

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

**Espectroscopia de fluorescência no estudo das interações entre terpenos e
membranas modelo**

LUCIANO CALAÇA ALVES

GOIÂNIA/GO

2011

LUCIANO CALAÇA ALVES

**Espectroscopia de fluorescência no estudo das interações entre terpenos e
membranas modelo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Física.

Orientação: Prof^a. Dra. Cássia Alessandra Marquezin

GOIÂNIA/GO

2011

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

A472e Alves, Luciano Calaça.
Espectroscopia de fluorescência no estudo das interações entre terpenos e membranas modelo [manuscrito] / Luciano Calaça Alves. - 2011.
61 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cássia Alessandra Markezim.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2011.
Bibliografia.

1. Espectroscopia de fluorescência. 2. Anisotropia de fluorescência. 3. Terpenos. I. Título.

CDU: 543.42

*Aos meus pais,
José e Cleonice,
e à “vó” Lurdes.*

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Cássia Alessandra Marquezin, pela orientação, dedicação, amizade e paciência;

Ao Prof. Dr. Antônio Alonso, por disponibilizar seu laboratório e nos ceder os terpenos, lipídios e alguns equipamentos;

Ao Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, por disponibilizar seu laboratório em Ribeirão Preto e nos ceder sondas, lipídios e alguns equipamentos;

À Prof.^a Dra. Maria Teresa Moura Lamy, que nos cedeu alguns lipídios;

À Prof.^a Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira, que nos cedeu as tiossemicarbazonas;

Ao grupo de Biofísica da UFG e da USP – RP, pela ajuda e dicas, tanto na preparação das amostras, quanto nas medidas;

Ao Instituto de Física UFG e todos os professores;

Aos meus pais, José e Cleonice, por todo amor e dedicação;

À minha avó Lurdes, por ter sido tão importante na minha criação e pela janta gostosa de todo dia;

Aos meus irmãos, Lucas e Luan, por toda raiva que me passaram e por toda ajuda que me dão;

Aos meus amigos do mestrado, em especial ao Harley, ao Luizmar e à Kelly, por todas as horas de estudo, a amizade e o companheirismo;

Aos amigos Giovanni e Eduardo, pela amizade nas horas de alegria e nos momentos difíceis;

À minha namorada Giullia, pelo amor e companheirismo;

A Deus, que me deu força, sabedoria, saúde e sanidade em minha vida;

Ao CNPq e à Capes, pelo apoio financeiro;

RESUMO

Considerando que membranas de células naturais são extremamente complexas, utiliza-se em Biofísica alguns modelos mais simplificados para tais membranas, visando compreender interações específicas dessas membranas com moléculas de interesse biológico. Neste trabalho foram estudadas interações entre moléculas de terpenos e seus derivados e vesículas de fosfolipídios (membranas modelo), utilizando a técnica de Espectroscopia de Fluorescência.

Os terpenos são conhecidos pela sua atuação como aumentadores da permeação em membranas naturais. Neste trabalho, os terpenos estudados foram o cineole e o limoneno. Os derivados de terpenos são moléculas da classe das tiossemicarbazonas e aqui foram estudados o *p*-Dimetil e o *m*-Nitro; tais compostos apresentam atividade antitumoral, antimalárica, anticancerígena, etc. Como modelos de membrana de célula natural, utilizamos vesículas fosfolipídicas unilamelares produzidas pelo método de extrusão, com diâmetro de 0,1 μm . Foram utilizados cinco tipos de fosfolipídios para produção de tais vesículas: DMPC, DLPC, DPPC, DPPG e DLPG; diferem entre si principalmente pela carga do grupo polar e pelo comprimento de suas cadeias hidrocarbônicas.

Medidas de anisotropia de fluorescência forneceram informações acerca da fluidez das membranas lipídicas quando da adição de terpenos; as sondas fluorescentes utilizadas foram o Ahba, o 6-NBD-PC e o DPH. São todas sondas lipofílicas, mas com preferência de localização na bicamada lipídica em locais distintos. Os resultados mostraram que ambos os terpenos provocaram mudanças na fluidez da membrana, fluidificando a fase gel e deslocando a transição de fase para valores menores de temperatura; no entanto, o limoneno atuou de forma mais significativa que o cineole. Em vesículas de DLPC nenhum efeito foi observado no intervalo de temperatura em que se trabalhou e em DLPG, ligeira fluidificação da membrana foi observada em presença do limoneno. Dos experimentos com as tiossemicarbazonas, observou-se interação forte com vesículas de DPPC.

Palavras-Chave: Espectroscopia de Fluorescência, Anisotropia de Fluorescência, Terpenos, Membranas.

ABSTRACT

Natural cell membranes are extremely complex. Therefore some simplified models for such membranes are used in biophysics, in order to understand specific interactions of these membranes with molecules of biological interest. In this work we study interactions between molecules of terpenes and their derivatives and phospholipid vesicles, using the technique of fluorescence spectroscopy.

Terpenes are known for their performance such as enhancers of the permeability of natural membranes. In this work, the terpenes studied were limonene and cineole. The terpenes derivatives are molecules from the class of thiosemicarbazones and here we studied the *p*-Dimethyl and *m*-Nitro; such compounds have antitumor, antimalarial, anticancer activity, and others. As models of natural cell membrane, we used large unilamellar vesicles (with a diameter of 0.1 μm), produced by the extrusion method. Five types of phospholipids were used for the production of such vesicles: DMPC, DLPC, DPPC, DPPG and DLPG; these lipids differ by the polar group charge and the length of their hydrocarbon chains.

Fluorescence anisotropy measurements provided information about the fluidity of lipid membranes upon the addition of terpenes; the fluorescent probes used were Ahba, the 6-NBD-PC and DPH. They are lipophilic probes, but localized at different depths at the bilayer. The results showed that both terpenes cause changes in the membrane fluidity, increasing the fluidity of gel phase and shifting the phase transition to lower values of temperature; however, the effects caused by the limonene were more significant than those of the cineole. In DLPC vesicles no effects were observed in the temperature range studied; in DLPG, a slight increase in the fluidity of the membrane was observed in the presence of limonene. From experiments with the thiosemicarbazones, a strong interaction with DPPC vesicles was observed.

Keywords: Fluorescence Spectroscopy, Fluorescence Anisotropy, Terpenes, Membranes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Espectroscopia de Fluorescência em Biofísica	8
1.2 Fluorescência	9
1.3 Anisotropia de Fluorescência.....	11
1.4 Sistemas Modelo de Membranas Biológicas	14
1.5 Terpenos.....	15
1.6 Tiossemicarbazonas	16
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	19
2.1 Lipídios	19
2.2 Sondas Fluorescentes	21
2.3 Preparação das Amostras	23
2.4 Técnicas Utilizadas	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.1 Ahba em DMPC.....	28
3.2 6-NBD-PC em DMPC	32
3.3 DPH em DMPC	36
3.4 DPH em DLPC	39
3.5 DPH em DPPC.....	43
3.6 DPH em DLPG	48
3.7 DPH em DPPG	51
3.8 Tiossemicarbazonas	55
4. CONCLUSÕES	58
5. BIBLIOGRAFIA.....	60

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho utilizamos vesículas de fosfolipídios, que podem ser considerados sistemas biomiméticos simplificados, ou seja, modelos de membranas biológicas. Os estudos com essas membranas modelo podem nos fornecer informações relevantes para a compreensão de fenômenos relacionados à membrana celular que, do ponto de vista das interações moleculares, é bastante complexa. Propriedades como a fluidez da bicamada são de grande interesse no estudo de membranas naturais uma vez que interações envolvendo a permeabilidade da bicamada podem modular o efeito biológico de moléculas cuja ação dependa da interação com a membrana. Daí nosso interesse em estudar tais sistemas.

1.1 Espectroscopia de Fluorescência em Biofísica

A espectroscopia de fluorescência tem se tornado uma ferramenta científica amplamente utilizada em bioquímica, biofísica e ciência dos materiais. Recentemente, muitas aplicações novas com base na fluorescência têm sido desenvolvidas, transformando a espectroscopia de fluorescência em um método comumente utilizado.

O fenômeno da fluorescência é, por exemplo, explorado em simples testes analíticos na ciência ambiental e na bioquímica, na identificação de células e classificação em citometria de fluxo, e como uma ferramenta para investigar a interação de proteínas [1].

Em biofísica, a espectroscopia de fluorescência, tanto em estado estacionário quanto resolvida no tempo, pode nos fornecer informações úteis sobre mobilidade molecular; forma, tamanho e flexibilidade das moléculas, fluidez e parâmetros de ordem em bicamadas lipídicas, além de outros estudos [2].

1.2 Fluorescência

Ocorrerá a absorção de radiação por uma molécula quando a frequência da onda eletromagnética sobre ela incidida for igual à frequência natural de vibração da mesma. A energia disponível para absorção deve se relacionar com a frequência de radiação (ν) pela lei de Planck:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda da luz incidente.

A molécula, então, sofre uma transição de um nível de baixa energia para um nível de energia mais alta no qual vários estados eletrônicos estão disponíveis para a molécula. Esses estados eletrônicos são subdivididos em níveis de energia vibracional e rotacional. Transições entre níveis eletrônicos exigem energias encontradas nas regiões da luz visível e ultravioleta. Vários estados vibracionais quantizados estão disponíveis para uma molécula em cada estado eletrônico, e uma molécula pode ser excitada de um menor para um maior nível de energia vibracional pela absorção de luz na região do infravermelho. Vários estados quantizados rotacionais estão disponíveis para uma molécula em um dado estado eletrônico vibracional. Os estados rotacionais são muito próximos, e microondas de baixa energia têm a energia adequada para excitar uma molécula de um menor para um maior nível de energia rotacional [3].

Os processos que ocorrem entre a absorção e emissão da luz são geralmente ilustrados pelo diagrama de Jablonski. Esse diagrama ilustra vários processos moleculares que podem ocorrer nos estados excitados.

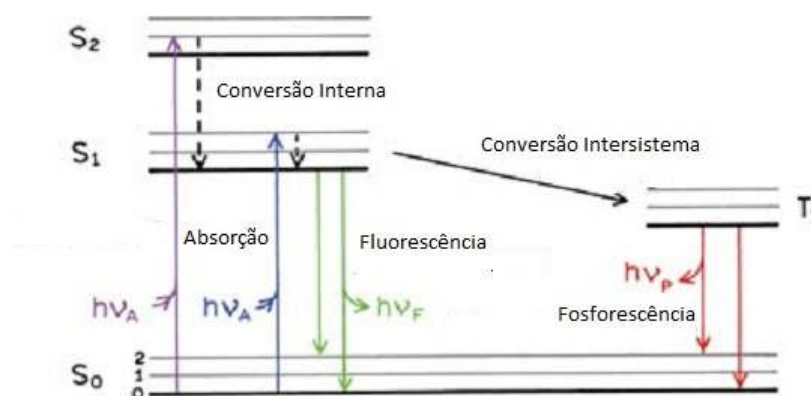


Figura 1: Diagrama de Jablonski. Adaptado de [4].

Um típico diagrama é representado na Figura 1, onde S₀ é o estado singlete fundamental e, S₁ e S₂ são o primeiro e o segundo estados singlete excitados, respectivamente. Para cada nível eletrônico de energia podem existir certos números de níveis de energia vibracional, demonstrado por 0, 1, 2, etc. A transição entre estados é representada pelas linhas verticais para indicar a natureza instantânea da absorção da luz (da ordem de 10⁻¹⁵ s).

Um fluoróforo é geralmente excitado para um estado maior que S₁ e S₂. Em um processo chamado conversão interna (da ordem de 10⁻¹² s) as moléculas relaxam para o menor nível vibracional de S₁.

Estando no estado excitado S₁, a molécula poderá voltar ao seu estado fundamental por diferentes caminhos. Em muitos casos a energia é transferida como calor para o meio ou por processos não radiativos, como colisões com moléculas do solvente. No entanto, em alguns casos, luz é emitida pela amostra. Este fenômeno é chamado luminescência e é formalmente dividido em duas categorias dependendo da natureza do estado excitado: fosforescência e fluorescência.

Se a emissão de luz for proveniente do estado S₁, ocorre a fluorescência (da ordem de 10⁻⁹ s). Entretanto, pode ocorrer uma conversão de spin de S₁ para o primeiro estado tripleto T₁, chamado cruzamento intersistema. A emissão de luz proveniente de T₁ é chamada de fosforescência, variando de milissegundos a segundos.

Medições de fluorescência podem ser classificadas em dois tipos de medidas: estática e com resolução temporal. As medições estáticas, o mais comum, são as realizadas com iluminação constante; a amostra é iluminada com um feixe contínuo de luz e a intensidade ou espectro de emissão é registrada.

Experimentos com resolução temporal são usados para medir os decaimentos da intensidade ou da anisotropia de fluorescência em função do tempo. Para estas medidas a amostra é exposta a um pulso de luz, onde a largura do pulso deve ser menor que o tempo de decaimento da amostra. Este decaimento da intensidade é registrado por um sistema de detecção cuja eletrônica é de alta velocidade e permite que a intensidade e a anisotropia de fluorescência possam ser medidas na escala de nanossegundos. É importante entender que uma observação estática é simplesmente uma média do decaimento da intensidade de fluorescência da amostra [4].

1.3 Anisotropia de Fluorescência

A luz é uma onda eletromagnética constituída de campo elétrico E e um campo magnético B , perpendiculares entre si e à direção de propagação, e oscilando em fase, representados na Figura 2, a seguir.

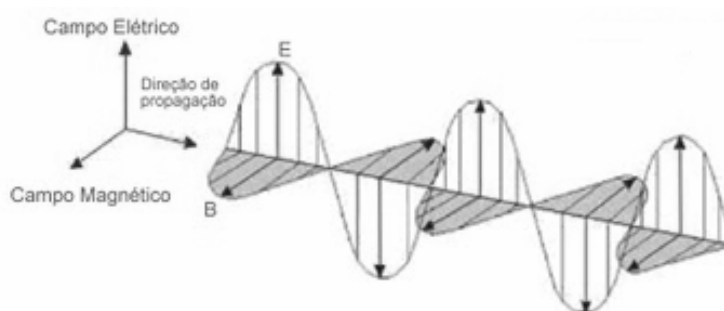


Figura 2: Representação da luz como uma onda eletromagnética.

Para a luz natural, estes campos não têm orientação preferencial, mas para a luz linearmente polarizada, o campo elétrico oscila ao longo de uma determinada

direção, Figura 3, a seguir; um caso intermediário corresponde a uma luz parcialmente polarizada.

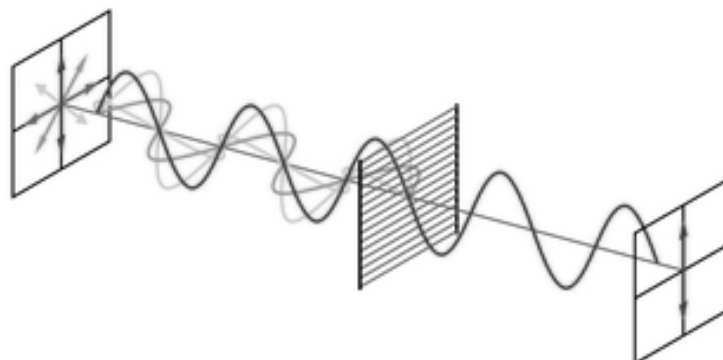


Figura 3: Polarização da luz natural.

Se a luz incidente é linearmente polarizada, a probabilidade de excitação de um fluoróforo é proporcional ao quadrado do produto escalar $\vec{M}_\alpha \cdot \vec{E}$, onde \vec{M}_α é o momento de absorção do fluoróforo, ou seja, é proporcional a $\cos^2\theta_\alpha$, onde θ_α é o ângulo entre \vec{E} e \vec{M}_α , Figura 4, a seguir. Então, esta probabilidade é máxima quando \vec{E} é paralelo a \vec{M}_α e é zero quando eles são perpendiculares.

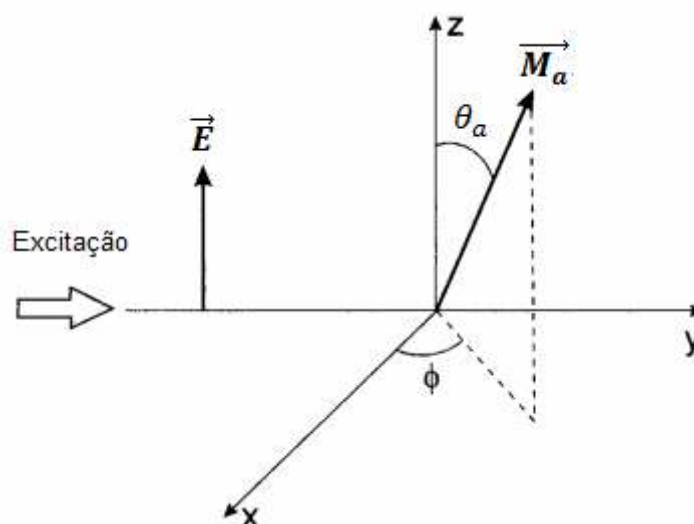


Figura 4: Representação da absorção de luz linearmente polarizada. Adaptado de [5].

Desta maneira, quando uma população de fluoróforos é iluminada por uma luz incidente linearmente polarizada, aqueles fluoróforos cujo \vec{M}_α estão orientados em

uma direção próxima de \vec{E} do feixe de fótons incidentes, são preferencialmente excitados. Isto é chamado de excitação fotoseletiva, ou simplesmente de fotoseleção. Devido ao fato de a distribuição dos fluoróforos excitados ser anisotrópica, a fluorescência emitida também será anisotrópica [5]. Podemos observar na Figura 5, a seguir, o comportamento de um fluoróforo entre a excitação e a emissão de luz.

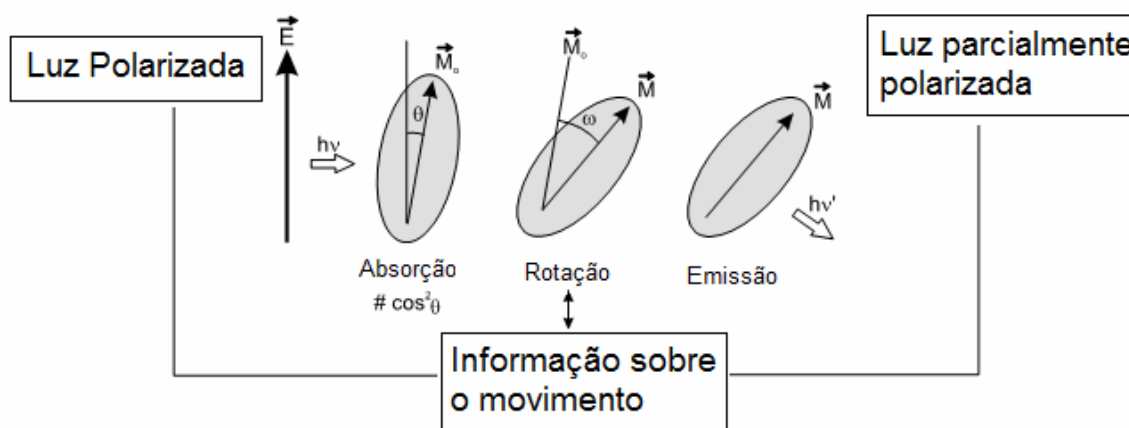


Figura 5: Representação do comportamento do fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Adaptado de [5].

A anisotropia de fluorescência é definida por

$$I_{||} + 2I_{\perp}$$

Equação 2

onde $I_{||}$ e I_{\perp} são, respectivamente, as intensidades da emissão da fluorescência polarizadas vertical e horizontalmente, para quando a excitação é vertical. Valores maiores de anisotropia (limite teórico máximo: 0,4) indicam pouca mobilidade da molécula, enquanto que valores menores, próximos de zero, indicam alta mobilidade.

Vários fenômenos podem diminuir os valores da anisotropia. A causa mais comum é a difusão rotacional. Esta difusão ocorre durante o tempo de vida do

estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo. Medições deste parâmetro nos fornecem informações sobre o deslocamento relativo do fluoróforo entre a absorção e a emissão. Numa solução fluida muitos fluoróforos giram intensivamente com um tempo entre 50 e 100 ps, portanto, as moléculas podem girar muitas vezes durante o tempo de vida do estado excitado, e a orientação da emissão polarizada é aleatória. Por esta razão, fluoróforos em soluções não viscosas geralmente exibem valores de anisotropia próximos de zero. Transferência de energia entre os fluoróforos também resulta em uma diminuição da anisotropia.

1.4 Sistemas Modelo de Membranas Biológicas

Neste trabalho utilizamos como modelos de uma membrana celular natural, vesículas do tipo LUV (large unilamellar vesicles). As vesículas são constituídas por fosfolipídios, que são compostos insolúveis em água, com importantes funções biológicas; os fosfolipídios representam aproximadamente a metade da massa das membranas biológicas e possuem duas cadeias de ácidos graxos (cadeias apolares) ligadas a grupos polares. Em meio aquoso, agregam-se em bicamadas lipídicas que se dobram para formar vesículas. Nas bicamadas lipídicas a agregação ocorre mais facilmente quando as áreas de secção transversal do grupo polar e das cadeias apolares são similares [6]. As vesículas encerram um volume de água em seu interior, como pode ser visto na Figura 6, a seguir.

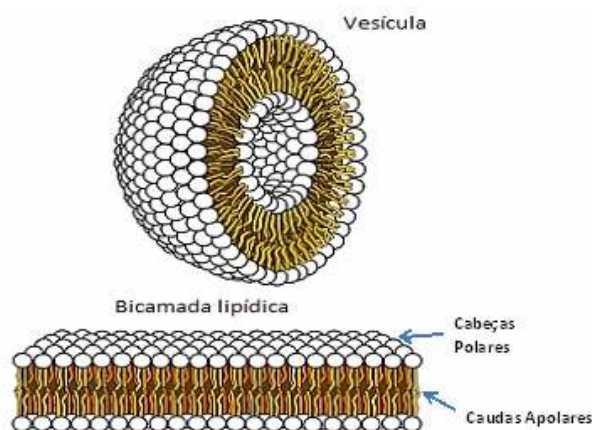


Figura 6: Estruturas representativas de bicamadas lipídicas e vesículas

É importante notar que os estudos sobre membranas biológicas e membranas modelo são realizados com diversas técnicas experimentais e as diferentes informações se complementam de modo a se ter uma visão abrangente das propriedades biofísicas dos sistemas e processos relacionados às membranas. As técnicas estão sendo combinadas e utilizadas no estudo das modificações em membranas modelo, causadas pela presença de macromoléculas variadas. Neste caso, agentes facilitadores da permeabilidade da membrana (terpenos) bem como algumas moléculas da classe das tiossemicarbazonas foram estudadas.

1.5 Terpenos

Terpenos são compostos encontrados em óleos essenciais de origem vegetal usados em medicamentos, aromatizantes e perfumaria. Estas moléculas têm sido utilizadas como matérias-primas para a síntese de diversos compostos bioativos, pois vêm demonstrando um grande potencial terapêutico com um amplo espectro de atividade biológica, incluindo anti-inflamatórios, anti-tumoral e propriedades fungicidas.

Do ponto de vista químico, compreendem somente átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, podendo assumir diversas funções orgânicas. Estudos com terpenos mostraram que eles melhoram a permeabilidade da pele promovendo um aumento na absorção de diversas drogas polares e não polares [7] [8] [9]. Neste trabalho, estamos estudando a atuação dos terpenos nas membranas através de técnicas de fluorescência. A Figura 7 a seguir mostra a estrutura molecular dos terpenos estudados.

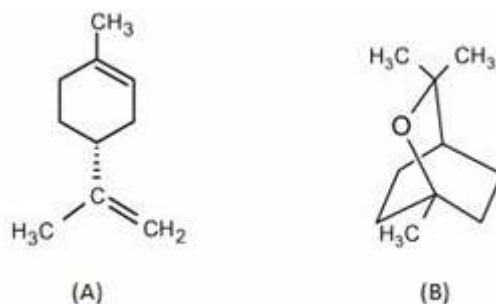


Figura 7: Estrutura dos terpenos utilizados em nosso trabalho. (A) Limoneno extraído de frutas cítricas e (B) Cineole, extraído do eucalipto.

1.6 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são derivadas do sesquiterpeno natural (-)- α -bisabolol, representado na Figura 8, a seguir, e juntamente com seus complexos metálicos têm demonstrado propriedades antitumorais [10], antivirais [11], antibacterianas [12], antifúngicas [13], dentre outras [14]. Estes compostos são geralmente obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado. São conhecidos, também, pelas suas excelentes propriedades para formarem complexos organometálicos, comportando-se como agentes quelantes.

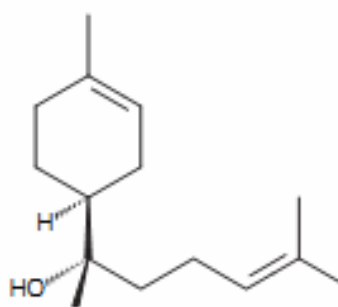


Figura 8: Estrutura molecular do (-)- α -bisabolol, derivado da camomila.

Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final [15].

Em nosso trabalho utilizaremos as seguintes tiossemicarbazonas: O (-)-*N*(1)-*m*-Nitro-benzaldeído-*N*(4-6)-{2-(*S*)-2-hidroxi-6-metil-2-[1(*S*)-4-metilciclohex-3-enil]-heptanil}-tiossemicarbazona (o qual chamaremos de *m*-Nitro), na forma de um pó amarelado; e o (-)-*N*(1)-*p*-Dimetilamino-benzaldeído-*N*(4-6)-{2-(*S*)-2-hidroxi-6-metil-2-[1(*S*)-4-metilciclohex-3-enil]-heptanil}-tiossemicarbazona (*p*-Dimetil), na forma de um óleo amarelo escuro, bastante viscoso, cujas estruturas estão demonstradas na Figura 9, a seguir. Estudos com o *m*-Nitro mostraram que ele possui uma grande atividade contra células cancerígenas da leucemia [14].

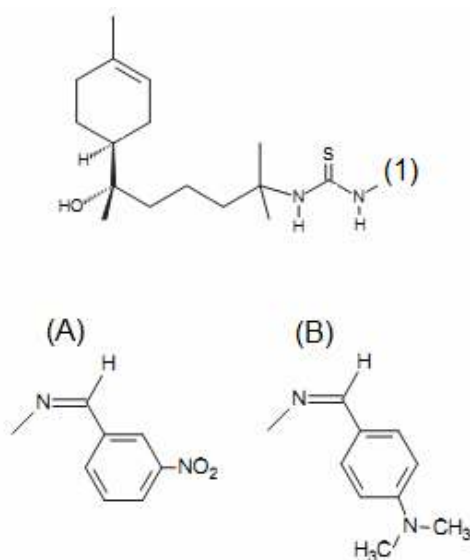


Figura 9: Estrutura molecular das tiossemicarbazonas utilizados em nosso estudo. Em (1) liga-se com (A) para o *m*-Nitro e (B) para o *p*-Dimetil.

Diante do exposto, propomos neste trabalho o uso da técnica de espectroscopia de fluorescência para investigar os efeitos causados por terpenos e alguns de seus derivados, em vesículas de fosfolipídios. Serão utilizados diferentes tipos de terpenos e tiossemicarbazonas e através de medidas de anisotropia de fluorescência, será possível monitorar as alterações na fluidez das bicamadas lipídicas.

Diversas sondas lipofílicas fluorescentes serão utilizadas, cada uma com preferência de localização em regiões distintas da bicamada. Também serão produzidas vesículas a partir de diferentes tipos de fosfolipídios, visando compreender os tipos de interações dos terpenos e tiossemicarbazonas com os fosfolipídios.

2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1 Lipídios

Uma característica importante das bicamadas lipídicas puras é o comportamento de fase; aumentando a temperatura do sistema é possível observar a transição de uma fase mais rígida (fase gel) para uma fase fluida (líquido-cristalina) [16]. Cada fosfolípido tem sua própria temperatura de transição (T_M). Utilizamos para a preparação de vesículas, dois grupos de fosfolípídios, as fosfatidilcolinas (PC) e os fosfatidilglicerois (PG).

Fosfatidilcolina é um dos principais constituintes das membranas celulares. Sua principal função é fornecer um quadro estrutural para a membrana e manter a barreira de permeabilidade. Além disso, os fosfolípídios desse grupo possuem carga líquida neutra. Deste grupo utilizaremos os seguintes fosfolípídios:

O 1,2-didodecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, também conhecido como dilauroil glicerol fosfocolina (DLPC), de fórmula molecular $C_{32}H_{64}NO_8P$, massa molar 621,826 g/mol e cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 10. A transição de fase é observada em torno de $-1\text{ }^\circ\text{C}$.

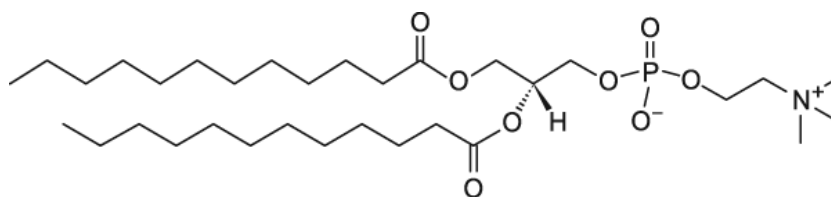


Figura 10: Estrutura molecular do DLPC

O 1,2-ditetradecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, também conhecido como dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), de fórmula molecular $C_{36}H_{72}NO_8P$, massa molar 677,933 g/mol e cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 11. A transição de fase é observada em torno de $23\text{ }^\circ\text{C}$.

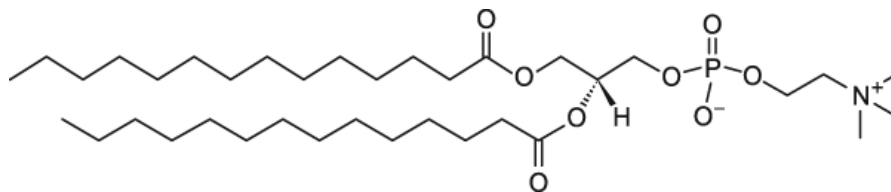


Figura 11: Estrutura molecular do DMPC

O 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, também conhecido como dipalmitoil glicerol fosfocolina (DPPC), de fórmula molecular $C_{40}H_{80}NO_8P$, massa molar 734,039 g/mol e cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 12. A transição de fase é observada em torno de 41 °C.

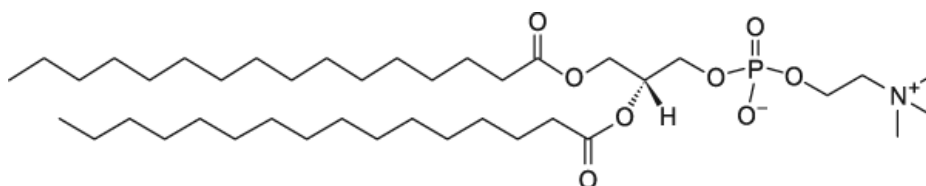


Figura 12: Estrutura molecular do DPPC

Fostatidilglicerol também é um dos constituintes das membranas celulares, porém, em uma baixa proporção, cerca de 1 a 2% da quantidade total de lipídios. Porém, em surfactantes pulmonares, sua proporção pode chegar a 11%. Em bactérias são encontradas em alta quantidade. Deste grupo, que possui carga líquida negativa, utilizaremos dois tipos de fosfolipídios:

O 1,2-didodecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (sal de sódio), também conhecido como dilauroil glicerol fosfoglicerol (DLPG), de fórmula molecular $C_{30}H_{58}O_{10}PNa$, massa molar 632,739 g/mol e cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 13. Sua transição de fase é observada em torno de -3 °C.

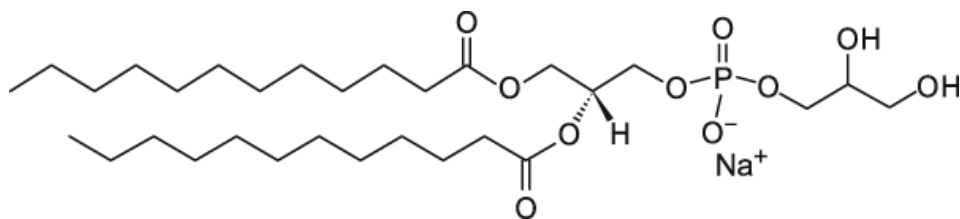


Figura 13: Estrutura molecular do DLPG

O 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (sal de sódio), também conhecido como dipalmitoil glicerol fosfoglicerol (DPPG), de fórmula molecular $C_{38}H_{74}O_{10}PNa$, massa molar 744,952 g/mol e cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 14. Sua transição de fase é observada em torno de 41 °C.

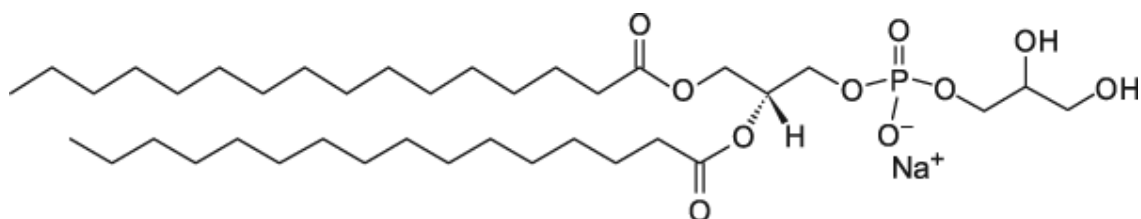


Figura 14: Estrutura molecular do DPPG

2.2 Sondas Fluorescentes

Em nosso trabalho diferentes sondas fluorescentes são utilizadas, dentre as quais podemos citar o Ahba [17] (2-Amino-*N*-hexadecil-benzamida) derivado do ácido *orto*-aminobenzóico (Abz) o 6-NBD-PC [18] [19] (1-palmitoil-2-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)aminododecanoil]-*sn*-glicero-3-fosfocolina) e o DPH [20] [21] [22] (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), representados nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente. O Ahba mostrou localizar-se preferencialmente na superfície de bicamadas lipídicas [17], enquanto que o DPH, por exemplo, se encontra totalmente inserido na região apolar das bicamadas. Já o 6-NBD-PC, é um fosfolípido fluorescente, cujo fluoróforo é o NBD, covalentemente ligado ao carbono 6 de uma das cadeias graxas de uma fosfatidilcolina.

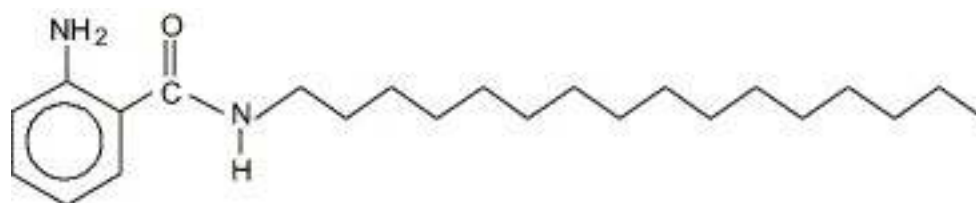


Figura 15: Estrutura Molecular do 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA)

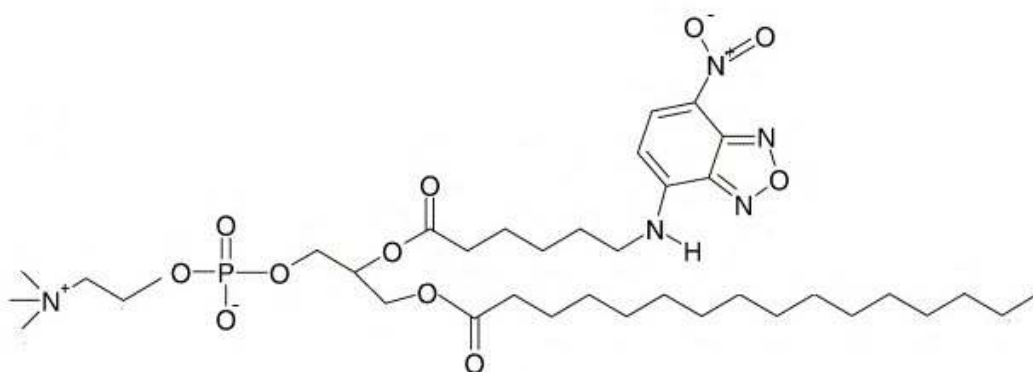


Figura 16: Estrutura molecular do 6 NBD-PC.

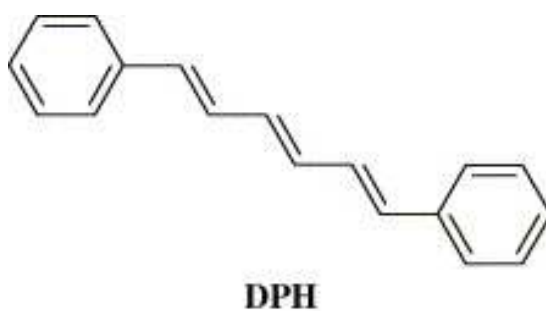


Figura 17: Estrutura molecular do DPH.

2.3 Preparação das Amostras

A maioria das amostras utilizadas em nosso trabalho foi preparada no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás. Os lipídios, adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) foram cedidos pela prof^a Dra. Maria Teresa Lamy, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, com quem mantemos colaborações; os terpenos foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Antônio Alonso do IF - UFG. Amostras também foram preparadas em Ribeirão Preto, no Laboratório de Fotobiofísica, no Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. O DMPC utilizado em Ribeirão Preto, também adquirido da Avanti, foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Amando Ito, assim como todos os instrumentos necessários para a preparação dessas amostras.

No início do trabalho, foi utilizado o espectrofluorímetro estático Hitachi F-7000 do Laboratório de Fotobiofísica da USP de Ribeirão Preto, disponibilizado pelo prof. Dr. Amando Ito, havendo assim a necessidade do preparo das amostras neste mesmo laboratório.

Um filme de lipídio é formado a partir dos lipídios dissolvidos em clorofórmio; nesta etapa do processo, é adicionada também a sonda fluorescente; o solvente é então removido através de um fluxo de N₂, o filme (lipídio + sonda) é deixado em ambiente de pressão reduzida por algumas horas, para eliminar todos os traços do solvente. No processo de hidratação para formar as vesículas, as amostras de DLPC, DMPC e DPPC foram incubadas em uma solução tampão PBS (fosfato) 5 mM pH 7,4 por cerca de 5 min com uma temperatura acima de sua temperatura de transição e submetidas ao vortex várias vezes. Já as amostras de DLPG e DPPG foram incubadas com tampão Hepes EDTA 5mM, pH 7,4 pelo mesmo processo. Utilizando membranas de policarbonato, as amostras foram extrusadas [23], sete vezes em membranas com poros de diâmetro 0,2 µm e 21 vezes em membranas com poros de diâmetro 0,1 µm, sempre acima da T_M, resultando em vesículas unilamelares com diâmetro de 0,1 µm.

Para a adição dos terpenos, dois métodos distintos foram utilizados. No primeiro, o qual chamaremos de método 1, a solução contendo as vesículas foi

centrifugada por 15 minutos a 12400 RPM, após, o sobrenadante foi separado, sobrando apenas as vesículas. A concentração calculada de cada terpeno em solução de etanol foi adicionada diretamente às vesículas. Após cerca de 5 minutos, o sobrenadante retorna ao conjunto vesícula-terpeno e é submetido ao vortex mais algumas vezes. No segundo método, chamado de método 2, os terpenos foram adicionados diretamente na solução tampão + vesículas, sem centrifugação. Ambos os métodos estão representados na Figura 18, a seguir, e resultaram em soluções de vesículas de concentração 1 mM ou 2 mM, com a proporção de terpeno:fosfolipídio de 1:1.

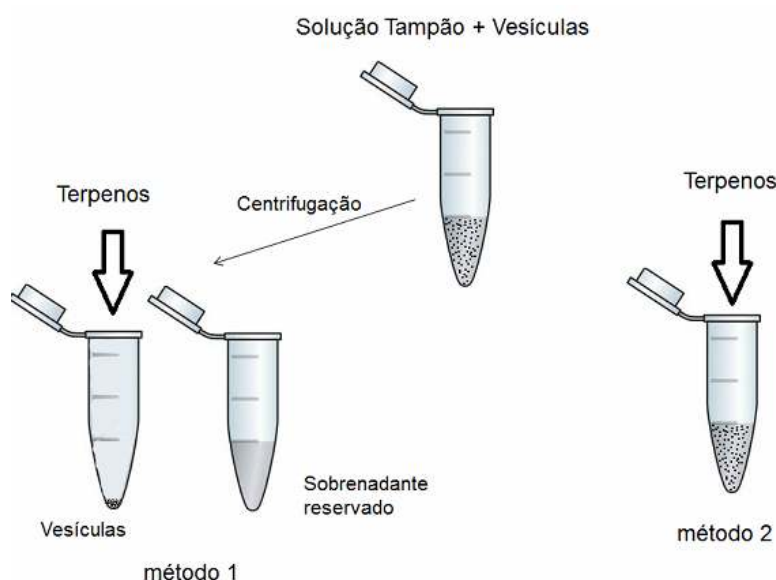


Figura 18: Representação dos métodos de adição dos terpenos.

As amostras são colocadas em cubetas de quartzo de caminho óptico de 10 mm ou 2 mm, as quais são então colocadas no porta-amostra do espectrofluorímetro. O controle de temperatura é feito por um banho térmico.

2.4 Técnicas Utilizadas

As medidas de fluorescência estática foram realizadas em dois laboratórios. Inicialmente no Laboratório de Fotobiofísica do DF-FFCLRP USP, utilizando um espectrofluorímetro F-7000, da Hitachi, equipado com filtros polarizadores. Dando continuidade ao trabalho, outras medidas foram realizadas no Instituto de Física da UFG, utilizando um espectrofluorímetro Fluorolog-3 da Horiba, também equipado com filtros polarizadores. Os próprios equipamentos dispõem de um programa responsável pela aquisição dos espectros e cálculo dos valores de anisotropia.

As medidas de anisotropia estática feitas neste trabalho foram obtidas pelo método do formato L, ou método do canal único. A Figura 19 a seguir ilustra o aparato experimental [4].

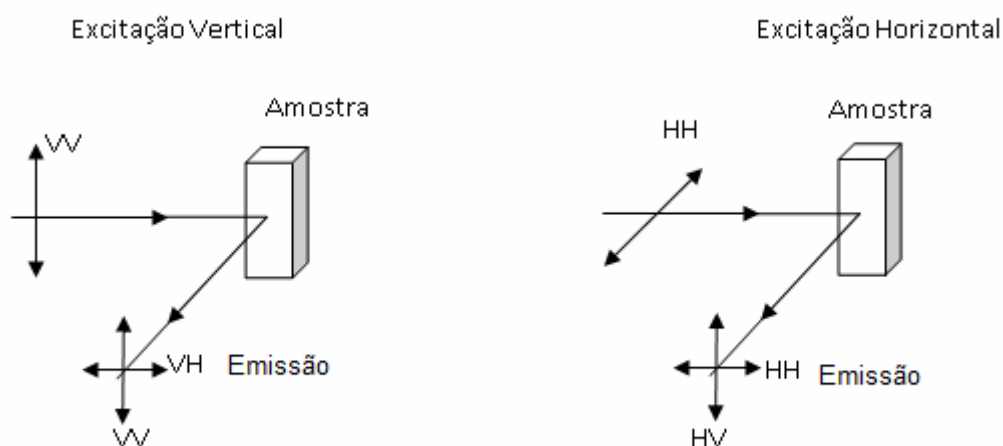


Figura 19: Diagrama esquemático para medidas de anisotropia utilizando a geometria L

Aqui, VV corresponde à excitação e emissão polarizadas verticalmente; VH à excitação polarizada verticalmente e emissão polarizada horizontalmente; analogamente para HV e HH.

Para a excitação polarizada verticalmente, obtemos as intensidades de emissão polarizadas vertical e horizontalmente, dados por:

$$I_{VV} = K S_V I_{\perp} \quad \text{Equação 3}$$

$$I_{VH} = K S_H I_{\perp} \quad \text{Equação 4}$$

onde K é um fator de proporcionalidade que leva em consideração o rendimento quântico do fluoróforo e S_V e S_H são a sensibilidade do sistema de detecção para a luz polarizada vertical e horizontalmente.

Dividindo a equação 3 pela equação 4, obtém-se:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \quad \text{Equação 5}$$

a razão S_V/S_H é definida como fator G de correção.

Para excitação horizontal, a detecção feita pelo método do formato L será sempre perpendicular à excitação, então as intensidades tendem a ser iguais, com pequenas diferenças, devido às propriedades do sistema. Assim, para a excitação polarizada horizontalmente, as intensidades de emissão polarizadas vertical e horizontalmente, serão dadas por:

$$I_{HV} = K S_V I_{\perp} \quad \text{Equação 6}$$

$$I_{HH} = K S_H I_{\perp} \quad \text{Equação 7}$$

dividindo as equações 6 e 7, obtemos:

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V}{S_H} = G \quad \text{Equação 2}$$

podemos reescrever a equação 5 desta forma:

$$= I_{\perp} \frac{1 I_{VV}}{G I_{VH}} \quad \text{Equação 9}$$

Substituindo a equação 9 na equação 2, a anisotropia para o método do canal único pode ser descrita da seguinte forma

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad \text{Equação 3}$$

As medidas de anisotropia foram feitas variando a temperatura da amostra, no intervalo de 9 °C a 65 °C, para que seja observada a transição de fase das bicamadas lipídicas. Não foram realizadas medidas de absorção para as sondas fluorescentes, então, o comprimento de onda de excitação utilizado é igual ao de maior absorção para as sondas fluorescentes, valores estes encontrados na literatura [20] [18] [17]. A anisotropia foi medida no comprimento de onda correspondente ao máximo de emissão (pico de emissão) para o Ahba e o 6-NBP-PC, enquanto que para o DPH, além do comprimento de onda correspondente ao máximo de emissão (segundo pico), foi também medida a anisotropia para o primeiro pico de emissão.

3. RESULTADOS

Utilizando sondas fluorescentes com afinidade por regiões hidrofóbicas, realizamos os primeiros experimentos de anisotropia de fluorescência, onde as diferentes sondas foram incorporadas nas bicamadas lipídicas e diferentes tipos de terpenos foram adicionados ao sistema, com a intenção de monitorar seus efeitos sobre a bicamada.

Dada a propriedade das bicamadas lipídicas de sofrerem transição de fase, dependendo da temperatura a que são submetidas, os experimentos foram feitos a diferentes temperaturas, monitorando assim, em alguns casos, as possíveis mudanças causadas pelos terpenos no comportamento de fase das bicamadas.

De início utilizamos as três sondas fluorescentes e somente o DMPC como fosfolipídio; este apresenta um grupo fosfato na cabeça polar e é *zwitteriônico*, ou seja, possui uma carga positiva e outra negativa, resultando em uma carga elétrica líquida nula. O DMPC tem cadeias hidrocarbônicas com 14 carbonos cada (ácido mirístico).

3.1 Ahba em DMPC

O Ahba, conforme já citado, se posiciona preferencialmente na superfície da bicamada lipídica, mas com sua cauda hidrofóbica penetrando na região apolar, como pode ser visto na Figura 20, a seguir. Estudos com variações do pH do meio sugeriram que esta sonda fica suficientemente exposta ao meio solvente para sentir pequenas variações nos valores de pH e suficientemente inserida na bicamada lipídica, sendo capaz de sentir alterações na fluidez da bicamada [17].

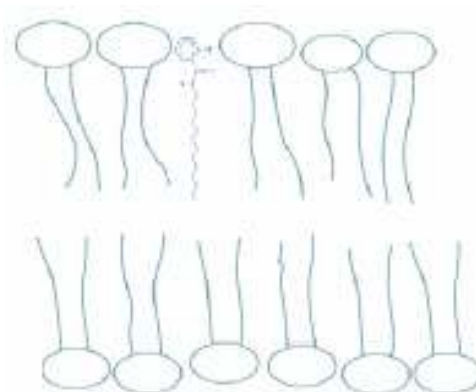


Figura 20: Representação esquemática da posição do Ahba em uma bicamada lipídica;

Deste modo, espera-se que, se a presença de terpenos altera a fluidez da bicamada na interface entre as regiões polar e apolar, o Ahba exiba alterações em seus valores de anisotropia estática. Podemos observar na Figura 21, a seguir, que o aumento da temperatura não altera o espectro de emissão do Ahba e não causa deslocamento espectral.

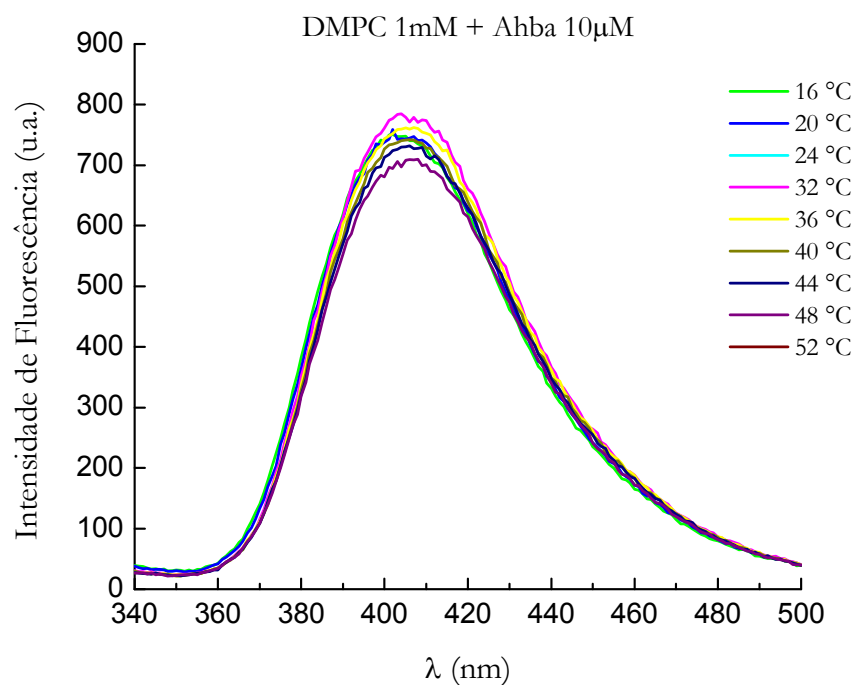


Figura 21: Espectro de emissão do Ahba, em DMPC, para diferentes temperaturas.

A seguir, na Figura 22, resultados obtidos para o Ahba em 2mM de DMPC, tampão fosfato 5 mM. Os terpenos foram adicionados pelo método 1. A razão molar entre terpeno e DMPC foi de 1:1. Para a excitação do Ahba, utilizamos $\lambda_{EX} = 330 \text{ nm}$ e a emissão foi monitorada em $\lambda_{EM} = 400 \text{ nm}$.

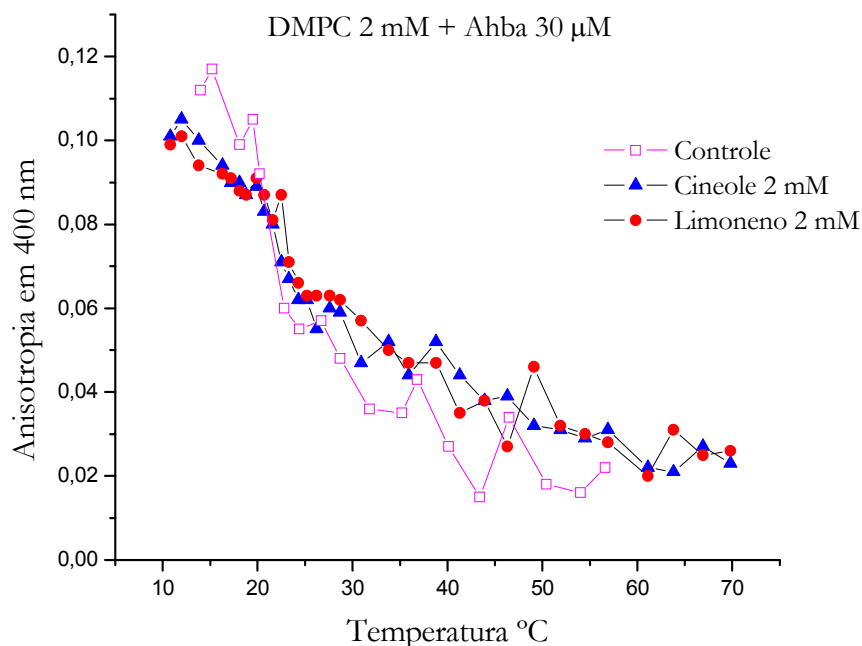


Figura 22: Anisotropia em função da temperatura para amostras de Ahba + DMPC. Terpenos adicionados pelo método 1.

A amostra controle consiste no monitoramento da transição de fase do DMPC, sem a presença de terpenos. Deste gráfico, uma pequena alteração pode ser observada na curva com terpineol, na fase gel da bicamada; na fase fluida, em média, os valores de anisotropia na presença de terpenos foram maiores que a anisotropia do controle, mas são necessárias mais medidas para um resultado mais conclusivo. Deste modo, prosseguimos com os experimentos, repetindo as medidas com os terpenos limoneno e cineole. A Figura 23, a seguir, mostra os resultados obtidos:

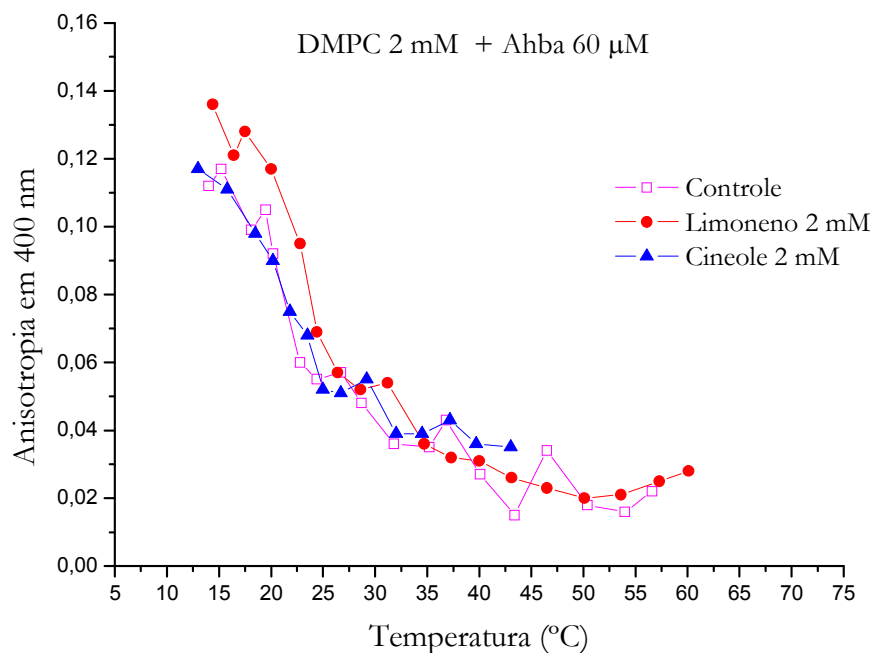


Figura 23: Anisotropia em função da temperatura para amostras de Ahba + DMPC. Terpenos adicionados pelo método 2.

Neste experimento, aumentamos a concentração de Ahba para 60 μ M e a relação terpeno/DMPC continuou 1:1. Os terpenos foram adicionados pelo método 2. Desta vez, os valores de anisotropia na presença de limoneno foram ligeiramente maiores que aqueles do controle, contradizendo os resultados mostrados no gráfico da Figura 22.

Neste ponto, surgiram as seguintes questões: (1) o método de incorporação dos terpenos na bicamada pode influenciar nos resultados? (2) a razão entre a concentração de lipídios e a concentração de sonda fluorescente pode influenciar nos resultados?

Os experimentos foram repetidos, utilizando agora a sonda 6-NBD-PC e preparando as amostras pelos dois métodos citados anteriormente.

3.26-NBD-PC em DMPC

Utilizando como sonda fluorescente o 6-NBD-PC, que localiza-se na região apolar da bicamada, porém, mais próximo da interface com a região das cabeças polares, representado na Figura 24, e com $\lambda_{EX} = 464 \text{ nm}$ e $\lambda_{EM} = 535 \text{ nm}$, realizamos experimentos na presença do limoneno e do cineole. Estudos utilizando a anisotropia de fluorescência do 6-NBD-PC foram realizados em surfactantes pulmonares e suas interações com proteínas em membranas modelo [24]; além disso, o 6-NBD-PC é utilizado também em estudos de membranas lipídicas através de experimentos de transferência de energia [25].

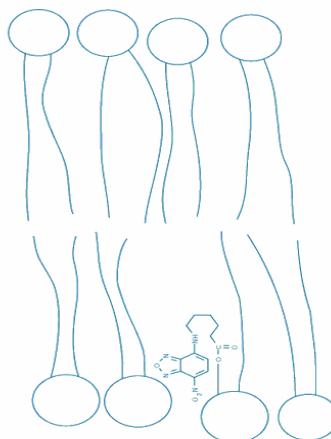


Figura 24: Representação esquemática da posição do 6-NBD-PC em uma bicamada lipídica;

As Figuras 25 e 26, a seguir, mostram os espectros de emissão do 6-NBD-PC, em vesículas de DMPC na ausência e presença do limoneno, demonstrando que o aumento da temperatura do sistema apenas diminui a intensidade de fluorescência, sem causar deslocamento espectral. Observamos ainda que a presença dos terpenos no sistema não provoca alterações no espectro de emissão da sonda fluorescente.

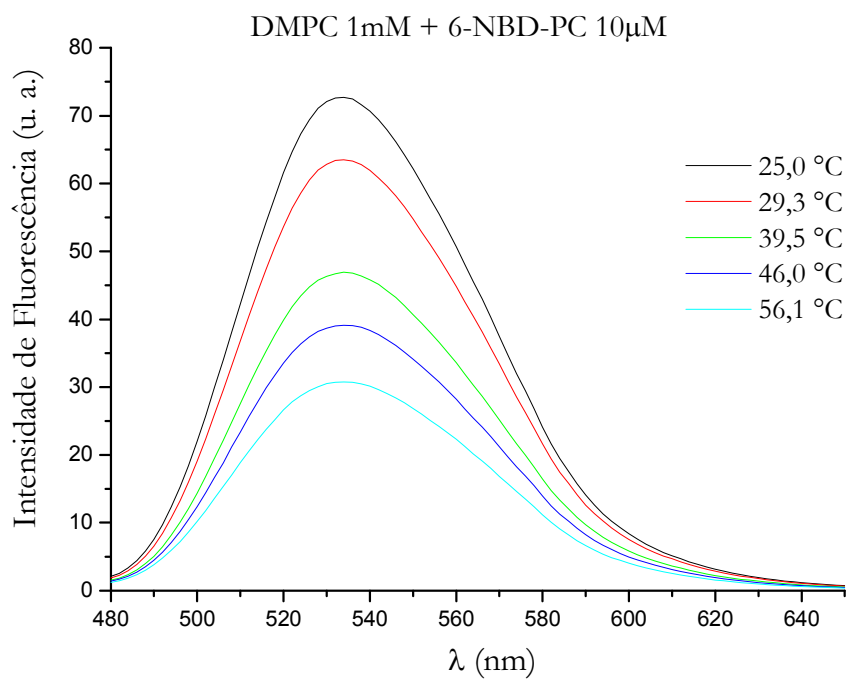


Figura 25: Espectro de emissão do 6-NBD-PC, em DMPC, para diferentes temperaturas.

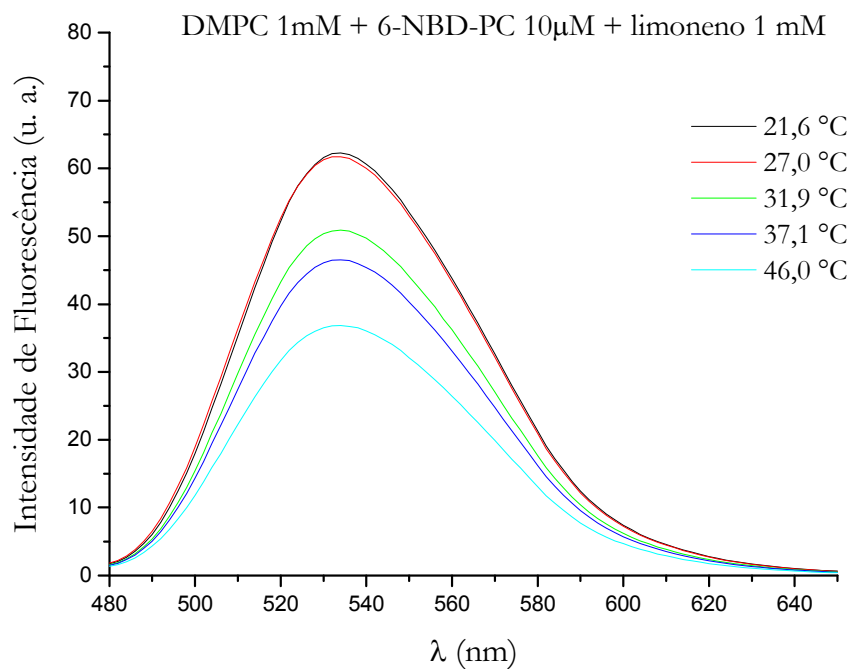


Figura 26: Espectro de emissão do 6-NBD-PC, em DMPC, para diferentes temperaturas, na presença do limoneno.

Com o 6-NBD-PC observamos nas Figuras 27 e 28, a seguir, que a presença do limoneno varia os valores de anisotropia em relação ao cineole e ao controle. A principal diferença entre as amostras medidas na Figura 27 e as amostras medidas na Figura 28, está na concentração de DMPC e na preparação das amostras. Novamente, a diferença entre os valores de anisotropias são mais visíveis na fase gel da membrana.

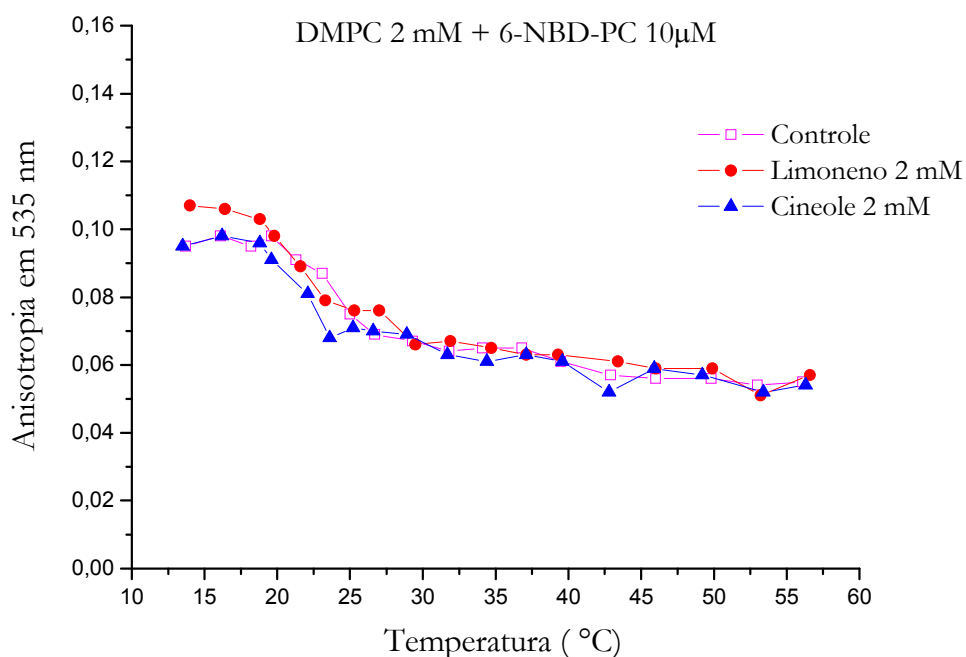


Figura 27: Anisotropia em função da temperatura para amostras com 6-NBD-PC + DMPC. Terpenos adicionados pelo método 1.

A razão molar entre lipídios e terpenos foi de 1:1 e com apenas 10 μ M de 6-NBD-PC, conseguimos um bom sinal no fluorímetro. Em relação ao DMPC puro, a presença do limoneno desloca para cima a curva da anisotropia, na fase gel da bicamada; ou seja, torna a bicamada mais rígida. Aqui os terpenos foram incorporados na membrana pelo método 1.

Repetimos esses experimentos, desta vez incorporando os terpenos sem a centrifugação, ou seja, adição direta do terpeno na suspensão contendo as vesículas. A razão molar entre DMPC e terpenos continua sendo 1:1, porém a razão

entre a concentração do lipídio e da sonda fluorescente mudou; a Figura 28 a seguir mostra os resultados obtidos:

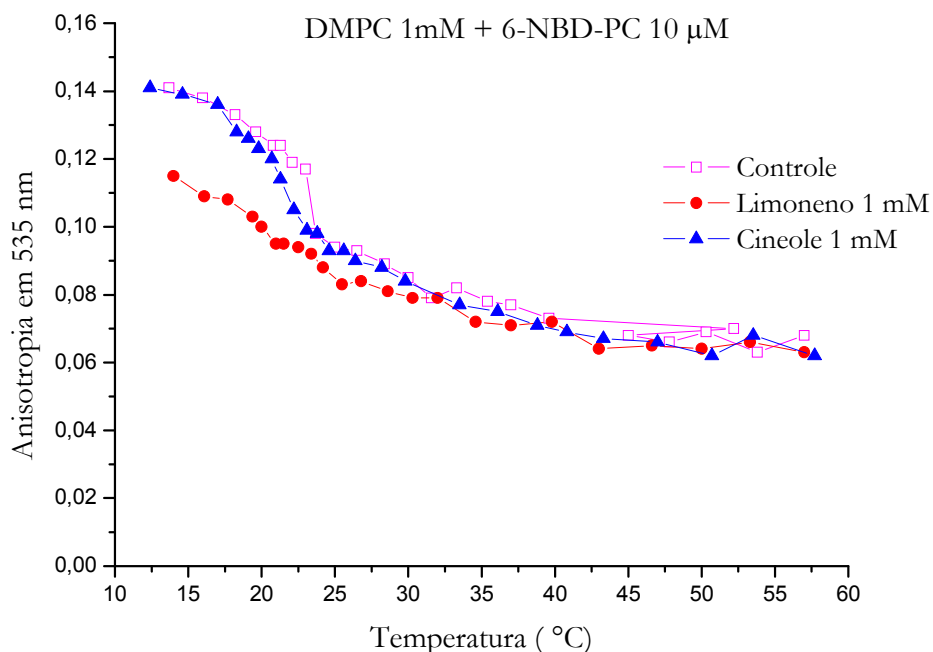


Figura 28: Anisotropia em função da temperatura para amostras com 6-NBD-PC + DMPC. Terpenos adicionados pelo método 2.

Como podemos observar, o limoneno causa alterações nos valores da anisotropia, em relação ao controle e tais alterações são bem visíveis na fase gel da bicamada; no entanto, os valores de anisotropia são menores do que aqueles observados para o controle, contradizendo os resultados mostrados no gráfico da Figura 27. Esses resultados sugerem fortemente que o método de preparação influencia nos resultados.

Para evitar a influência do método de preparação, os experimentos seguintes foram realizados com amostras preparadas com incorporação de terpenos diretamente nas vesículas, após a centrifugação (método 1) e a proporção entre sonda e lipídio foi de 1 mol % (de sonda em relação a lipídio).

3.3 DPH em DMPC

Continuamos o trabalho, utilizando uma terceira sonda fluorescente: o DPH; sugere-se que esta sonda encontra-se totalmente inserida na região apolar da bicamada lipídica, alinhada com as cadeias hidrocarbônicas dos lipídios [26], como mostra a Figura 29 a seguir:

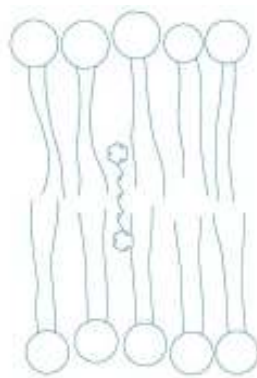


Figura 29: Representação esquemática da posição do DPH em uma bicamada lipídica.

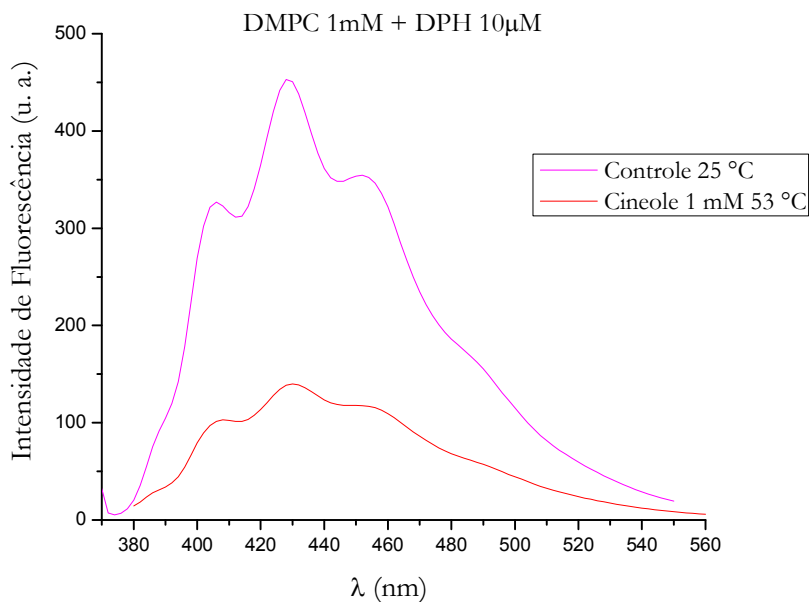


Figura 30: Espectro de emissão do DPH, em DMPC, para a amostra controle e para o cineole, em diferentes temperaturas

Como podemos observar na Figura 30, a presença do terpeno e o aumento da temperatura não causaram deslocamento espectral e somente uma diminuição na intensidade do espectro de emissão do DPH. Esta sonda tem sido amplamente utilizada em estudos das propriedades de membranas de célula, como por exemplo domínios lipídicos [27], eritrócito humano [28], efeitos de sais biliares em vesículas de DPPC [29], interação entre peptídeos hidrofóbicos e vesículas de DMPC [30], etc.

As três bandas observadas no espectro de fluorescência do DPH são provenientes da emissão dos estados S_1 e S_2 do *s-t*-DPH (*s-trans,s-trans*) (bandas de maior energia) e da emissão do estado S_1 do *c-t*-DPH (*s-cis,s-trans*) (banda de menor energia) [21]. Em nossos experimentos, foram monitoradas as anisotropias referentes às duas bandas de maior energia (rotâmero excitado *s-t*-DPH).

Para o DPH, com $\lambda_{EX} = 360 \text{ nm}$ e $\lambda_{EM} = 428 \text{ nm}$, como podemos observar na Figura 31, o limoneno provocou alterações nos valores de anisotropia, em relação ao controle, de maneira mais significativa na fase gel da membrana, em conformidade com o gráfico da Figura 28.

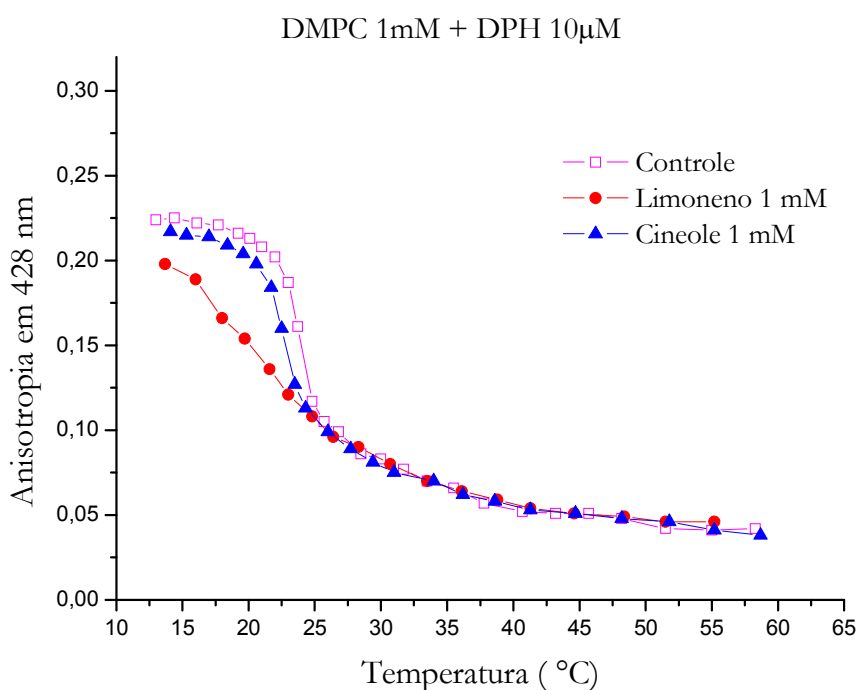


Figura 31: Anisotropia em função da temperatura para amostras de DMPC + DPH .

Dada a diferença nos resultados em função do método de preparação das amostras, optou-se por aquele método onde os terpenos são inseridos no sistema logo após a suspensão com vesículas ter sido centrifugada e o sobrenadante ter sido retirado e reservado. Com essa metodologia, as moléculas de terpeno estariam seguramente inseridas na bicamada lipídica, já que a quantidade de água no sistema é bastante reduzida, evitando uma partição significativa do terpeno nesses dois meios (solução aquosa e bicamada).

Considerando os resultados obtidos com as três sondas fluorescentes, optou-se por dar continuidade ao trabalho utilizando somente o DPH, por estar inserido na região apolar da bicamada e mostrar maior sensibilidade ao efeito causado pela presença dos terpenos.

O restante das medidas foi realizado, no Instituto de Física da UFG.

Resumimos no gráfico a seguir, a transição de fase (monitorada pelo DPH) das bicamadas preparadas com os cinco diferentes tipos de lipídios utilizados neste trabalho:

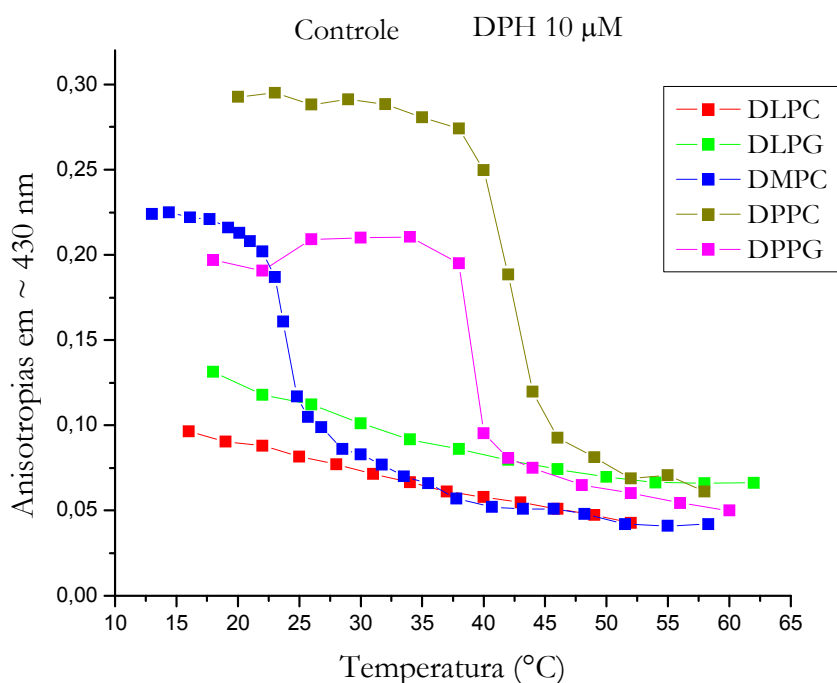


Figura 32: Anisotropia em função da temperatura, para diferentes fosfolipídios, sem adição de terpenos.

Cadeias graxas de comprimentos mais longos apresentam transição de fase em temperaturas maiores (DPPG e DPPC). O DMPC transiciona em uma

temperatura intermediária, enquanto que DLPC e DLPG já se apresentam na fase líquido-cristalina, no intervalo de temperaturas em que foram realizadas essas medidas, pois suas temperaturas de transição são bastante baixas (negativas).

Os valores de anisotropia do DPH são maiores que aqueles observados para o Ahba ou o 6-NBD-PC; ressaltamos que, para um mesmo meio, o valor da anisotropia estática é uma característica intrínseca de cada sonda fluorescente; no entanto, nestes experimentos estamos interessados em resultados qualitativos.

3.4DPH em DLPC

Como pode ser visto na Figura 33, o espectro de emissão do DPH apresenta três picos principais de intensidade. Dessa forma realizamos experimentos para adquirir os espectros de emissão e medir a anisotropia em comprimentos de onda na região dos picos, com uma amostra controle (ausência de terpenos) e na presença do limoneno e do cineole. Em vesículas de DLPC para a amostra controle e com adição dos terpenos, podemos observar que o aumento da temperatura do sistema apenas diminui a intensidade de fluorescência, sem causar deslocamento espectral. Observamos ainda que a presença dos terpenos no sistema não provoca alterações no espectro de emissão da sonda fluorescente (Figuras 34 e 35).

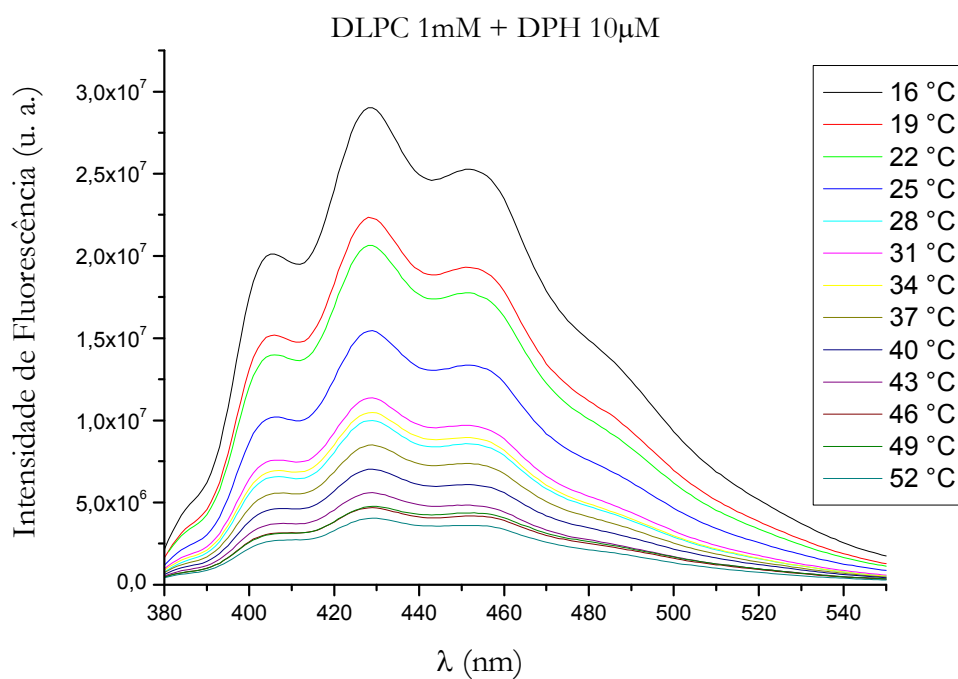


Figura 33: Espectro de emissão do DPH, em DLPC, para diferentes temperaturas.

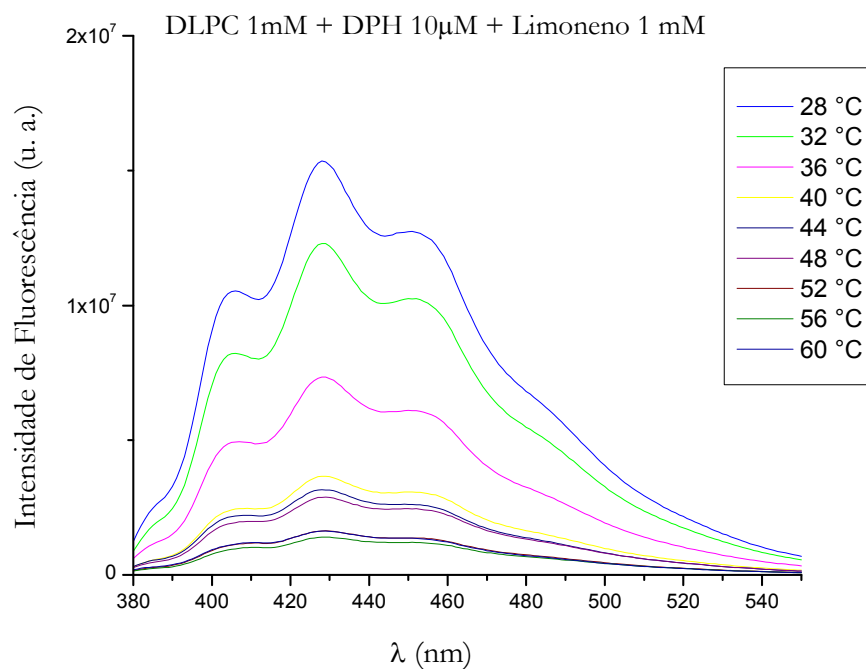


Figura 34: Espectro de emissão do DPH, em DLPC, para diferentes temperaturas, na presença do limoneno.

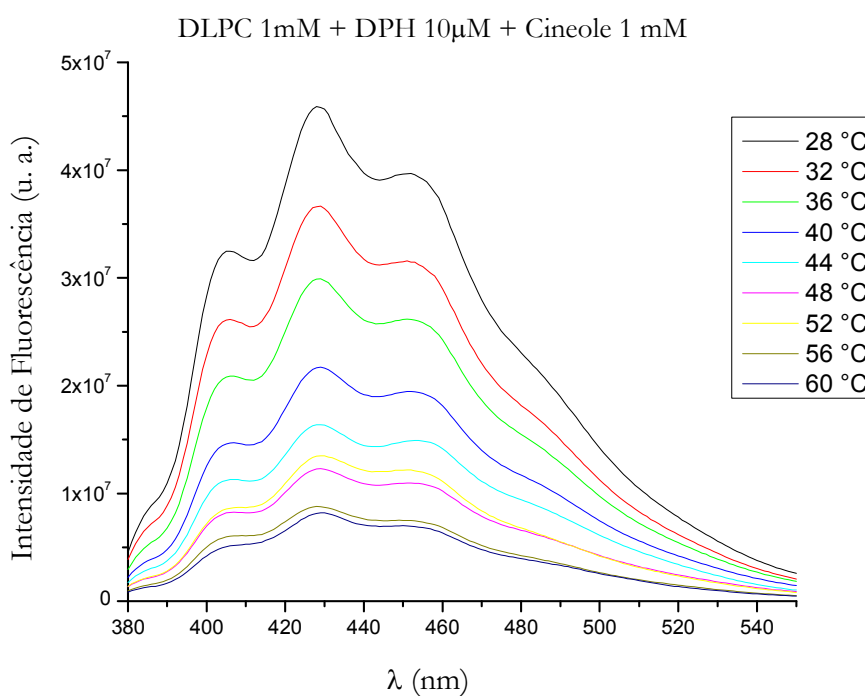


Figura 35: Espectro de emissão do DPH, em DLPC, para diferentes temperaturas, na presença do cineole.

As vesículas de DLPC possuem cadeias hidrocarbônicas com 12 carbonos cada e temperatura de transição em torno de -1 °C, assim, as medidas foram realizadas com as vesículas na fase líquido-cristalina, com a temperatura variando de 15 °C a 65 °C. A anisotropia foi medida em dois picos de emissão: $\lambda_{EM} = 412$ nm e $\lambda_{EM} = 436$ nm. Como podemos observar nas Figuras 36, a seguir, o limoneno provocou alterações nos valores de anisotropia, em relação ao controle, de maneira mais significativa que o cineole.

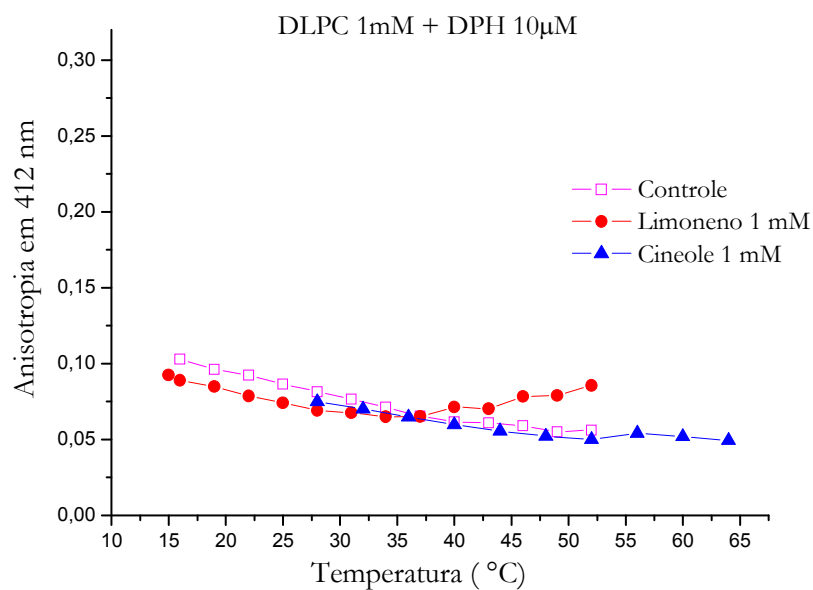


Figura 36: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DLPC, $\lambda_{EM} = 412 \text{ nm}$

Em 436 nm, como podemos observar, na Figura 37, a seguir, não há mudanças significativas na anisotropia do DPH em presença destes terpenos, neste intervalo de temperatura.

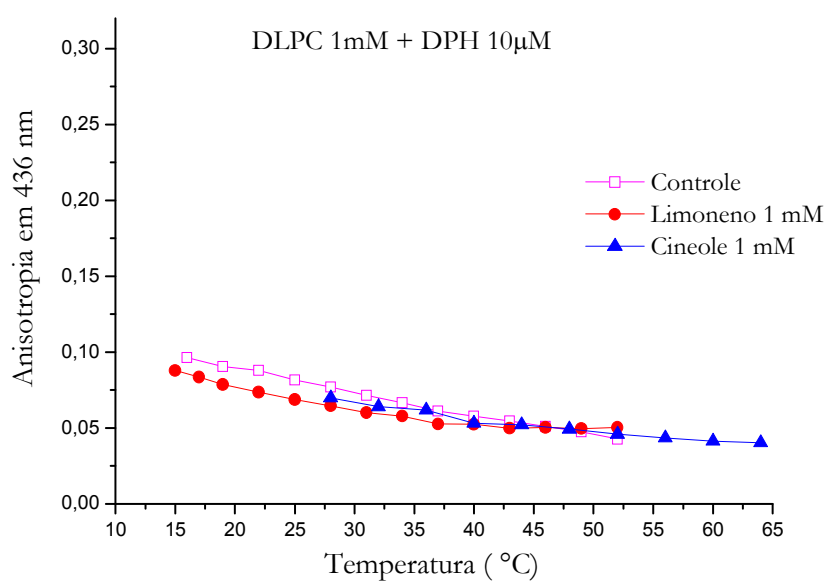


Figura 37: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DLPC, com $\lambda_{EM} = 436 \text{ nm}$

A pequena alteração nos valores de anisotropia, em relação ao comprimento de onda em que são observados, pode ser atribuída ao fato de serem emissões provenientes de diferentes estados eletrônicos do DPH [21]. No entanto, embora haja transições diferentes, na média a anisotropia estática destas duas bandas reflete igualmente a transição de fase da bicamada.

3.5DPH em DPPC

As vesículas de DPPC possuem cadeias hidrocarbônicas com 16 carbonos cada e temperatura de transição em torno de 41 °C, deste modo, variando a temperatura da amostra entre 18 °C a 60 °C, foram realizadas medidas com as vesículas na fase gel, líquido-cristalina e durante a transição de fase. A anisotropia foi medida em dois picos de emissão: $\lambda_{EM} = 404 \text{ nm}$ e $\lambda_{EM} = 426 \text{ nm}$.

Para o DPPC foram feitas duas amostras contendo limoneno: uma na proporção terpeno:lipídio de 1:1 e outra com proporção de 0,5:1, uma amostra com cineole na proporção 1:1, além da amostra controle. As Figuras 38, 39, 40 e 41 a seguir apresentam os espectros de emissão para cada amostra e, como podemos observar, a presença do terpeno e o aumento da temperatura, não provocam deslocamento espectral e também não alteram a forma do espectro.

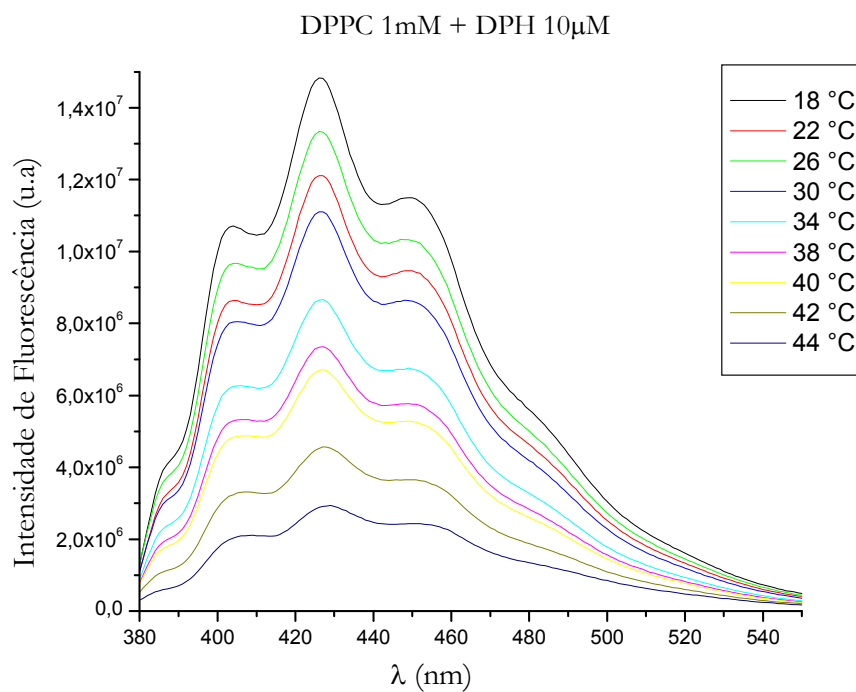


Figura 38: Espectro de emissão do DPH, em DPPC, para diferentes temperaturas.

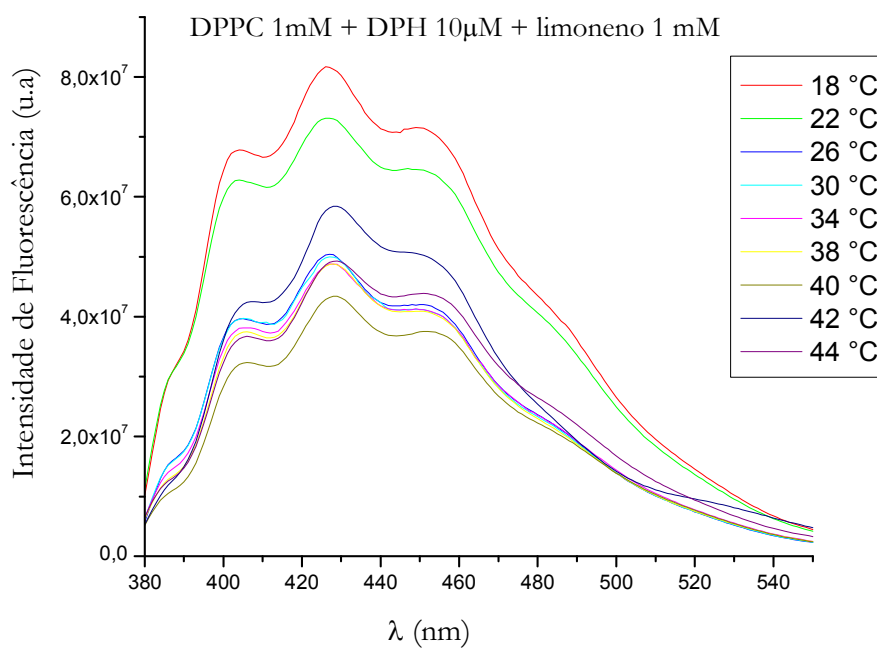


Figura 39: Espectro de emissão do DPH, em DPPC, para diferentes temperaturas, na presença do limoneno 1 mM.

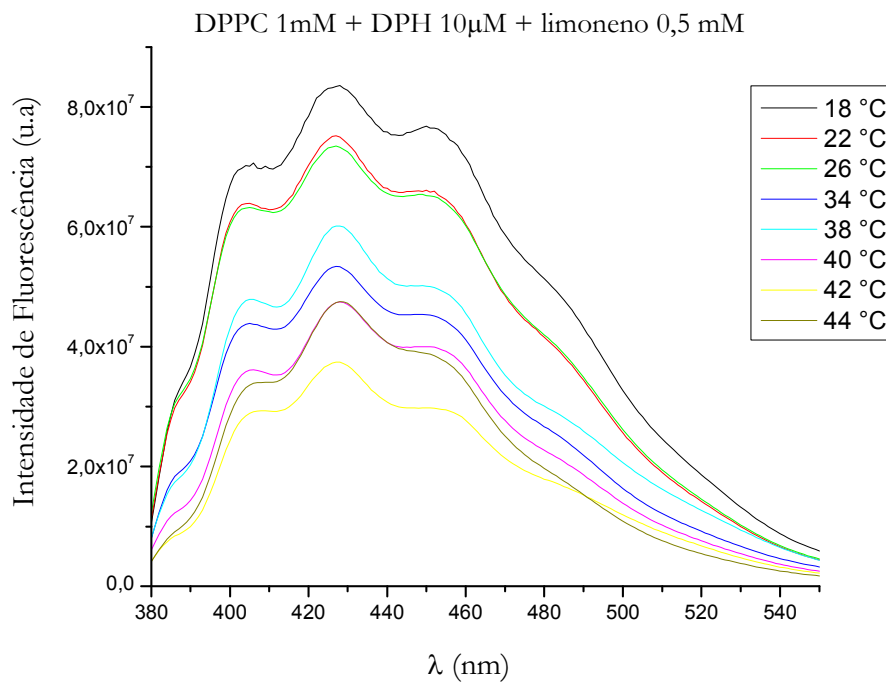


Figura 40: Espectro de emissão do DPH, em DPPC, para diferentes temperaturas, na presença do limoneno 0,5 mM.

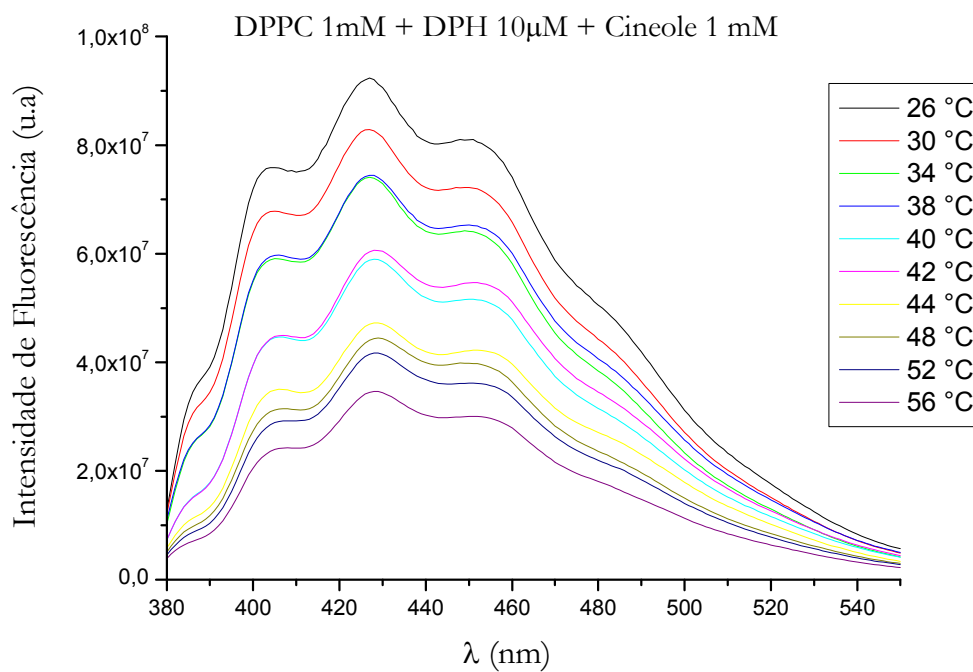


Figura 41: Espectro de emissão do DPH, em DPPC, para diferentes temperaturas, na presença do cineole.

A seguir são apresentados os gráficos das anisotropias para essas amostras. Como podemos observar nas Figuras 42 e 43, os terpenos provocaram alterações significativas nos valores de anisotropia, em relação ao controle, na fase gel da membrana. Ao compararmos as duas amostras com limoneno, podemos observar que elas alteraram de maneira semelhante o comportamento da transição, assim como os valores de anisotropia. O que nos leva a concluir que parte do limoneno acrescentado, estava na solução aquosa, pois, se com a metade da concentração obtivemos o mesmo efeito, significa que as membranas já haviam incorporado uma certa quantidade de limoneno.

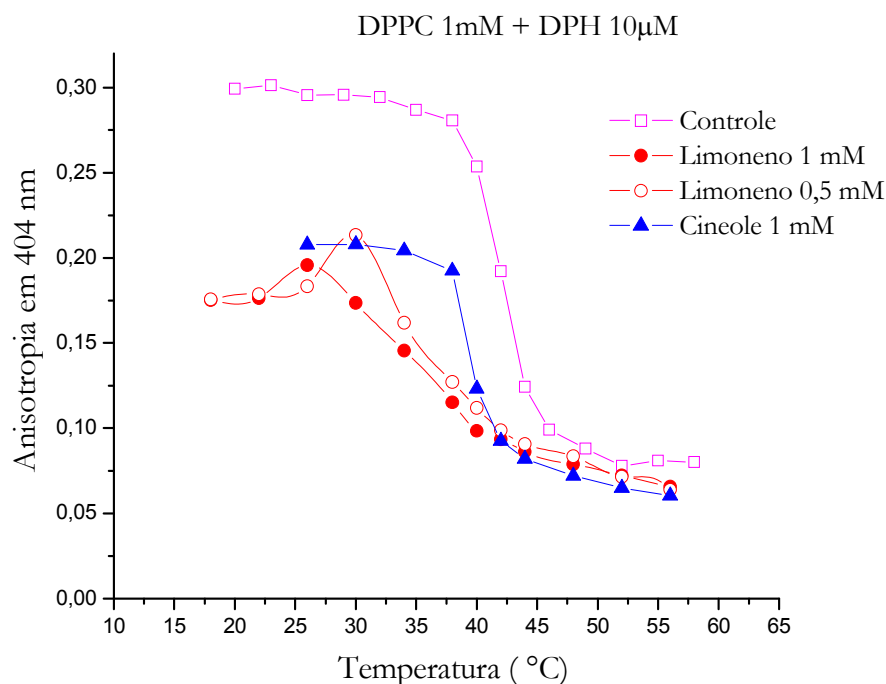


Figura 42: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DPPC, com $\lambda_{EM} = 404 \text{ nm}$

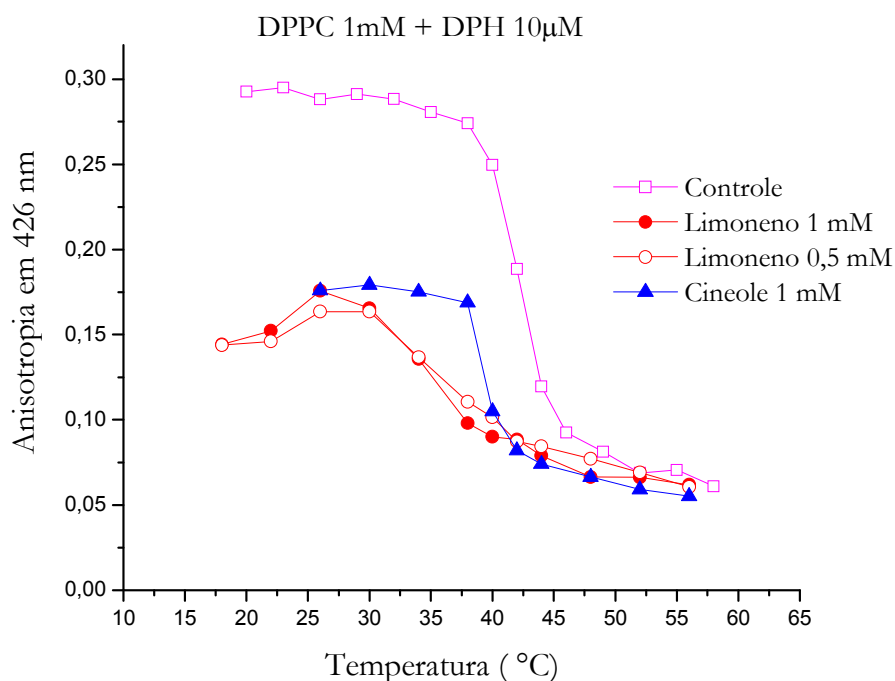


Figura 43: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DPPC, com $\lambda_{EM} = 426 \text{ nm}$

Observamos que para o DPPC, tanto o limoneno quanto o cineole fluidificam a fase gel da bicamada e facilitam a transição para a fase fluída; o fato de a anisotropia não se alterar após a transição de fase nos permite concluir que a presença dos terpenos não é sentida na fase fluída, possivelmente pela maior movimentação das cadeias graxas e seu menor grau de organização. Esse resultado está de bom acordo com a literatura, pois Anjos & Alonso (2008) mostraram através de experimentos de RPE que, em vesículas de DPPC, na razão molar terpeno:DPPC de 0,75:1, o cineole e o limoneno aumentam a fluidez da bicamada lipídica na fase gel, alterando inclusive a temperatura de transição de fase de 42°C para aproximadamente 33°C.

3.6DPH em DLPG

As vesículas de DLPG, assim como o DLPC, possuem cadeias hidrocarbônicas com 12 carbonos cada, porém possuem carga líquida negativa. Sua temperatura de transição é em torno de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e como as medidas foram realizadas com a temperatura variando entre $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $66\text{ }^{\circ}\text{C}$, as vesículas estavam em seu estado líquido-cristalino. A anisotropia foi medida em dois picos de emissão: $\lambda_{EM} = 405\text{ nm}$ e $\lambda_{EM} = 428\text{ nm}$ e como podemos observar nas Figuras 44, 45 e 46 a seguir, a presença do terpeno não muda o espectro e o aumento da temperatura apenas diminui a intensidade de emissão, não causando deslocamento espectral.

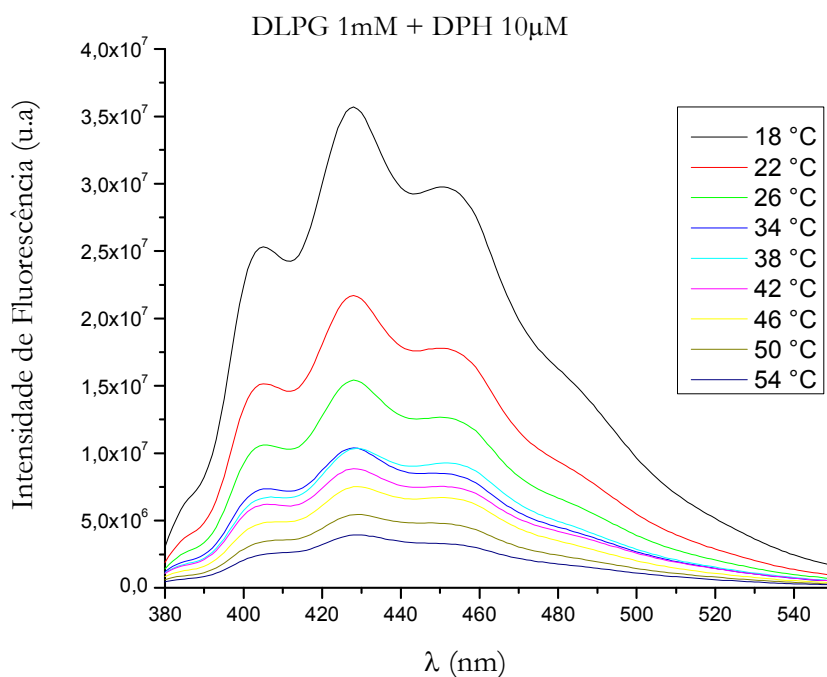


Figura 44: Espectro de emissão do DPH, em DLPG, para diferentes temperaturas.

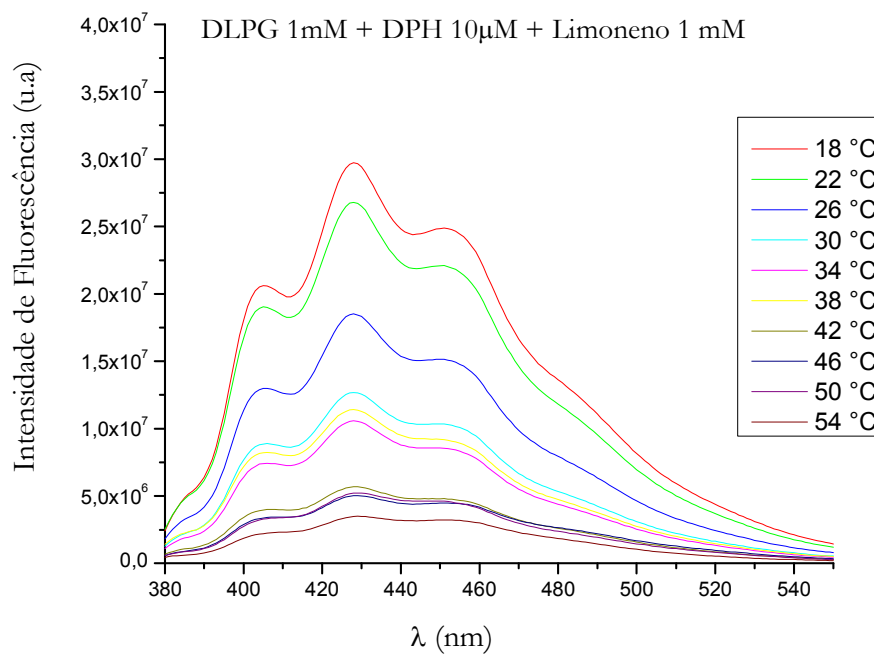


Figura 45: Espectro de emissão do DPH, em DLPG, para diferentes temperaturas, na presença do limoneno.

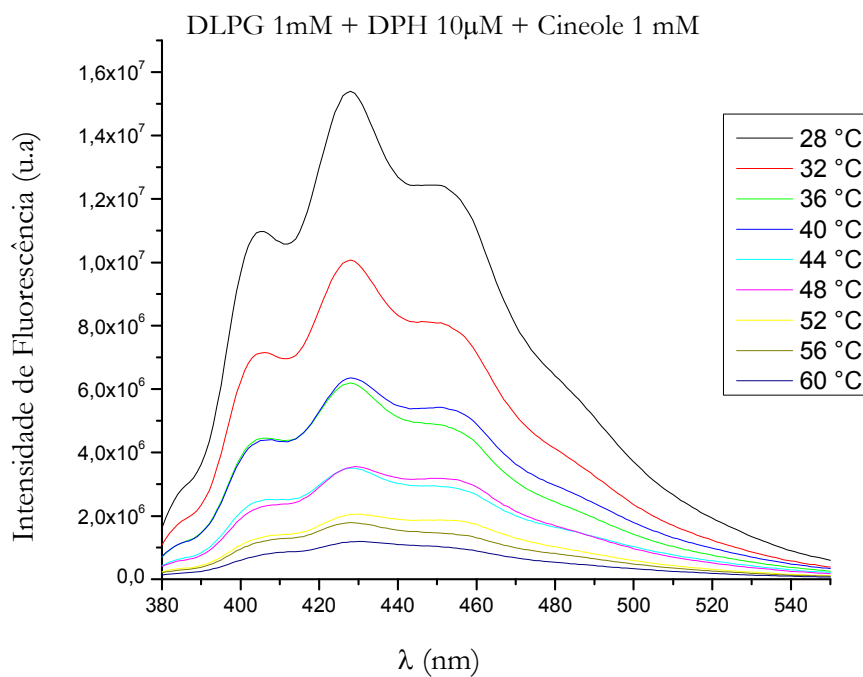


Figura 46: Espectro de emissão do DPH, em DLPG, para diferentes temperaturas, na presença do cineole.

Mesmo estando na fase líquido-cristalina, podemos observar nas Figuras 47 e 48 a seguir que o limoneno diminuiu consideravelmente a fluidez da bicamada lipídica, ao comparar com os resultados obtidos para o DLPC. Podemos observar também que o limoneno se mostrou mais eficaz do que o cineole.

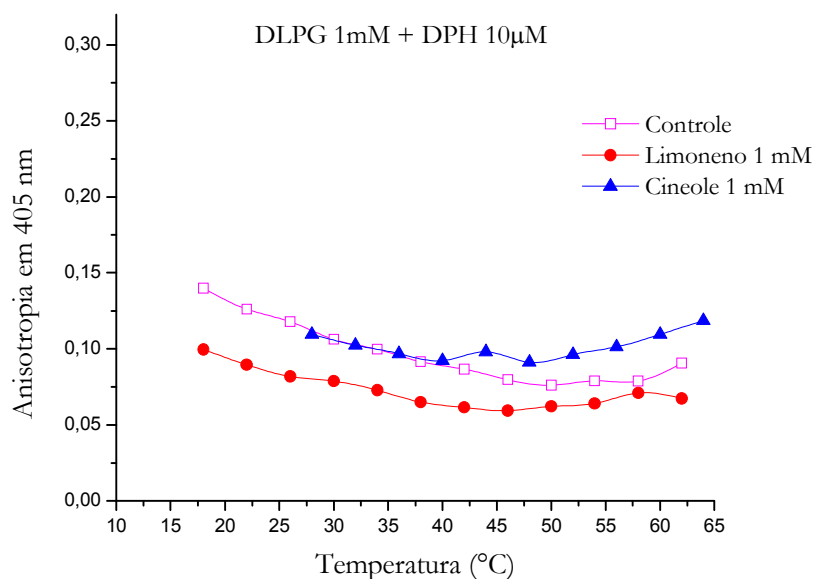


Figura 47: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DLPG, com $\lambda_{EM} = 405 \text{ nm}$.

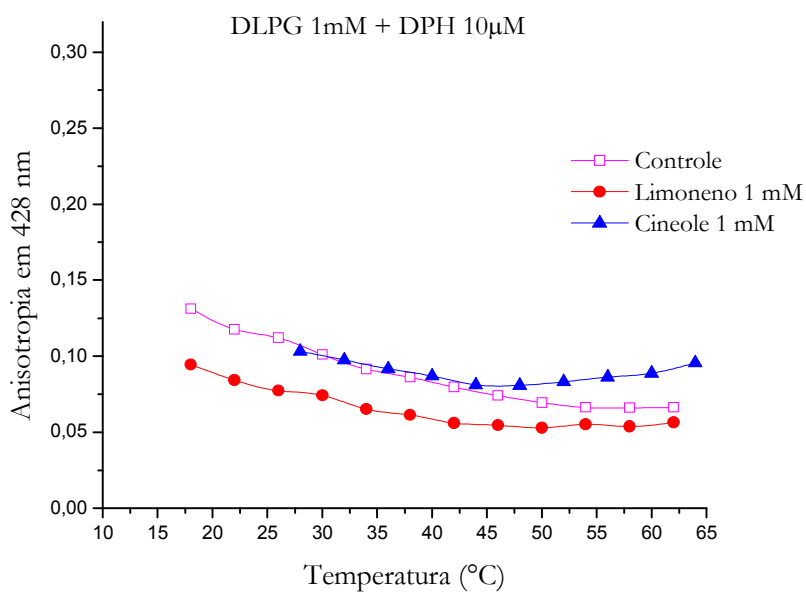


Figura 48: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DLPG, com $\lambda_{EM} = 428 \text{ nm}$.

3.7 DPH em DPPG

Repetimos as medidas para o DPPG, que assim como o DPPC, possui cadeias hidrocarbônicas com 16 carbonos cada, mas com carga líquida negativa. Sua temperatura de transição é de 41 °C e as anisotropias foram medidas entre 16 °C e 60 °C, compreendendo assim, suas fases líquido-cristalina, gel e durante a transição de fase. São mostrados a seguir, nas Figuras 49, 50 e 51, os espectros de emissão do DPH em DPPG.

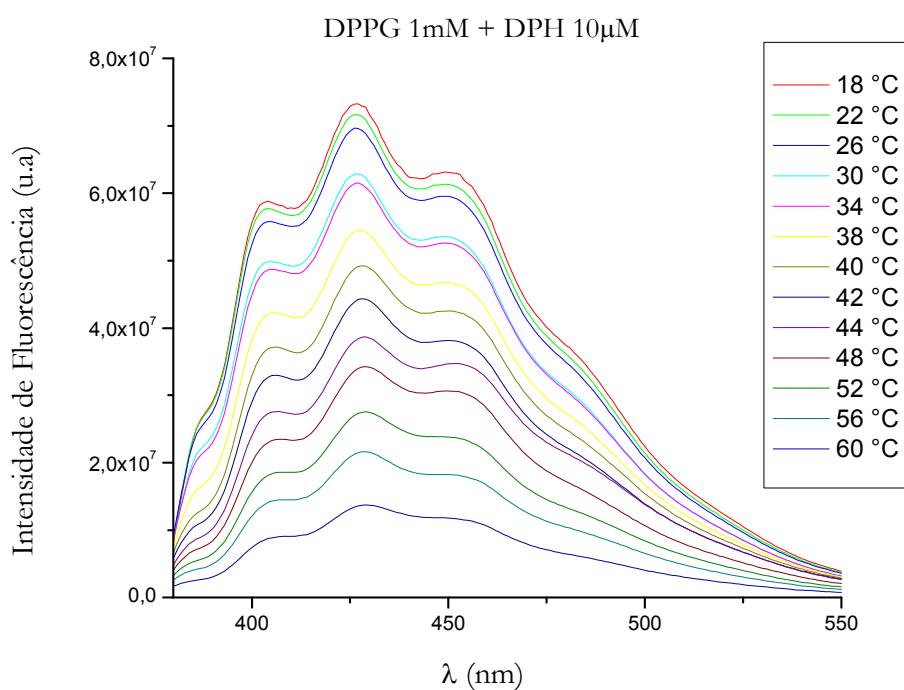


Figura 49: Espectro de emissão do DPH, em DPPG, para diferentes temperaturas.

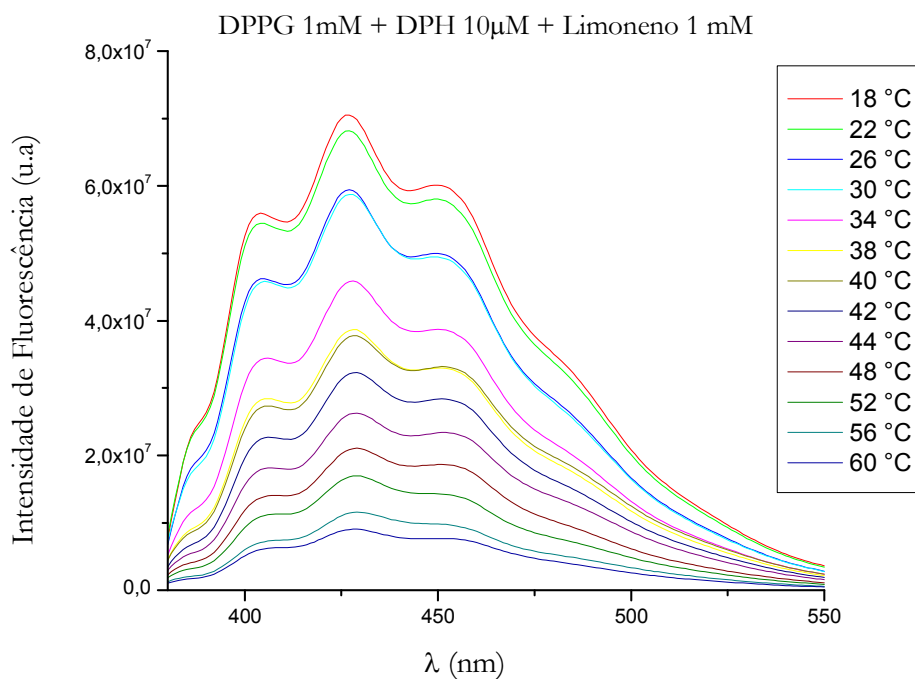


Figura 50: Espectro de emissão do DPH, em DPPG, para diferentes temperaturas, na presença do limoneno.

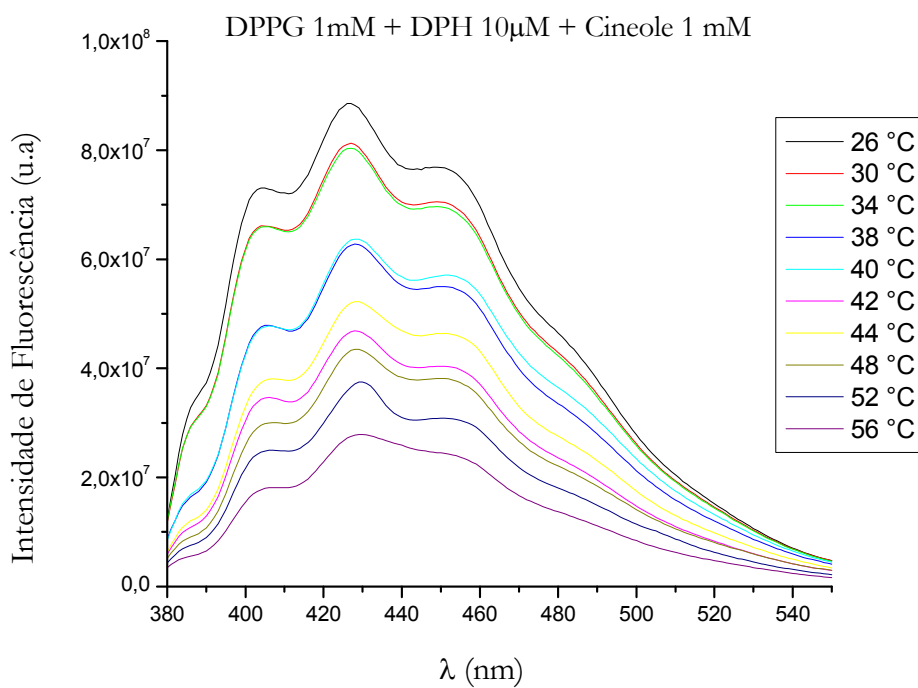


Figura 51: Espectro de emissão do DPH, em DPPG, para diferentes temperaturas, na presença do cineole.

Diferentemente do DPPC, onde os terpenos causavam uma alteração consideravelmente grande na fase gel, no DPPG observamos uma leve diminuição da anisotropia na fase gel e considerável deslocamento na transição de fase, como pode ser visto nas Figuras 52 e 53. As anisotropias foram medidas em $\lambda_{EM} = 404 \text{ nm}$ e $\lambda_{EM} = 426 \text{ nm}$.

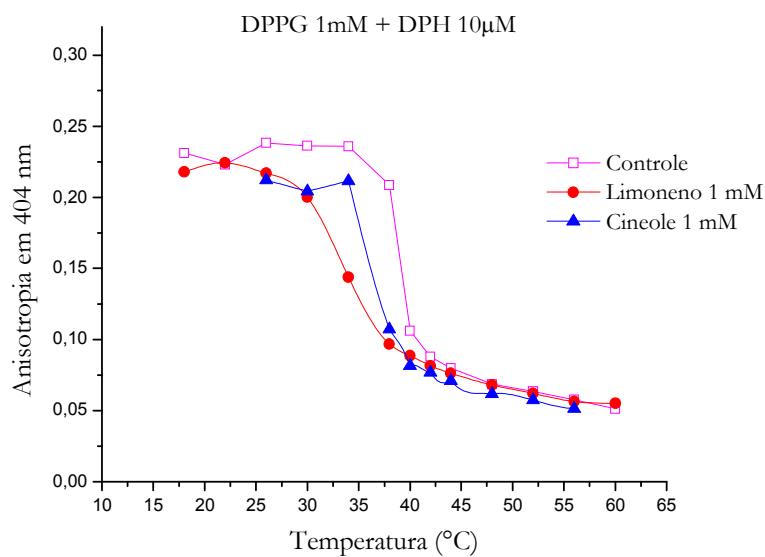


Figura 52: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DPPG, com $\lambda_{EM} = 404 \text{ nm}$.

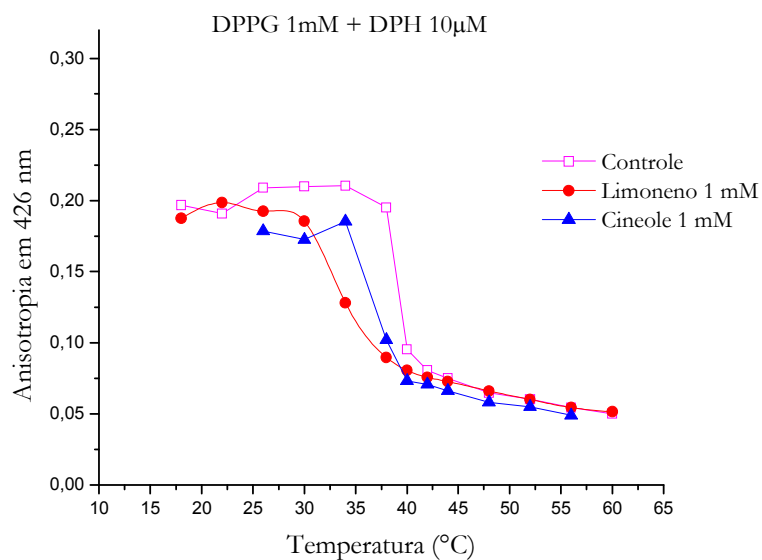


Figura 53: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DPPG, com $\lambda_{EM} = 426 \text{ nm}$.

Todos esses resultados, analisados conjuntamente, sugerem que o cineole não promove alterações significativas na fluidez da bicamada lipídica, pelo menos na razão molar terpeno:lipídio de 1:1, para os fosfolipídios de cadeias menores: DMPC, DLPC e DLPG; em DPPC e DPPG o cineole promoveu alteração na temperatura de transição, bem como ligeira diminuição da rigidez na fase gel.

Já o limoneno, nesta mesma razão molar, mostrou interagir com a membrana para todos os lipídios utilizados, exceto DLPC, alterando de modo significativo os valores de anisotropia. Sendo tais alterações na direção de valores de anisotropia menores em relação ao controle, conclui-se que o ambiente ao redor da sonda se tornou mais fluido, refletindo maior mobilidade da membrana lipídica; ambos os compostos (limoneno e cineole) provocaram esse efeito (diminuição da anisotropia) de forma mais efetiva na fase gel.

Para o DMPC foi observada uma alteração no comportamento da transição de fase, em presença do limoneno. Já para o DPPG e DPPC, ambos os terpenos provocaram a diminuição da temperatura de transição de fase; no DPPG a fluidez da fase gel foi pouco alterada, enquanto que para o DPPC observou-se grande fluidificação nesta fase.

A diminuição da rigidez durante a fase gel, para DMPC (limoneno), DPPC (limoneno e cineole), DLPG (limoneno) e DPPG (fracamente, limoneno e cineole) indica que a presença de moléculas de terpeno altera o grau de ordenação das cadeias graxas, ou seja, diminui a ordem com que estão empacotadas tais cadeias, permitindo que o fluoróforo ali inserido sinta um ambiente de maior fluidez. Esse mesmo efeito seria também responsável pelo deslocamento (para temperaturas menores) da transição de fase nas bicamadas de DPPG e DPPC.

Como exceção do DLPG, os valores de anisotropia na fase fluida não foram significativamente alterados; é possível que o grau de ordenamento das cadeias graxas (que agora é bem menor) permita aos terpenos se movimentarem livremente na região apolar sem serem percebidos pelos fosfolipídios. De qualquer forma, a área por lipídio aumenta quando a bicamada está na fase fluida e isso faz com o que moléculas da dimensão destes terpenos não sejam sentidas pela bicamada.

3.8 Tiossemicarbazonas

Na última etapa deste trabalho, realizamos alguns experimentos com dois compostos da classe das tiossemicarbazonas: o *m-Nitro* e o *p-Dimetil*. Tais compostos foram gentilmente cedidos pela prof^a Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira (IQ – UFG). Realizamos assim, os primeiros testes com essas moléculas em presença de vesículas fosfolipídicas; o objetivo é verificar se há interação com membranas modelo. O estudo foi feito através da anisotropia de fluorescência, tendo o DPH como sonda. Utilizamos o DPPC como fosfolipídio, pois, como sua temperatura de transição é em torno de 41 °C, podemos observar como estes compostos atuam na fase gel, na fase líquido-cristalina e durante a transição de fase. Como pode ser observado na Figura 54 abaixo, o *m-Nitro* não alterou a forma do espectro de emissão do DPH, enquanto que para o *p-Dimetil*, Figura 55, o espectro de emissão sofreu grandes alterações.

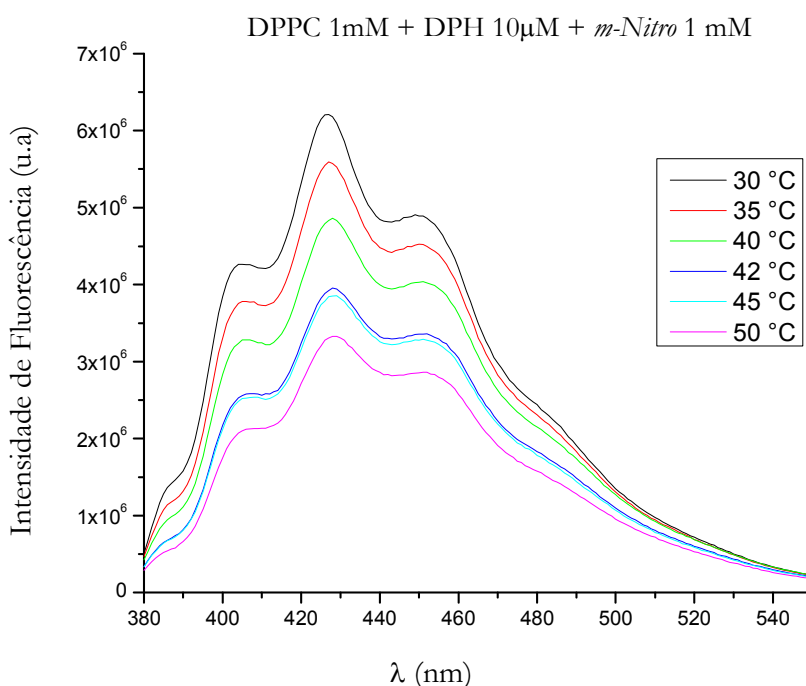


Figura 54: Espectro de emissão do DPH, em DPPC, para diferentes temperaturas, na presença do *m-Nitro*.

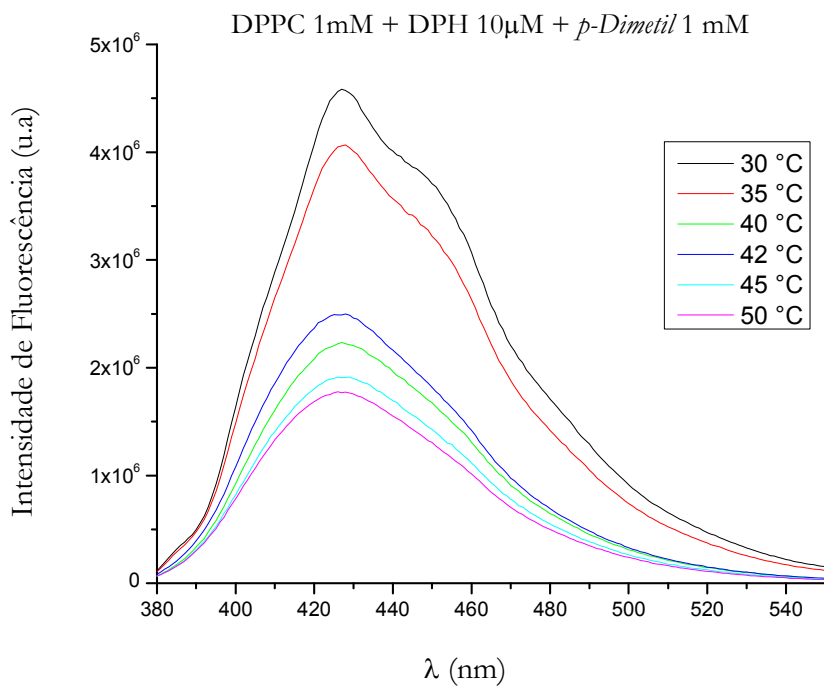


Figura 55: Espectro de emissão do DPH, em DPPC, para diferentes temperaturas, na presença do *p*-Dimetil.

Ao observarmos os valores da anisotropia mostrados nos gráficos da Figura 56 a seguir, podemos observar que o *m*-Nitro alterou a forma da curva de transição de fase, pelo menos nas temperaturas medidas. Enquanto isso para o *p*-Dimetil, nas temperaturas medidas, observa-se uma espécie de patamar de valores intermediários de anisotropia.

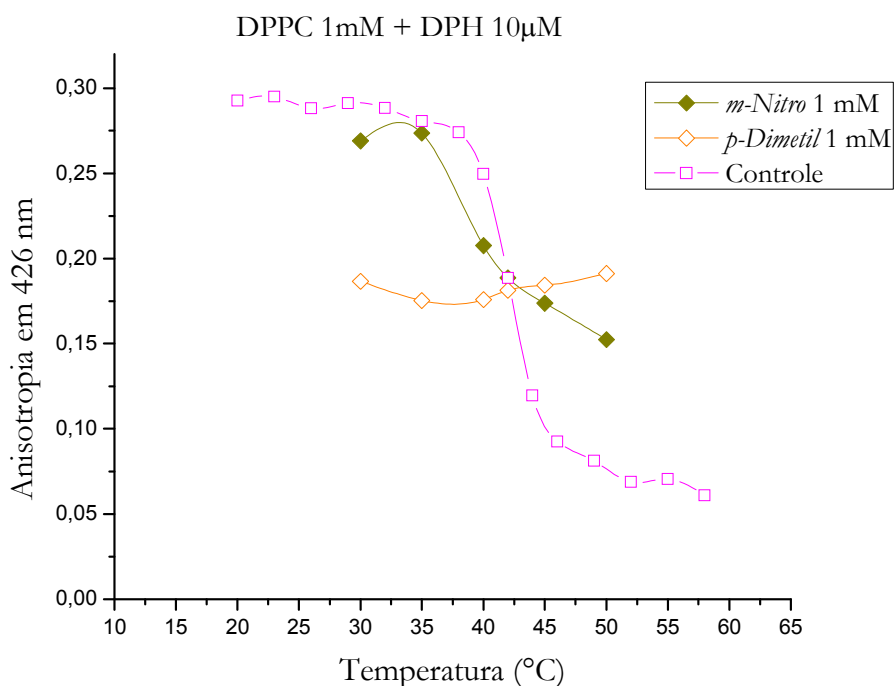


Figura 56: Anisotropia em função da temperatura para amostras com DPH + DPPC, com $\lambda_{EM} = 426 \text{ nm}$, na presença dos *m-Nitro* e *p-Dimetil*.

Tanto o espectro de emissão (Figura 55) quanto os valores de anisotropia, sugerem que, em presença do *p-Dimetil* o DPH não se encontra inserido na bicamada; a possibilidade é que a vesícula tenha se desintegrado, restando na solução fragmentos de bicamada; o DPH, neste caso, estaria na solução, formando agregados consigo mesmo. Essa agregação poderia justificar uma forma tão diferente do espectro de emissão.

Tais resultados, no entanto, são pouco conclusivos: observa-se que ambos os compostos interagiram com a membrana, mas os efeitos provocados pela presença do *p-Dimetil* são pouco claros. Diversos outros experimentos poderiam ser realizados com a finalidade de permitir a compreensão do que está ocorrendo; por exemplo, explorar a agregação do DPH em solução aquosa. Na literatura, pouco é discutido sobre DPH em soluções aquosas. Graceto 2010, 2011 mostraram apenas o espectro de absorção do DPH em misturas etanol/água. Desta maneira, apenas iniciamos aqui o estudo da interação destes compostos com membranas modelo.

4. CONCLUSÕES

A partir dos espectros de emissão fluorescente das sondas lipofílicas Ahba, 6-NBD-PC e DPH em vesículas fosfolipídicas, foi observado que a presença de terpenos no sistema não altera a forma do espectro e tão pouco causa deslocamentos espectrais. Para o 6-NBD-PC e para o DPH, a intensidade de fluorescência diminui consideravelmente com o aumento da temperatura; já a emissão fluorescente do Ahba é pouco sensível a mudanças na temperatura do sistema.

Das medidas de anisotropia estática do sistema Ahba+DMPC+terpenos, sendo, tal sistema, preparado por diferentes metodologias, concluiu-se que o método de incorporação dos terpenos nos sistemas membrana/sonda influencia nos resultados, pois não se pode controlar precisamente a quantidade de terpeno que foi incorporada na bicamada; a metodologia escolhida para o preparo das amostras foi aquela onde a solução contendo vesículas é centrifugada e o sobrenadante é retirado e reservado e só então é adicionada a quantidade desejada de terpenos. Em uma solução de vesículas muito concentrada, a partição do terpeno na solução aquosa seria praticamente nula.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos com as três diferentes sondas, optou-se por prosseguir os estudos com o DPH, que está inserido na região apolar da bicamada e mostrou maior sensibilidade aos efeitos causados pelos terpenos na fluidez da bicamada.

O cineole provocou efeitos significativos nas vesículas cujos fosfolipídios apresentam cadeias graxas mais longas (DPPG e DPPC) diminuindo a temperatura de transição de fase e fluidificando a fase gel, principalmente no DPPC. Para os demais lipídios, não foram observadas alterações na anisotropia, em relação à amostra controle.

O limoneno apresentou interação com todos os fosfolipídios, exceto DLPC, no intervalo de temperatura estudado (15°C a 65°C). Na fase líquido-cristalina, somente no DLPG foi observada a diminuição da anisotropia, ou seja, a bicamada ficou ainda mais fluida com a presença do limoneno. Para os demais lipídios, foi observada a fluidificação da fase gel, com efeito mais pronunciado no DPPC. Nos lipídios de

cadeias mais longas (DPPG, DPPC e DMPC) o limoneno também alterou para valores menores a temperatura de transição de fase, de maneira mais significativa que o cineole. Esses resultados mostram que os terpenos interagem com a bicamada no momento em que as cadeias graxas estão em um grau de maior ordenamento (fase gel), podendo provocar espaçamentos entre as cadeias graxas, favorecendo a diminuição da rigidez do meio e permitindo maior liberdade de movimento da sonda fluorescente (anisotropias menores). Já na fase fluida, a área ocupada por cada fosfolipídio é maior e as cadeias hidrocarbônicas se movimentam mais, diminuindo o empacotamento, fazendo com que a presença dos terpenos não influencie na rigidez do meio.

Quanto às cargas dos grupos polares dos fosfolipídios (PG negativos e PC *zwitteriônicos*), observamos que em DPPC a fluidificação da fase gel foi bem maior que no DPPG; e no DLPG foi observada pequena fluidificação da fase líquido-cristalina em presença do limoneno, enquanto que nenhum efeito foi observado no DLPC, nesta mesma fase. Tais resultados mostram que não se pode estabelecer uma correlação direta entre a carga líquida dos fosfolipídios e mudanças na fluidez da membrana devido aos terpenos.

Resultados preliminares mostraram que os dois compostos da classe das tiossemicarbazonas aqui estudados (*m*-Nitro e *p*-Dimetil) interagem fortemente com vesículas de DPPC, na proporção terpeno:lipídio de 1:1, podendo até ter ocorrido a desintegração da vesícula em presença do *p*-Dimetil, dada a forma do espectro do DPH e os valores constantes da anisotropia. Somente o prosseguimento destes estudos permitirá uma melhor compreensão das interações entre tiossemicarbazonas e membranas modelo.

5. BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, M. P.; ROYER, C. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 45-49, 1997.
2. HOF, M.; HUTTERER, R.; FIDLER, V. **Fluorescence Spectroscopy in Biology**. [S.I.]: Springer, 2005.
3. VAN HOLD, K. E. **Bioquímica Física**. São Paulo: Edgard , 1975.
4. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3ª. ed. [S.I.]: Springer, 2006.
5. VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**. [S.I.]: Wiley-VCH, 2002.
6. VENTUROLI, M. et al. **Physics Reports**, v. 437, p. 1-54, 2006.
7. WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603-618, 2004.
8. VADDI, H. K. et al. **Journal of Controlled Release**, v. 81, p. 121-133, 2002.
9. ANJOS, J. L. V.; ALONSO, A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 103-112, 2008.
10. FEUN, L. et al. **Cancer chemother Pharmacol**, v. 50, p. 223-229, 2002.
11. TEITZ, Y. et al. **Antiviral Research**, v. 24, p. 305-314, 1994.
12. KASUGA, N. C. et al. **Journal of Inorganica Biochemistry**, v. 96, p. 298-310, 2003.
13. LIBERTA, A. E.; WEST, D. X. **Biometals**, v. 5, p. 121-126, 1992.
14. SILVA, A. et al. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 45, p. 2987-2993, 2010.
15. TENÓRIO, R. P. et al. **Química Nova**, v. 28, p. 1030-1037, 2005.
16. BROWN, B. S. **Biological Membranes**. 1. ed. [S.I.]: Portland Press, 1996.
17. MARQUEZIN, C. A. et al. **Biophysical Chemistry**, v. 124, p. 125-133, 2006.
18. LOURA, L. M. S.; RAMALHO, J. P. P. **Biochimica et Biophysica Acta** , v. 1768,

- p. 467-478, 2007.
19. RAGHURAMAN, H.; SHRIVASTAVA, S.; CHATTOPADHYAY, A. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1258-1267, 2007.
 20. JAIN, B.; DAS, K. **Chemical Physics Letters**, v. 433, p. 170-174, 2006.
 21. TUREK, A. M. et al. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, p. 293-303, 2005.
 22. DUPUY, B.; MONTAGU, M. **The Analyst**, v. 122, p. 783-786, 1997.
 23. HOPE, M. J. et al. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 812, p. 55-65, 1985.
 24. BAATZ, J. E. et al. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 60, p. 163-178, 1991.
 25. JOHN, K. et al. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 3315-3323, 2002.
 26. REPÁKÓVÁ, J. et al. **Journal of Physics and Chemistry**, v. 108, p. 13438-13448, 2004.
 27. BOTCHWAY, S. W.; LEWIS, A. M.; STUBBS, C. D. **European Biophysics Journal**, v. 40, p. 131-141, 2011.
 28. MARCZAK, A. **Bioelectrochemistry**, v. 74, p. 236-239, 2009.
 29. SUBUDDHI, U.; MISHRA, A. K. **Journal of Chemical Sciences**, v. 119, p. 169-174, 2007.
 30. SHOBINI, J.; MISHRA, A. K. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 56, p. 2239-2248, 2000.
 31. GRACETTO, A. C. et al. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1497-1502, 2010.
 32. GRACETTO, A. C. et al. **Applied Spectroscopy**, v. 65, p. 168A-188A; 565-697, 2011.