

SIMULAÇÃO DE ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE) ATRAVÉS DO PROGRAMA NLSL

Carlos Ernesto Garrido Salmon

Departamento de Física, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, 49100-000 São Cristóvão - SE, Brasil

Diógenes de Sousa Neto

Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP. Departamento de Física e Informática, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Marcel Tabak*

Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Antonio José da Costa Filho

Departamento de Física e Informática, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 369, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 17/8/06; aceito em 8/12/06; publicado na web em 6/8/07

SIMULATION OF ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE (EPR) SPECTRA USING THE NON-LINEAR LEAST SQUARES PROGRAM NLSL. EPR users often face the problem of extracting information from frequently low-resolution and complex EPR spectra. Simulation programs that provide a series of parameters, characteristic of the investigated system, have been used to achieve this goal. This work describes the general aspects of one of those programs, the NLSL program, used to fit EPR spectra applying a nonlinear least squares method. Several motion regimes of the probes are included in this computational tool, covering a broad range of spectral changes. The meanings of the different parameters and rotational diffusion models are discussed. The anisotropic case is also treated by including an orienting potential and order parameters. Some examples are presented in order to show its applicability in different systems.

Keywords: EPR simulations; slow motion regime; NLSL.

INTRODUÇÃO

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) tem sido largamente utilizada no estudo não somente de espécies intrinsecamente paramagnéticas, tais como metaloproteínas e metaloporfirinas, mas também de radicais livres intermediários formados em reações bioquímicas. Muitas aplicações encontram-se descritas nos vários volumes da série *Biological Magnetic Resonance*, dedicada à ressonância magnética em geral, que abrange RPE e RMN (ressonância magnética nuclear), editada por Berliner e Reuben, na qual os trabalhos relacionados nos volumes dedicados à RPE servem para dar uma boa idéia da contribuição desta técnica ao estudo de sistemas biológicos¹. Entretanto, grande parte dos sistemas biológicos de interesse não apresenta centros paramagnéticos, tornando-se necessária a utilização de sondas específicas, usualmente conhecidas como marcadores de spin. Estas sondas são amplamente empregadas devido à grande sensibilidade do espectro de RPE à sua mobilidade, bem como à extraordinária estabilidade química do fragmento paramagnético (radical nitroxídeo), mesmo quando submetido a condições extremas de pH e temperatura. Ambos os fatores explicam porque os radicais nitroxídeos, desde o seu desenvolvimento há mais de 30 anos, têm sido uma importante ferramenta em muitos estudos de Biofísica, especialmente de membranas e proteínas^{1,2}.

Os espectros de RPE podem ser descritos, em termos da dinâmica dos marcadores de spin, por três tipos de regime de movimento:

rápido (“fast-motion”), lento (“slow-motion”) e limite rígido (“rigid limit”). O regime de movimento lento compreende situações em que os marcadores de spin apresentam tempos de correlação rotacional no intervalo entre 10^{-9} e 10^{-6} s. Esta faixa engloba sistemas em que os radicais nitroxídeos estão presentes em fluidos de fase ordenada tais como cristais líquidos e membranas biológicas, ou mesmo quando ligados a macromoléculas. Análises dos espectros de RPE baseadas nas relações de intensidade dos picos têm sido realizadas como medidas muito aproximadas da mobilidade do marcador de spin³. Por outro lado, avanços na simulação de espectros de RPE têm permitido monitorar em detalhes as mudanças que ocorrem nas propriedades do movimento dos marcadores de spin, mostrando aspectos dinâmicos interessantes do sistema em estudo, os quais não são acessíveis por outras técnicas espectroscópicas. Entretanto, as análises dos espectros neste regime de movimento são dificultadas uma vez que o movimento da molécula em estudo ou a própria dinâmica da sonda pode produzir formas de linhas irregulares e complicadas, requerendo uma simulação espectral detalhada para extrair as informações desejadas. Um outro agravante diz respeito à relação indireta entre os parâmetros físicos e a própria forma do espectro. Como consequência, é inevitável um aumento na demanda computacional para os problemas envolvendo este regime de movimento, requerendo a solução de inúmeras equações matriciais para o cálculo de um simples espectro.

O presente trabalho aborda os aspectos gerais do programa NLSL (“Nonlinear Least-Squares”) utilizado na simulação dos espectros de RPE de marcadores de spin nos vários regimes, em particular no de movimento lento⁴. O emprego desta ferramenta para

*e-mail: marcel@sc.usp.br

diferentes modelos de difusão rotacional é discutido, assim como uma interpretação detalhada dos coeficientes do potencial de reorientação e dos parâmetros de ordem para radicais nitróxidos em um meio anisotrópico. Além disso, alguns exemplos também são apresentados, demonstrando o grande potencial de aplicação do programa em diferentes tipos de sistemas biológicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais utilizados

A proteína albumina de soro bovino (BSA) e o surfactante N-hexadecil-N,N, dimetil-3- β -amônio-1-propano sulfonato (HPS) foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA) e preparados conforme descrito na referência 5. Uma descrição detalhada do procedimento de extração e preparação das membranas de estrato córneo (EC) a partir de ratos da raça Wistar está apresentada na referência 6. Os marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA foram adquiridos da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI, USA) e utilizados para a marcação dos sistemas mencionados acima^{5,6}. O fosfolípido 1,2-dipalmitoil-*sn*-3-glicero-fosfatidilcolina (DPPC) bem como os marcadores de spin 5-PC e 16-PC foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, Inc, sendo que a preparação e marcação das vesículas de DPPC estão descritas na referência 7.

As estruturas químicas das moléculas utilizadas no presente estudo e que formam as micelas ou vesículas de fosfolípidos estão apresentadas na Figura 1.

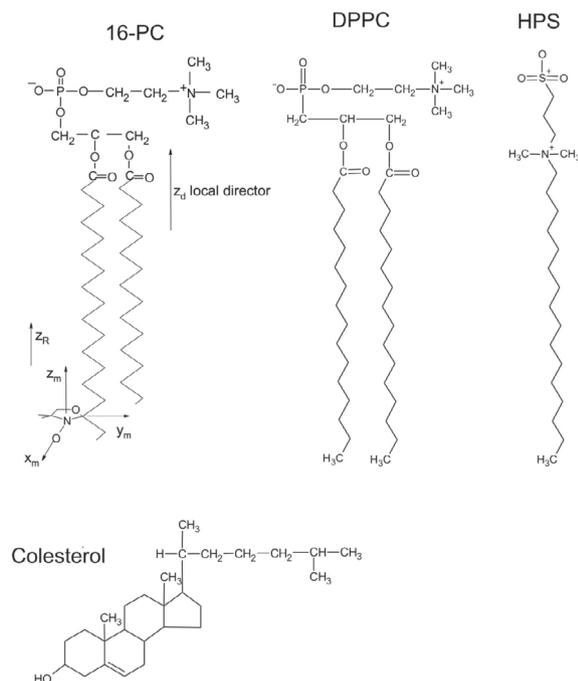


Figura 1. Estruturas químicas das moléculas utilizadas como matrizes e sondas

Métodos

Equipamentos

Um espectrômetro Varian E-109 e um Bruker ESP300, ambos equipados com uma cavidade retangular padrão e operando em uma frequência de 9,4 GHz, foram utilizados para as medidas de RPE. Este último espectrômetro foi empregado para as medidas envolvendo as membranas de EC, onde a temperatura foi controlada através de um sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten,

Germany) com uma precisão de 0,3 °C. Os parâmetros de operação dos dois equipamentos foram os seguintes: potência de microonda, 20 mW; frequência de modulação, 100 KHz; amplitude de modulação, 1,0 G; varredura do campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 ms.

Cálculos numéricos: algoritmos computacionais

Grande parte dos métodos envolvidos na simulação de espectros de RPE tem sido aplicada a outros regimes de movimento, em especial aos regimes de limite rígido⁸ e de movimento rápido⁸, que corresponderiam aos tradicionais espectros de RPE obtidos de amostras policristalinas e de amostras em ambientes isotrópicos. Somente há pouco mais de uma década, o programa NLSL tem sido empregado nas análises de espectros de RPE no regime de movimento lento⁴. Este programa gera um espectro teórico a partir da solução da equação estocástica de Liouville (“SLE, Stochastic Liouville Equation”) utilizando os valores de entrada dos parâmetros definidos pelo usuário. A SLE é uma equação matricial construída em um conjunto de bases que consiste de produtos de funções de spin, que representam propriedades da ressonância magnética, e das funções envolvendo os harmônicos esféricos generalizados, que representam a difusão rotacional da sonda paramagnética. Como as variáveis destas duas funções estão correlacionadas e a equação não pode ser resolvida analiticamente, o programa NLSL utiliza cálculos numéricos para encontrar a solução da SLE. Em seguida, o programa ajusta o espectro teórico ao experimental através de um algoritmo de minimização envolvendo o método de mínimos quadrados não lineares. Este método é empregado pelo fato do resíduo da diferença quadrática de ambos os espectros, que constitui a função objetiva a ser minimizada, ser formada por uma soma de funções quadráticas não lineares. Dentro deste método existem ainda diferentes modelos de minimização, tais como Gauss-Newton, quase-Newton (“quasi-Newton”) dentre outros, os quais são modificados do algoritmo padrão de minimização Levenberg-Marquardt. No caso do programa NLSL, o modelo utilizado é o quase-Newton, também conhecido como modelo da região de confiança. Assim, o procedimento de minimização da função objetiva é repetido até se atingir o grau de convergência pré-definido no programa.

A eficiência deste procedimento pode ser aumentada através do método de separação de variáveis. Neste método, as variáveis que possuem uma relação não linear (por ex., os tensores magnéticos) são separadas daquelas que apresentam uma dependência linear com a forma do espectro (por ex., as amplitudes relativas de duas espécies no mesmo espectro). Os valores otimizados neste segundo tipo de variáveis são calculados utilizando um algoritmo de fatorização QR, que consiste em decompor a matriz de coeficientes incógnitas em uma multiplicação envolvendo uma matriz ortonormal Q e uma triangular superior R . Em relação às variáveis não lineares, o programa utiliza o modelo da região de confiança, limitando o tamanho do passo da variável a ser otimizada. O método de separação de variáveis também é bastante útil para espectros de RPE com multicomponentes, o qual possibilita obter a população relativa de cada componente. Outra vantagem encontrada no programa NLSL diz respeito à interface gráfica, permitindo acompanhar o processo de otimização com a concomitante ilustração do espectro calculado (Figura 2).

Existem vários outros programas de simulação de espectros de RPE. Um dos mais conhecidos é o SimFonia, desenvolvido pela empresa Bruker, que fornece os espectrômetros de RPE. Esse programa não permite fazer uma otimização dos parâmetros físicos, senão meramente uma simulação espectral. Cabe mencionar ainda o programa LOWFIT⁹ bastante utilizado na análise de espectros na região de movimentos rápidos (“fast motion regime”) e que permi-

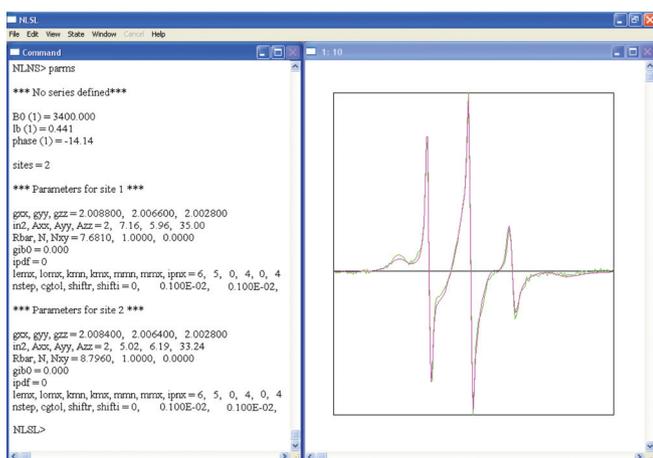


Figura 2. Ambiente gráfico do NLSL após finalizar uma simulação

tem um ajuste detalhado das larguras das linhas, usando as formas de linha lorentziana e gaussiana ou misturas das duas. Ele tem sido bastante utilizado na descrição de alargamento não homogêneo, um fenômeno importante na análise da forma das linhas dos espectros de RPE de radicais nitróxidos¹⁰. Mais recentemente começou a ser utilizado um pacote muito completo, o EasySpin¹¹. Porém, esta ferramenta é uma “toolbox” do software Matlab, o que implica que, para seu uso, o pesquisador deve possuir a licença deste último programa, bem como alguns conhecimentos básicos do mesmo. Estes dois fatores poderiam limitar a aplicação desta potente ferramenta em alguns laboratórios. Além disso, o programa NLSL é o único disponível para a comunidade que permite tratar todos os regimes dinâmicos observados no movimento de moléculas em fluidos complexos.

Tensores magnéticos e larguras de linha

O programa modela a reorientação de um sistema composto por um único elétron e um único núcleo (tipicamente um nitróxido) descrito por três tipos de interações: (a) Zeeman do spin eletrônico, com fator giromagnético (fator g) anisotrópico (dependente da orientação), (b) hiperfina elétron-núcleo e (c) Zeeman isotrópica do spin nuclear. Para tanto, o programa NLSL utiliza diferentes tipos de sistemas de coordenadas, os quais serão abordados mais adiante. Como resultado da simulação, os tensores magnéticos \mathbf{g} (do fator g) e \mathbf{A} (da interação hiperfina) são determinados. Estes tensores representam uma anisotropia espectral e suas componentes podem ser determinadas a partir do espectro de amostras monocristalinas ou em sistemas onde o marcador apresenta movimentos rápidos, sendo que neste último caso são encontrados apenas seus valores médios. Por outro lado, quando a sonda paramagnética apresenta uma dinâmica intermediária, os valores destes tensores não podem ser obtidos de uma simples observação direta do espectro experimental.

Os valores das componentes dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} podem ser obtidos de um espectro onde o movimento do radical nitróxido é bastante restrito, correspondente ao marcador imobilizado. No caso dos radicais nitróxidos, os valores mais comuns dos tensores magnéticos estão nos seguintes intervalos: $g_{xx} = 2,007$ a $2,010$ G, $g_{yy} = 2,004$ a $2,008$ G, $g_{zz} = 2,002$ a $2,003$ G, $A_{xx} = 5$ a 8 G, $A_{yy} = 4$ a 6 G, $A_{zz} = 32$ a 36 G¹². Na simulação é conveniente fazer uma estimativa inicial adequada dos tensores a partir das posições das linhas e, logo durante o processo de refinamento, variar um parâmetro de cada vez, já que podem estar fortemente correlacionados. Uma outra aproximação é fixá-los e variar somente os parâmetros dinâmi-

cos e de ordenamento (no caso de sistemas com ordenamento microscópico) durante o procedimento de ajuste. Na realidade, na nossa experiência observamos que, para formas de linha com movimento lento, o programa pode também ser utilizado eficientemente para se obter os parâmetros magnéticos do espectro em um limite rígido, efetuando cálculos no limite das várias pequenas taxas de difusão rotacional.

Os tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} neste programa de simulação podem ser representados de três formas equivalentes: cartesiana (por ex., para \mathbf{g} : g_{xx} , g_{yy} , g_{zz}); axial, que pressupõe essa simetria (g_{\parallel} , g_{\perp}) e esférica modificada (g_1 , g_2 , g_3). As relações entre as diferentes formas podem ser obtidas na referência 4. Neste trabalho, por conveniência de interpretação, é usada a forma cartesiana.

A largura de linha dos espectros de RPE está relacionada com o tempo de correlação rotacional do marcador de spin: quanto maior a largura de linha, maior o tempo de correlação, isto é, menor a mobilidade da sonda. Estes tempos são caracterizados pelo tensor de difusão rotacional (\mathbf{D}), que será abordado com mais detalhe na próxima seção. Adicionalmente, existem vários parâmetros na simulação que complementam a largura das linhas. Estes parâmetros representam não homogeneidades locais, tanto do campo magnético interno da amostra quanto do campo externo gerado pelo equipamento. Dois parâmetros são isotrópicos, isto é, afetam igualmente todas as orientações, e outros dois são anisotrópicos. O coeficiente lb (expresso em Gauss) representa uma largura de linha lorentziana isotrópica adicional (portanto maior que zero), sendo que seu uso é mais apropriado quando as linhas têm forma de derivadas de lorentziana, isto é, com variação mais suave nas bordas. De forma similar, o coeficiente $gib0$ (em Gauss) é mais conveniente quando as linhas têm uma forma mais aproximada à derivada de gaussiana, ou seja, mais abrupta nas bordas. Este coeficiente também possui significado físico unicamente para valores maiores que zero. Analogamente, existe uma matriz de largura de linha lorentziana adicional anisotrópica, \mathbf{W} (em Gauss). Esta matriz pode alargar seletivamente a linha do espectro de RPE correspondente a cada componente (W_{xx} , W_{yy} e W_{zz}). Por ex., W_{zz} alarga as linhas extremas (a de campo mais baixo e de campo mais alto) que correspondem a g_{zz} e A_{zz} (no caso de nitróxidos) bem como a linha central. \mathbf{W} também pode ser representada de três formas diferentes. Por último, o coeficiente $gib2$ (em Gauss) representa uma largura de linha gaussiana adicional dependente da orientação, onde $gib = gib0 - gib2 \cdot \cos^2 \psi$, onde ψ é o ângulo formado entre o eixo diretor e o campo magnético externo (ver seção *Sistemas de coordenadas*). Ele faz sentido unicamente quando temos medidas com diferentes orientações em relação ao eixo do campo externo ou no modelo *MOMD* (“Microscopic Order with Macroscopic Disorder”), que será discutido na seção *Modelos de difusão*. O coeficiente pode ser associado à não homogeneidade do campo magnético externo. A diferença $gib0 - gib2$ deve ser positiva.

Sistemas de coordenadas

Na representação completa do problema são definidos cinco sistemas de coordenadas associados a diferentes grandezas tensoriais. Três destes sistemas estão fixados na molécula (marcador de spin), ou seja, giram em relação ao meio onde a sonda está localizada e, evidentemente, ao laboratório. Os outros dois estão ligados ao laboratório. As transformações entre os diferentes sistemas são expressas por três rotações sucessivas utilizando os ângulos de Euler $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ ¹³: uma rotação em torno do eixo z através de um ângulo γ ; uma rotação em torno do eixo y através de um ângulo β e uma rotação em torno do eixo x através de um ângulo α . Desta forma γ é o ângulo formado entre os eixos longitudinais (z e z') do sistema original e do transformado, ao passo que α e β estão relacionados com os eixos transversos. Os sistemas fixos nos eixos moleculares são: sis-

tema de coordenadas da interação hiperfina (x_a, y_a, z_a) que contém o tensor \mathbf{A} ; sistema de coordenadas magnético (x_m, y_m, z_m) que contém o tensor do fator \mathbf{g} ; sistema de coordenadas de difusão rotacional (x_r, y_r, z_r) que contém o tensor rotacional \mathbf{R} .

Por convenção, para os marcadores do tipo nitróxidos, o sistema magnético de coordenadas (x_m, y_m, z_m) é assumido como segue: o eixo x ao longo da ligação N-O, o eixo z ao longo do orbital $2p\pi$ do nitrogênio e o eixo y perpendicular a ambos os eixos^{7,14}. Para levar o sistema de interação hiperfina para o sistema magnético são definidos os ângulos $\Omega_m = (\alpha_m, \beta_m, \gamma_m)$. Geralmente, ambos os sistemas são considerados colineares e, assim, esses ângulos são nulos. Para levar o sistema rotacional para o magnético são definidos os ângulos $\Omega_d = (\alpha_d, \beta_d, \gamma_d)$. Nota-se que no caso de simetria axial para alguns dos tensores envolvidos em dada transformação, o ângulo α_d que gira no plano XY , é arbitrário.

Os outros dois sistemas de coordenadas estão relacionados ao laboratório, isto é, fixos em relação ao espectrômetro: a) sistema diretor de coordenadas (x_d, y_d, z_d), que pode ser escolhido de forma arbitrária. Para facilitar as análises, o sistema diretor normalmente coincide com um sistema que representa a anisotropia do meio. É em relação a este sistema que a molécula se reorienta em fluidos anisotrópicos; b) sistema de coordenadas do laboratório (x_l, y_l, z_l), onde o eixo z_l coincide com a direção do campo magnético estático gerado pelo espectrômetro.

A única relação entre estes sistemas de coordenadas é através do ângulo $\Omega = (0, \psi, 0)$, pois o sistema de laboratório possui uma única direção longitudinal definida por z_l .

Modelos de difusão

Os cálculos espectrais incorporam vários modelos de difusão. Basicamente são quatro os modelos de difusão presentes no programa NLSL⁴ e que estabelecem como o marcador de spin irá se reorientar em relação aos eixos moleculares de rotação (x_r, y_r, z_r), isto é, o movimento desses eixos. O uso de cada modelo é definido pelo valor da variável inteira *ipdf*, sendo o valor pré-definido desta variável igual a 0 (exceto para um modelo em particular onde a variável *ist* é diferente de 0). Os modelos de difusão são:

Difusão rotacional browniana (ipdf=0)

Seqüência de reorientações infinitesimais dadas pelo tensor de difusão rotacional (\mathbf{D}). Isto é, cada eixo molecular pode possuir um tempo de correlação característico diferente. No programa, o tensor \mathbf{D} é dado em termos da variável \mathbf{R} pela expressão $\mathbf{R} = \log_{10}(\mathbf{D})$. Ao longo deste trabalho, o símbolo \log refere-se a \log_{10} .

Assim como os outros tensores, o tensor \mathbf{R} pode ter sua anisotropia representada nas três formas já mencionadas: cartesiana (r_x, r_y, r_z), axial (r_{pll}, r_{ppp} , assumindo uma simetria axial) e mais uma envolvendo o valor médio (r_{bar}, N, N_{xy}). Nesta última forma, que corresponde a mais utilizada na prática, a anisotropia é expressa

$$\text{pelos fatores: } N = \log\left(\frac{D_z}{\sqrt{D_x \cdot D_y}}\right) = r_z - \frac{(r_x + r_y)}{2} \text{ ou na simetria}$$

$$\text{axial } N = \log\left(\frac{D_{pll}}{D_{ppp}}\right) = r_{pll} - r_{ppp} \text{ e } N_{xy} = \log\left(\frac{D_x}{D_y}\right) = r_x - r_y.$$

Para o valor médio do coeficiente de difusão rotacional, temos que $r_{bar} = \sqrt[3]{r_x \cdot r_y \cdot r_z}$ ou na simetria axial $r_{bar} = \sqrt[3]{r_{ppp}^2 \cdot r_{pll}}$.

Este modelo de difusão rotacional browniana é mais apropriado para marcadores de spin com tamanhos intermediários e para macromoléculas marcadas, sendo, portanto, o modelo mais largamente utilizado.

Uma forma de estimar os valores iniciais do tempo de correla-

ção médio, bem como da anisotropia, é a partir de um espectro de RPE a uma temperatura tal que a dinâmica do marcador de spin seja rápida e a forma de linha deste espectro seja caracterizada aproximadamente por três linhas bem definidas¹⁵. Nesse espectro, a diferença de intensidades entre as linhas do campo central e baixo permite medir a anisotropia (N no caso de simetria axial), onde não se leva em consideração a linha para campo alto. Quanto maior for a diferença de intensidade entre a linha do campo central e baixo, maior será a anisotropia do movimento do marcador de spin. Já o valor médio do tempo de correlação rotacional depende da diferença de intensidades entre campo central e alto, sendo diretamente proporcional à largura da linha central. Desta forma, quanto maior for a largura da linha central, bem como da razão entre a linha central e a de campo alto, mais imobilizado estará o marcador de spin e maior será o tempo de correlação rotacional.

Difusão rotacional não-browniana (ipdf=1)

As reorientações são descontínuas, acontece uma reorientação a cada intervalo τ_i em relação ao eixo i . O valor quadrático médio do ângulo reorientado em relação ao eixo i é $6R_i\tau_i$ (em radianos). Os parâmetros que definem esta reorientação são as variáveis $\mathbf{pmxy} = R_{xy}\tau_{xy}$ em relação ao plano xy e $\mathbf{pml} = R_z\tau_z$ em relação ao eixo z .

Adicionalmente pode ser definido um movimento de reorientação não-browniano interno em torno de z_r . Neste caso, o tempo de residência é de τ_z , dado pelo parâmetro $\mathbf{pmzz} = R_z\tau_z$.

A difusão não-browniana tem duas variantes definidas pelos valores das variáveis (\mathbf{ml} para reorientação em relação ao eixo z_r , \mathbf{mxy} para reorientação em relação ao plano xy e \mathbf{mzz} para uma reorientação em relação ao eixo z_r). Um primeiro sub-modelo da difusão não-browniana é a difusão livre (\mathbf{ml} e/ou \mathbf{mxy} e/ou $\mathbf{mzz} = 0$) onde a molécula fica girando em relação ao eixo i e após um tempo τ_i reorienta-se. O segundo sub-modelo é a difusão por saltos (\mathbf{ml} e/ou \mathbf{mxy} e/ou $\mathbf{mzz} = 1$) onde a molécula fica fixa durante τ_i e logo se reorienta, ficando fixa novamente na nova orientação.

Difusão por saltos discretos ("jump diffusion") (ist ≠ 0)

Pode ser adicionado aos dois modelos anteriores (browniano e não browniano). Neste caso, a molécula salta para os i -primeiros sítios (*ist* sítios) simétricos ao eixo molecular z_r , com uma taxa dada pela variável 10^{dif} (em s^{-1}). Este modelo é similar à difusão não-browniana com saltos; neste caso, o ângulo de reorientação é $360/ist$ e o tempo de permanência é $1/(djf.ist)$.

Difusão anisotrópica (ipdf=2)

O marcador de spin (com seus três eixos moleculares de rotação: x_r, y_r, z_r) gira, juntamente com o seu movimento browniano intrínseco, em torno do eixo z_d do sistema diretor com $z_d = z_l$ ($\psi = 0$, os sistemas diretor e de laboratório são solidários), isto é, rotações em torno da direção do campo magnético externo. Este modelo representa uma anisotropia externa, em relação ao sistema fixo de coordenadas (mais especificamente ao eixo z_l), útil no caso de fluidos ordenados. Este modelo pode ser combinado somente com o modelo browniano.

Nos dois primeiros modelos, as rotações eram relativas aos eixos moleculares, neste modelo todo o sistema molecular gira em torno do sistema diretor, existindo orientações mais prováveis devido à anisotropia do meio. Estas orientações são modeladas usando um potencial de reorientação que será tratado na próxima seção.

Potencial de reorientação

Para a difusão de uma sonda em um meio com moléculas microscopicamente ordenadas, tais como um cristal líquido, membranas ou polímeros, a tendência do marcador em se ordenar é

modelada por um potencial de restauração U^{16} . Este potencial está relacionado com uma função de distribuição de probabilidades P , onde esta função é expressa em termos das coordenadas do ângulo sólido $\Omega = (\beta, \gamma)$, formado entre o eixo do sistema diretor e o eixo do sistema de difusão. Desta forma, as possíveis orientações dos eixos moleculares de rotação (x_r, y_r, z_r) em relação ao eixo do sistema diretor (x_d, y_d, z_d) podem ser representadas mediante uma função de distribuição, que pode ser escrita como:

$$P(\Omega) = \frac{e^{-\frac{U(\Omega)}{k_B T}}}{\int_{4\pi} e^{-\frac{U(\Omega)}{k_B T}} d\Omega}$$

onde T corresponde à temperatura do sistema e k_B é a constante de Boltzman. Esta função representa a anisotropia do meio e define qual é a probabilidade de que o marcador de spin esteja orientado em uma dada direção. O caso mais simples seria representado por um meio cujas moléculas não apresentam ordem microscópica, isto é, um meio isotrópico. Neste caso, $U = 0$ e $P = 1/(4\pi)$ em todas as direções.

O potencial de orientação é expandido em uma série de harmônicos esféricos¹⁷

$$U(\Omega) = -k_B \cdot T \cdot \sum_{k,l} c_{k,l} \cdot Y_k^l(\Omega)$$

onde $c_{k,l}$ representam os coeficientes do potencial e Y_k^l os harmônicos esféricos normalizados. Por questões de simetria e utilização, geralmente são considerados somente os termos $c_{2,0}$ e $c_{2,2}$ na expansão de $U(\Omega)$, resultando em uma equação mais simples:

$$U(\beta, \gamma) = -k_B \cdot T \cdot \left[c_{2,0} \cdot \frac{3 \cdot \cos^2(\beta) - 1}{2} + c_{2,2} \cdot \frac{\sqrt{3} \cdot \sin^2(\beta) \cdot \cos(2 \cdot \gamma)}{2} \right]$$

A interpretação dos coeficientes $c_{2,0}$ e $c_{2,2}$ pode ser facilitada observando-se as curvas da Figura 3 que representam o comportamento da distribuição de orientações prováveis em relação ao eixo z_d ($\beta = 0$ paralelo e $\beta = 90^\circ$ perpendicular) para diferentes valores de ambos os coeficientes. Para as curvas das Figuras 3a e 3b é feita uma integração ao longo de γ , a qual não é necessária na curva da Figura 3c pois o plano perpendicular está associado (ocorre) somente a $\beta = 90^\circ$.

Note na Figura 3a que $c_{2,0} > 0$ representa ordem na direção paralela a z (o eixo rotacional z_r , que geralmente coincide com o eixo de simetria do marcador, oscila em torno do eixo diretor z_d formando um pequeno ângulo). O caso de $c_{2,0} < 0$ sugere ordem na direção perpendicular (o marcador fica orientado perpendicularmente ao eixo diretor z_d). Quanto maior o módulo de $c_{2,0}$ maior ordem, isto é, menor dispersão angular. Ao contrário de $c_{2,0}$, o coeficiente $c_{2,2}$ representa ordem na direção perpendicular a z , independente do seu sinal. Quanto maior o módulo de $c_{2,2}$, menor será a dispersão angular, onde uma maior probabilidade do eixo molecular estar orientado a $\beta = 90^\circ$ com o eixo z_d é observada. Já a Figura 3c mostra a influência do sinal de $c_{2,2}$, indicando que $c_{2,2} > 0$ representa ordem na direção x , ao passo que $c_{2,2} < 0$ sugere ordem na direção y . Assim, $c_{2,2}$ é uma medida da anisotropia no plano diretor perpendicular (XY).

A ordem microscópica de um sistema, também chamada de anisotropia ou de orientação preferencial, pode ser ilustrada usando-se a definição de parâmetros de ordem^{7,14,16,18}. Estes parâmetros representam os valores médios dos harmônicos esféricos usando P como função de probabilidade. As Figuras 4a e 4b apresentam o comportamento dos parâmetros de ordem zero e de segunda ordem

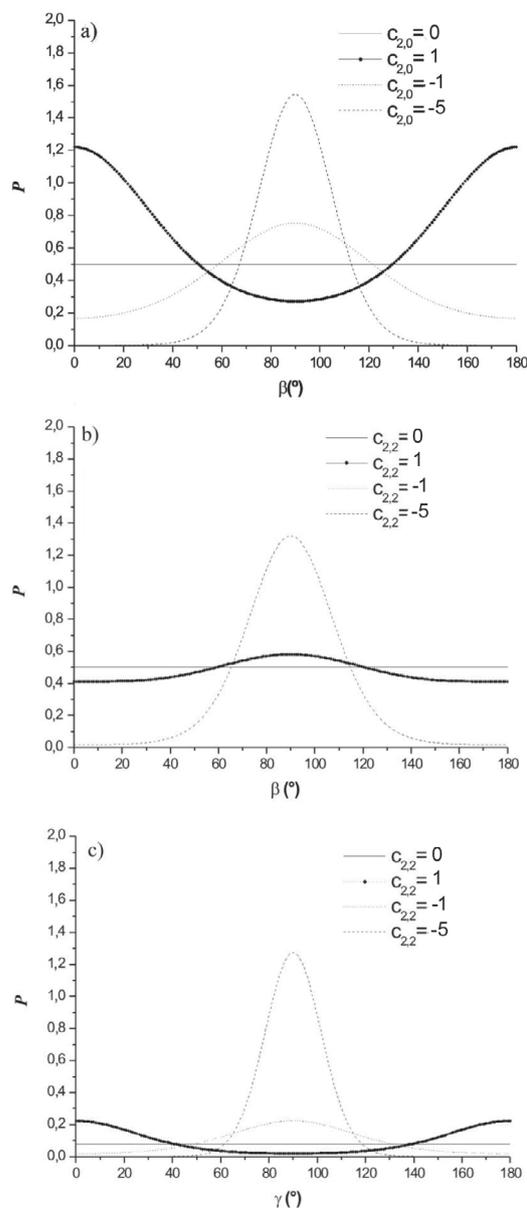


Figura 3. Distribuição de orientações prováveis do sistema de coordenadas rotacionais (fixo no marcador) em relação ao sistema diretor (fixo em relação ao laboratório) para diferentes valores dos coeficientes do potencial de orientação: **a)** variando $c_{2,0}$ com $c_{2,2} = 0$ em função do ângulo entre z_d e z_r , **b)** variando $c_{2,2}$ com $c_{2,0} = 0$ em função do ângulo entre z_d e z_r , e **c)** variando $c_{2,2}$ com $c_{2,0} = 0$ em função do ângulo entre x_d e x_r .

em função dos coeficientes $c_{2,0}$ e $c_{2,2}$ do potencial de reorientação, respectivamente. Note na Figura 4a que a relação entre $c_{2,0}$ e S_0 é quase linear, onde no intervalo $-1 < c_{2,0} < 1$ a curva de S_0 exibe uma pequena inflexão. Desta forma, S_0 é interpretado, de forma geral, como ordem na direção paralela ($S_0 > 0$) e perpendicular ($S_0 < 0$). É interessante mencionar que o efeito de $c_{2,2}$ depende do sinal de $c_{2,0}$. Caso $c_{2,0} > 0$, $c_{2,2}$ diminui o valor de S_0 . Por outro lado, se $c_{2,0} < 0$, $c_{2,2}$ aumenta ligeiramente a magnitude de S_0 . Assim como $c_{2,0}$, o coeficiente $c_{2,2}$ também apresenta uma relação quase linear com S_2 . Deste modo, S_2 representa ordem relativa aos eixos transversos: em x ($S_2 > 0$) e em y ($S_2 < 0$). O sinal de $c_{2,0}$ também influencia na ordem: aumenta a ordem perpendicular se $c_{2,0} < 0$ (seja para x ou para y) e diminui se $c_{2,0} > 0$, pois existiria mais ordem longitudinal.

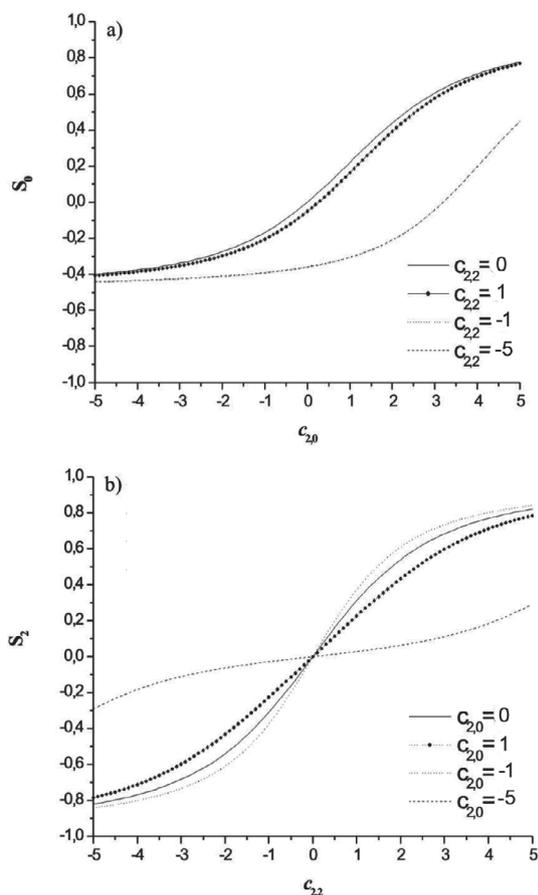


Figura 4. Comportamento dos parâmetros de ordem para diferentes valores dos coeficientes do potencial de reorientação: a) S_0 e b) S_2 .

Estes parâmetros de ordem representam, de forma geral, o potencial orientador presente em membranas biológicas, que restringe a amplitude do movimento rotacional das cadeias lipídicas. Isto é, quanto maior o potencial orientador, menor será o intervalo de orientações disponível para o movimento rotacional das cadeias. Mais precisamente, o potencial $U(\Omega)$ dá origem a uma distribuição de moléculas ao longo de várias orientações em torno do eixo de ordenamento local da membrana (diretor local). No caso de vesículas, existe, ainda, uma distribuição desse diretor local representando cada um dos segmentos da membrana na vesícula⁷.

Adicionalmente a esta ordem microscópica pode existir uma desordem macroscópica, isto é, o marcador tem orientações preferenciais em relação à molécula onde está ligado, mas as diferentes moléculas na amostra possuem uma distribuição aleatória de orientações em relação ao campo magnético externo. Este caso específico é conhecido como ordem microscópica com desordem macroscópica (MOMD), sendo modelado integrando o espectro para um número especificado de ângulos ψ . Ele é válido tanto para o modelo de difusão browniana como para o de difusão anisotrópica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aplicações do programa NLSL

Nesta seção são apresentados três exemplos que ilustram diferentes aplicações do programa NLSL. Os dados utilizados foram obtidos pelos autores, alguns publicados e outros submetidos para publicação. Os dois primeiros exemplos mostram a importância de simular ao menos duas componentes nos espectros, que represen-

tam duas ou mais espécies com significado físico. No terceiro exemplo é destacado o efeito da anisotropia do meio no espectro de RPE e a relevância, no processo em estudo, dos parâmetros que ela representa.

Interação da proteína albumina de soro bovino (BSA – “bovine serum albumin”) com o surfactante zwitteriônico N-hexadecil-N,N, dimetil-3-Zamônio-1-propano sulfonato (HPS)⁵

A Figura 5 mostra os espectros de RPE experimentais e de melhor ajuste do marcador de spin 5-doxil ácido esteárico (5-DSA, “5-doxyl stearic acid”) incorporado à BSA na ausência (Figura 5a) e na presença (Figura 5b) do surfactante zwitteriônico HPS a diferentes concentrações. O ajuste da Figura 5a foi obtido utilizando um modelo com somente uma componente espectral, já que a forma de linha deste espectro é semelhante àquela obtida para baixas temperaturas, caracterizada por uma única população de radicais nitróxidos com uma considerável restrição de movimento. Assim, os valores de entrada dos tensores magnéticos \mathbf{g} e \mathbf{A} bem como do parâmetro de movimento R_{bar} no ajuste da Figura 5a foram obtidos previamente do ajuste espectral a baixas temperaturas. Além disso, estamos assumindo que o modelo de difusão rotacional dos marcadores de spin é do tipo browniano, sendo este modelo largamente empregado nos casos em que os marcadores de spin apresentam tamanhos intermediários e de macromoléculas marcadas. Uma anisotropia de movimento igual a $N \equiv R_{||} / R_{\perp} = 10$ foi também admitida, onde o critério empregado na escolha do valor de N está relacionado à qualidade do ajuste (valor de χ_{red}^2) fornecido pelo programa NLSL.

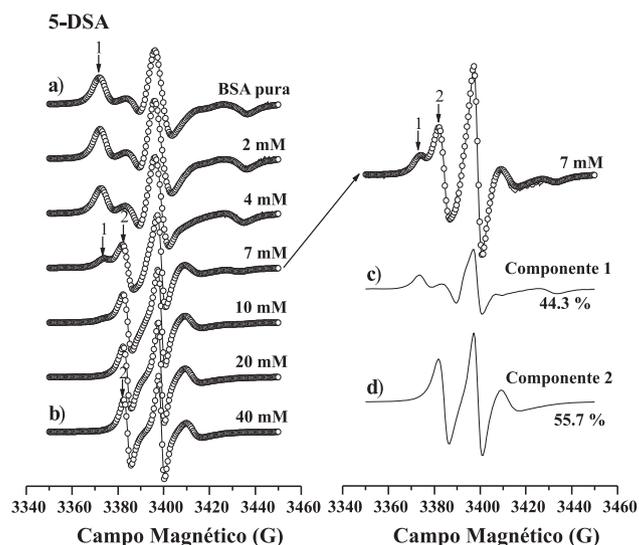


Figura 5. Espectros de RPE experimentais (linha sólida) e de melhor ajuste (círculos vazios) do marcador 5-DSA incorporado a BSA na ausência (a) e na presença de diferentes concentrações de HPS em tampão fosfato 20 mM pH 7.0 (25 °C). O espectro em (b) apresenta 40 mM de HPS sendo formado somente pela componente 2. Em (c) temos a componente 1 e em (d), a componente 2 do espectro com 7 mM de HPS

Para concentrações inferiores a 4 mM de HPS, os espectros de RPE são formados por uma única componente. Assim, os ajustes foram alcançados variando as componentes do tensor \mathbf{A} , o parâmetro R_{bar} e a largura de linha Lorentziana não-homogênea (L_b). Os valores dos parâmetros de melhor ajuste para o espectro da Figura 5a foram: $g_{xx} = 2,0086$, $g_{yy} = 2,0064$ e $g_{zz} = 2,0025$ para as componentes do tensor \mathbf{g} ; $A_{xx} = 6,91$, $A_{yy} = 5,38$ e $A_{zz} = 33,70$ Gauss para as

componentes do tensor \mathbf{A} ; $L_b = 2,3$ Gauss e $R_{bar} = 7,01$ (equivalente a $\bar{R} = 10^{7,01} \text{ s}^{-1}$). Este último parâmetro pode ser ainda convertido no tempo de correlação rotacional (τ), permitindo fazer inferências diretas acerca da dinâmica do marcador de spin no sistema em estudo. Como mostrado anteriormente, para uma simetria rotacional axial, a taxa da constante de difusão rotacional (\bar{R}) é dada por $\bar{R} \equiv \sqrt[3]{R_{\perp}^2 R_{\parallel}}$. Este parâmetro por sua vez está relacionado com R_{bar} pela equação $R_{bar} = \log_{10} \bar{R}$ e, como o modelo da difusão rotacional é do tipo browniano, temos que $\tau = (6\bar{R})^{-1}$. Assim, para $R_{bar} = 7,01$ encontramos que $\tau = 16,29$ ns. Uma outra relação importante envolve a média das componentes do tensor \mathbf{A} : $a_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$, onde a_0 é conhecido como desdobramento hiperfino isotrópico e fornece uma medida indireta da polaridade do ambiente onde o marcador de spin está localizado. Neste caso, temos que $a_0 = 15,33$ G.

Por outro lado, para 7 e 10 mM de HPS, é possível observar a sobreposição de duas componentes espectrais (ver as setas na Figura 5), indicando a coexistência de duas populações de radicais nitróxidos com diferentes estados de mobilidade. Neste caso, deve-se utilizar um modelo de duas componentes. Os valores de entrada dos tensores magnéticos referentes à componente 1 foram obtidos para concentrações inferiores de surfactante. Assim, para obter-se os valores de entrada dos parâmetros para a componente 2, é necessário ajustar previamente um espectro formado exclusivamente por esta componente (Figura 5b) e que corresponde à concentração de HPS de 40 mM. Os valores dos parâmetros obtidos no ajuste do espectro da Figura 4b foram: $g_{xx} = 2,0087$, $g_{yy} = 2,0062$ e $g_{zz} = 2,0029$; $A_{xx} = 7,02$, $A_{yy} = 5,52$, $A_{zz} = 32,88$ Gauss, e $R_{bar} = 8,15$ (equivalente a $\bar{R} = 1,41 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$). Neste caso, uma largura de linha Gaussiana não-homogênea foi utilizada ($Gib0 = 0,44$ Gauss). Durante o procedimento de ajuste dos espectros de RPE com duas componentes, os tensores magnéticos da componente 2 foram fixados, sendo variado somente o parâmetro R_{bar} . Em relação à componente 1, além do parâmetro de movimento, as componentes A_{zz} e A_{xx} também foram variadas, assim como a largura de linha Lorentziana não-homogênea. Este procedimento reduziu o número de parâmetros livres durante a simulação e, conseqüentemente, a correlação entre eles. As Figuras 5c e d representam, respectivamente, as componentes 1 e 2 sobrepostas no espectro de RPE para 7 mM de HPS, onde a fração de radicais nitróxidos para cada componente também está ilustrada. Para a componente 1, encontramos que $\tau = 5,57$ ns e $a_0 = 15,14$ G, ao passo que para a componente 2 obtivemos $\tau = 1,37$ ns e $a_0 = 15,13$ G, indicando diferenças significativas somente quanto à mobilidade.

A simulação dos espectros de RPE apresentados na Figura 5, permitiu obter o tempo de correlação rotacional, τ , para o 5-DSA ligado à BSA de 16,29 ns, e a sua variação para 5,57 ns para a componente 1 e 1,37 ns para a componente 2 na presença de 7 mM de HPS. Na concentração de HPS de 40 mM apenas a componente 2 é observada com τ de 1,18 ns e $a_0 = 15,14$ G. Na suspensão de HPS 40 mM, na ausência de proteína, $\tau = 1,18$ ns e $a_0 = 15,14$ G, ou seja os valores são bem próximos aos obtidos na presença de BSA. Pode-se concluir, então, que o efeito da adição do surfactante HPS à BSA foi o de mudar a mobilidade do radical nitróxido ligado à proteína, simultaneamente à produção de uma nova distribuição dos radicais em dois grupos com mobilidades distintas. Estes dois grupos de radicais podem estar associados a radicais mais fortemente ligados à proteína (componente 1) e radicais com maior liberdade de movimento rotacional e menor valor de τ , que sofrem maior efeito das micelas de surfactante. É interessante que a mudança de mobilidade é bastante significativa e que a mudança de polaridade, obtida através da comparação do valor de a_0 , é muito pequena. Podemos afirmar apenas que a polaridade do 5-DSA obtida na sua ligação à proteína pura, $a_0 = 16,33$ G, é ligeiramente

superior à polaridade observada em micelas puras de HPS, $a_0 = 16,13$ G, e bastante menor que aquela observada em meio aquoso (tampão aquoso utilizado em nossos experimentos), $a_0 = 17,0$ G. No trabalho referenciado neste exemplo⁵ foram feitas medidas também para o 16-DSA, onde o fragmento paramagnético se encontra localizado mais próximo do grupo metil da cadeia metilênica. Nesse caso, também aparecem 2 componentes nas simulações dos espectros de RPE e nas mesmas concentrações de HPS. As mudanças de mobilidade são bem similares às descritas para o 5-DSA, enquanto que a polaridade da componente 1 aumenta de 15,46 para 16,04 G, variando a concentração de HPS de 0 a 10 mM e a polaridade da componente 2 permanece constante em toda a faixa, entre 7 e 40 mM, e igual a 14,82 G; é essencialmente a mesma que em micelas puras de HPS 40 mM. Estes resultados ilustram o “gradiente de polaridade” esperado em sistemas miméticos de membranas e que tem sido bastante estudado por vários pesquisadores¹⁹. Convém mencionar ainda que uma deficiência do programa NLSL está associada ao fato de que ele não permite estimar a polaridade através de modelos próprios que levem em conta a densidade eletrônica no átomo de nitrogênio do fragmento paramagnético associado à ligação N-O, mas apenas como o valor médio das componentes do tensor hiperfino, conforme mencionado.

Efeito da temperatura sobre as membranas de estrato córneo (EC)⁶

O estrato córneo (EC) está localizado na camada mais superficial da epiderme, sendo o principal responsável pelo controle da perda de água transdérmica além de exercer uma permeabilidade seletiva à passagem de moléculas através da pele. O EC é constituído por células anucleadas e destituídas de organelas citoplasmáticas (corneócitos) embebidas em uma matriz lipídica. A Figura 6 apresenta uma série de espectros de RPE experimentais e de melhor ajuste do 5-DSA incorporado ao EC a diferentes temperaturas. Note que a 6 °C, o espectro é formado por apenas uma componente espectral, onde o ajuste foi realizado assumindo um modelo browniano para a difusão rotacional do 5-DSA e uma anisotropia $N = 10$. Novamente, o critério na escolha do valor de N foi a qualidade do ajuste (valor de χ^2_{red}). Os valores de entrada dos tensores magnéticos \mathbf{g} e \mathbf{A} e do parâmetro R_{bar} foram obtidos do ajuste espectral a baixas temperaturas. Os parâmetros obtidos no

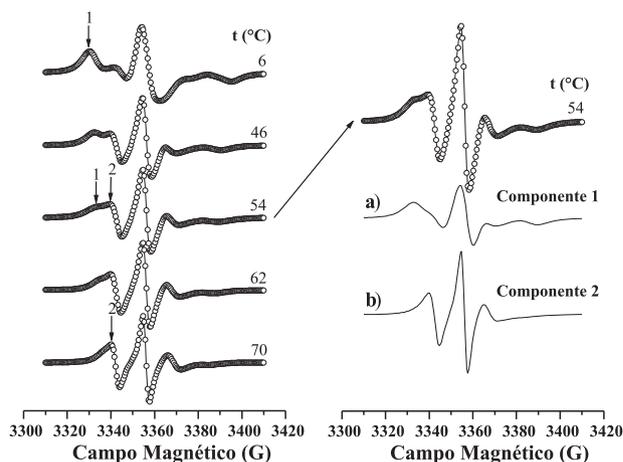


Figura 6. Espectros de RPE experimentais (linha sólida) e de melhor ajuste (círculos vazios) do marcador 5-DSA incorporado ao estrato córneo (EC) em tampão salino acetato (10 mM de acetato, 150 mM de NaCl e 1 mM de EDTA; pH 5.2) a diferentes temperaturas. Em (a) temos a componente 1 e em (b) a componente 2 do espectro de RPE a 54 °C

ajuste do espectro de RPE a 6 °C foram: $g_{xx} = 2,0087$, $g_{yy} = 2,0060$ e $g_{zz} = 2,0022$ para as componentes do tensor \mathbf{g} ; $A_{xx} = 6,0$, $A_{yy} = 6,0$ e $A_{zz} = 33,5$ Gauss para as componentes do tensor \mathbf{A} e $R_{bar} = 6,75$. Uma largura de linha Lorentziana não-homogênea também foi utilizada no procedimento de ajuste.

A Figura 6 mostra que mudanças significativas ocorrem na forma de linha dos espectros de RPE em função da temperatura. A 54 °C, por ex., é possível notar claramente a coexistência de duas componentes espectrais (ver as setas na Figura 6). Logo, podemos concluir que o aumento da temperatura favorece a formação da componente 2. A nossa interpretação da existência de duas componentes baseia-se em que a componente 1 deve-se ao marcador 5-DSA interagindo com os lipídios covalentemente ligados aos corneócitos, ao passo que a componente 2 corresponde ao marcador presente nas regiões intercelulares. Os valores de entrada dos tensores magnéticos, assim como do parâmetro de movimento R_{bar} associados a esta componente podem ser obtidos ajustando o espectro de RPE a 70 °C, o qual é formado essencialmente pela componente 2. Estes parâmetros foram: $g_{xx} = 2,0086$, $g_{yy} = 2,0060$ e $g_{zz} = 2,0031$; $A_{xx} = 5,5$, $A_{yy} = 5,5$, $A_{zz} = 31,5$ Gauss e $R_{bar} = 7,8$. Além disso, uma largura de linha Gaussiana não-homogênea foi empregada. Como neste sistema estamos interessados somente na dinâmica do marcador, os ajustes dos espectros de RPE com duas componentes foram alcançados variando somente o parâmetro R_{bar} , além da largura de linha Lorentziana não-homogênea da componente 1. As Figuras 6a e b ilustram, respectivamente, as componentes 1 e 2 do espectro de RPE a 54 °C, onde a fração de radicais nitróxidos para cada componente é igual a 41 e 59%, respectivamente. Em relação a componente 1, temos que $\tau = 7,11$ ns e $a_0 = 15,17$ G, ao passo que para a componente 2, $\tau = 4,14$ ns e $a_0 = 14,17$ G, indicando diferenças tanto de mobilidade quanto de polaridade.

Os lipídios ligados covalentemente aos corneócitos apresentam uma maior restrição de movimento em relação àqueles presentes nos espaços intercelulares, formando as bicamadas lipídicas. Assim, é esperado que a mobilidade dos radicais nitróxidos presentes nas regiões intercelulares (componente 2) seja maior quando comparada àqueles presentes na região dos lipídios ligados covalentemente (componente 1). De fato, os resultados obtidos da simulação indicam este comportamento, sustentando a interpretação dada anteriormente acerca da origem destas componentes. Ainda neste exemplo, o valor médio do tensor hiperfino calculado reflete as diferenças de polaridade entre as duas regiões monitoradas pelo 5-DSA.

Papel do colesterol em modelos de membrana: o estado líquido-ordenado

A complexa organização de membranas biológicas pode ser estudada através do uso de membranas lipídicas mais simples, cuja composição é escolhida de maneira a enfatizar as propriedades que se deseja investigar. O caráter anfifílico dos lipídios faz com que, em solução aquosa, eles se agrupem em bicamadas que podem, por sua vez, estar empacotadas de diversas maneiras. Assim, são definidas várias fases dos lipídios na membrana, como a fase gel, na qual os lipídios estão mais ordenados e a membrana é menos fluida, e a fase de líquido cristalino, onde a membrana é mais fluida e os lipídios têm suas cadeias acil desordenadas.

Colesterol e seus derivados são componentes comuns de biomembranas, sendo encontrados principalmente em membranas plasmáticas de células eucarióticas, onde podem responder por até 50 mol% da composição lipídica de tais membranas²⁰. Eles funcionam como moduladores passivos da membrana²¹, alterando suas propriedades físico-químicas, como a fluidez. Mais recentemente, outra função tem sido atribuída às moléculas de colesterol em biomembranas:

a formação de domínios líquido ordenados (Lo) devido a interações específicas entre as moléculas de colesterol e lipídios com pelo menos uma cadeia acil saturada. Esses domínios, denominados “rafts” em membranas biológicas²², desempenham papel importante na transferência de sinais do meio extracelular para o citoplasma (transdução de sinal – “signal transduction”)²³. Portanto, entender o papel dos lipídios e como sua organização afeta os processos relevantes para o funcionamento celular é uma área de bastante interesse.

Tem sido demonstrado que a presença de colesterol na membrana em concentrações superiores a 22 mol% leva a membrana a um estado de líquido ordenado (Lo)²⁴, que possui algumas características bastante peculiares e, à primeira vista, contraditórias. Assim como na fase gel ou sólido ordenado (So), as cadeias acil dos lipídios em fase Lo encontram-se mais ordenadas que na fase de líquido cristalino (Lc). Entretanto, como em um líquido, as taxas de rotação e translação das cadeias lipídicas em fase Lo são mais rápidas que aquelas obtidas na fase So. Vist e Davis²⁵ mostraram que não há forças restauradoras em membranas na fase Lo e, portanto, estas se comportam como um fluido bidimensional²⁰.

Para verificarmos essas alterações induzidas por altas concentrações de colesterol na estrutura dinâmica de biomembranas e sua pronta caracterização através de simulações com o programa NLSL, procedemos com experimentos de RPE em modelos de membrana constituídos pelo fosfolipídio dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e misturas deste com colesterol em uma concentração de 50 mol%. O marcador de spin utilizado foi o 16-PC, que monitora a região final das cadeias acil dos fosfolipídios. Os espectros foram medidos em duas temperaturas para cada amostra, de maneira a termos dados em temperaturas abaixo (30 °C) e acima (51 °C) da transição da fase gel para a fluida do DPPC que ocorre em 41 °C.

Os espectros experimentais e suas respectivas simulações obtidas através do programa NLSL estão mostrados na Figura 7. Uma simples inspeção visual dos espectros já oferece informações interessantes acerca do papel desempenhado pelo colesterol. Os espectros da amostra de DPPC acima (Figura 7b) e abaixo (Figura 7a) da temperatura de transição de fase apresentam diferenças significativas. O espectro do marcador 16-PC em DPPC a 30 °C é constituído por linhas largas e com relação de intensidades entre cada linha bastante diferente, resultado de um ambiente de maior ordem e menor mobilidade do referido marcador de spin. Ao se aquecer essa amostra até 51 °C (fase Lc), o espectro passa a apresentar linhas estreitas com relação de intensidade entre a linha de campo baixo e a linha central mais próxima da unidade. Isto reflete um regime de movimento rápido e pouco restrito (baixo ordenamento). Já os espectros do marcador 16-PC em DPPC/Colesterol apresentam características gerais bastante similares em relação a sua forma de linha tanto a 30 quanto a 51 °C.

As simulações dos espectros (círculos na Figura 7) nos permitem identificar as características gerais discutidas acima, fornecendo os valores para a taxa de difusão rotacional (R_1) que representa o movimento oscilatório da porção da cadeia lipídica onde está inserido o marcador de spin e para o parâmetro de ordem S_0 . No caso da amostra de DPPC foram usados os seguintes valores para as componentes dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} : $g_{xx} = 2,0089$; $g_{yy} = 2,0058$; $g_{zz} = 2,0021$; $A_{xx} = 4,9$ G; $A_{yy} = 4,9$ G; $A_{zz} = 33,0$ G²⁶. Para a amostra de DPPC/Colesterol esses valores foram: $g_{xx} = 2,0084$; $g_{yy} = 2,0054$; $g_{zz} = 2,0020$; $A_{xx} = 5,0$ G; $A_{yy} = 5,0$ G; $A_{zz} = 32,6$ G²⁶. Todos esses valores foram obtidos previamente por simulação de espectros do marcador 16-PC em DPPC e DPPC/Colesterol em baixas temperaturas (limite rígido)²⁶.

Para obtermos informações referentes à dinâmica do marcador de spin em cada sistema de interesse utilizamos os parâmetros R_1 e os coeficientes do potencial $c_{2,0}$ e $c_{2,2}$, além de um alargamento

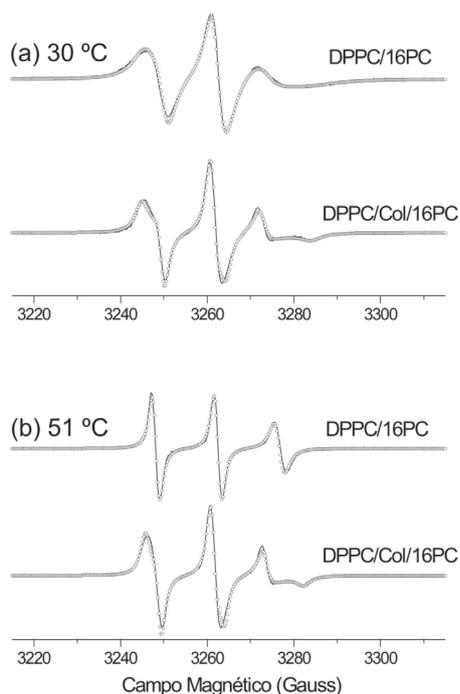


Figura 7. Espectros de RPE experimentais (linha sólida) e de melhor ajuste (círculos vazios) do marcador 16-PC incorporado ao fosfolípido dipalmitoil fosfatidilcolina com e sem colesterol em uma concentração de 50 mol% a diferentes temperaturas. Em (a) 30 °C, abaixo da transição de fase e em (b) 51 °C, acima da transição de fase

Lorentziano não-homogêneo caracterizado pelo tensor W definido no programa. Os valores das componentes dos tensores g e A foram mantidos fixos durante toda a simulação, assim como o valor da componente paralela do tensor de difusão rotacional (R_{\parallel}), esta última mantida em 10 vezes o valor de R_{\perp} , que é uma boa aproximação para os casos de marcadores inseridos na porção final de cadeias lipídicas.

Obtivemos para o marcador 16-PC em DPPC a 30 °C, $R_{\perp} = 0,08 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ e $S_0 = 0,22$, o que corrobora as observações iniciais acerca da forma de linha do espectro nesta situação. A 51 °C, os fosfolípidos passam a apresentar mobilidade mais elevada ($R_{\perp} = 0,41 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$) e ordenamento das cadeias acil extremamente baixo ($S_0 = 0,02$). Esses valores são condizentes com fosfolípidos organizados em uma fase gel (30 °C) ou fluida (51 °C). Quando da adição de colesterol, as propriedades da membrana mostram alterações significativas em ambas as temperaturas. A 30 °C, que corresponderia à fase gel, o colesterol fluidifica a porção final das cadeias acil, elevando o valor de R_{\perp} para $0,25 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. O ordenamento das cadeias é também ligeiramente aumentado de $S_0 = 0,22$ para $0,28$. Acima da transição de fase do DPPC, o colesterol não altera significativamente a fluidez da membrana ($R_{\perp} = 0,44 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$), mas induz um ordenamento comparável àquele observado em temperaturas mais baixas com $S_0 = 0,21$. Comparando-se os valores de R_{\perp} e S_0 a 30 e 51 °C da amostra que contém colesterol, podemos observar que o colesterol mantém esses valores em patamares similares (R_{\perp} passa de $0,25 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ para $R_{\perp} = 0,44 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$, e S_0 varia de $0,21$ a $0,27$). Ou seja, uma maior uniformidade na estrutura dinâmica da membrana em função da temperatura é induzida pela presença do colesterol em altas concentrações, o que pode ser associado com a conhecida capacidade do colesterol de abolir a transição de fase gel-fluida observada em membranas contendo apenas o fosfolípido DPPC. Por fim, vale ressaltar que os valores elevados tanto para R_{\perp} e S_0 são característicos da chamada fase de líquido-ordenado^{24,27},

que não poderia ser identificada apenas pela simples inspeção visual dos espectros de RPE mencionada inicialmente.

CONCLUSÕES

Os exemplos da seção anterior retratam uma série de aplicações do programa de ajuste espectral NLSL em alguns sistemas biológicos. Os resultados demonstraram que este programa é uma ferramenta eficiente para avaliar mudanças de mobilidade da cadeia polipeptídica de proteínas, fluidez e de ordenamento de membranas e vesículas, além de permitir estimar a polaridade das regiões onde os radicais nitróxidos estão localizados. Estas informações são valiosas uma vez que possibilitam fazer inferências em nível molecular destes sistemas.

AGRADECIMENTOS

Às agências financiadoras FAPESP e CNPq. D. de Sousa Neto é grato à FAPESP pela bolsa de mestrado e C. E. G. Salmon pela bolsa de pós-doutorado.

REFERÊNCIAS

- Berliner, L. J., ed.; *Biological Magnetic Resonance*, Plenum Press: New York, 1998, vol. 14.
- Perussi, J. R.; Ruggiero, A. C.; Tabak, M.; *Quim. Nova* **1985**, *8*, 313.
- Nordio, P. L. Em *Spin Labeling: Theory and Applications*; Berliner, L. J., ed.; Academic Press: New York, 1976, Cap. 2.
- Budil, D. E.; Lee, S.; Saxena, S.; Freed, J. H.; *J. Magn. Reson. A* **1996**, *120*, 155.
- Sousa Neto, D.; Salmon, C. E. G.; Alonso, A.; Tabak, M.; *J. Phys. Chem. B* **2006**, trabalho não publicado; Souza Neto, D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
- Queirós, W. P.; Sousa Neto, D.; Alonso, A.; *J. Controlled Release* **2005**, *106*, 374.
- Costa-Filho, A. J.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
- Hwang, J. S.; Mason, R.; Hwang, L. P.; Freed, J. H.; *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 489.
- Halpern, H. J.; Peric, M.; Yu, C.; Bales, B. L.; *J. Magn. Reson.* **1993**, *103*, 13.
- Bales, B. L. Em *Biological Magnetic Resonance*; Berliner, L. J.; Reuben, J., eds.; Plenum: New York, 1989, vol. 8, p. 77.
- Stoll, S.; Schweiger, A.; *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42.
- Berliner, L. J., ed.; *Spin Labeling: Theory and Applications*, Academic Press: New York, 1976, p. 564 e referências anexas.
- Atherton, N. M.; *Principles of Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood: New York, 1993, apêndice A7.
- Freed, J. H. Em ref. 12, Cap. 3.
- Yushmanov, V.; Tabak, M.; *J. Colloid. Interface Sci.* **1997**, *191*, 384.
- Budil, D. E.; Sale, K. L.; Khairy, K. A.; Fajer, P. G.; *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 3703.
- Jackson, J. D.; *Classical Electrodynamics*, 2nd ed., Wiley: New York, 1975, cap. 3.
- Schneider, D. J.; Freed, J. H. Em ref. 10, Cap. 1.
- Marsh, D.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 7777.
- Bloom, M.; Evans, E.; Morrissen, O. G.; *Q. Rev. Biophys.* **1991**, *24*, 293.
- Bloch, K. Em *Biochemistry of Lipid and Membranes*; Vance, D. E.; Vance, J. E., eds.; Benjamin/Cummings Publishing: Menlo Park, 1995, p. 25.
- Simons, K.; Ikonen, E.; *Nature* **1997**, *387*, 569; Brown, D. A.; London, E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 1; Brown, D. A.; London, E.; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 111.
- Field, K. A.; Holowka, D.; Baird, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 9201; Field, K. A.; Holowka, D.; Baird, B.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4280.
- Ipsen, J. H.; Karlstrom, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerstrom, H.; Zuckermann, M. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162.
- Vist, M. R.; Davis, J.; *Biochemistry* **1990**, *29*, 451.
- Ge, M.; Field, K. A.; Aneja, R.; Holowka, D.; Baird, B.; Freed, J. H.; *Biophys. J.* **1999**, *77*, 925.
- Ge, M.; Freed, J. H.; *Biophys. J.* **1998**, *74*, 910; Straume, M.; Litman, B. J.; *Biochemistry* **1987**, *26*, 5121; Shin, J. K.; Freed, J. H.; *Biophys. J.* **1989**, *55*, 537.