientações instantâneas dos eixos x, y e z do nitróxido de um marcador de spin, relativo aos eixos da bicamada lipídica.

$$A = \begin{bmatrix} A_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & A_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & A_{\parallel} \end{bmatrix} \quad (4.35)$$

e

$$g = \begin{bmatrix} g_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{\parallel} \end{bmatrix}, \quad (4.36)$$

sendo os elementos

$$A_{\perp} = \frac{1}{2}(A_{zz} - A_{xx})(1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle) + A_{xx}, \quad (4.37)$$

$$A_{\parallel} = \frac{1}{2}(A_{zz} - A_{xx})\langle \cos^2 \theta_3 \rangle + A_{xx} \quad (4.38)$$

$$e \quad g_{\perp} = \frac{1}{2}(g_{xx} - g_{yy})(1 - \langle \cos^2 \theta_1 \rangle) + \frac{1}{2}(g_{zz} - g_{yy})(1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle), \quad (4.39)$$

$$g_{\parallel} = (g_{xx} - g_{yy})\langle \cos^2 \theta_1 \rangle + (g_{zz} - g_{yy})\langle \cos^2 \theta_3 \rangle + g_{yy}. \quad (4.40)$$

onde o índice $\perp$ significa perpendicular à bicamada e $\parallel$ paralela à normal da bicamada lipídica. A aproximação $A_{yy} \approx A_{xx}$ feita nas Eq. (4.37) e (4.38), baseada nos valores da Tab. 4.2, significa que é possível obter-se a orientação temporal média do eixo z do nitróxido relativo ao eixo normal da bicamada apenas pela determinação dos desdobramentos hiperfinos $A_{\perp}$ e $A_{\parallel}$ (Fig. 4.10).

Para um dado grupo de parâmetros experimentais A_{exp} , g_{exp} e θ_i , pode ser determinada a média de flutuação angular $\langle \cos^2 \theta \rangle$. O parâmetro de ordem pode ser definido como (Saupe, 1964):

$$S_{ii} = \frac{1}{2}(3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1), \quad (4.41)$$

onde i são os eixos do nitróxido (x,y,z) em relação à normal da bicamada lipídica (Fig. 4.8).

No caso do radical nitróxido, que têm uma simetria aproximadamente axial em torno do eixo z, o parâmetro de ordem deste eixo em relação ao eixo diretor, que é a normal à bicamada, torna-se (Griffith e Jost, 1976)

$$S_3 = \frac{1}{2}(3\langle \cos^2 \theta_3 \rangle - 1), \quad (4.42)$$

Das Eqs. (4.40) da (4.41), obtêm-se que

$$S_3 = \frac{(A_{\parallel} - A_{\perp})}{\left[A_{ZZ}^c - \frac{1}{2}(A_{XX}^c + A_{YY}^c) \right]} \frac{A_0(\text{cristal})}{A_0(\text{bicamada})}, \quad (4.43)$$

onde A_{ZZ}^c , A_{XX}^c e A_{YY}^c são os valores das componentes do tensor hiperfino obtido do radical nitróxido inserido em policristal (Tab. 4.2); $A_{\parallel}$ e $A_{\perp}$ são os das componentes do tensor hiperfino determinado no espectro de RPE (Fig. 4.10); e a razão entre os desdobramentos hiperfinos isotrópicos $A_0(\text{cristal})/A_0(\text{bicamada})$, é a correção da diferença de polaridade que existe entre os valores das componentes do tensor hiperfino da bicamada lipídica para o policristal. Neste trabalho, assume-se que $A_0(\text{cristal})/A_0(\text{bicamada})=1$, pois a análise dos espectros é sempre comparativa entre amostras com e sem a presença de melatonina.

Pela simetria axial assumida do radical nitróxido, $A_{XX} \approx A_{YY} \approx A_{\perp}$ e $A_{ZZ} \approx A_{\parallel}$ (Sec. 4.4.4.2), pode determinar-se um parâmetro de ordem efetivo, já sem considerar a correção de polaridade, medindo-se os valores experimentais de $2A_{\text{máx}}$ e $2A_{\text{mín}}$ (Fig. 4.10). O parâmetro de ordem efetivo é determinado pela expressão (Seelig, 1970; Hubbell e McConnell, 1971; Gaffney, 1974):

$$S^{ef} = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{\left[A_{ZZ}^c - \frac{1}{2} (A_{XX}^c + A_{YY}^c) \right]}, \quad (4.44)$$

com $A_{\parallel} = A_{\text{máx}}$ e

$$A_{\perp} = A_{\text{mín}} + 1,4 \left(1 - \frac{A_{\text{máx}} - A_{\text{mín}}}{\left[A_{ZZ}^c - \frac{1}{2} (A_{XX}^c + A_{YY}^c) \right]} \right), \quad (4.45)$$

onde $A_{\text{máx}}$ é a metade do valor da distância em gauss entre primeiro máximo e o último mínimo (Fig. 4.10); $A_{\text{mín}}$ é a metade do valor da distância em gauss entre primeiro mínimo e o último máximo (Fig. 4.10). A Eq. (4.45) é uma correção de $2A_{\perp}$ (Gaffney, 1974), pois este parâmetro, obtido da através de simulação, de espectros de RPE, difere do parâmetro experimental $2A_{\text{mín}}$, conforme mostra a Fig. (4.10). A constante 1,4 têm um erro de $\pm 0,08$ (Griffith e Jost, 1976) e está de acordo com diversos valores das componentes do tensor A , diferentes larguras de linha e diferentes programas de computador utilizados na simulação computacional (Griffith e Jost, 1976).

Figura 4.10. Parâmetros $2A_{\text{máx}}$, $2A_{\text{mín}}$, $2A_{\parallel}$ e $2A_{\perp}$, em espectro de RPE (Griffith e Jost, 1976).

O desdobramento hiperfino de espectros de RPE de marcadores de spin com movimento rápido e alto grau de ordenamento, pode ser determinado pela expressão (Griffith e Jost, 1976):

$$A_0 = \frac{(A_{\parallel} + 2A_{\perp})}{3}, \quad (4.46)$$

onde $A_{\parallel} = A_{\text{máx}}$ e $A_{\perp}$ é dado pela Eq. (4.45).

Esta metodologia de análise pode ser aplicada a espectros de RPE de marcadores de spin derivados de ácido esteárico (X-SASL, Fig. 4.5) e de fosfolipídios (Fig. 3.2) com movimento rápido, conforme Griffith e Jost (1976). Estes marcadores apresentam o eixo z do nitróxido (Fig. 4.5) que coincide aproximadamente com o eixo normal da bicamada lipídica (Fig. 4.8), requisito básico exigido para utilizar esta metodologia. Em particular, neste trabalho, esta metodologia foi utilizada na análise dos espectros de RPE que utilizaram 5-SASL e 6-DPPC, incorporados a lipossomos de DMPG e DMPC (Sec. 5.2).

4.4.4.9. Análise das intensidades de linha do SSL

Uma análise empírica que têm sido feito com os espectros de RPE de marcadores de spin incorporados a lipossomos, é a medida da relação de intensidades pico a pico entre as linhas de campo baixo ($m=+1$) e campo médio ($m=0$). Para marcadores de spin que têm o eixo X do radical nitróxido (Fig. 4.6) como o eixo principal de rotação (Fig. 4.7a), portanto com a intensidade pico a pico da linha $m=+1$ (h_{+1}) maior que a linha $m=0$ (h_0) (Fig. 4.16), foi mostrado que o aumento da relação h_{+1}/h_0 está relacionada com o aumento de fluidez da membrana (diminuição de τ_R e/ou S) (Schreier-Muccillo, 1973).

Figura 4.11. Espectro de RPE característico de SSL incorporado a lipossomos.

Hsia e col. (1970) utilizaram o parâmetro h_{+1}/h_0 no estudo do efeito do colesterol incorporados a lipossomos de fosfatidil colina de ovo, utilizando o marcador SSL, e observaram a diminuição da razão h_{+1}/h_0 com o aumento da concentração de colesterol, e concluem que o colesterol torna a membrana menos fluida.

Este parâmetro empírico será utilizado na presente trabalho, e será discutido na Sec. 6.2.3.

4.4.5. Método numérico de separação de linhas de RPE - programa Lowfit

As linhas de RPE de marcadores de spin (ou de marcadores perfeitamente alinhados em um cristal líquido ou cristal orientado), no regime de rotação (ou movimento) rápido, contêm uma componente Lorentziana e outra Gaussiana. A componente Lorentziana contém informações sobre o tempo de relaxação transversal (T_2), portanto sobre os tempos de correlação rotacional. A componente Gaussiana é a resultante da soma de várias interações hiperfinas não resolvidas, com os prótons vizinhos aos nitroxidos.

Bales (1982) desenvolveu um método empírico simples de separação das larguras de linha Gaussiana e Lorentziana, que contribuem para a largura total de uma linha de RPE do radical nitróxido. A determinação das larguras de linha Lorentziana, por este método, permite calcular os tempos de correlação perpendicular e paralelo ($\tau_{R\perp}$ e $\tau_{R\parallel}$), utilizando a metodologia desenvolvida na Sec. 4.4.4.6. O método está contido em um programa de computador da linha IBM-PC e chama-se Lowfit.

O método é baseado na medição das intensidades relativas das "asas" do espectro V_{pp} e $V'/2$ (Fig. 4.12). A região do espectro tomada para essa análise, localiza-se onde o campo magnético é $\pm 1,32 \Delta H_{pp}$ (largura de linha pico a pico total da linha) distante do centro do campo ressonante, neste ponto a amplitude das asas valem V' . A relação entre as amplitudes pico-a-pico (V_{pp}) e V' diferem consideravelmente, nesta região, entre as formas de linha totalmente Gaussiana e totalmente Lorentziana. Essa relação é definida por

$$\psi = \frac{V'}{2V_{pp}} . \quad (4.47)$$

Figura 4.12. Uma linha de interação hiperfina ($m_I=0$) do ^{14}N , ilustrando a posição nas asas do espectro ($\pm 1,32\Delta H_{pp}$) na qual a amplitude V' para desconvolução Gaussiana-Lorentziana é definida Bales (1982).

Para uma linha Gaussiana pura $\psi^G = 0,067$ e para uma Lorentziana pura $\psi^L = 0,213$. Através da simulação numérica de 19 multipletos de prótons, com diferentes valores de acoplamento hiperfino, utilizando a aproximação de Voigt (Bales, 1982), foi obtida a seguinte calibração da relação das larguras de linhas Gaussiana e Lorentziana em termos da relação ψ (Bales, 1982):

$$\frac{\Delta H_{pp}^G}{\Delta H_{pp}^L} = 16,02 - 236,64\psi + 1263\psi^2 - 2373\psi^3 , \quad (4.48)$$

onde ΔH_{pp}^G e ΔH_{pp}^L são as larguras de linha Gaussiana e Lorentziana, respectivamente. Esta calibração é válida para a faixa de

$$0 < \frac{\Delta H_{pp}^G}{\Delta H_{pp}^L} < 2,04 , \quad (4.49)$$

para diversos marcadores de spin (Bales, 1989). A combinação da Eq. (4.48) com a relação descoberta acidentalmente por Dobryakov e Lebedev (1969),

$$\left(\frac{\Delta H_{pp}^G}{\Delta H_{pp}^{Total}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta H_{pp}^L}{\Delta H_{pp}^{Total}} \right)^2 = 1 , \quad (4.50)$$

permite determinar as larguras de linha Gaussiana e Lorentziana de uma linha de ressonância de RPE. ΔH_{pp}^{Total} é a largura total de linha.

4.4.6. Aquisição de espectros de RPE

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro ER 200D - SRC da Bruker. Este espectrômetro opera na chamada banda X, que corresponde a região de 9,5 GHz.

Na aquisição de espectros de RPE é necessário certos cuidados na escolha dos parâmetros de ajustes do aparelho (Bolton e col., 1972; Jost e Griffith, 1976), pois um ajuste inadequado pode distorcer completamente o sinal de RPE. Neste trabalho foi utilizado 3355G como o centro da varredura do campo magnético; 100G de varredura do campo magnético; 9,45GHz de frequência de microondas, 12,7mW de potência de microondas; 100kHz de frequência de modulação do campo magnético; e 1 G de amplitude da frequência de modulação do campo magnético para todas as amostras de RPE.

O tempo de aquisição de cada espectro variou de 50 a 100 s, com constantes de tempo de variando de 50 a 100 ms para amostras em temperaturas acima da temperaturas de transição de fase do fosfolipídio utilizado; e de 200 a

1000 s de tempo de aquisição, com constantes de tempo variando de 200 a 1000 ms para amostras em temperaturas abaixo da T_f .

4.4.7. Manipulação de Espectros de RPE

Os espectros de RPE de marcador de spin incorporado a lipossomos foram adquiridos e armazenados em arquivos digitalizados. Posteriormente estes espectros digitalizados foram manipulados e analisados em programas de microcomputadores da linha IBM-PC.

Para a medição das larguras de linha total pico-a-pico, alturas das linhas pico-a-pico, dos parâmetros $2A_{\text{máx}}$ e $2A_{\text{mín}}$ foi utilizado o programa Origin, da Microcal Inc. Nenhuma medição foi realizada manualmente no espectro de RPE graficado. Sempre que necessário, os espectros foram ampliados na tela do monitor de vídeo do microcomputador, para possibilitar medidas mais precisas.

Para a subtração da componente relativa a marcadores de spin não incorporados ao lipossomos, foi utilizado o programa EPRANALA, sob licença do prof. Dr. Anthony Watts, de Oxford, Inglaterra.

Para a determinação do alargamento de linha Lorentziano nas linhas dos espectros de SSL incorporados a lipossomos foi utilizado o programa Lowfit, sob licença do prof. Dr. Barney Bales, da Universidade Estadual da Califórnia, Northridge, EUA.

4.5. Fluorescência

A melatonina, uma molécula derivada do amino-ácido triptofano, possui um grupo indol em sua estrutura química. Este grupo indol é fluorescente e permite

que se estude a melatonina, e sua interação com membranas lipídicas, por um aspecto diferente da RPE. Nesta técnica o próprio hormônio, que é fluorescente, é diretamente monitorado, enquanto que em RPE, as modificações que a melatonina provoca na estrutura da membrana lipídica é que são monitoradas. Todo o estudo foi realizado utilizando-se fluorescência estática, que será resumidamente descrita a seguir.

4.5.1. Princípio da fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é basicamente uma técnica de detecção do processo de decaimento radiativo de estados singletos excitados por absorção de radiação. A Fig. 4.13 mostra uma representação bastante simplificada do fenômeno da fluorescência.

Figura 4.13. Representação simplificada do fenômeno da fluorescência. O elétron no estado singleto fundamental S_a absorve um fóton de energia $h\nu$ e vai para o estado singleto de maior energia S_b . Posteriormente o elétron retorna ao seu estado fundamental emitindo um outro fóton (fluorescência).

Semelhante a qualquer outra técnica espectroscópica, inclusive RPE, como descrito na Sec. 4.4, a emissão de um fóton (fluorescência) só é detectada quando existe uma diferença de população entre os níveis de energia S_a e S_b pois, o fenômeno da radiação estimulada induz a transição $S_a \rightarrow S_b$ e o decaimento $S_b \rightarrow S_a$ com iguais probabilidades. A diferença entre as populações nos níveis de energia é dada pelo fator de Boltzmann,

$$\frac{n_a}{n_b} = e^{-\frac{(E_a - E_b)}{kT}} = e^{\frac{h\nu}{kT}}, \quad (4.51)$$

onde n_a e n_b são as populações do estado a e estado b, respectivamente; E_a e E_b , as energias dos estados a e b respectivamente; k é a constante de Boltzmann; T a temperatura em kelvin; h a constante de Plank; e ν a frequência associada ao fóton. A absorção do fóton só ocorre quando a diferença de energia dos estados singletos é igual a energia do fóton,

$$\Delta E = E_b - E_a = h\nu. \quad (4.52)$$

Obviamente, esta é uma equação idêntica a condição de ressonância para ocorrer a ressonância magnética, Eq. (4.15), com a diferença de que na fluorescência não há a necessidade de um campo magnético externo para induzir a separação dos níveis de energia. Na fluorescência esses níveis de energia são os próprios estados eletrônicos excitados da molécula fluorescente.

Na realidade, todo o processo de desexcitação de uma molécula que absorveu um fóton com energia $h\nu$ é mais complexo, pois existe uma competição entre os processos de desexcitação radiativa (fluorescência) e não radiativa. O processo completo de excitação e desexcitação pode ser resumido no chamado diagrama de Jablonski (Fig.4.14).

Figura 4.14 Diagrama de Jablonski, mostrando os vários processos de desexcitação (Cantor e Shimmel, 1980; Lakowicz, 1983).

A excitação radiativa (absorção do fóton) leva o elétron do seu estado fundamental S_0 (Fig. 4.14), para um dos estados vibracionais do estado excitado eletrônico S_1 . Este é um processo extremamente rápido, cerca de 10^{-15} s (Cantor e Shimmel, 1980), e pode ser descrita pela relação:

A molécula no estado excitado S_1 pode decair por processos radiativos e não-radiativos. O processo de desexcitação radiativa (fluorescência) é o retorno do elétron do nível vibracional mais baixo do estado singleto excitado, para um dos estados vibracionais do estado fundamental S_0 , emitindo um fóton de menor energia (Fig. 4.14). Este processo pode ser descrito como:

onde k_F é a taxa de fluorescência.

As desexcitações não-radiativas, por outro lado, são fatores que governam a intensidade de fluorescência. As principais desexcitações não-radiativas são: a conversão interna, cruzamento inter-sistemas e a supressão (Fig. 4.14).

A conversão interna (Fig. 4.14) é a energia dissipada por colisão com o solvente ou através dos modos vibracionais internos. A conversão interna pode ser descrita pela relação:

onde k_{CI} é a taxa de conversão interna.

O Cruzamento inter-sistemas (fosforescência, Fig. 4.14) é o decaimento por estados excitados tripleto proibidos. O tempo de vida antes da emissão desses estados é bastante longo, sendo de décimos de segundos a segundos. O cruzamento inter-sistemas pode ser escrito pela seguinte relação:

onde k_{IS} é a taxa de cruzamento inter-sistemas.

A supressão é a desexcitação que ocorre por colisão ou por formação de complexo com moléculas capazes de suprimir o estado excitado da molécula fluorescente, representado por

onde k_Q é a taxa de supressão de fluorescência; Q é a molécula supressora de fluorescência; e Q^* é o supressor no estado excitado, que posteriormente se desexcita por processos não-radiativos. Em geral, para ocorrer a supressão, a concentração de supressor deve ser muito maior do que a do fluoróforo.

Figura 4.15. Os efeitos dos níveis vibracionais e eletrônicos no espectro de excitação e emissão de fluorescência. (a) Níveis de energia. (b) Espectro de excitação (—) e o espectro de emissão (- - - - -).

A relaxação vibracional (Fig. 4.15a) é muito mais rápida que a emissão de um fóton, por isso o elétron excitado decai sempre para o nível vibracional de menor energia do estado excitado, antes de fluorescer. Por causa disso, o comprimento de onda de emissão é sempre menor que o de absorção, e o resultado disso é que a maioria, ou todo espectro, é deslocado para comprimentos de onda maiores (energia menor) em relação ao espectro de absorção (Fig. 4.15b). A forma do espectro de emissão será uma imagem rebatida (espelho) do espectro de absorção, desde que as estruturas vibracionais dos estados singletos excitado e fundamental sejam similares.

Todos esses processos não radiativos competem diretamente na despopulação do estado singlete excitado com a fluorescência. Assim a fração de

estados singletos que desexcitam por fluorescência, chamado de rendimento quântico fluorescente, é:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{CI} + k_Q + Q} , \quad (4.58)$$

onde ϕ_F pode ser interpretado como a razão de fótons emitidos por fótons absorvidos pelo sistema. Sistemas com $\phi_F > 0,2$ são considerados como tendo uma fluorescência forte (Cantor e Shimmel, 1980).

A espectroscopia de fluorescência é muito sensível ao meio onde está o fluoróforo, devido ao relativamente longo tempo de vida que a molécula fica excitada no estado singlete antes de decair, entre 10^{-9} e 10^{-8} segundos. Em comparação, a absorção ótica e o dicroísmo circular têm tempos de vida curtos, cerca de 10^{-15} s, portanto a molécula e o meio, nessas técnicas, estão efetivamente estáticos, enquanto na fluorescência o fluoróforo pode interagir com o meio antes de decair. Para intervalos de tempo entre 10^{-9} e 10^{-8} s, vários processos podem ocorrer, como: reações de protonação e desprotonação; relaxação por colisão com solvente; mudanças conformacionais; e qualquer outro processo acoplado a movimentos rotacionais e translacionais.

4.5.2. Fluorescência com vesículas

Uma das aplicações da técnica de Fluorescência é estudar a interação de compostos fluorescentes com membranas modelo.

A metodologia utilizada para a fluorescência de melatonina com vesículas unilamelares foi a seguinte: para uma concentração fixa de melatonina de 2×10^{-5} M em tampão HEPES 10mM, pH 7,4 , $\lambda_{excitação}=278\text{nm}$, largura de fenda de excitação e emissão de 5nm, foram registrados espectros de emissão com várias concentrações de vesícula preparadas pelo método de filtração sob pressão (Sec.

4.1.2). As vesículas foram preparadas com o mesmo tampão da melatonina solubilizada.

4.5.3. Análise da Fluorescência com vesículas

A teoria aplicada para analisar os resultado de fluorescência se baseia no trabalho de Tabak e Borisevith (1992), que parte do pressuposto de que quando o fluoróro interage com a membrana, ocorre uma alteração dos orbitais moleculares do fluoróforo, resultando em alteração do rendimento quântico e deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão. A interação entre a melatonina e a membrana pode ser descrita pelo equilíbrio:

onde L_{liv} é Lipídio livre; M_{liv} é Melatonina livre; LM é o complexo Lipídio-Melatonina; e K_M a constante efetiva de associação, expressa da forma:

$$K_M = \frac{LM}{L_{liv} M_{liv}}, \quad (4.60)$$

onde $[L_{liv}]$ é a concentração de lipídio livre; $[M_{liv}]$ é a concentração de melatonina livre; e $[LM]$ é a concentração do complexo lipídio-melatonina. Neste modelo assume-se que a melatonina têm um número de sítios infinitos na membrana para interagir.

A intensidade total de fluorescência (F) da melatonina, pode ser escrita como uma soma de intensidades relativas a fração de melatonina livre ($F_{mín}$) e a fração de melatonina ligada ($F_{máx}$),

$$F = \phi_{lig} F_{mín} + \phi_{liv} F_{máx} \quad (4.61a)$$

ou

$$F = \frac{M_{lig}}{M_{total}} F_{mín} + \frac{M_{liv}}{M_{total}} F_{máx} , \quad (4.61b)$$

onde ϕ_{lig} é o rendimento quântico da melatonina ligada à membrana; ϕ_{liv} é o rendimento quântico da melatonina livre em solução; M_{total} é a quantidade total de melatonina da suspensão; M_{lig} é a quantidade de melatonina ligada à membrana; M_{liv} é a quantidade de melatonina livre, não ligada à membrana. Diferentemente do que foi utilizado por Tabak e Borisevith (1992), no presente trabalho, $F = F_{mín}$ quando toda a melatonina está ligada ($M_{liv} = 0$ ou $\phi_{liv} = 0$) e $F = F_{máx}$ quando todo o hormônio está todo em solução ($M_{lig} = 0$ ou $\phi_{lig} = 0$), conforme nossos dados experimentais (Sec. 5.3).

Como $M_{liv} = M_{total} - M_{lig}$, podemos reescrever a Eq. (4.61b) como:

$$F - F_{máx} = \frac{M_{lig}}{M_{total}} (F_{mín} - F_{máx}) . \quad (4.62)$$

Utilizando $M_{total} = M_{liv} + M_{lig}$ e invertendo os dois lados da Eq. (4.62), temos

$$\frac{1}{F - F_{máx}} = \frac{1}{F_{mín} - F_{máx}} + \frac{M_{liv}}{M_{lig}} \frac{1}{F_{mín} - F_{máx}} . \quad (4.63)$$

Assumindo que há muito mais lipídio livre do que lipídio complexado, ou seja $[L_{liv}] \gg [LM]$, portanto $[L_{liv}] = [L_{total}]$, e sendo a concentração do complexo lipídio-melatonina igual a melatonina ligada, ou seja $[LM] = [M_{lig}]$, redefinimos a constante efetiva de associação como:

$$K_M = \frac{LM}{L_{liv} M_{liv}} = \frac{M_{lig}}{L_{total} M_{liv}} , \quad (4.64a)$$

ou

$$\frac{M_{liv}}{M_{lig}} = \frac{1}{K_M L_{total}} , \quad (4.64b)$$

e assim,

$$\frac{1}{F - F_{\text{máx}}} = \frac{1}{F_{\text{mín}} - F_{\text{máx}}} + \frac{1}{K_M} \frac{1}{F_{\text{mín}} - F_{\text{máx}}}, \quad (4.65)$$

que é semelhante à equação utilizada por Tabak e Borisevitch (1992).

A correspondência ente K_M e Coeficiente de Partição P é feita tomando-se a Eq. (4.64b) e comparando com a definição de P , escrita na forma:

$$P = \frac{M_{\text{membrana}}}{M_{\text{água}}}, \quad (4.66)$$

onde $[M]_{\text{membrana}}$ é a concentração de melatonina na fase membrana; e $[M]_{\text{água}}$ é a concentração de melatonina na fase aquosa. A concentração de melatonina ligada ($[M]_{\text{lig}}$) da Eq. (4.64b) é relativa ao volume total da amostra, por isso é necessário calcular $[M]_{\text{lig}}$ na fase membrana. Assumindo que o volume de membrana é muito menor que o volume total da amostra, ou seja, $V_{\text{total}} \gg V_{\text{membrana}}$,

$$M_{\text{lig}} = \frac{n_{\text{lig}}}{V_{\text{total}}} \cdot \frac{V_{\text{membrana}}}{V_{\text{membrana}}} = M_{\text{lig membra}} \cdot \frac{V_{\text{membrana}}}{V_{\text{total}}}, \quad (4.67)$$

onde n_{lig} é o número de moles de melatonina ligada ; V_{membrana} é o volume da fase membrana; V_{total} é o volume total da amostra. Utilizando as definições de concentração e número de moles, chegamos à

$$K_M = P \cdot \frac{PM_{\text{Lipídio}}}{\rho_{\text{Lipídio}}}, \quad (4.68)$$

onde $\rho_{\text{Lipídio}}$ é a densidade do lipídio da membrana; $PM_{\text{Lipídio}}$ é o peso molecular do lipídio; e P é o coeficiente de partição. Utilizando $\rho_{\text{Lipídio}} = 1000 \text{g/ml}$ (Lissi e col., 1992) e o Peso Molecular dos fosfolipídios em torno de 700, obtêm-se

$$P = 1,4 \cdot K_M, \quad (4.69)$$

que relaciona a constante de associação com o coeficiente de partição.

4.6. Determinação do Coeficiente de Partição

4.6.1. Partição em sistema clorofórmio/água

Utilizando a própria definição do coeficiente de Partição é possível determinar a partição da melatonina em um sistema contendo duas fases distintas, como o clorofórmio e a água. Reescrevendo a equação de partição, Eq. (4.66), para o sistema clorofórmio/água,

$$P = \frac{\frac{n_{\text{clorofórmio}}}{V_{\text{clorofórmio}}}}{\frac{n_{\text{H}_2\text{O}}}{V_{\text{H}_2\text{O}}}}, \quad (4.70)$$

onde $n_{\text{clorofórmio}}$ é o número de moles de melatonina em clorofórmio; $V_{\text{clorofórmio}}$ é o volume de clorofórmio; $n_{\text{H}_2\text{O}}$ é o número de moles de melatonina em água; e $V_{\text{H}_2\text{O}}$ é o volume de água. Como o clorofórmio e a água formam duas fases distintas quando colocados num mesmo recipiente, é possível dosar, através de absorção ótica, as quantidade de melatonina em cada uma das fases.

A metodologia utilizada foi a seguinte: coloca-se a melatonina solubilizada em uma das fases (água ou clorofórmio); agita-se no vórtex por 3 minutos; centrifuga-se a amostra para separar as fases; dosa-se a concentração de melatonina de cada uma das fases através das medidas de absorção ótica; e utilizando-se a Eq. (4.68) calcula-se o coeficiente de partição do sistema.

4.6.2. Partição em sistema membrana/água

Para a determinação do Coeficiente de Partição (P), Eq. (4.66), da melatonina foi utilizada uma metodologia desenvolvida por Lissi e col. (1990). Este método baseia-se na avaliação do "efeito" sobre a organização da membrana causado por um composto que sofre partição entre as fases aquosa e lipídica. O "efeito" observado pode ser a variação de uma propriedade qualquer da membrana.

O método consiste na obtenção de várias curvas da variação do "efeito" em função do número total de moles (n_T) de melatonina, para diversas concentrações de lipídio, mantendo-se constante o volume da fase aquosa. Assim obtêm-se uma família de curvas de "efeito" para diferentes valores de concentração de lipídio, que permitem a determinação de P.

Assumindo que o "efeito" observado é linearmente proporcional à concentração do composto na membrana (n_M/V_M), a curva do "efeito" em função de n_T para V_M e V_{H_2O} constante, é dada por

$$\text{"Efeito"} = \beta \frac{n_M}{V_M} = \beta \frac{n_T \cdot P}{(V_{H_2O} + P \cdot V_M)}, \quad (4.71)$$

obtendo-se assim, uma reta, para cada concentração de lipídio. O coeficiente angular (α) será menor, quanto maior for a concentração de lipídio da amostra, sendo dado por:

$$\alpha = \beta \frac{P}{(V_{H_2O} + P \cdot V_M)}, \quad (4.72)$$

Fazendo vários experimentos com diferentes concentrações de lipídio, obtêm-se um gráfico de $1/\alpha$ em função de V_M , que pode ser ajustada pela reta:

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{V_{H_2O}}{\beta \cdot P} + \frac{V_M}{\beta}. \quad (4.73)$$

Deste gráfico determina-se o coeficiente angular ($1/\beta$) e o ponto de intercepção do eixo $1/\alpha$ (que é igual a $V_{H_2O}/\beta P$), e desta maneira, calcula-se o coeficiente de partição P.

5. Resultados

5.1. Solubilização e estabilidade da melatonina em meio aquoso

No novo método de solubilização de melatonina em meio aquoso (água ou tampão), conforme Sec. 4.1, a molécula pode ser dosada através da intensidade de absorção ótica em $\lambda=278\text{nm}$, onde $\varepsilon=6300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (para solvente apolar, como etanol, cf. Merck Index, 1989). A solução de melatonina preparada pelo método tradicional, isto é, dissolvida em etanol antes de ser diluída em água, têm o coeficiente de extinção muito próximo do acima citado.

Amostra	Teórico* (M)	Medido (M)	Solvente
1	10^{-4}	$0,9 \times 10^{-4}$	água
2	10^{-4}	$0,9 \times 10^{-4}$	etanol
3	2×10^{-4}	$1,9 \times 10^{-4}$	água
4	2×10^{-4}	$2,1 \times 10^{-4}$	etanol
5	4×10^{-4}	$3,3 \times 10^{-4}$	água
6	4×10^{-4}	$3,0 \times 10^{-4}$	etanol

Tabela 5.1: Comparação entre amostras solubilizadas em água e etanol.

(*) Concentração final caso toda melatonina utilizada para fazer o filme seja solubilizada, calculada a partir da solução estoque.

A Tab. 5.1 mostra as concentrações de soluções de melatonina, preparadas conforme método descrito na Sec. 4.3, que foram determinadas através de medidas de absorção ótica. São comparadas amostras onde o filme seco de melatonina foi solubilizado em água e etanol. É sabido que em etanol a melatonina solubiliza-se completamente.

A Tab. 5.2 mostra um estudo mais abrangente de solubilização da melatonina em água e a respectiva estabilidade das soluções com o tempo.

Amostra	Teórico* (M)	Dosada no mesmo dia (M)	Após 3 dias (M)	Após 10 dias (M)	Após 12 dias (M)
1	2×10^{-5}	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$
2	4×10^{-5}	$3,8 \times 10^{-5}$	-	-	-
3	5×10^{-5}	$4,5 \times 10^{-5}$	-	-	-
4	1×10^{-4}	$8,7 \times 10^{-5}$	-	$8,3 \times 10^{-5}$	-
5	2×10^{-4}	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	-
6	4×10^{-4}	$3,9 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$	-
7	5×10^{-3}	$4,8 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$
8	1×10^{-2}	$7,9 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-3}$	$7,7 \times 10^{-3}$	-
9	1×10^{-2}	$8,4 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-3}$
10	2×10^{-2}	$1,5 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-3}$	-
11	2×10^{-2}	$1,5 \times 10^{-2}$	$8,8 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-3}$
12	2×10^{-2}	$1,9 \times 10^{-2}$	$6,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$

Tabela 5.2: Estudo da solubilização e estabilidade da melatonina em meio aquoso. As soluções de melatonina foram guardadas em geladeira a 4°C. (*) semelhante à Tab. 5.1. Concentrações acima de 4×10^{-4} M de melatonina a amostra foi diluída para medidas de absorção ótica.

Com os dados da Tab. 5.2 foi possível determinar uma concentração máxima de solubilização da melatonina em água, na qual a molécula é estável por um mínimo de 12 dias: $(5 \pm 2) \times 10^{-3} \text{M}$. Este valor é uma média dos experimentos de solubilização realizados, sendo que a Tab. 5.2 mostra somente alguns dados mais representativos. As soluções com concentrações menores do que esta mostraram ser estáveis por um tempo maior (dados não incluído na Tab. 5.2).

Gráfico 5.1. Solubilização da melatonina em água, segundo os dados da Tab. 5.2. Caminho ótico utilizado: 1 cm.

Os espectros de absorção ótica ($240\text{nm} < \lambda < 300\text{nm}$) da melatonina solubilizada pelo novo método em água, ou em tampão hepes 10mM, são idênticos ao da melatonina solubilizada em etanol. A Gráf. 5.2 mostra que a intensidade de absorção da melatonina solubilizada pelo novo método cresce linearmente, obedecendo a lei de Beer-Lambert (Cantor e Shimmel, 1980), no intervalo de concentrações testado:

$$Abs = C \cdot \epsilon \cdot l, \quad (5.1)$$

onde Abs é a absorção ótica ou densidade ótica; C é a concentração da amostra em molar; ϵ é o coeficiente de extinção em $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; e l é o caminho ótico em cm.

Gráfico 5.2. Absorção ótica em $\lambda=278\text{nm}$ para diversas concentrações de melatonina solubilizada em água pelo novo método. Caminho ótico utilizado: 1 cm.

Os espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}}=278\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 300 a 400nm) de melatonina, solubilizada pelo novo método, em água ou tampão HEPES também são idênticos ao da amostra solubilizada pelo método tradicional (com menos que 0,2% álcool). A comparação com espectros de fluorescência de melatonina solubilizada em etanol não é possível, pois em etanol a molécula apresenta um espectro diferente daquele em meio aquoso, como o esperado para um fluoróforo em solvente mais apolar, ocorrendo aumento da intensidade e diminuição do $\lambda_{\text{emissão}}$ máximo (Cantor, 1980; e Lakowicz, 1983) (Fig. 5.13).

Nos experimentos de absorção ótica e fluorescência foram utilizadas concentrações máximas de 4×10^{-4} M e 2×10^{-5} M, respectivamente.

5.1.1. Experimento biológico com a melatonina solubilizada em água

Amostras de melatonina solubilizada em água foram levadas ao laboratório da prof^a. Dr^a. Ana Castrucci, do Instituto de Biociências da USP, onde foram realizados experimentos biológicos por Ana Maria Filadelfi, seguindo protocolo descrito em Ferroni e Castrucci (1987).

Os experimentos consistiram em medir a reflectância de pedaços de pele do sapo *Bufo ictricus*. Em estado não estimulado, os grânulos dos pigmentos dos melanócitos estão agregados perinuclearmente, não havendo alteração na reflectância. Inicialmente foi aplicado α -MSH (hormônio melanócito estimulante) em concentração 10^{-9} M, que causa dispersão máxima dos melanossomos (grânulo de pigmentos dos melanóforos), levando ao escurecimento da pele do animal, com grande diminuição da reflectância. Após 60 minutos, foi aplicado a melatonina na concentração 10^{-6} M nas peles. A medida de reflectância foi realizada após 30 minutos da aplicação da melatonina.

A melatonina solubilizada pelo novo método apresentou o mesmo efeito biológico da melatonina preparada pelo método tradicional (solubilizada em etanol antes de ser diluída em água), ou seja, reverteu cerca de 20% o escurecimento induzido pelo α -MSH, clareando parcialmente a pele do animal (Filadelfi e Castrucci, comunicação oral).

5.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica

5.2.1. Lipossomos de DMPG com SSL

Espectros de RPE do marcador de spin SSL incorporado a lipossomos de DMPG, com e sem a presença de melatonina, foram analisados em 2 grupos: espectros de amostras abaixo da temperatura de transição de fase (para DMPG¹ $T_f=23^\circ\text{C}$, conforme Tab.1.2) e espectros obtidos acima dessa temperatura.

Espectros obtidos abaixo da T_f apresentaram alterações significativas na forma (Fig. 5.1) quando comparados espectros de amostras na presença e ausência de melatonina. Essas alterações na forma espectral foram quantificadas medindo-se a largura de linha total das linhas dos espectros para $m=+1$ e $m=0$ (a largura de linha de $m=-1$ não foi possível medir). Os valores das larguras de linha mostram que a presença de melatonina na bicamada lipídica, provoca o estreitamento das linhas de RPE do SSL (Gráf. 5.3).

Os espectros de RPE de SSL incorporados a lipossomos de DMPG, acima da T_f (Fig. 5.2), não apresentam alterações evidentes na forma espectral, quando na presença e ausência de melatonina. Os espectros apresentam as linhas bastante estreitas, indicando que o marcador SSL tem um movimento bastante rápido nesta faixa de temperatura.

Apesar do estreitamento das larguras de linha dos espectros de RPE de SSL pela presença de melatonina, o parâmetro empírico h_{+1}/h_0 (Sec. 4.4.4.9), a temperaturas abaixo da T_f , apresenta uma variação pequena, ocorrendo inclusive o colapsamento dos valores abaixo de 10°C (Graf. 5.4). Acima da T_f o parâmetro h_{+1}/h_0 , das amostras com 50% e 20% de melatonina, mostra uma grande variação. Entretanto, o valor do parâmetro praticamente não se altera com o aumento da

¹ Neste trabalho foram utilizadas as T_f para DMPG e DMPC da Tab. 1.2, que são valores de literatura.

temperatura, principalmente para as amostras 0% e 20% de melatonina, ocorrendo até um pequeno decréscimo, em temperaturas próximas a 50°C. Este comportamento atípico do parâmetro h_{+1}/h_0 será discutido na Sec. 6.2.2.

Utilizando o programa Lowfit (Bales, 1989), baseado na teoria mostrada na Sec. 4.4.5, foram obtidos as larguras de linha Lorentziana dos espectros de SSL, com e sem a presença de melatonina, em temperaturas acima da T_f . (Gráf. 5.5) (abaixo da T_f , como era esperado, não foi possível a obtenção de bons ajustes para as linhas de RPE com o programa Lowfit, razão pela qual foi feito somente medidas de largura de linha total (Gráf. 5.3)). Apesar da pequena diferença da largura de linha Lorentziana, entre as amostras com e sem melatonina, é evidente uma diminuição da largura de linha Lorentziana com o aumento da relação melatonina/lipídio. A razão entre as larguras de linha Gaussiana e Lorentziana, determinadas através do programa Lowfit, estão dentro da faixa válida exigida pela Eq. (4.49).

Utilizando-se os dados de largura de linha Lorentziana e a metodologia mostrada na Sec. 4.4.4.6, foram calculados os tempos de correlação rotacional $\tau_{20} = \tau_{R_{\perp}}$, τ_{22} e $\tau_{R_{\parallel}}$ (Gráf. 5.6). O eixo X do radical nitróxido (Fig. 4.6) do marcador de spin SSL coincide aproximadamente com o seu eixo longo molecular. Isto significa que o eixo X, é o eixo preferencial de rotação do radical nitróxido (Fig. 4.7a). Os parâmetros para rotação em torno do eixo X, para calcular os τ_R pelas Eqs. (4.33) e (4.34), são dados na Tab. 4.1. Todos os parâmetros B e C, calculados pelas Eqs. (4.29) e (4.30), estão dentro do limite $|C/B|$, da Tab. 4.3, para rotação em torno de X. Os resultados mostram que a presença de melatonina aumenta $\tau_{R_{\perp}}$ (Gráf. 5.6) de membranas de DMPG, indicando que a melatonina provoca um aumento do movimento dos fosfolipídios da bicamada lipídica.

Figura 5.1. Espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos de DMPG com concentrações de melatonina de 0, 20 e 50%. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.3. Variação da largura de linha total dos espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos de DMPG abaixo da temperatura de transição de fase.

Figura 5.2. Espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos de DMPG a 30°C com 0, 20 e 50% melatonina. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.4. Variação com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_0 de SSL incorporado a lipossomos de DMPG, para diversas concentrações de melatonina.

Gráfico 5.5. Larguras de linha Lorentziana de espectros de RPE de SSL em lipossomos de DMPG, calculadas com o programa Lowfit.

Gráfico 5.6. Tempos de correlação calculados a partir dos dados do Gráf. 5.5.

5.2.2. Lipossomos de DMPC com SSL

Ao contrário aos resultados obtidos em DMPG, os espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos de DMPC, abaixo da T_f , não mostraram alterações evidentes da forma do sinal, quando em presença de melatonina (Fig. 5.3). As larguras de linha total de $m=1$ e $m=0$, reforçam a análise qualitativa, também não mostrando alterações nesta faixa de temperatura (Gráf. 5.7). A largura de linha de $m=-1$ não foi possível determinar.

Entretanto, as medidas das relações entre as amplitudes das linhas de campo baixo e central, o parâmetro h_{+1}/h_0 , mostram que os espectros são dependentes da concentração de melatonina no meio, em toda a faixa de temperatura estudada (Gráf.5.8). Inclusive abaixo de 10°C , região onde o h_{+1}/h_0 de RPE de SSL em DMPG não apresenta alteração com a presença de melatonina (Gráf. 5.8).

Os espectros de RPE de SSL em DMPC, acima da T_f , não mostram alterações evidentes na forma do sinal, quando em presença e ausência de melatonina (Fig. 5.4), assim como os espectros de SSL em DMPG.

Acima da T_f , os espectros foram analisados utilizando-se o programa Lowfit (Bales, 1989), Sec. 4.4.5. As larguras de linha Lorentziana (Gráfs. 5.9) mostra somente uma pequena diferença na linha de campo alto ($m=-1$), entre as amostras com e sem melatonina. Ao contrário do que ocorre com as larguras de linha dos espectros de SSL em DMPG, em DMPC a melatonina causa um pequeno aumento da largura dessa linha.

Utilizando-se os dados de largura de linha Lorentziana e a metodologia mostrada na Sec. 4.4.4.6, foram calculados os tempos de correlação rotacional $\tau_{20} = \tau_{R_\perp}$, τ_{22} e $\tau_{R_\parallel}$ (Gráf. 5.10), semelhante ao que foi feito na secção anterior (Sec 5.2.1). Os resultados mostram que a presença de melatonina em lipossomos de DMPC não provoca alteração de $\tau_{R_\perp}$ e $\tau_{R_\parallel}$ (Gráf. 5.10), indicando que a melatonina

não provoca alteração do movimento dos fosfolipídios da bicamada lipídica de DMPC.

Figura 5.3: Espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomo de DMPC com concentrações de melatonina com 0, 20 e 50%. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.7. Variação da largura de linha total dos espectros de RPE de SSL em lipossomos de DMPC abaixo da temperatura de transição de fase.

Figura 5.4. Espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos de DMPC a 30°C com 0, 20 e 50% melatonina. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.8. Variação com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_0 de SSL incorporado a lipossomos de DMPC, para diversas concentrações de melatonina.

Gráfico 5.9. Larguras de linha lorentziana de espectros de RPE de SSL em lipossomos de DMPC, calculadas com o programa Lowfit.

Gráfico 5.10. Tempos de correlação calculados a partir dos dados do Gráf. 5.9.

5.2.3. Lipossomos de DMPG com 5-SASL

Para temperaturas abaixo da T_f (Fig. 5.5), a forma dos espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPG é dependente da concentração de melatonina no meio. A linha central mostra grande alteração para as amostras com a presença de melatonina comparada com amostras sem o hormônio. Essa alteração reflete um aumento da mobilidade e/ou diminuição da ordem da bicamada lipídica, semelhante ao efeito que ocorre com o aumento da temperatura. Por exemplo, qualitativamente o espectro 50% de melatonina a 0° C (Fig. 5.5) é bastante semelhante ao espectro de 0% a 15° C (Fig. 5.5).

O parâmetro $2A_{\text{máx}}$ (Gráf. 5.11), confirma o que foi sugerido no parágrafo anterior, mostrando que para temperaturas abaixo da T_f , espectros de SSL em DMPG de amostras com melatonina, apresentam um valor menor do que espectros de amostras sem o hormônio.

Acima da T_f , apesar dos espectros de 5-SASL em DMPG (Fig. 5.6), obtidos na presença de melatonina, apresentarem uma pequena alteração na região de campo baixo, quando comparado com espectros na ausência do hormônio (os espectros de RPE com 0% de melatonina têm a linha de ressonância mais intensa que a de 20 e de 50%), os valores de $2A_{\text{máx}}$ são semelhantes (Gráf. 5.11).

Como é possível a medida do parâmetro $2A_{\text{mín}}$ (Fig. 4.9) dos espectros de RPE de 5-SASL em DMPG das amostras acima da T_f , foram calculados os valores do parâmetro de ordem efetivo S^{ef} (Sec. 4.4.4.8), para as amostras com e sem melatonina (Gráf. 5.12).

O Gráf. 5.12 mostra resultados equivalentes a aqueles obtidos somente com medidas de $2A_{\text{máx}}$, isto é, na presença de melatonina só é observado uma pequena diminuição de ordem e/ou aumento de mobilidade para temperaturas menores que 25°C.

Figura 5.5. Espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPG com concentrações de melatonina de 0, 20 e 50%. Espectros com áreas normalizadas.

Figura 5.6. Espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPG a 30°C com 0, 20 e 50% de melatonina. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.11. Parâmetro $2A_{máx}$ de espectros de RPE de 5-SASL incorporados a lipossomos de DMPG.

Gráfico 5.12. Parâmetro de ordem efetivo (S^{ef}) de 5-SASL em lipossomos de DMPG, para diversas concentrações de melatonina.

5.2.4. Lipossomos de DMPC com 5-SASL

Espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPC, a temperaturas abaixo da T_f (Fig. 5.7), mostram uma pequena alteração na forma da linha central, de um modo semelhante (mas quantitativamente menor) aos espectros de RPE de 5-SASL em DMPG (Sec. 5.2.3), para amostras com e sem a presença de melatonina. Por exemplo, qualitativamente, o espectro de 50% de melatonina a 0° C é bastante parecido com o espectro de 0% a 5° C. Enquanto em espectros de 5-SASL em DMPG isto ocorre entre espectros de 50% a 0°C e 0% a 15°C. No entanto, em DMPC, esse efeito não se reflete no parâmetro $2A_{\text{máx}}$ (Gráf. 5.13).

Os espectros de RPE de 5-SASL em lipossomos de DMPC acima da T_f , mostram uma pequena alteração na forma de linha de campo alto ($m=+1$). Os espectros na presença de melatonina têm esta linha com uma intensidade relativa maior do que o espectro sem o hormônio (Fig. 5.8). Esse efeito é o oposto aos encontrados para 5-SASL em DMPG, onde a presença da melatonina diminui a intensidade relativa da linha de ressonância de campo baixo (Fig. 5.6). Entretanto este pequeno efeito, como no caso de 5-SASL em DMPG, não se reflete no parâmetro $2A_{\text{máx}}$ (Gráf. 5.13), nem em S^{ef} (Gráf. 5.14).

Figura 5.7. Espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPC com concentrações de melatonina de 0, 20 e 50%. Espectros com áreas normalizadas.

Figura 5.8. Espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPC a 30°C com 0, 20 e 50% melatonina. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.13. Parâmetro $2A_{\text{máx}}$ de espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPC.

Gráfico 5.14. Parâmetro de ordem efetivo (S^{ef}) de 5-SASL em lipossomos de DMPC, para diversas concentrações de melatonina.

5.2.5. Lipossomos de DMPG com 6-DPPC

Em temperaturas abaixo da T_f , os espectros de RPE de 6-DPPC incorporado a lipossomos de DMPG (Fig. 5.9) mostram uma pequena alteração na forma da linha central, quando comparados espectros com e sem a presença de melatonina. Esta alteração é similar a apresentada em espectros de RPE de 5-SASL em DMPC e DMPG (principalmente DMPG), nesta mesma região de temperatura (Secs. 5.2.3 e 5.2.4). Por exemplo, o espectro de RPE de 6-DPPC em DMPG (Fig. 5.9) de 50% de melatonina é muito semelhante ao espectro de 0° C e 0% de melatonina a 15° C, ou seja, a presença de melatonina têm um efeito similar ao aumento da temperatura. Este efeito reflete-se nas medidas de $2A_{\text{máx}}$ (Gráf. 5.15), como para 5-SASL em DMPG (Gráf. 5.11).

Acima da T_f (Fig. 5.10) os espectros de 6-DPPC em lipossomos de DMPG são muito semelhantes, para amostras com e sem a presença de melatonina. Nesta região de temperatura o parâmetro $2A_{\text{máx}}$ não sofre qualquer alteração (Gráf 5.15). E nestes espectros não ocorrem a nenhuma modificação na intensidade da linha de ressonância de campo baixo, como ocorria quando se utilizava o marcador 5-SASL incorporado em DMPG (Figs. 5.6 e 5.8).

Como é possível a medida do parâmetro $2A_{\text{mín}}$ dos espectros de RPE de 6-DPPC em DMPG das amostras acima da T_f , foram calculados os valores do parâmetro de ordem efetivo S^{ef} (Sec. 4.4.4.8), para as amostras com e sem melatonina (Gráf. 5.16).

O Gráf. 5.16 mostra que a altas temperaturas, a melatonina não afeta S^{ef} . Resultado similar ao obtido para o marcador 5-SASL em DMPG e DMPC.

Figura 5.9. Espectros de RPE de 6-DPPC incorporado a lipossomos de DMPG com concentrações de melatonina de 0, 20 e 50%. Espectros com área normalizada.

Figura 5.10. Espectros de RPE de 6-DPPC incorporado a lipossomos de DMPG a 30°C com 0, 20 e 50% melatonina. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.15. Parâmetro $2A_{\text{máx}}$ de espectros de RPE de 6-DPPC incorporados a lipossomos de DMPG.

Gráfico 5.16. Parâmetro de ordem efetivo (S^{ef}) de 6-DPPC em lipossomos de DMPG, para diversas concentrações de melatonina.

5.2.6. Lipossomos de DMPC com 6-DPPC

Espectros de RPE de 6-DPPC incorporados a lipossomos de DMPC, em temperaturas abaixo da T_f (Fig. 5.11), apresentam alterações mínimas na forma na linha central, quando comparadas amostras com e sem melatonina. A análise do parâmetro $2A_{máx}$ destes espectros (Gráf. 5.17) também mostra que não ocorre nenhuma alteração em toda faixa de temperatura estudada.

Novamente, medindo o parâmetro $2A_{mín}$ dos espectros com e sem a presença de melatonina, foi calculado o parâmetro de ordem efetivo (S^{ef}) (Gráf. 5.18), conforme Sec. 4.4.4.8.

Semelhante a 6-DPPC em DMPG e 5-SASL em DMPC e DMPG, o S^{ef} não sofre alterações na presença de melatonina, para temperaturas acima da T_f .

Figura 5.11. Espectros de RPE de 6-DPPC incorporado a lipossomos de DMPC com concentrações de melatonina de 0, 20 e 50%. Espectros com áreas normalizadas.

Figura 5.12. Espectros de RPE de 5-SASL incorporado a lipossomos de DMPC a 30°C com 0, 20 e 50% melatonina. Espectros com áreas normalizadas.

Gráfico 5.17. Parâmetro $2A_{máx}$ de espectros de RPE de 6-DPPC incorporados a lipossomos de DMPC.

Gráfico 5.18 Parâmetro de ordem efetivo (S^{ef}) de 5-SASL em lipossomos de DMPC, para diversas concentrações de melatonina.

5.2.7. Outros lipossomos e marcadores de spin

Além dos resultados apresentados nas secções anteriores, outras amostras de lipossomos, de outros fosfolipídios, com outros marcadores de spin incorporados, com e sem a presença de melatonina, foram estudadas. Os respectivos resultados não estão apresentados aqui porque nenhum efeito foi observado, seja na forma do espectro de RPE ou em algum de seus parâmetros.

Particularmente, os resultados mais interessantes, onde nenhum efeito foi observado, dentro do contexto do presente trabalho, foram com o marcador de spin 12-SASL incorporado a lipossomos de DMPG e DMPC. Este marcador complementa os resultados dos outros marcadores derivados de ácido esteárico, SSL e 5-SASL, pois o 12-SASL monitora principalmente uma região próxima ao final cadeia de hidrocarbonetos do DMPC e DMPG.

Durante o trabalho, foram estudados os seguintes sistemas, onde não foram observados efeitos na presença de melatonina: lipossomos de fosfatidil colina de ovo (um lipídio insaturado), com marcadores de spin 5-SASL e 12-SASL em presença de 0, 10 e 20% de melatonina, com a temperatura variando de 0 a 40°C (nesta faixa de temperatura este lipídio está na fase líquido-cristalina); lipossomos de DMPC com 12-SASL em presença de 0 e 20% de melatonina, com a temperatura variando de 0 a 40°C; lipossomos de DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina) com os marcadores CSL (3-doxil-5-colestano) e 12-DPPC (1-palmitoil-2-(12-doxilesteroil)-fosfatidil colina) com 0 e 50% de melatonina, com a temperatura variando de 0 a 50°C (a transição de fase deste fosfolipídio é 42°C); lipossomos de DMPG com CSL e 0, 5, 20 e 50% de melatonina em tampão HEPES 50mM, pH 7,4, com a temperatura variando de 0 a 40°C; lipossomo de DMPG com 12-SASL e 0, 20 e 50% de melatonina em tampão HEPES 50mM, pH 7,4, com a temperatura variando de 0 a 50°C.

5.3. Fluorescência de melatonina com vesículas

Utilizando o método descrito na Sec. 4.5 foram realizados experimentos de fluorescência estática com melatonina, na presença de vesículas unilamelares de DMPG e DMPC a temperatura de 30°C (acima da T_f). As amostras foram preparadas conforme Sec. 4.1.2 e dosadas conforme Sec. 4.2. A melatonina em meio aquoso, quando excitada em $\lambda = 278\text{nm}$, fluoresce com um máximo de intensidade em torno de $\lambda = 350\text{nm}$. A Fig. 5.17 mostra espectros característicos de melatonina em solução aquosa e etanol.

Em presença de concentrações de fosfolipídios até 3mM, ou seja, uma relação aproximadamente de 200:1 (200 lipídios para uma 1 melatonina), não foi observado nenhum deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão

da fluorescência da melatonina. Entretanto foi observada diminuição da intensidade do espectro de emissão (Fig. 5.14) da melatonina, tanto na presença de vesículas de DMPG quanto na de vesículas de DMPC, conforme mostra os Gráficos 5.19 e 5.20.

Figura 5.13. Espectros de fluorescência de Melatonina $1,6 \times 10^{-5} \text{M}$. Espectro (a) em etanol, com máximo em torno de 330 nm e em (b) tampão HEPES 50mM pH 7,4, com máximo em torno de 350 nm. Excitação em $\lambda = 278 \text{ nm}$.

Figura 5.14. Espectros de fluorescência de Melatonina $1,6 \times 10^{-5} \text{M}$ na presença de vesícula de DMPC. a) melatonina em tampão, e b) melatonina em presença de vesícula de DMPC. Excitação em $\lambda = 278 \text{ nm}$.

Gráfico 5.19. Diminuição da intensidade de fluorescência no máximo de emissão ($\lambda = 350 \text{ nm}$) em função da concentração de vesícula de DMPC. Dados experimentais ajustados com regressão linear. Excitação em 278 nm .

Gráfico 5.20 Diminuição da intensidade de fluorescência no máximo de emissão ($\lambda = 350\text{nm}$) em função da concentração vesículas de DMPG. Dados experimentais ajustados com regressão linear. Excitação em 278nm.

Estes resultados foram analisados, utilizando-se o método desenvolvido na Sec. 4.5.3.

Gráfico 5.21. Análise dos dados de fluorescência da melatonina em presença de vesículas de DMPC, segundo a metodologia desenvolvida na Sec. 4.5.3.

Gráfico 5.22. Análise dos dados de fluorescência da melatonina em presença de vesículas de DMPG, segundo a metodologia desenvolvida na Sec. 4.5.3.

Utilizando os resultados de regressão linear obtidos nos Gráfs. 5.21 e 5.22 e ajustando-os com a Eq. (4.65), foram calculados as constantes efetiva de ligação (K_M) da melatonina com vesículas de DMPC e DMPG. Assim, para

$$\text{DMPC} \quad K_M = 1.090 \text{ M}^{-1}$$

e para

$$\text{DMPG} \quad K_M = 7.900 \text{ M}^{-1} .$$

5.4. Determinação do Coeficiente de Partição (P)

A fim de determinar o coeficiente de partição da melatonina foram realizados três experimentos: um preliminar utilizando um sistema água/clorofórmio, um utilizando RPE com o formalismo mostrado no Sec. 4.6, e o terceiro utilizando os resultados de fluorescência da Sec. 5.3.

5.4.1. Partição da melatonina em sistema clorofórmio/água

Clorofórmio e água são solventes não miscíveis e formam duas fases distintas quando colocados num mesmo recipiente. Utilizando esta propriedade foi possível determinar o Coeficiente de Partição (P) do sistema clorofórmio/água, diretamente da sua definição, a Eq. (4.70).

O método utilizado está descrito na Sec. 4.6.1.

Diversos volumes de clorofórmio e de água, com diversas concentrações de melatonina, solubilizada inicialmente em água ou em clorofórmio, foram utilizados. A Tab. 5.3 mostra as diversas relações utilizadas e o coeficiente de partição correspondente a cada amostra.

Amostras	Antes de misturar as fases				após misturar fases		
	V_{H_2O} (ml)	n_{H_2O} (mol)	V_{clorof} (ml)	n_{clorof} (mol)	n_{H_2O} (mol)	n_{clorof} (mol)	P
A	7,5	6×10^{-7}	7,5	-	$6,0 \times 10^{-8}$	$5,4 \times 10^{-7}$	9
B	7,5	-	7,5	6×10^{-7}	$6,0 \times 10^{-8}$	$5,4 \times 10^{-7}$	9
C	1,0	10^{-5}	1,0	-	$4,0 \times 10^{-7}$	$9,6 \times 10^{-6}$	24
D	0,4	2×10^{-6}	0,4	-	$2,0 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-6}$	12
E	0,9	10^{-6}	0,1	-	$4,0 \times 10^{-7}$	$6,0 \times 10^{-7}$	14
F	0,9	$4,5 \times 10^{-6}$	0,1	-	$3,0 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	18

Tabela 5.3: Experimentos de partição para sistema clorofórmio/água. V_{H_2O} e V_{clorof} são volume de água e volume de clorofórmio respectivamente; n_{H_2O} e n_{clorof} são respectivamente número de moles de melatonina em água e em clorofórmio. Para o cálculo de P foi utilizado a Eq. (4.70).

Calculando-se a média dos resultados de partição, obtêm-se o seguinte valor para o sistema clorofórmio/água : $P = 15 \pm 5$.

5.4.2. Partição da melatonina em sistema membrana/solução aquosa por RPE

Utilizando-se o método desenvolvido na Sec. 4.6.2, foi determinado o Coeficiente de Partição (P) de melatonina com membranas modelo (lipossomos) de DMPC, através de RPE do marcador de spin SSL incorporado a membrana, a temperatura de 30°C.

O "efeito" utilizado é a diferença entre o parâmetro h_{+1}/h_0 da amostra sem melatonina (branco) e o parâmetro da amostra h_{+1}/h_0 da amostra com melatonina, em porcentagem, assim calculado:

$$"Efeito" = \left(\frac{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{melatonina} - \left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{branco}}{\left(\frac{h_{+1}}{h_0}\right)_{branco}} \right) \cdot 100 \quad (5.2)$$

Foram utilizadas amostras de DMPC nas concentrações de 6, 10, 15 e 20mg/ml, o equivalente a 8,9 , 14,8 , 22,1 e 29,5mM. A concentração de marcador SSL utilizada foi sempre $0,9 \times 10^{-4}M$, que corresponde a 1% molar da amostra de 6mg/ml (ou 8,9mM), que foi a menor concentração de DMPC utilizada. As concentrações de melatonina utilizadas foram: 2, 4, 6, 8mM.

O Gráf. 5.23 mostra os resultados do "efeito" medido em função da quantidade de melatonina, onde o volume da solução aquosa (V_{H_2O}) está normalizado para 1 ml (conforme método desenvolvido por Lissi e col., 1990).

Gráfico 5.23. Efeito (alteração no parâmetro h_{+1}/h_0) em função da quantidade de melatonina (número total de moles). Normalizado $V_{H_2O} = 1$ ml (ver texto).

Calculando-se o coeficiente angular de cada curva do Gráf. 5.23, através de regressão linear, faz-se o gráfico do inverso do coeficiente ($1/\alpha$) em função do volume de membrana para cada amostra. Asumindo, como em Lissi e col. (1990), a densidade do lipídio igual a 1 g/ml, obtemos o resultado que está mostrado no Gráf. 5.24.

Gráfico 5.24. O inverso dos diversos coeficientes angulares das regressões lineares do Gráf. 5.23 em função do volume de membrana. Normalizando para $V_{H_2O} = 1$ ml, conforme texto.

Utilizando a equação (4.73) e os resultados da regressão linear do Gráf. 5.24, foi calculado o valor do Coeficiente de Partição para DMPC a 30°C:

$$P = (30 \pm 15).$$

O valor de P em membranas é muito próximo do determinado no sistema clorofórmio/água. Foi também realizado o mesmo experimento para a temperatura de 35 °C, e o P encontrado está dentro do erro do valor obtido acima.

5.4.3. Partição da melatonina em sistema membrana/solução aquosa por fluorescência

A partir das constantes efetivas de ligação (K_M) de fluorescência obtidos ns Sec. 5.3, é possível, através da Eq. (4.69), deduzida na Sec. 4.5.3, calcular o

coeficiente de Partição da melatonina em sistema membrana/meio aquoso, para membranas de DMPC e DMPG.

Assim o Coeficiente de Partição a 30°C, conforme Eq. (4.69), a partir dos resultados de fluorescência da Sec. 5.3 são:

$$\text{DMPC} \quad \mathbf{P} = 1.600$$

$$\text{DMPG} \quad \mathbf{P} = 11.560$$

Valores bastante altos e que não concordam com os resultados de partição obtidos com RPE (Sec. 5.3.2) e com sistema clorofórmio/água (Sec. 5.3.1). Isso será discutido na Sec. 6.

6. Discussão

6.1. Solubilização da melatonina em meio aquoso

A melatonina solubilizada diretamente em meio aquoso (novo método, Sec. 4.3 e 5.1) têm a grande vantagem de evitar a presença de pequenas quantidades de etanol, ou outro solvente orgânico, que possa prejudicar o experimento, seja ele de natureza biológica ou físico-química. Na literatura, todas as soluções de melatonina são preparadas dissolvendo-se, primeiramente, a melatonina cristalizada com um pequeno volume de etanol ou dimetilsulfóxido, para em seguida ser acrescentado o meio aquoso (Heward e Hadley, 1975; Pierce e Besharse, 1986; Sugden, 1992; Durlach-Misteli e Ree, 1992; Golombeck e col., 1992). Na Sec. 5.1, foi mostrado que a melatonina pode ser solubilizada diretamente em meio aquoso, em concentrações até 5mM, sendo que esta preparação é estável por pelo menos 12 dias (Gráf.5.1). Um valor de solubilidade alto, para um composto até então considerado insolúvel em meio aquoso.

Em amostras solubilizadas pelo novo método, com concentrações até 0,4mM de melatonina, nenhuma alteração é observada em seus espectros de absorção ótica, ou de fluorescência, quando comparados com os de amostras preparadas pelo método tradicional. Além disso o Gráf. 5.2, mostra uma dependência linear da absorção ótica com a concentração, indicando que não existe a formação de agregados de melatonina nesta faixa de concentrações estudada. Para concentrações entre 0,4 mM e 5mM, apesar de não terem sido feitas medidas de absorbância, as soluções de melatonina são transparentes, sugerindo que a molécula encontra-se monomérica. Para testar-se a inexistência de agregados, serão utilizadas cubetas de menor caminho ótico, que possibilitam medidas de absorção ótica de soluções mais concentradas. Além disso, serão realizados

experimentos de RPE, onde prepara-se um filme contendo melatonina e um marcador de spin hidrofóbico, que não se solubiliza em meio aquoso, como por exemplo o CSL (3-doxil-5-colestano) ou algum fosfolípido marcado. Ao ser adicionado a solução aquosa ao filme, caso a melatonina forme agregados, o marcador tenderá a intercalar-se nestes sítios hidrofóbicos e a amostra apresentará um sinal de RPE. Caso contrário, o marcador não se solubilizará e a amostra não apresentará sinal de RPE, ou apresentará um sinal muito largo, devido à formação de agregados de marcador.

Para completar a validade do novo método, o experimento biológico (Sec. 5.1.1) confirmou que a melatonina assim solubilizada não perde sua atividade biológica.

A melatonina não é uma molécula completamente apolar: têm um átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel indol, comum ao triptofano, que pode ser um doador de hidrogênio (Stryer, 1988). Este hidrogênio pode fazer uma ponte de hidrogênio com a molécula de água, e ajudar a solubilizar a melatonina. Uma possível explicação para a alta solubilidade da melatonina, talvez esteja no fato de que o filme expõe mais esse grupo doador de hidrogênio às moléculas de água do que a forma cristalizada da melatonina, facilitando assim a formação de pontes de hidrogênio. Foi também mostrado recentemente, que o núcleo de benzeno (que está no centro da molécula de melatonina) pode fazer pontes de hidrogênio com as moléculas de água (Suzuki e col., 1992; Klemperer, 1992), dependendo da disposição espacial entre as duas moléculas. No presente trabalho, o filme de melatonina também tornaria este núcleo benzênico mais acessível às moléculas de água, facilitando assim a formação dessas pontes de hidrogênio.

Biologicamente, a albumina têm sido considerada na literatura o carregador da melatonina no plasma sanguíneo, já que o hormônio era considerado insolúvel em meio aquoso, e têm sido sempre detectado associado a esta proteína

em experimentos com soro de sangue (Cardinali e col., 1972). Entretanto, como foi mostrado neste trabalho, que a melatonina tem uma alta solubilidade em meio aquoso, daí a necessidade do carregador pode ser questionada, pois o hormônio pode difundir-se monomericamente no plasma, onde sua concentração é da ordem de 10^{-9}M .

Por fim, resta discutir a relevância biológica da alta solubilidade da melatonina em meio aquoso. Esta é uma questão delicada, pois implica em discutir questões complexas, como o próprio mecanismo de interação da melatonina com a membrana celular, ou o mecanismo que leva a melatonina a atravessar a membrana plasmática da célula e atuar no seu núcleo (Tan e col., 1993), ou ainda, a mais recente discussão, da relevância da melatonina enquanto agente antioxidante natural (Reitel e col., 1993). Estes são temas que atualmente não temos condições de discutir mais aprofundadamente e serão retomados no futuro, com mais dados experimentais.

6.2. Interação da melatonina com membranas lipídicas

Os resultados de RPE mostram claramente que a melatonina interage com membranas lipídicas. Qualitativamente, o maior efeito foi observado em lipossomos onde o marcador de spin incorporado têm o radical nitróxido na região da cabeça polar (SSL, Fig. 3.2a). Com 5-SASL e 6-DPPC (Fig. 3.2b e 3.2d), que têm o radical nitróxido na cadeia de hidrocarbonetos, mas ainda próximo à região da cabeça polar, só foi observado efeito abaixo da T_f . Com o 12-SASL, que têm o nitróxido próximo ao final da cadeia, portanto monitorando principalmente a região próxima ao final da cadeia de DMPC e de DMPG (são fosfolipídios que têm cadeias de 14 átomos de carbono), nenhum efeito foi observado.

Quanto aos fosfolipídios utilizados, foi observado que lipossomos de DMPG (cabeça polar com carga total -1) apresentaram um efeito maior do que os de DMPC (cabeça polar carga líquida neutra), indicando que a melatonina interage mais fortemente com membranas de fosfolipídios carregados do que "zwitteriônicos" (carga líquida zero). Sendo a melatonina uma molécula neutra, não é esperado que a diferença de carga das cabeças polares desses dois fosfolipídios, seja responsável por esse efeito.

6.2.1. Comparação entre estruturas de membranas de DMPG e DMPC. Posição dos marcadores de spin na membrana

A Fig. 6.1 mostra, de maneira simplificada, como os marcadores de spin utilizados no presente trabalho, intercalam-se em membranas de DMPC, baseado em estudos de redução do sinal de RPE por ascorbato, em lipossomos de fosfatidil colina de ovo, em pH entre 6,2 e 6,8 (Schreier-Muccillo e col., 1976). Nota-se ainda que o radical nitróxido do SSL, incorporado a estes lipossomos, está posicionado na região da cabeça polar, bastante próximo da interface fosfolípido-água, pois é bastante acessível ao ascorbato (Schreier-Muccillo e col., 1976). O nitróxido do 5-SASL fica na cadeia de hidrocarbonetos, mas ainda próximo à região da cabeça polar. No 12-SASL, o nitróxido fica próximo ao final da cadeia de hidrocarbonetos da membrana. Deve ser ressaltado aqui que a Fig. 6.1 é um esquema estático das posições dos marcadores na bicamada lipídica, pois é sabido que devido à flexibilidade das cadeias de hidrocarbonetos, acima da T_f , os ácidos esteáricos marcados no carbono 10, 12 e 16 interagem com moléculas próximas à região da cabeça polar (Yin e Hyde, 1988; Ellena e col., 1988). Foi utilizado o posicionamento estático dos marcadores em membrana de DMPC, porque este fosfolipídio têm a mesma cabeça polar da fosfatidil colina de ovo, utilizada no

trabalho de Schreier-Muccillo e col. (1976), em que se baseou a montagem da Fig. 6.1. Também não foi explicitado a diferença de posições do 5-SASL em suas formas carregada e neutra, que será discutida mais adiante.

Figura 6.1. Representação esquemática estática da posição em que os marcadores de spin utilizados se intercalam na membrana DMPC, em pH entre 6,2 e 6,8. Adaptado de Shreier-Muccillo e col. (1976).

Espera-se que membranas de fosfolipídios "zwitteriônicos" tenham uma estrutura mais compactada lateralmente, pois não apresentam cargas líquidas nas cabeças polares para repelirem-se mutuamente. Ou seja, as membranas "zwitteriônicas" devem ser menos fluidas do que as carregadas, pois seus fosfolipídios devem ter um menor grau de mobilidade. Os resultados experimentais do presente trabalho confirmam esta previsão, quando são comparados o parâmetro

$2A_{\text{máx}}$ (ou S^{ef}) e as larguras de linha de ressonância (ou τ_R), dos marcadores de spin incorporados a lipossomos de DMPC ("zwitteriônico") e de DMPG (carregado).

Em temperaturas abaixo da T_f , o Gráf. 6.1 mostra quantitativamente que a membrana de DMPC têm um "empacotamento" maior (menor fluidez) do que a membrana de DMPG, na região da cabeça polar, pois a largura total da linha $m=+1$ do SSL, em DMPC, apresenta-se mais alargada do que a da linha do SSL em DMPG. A linha $m=0$ apresenta uma variação semelhante ao Gráf. 6.1.

Acima da T_f , somente a linha $m=-1$, onde é esperado maior efeito, apresenta uma variação da largura de linha Lorentziana, próximo a região da T_f (Gráf. 6.2). Novamente é o DMPC que se apresenta mais alargado, mostrando que o DMPC é ligeiramente mais rígido (menos fluido) do que o DMPG. Nesta região de temperatura, as membranas estão na fase líquido-cristalino, onde as cadeias de hidrocarbonetos apresentam um grande desordenamento (Sec. 1.2.5 e 1.2.6) em relação a fase gel, e é esperado que as diferenças de fluidez sejam pequenas entre DMPC e DMPG.

Figura 6.1. Largura de linha total de SSL incorporado a lipossomos de DMPC e DMPG, sem a presença de melatonina.

Figura 6.2. Largura de linha Lorentziana de SSL incorporado a lipossomos de DMPC e DMPG, sem a presença de melatonina.

O 6-DPPC, que monitora uma região mais interna da bicamada lipídica, quando comparado com SSL mostra uma variação de fluidez entre DMPC e DMPG somente em temperaturas altas. Acima de 35°C, o S^{ef} mostra-se ligeiramente maior em DMPC do que em DMPG (Fig. 6.3b), indicando que a membrana de DMPC está mais rígida do que a de DMPG. Abaixo da T_f , o parâmetro $2A_{máx}$ do 6-DPPC não mostra nenhuma variação entre DMPC e DMPG (Fig. 6.3a).

Figura 6.3.a e 6.3.b. Parâmetro $2A_{\text{máx}}$ e S_{ef} obtidos de espectros de RPE de marcadores 5-SASL e 6-DPPC em DMPC e DMPG, sem a presença de melatonina.

O marcador 5-SASL, diferentemente do 6-DPPC, apresenta variações grandes, quando comparados os parâmetros que caracterizam a fluidez de DMPC e DMPG. Acima da T_f , a membrana de DMPC apresenta S_{ef} bem maior do que a de DMPG (Fig 6.3b). Abaixo da T_f , a variação do parâmetro $2A_{\text{máx}}$ entre as duas membranas é pequena e ocorre uma inversão, ou seja, $2A_{\text{máx}}$ do 5-SASL em DMPG apresenta um valor maior do que em DMPC (Fig. 6.3a). Este último resultado não será discutido aqui.

Acima da T_f , esta diferença no grau e natureza de variação do $2A_{\text{máx}}$ e do S_{ef} , do 5-SASL e do 6-DPPC em membranas de DMPG e DMPC, pode ser devido a dois fatores: a) o 5-SASL pode ser, realmente, um marcador mais sensível a variações de fluidez da membrana do que o 6-DPPC; e/ou a Fig. 6.3 pode estar simplesmente refletindo o fato de que b) o 5-SASL posiciona-se mais

profundamente na bicamada de DMPG do que na de DMPC, como discutido a seguir.

O posicionamento de marcadores de spin derivados de ácido esteárico na membrana lipídica, como o 5-SASL, têm sido objeto de discussão na literatura, pelos seguintes fatos:

i) o pKa do grupo carboxila da cabeça polar destes marcadores em membrana, depende da carga da cabeça polar dos fosfolipídios da bicamada. Em DMPC, estes marcadores têm pKa de 6,5 enquanto em DMPG, o pKa pode aumentar em até 1 unidade, ou seja, 7,5 (Egret-Charlier e col., 1978; Ptak e col., 1980). Portanto, em pH 7,4, utilizado no presente trabalho, em DMPC o 5-SASL estaria aproximadamente 90% na sua forma carregada e em DMPG somente 50% carregada;

ii) as formas carregada e neutra dos ácidos esteáricos poderiam ocupar diferentes posições na bicamada lipídica. A forma carregada ficaria mais próxima à região da cabeça polar dos fosfolipídios do que a neutra. Esses dois diferentes posicionamentos dariam origem a sinais de RPE ligeiramente diferentes (Sanson e col.; 1976; Ptak e col., 1980).

Pelo exposto acima poderia atribuir-se os diferentes resultados com DMPC e DMPG, encontrados no presente trabalho, aos diferentes sítios que o marcador 5-SASL estaria monitorando dentro da membrana lipídica. Entretanto, este argumento não é verdadeiro por duas razões: a) em DMPC, onde o marcador está principalmente em sua forma carregada e portanto, mais próximo à região da cabeça polar, que parece ser a região onde se insere a melatonina, observou-se menores alterações no sinal de RPE do 5-SASL quando em presença do hormônio; b) os resultados obtidos com o marcador 5-SASL, derivado de ácido graxo, e o marcador 6-DPPC, derivado de fosfolipídio, são bastante semelhantes, quando

comparadas amostras com e sem a presença de melatonina, assunto que será discutido mais adiante.

Ao contrário do parágrafo anterior, essa diferença de posicionamento do 5-SASL, em membranas de DMPC e DMPG é de fato observada, quando se compara os valores de S_{ef} nas 2 membranas (Fig. 6.3b). Os menores valores de S_{ef} do 5-SASL em DMPG podem estar relacionados com o fato do marcador estar "enxergando" uma posição mais interna da bicamada lipídica (Hubbell e McConnell, 1971). A discussão sobre o posicionamento do 5-SASL fica em aberto, pois os resultados são escassos e este estudo será retomado no futuro.

Outro parâmetro que mostra a diferença de estrutura entre as membranas de DMPC e de DMPG é o desdobramento hiperfino isotrópico A_0 (Secs. 4.4.5 e 4.4.4.8). Este parâmetro é bastante sensível à polaridade do meio em que se encontra o radical nitróxido (Marsh, 1981). Quanto mais polar o meio, maior será o valor de A_0 . Os Gráfs. 6.4 e 6.5 mostram a variação dos desdobramentos hiperfinos A_0 do SSL, 5-SASL e 6-DPPC em tampão, e incorporados a DMPG e DMPC, para temperaturas acima da T_f .

Figura 6.4. Desdobramento hiperfino A_0 do SSL. Os valores de A_0 foram determinados com a utilização do programa Lowfit.

Figura 6.5. Desdobramento hiperfino do 5-SASL e 6-DPPC em DMPC e DMPG. O A_0 do 5-SASL em tampão foi determinado utilizando-se o programa Lowfit e A_0 em membrana lipídica foi calculada pela Eq. (4.46).

O Gráf. 6.4 mostra que o SSL têm A_0 bastante diferente dentro e fora da membrana, indicando que a polaridade da região da cabeça polar, onde se encontra o radical nitróxido na membrana, é menor do que a polaridade do tampão. O A_0 do SSL em membrana é ligeiramente maior em DMPG do que em DMPC, mostrando que a região onde está o nitróxido do SSL, deve ser um pouco mais polar em DMPG. Isto ocorre provavelmente porque a membrana de DMPG é mais fluida e mais acessível às moléculas de água, devido a sua carga na cabeça polar.

O Gráf. 6.5 mostra, que o radical nitróxido dos marcadores de spin utilizados, derivados de ácido esteárico e fosfolípido, estão numa região da bicamada mais apolar do que o tampão (região das cadeias de hidrocarbonetos),

como era esperado e também mais apolar do que a região do nitróxido do SSL (menor A_0). Devido ao erro experimental das medidas de A_0 do 5-SASL e 6-DPPC em DMPC e DMPG, nada pode ser concluído, além do que foi dito no início do parágrafo, acerca da localização desses marcadores na membrana lipídica. A presença de melatonina em lipossomos de DMPG e DMPC, com esses marcadores incorporados, não causa alterações em A_0 que sejam distinguíveis do erro experimental (dados não mostrados).

Uma análise mais detalhada sobre cada sistema de marcador e fosfolípido estudado é feita nos tópicos a seguir.

6.2.2. Marcador SSL incorporado em lipossomos de DMPG e DMPC

6.2.2.1. Acima da T_f , o espectro de SSL incorporado a lipossomos têm as linhas de RPE bastante estreitas (Fig. 5.2), caracterizando-se por apresentar a linha de campo baixo mais intensa do que as demais, devido a rotação mais rápida em torno do eixo X (Fig. 4.6a). Espectros de RPE de SSL, incorporados a filmes orientados de fosfatidil colina de ovo (Schreier-Muccillo e col., 1973), acima da T_f , mostraram que o espectro obtido com o campo magnético externo paralelo à bicamada não difere muito, na forma, do espectro obtido com o campo perpendicular à bicamada. Isto indica que o SSL nessas membranas têm bastante liberdade de movimento pouca anisotropia, e portanto, uma ordem muito baixa. Por esta razão foi utilizado o algoritmo de Bales (1989), para a análise de espectros de SSL em DMPG e DMPC, acima da T_f . O algoritmo permitiu separar as contribuições Lorentziana e Gaussiana das linhas de ressonância dos espectros dessas amostras. Com as larguras de linha Lorentzianas, obtidas através do algoritmo de Bales (1989), foi possível o cálculo dos tempos de correlação rotacional paralelo ($\tau_{R\parallel}$) e perpendicular ($\tau_{R\perp}$) ao eixo preferencial de rotação do

radical nitróxido (eixo X) (Gráf. 5.6 e 5.10). A presença de melatonina em membrana de DMPG aumenta a mobilidade dos fosfolipídios no plano da bicamada, pois é evidente a diminuição de $\tau_{R\perp}$ de amostras com 50% do hormônio (Gráf. 5.6), enquanto $\tau_{R\parallel}$ praticamente não se altera. A melatonina em membranas de DMPC não altera a mobilidade dos fosfolipídios da bicamada (praticamente não há alteração de $\tau_{R\parallel}$ e $\tau_{R\perp}$, Gráf. 5.10). Ou seja, qualitativamente, comparando-se DMPG e DMPC, a presença da melatonina torna uma membrana "pouco empacotada" (pouca mobilidade) na região da cabeça polar (DMPG) mais fluida (com maior mobilidade); enquanto sua presença em uma membrana com grau maior de "empacotamento" na região da cabeça polar (DMPC) não altera a sua fluidez.

A análise do τ_R concorda com a análise do desdobramento hiperfino isotrópico A_0 , que mostra que existe uma variação de polaridade da região da cabeça polar de DMPG, monitorada pelo radical nitróxido do SSL, em presença de melatonina (Fig. 6.6), em temperaturas acima da T_f . A presença de melatonina torna a região da cabeça polar, da membrana de DMPG, mais polar. É possível que em DMPG a melatonina, facilite o acesso de moléculas de água à esta região da bicamada provocando o aumento de τ_R e da polaridade. Em DMPC, não ocorre a variação de A_0 (dados não mostrados).

Gráfico 6.6. Desdobramento hiperfino isotrópico do SSL em tampão e DMPG com a presença de melatonina.

Por fim, deve-se ressaltar que a comparação entre DMPG e DMPC, realizada nesta secção, não levou em conta a natureza da estrutura química das cabeças polares destes fosfolipídios. A discussão restringiu-se, ao efeito das cargas das cabeças polares na fluidez da bicamada. Certamente entre o DMPC e o DMPG existe, nesta região, uma diferença na estrutura química, na distribuição espacial dos átomos e orbitais moleculares, que também podem influenciar a interação com a melatonina. Estudos futuros incluem experimentos com fosfolipídios com a mesma cadeia de hidrocarbonetos (ácido mirístico) mas, com cabeças polares de diferentes natureza, tanto em relação a cargas quanto a estruturas químicas. Este trabalho será realizado não só para estudar a interação da melatonina com membranas lipídicas mas, também, para aprofundar o conhecimento sobre estruturas de membranas de diferentes fosfolipídios. Este estudo, mais básico sobre estruturas de membranas, foi realizado no presente trabalho, de modo indireto e incipiente, ao comparar-se a interação da melatonina com dois fosfolipídios, o DMPG e o DMPC (Sec. 6.2.1).

6.2.2.2. Abaixo da T_f , o algoritmo de Bales não pôde ser aplicado aos espectros de RPE de SSL em lipossomos pois suas linhas são bastante alargadas (anisotrópicos). Mas as larguras de linha das ressonâncias de campo baixo ($m=+1$) e campo médio ($m=0$) do SSL mostram uma grande alteração na presença de melatonina em lipossomos de DMPG (Gráf. 5.3) e, praticamente nenhuma para DMPC (Gráf. 5.7). A presença da melatonina em membranas de DMPG diminui a anisotropia (diminuição das larguras de linha) dos lipídios, enquanto em de DMPC sua presença praticamente não afeta a estrutura da bicamada.

Trabalhos futuros incluem estudos com simulação de espectros de RPE de marcador de spin SSL, com movimento lento ($\tau_R > 10^{-9}s$), utilizando algoritmos como o desenvolvido por Schneider e Freed (1989), para uma melhor compreensão das alterações que ocorrem nos espectros, em temperaturas abaixo da T_f . Será realizado, ainda, RPE de SSL incorporado a filmes orientados, com e sem a presença de melatonina. Esta a técnica possibilita a detecção de efeitos pequenos, como os observados no trabalho, e a sua análise, assim como a simulação e a análise de espectros de RPE, está melhor estabelecida na literatura (Smith e Butler, 1976).

6.2.2.3. O Parâmetro h_{+1}/h_0 , abaixo da T_f , não apresenta variação para SSL em DMPG, comparando amostras com e sem a presença de melatonina (Gráf. 5.4). Entretanto, nesta região de temperatura, estes mesmos espectros de SSL em DMPG apresentam as linhas de RPE bastante estreitadas (Fig. 5.1 e Gráf. 5.3), quando comparados com amostras sem a presença de melatonina, indicando um grande efeito do hormônio nas bicamadas. Em contrapartida, em DMPC ocorre exatamente o contrário: abaixo da T_f não ocorre alteração na largura das linhas (Gráf. 5.7), mas h_{+1}/h_0 apresenta uma grande variação comparando-se espectros com e sem melatonina, nesta mesma faixa de temperatura. Acima da T_f , h_{+1}/h_0

varia pouco com a temperatura (Gráfs. 5.4 e 5.8), mostrando que este parâmetro não é sensível à mobilidade dos fosfolipídios, apesar da comparação entre as amostras com e sem melatonina, seja em DMPC ou DMPG, apresentarem uma variação expressiva.

Na literatura existem poucos trabalhos com SSL incorporado a lipossomos. Uma dessas referências é o trabalho de Hsia e col. (1970), que é bastante qualitativo. Este trabalho mostra que ocorrem alterações na forma de espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos de fosfatidil colina de ovo, quando o colesterol é incorporado a membranas, em temperaturas acima da T_f (Sec. 4.4.4.6). Polnaszek (1975) mostra, através de simulações computacionais de filmes planos, que quando o parâmetro h_{+1}/h_0 diminui, τ_R também diminui, mas não proporcionalmente. Na faixa de $10^{-10} \text{ s} < \tau_R < 10^{-9} \text{ s}$ o parâmetro h_{+1}/h_0 têm uma variação pequena em relação a variação de τ_R .

A conclusão é que h_{+1}/h_0 dos espectros de RPE de SSL, incorporados a lipossomos, é um parâmetro que não fornece informações precisas, em termos de mobilidade, do que ocorre na bicamada lipídica. Entretanto, a variação desse parâmetro informa que mudanças conformacionais ocorreram na bicamada lipídica, e esta informação será utilizada na determinação do coeficiente de partição (Sec. 6.3). É possível que a informação que h_{+1}/h_0 contenha, esteja relacionado com a ordem do sistema, segundo sugestão de Polnazek (1975), apesar da ordem do SSL em bicamadas ser baixa, como já foi dito antes. Para verificar se essa hipótese é válida, experimentos com filmes planos, onde é possível separar ordem e mobilidade (Schreier e col., 1978) serão realizados, reforçando o que foi dito no final da Sec. 6.2.2.2.

6.2.3. Marcadores 5-SASL e 6-DPPC incorporados a lipossomos de DMPG e DMPC

Os resultados mais evidentes com os marcadores 5-SASL e 6-DPPC foram obtidos em lipossomos de DMPG abaixo da T_f . As medidas do parâmetro $2A_{\text{máx}}$ (Gráfs. 5.11 e 5.15) ou simples observação da forma dos espectros (Figs. 5.5 e 5.9), mostram que a presença de melatonina fluidifica a membrana de DMPG (têm o mesmo efeito do aumento de temperatura). Esses mesmos marcadores em lipossomos de DMPC, nesta região de temperatura, não apresentaram nenhuma alteração de $2A_{\text{máx}}$ (Figs. 5.13 e 5.17), e somente o 5-SASL mostra alterações na forma do sinal de RPE com a presença de melatonina (Fig. 5.7). Esses resultados mostram que a melatonina interage mais fortemente com membranas de DMPG, que é carregada negativamente e menos fluida do que a de DMPC (discutido na Sec. 6.2.1), confirmando os resultados com o marcador SSL.

Acima da T_f , o parâmetro $2A_{\text{máx}}$ não apresenta nenhuma variação nos espectros de RPE com e sem a presença de melatonina, seja com 5-SASL ou 6-DPPC em lipossomo de DMPG ou DMPC. O S_{ef} , desses mesmos espectros, também praticamente não apresenta variação, com exceção do 5-SASL em DMPG, que apresenta uma pequena alteração somente em temperatura muito próximo a T_f (Gráfs. 5.12, 5.14, 5.16 e 5.18). Isto indica que nesta faixa de temperatura a melatonina praticamente não altera a região das membranas de DMPG ou DMPC monitorada por esses marcadores.

Ainda acima da T_f , a forma espectral do 6-DPPC em DMPG ou DMPC não apresenta qualquer alteração, comparando-se espectros com e sem a presença de melatonina (Figs. 5.10 e 5.12). Os espectros de 5-SASL, em DMPG ou DMPC, na presença do hormônio (Figs. 5.6 e 5.8), mostram pequenas alterações na linha $m=+1$, que ocorrem de modo diferente para DMPC (aumento da intensidade do pico) e DMPG (diminuição da intensidade do pico). Como essa alteração não ocorre em espectros de marcador 6-DPPC em lipossomo de DMPC ou DMPG, é possível

que isto seja devido a diferença no posicionamento e/ou grau de mobilidade do 5-SASL nas diferentes membranas, como já foi discutido na Sec. 6.2.1.

Essa diferença no efeito apresentado pela melatonina, acima e abaixo da T_f , pode ser atribuído ao fato de que o hormônio seja uma molécula pequena, comparada ao tamanho do fosfolipídio, e seu efeito somente seja perceptível para marcadores que monitoram o interior da bicamada lipídica, quando esta encontra-se na fase gel, que é uma fase mais organizada. Este efeito é semelhante ao que ocorre com hidrocarbonetos aromáticos em membranas lipídicas, onde o efeito só é detectado em temperatura abaixo da T_f (Sanioto e col., 1986). Também foi observado que pequenos peptídeos, relacionados com a pentagastrina, interagem mais fortemente com membranas lipídicas abaixo da T_f (Surewicz e Eppand, 1984).

Como os espectros de RPE de 5-SASL e 6-DPPC incorporados a lipossomos de DMPG, com e sem a presença de melatonina, mostram grandes semelhanças, tanto na análise qualitativa dos espectros obtidos, quanto na análise do parâmetro $2A_{\text{máx}}$ e S^{ef} , o radical nitróxido destes 2 marcadores deve estar aproximadamente na mesma região da bicamada. Deste modo, o estudo realizado com marcadores derivados de ácido esteárico é válido, apesar das restrições que existem relativas a eles poderem localizar-se em posições diferentes na bicamada, dependendo do pH da amostra, discutidos na Sec. 6.2.1. O 6-DPPC é um marcador fosfolipídico e sua posição, em relação à bicamada, deve ser semelhante a de outros fosfolipídios, não particionando e não mudando seu posicionamento dependendo do pH, por isso é uma sonda que mimetiza melhor membranas lipídicas.

Com os marcadores 5-SASL e 6-DPPC, não ocorre variação de A_0 ao comparar-se espectros de RPE de amostras com e sem a presença de melatonina, em DMPC e DMPG (dados não mostrados). Isto indica que o radical nitróxido

destes marcadores encontra-se numa região da bicamada lipídica onde a presença de melatonina não altera a polaridade dessa região.

Futuros trabalhos incluem simulação espectral desses espectros de RPE, principalmente abaixo da T_f , onde o movimento é lento, utilizado-se algoritmo de Schneider e Freed (1989).

6.3. Partição da melatonina em membranas lipídicas

Os coeficientes de partição da melatonina em membranas lipídicas, calculados a partir de resultados experimentais, dão valores bastante diferentes, dependendo da técnica e metodologia utilizadas.

Utilizando-se RPE e a metodologia discutida na Sec. 4.6, foi obtido um coeficiente de partição da ordem de 30, para membranas de DMPC (Sec. 5.4.2). O experimento em sistema clorofórmio/água apresenta um valor próximo, $P=(15\pm5)$, indicando que a melatonina particiona pouco em sistemas hidrofóbicos (Sec. 5.4.1). Isto concorda com o fato da melatonina ser bastante solúvel em meio aquoso. O clorofórmio têm uma constante dielétrica maior do que a da membrana ($\epsilon_0=5,1$ para clorofórmio e $\epsilon_0=2$ para membranas, Stryer, 1988), o que talvez explique os diferentes coeficientes de partição.

A partir da Eq. (4.66) e considerando $P=30$, pode-se calcular n_M para as duas concentrações de melatonina utilizadas neste trabalho. Desta maneira, calcula-se que para as relações em moles de melatonina de 50% e 20% em moles do número total de moles de fosfolipídio, na membrana a melatonina representa somente 8 e 3,5% em moles de fosfolipídios, respectivamente. Ou seja, na amostra aqui chamada de 50%, na fase membranar, são 8 moléculas de melatonina para cada 100 fosfolipídios. Estes cálculos mostram que, mesmo para uma relação alta de fosfolipídio/melatonina, pouca melatonina particiona em membrana, o que pode

explicar o relativo pouco efeito que o hormônio provoca, quando estudado por RPE.

O coeficiente de partição não pode ser calculado utilizando-se como "efeito" o alargamento Lorentziano de alguma das linhas de ressonância, pois, como mostra o Gráf. 5.9 na região de 30 e 35°C, a diferença entre as amostras com e sem melatonina é praticamente nenhuma. Em trabalhos futuros, será determinado o coeficiente de partição da melatonina utilizando-se o alargamento de linha Lorentziano de espectros de SSL em DMPG, pois este é o sistema que apresenta maior variação com a presença do hormônio, como mostra o Gráf. 5.5.

Em experimentos de fluorescência, os compostos fluorescentes, quando estão dissolvidos em solvente pouco polar (por exemplo: etanol), apresentam a intensidade máxima de emissão num comprimento de onda menor, quando comparado com os espectros desses mesmos compostos em solvente polar (por exemplo: meio aquoso). Uma molécula muito estudada é o amino-ácido triptofano (Jain e col., 1984). O triptofano em solução aquosa, quando excitado em $\lambda=280\text{nm}$, tem o máximo de emissão em $\lambda=354\text{nm}$ (Jain e col., 1984). Quando o triptofano, como resíduo de um peptídeo, penetra na fase lipídica e encontra um ambiente menos polar, entre as cadeias acilas dos fosfolipídios, o máximo de emissão pode ser deslocado para comprimentos até $\lambda=334\text{nm}$ (Jain e col., 1984), dependendo da profundidade que ele penetra na membrana.

Os resultados da Sec. 5.3, mostram que a melatonina, em presença de vesículas de DMPG ou DMPC, não apresenta diminuição do λ máximo de emissão (Fig. 5.13), o que é uma forte indicação que o hormônio não muda de um ambiente polar (meio aquoso) para um apolar (região das caudas de hidrocarbonetos) (Cantor, 1980; Jain, 1984; Mcnight e col., 1992; Ito e col, 1993), e está de acordo com os resultados de RPE, que indicam que a melatonina têm uma interação com

membranas lipídicas na região da cabeça polar, tanto em DMPG como DMPC. A hipótese de que a região da cabeça polar possa ter uma polaridade maior do que o meio aquoso, e ser responsável pela diminuição no rendimento quântico, não está de acordo com os dados experimentais, pois o desdobramento hiperfino A_0 (Gráf. 6.1 e 6.2), dos marcadores de spin SSL, 5-SASL e 6-DPPC, mostram que a polaridade da fase lipídica é sempre menor que do meio aquoso (tampão), pelo menos em temperatura que foram realizados os experimentos de fluorescência (acima da T_f).

No entanto, existe uma supressão da fluorescência da melatonina na presença de vesículas unilamelares de fosfolipídios, que aumenta com a concentração destes (Fig. 5.14). Isto ocorre tanto para vesículas de DMPG quanto de DMPC.

Utilizando-se a fluorescência foi obtido um coeficiente de partição da melatonina em membranas de DMPC cerca de 30 vezes maior do que o encontrado para RPE (por RPE $P=30$; e por fluorescência $P=1090$). Com DMPG é encontrado um valor ainda maior, mas não há o correspondente por RPE para que uma comparação entre os dois possa ser feita.

Nos experimentos de fluorescência a molécula de melatonina é diretamente monitorada. Em RPE, são monitoradas as alterações estruturais que ela causa nas membranas, através dos marcadores de spin sendo portanto, indiretas. Esta é uma das explicações possíveis para a discrepância entre os resultados partição obtidos por RPE e por fluorescência. Pode ser que para uma certa relação fosfolipídio/melatonina na membrana, já se observe a variação da fluorescência da melatonina, mas não se monitore nenhuma variação na estrutura da membrana por RPE, com os marcadores de spin utilizados. Talvez para que o efeito da melatonina seja "observável" por RPE em DMPC, seja necessário aumentar a concentração do fosfolipídio, para provocar um aumento da relação melatonina/lipídio dentro da

membrana. Isto é possível e será realizado em trabalhos futuros. Por outro lado, poderia aumentar-se a concentração de melatonina no meio, no entanto, isto não é aconselhável porque, nas amostras com relação 50% , a concentração do hormônio na suspensão é de 5mM, o seu limite de solubilidade em água (Sec. 5.1).

Uma análise alternativa a que foi feita na Sec. 4.5.3, considerando que a presença de fosfolipídios suprime a fluorescência da melatonina, é a utilização do modelo de supressão de Stern-Volmer (Lakowicz, 1983). O modelo baseia-se no fato da existência de uma constante de associação (K_S) entre fluoróforo e supressor, análoga à utilizada na Sec. 4.5.3. Este assume que quando há a formação deste complexo, toda fluorescência é suprimida, ou seja, o rendimento quântico é zerado. Analogamente a Sec. 4.5.3, assume-se que há um número infinito de sítios para a melatonina interagir com os lipídios. Neste modelo o fosfolipídio seria considerado o supressor, se bem que na realidade ele pode ser visto como o indutor desta supressão. O modelo de Stern-Volmer parte da mesma relação de equilíbrio dada pela Eq. (4.59). A constante de associação deste equilíbrio é definida analogamente à Eq. (4.60), substituindo K_M por K_S , e assumindo que ϕ_{lig} , na Eq. (4.61a), é igual a zero. Substituindo as concentrações de melatonina pelas suas intensidades de fluorescência, temos a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S L \quad , \quad (6.1)$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência da melatonina sem a presença de lipídio; F é a intensidade de fluorescência da melatonina na presença de lipídio. Os dados de fluorescência têm um bom ajuste com equação de Stern-Volmer, como mostra os Gráfs. 6.1 e 6.2. A partir do ajuste dos pontos experimentais, com a regressão linear, calcula-se os K_S para a supressão de fluorescência da melatonina em presença de fosfolipídio.

Gráfico 6.1. Ajuste com a equação de Stern-Volmer dos dados de fluorescência da melatonina em presença de DMPC.

Gráfico 6.2. Ajuste com a equação de Stern-Volmer dos dados de fluorescência da melatonina em presença de DMPG.

Sendo encontrados para DMPC $K_S=74M^{-1}$ e para DMPG $K_S=444M^{-1}$. Estes valores são pelo menos uma ordem de grandeza menores do que os valores de K_M encontrados com a teoria da Sec. 5.3 e mais próximos do valor obtido por RPE ($P=30$ para DMPG).

O modelo da Sec. 4.5.3, é aplicado geralmente a sistemas onde ocorrem o aumento da intensidade da fluorescência e uma diminuição no comprimento do máximo de emissão, ficando claro a penetração do fluoróforo em meio menos polar. Entretanto, isto não significa que a aplicação do método de Stern-Volmer seja adequada, pois a membrana não é um supressor de fluorescência.

Essa é uma discussão que fica aberta neste trabalho, exigindo mais dados experimentais, como por exemplo, a determinação de P através da fluorescência da melatonina, porém com o mesmo método (Lissi e col., 1992) utilizado para RPE.

Uma possível hipótese para explicar a supressão da fluorescência na presença de membrana lipídicas é a seguinte: a melatonina ao inserir-se entre as cabeças polares das vesículas (visto que a molécula de melatonina é menor do que a de um fosfolipídio), muda para um meio de propriedades diferentes, e adquire uma outra conformação estável, que possibilita que algum dos seus resíduos do anel indol mude para outra posição e passe a atuar como um aceptor de elétron, auto-suprimindo a fluorescência. Esta hipótese baseia-se em um modelo utilizado para explicar auto-supressão de fluorescência de derivados de indol, estudados em diversos solventes, com diferentes pHs (Steiner e Kirby, 1969).

Entretanto, como mencionado anteriormente, para uma discussão mais aprofundada serão necessários mais dados experimentais. Em trabalhos futuros, serão realizado estudos da interação da melatonina com micelas de detergentes (Tabak e Borisevith, 1992), pois o método em que foi baseada a teoria da Sec. 4.5.3, utiliza detergentes e não fosfolipídios. Também será utilizado o chamado método da paralaxe para determinar a posição em que a melatonina se localiza na membrana (Chatopadyay e London, 1987), utilizando os mesmos marcadores de spin do trabalho de RPE. Pode-se também fazer curvas de Stern-Volmer com um supressor solúvel em meio aquoso, com e sem a presença de membrana, pois se a melatonina aloja-se na interface fosfolipídio-água é possível que toda a

fluorescência seja suprimida, mesmo entre as moléculas na bicamada. Estudos da melatonina em diversos solventes, com diferentes forças iônicas e diferentes valores de pH do meio, serão importantes para testar a hipótese de que somente a mudança de polaridade ou pH do meio, pode induzir uma estrutura conformacional que possa fazer a melatonina transformar-se em um auto-supressor de fluorescência (Steiner e Kirby, 1969).

Por fim, pretende-se fazer a dinâmica molecular da melatonina, com e sem a presença de uma interface lipídica, utilizando o algoritmo desenvolvido por Mundin e col. (1993). A dinâmica poderá trazer informações sobre as mudanças conformacionais da melatonina nas vizinhanças da interface, relacionadas com mudanças da distribuição eletrônica na molécula, que levem a uma melhor compreensão dos efeitos observados em RPE e em fluorescência.

7. Conclusões

O estudo apresentado aqui da interação da melatonina com membranas lipídicas, através de espectroscopias de RPE e fluorescência permite chegar a algumas conclusões:

7.1. A melatonina é bastante solúvel em meio aquoso e tem uma constante de solubilidade de 5mM. A solubilização da melatonina é possível utilizando-se o método desenvolvido no decorrer do presente trabalho (Sec. 4.3).

7.2. A melatonina interage com membranas lipídicas. Isto é mostrado pelos resultados de RPE e fluorescência, que indicam que a interação ocorre na região da cabeça polar dos fosfolipídios da membrana.

7.3. A melatonina interage mais fortemente com membranas lipídicas carregada negativamente (DMPG) do que com membranas com carga líquida igual a zero (DMPC). Resultado mostrado tanto por RPE (com os marcadores de spin SSL, 5-SASL e 6-DPPC, que monitoram diferentes regiões da bicamada) quanto por fluorescência. Essa diferença é discutida no trabalho em termos dos parâmetros τ_R e S^{ef} que dão informações da estrutura da bicamada lipídica.

7.4. O efeito da melatonina em membranas lipídicas, quando estudado por RPE dos marcadores de spin utilizados, é maior abaixo da T_f , quando a membrana está na fase gel, que por ser uma fase mais organizada, pequenas alterações de fluidez podem ser detectadas.

7.5. O h_{+1}/h_0 não é um bom parâmetro para analisar espectros de RPE de SSL incorporado a lipossomos.

7.6. A análise sobre a partição da melatonina em membranas lipídicas é ainda inconclusiva, pois os experimentos de fluorescência e de RPE, mostram resultados bastante diferentes necessitando de mais experimentos.

8. Referências Bibliográficas

- Bales, B.L. (1982). Correction for inhomogeneous line in spin labels. II. **J. Mag. Res.**, **48**: 418-430.
- Bales, B.L. (1989). Inhomogeneously broadened spin-Label spectra, in **Biological Magnetic Resonance**, **8**, editado por L.J. Berliner e J. Reuben, Plenum Publishing Corporation, New York.
- Bartness, T.J. e Goldman, B.D. (1989). Mammalian pineal melatonin: A clock for all season. **Experientia**, **45**: 939-945.
- Batzri, S. e Korn, E.D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochem. Biophys. Acta**, **298**: 1015-1019.
- Berchiasvili, G. e Seelig, J. (1990). Peptide binding to lipid membranes spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers. **Biochem. Biophys. Acta**, **1061**: 78-84.
- Berliner, L.J. editor (1976). **Spin Labeling. Theory and applications**. Academic Press, New York.
- Berliner, L.J. editor (1979). **Spin Labeling. Theory and applications**, vol. II. Academic Press, New York.
- Berridge, M.J. (1985). The molecular basis of communication within the cell. **Sci. Amer.**, **253(4)**: 142-152.
- Biaggi, M.H. (1992). Dissertação de mestrado. Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bianconi, M.L. (1990). Tese de doutoramento. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Blodgett, K.B. (1935). Built-up films of barium stearate and their optical properties. **Phys. Rev**, **51**: 964-982.

- Blodgett, K.B. e Langmuir, I. (1937). Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. **J. Am. Chem. Soc.**, **57**: 1007-1022.
- Bolton, J.R.; Borg, D.C e Swartz, H.M. (1972). Experimental aspects of biological electron spin resonance studies. in **Biological Applications of Electron Spin Resonance**. Editores Bolton, J.R.; Borg, D.C e Swartz, H.M., Wiley-Interscience, New York.
- Cantor, C.R. e Schimmel P.R. (1980). **Biophysical Chemistry**. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Cardinali, D.P.; Lynch, H.J. e Wurtman, R. (1972). Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. **Endo**, **91**: 1213-1218.
- Cevc, G. e Marsh, D. (1987). **Phospholipid Bilayers. Physical principles and models**. Willey-Interscience Publication, New York.
- Chattopadhyay, A. e London, E. (1987). Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. **Biochemistry**, **26**: 39-45.
- Chen Junior, T.S.; Toribara, T.Y. e Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. **Anal. Chem.**, **28**: 1756-1758.
- Debye, P. (1945). **Polar Molecules**. Dover, New York.
- Devaux, P. e McConnell, H. M. (1972). Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers. **J. Am. Chem. Soc.**, **94**: 4475-4481.
- Dobryakov, S.N. e Lebedev, Y.S. (1969). Analysis of spectra lines whose profile is described by a composition of gaussian an lorentzian profiles. **Sov. Phys. Dokl.**, **13**: 873-875.
- Durlach-Misteli, C. e Van Ree (1992). Dopamine and melatonin in the nucleusaccumbens may be implicated in the mode of action of antidepressant drugs. **Eur. Journ. Pharm.**, **217**: 15-21.

- Ebling, F.J.P. e Foster, D.L. (1989). Pineal melatonin rhythms and timing of puberty in mammals. **Experientia**, **45**: 946-954.
- Egret-Charlier, M.; Sanson, A. e Ptak, M. (1978). Ionization of fatty acid at the lipid-water interface. **FEBS Letters**, **89(2)**: 313-316.
- Ellena, J.F.; Archer, S.J.; Dominey, R.N.; Hill, B.D. e Cafiso, D.S. (1988). Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, **940**: 63-70.
- Epand, R.M., Segrest, J.P. e Anantharamaiah, G.M. (1990). Thermodynamics of binding of human Apolipoprotein A-I to dimyristoylphosphatidyl glycerol. **J. Biol. Chem.**, **265(34)**: 20829-20834.
- Fermi, E. (1930). Über die magnetischen Momente der Atomkerne. **Z. Physik**, **60**: 320.
- Ferroni, E.N. e Castrucci, A.M.L. (1987). A sensitive *in vitro* toad skin bioassay for melanotropic peptides. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **20**: 213-220.
- Finean, J.B.; Coleman, R. e Mechel, R.H. (1984). **Membranes and their Cellular Functions**, Backwell Scientific Publications, Oxford, 1984.
- Freed, J.H. (1976). Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides. in **Spin Labeling. Theory and Applications**. Editor Berliner, J. Academic Press, New York.
- Frieden, E. e Lipner, H. (1975). **Endocrinologia Bioquímica dos Vertebrados**, Editora Edgar Blücher Ltda e Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gaffney, B.J. e McConnell, H.M. (1974). The paramagnetic resonance spectra of spin label in phospholipid membranes. **J. Mag. Res.**, **16**: 1-28.
- Gennis, R.B. (1989). **Biomembranes. Molecular Structure and Function**. Editor Cantor, C.R., Springer-Verlag, Berlin.

- Goldman, S.A.; Bruno, G.V.; Polnaszek, C.P. e Freed, J.H. (1972). An ESR study of anisotropic rotational reorientation and solw tumbling in liquid and frozen media. **J. Chem. Phys.**, **56**: 716-735.
- Golombeck, D.A.; Duque, D.F.; Sánchez, M.G.B. ; Burin, L. e Cardinali, D.P. (1992). Time-dependent anticonvulsant activity of melatonin in hemsters. **Eur. Journ. Pharm.**, **210**: 253-258.
- Griffith, O.H. ; Cornell, D.W. e McConnell, H.M. (1965). Nitrogen hyperfine tensor and g-tensor of nitroxide radicals. **J. Chem. Phys.**, **43**: 2909-2910.
- Griffith, O.H. e Jost, P.C. (1976). Lipid spin labels in biological membranes. in **Spin labeling. Theory and applications**. Editor Berliner, L.J., Academic Press, New York.
- Hadley, M.E. (1988). **Endocrinology**. 2nd edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hasting, M H.; Vance, G. e Maywood, E. (1989). Some reflections on the phylogeny and funtion of the pineal. **Experientia**, **45**: 903-909.
- Heward, C.B. e Hadley, M.E. (1975). Structure-activity relationships of melatonin and related indolamines. **Life Sciences**, **17**: 1167-1178 .
- Hsia, J.C.; Schneider, H. e Smith, I.C.P. (1970) A spin label study of the effects of cholesterol in lipossomes. **Chem. Phys. Lipids**, **4**: 238-242.
- Hubbel, W.L. e MacConnell, H.M. (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. **J. Am. Chem. Soc.**, **93**(2): 314-326.
- Hudson, A. e Luckhurst, G.R. (1969). The electron resonance line shapes of radicals in solution. **Chem. Rev.**, **69**: 191-225.
- Ito, A. S.; Castrucci, A. M. L. ; Hruby, V. J.; Hadley, M.E.; Krajcarski, D. T. e Szabo, A. G. (1993). Structure of mlanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. Submetido a publicação.

- Jain, M.K.; Rogers, J.; Simpson, L. e Gierasch, L.M. (1984). Effect of tryptophan derivatives on the phase properties of bilayers. **Biochem. Biophys. Acta**, **816**: 153-162.
- Jain, M.K. e Wagner, R.C. (1980). **Introduction to Biological Membranes**. John Wiley and Sons, New York, 1980.
- Jost, P.C.; Libertini, L.J.; Hebert, V.C. e Griffith, O.H. (1971). Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains. **J. Mol. Biol.**, **59**: 77.
- Jost, P.C. e Griffith, O.H. (1976). Instrumental aspects of spin labeling. in **Spin Labeling. Theory and applications**. Editor Berliner. L.J., Academic Press, New York.
- Killian, J.A. ;Keller, R.C.A.; Struyvé, P.M.; Kroon, A.L.P.M., Tommassen, J. e Kruijff, B. (1990). Tryptophan fluorescence study on the interaction of the signal peptide of the Escherichia Coli outer membrane protein PhoE with model membranes. **Biochemistry**, **29**: 8131-8137.
- Kiverson, D. (1972). Electron spin relaxation in liquids. in **Electron Spin Relaxation in Liquids**. Editores Muus, L.T. e Atkins, P.W. Plenum Press, New York.
- Klemperer, W. (1992). Intermolecular Interactions. **Science**, **257**: 887-888.
- Kornberg, R.D. e McConnell, H.M. (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. **Biochemistry**, **10(10)**: 1111-1120.
- Lakowicz, J.R. (1983). **Principles of fluorescence spectroscopy**. Plenum Press, New York.
- Lasic, D. (1992). Liposomes. **Am. Scientist**, **80**: 21-31.
- Lehninger, A.L.(1984). **Princípios de Bioquímica**, Savier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo.

- Lissi, E.; Bianconi, M.L.; Amaral, A.T.; Paula, E.; Blanch, L.E.B. e Schreier, S. (1990). **Biochem. Biophys. Acta**, **1021**: 46-50.
- Luchhurst, G.R. (1976). Biradical as spin probes. in **Spin Labeling. Theory and applications**. Editor Berliner, L.J. Academic Press, New York.
- Marsh, D. (1981). in **Membrane Spectroscopy**. Springer -Verlag, Berlin.
- Marsh, D. (1989). Experimental methods in spin-label spectral analysis. in **Biological Magnetic Resonance**, **8**. Editor Berliner, L.J. e Reuben, J. Plenum Press Corporation, New York.
- Marzzoco, A. e Torres, B.B. (1990). **Bioquímica Básica**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.
- McKnight, E.J.; Rafalski, M e Gierasch, L.M. (1991). Fluorescence analysis of tryptophan-containing variants of the LamB signal sequence upon insertion into a lipid layer. **Biochemistry**, **30**: 6241-6246.
- Merck Index (1989). 11a. edição, pp 5693.
- Moore, R.J. (1978). The innervation of the mammalian pineal gland. **Proj. Reprod. Biol.**, **4**: 1-29.
- Morgan, P.J. e Williams, L.M. (1989). Central melatonin receptors: Implications for a mode action. **Experientia**, **45**: 955-965.
- Mouritzen, O.G. e Jørgensen, K. (1992). Dynamic lipid-bilayer heterogeneity: a mesoscopic vehicle for membrane function? **BioEssays**, **14(2)**: 129-136.
- Mueller, P.; Rudin, D.O. ;Tien, H.T. e Wsecott, W.T. (1962). **Circulation**, **26**: 1167.
- Mundin, K.; Bisch, P.M. e Pascutti, P. (1993). Desenvolvimento de um "software" para simulação de mecânica de dinâmica molecular de interfaces biológicas. Apresentado no XVI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 18 a 22 de maio de 1992. Caxambu, MG.

- Nordio, P.L. (1976). General magnetic resonance theory. in **Spin Labeling. Theory and applications**. Editor Berliner, L.J. Academic Press, New York.
- O'Brien, P.J. e Klein, D.C. (1986). **Pineal and Retinal Relationships**, Academic Press, Inc., Orlando, Florida.
- Onishi, S. e McConnell, H.M. (1965). Interactions of the radical in chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. **J. Chem. Soc.**, **87**: 2293.
- Pierce, M.E. e Besharse, J.C. (1986). Melatonin and dopamine interactions in the regulation of rhythmic photoreceptor metabolism. in **Pineal and retinal relationships**. Editores O'Brien, P.J. e Klein, D.C., Academic Press, New York.
- Polnaszek, C.F.; Schreier, S; Butler, K.W. e Smith, I.C.P. (1978). Analysis of the factors determining the EPR spectra of spin probes that partition between aqueous and lipid phases. **J. Am. Chem. Soc. USA**, **100**: 8223-8232.
- Polnaszek, C.F. e Freed, J.H. (1975). Electron spin resonance studies of anisotropic ordering, spin relaxation, and slow tumbling in liquid crystalline solvents. **J. Phys. Chem.**, **79**: 2283-2306.
- Polnaszek, C.K. (1975). Não publicado.
- Ptak, M.; Egret-Charlier, M.; Sanson, A. e Bouloussa, O. (1980). A NMR of the ionization of fatty acids, fatty amines e N-acylamino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. **Biochem. Biophys. Acta**, **600**: 387-397.
- Reitel, R.J.; Pöeggeler, B.; Tan, D.; Chen, L.; Manchester, L.C. e Guerrero, J.M. (1993). Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring receptor. **Neuroendocrinol. Lett.**, **15**: 103-116.
- Reiter, R.J. (1992). The ageing pineal gland and its physiological consequences. **BioEssays**, **14**(3): 169-175.
- Rubenstein, J.L.R.; Barton, A.S. e MacConnell, H.M. (1979). **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **76**: 15-18.

- Sanioto, D.L.; Quina, F.H. e Schreier, S. (1986). Carcinogenic and non-carcinogenic aromatic hydrocarbons in lipid membrane. A fluorescence study of pyrene and benzo[A]pyrene. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **19**: 691-698.
- Sanson, A.; Ptak, M.; Rigaud, J.L. e Gary-Bobo, C.M. (1976). An ESR study of the anchoring of spin-labeled stearic acid in lecithin multilayers. **Chem. Phys. Lipids**, **17**: 435-444.
- Sargent, D.F. e Schwyzer, R. (1986). Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **83**: 5774-5778.
- Saupe, A. (1964). Neue Kernresonanzen in kristallinen flüssigkeiten und kristallinen flüssigen Lösungen. **Z. Naturforsch**, **19a**: 161-171.
- Schindler, H. e Seelig, J. (1974). EPR spectra of spin labels in lipid bilayers. II. rotation of steroid spin probes. **J. Chem. Phys**, **61**: 2946-2949.
- Schneider, D.J. e Freed, J.H. (1989). Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide, in **Biological Magnetic Resonance**, **8**. Plenum Press Corporation, New York.
- Schreier, S.; Polnaszek, C.F. e Smith, I.C.P. (1978). Spin labels in membranes. Problems in practice. **Biochem. Biophys. Acta**, **515**: 375-436.
- Schreier, S.; Marsh, D. e Smith, I.C.P. (1976). Monitoring profile of lipid membranes with spin probes. **Arch. Biochem. Biophys.**, **172**: 1-11.
- Schreier-Muccillo, S. ; Marsh, D.; Dugas, H.; Schneider, H. e Smith, I.C.P. (1973). A spin probe study of the influence of cholesterol on motion and orientation of phospholipids in oriented multibilayers and vesicles. **Chem. Phys. Lipids**, **10**: 11-27.
- Schwyzzer, R. (1986). Molecular mechanism of opioid receptor selection. **Biochemistry**, **25**: 6335-6342.
- Seelig, J. (1970). Spin label studies of oriented liquid crystals (a model system for a bilayers membranes). **J. Am. Chem**, **92**: 3881-3887.

- Seelig, J. (1976). Anisotropic motion in liquid crystalline structures. in **Spin Labeling. Theory and applications**. Editor Berliner, L.J. Academic Press, New York.
- Seigneuret, M. e Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **81**(12): 3751-3752.
- Sessa, G. e Weissmann, G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as model for biological membranes. **J. Lipid Res.**, **9**: 310-318.
- Shinitzky, M. e Barenholtz, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. **Biochem. Biophys. Acta**, **515**(4): 367-394.
- Singer, S.J. e Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, **175**: 720-731.
- Smith, I.C.P.; e Butler, K.W. (1976). Oriented lipid systems as model membranes in spin labeling. in **Spin Labeling. Theory and applications**. Editor Berliner, L.W. Academic Press, New York.
- Smith, I.C.P. (1972). The spin label method, in **Biological Applications of Electron Spin Resonance**. Editores Swartz, H.M.; Bolton, J.R. e Borg, D.C. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Snipes, W.; Cupp, J.; Cohn, G. e Keith, A.D. (1974). Electron spin resonance analysis of the nitroxide spin label 2,2,6,6-tetramethylpiperidone-N-oxyl (Tempone) in single crystals of the reduced Tempone matrix. **Biophys. J.**, **14**: 20.
- Snyder, S.H. (1985). The molecular basis of communication between cells. **Sci. Amer.**, **253**(4): 132-140.

- Steiner, R.F. e Kirby, E.P. (1969). The interactions of the ground and excited states of indoles derivatives with electron scavengers. **J. Phys. Chem.**, **75**: 4130-4135.
- Stryer, L. (1988). **Biochemistry**, 3ª. edição. W. H. Freeman and Company, New York.
- Sugden, D. (1989). Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, **45**: 922-932.
- Sugden, D. (1992). Effect of putative melatonin receptor antagonists on melatonin-induced pigment aggregation in isolated *Xenopus laevis* melanophores. **Eur. J. Pharm.**, **213**: 405-408.
- Surewicz, W.K. e Epand, R.M. (1984). Role of peptide structure in lipid-peptide interactions. A fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. **Biochemistry**, **23**: 6072-6077.
- Suzuki, S.; Grenn, P.G.; Bumgarner, R.E., Dasgupta, S., Goddard III, W.A. e Blake, G.A. (1992). Benzene forms hydrogen bonds with water. **Science**, **257**: 942-945.
- Swartz, H.M.; Bolton, J.R. e Borg, D.C. (editores) (1972). **Biological application of electron spin resonance**. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Tabak, M. e Borisevitch, I.E. (1992). Interaction of dipyrindamole with micelles of lysophosphatidylcholine and with bovine serum albumin: fluorescence studies. **Biochim. Biophys. Acta**, **1116**: 241-249.
- Tamarkin, L.; Baird, R.J. e Almeida, O.F.X. (1985) Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? **Science**, **227**: 714-720.
- Tan, D.; Pöeggeler, B.; Reitel, R.J.; Chen, L.; Chen, S.; Manchester, L. e Barlow-Walden, L.R. (1993). The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct

- formation induced by chemical carcinogen safrole in vivo. **Cancer Letters**, **70**: 65-71.
- Tanford, C. (1980). **The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes**, 2^a. edição, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York.
- Van, S.P. ; Birrell, G.B. e Griffith, O.H. (1974). Rapid anisotropic motion of spin labels. Models for motion averaging of the ESR parameters. **J. Mag. Res.**, **15**: 444-459.
- Vander, A.J., Sherman, J.H. e Luciano, D.S. (1985). **Human Physiology: The Mecanisms of Body Function**, 4^a. edição McGraw Hill Book Company, New York.
- Vieira, R.; Míguez, J.; Lema, M. e Aldegunde, M. (1992). Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Anal. Biochem.**, **205**: 300-305.
- Wertz, J.E. e Bolton, J.R. (1972). in **Electron spin resonance: Elementary theory and practical applications**. McGraw-Hill, New York.
- Yin, J.; Feix, J.B. e Hyde, J.S. (1988). Mapping of collision frequencies for stearic spin labels by saturation-recovery electron paramagnetic resonance. **Biophys. J.**, **53**: 521-531.