Universidade de São Paulo

Instituto de Física

**Propriedades estruturais de
agregados anfífilos catiônicos:
interação com material genético**

Rafael Pianca Barroso

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy

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

São Paulo

2006

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio incondicionais.

À Teresa, pela orientação e por tudo que me ensinou e vem ensinando durante nossos anos de convivência.

Ao amigo Carlos Roberto Benatti, pela co-orientação e auxílio durante todo este trabalho.

Aos amigos Tiago e Evandro, técnicos do laboratório, sempre dispostos a ajudar.

Ao amigo Roberto, pelas discussões sempre esclarecedoras.

Aos colegas de sala Cíntia, Daniel, Fernando, Suely e Elisa e à professora Carla Goldman.

À Andreza, pelas discussões sobre meu trabalho e disposição para ajudar.

À Celiane, pela paciência, apoio e compreensão nestes anos de mestrado.

À minha querida irmã Cássia e aos meus familiares, pelo incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para o término deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Índice

Resumo	v
Abstract	vi
I. Introdução	1
I.1 Lipídios e membranas celulares	1
I.2 Transição de fases de bicamadas	5
I.3 Nucleotídeos e DNA	6
I.4 Terapia gênica	6
I.5 Interação nucleotídeo/DODAB	8
I.6 Justificativa e objetivo	10
II. A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	12
II.1 A interação Zeeman	13
II.2 Interação com a microonda do campo	15
II.3 O acoplamento hiperfino	16
II.4 Espectros em solução	17
II.5 Relaxação de spins e a forma de linha lorentziana	19
II.6 Largura de linha de espectros em solução	23
II.7 Os radicais livre com o nitróxido	27
II.7.1 Alargamento de linha não homogêneo	30
II.8 Parâmetros de ordem	31
II.9 Dependência dos parâmetros de RPE com a polaridade do meio	34
III. Materiais e métodos	36
III.1 Materiais	36
III.2 Métodos	38
IV. Resultados e discussões	41
IV.1 Efeito de diferentes concentrações de dAMP na estrutura de bicamadas de DODAB: fases gel e fluida	41
IV.1.1 Fase gel (15 °C)	41
IV.1.2 Fase fluida (50 °C)	48
IV.2 Efeito do dAMP na transição de fase do DODAB: estudo a várias temperaturas entre 15 e 50 °C	59

V. Conclusões	68
VI. Apêndice – Ajuste de espectros de RPE na região de movimento rápido	74
VI.1 Escrevendo a derivada da função gaussiana em termos da largura de linha e da altura pico a pico	74
VI.2 Escrevendo a derivada da função lorentziana em termos da largura de linha e da altura pico a pico	76
VI.3 Ajuste de espectros	79
VI.3.1 Escrevendo a função de Voight como uma soma de gaussiana e lorentziana	83
VII. Referências bibliográficas	85

Resumo

Embora menos eficientes que os vetores virais, lipídios catiônicos têm sido cada vez mais usados como transportadores de material genético. Eles têm como vantagens em relação aos transportadores virais, a baixa imunidade, controle de qualidade e produção em grande quantidade, entre outros. Todavia, a interação entre lipídios catiônicos e material genético ainda é pouco compreendida. No presente trabalho, estudamos a interação entre o anfifílico catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e o nucleotídeo 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP). Para tanto, utilizamos a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) aplicada a marcadores de spin derivados do ácido esteárico incorporados em vesículas de DODAB. Os resultados mostraram que na fase gel, na região próxima à superfície das bicamadas de DODAB, o dAMP causa muito pouca alteração na fluidez da membrana, enquanto que, na região do centro da bicamada, o dAMP diminui a fluidez da membrana, o que pode ser um efeito apenas de cargas, isto é, devido à blindagem eletrostática. Já na fase fluida, em ambas as regiões o dAMP aumenta a fluidez da membrana, sendo que, no centro das bicamadas induz um acréscimo significativo na polaridade do meio. A transição de fase gel-fluida do DODAB não sofre modificações com o acréscimo de dAMP.

De uma maneira geral, nossos resultados mostraram que o dAMP não causa grandes modificações na estrutura do DODAB. Concluimos que o dAMP se localiza na região da superfície das bicamadas do DODAB e se comporta como um íon grande. Este resultado deverá ser considerado na análise estrutural da interação DNA/vesículas lipídicas em nível molecular.

Abstract

Though less efficient than viral vectors, cationic lipids have been used as carriers in gene therapy. They offer several advantages over viral vectors, including the low immunogenic and inflammatory responses, the potential transfer of unlimited-size expression units, and the possibility for engineered cell-specific targeting. However, the interaction between cationic lipids and genetic material needs to be better understood for the optimization of the transfection protocol. In the present work, we study the interaction between the nucleotide 2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP) and cationic liposomes of dioctadecyl dimethylammonium (DODAB), through the analysis of the electron spin resonance (ESR) spectra of spin labels incorporated in the bilayers. DODAB gel phase structure is not much affected by dAMP. The observed packing effect at the bilayer core seems to be related to the expected electrostatic screening effect at the bilayer surface, bringing the headgroups closer together, due to the presence of anions at the surface. In DODAB fluid phase, above 44 °C, ESR results strongly suggest that the relatively large double charged molecule of DMP is localized at the bilayer surface, but incorporated in the membrane, such that it is able of somehow space the headgroups, turning the bilayer core less packed and more hydrated. This result is certainly relevant for the structural understanding of the DNA-cationic membrane interaction on a molecular level.

I. Introdução

I.1 Lipídios e membranas celulares

Por definição, lipídios são biomoléculas insolúveis em água e altamente solúveis em solventes orgânicos, como o clorofórmio ou o éter. Eles possuem uma variedade de funções: servem como combustíveis moleculares, moléculas sinalizadoras e componentes de membrana (Strayer, 1997). No presente trabalho, estaremos interessados apenas nos lipídios que desempenham esta última função, ou seja, os lipídios de membrana.

As membranas circundam as células, tornando possível a compartimentalização das atividades metabólicas dentro das células. Elas contêm muitas proteínas e sistemas importantes de transporte. Além disso, na superfície externa das membranas celulares estão localizados muitos sítios receptores ou de reconhecimento, que podem reconhecer outras células, ligar certos hormônios e detectar outros tipos de sinais do meio ambiente externo (Lehninger, 1984).

Muitos lipídios de membrana são moléculas anfifílicas, possuindo uma região hidrofóbica e outra hidrofílica. A unidade hidrofóbica (apolar) é constituída pelas cadeias hidrocarbônicas do lipídio e a hidrofílica (polar) é denominada cabeça polar (figura I.1). Muitas das propriedades das membranas celulares são reflexos do seu conteúdo de lipídio (Lehninger, 1984), o que já nos dá um vislumbre da importância dos mesmos.

Figura I.1 – Estrutura típica de um lipídio de membrana. Adaptada de Karp (1996).

Em sistemas aquosos os lipídios espontaneamente se dispersam formando estruturas que minimizam o contato da região hidrofóbica com as moléculas de água. Esse fenômeno é conhecido como efeito hidrofóbico, e é devido ao balanço das contribuições energéticas e entrópicas entre as moléculas apolares e as de água. Os diferentes tipos de estrutura formados devido ao efeito hidrofóbico dependem de vários fatores, como concentração lipídica, temperatura, pressão, força iônica, pH (Gennis, 1989) e, principalmente, da forma geométrica do anfifílico. As estruturas básicas são mostradas na figura I.2 e podem ser resumidas em:

Micela – as cadeias hidrocarbônicas dos lipídios ficam protegidas do meio aquoso e as cabeças hidrofílicas, polares, são expostas na superfície voltadas para o meio aquoso (figura I.2.a). Também podem ocorrer estruturas em que a organização dos lipídios é o contrário da citada anteriormente; tais estruturas são chamadas de micelas reversas, mas só podem ocorrer na presença de pelo menos um solvente apolar (figura I.2.c). Estruturas micelares podem ainda se organizar na forma de cilindros com os grupos polares para fora em contato com a água. Esses cilindros são empacotados em um padrão hexagonal, o que nomeia esse tipo de estrutura de fase hexagonal (figura I.2.b). Seguindo os mesmos padrões, existe também a fase hexagonal reversa (figura I.2.d).

Monocamada – neste sistema, as caudas hidrocarbônicas são expostas ao ar, evitando desta forma a água, e as cabeças hidrofílicas se estendem na fase polar aquosa (figura I.2.e).

Bicamada – nestas estruturas, que separam dois compartimentos aquosos, as cadeias hidrocarbônicas das moléculas dos lipídios se estendem para dentro das duas superfícies, formando uma base interna hidrocarbonada, e as cabeças hidrofílicas se voltam para fora, estendendo-se para as fases aquosas (figura I.2.g). Bicamadas podem ainda formar estruturas chamadas de lipossomos, que são vesículas fechadas, envolvidas por uma bicamada contínua de lipídios (figura I.2.f). Estas vesículas podem conter mais de uma bicamada, sendo denominadas multi-bicamadas, em estruturas que lembram a morfologia de uma cebola (figura I.2.h).

(a) Micela normal

(b) Fase hexagonal

(c) Micela reversa

(d) Fase hexagonal reversa

(e) Monocamada lipídica

(f) Vesícula unilamelar (lipossomo)

(g) Bicamada

(h) Vesícula multilamelar (multibicamada)

Figura I.2 – Estruturas formadas por lipídios em sistemas aquosos. Ilustrações (a), (c), (e) e (g) adaptadas de Garret & Grisham (1998).

A partir dos resultados químicos, da evidência da microscopia eletrônica e da semelhança nas propriedades das membranas naturais com as bicamadas de fosfolipídios sintéticos, S. Jonathan Singer e Garth Nicolson apresentaram em 1972 um modelo para a estrutura da membrana chamado modelo de mosaico fluido (Lehninger, 1984). Eles propuseram que a matriz, ou parte contínua da estrutura de membrana, fosse uma bicamada polar. A bicamada é fluida porque as caudas hidrofóbicas de seus lipídios polares consistem de uma mistura apropriada de ácidos graxos saturados e insaturados que é fluida na temperatura normal da célula.

O modelo de Singer-Nicolson explica muitas das propriedades físicas, químicas e biológicas das membranas e tem sido largamente aceito como o mais provável arranjo molecular dos lipídios e das proteínas das membranas. Entretanto, as membranas biológicas devem ter características estruturais adicionais às dos elementos do modelo de mosaico fluido (Lehninger, 1984).

Figura I.3 – (a) Modelo de membrana proposto por Singer e Nicolson e (b) representação atual do modelo. Adaptada de Karp (1996).

I.2 Transição de fase de bicamadas

A estrutura formada pelas bicamadas também é chamada de lamelar, uma vez que se pode fazer uma analogia entre as bicamadas lipídicas e lamelas. Assim sendo, uma vesícula formada por apenas uma bicamada é chamada de vesícula unilamelar (figura I.2.f), e uma formada por várias bicamadas de multilamelar (figura I.2.h).

Bicamadas formadas por apenas um tipo de lipídio apresentam uma transição de fase, chamada de principal, na qual as cadeias hidrocarbônicas passam de um alto empacotamento (fase gel) para uma membrana fluida (fase líquido-cristal) em uma dada temperatura, chamada T_m .

A fase fluida, também chamada de fase lamelar L_α , é a forma em que se costuma representar o conjunto de lipídios em uma membrana biológica. Existe uma ordem bidimensional, embora haja uma considerável desordem nas cadeias hidrocarbônicas devido à presença de dobras gauche (figura I.4)

Na fase gel, ou fase lamelar L_β , formada em temperaturas baixas, as moléculas estão empacotadas mais rigidamente (a área superficial por molécula é menor) e as cadeias acila encontram-se muito mais organizadas (em razão da interação de Van der Waals), com todas as ligações de carbono na configuração trans (figura I.4). Como as cadeias estão estendidas ao máximo na fase gel, a espessura da bicamada é maior do que na fase fluida. Por isto, a densidade da fase gel é ligeiramente maior que a da fase fluida.

Figura I.4 – Ilustração da transição de fase gel-fluida que ocorre quando a membrana é aquecida até atingir a temperatura de transição, T_m . Note que a área superficial aumenta e a espessura da membrana diminui após a membrana passar a transição. A mobilidade das cadeias lipídicas aumenta drasticamente. Embaixo, a conformação das ligações entre os carbonos das cadeias: à esquerda, conformação trans; à direita, conformação gauche, resultado de uma rotação de 120° no sentido horário (g+) ou anti-horário (g-). Adaptada de Garret & Grisham (1998).

I.3 Nucleotídeos e DNA

Os nucleotídeos são substâncias biologicamente presentes em quase todos os processos bioquímicos (Strayer, 1997). Entre suas várias funções, destacamos como a de maior interesse para a presente dissertação, o fato de eles formarem as unidades monoméricas dos ácidos nucléicos.

Nucleotídeos são ésteres fosforilados de pentoses (açúcares com 5 carbonos) em que uma base nitrogenada está ligada ao C1' do resíduo de açúcar. Nos ribonucleotídeos, a pentose é a D-ribose enquanto em deoxiribonucleotídeos (ou deoxinucleotídeos), que ocorre no DNA, o açúcar é a 2'-deoxi-D-ribose (figura I.5). O grupo fosfato pode estar ligado ao C3' ou ao C5' da pentose para formar seu 3'-nucleotídeo ou seu 5'-nucleotídeo, respectivamente. Se o grupo fosfato estiver ausente, o composto é conhecido como nucleosídeo. Os grupos fosfatos dos nucleotídeos estão duplamente ionizados em pH fisiológico (Voet & Voet, 1995).

Figura I.5 – Estrutura química de um deoxyribonucleotídeo. Adaptada de Voet & Voet (1995).

O ácido desoxiribonucléico (DNA) é um polímero de unidades de desoxiribonucleotídeo. Ele é a molécula da hereditariedade em todas as formas de vida celulares, bem como em muitos vírus. Suas funções podem ser resumidas em dirigir sua auto-replicação durante a divisão celular e direcionar a transcrição de moléculas de RNA.

I.4 Terapia gênica

A terapia gênica (TG) é um tratamento para doenças hereditárias, caracterizada pela inserção de um gene funcional no interior da célula humana com o intuito de lhe conferir uma nova função ou melhorar os efeitos de um gene anormal. Existem duas espécies de técnicas usadas em TG: a germinativa, em que se introduz o material genético nos óvulos ou

espermatozóides (células germinativas); e a somática, na qual a introdução do material genético se dá em quaisquer outras células.

Na maior parte dos estudos de TG, um gene normal é inserido dentro do genoma para substituir o gene anormal, causador de alguma doença. A estrutura “carreadora”, denominada vetor, é utilizada para levar o gene terapêutico para as células-alvo do paciente. Atualmente, o vetor mais comum é o vírus, alterado geneticamente para carrear o DNA humano normal. Tira-se proveito da capacidade do vírus infectar a célula humana. No caso da TG, o genoma do vírus é alterado para remover os genes causadores de doença e inserir os de interesse terapêutico.

A possível resposta imune desencadeada por um objeto estranho colocado no organismo, é um dos fatores que mantém a TG fora dos tratamentos de escolha a doenças genéticas. Sempre há a insegurança de que o vetor viral atenuado, sem os genes responsáveis pela sua replicação, poderia readquirir a habilidade de se replicar e causar a enfermidade no paciente.

Desde 1977, quando Kunitake e col. (1977) obtiveram pela primeira vez bicamadas fechadas (lipossomos), formadas por sais de amônio quaternário, os anfílicos catiônicos têm sido utilizados como ferramentas para o estudo e entendimento das propriedades físicas e moleculares das membranas celulares. Por outro lado, anfílicos sintéticos, com dupla cadeia carbônica, são de interesse particular, por terem características intermediárias entre detergentes com uma cadeia e fosfolípidios com duas cadeias. Seu estudo possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos de auto-associação.

Na última década, vários estudos têm demonstrado que lipossomos formados por anfílicos catiônicos são eficientes transportadores de drogas e de DNA (Felgner e cols., 1994; Gao e Huang, 1995; Lasic e col., 1997). Em 1989, Felgner e Ringold (1989) mostraram o uso de lipossomos catiônicos na transfecção de DNA (lipofecção). Muitos estudos têm sido desenvolvidos na aplicação de lipossomos catiônicos, e grandes avanços têm ocorrido na investigação da utilização destes lipossomos em terapia gênica. Por apresentarem algumas das melhores características de sistemas não-virais de transporte de DNA (baixa imunidade, produção em grande quantidade e controle de qualidade, entre outras), eles têm sido usados extensivamente no estudo *in vitro*, além de eficiente expressão gênica ter sido observada com

injeção intravenosa em animais (Zhu e col., 1993; Felgner, 1996; Tsukamoto e col., 1995). O importante fator para o uso de lipossomos catiônicos parece ser a presença de resíduos carregados negativamente em muitas superfícies celulares, e, portanto, a interação eletrostática entre essas superfícies biológicas e os sistemas catiônicos de transporte (Felgner e Ringold, 1989).

No intróito deste trabalho de mestrado, por intermédio da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) aplicada a sondas paramagnéticas, estudamos a interação entre o DNA e a vectamidina, um anfifílico catiônico desenvolvido e utilizado pelo grupo do Dr. Ruyschaert, do Centre de Biologie Structurale et de Bioinformatique (CNSB) da Université Libre de Bruxelles na Bélgica, com quem mantemos uma colaboração. No entanto, os resultados mostraram-se de difícil interpretação além de terem apresentado inúmeros percalços, entre os mais significativos: falta de reprodutibilidade dos experimentos, contaminação dos lipídios e queda no sinal de RPE a partir de certas quantidades de DNA. Assim sendo, decidimos trabalhar com o DODAB (brometo de dioctadecil dimetil amônia), e estudar a interação com um único tipo de nucleotídeo para tentarmos compreender, primeiro, um sistema mais simples. O DODAB é um anfifílico catiônico com 18 carbonos na cadeia acila e uma cabeça polar constituída por um nitrogênio quaternário e um contra-íon Br^- (ver seção III). Trata-se de um lipídio razoavelmente conhecido na literatura.

I.5 Interação nucleotídeo-DODAB

Nosso trabalho é o resultado de uma conversa com a Profa. Ana Maria Carmona Ribeiro, do Instituto de Química da USP, sobre um trabalho publicado de seu grupo (Kikuchi e col., 1999). Neste trabalho, foram feitos estudos com vesículas unilamelares de DODAB, em água, interagindo com o nucleotídeo dAMP (2'-desoxiadenonisa 5'-monofosfato). Os resultados obtidos são resumidos nos parágrafos abaixo.

Soluções de dAMP foram misturadas a dispersões contendo DODAB e a mistura centrifugada para separar o dAMP livre em solução dos lipossomos de DODAB. O sobrenadante era então filtrado. Medidas de turbidez do filtrado mostraram valores iguais ou muito próximos de zero, o que garantia que no

filtrado não havia lipossomos de DODAB, apenas dAMP. Finalmente, através da determinação de fosfato (a molécula de dAMP possui um grupo fosfato) nas soluções filtradas (Rouser e col., 1970), obtinha-se a adsorção de dAMP nos lipossomos de DODAB (a concentração de dAMP adsorvida era a diferença entre a concentração de dAMP inicial adicionada à dispersão de DODAB e a concentração de dAMP no filtrado). A adsorção máxima de dAMP aos lipossomos de DODAB resultou numa proporção molar de DODAB:dAMP adsorvido de 2:1. O método descrito acima foi repetido preparando-se as dispersões de DODAB diretamente em soluções de dAMP, de modo que o nucleotídeo também estava inserido no compartimento interno dos lipossomos e, novamente, a adsorção máxima resultou em 2:1. Isto sugeriu que o nucleotídeo atravessasse as bicamadas. Outro resultado interessante destas medidas mostrou que adsorção parece não sofrer modificações significativas em termos da temperatura, sugerindo que a adsorção não depende muito do estado físico dos lipossomos, pois a 30 °C (fase gel), 44 °C e 56 °C (fase fluida) os valores de dAMP adsorvidos eram parecidos (0.18, 0.24 e 0.21 mM, respectivamente).

Em 5 mM de NaBr, não houve adsorção de nucleotídeo, o que mostra que a força eletrostática tem um papel crucial na formação do complexo, pois uma força iônica relativamente baixa teve um efeito substancial sobre a adsorção de dAMP.

Determinou-se o efeito de NaCl sobre a estabilidade das vesículas de DODAB, através da avaliação da floculação de lipossomos induzida por NaCl. Para tanto, foram preparados lipossomos de DODAB em solução contendo D-Glicose (com uma osmolaridade suficiente para evitar o rompimento de lipossomos devido à mistura da dispersão de DODAB com soluções hiperosmóticas de NaCl) e adicionava-se soluções de NaCl. Media-se então a turbidez da solução isosmótica em função do tempo e assim estimava-se a velocidade de floculação. O mesmo foi feito com soluções contendo dAMP para comparar a cinética de floculação induzida pelo NaCl e a causada pelo nucleotídeo. Pequenas quantidades de dAMP causaram uma floculação muito mais rápida comparada à induzida por grandes concentrações de NaCl. Enquanto 210 mM de NaCl aumentaram a turbidez de ~ 0,1 a 0,2 em 30 minutos, apenas 1,50 mM de dAMP causaram um aumento de ~ 0,1 para 0,45

neste mesmo tempo. Isso mostra que, afora a atração eletrostática, o dAMP parece comportar-se como um ânion hidrofóbico com alta afinidade pelas bicamadas catiônicas de DODAB. Entretanto, o fato do dAMP estar duplamente carregado não foi considerado.

Através de experimentos de diálise, foram feitas medidas de ruptura vesicular pela interação DODAB/dAMP. Em presença de dAMP, houve um aumento de vazamento de sacarose radioativa a partir do compartimento intravesicular do DODAB para o meio externo, o que sugeriu, mais uma vez, inserção do nucleotídeo nas bicamadas de DODAB.

I.6 Justificativa e objetivo

Apesar de muito estudadas, as propriedades estruturais dos complexos catiônicos utilizados no transporte de DNA (lipoplexes) são pouco conhecidas. Utilizando marcadores de spin derivados de ácido esteárico e de seu metil-éster, marcados em diferentes carbonos da cadeia acila, foi mostrada a existência de anfífilos em fase fluida em agregados de DODAB, obtidos por sonicação, a temperaturas abaixo da temperatura monitorada para a transição gel-cristal líquido (~ 42 °C) (Benatti e col., 2001), na qual era suposto somente existirem anfífilos na fase gel. Com este trabalho, ficou evidente que marcadores de spin podem contribuir de maneira significativa para a compreensão da coexistência de diversas estruturas em agregados dispersos em meio aquoso.

No presente trabalho desejamos utilizar a técnica de RPE para adquirir um melhor entendimento acerca da interação de material genético com lipossomos catiônicos. Para tanto, todo o estudo realizado aqui enfoca o efeito causado por um único nucleotídeo (dAMP) sobre lipossomos formados pelo lipídio catiônico DODAB.

O espectro de RPE de marcadores de spin anfífilos incorporados a agregados, informa sobre a micro-viscosidade e a polaridade da região onde se encontra o grupo paramagnético (Biaggi e col., 1997; Turchiello e col., 2000). Este grupo-sonda pode tanto estar ligado na cabeça polar do anfílico, portanto informando sobre propriedades da interface do agregado com o meio aquoso, como estar ligado a um dos carbonos da cadeia acila do anfílico.

Neste último caso, por exemplo, sondas colocadas em diferentes carbonos monitoram a micro-estrutura das regiões a diferentes profundidades em uma bicamada lipídica ou micela, sendo capazes de distinguir a presença de uma ou outra (Benatti e col., 2001). A análise dos espectros de RPE permite ainda a distinção de regiões altamente organizadas e rígidas (fase gel) e regiões mais fluidas (fase fluida), podendo, portanto, monitorar a transição de fase gel - fluido, típica de anfífilicos organizados em bicamadas. Dependendo da forma do espectro de RPE, podemos fazer um estudo mais rigoroso, com simulações teóricas, usando a metodologia desenvolvida pelo grupo de Freed (Schneider e Freed, 1989; Budil e col., 1996; Fernandez e Lamy-Freund, 2000).

Destacam-se, de uma grande variedade de marcadores usados no estudo de membranas, os derivados de fosfolipídio (n-PCSL), ácido esteárico (n-SASL), ou metil éster do ácido esteárico (n-MESL) (onde n representa a posição do carbono da cadeia acila na qual se localiza o anel oxazolidínico que contém o grupo paramagnético). Dentre estes, optamos ser o mais indicado para o nosso caso o SASL, por duas razões principais: a cabeça polar hidrofílica do DODAB, constituída de um nitrogênio quaternário e quatro grupos metila, ocupa uma área transversal semelhante à das cadeias hidrofílicas, isto é, é uma cabeça pequena se comparada, por exemplo, com a cabeça de um fosfolipídio. Como o SASL também possui uma cabeça pequena, espera-se que ele altere menos a membrana do que marcadores com cabeças maiores (tais como os derivados de fosfolipídios). A outra razão é que estando o ácido esteárico negativo no pH em que os nossos experimentos foram feitos, poderá haver interação eletrostática entre o grupo carboxílico do SASL e a cabeça polar positiva do DODAB, minimizando um possível deslocamento vertical do marcador, algo que acontece com o MESL, por exemplo (Biaggi e col., 1997).

II. A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

(Nordio, 1976; Atherton, 1993; Orton, 1968; Poole, 1996; Griffith & Jost, 1976)

Ressonância Paramagnética Eletrônica é uma técnica espectroscópica que estuda as transições induzidas entre os níveis Zeeman de um sistema paramagnético situado em um campo magnético estático. Um átomo ou molécula possui um momento de dipolo magnético permanente apenas se seu momento angular eletrônico $\vec{J} = \vec{S} + \vec{L}$ for diferente de zero, onde $\vec{S}$ é o momento angular de spin e $\vec{L}$ é o momento angular orbital. O momento magnético de um átomo em um estado eletrônico especificado pelos números quânticos L, S e J é

$$\vec{\mu} = -g\beta_e\vec{J} \quad (\text{II.1})$$

onde g é o fator de desdobramento espectroscópico

$$g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad (\text{II.2})$$

e $\beta_e = \frac{|e|\hbar}{2mc}$ é o magneton de Bohr (e = carga do elétron; h = constante de Planck; m = massa do elétron; c = velocidade da luz). A energia de interação (energia Zeeman) do momento magnético com um campo externo $\vec{H}$ de intensidade uniforme H_0 é calculado pelo operador hamiltoniano

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} = g\beta_e\vec{H} \cdot \vec{J} = g\beta_e H_0 J_z \quad (\text{II.3})$$

onde J_z é o operador correspondente à projeção do momento angular ao longo da direção do campo. Os valores esperados de J_z , denotados por M_j , variam entre $-J$ e $+J$ inteiros. Portanto, o efeito do campo magnético é produzir $2J+1$ níveis, cada um dos quais com energia $W_{M_j} = g\beta_e H_0 M_j$ e uma população dado pela lei de distribuição de Boltzmann

$$P_{M_j} = \exp(-W_{M_j} / kT) / \sum_{M_j} \exp(-W_{M_j} / kT) \quad (\text{II.4})$$

Podem ocorrer transições entre os níveis de energia se a amostra é irradiada com um campo eletromagnético de frequência própria igual à

diferença de energia entre os níveis. Geralmente, este campo é polarizado em um plano perpendicular à direção do campo estático. As transições são induzidas somente entre níveis adjacentes caracterizados pelos números quânticos M_j e $M_j \pm 1$, com isto a condição de ressonância devida à absorção de energia do campo pela amostra é atingida quando

$$h\nu = \Delta W = g\beta_e H_0 \quad (\text{II.5})$$

II.1 A interação Zeeman

A energia de interação Zeeman do momento magnético associado ao spin eletrônico com o campo externo é expressa pela Hamiltoniana

$$H_Z = g_e \beta_e \vec{H} \cdot \vec{S} = g_e \beta_e H_0 S_z \quad (\text{II.1.1})$$

Denotando os valores do momento de spin angular $\vec{S}$ ao longo da direção do campo magnético por m_s , então as energias serão:

$$W_{m_s} = g_e \beta_e H_0 m_s \quad (\text{II.1.2})$$

Se a amostra for irradiada com uma radiação de frequência ν_0 , a energia de absorção ocorrerá quando o valor do campo satisfizer a seguinte condição:

$$H = \frac{h\nu_0}{g_e \beta_e} \quad (\text{II.1.3})$$

Quando uma molécula está sujeita à ação de um campo magnético, o efeito combinado do campo e do acoplamento spin-órbita reinstala pequenas contribuições do momento angular orbital dentro do estado fundamental do sistema. Desta maneira as propriedades magnéticas do sistema não são devidas apenas ao momento angular de spin; todavia, é conveniente tratar o momento magnético resultante como sendo produzido por um spin puro, definindo conseqüentemente um fator g efetivo para o sistema. Desvios do fator g do valor do spin do elétron livre são pequenos no caso de radicais livres aromáticos, mas são relativamente grandes em moléculas contendo íons dos metais de transição. Além do mais, a magnitude de tais correções depende da orientação do campo magnético com respeito ao eixo molecular do sistema. Isto implica que o fator g da molécula não pode ser representado por um escalar, mas deve ser representado por um tensor de segunda ordem.

Um tratamento teórico detalhado leva à seguinte expressão para os componentes do tensor g (Slichter, 1963):

$$g_{ij} = g_e \delta_{ij} - 2\lambda \sum_l \frac{\langle \psi_0 | L_i | \psi_l \rangle \langle \psi_l | L_j | \psi_0 \rangle}{E_l - E_0} \quad (\text{II.1.4})$$

em que δ_{ij} é o delta de Kronecker, que é igual a um se $i = j$ e zero se $i \neq j$; λ é a constante de acoplamento spin-órbita; e ψ_0 e ψ_l são as auto-funções que representam o estado fundamental e os excitados do sistema, respectivamente, E_0 e E_l sendo as energias correspondentes a estes estados.

A Hamiltoniana do efeito Zeeman pode então ser escrita da seguinte forma

$$H_Z = \beta_e \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} \quad (\text{II.1.5})$$

O observável físico correspondente ao operador Hamiltoniano é a energia e obviamente não depende da orientação do sistema de referência. Portanto a escolha do sistema de referência é completamente arbitrária. No entanto, há duas escolhas particulares convenientes:

- (a) Os eixos do sistema do laboratório com o eixo z coincidindo com a direção do campo magnético. Neste sistema $\vec{H} = \vec{k}H_0$, e os operadores de spin são bem definidos, dado que a direção de H corresponde ao eixo de quantização. Quando expressa no sistema de eixos do laboratório, a Hamiltoniana do efeito Zeeman se torna

$$H_Z = \beta_e H_0 (g_{xx} S_x + g_{yy} S_y + g_{zz} S_z) \quad (\text{II.1.6})$$

- (b) O sistema de eixos da molécula em que o tensor g é diagonal. Neste caso nós obtemos:

$$H_Z = \beta_e (g_{pp} H_p S_p + g_{qq} H_q S_q + g_{rr} H_r S_r) \quad (\text{II.1.7})$$

onde H_p , H_q e H_r são as componentes de $\vec{H}$ no sistema de eixos da molécula.

Tomemos como exemplo um caso em que a molécula está orientada com um dos eixos principais paralelo à direção do campo. A condição de ressonância será atingida nos seguintes valores de campo

$$\frac{h\nu_0}{g_{pp}\beta_e}, \quad \frac{h\nu_0}{g_{qq}\beta_e}, \quad \frac{h\nu_0}{g_{rr}\beta_e},$$

dependendo de qual dos eixos principais está direcionado ao longo do campo. Para qualquer orientação arbitrária da molécula, o campo ressonante continua sendo dado pela relação

$$H = \frac{h\nu_0}{g_{ef}\beta_e} \quad (\text{II.1.8})$$

onde o fator efetivo g é

$$g_{ef} = \left(g_{pp}^2 l^2 + g_{qq}^2 m^2 + g_{rr}^2 n^2 \right)^{1/2} \quad (\text{II.1.9})$$

(l,m,n) sendo os cossenos diretores de H no sistema de eixos da molécula.

II.2 Interação com a microonda do campo

Além do campo magnético estático, que determina a separação dos níveis Zeeman de energia, nós temos que considerar a presença da microonda do campo, que é responsável pelas transições de RPE. O campo magnético associado à radiação oscila ao longo do eixo x perpendicular à direção principal do campo, e, portanto tem como componentes

$$H_{1x} = H_1 \cos \omega t, \quad H_{1y} = H_{1z} = 0 \quad (\text{II.2.1})$$

A hamiltoniana correspondente para a interação com o momento de spin magnético, negligenciando por simplicidade o fator g anisotrópico é

$$H' = g_e \beta_e H_1 S_x \cos \omega t \quad (\text{II.2.2})$$

Como H_1 é muito menor do que o campo principal H_0 , H' pode ser tratado como uma perturbação dependente do tempo sobre os auto-estados de H_z . Da teoria de perturbação, pode ser facilmente verificado que o efeito de H' é induzir transições entre os estados $|\alpha\rangle$ e $|\alpha'\rangle$ de H_z de energias E_α e $E_{\alpha'}$, cuja razão é dada pela probabilidade de transição (Hameka, 1965; Slichter, 1963)

$$w_{\alpha\alpha'} = (2\pi/\hbar) g_e^2 \beta_e^2 H_1^2 |\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle|^2 \delta(E_\alpha - E_{\alpha'} - \hbar\omega) \quad (\text{II.2.3})$$

onde δ é a função delta de Dirac, que impõe a condição $E_\alpha - E_{\alpha'} = \hbar\omega$. A condição para valores não nulos de $\langle \alpha | S_x | \alpha' \rangle$ é encontrada reescrevendo o operador de spin S_x em termos dos operadores de abaixamento e levantamento S_+ e S_- :

$$S_\pm = S_x \pm iS_y, \quad S_x = \frac{1}{2}(S_+ + S_-)$$

O efeito destes operadores sobre as autofunções de spin é:

$$S_{\pm}|S, m_s\rangle = [S(S+1) - m_s(m_s \pm 1)]^{1/2}|S, m_s \pm 1\rangle \quad (\text{II.2.4})$$

Portanto as transições só ocorreram entre níveis com energia de separação $\Delta E = \hbar\omega$, satisfazendo a regra de seleção $\Delta m_s = \pm 1$.

II.3 O acoplamento hiperfino

A estrutura hiperfina é causada pela interação do spin magnético eletrônico com os momentos magnéticos do núcleo.

A estrutura de multipletto dos espectros de RPE surge do fato de que o momento magnético de spin eletrônico “sente” um campo total diferente de acordo com quais das $2I+1$ orientações permissíveis é assumida pelo spin nuclear no campo magnético estático.

As interações magnéticas entre os spins eletrônicos e nucleares são representadas pela hamiltoniana

$$H = -g_e\beta_e g_N\beta_N \left\{ \frac{(\vec{I} \cdot \vec{S})r^2 - 3(\vec{I} \cdot \vec{S})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^3} - \frac{8\pi}{3}(\vec{I} \cdot \vec{S})\delta(r) \right\} \quad (\text{II.3.1})$$

onde $\vec{r}$ é vetor distância entre o elétron e o núcleo e $\delta(r)$ é a função delta de Dirac. O primeiro termo que aparece na equação (II.3.1) descreve a interação dipolar entre o elétron e os núcleos, e pode ser derivada por argumentos clássicos (Hameka, 1965). O segundo termo, que surge do chamado acoplamento de contato de Fermi, também pode ser obtido por um simples tratamento clássico.

Da hamiltoniana da equação (II.3.1) nós podemos obter uma hamiltoniana de spin H_{hf} , agindo apenas sobre variáveis de spin, integrando sobre todas as coordenadas espaciais eletrônicas, isto é, tomando a média sobre a distribuição de probabilidade eletrônica $\psi^2(r)$.

Vamos examinar separadamente os resultados obtidos pelos dois termos da hamiltoniana dada na equação (II.3.1). A interação dipolar toma a seguinte forma

$$H_1 = \vec{I} \cdot \vec{A}' \cdot \vec{S} \quad (\text{II.3.2})$$

onde $\vec{A}'$ é um tensor de segunda ordem, com elementos dados por

$$A'_{ij} = -g_e\beta_e g_N\beta_N \langle (r^2\delta_{ij} - 3x_i x_j) r^{-5} \rangle \quad (\text{II.3.3})$$

e os brackets indicam integração sobre todos os elementos da distribuição.

O termo dipolar é claramente simétrico, e seu traço é zero porque $\sum x_i^2 = r^2$. Assim como o tensor g , nós podemos ver que a magnitude da interação dipolar depende da orientação da molécula em relação ao campo magnético.

Para a interação de contato nós obtemos

$$H_2 = a \vec{I} \cdot \vec{S} \quad (\text{II.3.4})$$

onde a constante de acoplamento isotrópica a é um escalar definido por

$$a = (8\pi/3) g_e \beta_e g_N \beta_N \psi^2(0) \quad (\text{II.3.5})$$

e $\psi(0)$ é o valor assumido pela função de onda do elétron desemparelhado na posição nuclear. Finalmente, a Hamiltoniana hiperfina completa H_{hf} , obtida somando-se H_1 e H_2 , pode ser escrita na forma compacta

$$H_{hf} = \vec{I} \cdot \vec{A} \cdot \vec{S} \quad (\text{II.3.6})$$

através da definição do tensor $\vec{A}$ com componentes

$$A_{ij} = A'_{ij} + \delta_{ij} a \quad (\text{II.3.7})$$

No sistema de eixos principal do tensor hiperfino, a Hamiltoniana assume a forma

$$H_{hf} = A_{pp} I_p S_p + A_{qq} I_q S_q + A_{rr} I_r S_r \quad (\text{II.3.8})$$

II.4 Espectros em solução

Para um radical livre em que o spin do elétron interage via interação hiperfina com N núcleos de número quântico de spin I_k , a Hamiltoniana magnética é

$$H = \beta_e \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} + \sum_{k=1}^N \vec{S} \cdot \vec{A}^{(k)} \cdot \vec{I} \quad (\text{II.4.1})$$

Se a espécie paramagnética está dissolvida em um solvente de baixa viscosidade, então o rápido movimento das reorientações moleculares devidas aos movimentos térmicos, promedia os termos anisotrópicos da hamiltoniana de spin. A posição do espectro no campo e a magnitude dos desdobramentos hiperfinos são então determinadas pelos valores médios dos elementos diagonais dos tensores $\vec{g}$ e $\vec{A}$. Os níveis de energia do sistema podem então ser obtidos em termos da Hamiltoniana isotrópica

$$\begin{aligned}
H_0 &= g\beta_e \vec{H} \cdot \vec{S} + \sum_{k=1}^N a_k \vec{S} \cdot \vec{I}_k \\
&= g\beta_e H_0 S_z + \sum_{k=1}^N a_k (S_x I_{kx} + S_y I_{ky} + S_z I_{kz})
\end{aligned} \tag{II.4.2}$$

onde

$$g = \frac{1}{3} \text{Tr } \vec{g} \quad \text{e} \quad a_k = \frac{1}{3} \text{Tr } \vec{A}^{(k)} \tag{II.4.3}$$

Como as interações hiperfinas são sempre muito menores do que a energia de interação Zeeman, podemos computar os níveis de energia tratando o termo hiperfino como uma perturbação sobre os autoestados do termo Zeeman. As autofunções da Hamiltoniana de Zeeman podem ser escritas como produtos simples das autofunções dos operadores de spin $\vec{S}_z$ e $\vec{I}_{kz}$ dos spins eletrônicos e nucleares. Estes produtos de funções são também autofunções da hamiltoniana simplificada

$$H'_0 = g\beta_e H_0 S_z + \sum_k a_k S_k I_{kz} \tag{II.4.4}$$

e as energias de primeira ordem requeridas são os autovalores correspondentes

$$E = g\beta_e H_0 m_s + \sum_k a_k m_s M_k \tag{II.4.5}$$

Devido ao efeito do campo estático e aos acoplamentos hiperfinos, são gerados subníveis com energias dadas pela equação (II.4.5). Alguns desses níveis terão a mesma energia, isto é, eles serão degenerados, se a interação hiperfina for a mesma para dois ou mais núcleos.

A microonda aplicada ao sistema em experimentos normais de RPE induz transições entre estes subníveis. No entanto, nem todas as transições são permitidas. Primeiramente, os estados envolvidos nas transições devem satisfazer a condição $\Delta m_s = \pm 1$, conforme já foi visto na equação (II.2.3). Além disso, o operador S_x age apenas sobre as variáveis de spin do elétron, e então a disposição dos spins nucleares dos dois estados entre os quais as transições ocorrerão deve ser a mesma. Se esse não for o caso, a matrix de elementos da equação (II.2.3) seria nula, devido à ortogonalidade das funções de spin nuclear.

Concluindo, as transições de RPE permitidas devem satisfazer as regras de seleção $\Delta m_s = \pm 1$ e $\Delta m_k = 0$ para todos os núcleos.

Vamos supor por simplicidade que todos os N núcleos sejam equivalentes. A energia dos níveis hiperfinos é então

$$E(m_s, M) = g\beta_e H_o m_s + a m_s M \quad (\text{II.4.6})$$

onde M é a soma vetorial dos números quânticos individuais M_k . A diferença de energia dos níveis envolvidos nas transições permitidas é

$$\Delta E = g\beta_e H_o + aM \quad (\text{II.4.7})$$

O espectro consistirá de um número de linhas igual a $2N I_k + 1$ valores permitidos de M , com intensidade proporcional a degenerescência de cada estado nuclear M , isto é, ao número de maneiras em que os componentes de spin individuais M_k possa se combinar para resultar M . As linhas espectrais são igualmente espaçadas, e a separação entre linhas adjacentes é a/h em unidades de freqüência. Em experimentos de RPE, em que o campo é varrido a uma freqüência fixa ν_0 para encontrar as condições de ressonância, as transições serão simetricamente dispostas em torno do centro $H_0 = h\nu_0 / g\beta_e$, e ocorrerão a valores de campo espaçados de $a/g\beta_e$. Por esta razão, é comum dar as constantes de acoplamento em unidades de freqüência ou seu equivalente em Gauss (G), ao invés de em unidades de energia. Da relação (II.5) nós encontramos que 1 G corresponde a 2,8 MHz para $g = 2$.

A figura II.4.1 mostra os diagramas de energia para o caso do um spin de elétron interagindo com um núcleo de spin 1.

Figura II.4.1 Esquema dos níveis de energia de um spin eletrônico interagindo com um núcleo de spin 1. As linhas tracejadas indicam as transições possíveis.

II.5 Relaxação de spins e a forma de linha lorentziana

Quando a amostra é irradiada com a microonda do campo, ela absorve energia deste e é excitada para níveis de energia mais altos. Ao mesmo tempo, ocorrem transições inversas por emissão estimulada. Estas circunstâncias, todavia, não são suficientes para permitir uma detecção contínua do sinal, já que os processos anteriores eventualmente igualarão as populações dos níveis

magnéticos, causando um desaparecimento do sinal (saturação). Na verdade, existem mecanismos de relaxação que trazem o sistema de volta à situação de equilíbrio de Boltzmann das populações após ela ter sido perturbada pela absorção da radiação. A situação de equilíbrio é restaurada por meios de transições não radioativas dos níveis mais altos para os mais baixos e a conseqüente transferência para o ambiente da energia magnética, que é dissipada como energia térmica. A razão em que o equilíbrio térmico é restaurado é definida por um tempo característico denominado spin-rede ou tempo de relaxação longitudinal T_1 .

Os processos de relaxação spin-rede encurtam o tempo de vida dos níveis magnéticos e, portanto, um alargamento das linhas espectrais deve ocorrer devido ao princípio de incerteza de Heisenberg. De acordo com este princípio, se um sistema mantém-se em um particular estado por um tempo menor do que Δt , a incerteza na energia do estado não pode ser menor que $\Delta W \approx h/\Delta t$. Isto significa que a largura de linha espectral, em unidades de freqüência, deve ser pelo menos da ordem de $1/T_1$. Porém, sob condições de baixa potência de microonda, evitando efeitos de saturação, o alargamento das linhas é causado por outros mecanismos de relaxação, os quais produzem modulação dos níveis magnéticos sem causar transições entre eles. Estes processos, que mantêm a energia total Zeeman constante em contraste com os mecanismos de relaxação spin-rede discutidos anteriormente, são caracterizados por um tempo de relaxação T_2 denominado tempo de relaxação transversal.

O fenômeno de relaxação de spins pode ser entendido utilizando-se apenas de argumentos clássicos. Consideremos uma coleção de spins em um campo magnético $H = H_0 \bar{k}$. Classicamente, os spins realizarão um movimento de precessão ao redor do campo e haverá uma magnetização resultante ao longo do eixo z. Para cada spin “precessando” há uma componente do momento magnético girando no plano xy perpendicular ao campo aplicado. No entanto, como não há coerência de fase entre os spins, os valores de M_x e M_y são nulos no equilíbrio térmico. Se, em algum instante, impusermos uma coerência de fase pela aplicação de alguma perturbação (no caso um campo oscilante no plano xy), então as componentes M_x e M_y vão oscilar ou girar no plano xy. Após a perturbação ser desligada, esta magnetização cai a zero conforme a coerência de fase vai sendo perdida. O tempo que esta

magnetização (no plano xy) demora até cair à zero é caracterizado pelo tempo de relaxação T_2 . As equações de movimento das componentes da magnetização, apresentadas logo abaixo, são conhecidas como as equações fenomenológicas de Bloch

$$\frac{dM_z}{dt} = g\beta_e (\vec{H} \times \vec{M})_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (\text{II.5.1})$$

$$\frac{dM_x}{dt} = g\beta_e (\vec{H} \times \vec{M})_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (\text{II.5.2})$$

$$\frac{dM_y}{dt} = g\beta_e (\vec{H} \times \vec{M})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (\text{II.5.3})$$

Onde M_0 é o valor de M_z no equilíbrio térmico e H é o campo total, dado por

$$\vec{H} = H_1 \cos(\omega t) \vec{i} + H_1 \sin(\omega t) \vec{j} + H_0 \vec{k} \quad (\text{II.5.4})$$

Resolvendo o sistema de equações, para o caso estacionário, chegamos em:

$$M_x = \frac{\gamma H_1 M_0 \{(\omega - \omega_0) \cos(\omega t) + (1/T_2) \sin(\omega t)\}}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega - \omega_0)^2} \quad (\text{II.5.5})$$

$$M_y = \frac{\gamma H_1 M_0 \{(\omega - \omega_0) \sin(\omega t) - (1/T_2) \cos(\omega t)\}}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega - \omega_0)^2} \quad (\text{II.5.6})$$

$$M_z = \frac{M_0 \{(1/T_2)^2 + (\omega - \omega_0)^2\}}{\gamma^2 H_1^2 (T_1/T_2) + (1/T_2)^2 + (\omega - \omega_0)^2} \quad (\text{II.5.7})$$

onde $\gamma = g\beta_e$ e $\omega_0 = \gamma H_0$

Na prática, os experimentos de RPE usam radiação linearmente polarizada. Podemos então escrever as componentes do campo da equação (II.5.4) como

$$H_x = 2H_1 \cos(\omega t); \quad H_y = 0 \quad (\text{II.5.8})$$

Os efeitos deste campo podem ser descritos usando uma suscetibilidade complexa

$$\chi = \chi' + i\chi'' \quad (\text{II.5.9})$$

cujas componentes χ' e χ'' são conhecidas como suscetibilidades de Bloch. Podemos tratar H_x na equação (II.5.8) como a parte real de um campo H_c complexo, dado por

$$H_c = 2H_1 \exp(i\omega t) = 2H_1 [\cos(\omega t) + i \sin(\omega t)] \quad (\text{II.5.10})$$

e então tomar M_x como sendo a parte real de uma magnetização complexa M_c .

$$M_c = \chi B_c \quad (\text{II.5.11})$$

Usando as equações (II.5.9) e (II.5.10) obtemos

$$M_x = 2H_1 \chi' \cos(\omega t) + 2B_1 \chi'' \sin(\omega t) \quad (\text{II.5.12})$$

Comparando esta equação com a (II.5.5), podemos ver que as componentes da susceptibilidade complexa são

$$\chi' = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\gamma M_0 (\omega_0 - \omega)}{\gamma^2 H_1^2 (T_1 / T_2) + (1 / T_2^2) + (\omega - \omega_0)^2} \right\} \quad (\text{II.5.13})$$

$$\chi'' = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\gamma M_0 (1 / T_2)}{\gamma^2 H_1^2 (T_1 / T_2) + (1 / T_2^2) + (\omega - \omega_0)^2} \right\} \quad (\text{II.5.14})$$

Um circuito formado por um resistor de resistência R em série com um indutor de indutância L, com a amostra em uma bobina, é equivalente à cavidade de um espectrômetro de RPE. Na ausência da amostra, a impedância é definida como

$$Z_0 = R_0 + i\omega L_0 \quad (\text{II.5.15})$$

Assumindo que a bobina tenha um volume unitário e esteja totalmente preenchida pela amostra, então a presença da amostra modifica a impedância para

$$Z = R_0 + i\omega L_0 (1 + 4\pi\chi) = (R_0 + 4\pi L_0 \chi'') + i\omega L_0 (1 + 4\pi\chi') \quad (\text{II.5.16})$$

A mudança na resistência, que é responsável pela potência extra dissipada no circuito devido à presença da amostra, é então proporcional a χ'' . Concluimos com isso que a forma de linha da absorção de RPE em termos da frequência é

$$f(\omega) = \frac{A\gamma M_0 (1 / T_2)}{\gamma^2 H_1^2 (T_1 / T_2) + (1 / T_2^2) + (\omega - \omega_0)^2} \quad (\text{II.5.17})$$

onde A é a constante de proporcionalidade em que são inclusos quaisquer fatores instrumentais.

Normalmente, o campo H_1 é pequeno para evitar saturação do sinal e com isso o termo $\gamma^2 H_1^2 (T_1 / T_2)$ é desprezível quando comparado a $(1 / T_2^2)$ e a função da forma de linha se torna

$$f(\omega) = \frac{A\gamma M_0 (1 / T_2)}{(1 / T_2^2) + (\omega - \omega_0)^2} \quad (\text{II.5.18})$$

A função lorentziana é dada por (Vuolo, 1996):

$$H(y) = \frac{1}{\pi} \frac{a}{a^2 + (y - y_0)^2} \quad (\text{II.5.19})$$

Comparando as duas equações acima, podemos ver que a (II.5.18) trata-se de uma função lorentziana multiplicada por uma constante ($A\gamma M_0\pi$) e com $a = 1/T_2$. A figura II.5.1 mostra uma função lorentziana e sua primeira derivada.

Figura II.4.1 Forma de linha lorentziana e sua primeira derivada.

Nos experimentos de RPE os espectros apresentados são a primeira derivada da curva de absorção em função do campo magnético. Para obter a equação (II.5.18) em termos do campo magnético, basta utilizar a igualdade $\omega = \gamma H$. Mais informações sobre a função lorentziana se encontram na seção V.I.

II.6 Largura de linha de espectros em solução

Se um elétron desemparelhado de uma molécula interage com um núcleo de spin I , o espectro observado consistirá de $2I + 1$ linhas hiperfinas. Espera-se que estas linhas tenham a mesma intensidade, dado que a energia de separação dos níveis magnéticos é muito menor do a energia térmica kT , e portanto as populações dos níveis, como vistas na equação (II.4), são

praticamente iguais. No entanto, observamos que, na maioria dos casos, as alturas das linhas não são iguais. Isso ocorre porque as linhas não possuem a mesma largura. Para uma curva Lorentziana como a da equação (II.5.18), a altura pico-a-pico da primeira derivada varia com o inverso do quadrado da largura (A.11) e portanto as alturas relativas de duas linhas têm a mesma intensidade mas diferentes larguras:

$$I_1 / I_2 = [T_2(1) / T_2(2)]^2 \quad (\text{II.6.1})$$

As variações na largura de linha são atribuídas na maioria dos casos a flutuações dos termos anisotrópicos da Hamiltoniana magnética (Freed and Fraenkel, 1963; Hudson and Luckhurst, 1969). Mesmo que os termos anisotrópicos não contribuam para os parâmetros magnéticos medidos em solução, eles constituem uma importante fonte do alargamento de linha. A Hamiltoniana (II.4.1) pode de fato ser considerada como uma soma de duas contribuições: uma isotrópica, parte invariante com as orientações H_0 , dada pela equação (II.4.2), e uma puramente anisotrópica, H_1 , parte dependente do ângulo, que pode ser escrita como

$$H_1 = \beta_e \vec{H} \cdot \vec{g}' \cdot \vec{S} + \sum_{k=1}^N \vec{A}'^{(k)} \cdot \vec{I} \quad (\text{II.6.1})$$

onde $\vec{g}'$ e $\vec{A}'^{(k)}$ são tensores diagonais.

Em fase líquida, o tombamento molecular faz H_1 ser uma função aleatória do tempo. Como consequência, há uma modulação aleatória dos níveis de energia e das frequências de transição. Apesar do valor da média de H_1 ser zero, espera-se ocorrer um alargamento das linhas de absorção.

As flutuações de frequência podem ser caracterizadas através de suas amplitude e coerência. A amplitude Δ é definida pelo valor da média ao quadrado das interações anisotrópicas (em unidades de frequência angular), e a coerência é dada pelo tempo de correlação τ do movimento aleatório. Nos casos discutidos longe das interações anisotrópicas moduladas pelos movimentos Brownianos, o tempo de correlação é uma medida do tempo em que as moléculas persistem em uma dada orientação. Em outros casos, em que a modulação dos parâmetros magnéticos do sistema resulta de interações do solvente ou mudanças conformacionais, o tempo de correlação está relacionado ao tempo médio da existência de uma particular configuração molecular.

Um processo aleatório é considerado rápido se $\Delta \cdot \tau < 1$. Sob esta condição os termos anisotrópicos vão a zero quando se tira a média e o espectro é composto de linhas Lorentzianas finas, caracterizada pelos valores isotrópicos dos parâmetros magnéticos. O efeito da parte da Hamiltoniana com dependência temporal manifesta-se através do surgimento de diferenças mais ou menos pronunciadas nas larguras de linha ao longo das componentes hiperfinas do espectro. Este fato faz com que a razão entre as alturas das linhas espectrais desvie do valor esperado.

Para $\Delta \cdot \tau > 1$, os movimentos são lentos e a forma de linha reflete diretamente a distribuição de frequência aleatória, se aproximando do caso limite de linhas espectrais de policristais.

Figura II.6.1 – Espectros de RPE do marcador de spin TEMPOL (molécula mostrada acima) em soluções de viscosidades crescentes de (a) a (f). Adaptada de Hsia e Piette, 1969.

A figura II.6.1 apresenta espectros de RPE de um nitróxido aquo-solúvel em ambientes com viscosidades diferentes. Da figura, observa-se claramente como a forma do espectro varia com o tempo de correlação.

Podemos dividir os tempos de correlação em quatro regiões:

- (a) $\tau \leq 10^{-11} s$ – em flutuações mais rápidas do que $10^{-11}s$, a espectroscopia de RPE não é sensível. Os espectros de RPE do nitróxido, no caso de movimento isotrópico, exibem três linhas de igual intensidade, sendo possível extrair os valores médios g_0 e a_0 ;
- (b) $10^{-11} \leq \tau \leq 3 \times 10^{-9} s$ – região de movimento rápido (*motional narrowing*). Usando a teoria de Redfield (Redfield, 1965), os alargamentos das três linhas lorentzianas (espectro (a) da figura II.6.1) dão informação acerca da velocidade do movimento da molécula.
- (c) $3 \times 10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-7} s$ – As linhas de RPE, além do alargamento, apresentam mudança de posição (espectros (c) a (e) da figura II.6.1). Há necessidade de uma modelagem mais complexa de simulação de espectros, desenvolvida, por exemplo, pelo grupo de J. H. Freed.
- (d) $\tau \geq 10^{-7} s$ – Nesta região a RPE é insensível. Os espectros são chamados de espectros de pó (espectro (f) da figura II.6.1). Os sinais correspondem à molécula em todas as direções relativas ao campo magnético externo.

Na região de movimento rápido, e em que as linhas espectrais resultam da interação hiperfina com um único núcleo, encontramos, usando a teoria de Redfield, que a dependência da largura de linha $1/T_2$ em relação ao número quântico M , pode ser “fitado” pela seguinte equação

$$[T_2(M)]^{-1} = A + BM + CM^2 \quad (II.6.2)$$

Os parâmetros de largura de linha A , B e C dependem da magnitude das anisotropias magnéticas e da taxa de reorientações moleculares no líquido. Se estas forem suficientemente rápidas, as anisotropias são anuladas e os efeitos de alargamento de linha não são mais observáveis. De acordo com o modelo de difusão de Debye (Debye, 1945), o tempo de correlação isotrópico para difusão rotacional pode ser calculado em termos das dimensões moleculares, temperatura e viscosidade do meio se as moléculas podem ser aproximadas por esferas de raio R :

$$\tau^{iso} = (6D)^{-1}, \quad D = kT / 8\pi\eta R^3 \quad (II.6.3)$$

onde D é a constante de difusão rotacional e η é a viscosidade. Valores típicos de τ_c para moléculas normais em solventes de baixa viscosidade estão numa faixa de $10^{-10} - 10^{-11}$ segundos.

Os parâmetros B e C são calculados através de parâmetros dos tensores $\tilde{g}$ e $\tilde{A}$ e resultam em duas expressões para o cálculo do tempo de correlação (Schreier e col., 1978):

$$\begin{aligned}\tau_B &= -1,22 \times 10^{-9} B \\ \tau_C &= 1,19 \times 10^{-9} C\end{aligned}\tag{II.6.4}$$

para movimento isotrópico, τ_B e τ_C devem ser idênticos. No caso de esses dois valores diferirem, interpreta-se tal situação como existência de anisotropia no movimento.

II.7 Os radicais livres com nitróxido

Os radicais livre nitróxidos são moléculas contendo o grupo paramagnético

Estas espécies são altamente estáveis e inertes graças ao efeito protetor exercido pelos quatro grupos metil. Os espectros de RPE desses componentes apresentam três linhas hiperfinas abruptas e bem-definidas resultando do acoplamento do spin do elétron com o spin do nuclear. A tabela II.7.1 (Griffith e col., 1965) mostra valores típicos dos parâmetros magnéticos, obtidos de estudos de um único cristal com radicais livres incorporados a baixa concentração em um meio diamagnético. O sistema molecular de eixos escolhido é mostrado a seguir:

Figura II.7.1 – Sistema de eixos do nitróxido. Adaptada de Nordio, 1976.

O valor da constante de acoplamento isotrópico (38 MHz comparado com 55 MHz para o radical NH_3^+) e a dependência angular da interação dipolar confirma que o elétron desemparelhado está localizado principalmente no orbital $2p_z$ do orbital do átomo de nitrogênio.

g_{pp}	2.0089	$A_{pp}(A_{\perp})$	14 MHz
g_{qq}	2.0061	$A_{qq}(A_{\perp})$	14 MHz
g_{rr}	2.0027	$A_{rr}(A_{\parallel})$	87 MHz
g	2.0059	a	38 MHz

Tabela II.7.1 - Parâmetros magnéticos típicos do grupo nitróxido. Adaptada de Nordio, 1976.

Figura II.7.2 – Espectros de radicais nitróxido. (a) , (b) e (c): Espectros de cristal com o campo ao longo dos eixos principais dos tensores g e A . (d) Espectro em solução aquosa de glicerol à 25° C. (e) Espectro de solução congelada de glicerol à -80° C. O campo cresce da esquerda para a direita. Adaptada de Nordio, 1976.

A figura II.7.2 mostra uma série de espectros obtidos em diferentes condições: em cristais; em solução e em solução congelada. Os espectros (a), (b), e (c) referem-se a moléculas orientadas em um cristal de rede com o campo magnético paralelo a cada uma das três direções principais dos tensores magnéticos. Os desdobramentos hiperfinos estão listados na tabela II.7.1, os quais correspondem a uma separação de campo respectivamente de 5, 5 e 31

G. Devido à anisotropia do fator g , os centros dos espectros localizam-se em diferentes valores de campo, dependendo da orientação molecular. Se o campo ressonante está ocorrendo em cerca de $H_0 = 3400$ G para moléculas orientadas com seus eixos r ao longo do campo, então a posição dos centros para os espectros (a) e (b), quando operados a frequência constante, são calculados das relações:

$$g_{pp}(H_0 + \delta H_p) = g_{qq}(H_0 + \delta H_q) = g_{rr}H_0 \quad (\text{II.7.1})$$

Os espectros (d) e (e) referem-se a radicais livres dissolvidos em glicerol aquoso à 25 °C e congelado a -80 °C.

Observamos também que a componente de campo alto da estrutura hiperfina do nitrogênio é mais fina (d) que as outras duas linhas, que têm aproximadamente a mesma largura. Isto pode ser visto tomando a equação (II.6.2) e calculando explicitamente as expressões para os parâmetros de largura de linha A , B e C . Fazendo isso, encontramos

$$\Delta H_0 = A \quad (\text{II.7.2})$$

$$\Delta H_{+1} = A + B + C \quad (\text{II.7.3})$$

$$\Delta H_{-1} = A - B + C \quad (\text{II.7.4})$$

onde ΔH_i é a largura da linha correspondente a $M = i$

Lembrando que intensidade da linha lorentziana é proporcional ao inverso do quadrado de sua largura ($h_i \propto 1/\Delta H_i^2$, h_i é a altura da linha cujo número de spin nuclear é i , ver seção A.I) chegamos ainda às seguintes equações

$$B = \frac{\Delta H_0}{2} \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right] \quad (\text{II.7.5})$$

$$C = \frac{\Delta H_0}{2} \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right] \quad (\text{II.7.6})$$

Através destas duas equações vemos que os parâmetros B e C podem ser medidos diretamente dos espectros de RPE. O termo A inclui contribuições para o alargamento devido a mecanismos que são diferentes da modulação das interações anisotrópicas. Estes efeitos de alargamento surgem, por exemplo, da presença de oxigênio na solução ou de fatores instrumentais.

Devido à relação entre a largura de linha lorentziana e sua altura, qualquer uma delas (largura ou altura) pode ser utilizada como um parâmetro capaz de dar informações acerca da mobilidade da região monitorada pelo marcador de spin. No entanto, experimentalmente é melhor medir a largura de linha, pois a intensidade da linha pode variar devido a fatores instrumentais mesmo repetindo-se uma mesma medição. Quanto maior a largura de linha, menor o movimento do marcador e, portanto, mais empacotado (rígido) será o ambiente monitorado por ele. Já a razão entre as alturas de duas linhas (na região de movimento rápido) sofre pouca alteração quando se repete uma mesma medida, o que torna a razão entre as alturas de duas linhas um parâmetro muito mais confiável do que apenas medir a altura. Quando o movimento do marcador se encontra na região de movimento rápido, tanto h_{+1}/h_0 quanto h_{-1}/h_0 são parâmetros que se aproximam da unidade à medida que a liberdade de movimento do marcador se torna maior, pois a altura das três linhas tende a se igualar.

II.7.1 Alargamento de linha não homogêneo

Além do alargamento causado pelos termos A , B e C , existem alargamentos não homogêneos devidos a estruturas hiperfinas não resolvíveis. Tais alargamentos têm sido um problema desde os primórdios da RPE (Plachy e Kivelson, 1967).

Uma consequência desses alargamentos de linha é que a medida dos parâmetros experimentais (larguras de linhas e/ou razão entre as alturas) torna-se comprometida, pois as linhas não possuem mais a forma lorentziana e nem formas de linha iguais. Dependendo da forma de linha, o erro em tais medidas pode atingir valores maiores que 70%! (Bales, 1989). No entanto, algumas vezes tanto a razão entre as alturas quanto as larguras de linha (obtidas diretamente do espectro e sem fazer qualquer correção), como será mostrado adiante neste trabalho, tornam-se parâmetros empíricos razoavelmente bons.

Na maioria dos casos, as perturbações que obscurecem a informação de interesse das linhas hiperfinas (as larguras lorentzianas) são gaussianas. Felizmente, quando a estrutura hiperfina não é resolvida, sua própria complexidade assegura que o perfil da linha seja aproximadamente gaussiano. Assim sendo, cada marcador de spin em um dado solvente é caracterizado por uma largura de linha gaussiana (Bales, 1989).

Bales desenvolveu um método mostrando que as linhas de RPE podem ser escritas como uma soma de uma única linha gaussiana com uma lorentziana (Bales, 1989) e, através de um programa de ajuste (LOWFIT), consegue extrair as larguras de linha gaussiana (ΔH^G) e lorentziana (ΔH^L) dos espectros de EPR na região de movimento rápido (ver seção A.II).

As equações II.7.5 e II.7.6 possuem um erro devido ao fato de que (em virtude dos alargamentos de linha não homogêneos não resolvidos) nem as formas de linha das três linhas são iguais e nem elas são lorentzianas. Podemos reescrever estas equações introduzindo um fator de correção:

$$B = \frac{\Delta H_0}{2} \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right] Q_0 S(\chi_0) \quad (\text{II.7.7})$$

$$C = \frac{\Delta H_0}{2} \left[\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right] Q_0 S(\chi_0) \quad (\text{II.7.8})$$

$$\text{onde } S(\chi_0) = \frac{1 + 1.78\chi_0 + 1.85\chi_0^2}{1 + 2.08\chi_0}, \quad \text{e } Q_0 = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4\chi_0^2}}{2\chi_0} \quad \chi_0 = \frac{\Delta H^G}{\Delta H^L}$$

Através das equações II.7.7 e II.7.8 podemos calcular os valores corretos dos tempos de correlação τ_B e τ_C dados na eq. II.6.4

II.8 Parâmetros de ordem

Quando o marcador de spin está inserido dentro de uma bicamada lipídica, ele está sujeito a uma anisotropia imposta pela mesma. A figura II.8.1 mostra um esquema com um grupo nitróxido dentro da bicamada. O eixo r do nitróxido (figura II.7.1) está alinhado com a direção normal da bicamada (denominada orientação paralela), enquanto os outros dois eixos (p e r) estão paralelos à superfície da membrana (orientação perpendicular).

Figura II.8.1 – Marcador de spin no interior de bicamada lipídica

Em 1964, Saupe introduziu uma matriz para caracterizar a ordem molecular em cristais líquidos (Saupe, 1964), cujos elementos são dados por

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \langle 3l_{Ni}l_{Nj} - \delta_{ij} \rangle \quad (\text{II.8.1})$$

onde l_{ab} é o cosseno do ângulo entre o eixo a e o eixo b , N é o eixo fixo de referência da amostra e $i, j = p, q, r$ definem os eixos do sistema de referência da molécula. Aplicando esta equação à figura II.8.1 podemos escrever

$$S_{rr} = \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \theta_3 \rangle - 1) \quad (\text{II.8.2})$$

O tensor A escrito no sistema de eixos da bicamada é diagonal e possui simetria axial. Seus elementos são dados por:

$$A_{\perp} = \frac{1}{2} (1 + \langle \cos^2 \theta_3 \rangle) A_{pp} + \frac{1}{2} (1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle) A_{rr} \quad (\text{II.8.3})$$

$$A_{||} = (1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle) A_{pp} + \langle \cos^2 \theta_3 \rangle A_{rr} \quad (\text{II.8.4})$$

Usando as equações (II.8.3-4) e fazendo algumas correções podemos reescrever a equação (II.8.1) como

$$S = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{A_{rr} - \frac{1}{2}(A_{pp} + A_{qq})} \quad (\text{II.8.5})$$

A figura (II.8.2) apresenta simulações de marcadores com movimento rápido e vários parâmetros de ordem.

Figura II.8.2 – Espectros simulados de marcadores de spin em vesículas lipídicas para movimento rápido e diferentes parâmetros de ordem. Adaptada de Griffith & Jost, 1976

Figura II.8.3 – Ampliação de um dos espectros da figura anterior e mostrando os valores das componentes do tensor A

Observamos da figura II.8.3 que o desdobramento hiperfino máximo ($A_{\max}$) é uma boa medida do desdobramento hiperfino externo ($A_{//}$). No entanto, o desdobramento hiperfino mínimo não é exatamente igual ao efetivo interno ($A_{\min}$). Fazendo-se algumas aproximações (Seelig, 1970) chegamos ao parâmetro de ordem aparente

$$S^{ap} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{A_{rr} - \frac{1}{2}(A_{pp} + A_{qq})} \quad (\text{II.8.6})$$

onde $A_{\max} = A_{//}$ e $A_{\min} \approx A_{\perp} = A_{\min} + 1,4(1-S^{ap})$

e finalmente ao parâmetro de ordem efetivo

$$S_{ef} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{A_{rr} - \frac{1}{2}(A_{pp} + A_{qq})} \frac{a_0(\text{cristal})}{a_0(\text{bicamada})} \quad (\text{II.8.7})$$

onde o termo $\frac{a_0(\text{cristal})}{a_0(\text{bicamada})}$ trata-se de uma correção devida a um efeito de polaridade (ver próxima seção).

Quando não é possível medir o desdobramento interno, usa-se o máximo desdobramento hiperfino ($A_{\max}$) como um parâmetro empírico para a medida de S_{ef} . $A_{\max}$ é sensível tanto a mudanças na polaridade do meio quanto na amplitude e velocidade de movimento. Quando se considera movimentação rápida, caso a polaridade permaneça constante, as alterações em $A_{\max}$ serão proporcionais às mudanças no parâmetro de ordem. Para movimentação lenta $A_{\max}$ e S_{ef} refletem uma mescla de mobilidade e ordem. Quanto maior o valor de $A_{\max}$, menor a mobilidade do ambiente monitorado pelo marcador de spin.

II.9 Dependência dos parâmetros de RPE com a polaridade do meio

Tanto o fator g quanto o desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) dependem do solvente (Griffith e col., 1974). Geralmente g diminui com o crescimento da polaridade, enquanto a_0 aumenta.

Atribui-se o aumento de a_0 com a polaridade à variação das contribuições correspondentes às estruturas (I) e (II) do nitróxido apresentadas a seguir:

Figura II.9.1 – Estruturas do radical nitróxido com o elétron desemparelhado sobre: (I) átomo de oxigênio; (II) átomo de nitrogênio. Adaptada de Griffith e Jost, 1976.

Ambientes polares favorecem a estrutura (II), sendo que o aumento da densidade de spin eletrônico desemparelhado no átomo de nitrogênio causa um aumento da constante de desdobramento hiperfino (a_0).

Na região de movimento rápido, podemos obter o parâmetro a_0 diretamente do espectro de RPE, pois ele é a metade da distância entre os campos ressonantes dos picos de campo baixo e alto, conforme mostra a figura II.9.10.

Figura II.9.10 – Espectro de RPE mostrando a constante de desdobramento hiperfino isotrópico

III. Materiais e métodos

III.1 Materiais

O DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio), os marcadores de spin, derivados do ácido esteárico, 5 e 16-sasl (ácido n-4, 4-dimetiloxadolidina-n-oxil esteárico, n = 5 e 16) e o nucleotídeo d'AMP (2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato) foram obtidos da Sigma Chemical Co. A figura III.1, ilustra a forma esquemática desses reagentes.

O único solvente usado foi água ultrapura, grau MilliQ. O cloreto de sódio (NaCl) também foi obtido da Sigma Chemical Co.

Figura III.1 – representação esquemática da molécula de DODAB, dos marcadores de spin 5-SASL e 16-SASL e do dAMP em pH 6.1.

III.2 Métodos

Solução estoque de DODAB – Inicialmente o DODAB era pesado em uma balança analítica e transferido para um tubo de ensaio, ao qual acrescentava-se o tampão desejado (água MilliQ pura ou com NaCl) de maneira que a concentração do DODAB fosse de 4 mM. A solução era então deixada em banho-maria a 56°C por 10 minutos, agitada em um agitador tipo vortex de um a dois minutos e novamente posta no banho durante mais vinte minutos. Ato contínuo, a solução era armazenada à temperatura ambiente por um mínimo de 15 horas, quando só então era usada para o experimento.

Filme de marcador – de uma solução-estoque concentrada (1 mM) de marcador dissolvido em clorofórmio, retirava-se o volume necessário para que a concentração de marcador fosse de 0,02 mM (0,5 mol% da concentração da solução estoque de DODAB descrita acima), o qual era posto num tubo de ensaio e secado sob a ação de um fluxo de nitrogênio gasoso. Em seguida o filme era deixado à baixa pressão num dessecador por 2 h e armazenado à -21 °C.

Solução estoque de nucleotídeo – o dAMP era pesado analiticamente e colocado num tubo tipo “ependorf” ao qual acrescia-se água milliQ de forma que a concentração final de nucleotídeo fosse de 4 mM. A solução era armazenada em geladeira durante um tempo máximo de uma semana.

Preparação da amostra – a solução estoque de DODAB era acrescentada toda ao tubo de ensaio contendo o filme de marcador e deixada em banho-maria durante dois minutos. Em seguida a solução era mantida sob agitação por 3 minutos para que o marcador se incorporasse ao DODAB. Dessa dispersão, retiravam-se alíquotas de 40 µL que eram colocadas em tubos de ensaio diferentes. À cada um desses tubos, eram adicionados água e um certo volume da solução de dAMP resultando numa solução final 2 mM de DODAB em 80 µL e uma concentração final de dAMP de 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5 ou 2 mM, dependendo do volume da solução de nucleotídeo adicionada (tabela III.1). Antes de se acrescentar o dAMP, o tubo com DODAB e marcador era levemente agitado no banho-maria. Finalmente, as soluções finais (cada uma em um tubo de ensaio) eram deixadas em repouso e abrigadas da luz por pelo menos 30 minutos e só então eram colocadas num capilar de quartzo que ia para a cavidade do RPE.

[dAMP] (mM)	V _{água} (μL)	V _{dAMP} (μL)	[DODAB] (mM)
0	40	0	2
0.2	36	4	2
0.5	30	10	2
1	20	20	2
1.5	10	30	2
2	0	40	2

Tabela III.1 Concentrações e volumes de solução de nucleotídeo.

Medidas de RPE:

Os espectros de RPE foram obtidos em um espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica EMX da Bruker (figura III.2). A temperatura da amostra foi controlada, e variada, por um aparelho BVT-2000 da Bruker, e verificada com um termopar Fluke 51KJ. Para todos os espectros foi usada uma potência de microonda de 10 mW e frequência da ordem de 9,4 GHz. A amplitude da modulação do sinal foi de 1.5 G para todos os espectros.

Figura III.2 – Espectrômetro utilizado nas medidas de RPE.

Incertezas

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes e a incerteza experimental apresentada nos gráficos em todas as figuras da seção IV. é o desvio da média do número de medidas, calculado pela fórmula:

$$\sigma = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{III.1})$$

onde n é o número de medidas, x é o valor de uma dada medida e $\bar{x}$ é a

média de n medidas de x ($\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$)

IV. Resultados e discussões

Para estudar a interação DODAB/dAMP, foram inseridas nos lipossomos de DODAB sondas paramagnéticas em duas regiões distintas da bicamada: o centro, monitorado pelo marcador 16-SASL; e a superfície, pelo 5-SASL.

IV.1 Efeito de diferentes concentrações de dAMP na estrutura de bicamadas de DODAB: fases gel e fluida

Para facilitar o estudo do efeito causado pelo nucleotídeo em lipossomos de DODAB, os resultados foram divididos em duas partes: a primeira, ater-se-á às consequências causadas pelo dAMP na fase gel; a segunda, na fase fluida; ambas as partes foram ainda subdivididas em região do centro da bicamada e da superfície. Isto porque a interação de uma molécula com a fase gel de uma bicamada pode ser muito diferente de sua interação com a fase fluida. Tanto com relação à partição, isto é, concentrações de moléculas na bicamada, como com relação ao posicionamento.

IV.1.1 Fase gel (15 °C)

Região próxima à superfície da membrana

Para monitorar a região próxima à superfície da bicamada, utilizamos o marcador de spin 5-SASL, um marcador derivado do ácido esteárico cuja sonda paramagnética está localizada no 5º carbono da cadeia acila. Os espectros desse marcador incorporados em vesículas de DODAB em várias concentrações de dAMP à temperatura de 15 °C são mostrados na figura IV.1*.

* Os espectros apresentados no presente trabalho são espectros representativos de duas ou mais medidas. Todos eles foram normalizados pela amplitude da linha de campo central.

Figura IV.1 - Espectros de 5-SASL em 2 mM de DODAB em água com concentrações crescentes de dAMP à 15°C. Varredura total de campo: 100 G.

Dada a alta sensibilidade dos espectrômetros de RPE, o uso de concentrações de marcador variando em uma faixa de 0,01 a 1 mM representam condições ótimas para experimentos de rotina (Nordio, P. L., 1976). Todavia, devido à baixa concentração de marcador usado, uma consequência direta da pequena concentração de lipídio utilizada (2 mM), os sinais de RPE não são tão bons quanto se esperaria por exemplo para concentrações de uma ordem de grandeza maior, as quais geralmente são utilizadas em lipídios (Fernandez e col., 2000; Benatti e col., 2001). A reduzida concentração de lipídio adotada por nós é devido à possível formação de outras estruturas para concentrações maiores, e a comparação com resultados já publicados com outras técnicas (Kikuchi e col., 1999). Além disso, tal concentração pode ser utilizada para uma possível aplicação *in vivo*, evitando-se assim riscos ao organismo em que o lipídio seria injetado.

Sabendo-se que marcadores derivados do ácido esteárico algumas vezes sofrem partição entre o meio lipídico e o aquoso (Biaggi, 1992), é interessante notar que o 5-SASL praticamente está todo incorporado às vesículas de DODAB, o que pode estar relacionado a uma possível atração entre sua cabeça polar (positiva) com o grupo carboxílico do SASL (negativo), conforme citado anteriormente (seção I.4).

A mobilidade da membrana foi analisada pelo desdobramento hiperfino máximo ($A_{\text{máx}}$), um parâmetro que cresce com o empacotamento do ambiente monitorado (ver seção II.8).

Figura IV.2 - Desdobramento hiperfino máximo ($A_{\text{máx}}$) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 5-SASL incorporados em dispersão de DODAB.

Podemos observar da figura IV.2 que o dAMP, na fase gel, altera muito pouco a mobilidade da bicamada na região próxima à superfície da membrana. Este resultado também pode indicar pouca sensibilidade do 5-SASL às variações da membrana, devido à pouca variação de fluidez da microregião monitorada por este marcador e/ou à pouca sensibilidade de seu sinal de RPE (muito imóvel e/ou ordenado, ver figura IV.1) a variações pequenas.

Região próxima ao centro da bicamada

Conforme já dito anteriormente, o marcador 16-SASL localiza-se na região central da bicamada, e, portanto o usamos para monitorar tal região. A figura IV.3 ilustra os espectros de 16-SASL à 15 °C, incorporados em DODAB, com várias concentrações de dAMP.

Figura IV.3 - Espectros de 0.01 mM de 16-SASL em 2 mM de DODAB em água com concentrações crescentes de dAMP à 15°C. Varredura total de campo: 100 G.

Comparados aos espectros de 5-SASL, observamos que os espectros de 16-SASL apresentam linhas mais estreitas, indicando uma mobilidade maior do marcador, mesmo na fase gel da bicamada, como esperado, pois está localizado numa região de mais movimento. Todavia, os espectros ainda indicam uma região de pouca mobilidade. Eles são típicos de bicamadas em fase gel: as linhas alargadas correspondem a uma mobilidade pequena do marcador, indicando a presença de uma região razoavelmente empacotada, em que as cadeias hidrocarbônicas estão bastante rígidas.

É interessante notar que à medida que crescemos dAMP, o sinal ruído nos espectros (tirados com os mesmos parâmetros) se torna maior. Este fato é bem visível se compararmos, por exemplo, o espectro correspondente à ausência de dAMP com aquele relacionado à 2 mM de dAMP. É possível que o nucleotídeo possua algum componente químico, impureza, que cause a supressão de marcador. Ainda não conseguimos encontrar uma explicação para este fenômeno.

Observando os espectros (figura IV.3), vemos que as formas de linha não correspondem a lorentzianas, ou contribuição de lorentziana e gaussiana (ver seção II) indicando que o movimento do marcador não se encontra na região de movimento rápido e que os parâmetros usuais utilizados nesta situação (razão entre as alturas de linha, ver seção II.9) têm pouco significado teórico. Apesar disso, usaremos o parâmetro h_{+1}/h_0 (indicado na figura IV.3) como um parâmetro empírico. A linha mais bem definida é a de campo central, de modo que também podemos lançar mão de sua largura como um parâmetro empírico.

Figura IV.4 – Razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

Figura IV.5 – Largura da linha de campo central (ΔH_0) em função da concentração de dAMP medidas nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

Conforme podemos ver da figura IV.5, a largura do pico de campo médio (ΔH_0), que cresce com o empacotamento da membrana (seção II.9), mostrou-se um parâmetro sensível, indicando um aumento da rigidez da membrana com o aumento de dAMP. Por outro lado, a razão entre as alturas de linha h_{+1}/h_0 (figura IV.4) não se mostrou um bom parâmetro. Isto talvez possa estar relacionado ao fato de que as alturas de linha (principalmente a de campo baixo) têm pouco significado teórico, conforme dito anteriormente.

O enrijecimento da membrana (com o aumento de dAMP) pode estar relacionado a um efeito de cargas (vemos claramente que o NaCl enrijece a mobilidade da membrana). Os pKs do dAMP são 3,7 e 6,2 para os grupos fosfato e 4,2 para a amina primária (Tamisier-Karolak e col., 2001). O pH da dispersão pura era em torno de 6, de modo que neste valor de pH o grupo fosfato do dAMP está duplamente desprotonado com carga 2^- , enquanto o grupo amina está descarregado. Além disso, próximo à superfície das bicamadas de DODAB, devido à repulsão eletrostática, certamente a concentração de íons H^+ deve ser menor, e conseqüentemente o pH local deve ser maior. Com isso, o dAMP deve, realmente, estar duplamente carregado. As cargas negativas do nucleotídeo blindariam as cabeças positivas do DODAB, fazendo com que a repulsão eletrostática entre elas diminua, acarretando assim uma maior aproximação entre elas e, conseqüentemente, tornando a membrana mais rígida, isto é, com uma menor mobilidade, situação refletida pelo aumento de $A_{máx}$ (figura IV.4). Esse efeito já foi observado em vesículas do anfifílico DMPG com NaCl (Fernandez e Lamy-Freund, 2000). Além disso, íons divalentes causam alterações significativas na mobilidade de bicamadas. Voltaremos a discutir sobre o efeito de cargas na seção IV.2, onde o comparamos com um possível efeito causado pelo dAMP na transição de fase do DODAB.

IV.1.2 Fase fluida (50 °C)

Região próxima à superfície da membrana

A figura IV.6 ilustra os espectros de 5-SASL incorporados em DODAB e com concentrações crescentes de dAMP à 50°C.

Figura IV.6 – Espectros de 0.01 mM de 5-SASL em 2 mM de DODAB em água com concentrações crescentes de dAMP à 50°C. Varredura total de campo: 100 G.

Os espectros são característicos de marcador de spin em região com muita ordem e muito movimento (Benatti e col, 2001). É possível extrair parâmetros relacionados à mobilidade da bicamada, conforme discutido na seção II.8.

Observamos uma queda significativa no desdobramento hiperfino máximo (figura IV.7), indicando que o dAMP, na fase fluida, está afrouxando o movimento da bicamada na região próxima à superfície da bicamada.

Figura IV.7 – Desdobramento hiperfino máximo ($A_{\max}$) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 5-SASL incorporados em dispersão de DODAB.

Dos espectros da figura IV.6, também obtivemos o parâmetro de ordem S_{ef} e a constante de desdobramento hiperfino isotrópico (a_0). O primeiro contém contribuições tanto de ordem quanto mobilidade da membrana, mas a principal contribuição para o S_{ef} provém da amplitude de movimento do segmento da cadeia acila (Schindler e Seelig, 1973 e seção II.8) e, o segundo, conforme dito na seção II.9, está relacionado à polaridade do meio.

Figura IV.8 – S_{ef} em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 0,5 mol% de 5-SASL incorporados em dispersão de DODAB.

Figura IV.9 – Desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) medidos nos espectros de RPE de 5-SASL incorporados em dispersão de DODAB.

Observamos que S_{ef} reflete o comportamento do desdobramento hiperfino máximo (figura IV.7) e que a constante de desdobramento hiperfino

isotrópico indica que o dAMP, na região próxima à superfície da bicamada, na fase fluida, causa pouca ou nenhuma alteração na polaridade deste ambiente da membrana.

Na fase gel, na região próxima à superfície das bicamadas, o dAMP parece não ter causado alteração na mobilidade das bicamadas de DODAB. Já na fase fluida, observamos um aumento da fluidez da membrana causado pelo dAMP, apontado tanto por $A_{\text{máx}}$ quanto S_{ef} .

Região central da bicamada

Espectros de 16-SASL incorporados em DODAB e com várias concentrações de nucleotídeo são apresentados na figura IV.10.

Figura IV.10 – Espectros de 0.01 mM de 16-SASL em 2 mM de DODAB em água com concentrações crescentes de dAMP a 50°C. Varredura total de campo: 100 G.

Os espectros mostram movimento rápido do marcador, apresentando linhas bastante estreitas, típicas de bicamadas em fase fluida. Neste tipo de espectro, em que as três linhas estão bem definidas (região de movimento rápido), é possível medir suas respectivas amplitudes com bastante precisão (ver seção II.7).

Figura IV.11 – Razão entre as alturas dos picos de campo baixo e médio (h_{+1}/h_0) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

Observamos da figura IV.11 que o dAMP está afrouxando o empacotamento da membrana, pois a razão h_{+1}/h_0 aproxima-se cada vez mais de um (ver seção II.8) na medida em que se aumenta a concentração de nucleotídeo. O sal praticamente não altera a mobilidade da membrana na fase fluida.

Nas figuras IV.12 a IV.13 apresentamos a variação com a quantidade de dAMP de outros três parâmetros relacionados à mobilidade. O primeiro, razão entre as amplitudes das linhas de campo alto e central (h_{-1}/h_0), similarmente a h_{+1}/h_0 aproxima-se de 1 para regiões menos viscosas; o segundo, largura de linha de campo alto (ΔH_{-1}), aumenta com o aumento da rigidez do meio, assim como ocorre com ΔH_0 (seção II.8).

Figura IV.12 – Razão entre as alturas dos picos de campo alto e médio (h_{-1}/h_0) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

Figura IV.13 – Largura de linha de campo alto (ΔH_{-1}) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

Figura IV.14 – Largura de linha de campo médio (ΔH_0) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

Com exceção de h_{-1}/h_0 , todos os parâmetros apresentados mostraram-se muito sensíveis ao acréscimo de dAMP, de maneira que as larguras de linha do campo médio e alto (ΔH_0 e ΔH_{-1} , respectivamente) mostraram-se como os mais sensíveis, sendo que ΔH_{-1} mostrou-se ainda mais que o primeiro. Ambos apontam para um afrouxamento da fase fluida causado pelo aumento de dAMP, o mesmo efeito observado na região próxima à superfície da membrana.

Figura IV.15 – Tempos de correlação τ_B em função da concentração de dAMP. (*) medida com 107 mM de NaCl.

A figura IV.15 ilustra os tempos de correlação τ_B calculados através da equação II.6.4. Eles mostram uma queda, indicando maior liberdade de movimentação do marcador e, acima de 1,5 mM, um aumento na rigidez da membrana. Este aumento, é difícil de ser entendido, porém está de acordo com o aumento de rigidez apresentado pelo parâmetro h_{-1}/h_0 . De maneira geral, a figura IV.15 reafirma os resultados apresentados pelos parâmetros anteriores, isto é, o acréscimo de dAMP está “afrouxando” a fase fluida.

Figura IV.16 – Constante de desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) em função da concentração de dAMP, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em dispersão de DODAB. (*) medida com 107 mM de NaCl.

A figura IV.16 mostra que o dAMP causa um aumento significativo na constante de desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) até a concentração de 1,5 mM de dAMP, a partir da qual parece haver uma saturação, indicando que o nucleotídeo aumenta a polaridade na região central da bicamada (ver seção IV.9).

É sabido que a água pode atravessar membranas biológicas (Lawaczeck, 1979). Sondas paramagnéticas e fluorescentes, incorporadas nas mesmas, foram capazes de detectar a presença de moléculas de água dentro de bicamadas (Griffith e col., 1994; Fretten e col., 1980; Subczynski e col., 1994; Ge e Freed, 1998). Esses trabalhos apontam que há uma dependência da barreira hidrofóbica da membrana com a presença de moléculas hidrofóbicas, como o colesterol e carotenóides. É razoável supor que o dAMP altere a polaridade da membrana. O aumento da polaridade observado (figura IV.14), no centro da bicamada, poderia estar relacionado à penetração do dAMP carregado nas bicamadas de DODAB.

Tratando o dAMP como um grande ânion, também é possível relacionar o seu efeito sobre a polaridade com a presença de íons na superfície da bicamada e, portanto, é interessante compará-lo com o efeito da polaridade causado por íons. Observamos que 107 mM de NaCl causam um aumento na polaridade (figura IV.16).

IV.2 Efeito do dAMP na transição de fase do DODAB: estudo a várias temperaturas entre 15 e 50 °C

Conforme dito anteriormente, a sensibilidade à transição de fase é maior na região do centro da bicamada, já que neste local há mais liberdade de movimento das cadeias acila dos lipídios. Com isso, uma sonda que se localize nas proximidades deste sítio é mais indicada para dar informações a respeito da transição. Assim sendo, escolhemos o 16-SASL para estudar as possíveis variações da transição de fase do DODAB com a presença de dAMP.

A figura IV.17 mostra os espectros do marcador 16-SASL incorporado a vesículas de DODAB em água a várias temperaturas. Como já dito, os espectros são típicos de bicamadas lipídicas: à temperatura de 15 °C, as linhas alargadas correspondem a uma mobilidade pequena do marcador, indicando a presença de uma região mais empacotada, em que as cadeias hidrocarbônicas estão mais organizadas; diz-se então que tal espectro é típico de fase gel. Conforme a temperatura vai aumentando, as linhas vão se tornando cada vez mais estreitas, indicando uma mobilidade da bicamada cada vez maior até que à temperatura de 41°C as linhas tornam-se bem estreitas, indicando uma transição para a fase fluida.

Figura IV.17 – Espectros de 0.01 mM de 16-SASL em 2 mM de DODAB em água. Varredura total de campo: 100 G.

Para observar um possível efeito do dAMP na transição das bicamadas de DODAB, espectros semelhantes foram tirados acrescentando-se 1 mM de dAMP à dispersão e também foram tomados espectros em alta força iônica para comparar o efeito do dAMP com o causado por íons em solução. A escolha de 1 mM de dAMP deve-se ao fato de que nessa concentração (metade da concentração de DODAB) e portanto uma quantidade razoável de nucleotídeo, o efeito deste sobre a mobilidade das vesículas de DODAB já é detectável. Além disso, observando os espectros da seção anterior (fase gel, principalmente) verificaremos que para concentrações muito grandes de dAMP (acima de 1 mM) os sinais-ruído das linhas espectrais tornam-se maiores, o que pode causar uma imprecisão maior nas medidas dos parâmetros dos espectros.

Figura IV.18 – Espectros de 0.01 mM de 16-SASL em 2 mM de DODAB e 1 mM de dAMP em água. Varredura total de campo: 100 G.

Figura IV.19 – Espectros de 0.01 mM de 16-SASL em 2 mM de DODAB em água e 107 mM de NaCl. Varredura total de campo: 100 G.

Para visualizar melhor a transição, utilizamos os mesmos parâmetros da seção anterior.

Para analisar o perfil de transição, o parâmetro h_{+1}/h_0 (razão entre as alturas das linhas hiperfinas de campo baixo e central) geralmente é capaz de refletir a transição com razoável eficácia. Com o aumento da fluidez das membranas, a tendência das alturas dos picos de campo baixo e central é igualar-se, o que faz com que o parâmetro h_{+1}/h_0 aproxime-se da unidade (seção IV.8). Todavia, a relação h_{+1}/h_0 também reflete a direção do eixo de rotação do nitróxido (seção IV.8), podendo ser maior do que 1, em casos de rotação em torno do eixo x (Marsh, 1981).

Figura IV.20 – Razão entre as alturas dos picos de campo baixo e central (h_{+1}/h_0) em função da temperatura, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em 2 mM de DODAB em água, água + 1 mM de dAMP e água + 107 mM de NaCl.

Da figura IV.20, observamos que h_{+1}/h_0 mostra-se sensível à transição, pois a partir de uma dada temperatura sofre um aumento abrupto indicando uma transição de fase. Aparentemente, o dAMP não altera a temperatura de transição do DODAB enquanto que o sal o faz. Antes de a transição ocorrer, a mobilidade mantém-se praticamente a mesma para os três experimentos; na

região de transição, é de difícil interpretação; depois da transição (45 e 50 °C) , o dAMP e o sal apresentam comportamentos semelhantes.

Figura IV.21 – Largura de linha do pico de campo médio (ΔH_0) em função da temperatura, medidos nos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em DODAB em água, água + 1 mM de dAMP e água + 107 mM de NaCl.

Assim como h_{+1}/h_0 , a largura de linha do campo médio (ΔH_0) também é um parâmetro capaz de monitorar a transição. O estreitamento da linha de campo médio indica maior mobilidade da membrana (seção IV). Vemos da figura IV.21, que tal parâmetro mostrou-se sensível à transição. O acréscimo de 1 mM de dAMP, em termos de ΔH_0 , parece não causar nenhuma alteração no perfil de transição do DODAB, enquanto que o NaCl o faz visivelmente, mostrando uma maior rigidez da membrana durante toda a transição e um respectivo aumento da temperatura de transição de fase.

O enrijecimento na mobilidade das bicamadas causado pelo acréscimo de sal, aumentando o número de íons em solução, pode estar ligado a uma situação de blindagem eletrostática das cabeças polares das moléculas de DODAB, conforme discutido na seção IV.1.1.

Para analisar a fase fluida, utilizaremos como parâmetro os tempos de correlação τ_B e τ_C .

Figura IV.22 – Tempos de correlação τ_B e τ_C em função da temperatura.

Como já discutido, as diferenças nos valores dos tempos de correlação τ_B e τ_C (fig. IV.22) mostram que há uma anisotropia no movimento. τ_C mostra que em 50 °C tanto o dAMP quanto o NaCl tornam a fase fluida mais frouxa. Por outro lado, τ_B aponta para o mesmo resultado a partir de 43 °C e, além disso, mostra que o dAMP afrouxa a bicamada com mais intensidade do que o NaCl.

Figura IV.23 – Constante de desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) em função da temperatura, medidos dos espectros de RPE de 16-SASL incorporados em DODAB em água, água + 1 mM de dAMP e água + 107 mM de NaCl.

Como já visto, observamos da figura IV.23 que tanto o sal quanto o dAMP alteram a polaridade da região central da bicamada. O nucleotídeo aumenta a polaridade ainda mais do que o sal (além do que também aumenta mais a fluidez do meio do que o sal) e, como ele tem pouca ou quase nenhuma influência no perfil de transição (figuras IV.21 e IV.22), esses resultados se complementam indicando que o efeito causado pelo dAMP não é apenas um efeito de carga. Conforme discutido na seção IV.1.1, é indispensável lembrar que o dAMP está duplamente carregado nos experimentos realizados no presente trabalho, o que torna ainda mais notável o fato dele não causar alteração no perfil de transição do DODAB.

V. Conclusões

A técnica de RPE, mostrou-se bem sensível e eficiente no estudo da interação entre o nucleotídeo dAMP e vesículas de DODAB, detectando a variação do grau de mobilidade das membranas de DODAB em presença de dAMP.

Conforme dito anteriormente, a interação entre bicamadas lipídicas e outras moléculas (nucleotídeos, peptídeos, colesterol, entre outros) pode apresentar diferenças em relação às fases gel e fluida. Assim sendo, dividimos nossas conclusões nestas duas situações de mobilidade das membranas.

Fase gel

A tabela que segue, resume de maneira simplificada os resultados obtidos no presente trabalho (relacionados à fluidez das bicamadas de DODAB), bem como outros resultados do nosso grupo obtidos com o DMPG, para efeito de comparação:

Molécula/Bicamada lipídica	Efeito causado na bicamada	
	Região do 5º carbono	Região central
NaCl em DODAB	nenhum	enrijece
NaCl em DMPG ¹	nenhum	enrijece
dAMP em DODAB	nenhum	enrijece
colesterol em DODAB ²	nenhum	fluidifica
colesterol em DMPG ³	enrijece	fluidifica
α -MSH em DMPG ⁴	nenhum	fluidifica
Barbalóina em DMPG ⁵	nenhum	fluidifica

Tabela V.1 – Efeito causado na fluidez de bicamadas lipídicas por moléculas interagindo com as membranas em baixa força iônica na fase gel. ¹Lamy-Freund e col., 2003; ²Benatti e col., trabalho em fase de redação; ^{3,4}Fernandez e col., 2000; ⁵Duarte e col., em fase de redação.

O dAMP, na região do 5º carbono das cadeias hidrocarbônicas, não modifica a fluidez das bicamadas de DODAB. Isto também ocorre na interação

de outros lipídios (DMPG) com íons (Na^+ e Cl^-), peptídeos (α -MSH) e o fármaco hidrofóbico barbaloina. Com exceção do colesterol, que penetra as membranas de DMPG e as enrijece na região do 5º carbono, esta ausência de efeitos perceptíveis na fluidez de membranas parece ser uma propriedade geral. Como a região do carbono 5º é uma região de pouco movimento, parece que a presença de outras moléculas próximas à bicamada, apesar de interagirem com a mesma, tenha pouca influência sobre a mobilidade da bicamada.

Já na região central da bicamada, o dAMP diminui a mobilidade das bicamadas de DODAB. Esse efeito pode ser apenas um efeito de cargas, ou seja, as cargas negativas do dAMP interagindo com as positivas do DODAB (causando uma blindagem eletrostática), fazendo com que as cabeças do DODAB se aproximem e, conseqüentemente, enrijeçam a membrana. Isto ocorre com o sal em DMPG e DODAB.

Supondo que o dAMP penetre as bicamadas do DODAB na fase gel, como sugere o trabalho de Kikuchi e col. (1999), ver figura V.1, esperar-se-ia que a distância entre dois lipídios consecutivos da bicamada fosse maior. Com isso, criar-se-ia uma vacância na região abaixo do dAMP de modo que nesta região as cadeias teriam maior liberdade de movimento, o que acarretaria um aumento da fluidez (figura V.2). Sabe-se que tanto o colesterol penetra as bicamadas lipídicas (inteiramente) quanto os peptídeos (parcialmente) e, ambos, conforme mostra a tabela V.1, causam um aumento na mobilidade/fluidez das bicamadas na região central, na fase gel, como esperado. Partindo deste fato, podemos supor que, nas faixas de concentração de dAMP e lipídio usadas neste trabalho, não há penetração do dAMP nas bicamadas, pois ele enrijece a região central da bicamada.

Figura V.1 – Representação esquemática tridimensional do complexo nucleotídeo/DODAB. Retirada de Kikuchi e col., 1999.

Figura V.2 – Representação esquemática da fase gel de bicamadas lipídicas mostrando apenas uma monocamada (por simplicidade) antes e após a penetração de uma molécula na membrana. Antes de haver penetração na bicamada, as cadeias hidrocarbônicas dos lipídios estão separadas por uma distância d . Após a penetração, a distância entre as cadeias aumenta para um dado valor $D > d$, de maneira que o espaço entre duas cadeias de dois lipídios consecutivos (abaixo de onde se encontra a molécula “externa”) é maior. Com isto, na região abaixo da molécula externa, há um aumento da fluidez.

Fase fluida

Molécula/Bicamada lipídica*	Efeito causado na bicamada	
	Região do 5º carbono	Região central
NaCl em DODAB	fluidifica	fluidifica
NaCl em DMPG	nenhum	nenhum
dAMP em DODAB	fluidifica	fluidifica
colesterol em DODAB	nenhum	enrijece
colesterol em DMPG	enrijece	enrijece
α -MSH em DMPG	enrijece	enrijece
Barbaloina em DMPG	enrijece	enrijece

Tabela V.2 – Efeito causado na fluidez de bicamadas lipídicas por moléculas interagindo com as membranas em baixa força iônica na fase fluida. *Dados obtidos das mesmas referências citadas na tabela V.1.

Molécula/Bicamada lipídica*	Polaridade da bicamada	
	Região do 5º carbono	Região central
NaCl em DODAB	não varia	aumenta
NaCl em DMPG	não varia	não varia
dAMP em DODAB	não varia	aumenta
colesterol em DODAB	diminui	
colesterol em DMPG	não varia	diminui
α -MSH em DMPG	aumenta	aumenta
Barbaloina em DMPG	aumenta	aumenta

Tabela V.3 – Efeito causado na polaridade de bicamadas lipídicas por moléculas interagindo com as membranas em baixa força iônica na fase fluida. *Dados obtidos das mesmas referências citadas na tabela V.1.

Na fase fluida, na região do 5º carbono nas bicamadas, os resultados mostraram que o dAMP aumenta a fluidez das membranas de DODAB e praticamente não altera a polaridade do ambiente. Já os peptídeos e o colesterol diminuem a fluidez das membranas, novamente mostrando um efeito contrário ao causado pelo dAMP. Porém, enquanto os peptídeos aumentam a polaridade do meio, tanto o colesterol quanto o dAMP não a modificam. É interessante notar que, novamente, o NaCl causa os mesmos efeitos que o dAMP tanto na fluidez (aumenta) quanto na polaridade (não varia). No entanto, o aumento causado na fluidez das bicamadas por 1 mM de dAMP é mais intenso do que o causado por 107 mM de NaCl (ver seção IV), mostrando que o dAMP está causando um efeito nas bicamadas do DODAB além de um efeito de cargas. Pode estar relacionado com as duas cargas que deve ter no pH estudado, ou ao fato de ser um íon grande, intercalando-se entre as cabeças polares, forçando a separação entre as cabeças.

Na região do centro da bicamada, o dAMP também fluidifica a fase fluida, isto é, aumenta ainda mais a fluidez das membranas. Além disso, aumenta significativamente a polaridade do meio. Tanto o colesterol quanto os peptídeos têm novamente um efeito oposto a este, pois enrijecem a membrana

no centro da bicamada na fase fluida. Porém, os peptídeos também aumentam a polaridade do ambiente, e, o colesterol, diminui. Novamente, o efeito na fluidez das bicamadas, causado pelos peptídeos e pelo colesterol, é explicado pelo fato de ambos penetrarem as bicamadas. Na fase fluida, em que os lipídios estão mais afastados uns dos outros em relação à fase gel, é mais fácil haver penetração de moléculas. Estando, tanto o α -MSH (parcialmente) quanto o colesterol (totalmente) no interior da bicamada, na fase fluida, em que há uma mobilidade bem maior que na fase gel, eles acabam causando um enrijecimento da bicamada. Isso ocorre porque, quando uma molécula penetra parcial ou totalmente a bicamada na fase fluida, ela acaba diminuindo o grau de liberdade de movimentação das cadeias hidrocarbônicas da bicamada. Assim sendo, como o dAMP causa um efeito oposto, isto é, aumenta a fluidez das bicamadas de DODAB na fase fluida, mais uma vez parece que o dAMP não penetra as bicamadas.

O que parece estar acontecendo é a intercalação do dAMP entre as cabeças polares do DODAB, forçando uma separação entre elas, portanto fluidificando a bicamada em toda a sua extensão e permitindo entrada mais significativa de moléculas de água.

Os resultados obtidos no estudo da transição de fase do DODAB, na presença de dAMP, mostraram que praticamente ele não afeta a transição. Na fase gel, à 15 °C, tanto o NaCl quanto o dAMP enrijecem a bicamada, sendo que o efeito do NaCl é mais acentuado. Acima de 20 °C, o perfil de transição do DODAB é muito semelhante ao DODAB com 1 mM de dAMP, enquanto que o NaCl (107 mM) altera o perfil e aumenta T_m . Já na fase fluida, tanto o sal quanto o dAMP fluidificam a bicamada, sendo que o dAMP o faz com maior intensidade. No caso de haver penetração do dAMP nas vesículas de DODAB, embora ele seja aquosolúvel, seria razoável esperar alterações no perfil de transição de fase, como acontece por exemplo com o colesterol (ele acaba com a transição de fase do DODAB). Assim sendo, nosso trabalho sugere mais uma vez que as bicamadas deste não estão sendo penetradas pelo nucleotídeo.

Apesar das afirmações na literatura de que o dAMP tenha uma influência significativa na estrutura das vesículas de DODAB, penetrando-as e causando até um rompimento das mesmas (Kikuchi e col., 1999; Nantes e col., 2003), nossos resultados apontam em sentido contrário. Talvez, alguns dos resultados da literatura possam ser interpretados como a ligação iônica do

dAMP com o DODAB, diminuindo a repulsão eletrostática entre as vesículas, portanto, favorecendo agregação, e posterior fusão, como fazem alguns íons divalentes, como Ca^{2+} .

Como prosseguimento do trabalho, seria interessante um estudo da interação de pequenos polinucleotídeos com DODAB, e outros anfifílicos catiônicos, para chegarmos ao estudo da interação com o DNA. Nestes estudos futuros será importante termos em vista os resultados aqui apresentados, sendo importante a não penetração dos nucleotídeos nas membranas lipídicas. Também seria interessante estudar a interação entre íons fosfato em solução e bicamadas de DODAB através de RPE.

VI. Apêndice – Ajuste de espectros de RPE na região de movimento rápido

(Bales, 1989)

VI.1 Escrevendo a derivada da função gaussiana em termos da largura de linha e da altura pico a pico

A função gaussiana é dada por

$$G(H) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{A.1})$$

Abaixo vemos a forma de uma linha gaussiana e sua primeira derivada

Figura VI.1 – Gráficos da função gaussiana (em cima) e de sua primeira derivada.

Vamos agora determinar a altura pico-a-pico (V_{pp}^G) e a largura de linha (ΔH^G) da primeira derivada da função gaussiana

$$G' = \frac{dG}{dH} = \frac{-(H - H_0)}{\sigma^3 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{A.2})$$

$$\frac{d^2 G}{dH^2} = \frac{-e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}}}{\sigma^3 \sqrt{2\pi}} + \frac{(H - H_0)^2}{\sigma^5 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}}$$

$$\frac{d^2 G}{dH^2} = 0 \Rightarrow \frac{e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}}}{\sigma^3 \sqrt{2\pi}} = \frac{(H - H_0)^2}{\sigma^5 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(H-H_0)^2}{2\sigma^2}}$$

$$(H - H_0)^2 = \sigma^2 \Rightarrow \begin{cases} H_{\text{máx}} = H_0 - \sigma \\ H_{\text{mín}} = H_0 + \sigma \end{cases}$$

$$\Delta H^G = H_{\text{mín}} - H_{\text{máx}}$$

$$\boxed{\Delta H^G = 2\sigma} \quad (\text{A.3})$$

$$G'_{\text{máx}} = G'(H_{\text{máx}}) = G'(H_0 - \sigma)$$

$$G'(H_0 - \sigma) = \frac{-(H_0 - \sigma - H_0)}{\sigma^3 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(H_0 - \sigma - H_0)^2}{2\sigma^2}}$$

$$G'_{\text{máx}} = \frac{\sigma \cdot e^{-\frac{\sigma^2}{2\sigma^2}}}{\sigma^3 \sqrt{2\pi}} \Rightarrow G'_{\text{máx}} = \frac{e^{-\frac{1}{2}}}{\sigma^2 \sqrt{2\pi}}$$

Devido à simetria da curva, podemos fazer $V_{pp}^G = 2G'_{\text{máx}}$

$$\therefore \boxed{V_{pp}^G = \frac{2e^{-\frac{1}{2}}}{\sigma^2 \sqrt{2\pi}}} \quad (\text{A.4})$$

Podemos reescrever a primeira derivada da função gaussiana em termos de sua largura ΔH^G ou da sua altura pico-a-pico V_{pp}^G e de uma variável ξ definida por

$$\xi = \frac{2(H - H_0)}{\Delta H^G} \quad (\text{A.5})$$

$$H - H_0 = \frac{\xi \Delta H^G}{2}$$

$$G'(H) \xrightarrow{\xi} G'(\xi) = \frac{\xi \Delta H^G}{2\sigma^3 \sqrt{2\pi}} e^{\frac{-1}{2\sigma^2} \frac{\xi^2 (\Delta H^G)^2}{4}}$$

Escrevendo σ em termos de ΔH^G

$$\sigma = \frac{\Delta H^G}{2}$$

chegamos em

$$G'(\xi) = \frac{-4\xi}{\sqrt{2\pi} (\Delta H^G)^2} e^{\frac{-\xi^2}{2}} \quad (\text{A.6})$$

Vamos agora reescrever a eq. (A.6) em termos de V_{pp}^G .

Isolando σ nas eqs. (A.3) e (A.4) e igualando ambas, ficamos com

$$\frac{\Delta H^G}{2} = \left[\frac{2e^{\frac{-1}{2}}}{V_{pp}^G \sqrt{2\pi}} \right]^{\frac{1}{2}} \Rightarrow (\Delta H^G)^2 = \frac{8e^{\frac{-1}{2}}}{V_{pp}^G \sqrt{2\pi}}$$

Substituindo $(\Delta H^G)^2$ em (A.6), chegamos em

$$G'(\xi) = \frac{-\sqrt{e} \cdot V_{pp}^G \xi e^{\frac{-\xi^2}{2}}}{2} \quad (\text{A.7})$$

VI.2 Escrevendo a derivada da função lorentziana em termos da largura de linha e da altura pico a pico

A função lorentziana é dada por

$$L(H) = \frac{1}{\pi} \frac{a}{a^2 + (H - H_0)^2} \quad (\text{A.8})$$

Na figura VI.2 vemos a forma de linha lorentziana e sua primeira derivada:

Figura VI.2 – Gráficos da função lorentziana (em cima) e de sua primeira derivada.

Determinação de ΔH^L e V_{pp}^L

$$\frac{dL}{dH} = \frac{-2a(H - H_0)}{\pi[a^2 + (H - H_0)^2]^2} \quad (\text{A.9})$$

$$\frac{d^2L}{dH^2} = \frac{-2a}{\pi[a^2 + (H - H_0)^2]^2} + \frac{4a(H - H_0)(2H - 2H_0)}{\pi[a^2 + (H - H_0)^2]^3}$$

$$\frac{d^2L}{dH^2} = 0 \Rightarrow \frac{2a}{\pi[a^2 + (H - H_0)^2]^2} = \frac{4a(H - H_0)(2H - 2H_0)}{\pi[a^2 + (H - H_0)^2]^3}$$

$$a^2 + (H - H_0)^2 = 4a(H - H_0)^2$$

$$(H - H_0)^2 = \frac{a^2}{3} \Rightarrow H = H_0 \pm \frac{a}{\sqrt{3}} \Rightarrow \begin{cases} H_{min} = H_0 + \frac{a}{\sqrt{3}} \\ H_{max} = H_0 - \frac{a}{\sqrt{3}} \end{cases}$$

$$\Delta H^L = H_{min} - H_{max} = H_0 + \frac{a}{\sqrt{3}} - H_0 + \frac{a}{\sqrt{3}}$$

$$\therefore \Delta H^L = \frac{2a}{\sqrt{3}} \quad (\text{A.10})$$

$$L'_{m\acute{a}x} = L'(H_{m\acute{a}x}) = \frac{-2a}{\pi} \left\{ \frac{H_0 - \frac{a}{\sqrt{3}} - H_0}{\left[a^2 + \left(H_0 - \frac{a}{\sqrt{3}} - H_0 \right)^2 \right]^2} \right\}$$

$$L'_{m\acute{a}x} = \frac{3\sqrt{3}}{8\pi a^2}$$

$$\therefore V_{pp}^L = \frac{3\sqrt{3}}{4\pi a^2} \quad (\text{A.11})$$

Assim como fizemos com a gaussiana, podemos reescrever a lorentziana em termos das variáveis ξ e V_{pp}^L ou ΔH^L

$$L' = \frac{-2a \cdot (H - H_0)}{\pi [a^2 + (H - H_0)^2]^2}$$

$$\xi = \frac{2(H - H_0)}{\Delta H^L} \Rightarrow (H - H_0) = \frac{\Delta H^L \xi}{2}$$

$$L' = \frac{-a\xi\Delta H^L}{\pi \left[a^2 + \frac{(\Delta H^L)^2 \xi^2}{4} \right]}$$

isolando a na eq. A.10 e substituindo na última eq. acima, chegamos em:

$$\therefore L'(\xi) = \frac{-8\sqrt{3}\xi}{\pi (\Delta H^L)^2 (3 + \xi^2)^2} \quad (\text{A.12})$$

Isolando a na eq. A.11 e igualando c/ a eq. A.11b:

$$\left(\frac{\sqrt{3}\Delta H^L}{2} \right)^2 = \frac{3\sqrt{3}}{4\pi V_{pp}^L}$$

$$(\Delta H^L)^2 = \frac{\sqrt{3}}{\pi V_{pp}^L}$$

e finalmente substituindo em A.12, ficamos com

$$L'(\xi) = \frac{-8V_{pp}^L \xi}{(3 + \xi^2)^2} \quad (\text{A.13})$$

VI.3 Ajuste de espectros

As formas de linha de RPE do nitróxido, na região de movimento rápido, podem ser ajustadas pela função de Voight (Bales, 1989).

A função de Voight trata-se de uma soma de lorentzianas espaçadas infinitesimalmente, conforme mostra a figura VI.3.

Figura VI.3 – Esquema de uma representação da construção da função de Voight. Linhas lorentzianas infinitesimalmente espaçadas — em várias posições H' cujas intensidades são dadas pelo “pacote” gaussiano A intensidade em H da linha de Voight é a soma das intensidades de todas as lorentzianas (Bales, 1989).

Se as linhas lorentzianas são espaçadas infinitesimalmente e seguem um perfil gaussiano, então nós podemos aproximar as intensidades das lorentzianas com uma função gaussiana e integrar. A intensidade em H (ver figura) é encontrada adicionando-se as lorentzianas nas posições H' .

A altura de cada lorentziana é proporcional à gaussiana, isto é

$$I(H') \propto e^{-\frac{(H_0 - H')^2}{2\sigma^2}}$$

onde $\sigma = \frac{\Delta H^G}{2}$

e a intensidade de cada lorentziana no ponto H é

$$\frac{I(H')}{1 + \left[\frac{2(H - H')^2}{\Delta H_{1/2}^L} \right]}$$

onde $\Delta H_{1/2}^L$ é a largura à meia altura da lorentziana e é igual a $\sqrt{3}\Delta H^L$
com isso, a intensidade é proporcional a

$$V(H) \propto \int \frac{e^{-\frac{(H_0 - H')^2}{2\sigma^2}}}{1 + \left[\frac{(H - H')^2}{\Delta H_{1/2}^L / 2} \right]} dH'$$

impondo que $\int_{-\infty}^{+\infty} V(H) dH = A$, onde A é a área e usando as seguintes definições:

$$v = \frac{\sqrt{2}(H - H_0)}{\Delta H^G} \quad x = \frac{\sqrt{2}(H' - H_0)}{\Delta H^G} \quad \text{e} \quad \chi = \frac{\Delta H^G}{\Delta H^L}$$

chegamos à função de Voight normalizada

$$V(v) = \frac{2\chi A}{\sqrt{3}\pi^{3/2}\Delta H^G} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{e^{-x^2}}{1 + 2/3\chi^2(v - x)^2} dx \quad (\text{A.14})$$

No entanto, estamos interessados na derivada da absorção. Então:

$$V'(v) = \frac{dV}{dH} = \left[2(2/3\pi)^{3/2} \chi^3 A(\Delta H^G)^2 \right] \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{-2(v-x)e^{-x^2}}{[1 + 2\chi^2(v-x)/3]^2} dx \quad (\text{A.15})$$

ou também podemos escrever

$$V'(v) = \left[3(2/3\pi)^{3/2} \chi A/(\Delta H^G)^2 \right] \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{-2xe^{-x^2}}{[1 + 2\chi^2(v-x)]^2 / 3} dx \quad (\text{A.16})$$

Numericamente é mais fácil integrar a eq. A.15 para χ pequeno. Já para χ grande usamos a A.16.

É importante notarmos que a forma da função de Voight depende apenas do parâmetro χ . Para testar se uma determinada linha hiperfina com um dado χ é aproximadamente gaussiana, teríamos que calcular uma integral para cada ponto do espectro. Felizmente, não precisamos ter todo este trabalho graças a 3 coisas:

(i) a relação, descoberta acidentalmente (Dobryakov, 1969):

$$\left(\frac{\Delta H^G}{\Delta H^0} \right)^2 + \left(\frac{\Delta H^{L.}}{\Delta H^0} \right) = 1 \quad (\text{A.17})$$

onde ΔH^0 é a largura de linha do espectro experimental

(ii) a função de Voight pode ser aproximada pela soma de uma única gaussiana com uma única lorentziana

(iii) é possível definir um parâmetro ψ , facilmente mensurável do espectro experimental, que é função de χ .

O parâmetro ψ

O parâmetro ψ , definido para uma função de voight, é dado por $\psi = \frac{V_w}{V_{pp}}$,

onde V_w é mostrado na figura VI.4

Figura VI.4 – Definição do parâmetro ψ (Bales, 1989).

Com isso, podemos descrever uma linha voightiana através dos parâmetros acessíveis experimentalmente ΔH^0 , ψ e V_{pp} ao invés de χ , ΔH^L e A . Para uma lorentziana $\psi^L = 0,213$ e para uma gaussiana $\psi^G = 0,067$.

Podemos construir várias formas de Voigt com diferentes valores de χ e medir ψ . Como resultado, chegamos à seguinte equação empírica:

$$\chi_{VOIGHT} = \frac{-0,3336\psi^2 + 0,2526\psi - 0,0392}{\psi^2 - 0,3185\psi + 0,0168} \quad (A.18)$$

Definimos o mesmo parâmetro ψ para linhas não-resolvidas e para vários marcadores de spin plotamos ψ em função de χ

Através desses gráficos, encontramos um parâmetro χ que se ajusta a um grande número de marcadores de spin, uma espécie de “ χ universal”. A eq. para $\chi_{universal}$ é dada por:

$$\chi_{universal} = \frac{-0,7624\psi^2 + 0,4091\psi - 0,0527}{\psi^2 - 0,2591\psi + 0,0075} \quad (A19)$$

A eq. A17 pode ser reescrita das seguintes maneiras:

$$\Delta H^0 = \frac{\Delta H^L}{2} \left(1 + \sqrt{1 + 4\chi^2} \right) \quad (A17a)$$

$$\Delta H^L = \frac{\Delta H^0 \left(-1 + \sqrt{1 + 4\chi^2} \right)}{2\chi^2} \quad (A17b)$$

$$\Delta H^G = \frac{\Delta H^0 \left(-1 + \sqrt{1 + 4\chi^2} \right)}{2\chi} \quad (A17c)$$

$$\chi = \frac{1}{\left(\frac{\Delta H^0}{\Delta H^G} - \frac{\Delta H^G}{\Delta H^0} \right)} \quad (A17d)$$

$$\Delta H^L = \Delta H^0 \left[1 - \left(\frac{\Delta H^G}{\Delta H^0} \right)^2 \right] \quad (A17e)$$

Tanto a eq. A18 quanto a A19 são aplicáveis universalmente. No entanto, para $\chi > 2$ a eq. A19 é melhor.

VI.3.1 Escrevendo a função de Voight como uma soma de gaussiana e lorentziana

Podemos escrever a função da primeira derivada da função de Voight como a soma de uma única derivada 1ª. de uma gaussiana com a derivada 1ª. de uma lorentziana, isto é,

$$V' = pL' + qG' \quad (A20)$$

onde L' e G' são as primeiras derivadas de uma função lorentziana e gaussiana, respectivamente, V' é a primeira derivada da função de Voigt e p é a porcentagem da forma de linha lorentziana e q a de gaussiana.

Conforme vimos anteriormente, podemos escrever tanto L' quanto G' em termos das larguras de linha ou altura pico-a-pico e da variável que definimos como ξ (equações A5 a A7, A12 e A13).

Definindo uma nova variável $\eta = -p$ e como $p + q = 1 \Rightarrow q = (1 - \eta)$, podemos reescrever a eq. A20 da seguinte forma:

$$V_H' = \eta_H \frac{8V_{pp}\xi}{[3 + \xi]^2} + (1 - \eta_H) \frac{\sqrt{e}}{2} V_{pp} \xi e^{\frac{-\xi^2}{2}} \quad (\text{A20a})$$

$$V_A' = \eta_A \frac{8\sqrt{3}}{\pi(\Delta H^0)^2} \frac{\xi}{[3 + \xi]^2} + (1 - \eta_A) \frac{4\xi e^{\frac{-\xi^2}{2}}}{\sqrt{2\pi}(\Delta H^0)^2} \quad (\text{A20b})$$

O subscrito H indica que V' foi escrita em termos da altura pico-a-pico e o subscrito A em termos da largura de linha.

Podemos escrever ψ em função de η . As equações são:

$$\psi_A = \frac{0,129 - 0,012\eta_A}{1,936 - 1,384\eta_A} \quad (\text{A21a})$$

$$\text{e} \quad \psi_H = 0,146\eta_H + 0,066 \quad (\text{A21b})$$

VI. Referências bibliográficas

- Atherton, N.M. "Principles of electron spin resonance", Ellis Howood Limited, 1993.
- Bales, B. L. "Inhomogeneously broadened spin-label spectra, em Biological Magnetic Resonance, vol. 8". Eds. Berliner, L.J. e Reuben, J. Plenum Publishing Corporation, New York, 1989, pág. 77-130.
- Benatti, C.R., Feitosa, E., Morato, R.F.E. e Lamy-Freund, M.T. "Structural and thermal characterization of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions by spin labels". *Chem. Phys. Lipids*, 111 (2001) 93-104.
- Biaggi, M. H., "Estudos por Ressonância Paramagnética Eletrônica da interação entre peptídeos melanotrópicos e bicamadas lipídicas". Dissertação de mestrado (1992).
- Biaggi, M.H., Schreier, S., Castrucci, A.M.L. e Lamy-Freund, M.T. "Interaction of melanotropic peptides with lipid membranes". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 680 (1993) 459-461.
- Biaggi, M.H., Riske, K.A. e Lamy-Freund, M.T. "Melanotropic peptides-lipids bilayers interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog". *Biophys. Chem.*, 67 (1997) 139-149.
- Budil, D.E., Lee, S., Saxena, S. e Freed, J.H. "Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm". *J. Mag. Res.*, 120 (1996) 155-189.
- Dobryakov, S. N. e Lebedev, Y. S. *Sov. Phys.—Doklady* 13, 873 (1969)
- Felgner, J.H. e Ringold, G.M. "Cationic liposome-mediated transfection". *Nature*, 337 (1989) 387-388.
- Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Weeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M. e Felgner, P.L. "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations". *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 2550-2561.
- Felgner, P.L. "Improvements in cationic liposomes for in vivo gene transfer". *Hum. Gene Ther.*, 7 (1996) 1791-1793.
- Fernandez, R.M. e Lamy-Freund, M.T. "Correlation between the effects of a cationic peptide on the hydration and fluidity of anionic lipid bilayers: a comparative study with sodium ions and cholesterol". *Biophys. Chem.*, 87 (2000) 87-102.

- Freed, J.H. e Fraenkel, G.K. "Theory of linewidths in electron spin resonance spectra". *J. Chem. Phys.*, 39 (1963) 326-348.
- Fretten, P., Morris, S.J., Watts, A. e Marsh, D. "Lipid-lipid and lipid-protein interactions in chromaffin granule membranes. A spin label ESR study". *Biochim. Biophys. Acta*, 598 (1980) 247-259.
- Gao, X. e Huang, L. "Cationic liposome-mediated gene transfer". *Gene Ther.*, 2 (1995) 710-712.
- Garrett, R.H e Grisham, C.M. "Biochemistry", Fort Worth : Saunders College Pub., 1998.
- Ge, M. e Freed, J.H. "Polarity profiles in oriented and dispersed phosphatidylcholine bilayers are different: An electron spin resonance study". *Biophys. J.*, 74 (1998) 910-917.
- Gennis, R.B. "Biomembranes. Molecular structure and function". Springer-Verlag, New York, 1989.
- Griffith, O.H., Dehlinger, P.J. e Vam, S.P. "Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (evidence for water penetration in biological membranes)". *J. Membr. Biol.*, 15 (1974) 159-192.
- Griffith, O.H. e Jost, P.C. "Lipid spin labels in biological membranes, em Spin labelling-Theory and applications". Ed. Berliner, L.J. Academic Press, New York, 1976, pág. 453-523.
- Griffith, O.H., Cornell, D.W. e McConnell, H.M. "Nitrogen hyperfine tensor and *g* tensor of nitroxide radicals". *J. Chem. Phys.*, 43 (1965) 2909-2910.
- Hameka, H.F. "Advanced Quantum Mechanics", Addison-Wesley, Reading, Massachusetts, 1965.
- Hudson, A. e Luckhurst, G.R. "The electron resonance line shapes of radicals in solution. *Chem. Rev.*, 69 (1969) 191-225.
- Karp, G. "Cell and molecular biology : concepts and experiments", John Wiley, 1996.
- Kikuchi, I.S., Viviani, W. e Carmona-Ribeiro, A.M. "Nucleotide insertion in cationic bilayers". *J. Phys. Chem. A*, 103 (1999) 8050-8055.
- Kunitake, T., Okahata, Y., Tamaki, K., Kumamaru, F. e Takayanagi, M. "Formation of the bilayer from a series of quaternary ammonium salts". *Chem. Letters*, (1977) 387-390.
- Lamy-Freund, M.T e Riske, K.A. "The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG". *Chem. Phys. Lipids*, 122 (2003) 19-32.

- Lasic, D.D., Strey, H., Stuart, M.C., Podgornik, R. e Frederik, P.M. "The structure of DNA-liposome complexes". *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 832-833.
- Lawaczeck, R. "Permeability of water-molecules across vesicular lipid bilayers". *J. Membr. Biol.*, 51 (1979) 229-261;
- Lehninger, A.L., "Princípios de bioquímica", Ed. Sarvier, 1984.
- Marsh, D. (1981) em *Membrane Spectroscopy*, Grell, E. (ed.) 51-142, Springer Verlag.
- Nantes, I.L, Correia, F.M, Faljoni-Alario, A., Kawanami, A.E., Ishiki, H.M., Amaral, A.T. e Carmona-Ribeiro, A.M. "Nucleotide conformational change induced by cationic bilayers". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416 (2003) 25-30.
- Nordio, P.L. "General Magnetic Resonance, em Spin labelling-Theory and applications". Ed. Berliner, L.J. Academic Press, New York, 1976, pág. 5-52.
- Orton, J.W. "Electron Paramagnetic Resonance", London Iliffe books, 1968.
- Plachy, W. e Kivelson, D. "Spin exchange in solutions of di-tertiary-butyl nitroxide". *J. Chem.Phys*, 47 (1967) 3312-3318.
- Poole, C.P., "ESR - A comprehensive treatise on experimental techniques", Dover Publications, 1996.
- Redfield, A.G. "The theory of relaxation processes, em Advances in magnetic resonance". Ed. Waugh, J.S. Academic Press, New York, 1965, pág. 1-32.
- Riske, K.A., Politi, M.J., Reed, W.F. e Lamy-Freund, M.T. "Temperature and ionic strength dependent surface ionization in DMPG liposomes". *Biophys. J.*, 72 (1997) -
- Riske, K.A., Nascimento, O.R., Peric, M., Bales, B e Lamy-Freund, M.T. "Probing DMPG vesicles surface a with cationic aqueous soluble spin label". *Biochim. Biophys. Acta*, 1418 (1999) 133-146.
- Rouser, G., Fleischer, S. e Yamamoto, A. "Two dimensional thin layer chromatography separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots". *Lipids*, 5 (1970) 494-496.
- Saupe, A. "Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten and kristallinflüssigen Lösunggen". *Naturforsch*, 19-A (1964)

- Schindler, H. e Seelig, J. "EPR-spectra of spin labels in lipid bilayers". *J. Chem. Phys.*, 59 (1973) 1841-1850.
- Schneider, D.J. e Freed, J.H. "Calculating slow motional magnetic resonance spectra- A user's guide, em Biological Magnetic Resonance, vol. 8". Eds. Berliner, L.J e Reuben, J. Plenum Publishing Corporation, New York, 1989, pág. 1-76.
- Seelig, J. "Spin label studies of oriented smectic liquid crystals - a model system for bilayer membranes". *J. Am. Chem. Soc.*, 92 (1970) 3881-3887.
- Slichter, C. P. "Principles of Magnetic Resonance". New York, Harper, 1963
- Stryer, L. "Biochemistry", W. H. Freeman and Co., New York, 1997.
- Subczynski, W.K., Wisniewska, A., Yin, J.J., Hyde, J.S. e Kusumi, A. "Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol". *Biochemistry*, 33 (1994) 7670-7681.
- Tamisier-Karolak, S.L. "Determination of styrene oxide adducts in mononucleotide dAMP and DNA by capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection". *Journal of Separation Science*, 24 (2001) 757-765.
- Tsukamoto, M., Ochiya, T., Yoshida, S., Sigmura, T. e Tereda, M. "Gene-transfer and expression in progeny after intravenous dna injection into pregnant mice". *Nature Genet.*, 9 (1995) 243-248.
- Turchiello, R.F., Juliano, L., Ito, A.S. e Lamy-Freund, M.T. "How bradykinin alters the lipid membrane structure: a spin label comparative study with bradykinin fragments and other cations". *Biopolymers*, 54 (2000) 211-221.
- Voet, D. e Voet, J.G. "Biochemistry", 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York, 1995.
- Vuolo, J. H. "Fundamentos da teoria dos erros", 2^a. edição. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1996.
- Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y. e Debbs, R. "Systemic gene-expression after intravenous dna delivery into adult mice". *Science*, 261 (1993) 209-211.