

SHIRLEY SCHREIER

ESTUDOS ESTRUTURAIS E DINÂMICOS DE MEMBRANAS PELO MÉTODO
DO MARCADOR DE SPIN

*Tese de Livre Docência
Instituto de Química
Universidade de São Paulo*

1979

À

ANA ROSA KUCINSKI

estão comigo as gravuras ricas de arte,
o livro de Oscar Wilde, o bule de chá;
mas, e os nosso papos, e a profunda pessoa
humana que você era?

AGRADECIMENTOS

Meus incomensuráveis agradecimentos a

meus pais

Giuseppe Cilento

Ian C.P. Smith

Antonio C.M. Paiva

Hernan Chaimovich

Walter Colli

Divo L. Sanioto

Szulim B. Zyngier

Wilson Gambeta

Yasco Aracava

José Roberto Ernandes

Clovis R. Nakaie

Ruth A. Ogawa

Marilene Demasi

Óhara Augusto

Roberto C. Baptista

Grupo do Prof. Cilento

Roxanne Deslauriers

Keith W. Butler

Carl F. Polnaszek

Anne Joyce

Maria Luiza Inoue

pelo apoio, incentivo, amizade, colaboração, paciência, aceitação.

Ana Valquíria de Amorim Pinto

Maria Manuela R. de C. Paupério

pela incrível dedicação no trabalho de datilografia

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tec
nológico

National Research Council do Canadá

pela ajuda financeira.

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO

Apresentação.....	1
A. Membranas.....	2
1. Membranas Biológicas.....	2
a. Modelos de Membranas.....	2
b. Assimetria de Membranas.....	5
c. Sistemas de Membranas mais Estudados.....	8
d. Reconstituição de Membranas.....	9
e. Movimentos de Componentes de Membranas.....	9
2. Membranas Artificiais, Fosfolipídios	
a. Generalidades.....	10
b. Liposomas.....	15
c. Vesículas.....	16
d. Multi-bicamadas Planas.....	18
e. Uni-bicamadas Planas.....	19
f. Monocamadas.....	21

B. O Método de Marcador de Spin

1. Histórico, Radicais Nitróxido.....	22
2. Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	23
3. Espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Nitróxidos.....	25
4. Marcadores de Spin.....	26
5. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Orientação - Parâmetro de Ordem.....	30
a. Determinação do Parâmetro de Ordem em Multi-bi- camadas Planas.....	33
b. Determinação do Parâmetro de Ordem em Liposomas e Vesículas.....	34
6. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Mobilidade - Tempo de Correlação Rotacional.....	35
7. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Polaridade do Meio-Parâmetro de Partição.....	39
8. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Concentração da Espécie Paramagnética.....	40

C. Contribuição do Método de Marcador de Spin ao Estudo de Membranas.

1. Membranas Artificiais.....	41
-------------------------------	----

a.	Organização Molecular.....	41
b.	Tipos de Movimento Molecular.....	42
i.	Rotação ao Redor do Eixo Longo Molecular....	43
ii.	Movimentos do Eixo Longo Molecular	44
iii.	Movimento de Segmentos Intra-Moleculares....	46
iv.	Difusão Lateral.....	48
c.	Temperatura de Transição de Fase de Fosfolípi- dios.....	49
d.	Fusão de Membranas.....	49
e.	Separação Lateral de Fases.....	50
i.	Termotrópica.....	50
ii.	Ionotrópica.....	51
f.	Interação a Nível de Membranas.....	51
2.	Membranas Biológicas.....	52
a.	Membranas Estudadas.....	52
b.	Interação Lipídio-Proteína.....	53
c.	Biossíntese de Fosfolipídios Marcados com Mar- cadores de Spin.....	54
3.	Reatividade de Marcadores de Spin.....	55
ii.	MATERIAS E METÓDOS	
a.	Compostos.....	56
b.	Equipamento.....	58
c.	Preparo das Amostras.....	59

1. Multi-bicamadas Planas.....	59
2. Liposomas.....	60
3. Vesículas.....	61
4. Amostras Contendo Glucagon Marcado.....	61
d. Registro dos Espectros.....	62

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Estudos de Caráter Estrutural.....	64
1. Características Estruturais para Formação de Bica- madas Organizadas por Compostos Anfifílicos.....	65
a. Estudos com Fosfolipídios.....	66
i. Efeito do pH.....	66
ii. Efeito de Ions.....	68
iii. Lisofosfatidil colina.....	71
b. Monoglicerídios.....	76
c. Diglicerídios.....	76
2. Efeito da Estrutura de Membranas sobre os Espectros de Marcadores de Spin que Sofrem Partição entre as Fases Lipídica e Aquosa.....	84
a. Fosfolipídios.....	87
i. Determinação da Concentração.....	88
ii. Avaliação do Tempo de Correlação Rotacional do Marcador na Membrana.....	89
iii. Espectros de TEMPO e pd-TEMPONA em Multi-bi- camadas Planas.....	92
b. Ácidos Graxos e Hidrocarbonetos de Cadeias Lon- gas.....	92

3. Influência da Estrutura de Membranas sobre Propriedades de Permeabilidade das Mesmas.....	100
a. A Cinética de Reação.....	104
i. Meias Vidas.....	104
ii. Energias de ativação.....	107
b. Localização dos Marcadores de Spin.....	109
c. Características de Permeabilidade de Bicamadas Lipídicas, Mecanismo de Permeação.....	110
d. Aplicabilidade do Princípio Envolvido no presente trabalho.....	113
B. Estudos de Interação com reagentes que Atuam ao Nível de Membranas.....	114
1. Efeito do Colesterol sobre a Estrutura de Membranas.....	114
a. Multi-bicamadas Planas de Fosfolipídios colina de Ovo.....	117
b. Liposomas de Fosfatidil colina de Ovo.....	123
c. Multi-bicamadas Planas de Dipalmitil fosfatidil colina.....	127
d. Liposomas de Dipalmitil fosfatidil colina..	131
2. Estudos a Frequência Variável do Efeito do Colesterol.....	133
a. Larguras das Linhas - O modelo do Spin Cambiante.....	136
b. Dependência de ΔH da Frequência,	139
c. Dependência de ΔH da Orientação em Relação ao Campo Magnético.....	139
d. Cálculo de Tempo de Correlação Rotacional.	142

3. Estudos de Efeitos Estruturais e da Reatividade de de Hidroperóxidos Lipídicos em Matrizes Membranas.....	147
a. Efeitos Estruturais.....	149
b. Reatividade.....	153
4. Interação entre Hidrocarbonetos Aromáticos e Membranas Lipídicas.....	158
5. Efeito do Antibiótico Poliênico Anfotericina B sobre a Estrutura e a Permeabilidade de Membranas Lipídicas.....	168
a. Estudos de Caráter Estrutural.....	175
i. Multi-bicamadas Planas.....	175
ii. Liposmas.....	176
b. Estudos de Permeabilidade.....	183
6. Interação entre o Hormônio Peptídico Glucagon e Membranas Lipídicas.....	191
C. Estudos com Membranas Biológicas.....	202
1. Biossíntese de Fosfolipídios por Sistema Enzimático de Mamífero.....	202
2. Estudos de Destruição do Paramagnetismo do Radical Nitróxido por Sistemas Enzimáticos de Membranas	210
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS	218
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	228

I - INTRODUÇÃO

Apresentação

O Método do Marcador de Spin (1-6), lançado por McConnell em 1965 (7), vem contribuindo de maneira significativa para o estudo de propriedades conformacionais de sistemas macromoleculares.

Grande parte dos trabalhos que utilizam o método encontram-se na área biológica, em particular, no campo de membranas.

Experimentos com Marcadores de Spin foram os primeiros a fornecer evidências diretas sobre os tipos de movimentos característicos de lipídios constituintes de membranas. Esses aspectos, bem como as vantagens e as limitações inerentes ao Método serão objeto do presente trabalho.

Pretende este trabalho apresentar os princípios do Método de Marcador de Spin, sua contribuição para o estudo de propriedades estruturais e dinâmicas de membranas e alguns resultados obtidos pela autora nesta área de investigação.

A. Membranas

Membranas são importantes elementos da arquitetura celular, constituindo-se em estruturas extremamente complexas tanto do ponto de vista de sua composição como do arranjo dos componentes. Por essa razão desenvolveu-se intensamente o estudo de sistemas modelos, os quais, por sua maior simplicidade, permitem uma melhor compreensão do comportamento de componentes de membranas ao nível molecular.

1. Membranas Biológicas

Membranas biológicas são constituídas principalmente de proteínas e lipídios. Açúcares, quando existentes, encontram-se ligados aos primeiros. O arranjo desses componentes nas membranas tem sido objeto de intensa investigação nas últimas décadas.

a. Modelos de Membranas

O experimento de Gorter e Grendel (8) em 1925, em que foi medida a área ocupada por lipídios extraídos de eritrócitos, levou à sugestão de que os lipídios de membranas se organizariam na forma de bicamadas. Micrografias eletrônicas de membranas biológicas indicavam uma região de baixa densidade eletrônica de cerca de 5 a 10 nm compreendida entre duas regiões de mais alta densidade eletrônica (9). Essas observações levaram Danielli e Davson (10)

a propor um modelo em que a região de baixa densidade eletrônica se constituiria em uma bicamada lipídica, coberta por proteínas (a região de mais alta densidade). Esse modelo, com a localização das proteínas apenas na superfície da bicamada, e portanto, ligadas aos lipídios por forças predominantemente eletrostáticas logo se revelou insatisfatório para explicar uma série de eventos que ocorrem ao nível de membranas, entre eles a permeação de solutos. O modelo foi então alterado criando-se canais proteicos intercalados na bicamada lipídica, que seriam responsáveis pela passagem de certos solutos (11). O modelo de Danielli e Davson permaneceu em uso como hipótese de trabalho durante longo tempo, ao mesmo tempo que surgiram na literatura vários outros modelos, tais como o de Lucy (12) que propunha a organização de lipídios em forma micelar ou o de Benson (13) que propunha que os lipídios se ligavam às proteínas de maneira caótica. Green e colaboradores (14) lançaram a idéia de que as proteínas se dividiriam em dois grupos, estruturais e funcionais, que desempenhariam papéis de acordo com sua classificação. Até a década de 60 o campo sofreu pouca evolução, principalmente devido a limitações das técnicas existentes: os lipídios são substâncias que se prestam pouco a medidas espectrofotométricas. Por outro lado, sendo membranas entidades particuladas, a dispersão da luz se constituía em mais um problema para a aplicação de várias técnicas de espectroscopia óptica.

Porém, com o advento da cromatografia em fase gasosa para análise química de lipídios e com o surgimento e aperfeiçoamento de várias técnicas espectroscópicas que permitiam agora o exame de membranas, a pesquisa no campo intensificou-se de forma exponencial, com a conseqüente ampliação do conhecimento dessas estruturas complexas.

Uma das técnicas que muito contribuiu para o estudo de propriedades físico-químicas de lipídios foi a calorimetria diferencial de varredura. Foi, de fato, um experimento executado com essa técnica por Stein e colaboradores (15) que forneceu evidências convincentes de que os lipídios de membranas se encontrariam na forma de bicamadas. Membranas obtidas de *Acholeplasma laidlawii* apresentaram dois picos de absorção de calor, um a cerca de 37°C e outro a cerca de 60°C, sendo apenas o primeiro reversível. Este foi atribuído a um fenômeno ocorrendo com os componentes lipídicos na forma de bicamadas e o outro à denaturação de proteínas. A reprodução do evento ocorrendo a 37°C com liposomas preparados com os lipídios extraídos das membranas foi considerada como confirmação da hipótese acima.

Medidas de raios X também vieram confirmar que grande parte dos lipídios de *Acholeplasma laidlawii* (16) e *Escherichia coli* (17) se encontram organizados em bicamadas.

A grande massa de trabalhos que começou a se avolumar no fim de década de 60, levou finalmente Singer e Nicolson (18) em 1972 a formular um modelo

geral de membranas - o do mosaico fluído (Fig. 1) - em que as proteínas se classificam em integrais e periféricas, sendo que as primeiras estariam imersas numa matriz fluída de lipídios, podendo atravessar a membrana total ou parcialmente, e ligando-se aos lipídios por interações predominantemente hidrofóbicas. As proteínas periféricas localizar-se-iam preferencialmente na superfície da membrana, interagindo com os lipídios por forças predominantemente eletrostáticas. Em vista disso, elas poderiam dissociar-se da membrana em soluções de elevada força iônica. Esse é o caso do citocromo c (19) em mitocôndrias e da espectrina (20), situada no lado citoplasmático de células vermelhas. Exemplos muito estudados de proteínas integrais que só podem ser extraídas com detergentes ou solventes orgânicos são o complexo da citocromo oxidase de mitocôndrias (21), da ATPase dependente de Ca^{++} e Mg^{++} de retículo sarcoplasmático (22), e da rodopsina situada nos segmentos externos de bastonetes (23).

b. Assimetria de Membranas

A presente década tem assistido a um avanço formidável na elucidação de propriedades organizacionais e dinâmicas dos componentes de membranas. Assim, a assimetria de membranas é um conceito que vem sendo muito explorado (24, 25). A assimetria tem sido verificada tanto em termos de diferenças entre o lado citoplasmático e o lado externo da membrana co-

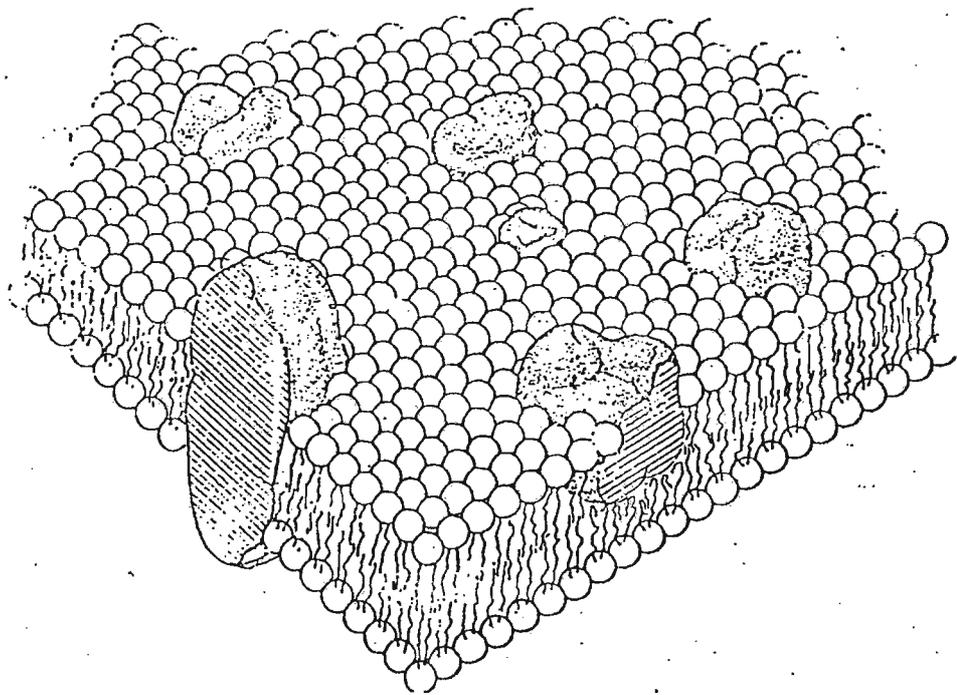


Fig. 1 Modelo do mosaico fluído de membranas.

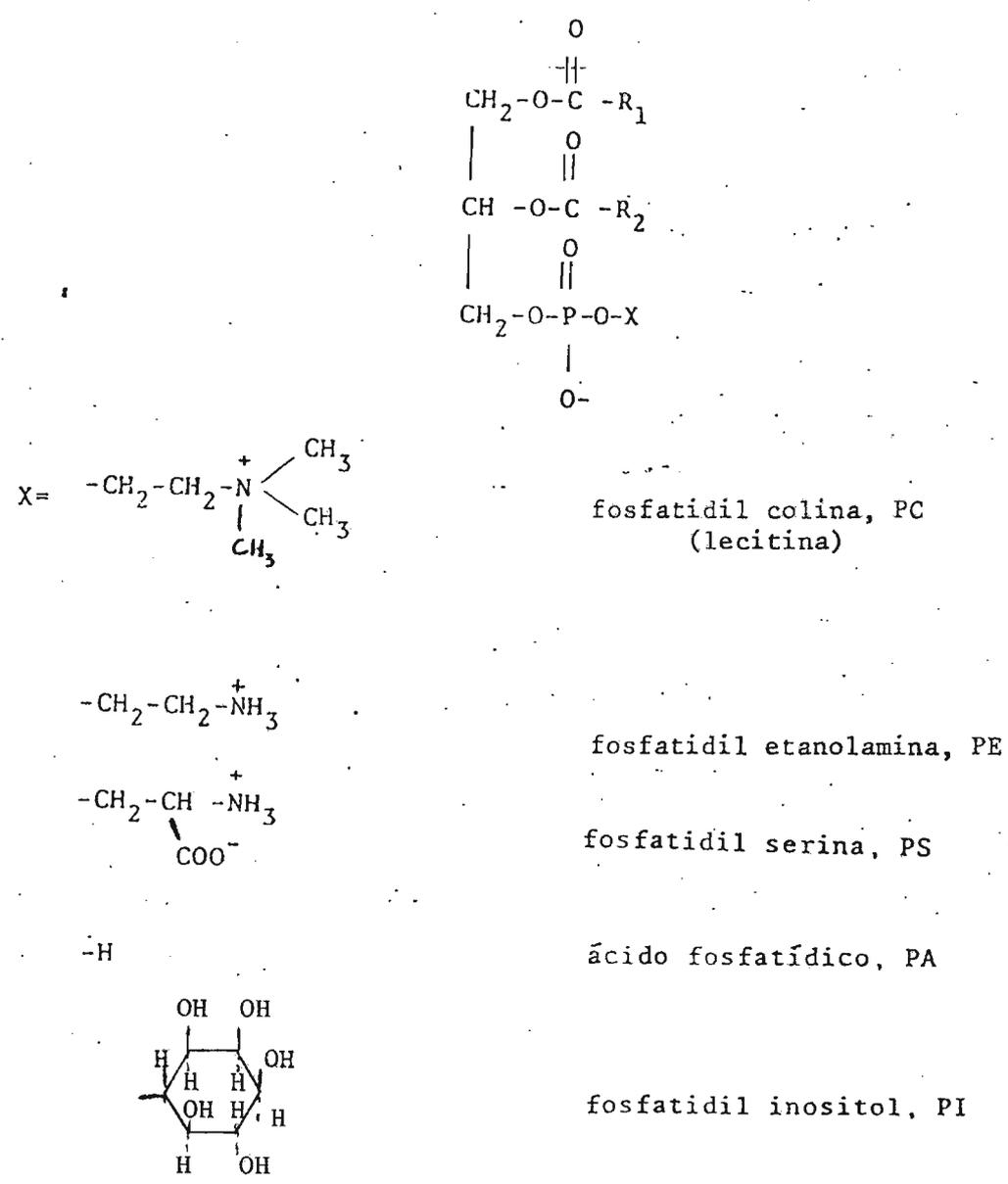


Fig. 2 Estrutura geral dos fosfolipídios e cabeças polares mais frequentemente encontradas.

mo em termos do arranjo de componentes em um dado lado.

Por exemplo, tem sido verificado que a parte sacarídica de glicoproteínas localiza-se sempre na face externa da membrana (26). O papel funcional dessa porção, que atua como receptor de uma série de agentes (27), explica essa localização. Também lipídios parecem dividir-se entre a superfície interna e externa da membrana por categorias. Assim, em eritrócitos, fosfolipídios como fosfatidil colina (Fig. 2) e esfingomielina (trimetilados no nitrogênio de cabeça polar) parecem encontrar-se predominantemente no lado externo da membrana, enquanto que fosfatidil etanolamina e fosfatidil serina (Fig. 2) parecem encontrar-se predominantemente no lado interno (28). Evidentemente esse arranjo heterogêneo teria papel funcional presentemente desconhecido e apresentando um problema interessante que se encontra atualmente em fase bastante especulativa que é o da biossíntese e posterior localização correta dos componentes (25).

Outro aspecto de assimetria é o do arranjo heterogêneo no plano da membrana. Nesse sentido, um fenômeno que tem sido alvo de muitos estudos recentes é o da separação lateral de fases de lipídios (29,30) ou de lipídios e proteínas (31, 32) promovido por ação de temperatura (33,34), íons ou pH (35) e vem sendo examinado através de microscopia eletrônica de fraturamento (36, 37) e pelo método do marcador de spin (38). Outro conceito que vem sendo experimental e teoricamente explorado é o de lipídio li

mítrofe a proteínas integrais que parece apresentar-se mais imobilizado do que o restante dos lipídios, (39 - 42).

c. Sistemas de Membranas mais Estudados

Muitos dos trabalhos executados com membranas biológicas empregam células vermelhas que apresentam a simplicidade de não possuírem outras estruturas membranosas além da membrana plasmática (43). Outro sistema membranoso de mamíferos utilizado é o de vesículas de retículo sarcoplasmático (44) que, devido à sua relativa simplicidade, são muito convenientes para o estudo de processos bioenergéticos, no caso o transporte ativo catalisado pela ATPase dependente de Ca^{++} e Mg^{++} . Também segmentos externos de bastonetes tem sido muito estudados (45).

Entre os microorganismos, *Acholeplasma laidlawii* (46), é muito empregado, pois além de não possuir parede celular, presta-se muito à obtenção de membranas de composição lipídica controlada através da seleção dos nutrientes do meio de cultura. *Escherichia coli* (47), é outro microorganismo bastante empregado, bem como células de levedura (48). Recentemente, bactérias cujos processos energéticos são dependentes de luz (49) também vem sendo estudadas com vistas a encontrar novas fontes de energia.

d. Reconstituição de Membranas

Entre as várias formas de abordar o estudo de membranas, o processo de reconstituição vem sendo bastante empregado (50). Este visa à reprodução de um aspecto funcional através da recombinação de um número limitado de componentes. Assim, por exemplo, tem-se verificado que a β -hidroxibutírico desidrogenase necessita para sua atividade do fosfolipídio fosfatidil colina (51).

e. Movimentos de Componentes de Membranas

Ao mesmo tempo que se tem verificado a existência de regiões heterogêneas no plano da membrana, e as diferenças entre os lados interno e externo, tem avançado de forma considerável o estudo da mobilidade dos seus componentes, tanto lateral (no plano da membrana) (52, 55) como transversal (flip-flop) (56-58). Vários tipos de experimentos (microscopia de fluorescência (52), ressonância paramagnética eletrônica (53, 54) foto-destruição de fluorescência (55)) tem indicado que diferentes componentes de membranas se deslocam no plano da membrana com diferentes coeficientes de difusão que dependem do peso molecular do componente e do tipo de membrana. Porém, a escala de tempo em que ocorre o fenômeno parece compatível com fenômenos de importância biológica que ocorrem ao nível da membrana.

Por outro lado, os dados relativos à mobilidade transversal são bastante diversos, variando de minutos (56) a dias (57, 58), dependendo do sistema, do componente e da técnica de medida.

As propriedades de mobilidade dos componentes de membranas, transversal, lateral, rotacional e segmental, bem como a alteração dessas propriedades por ação de agentes de importância fisiológica e farmacológica tem sido objeto de estudo cada vez mais pormenorizado de técnicas espectroscópicas altamente sofisticadas.

A complexidade qualitativa e organizacional de membranas biológicas levou à busca de sistemas modelos mais simples que facilitem a compreensão ao nível molecular do papel dos constituintes dessas membranas.

2. Membranas Artificiais, Fosfolipídios

a. Generalidades

Membranas modelos são em geral formadas por fosfolipídios. Fosfolipídios são compostos anfifílicos capazes de gerar mesofases esmécticas liotrópicas, isto é, em presença de um solvente, em geral água, organizam-se na forma de bicamadas onde a porção hidrofóbica das moléculas forma o "core" apolar e a porção iônica se encontra voltada para o meio aquoso intercalado entre as bicamadas (Fig. 3). A Fig. 2 mostra a estrutura geral dos fosfolipídios e as par-

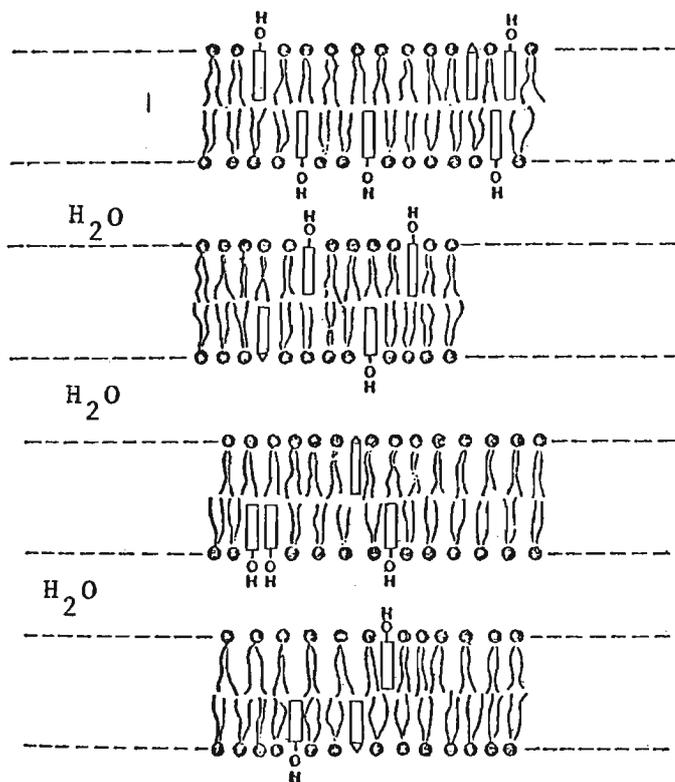


Fig..3 Aranjo de compostos anfifílicos em multi-bicamadas.

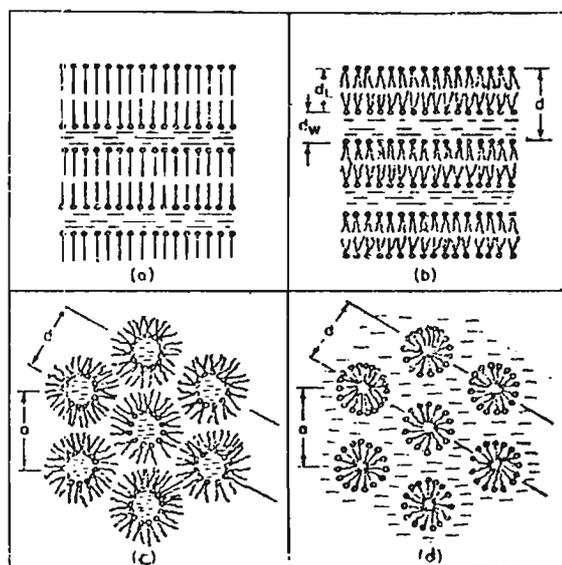


Fig. 4 Alguns tipos de organização de mesofases: a) lamelar, gel; b) lamelar, cristal líquido; c) hexagonal II; d) hexagonal I.

tes polares mais frequentemente encontradas.

A estrutura em bicamada (lamelas) é a de maior importância biológica em vista do fato que a maior porção dos fosfolipídios em membranas se encontra nessa forma de organização. Existem, contudo, outras formas possíveis, entre as quais hexagonal I e hexagonal II. Hexagonal II é formada em condições de alta concentração de lipídios e baixa concentração de água. Os lipídios formam longos cilindros, onde a parte central é constituída por água, em contacto com as cabeças polares. As caudas apolares se irradiam para as extremidades dos cilindros. Os cilindros se organizam em arranjo hexagonal, como visto na Fig. 4. A fase hexagonal I ocorre em concentrações baixas de lipídios e altas de água. Os cilindros, nesse caso tem a superfície coberta pelas cabeças polares que se encontram em contacto com a água, agora exterior ao cilindro, enquanto que as caudas apolares se irradiam para o centro. Aqui também os cilindros ocupam os vértices de um hexágono (Fig. 4).

Existem ainda outras possíveis formas de organização (fases) de compostos anfifílicos (59). Nem todas as formas ocorrem para um dado composto. A estrutura micelar é um caso extremo dentro dessas possibilidades.

Tem sido sugerido que estruturas diferentes da lamelar podem ocorrer em alguns processos a nível de membrana, por exemplo, no fenómeno de fusão de membranas. O mecanismo proposto para esse evento propõe que os lipídios da região onde ocorre a fusão se organizariam em estruturas semelhantes a micelas (60).

Fosfolipídios apresentam ainda propriedades termotrópicas (61). Uma característica muito importante desses compostos é a temperatura de transição de fase, T_c , onde ocorre passagem de uma fase de nominada gel para uma denominada cristal-líquido. Essa transição é descrita como sendo uma alteração na conformação das cadeias alifáticas dos fosfolipídios passando de uma condição de maior imobilidade (mais semelhante a um sólido) onde todas as ligações C-C são *trans* para uma de maior mobilidade (mais semelhante a um fluido), onde a probabilidade de isomerização *trans-gauche* tem valor finito. Além disso, para um dos lipídios mais estudados sob esse aspecto, a dipalmitil fosfatidil colina (DPPC) existem evidências de que, enquanto na fase gel, o eixo longo da molécula, ou a direção das cadeias alifáticas, forma um ângulo de cerca de 32° (62) a 35° (63) com a normal à superfície da bicamada.

Alguns fosfolipídios, entre eles a DPPC, apresentam também uma pré-transição à temperatura abaixo da T_c que tem sido interpretada de diferentes maneiras, desde uma alteração no arranjo da cabeça polar, com conseqüente variação no grau e forma de hidratação (64) até uma alteração no ângulo formado pelas cadeias alifáticas com a normal à bicamada, passando este a ter um valor zero (ou seja, as cadeias se tornam perpendiculares à superfície da membrana (65)).

A temperatura de transição é bem definida para fosfolipídios de cadeias homogêneas, sendo mais alta quanto maior e mais saturada a cadeia. Por ou-

tro lado, a heterogeneidade da composição das cadeias, como ocorre em fosfolipídios naturais, acarreta a observação de uma banda no estudo da temperatura de transição, ao invés de um pico agudo (61).

Quando existe uma mistura de fosfolipídios, estudos de variação de temperatura indicam que póde ocorrer separação de fases, e os diagramas de fase variam com a natureza e a complexidade das misturas (29,30,66-68).

O fenômeno de separação de fases vem sendo encarado como muito importante, tanto do ponto de vista estrutural como funcional em membranas biológicas.

Separação de fases ionotrópicas também foram verificadas (69-72), bem como aquelas induzidas por variação de pH (72). Essas poderiam ter significado fisiológico mais relevante do que as termotrópicas por ocorrerem à temperatura constante.

O estudo das formas sob as quais compostos anfifílicos podem organizar-se tem sido largamente efetuado através do emprego da técnica de raios X (59, 73,74)

Temperaturas de transição tem sido determinadas especialmente através de calorimetria diferencial de varredura (75). Microscopia eletrônica tem também contribuído para o conhecimento de características de sistemas modelos (76,77).

Mais recentemente várias técnicas espectrocópicas mais sofisticadas vem sendo empregadas para o estudo dessas e de outras propriedades estruturais e dinâmicas de membranas artificiais. Assim, medidas

de fluorescência (78, 79), dispersão de luz (80, 81) infra vermelho (82, 83), Raman (84-86), difração de neutrons (87,88) e ressonância magnética nuclear (89-95) e eletrônica (96-100), entre outras, vem sendo largamente empregadas no estudo desses sistemas.

b. Liposomas

Liposomas foram pela primeira vez descritos em 1965 (101) por Bangham. São preparados pela evaporação do solvente orgânico empregado para solubilizar os lipídios, em geral clorofórmio, clorofórmio-metanol, ou benzeno. O filme lipídico remanescente é suspenso em meio aquoso por agitação manual ou num Vortex. Isso dá origem a multi-bicamadas aproximadamente esféricas, cujo diâmetro máximo é variável (0,5-50 μm) (102) com água intercalada entre as bicamadas. A espessura da bicamada lipídica depende do comprimento e grau de saturação das cadeias alifáticas, bem como de o fosfolípido se encontrar abaixo ou acima de T_c (61). Acima de T_c a ocorrência de isomerização *trans-gauche* é um fator causador de aparente encurtamento das cadeias. Quando ocorre insaturação nos ácidos graxos formadores de fosfolipídios existentes em membranas, esta geralmente é *cis* (103), o que também produz encurtamento da cadeia além de criar um espaço contíguo ao "cotovelo" formado pelos carbonos da dupla ligação e vizinhos.

A fosfatidil colina de ovo, conjunto de fosfolipídios extraídos da gema do ovo que possuem em

comum a cabeça polar glicero-fosforil colina e cadeias de ácido graxo variadas (104), constitui um sistema muito empregado em estudos de membranas artificiais. Muitos dos trabalhos iniciais visavam ao estudo das propriedades de permeabilidade (105-108) dessas membranas com a finalidade de compará-las às de membranas biológicas. Em geral solutos permeantes, iônicos (106) ou não (107), eram incluídos nos compartimentos aquosos inter-lamelares por adição ao meio aquoso de dispersão dos lipídios, sendo a fração externa frequentemente removida por diálise. A passagem por coluna também é uma forma de remover solutos pequenos do meio aquoso externo aos liposomas (109).

Também o inchamento ou encolhimento (108) de liposomas por alteração de concentração de solutos eram examinados através de turbidez ou de absorbância.

c. Vesículas

A medida que se propagou o emprego de liposomas como sistemas modelos de membranas, foram surgindo as verificações das desvantagens por eles apresentadas. Entre essas, ocorria a heterogeneidade das preparações podendo variar o número de lamelas, e, assim, as dimensões dos liposomas, com as conseqüentes complicações nos estudos de permeabilidade.

Surgiram então idéias da preparação de membranas fosfolipídicas de uma só bicamada que separaria um compartimento aquoso interior do meio exte-

rior, numa analogia mais próxima à membrana plasmática celular.

O pioneiro desses estudos foi Huang que em 1969 descreveu a preparação e caracterização de vesículas uni-lamelares de fosfatidil colina de ovo através do emprego de ultra-som (110). Verificou-se que essas vesículas possuem forma aproximadamente esférica com diâmetros externo e interno de cerca de 25 e 15 nm, respectivamente. Essas vesículas eram obtidas após cerca de 2 h de ação do ultra-som. Foi observado que a introdução de uma pequena fração molar (4%) (111) de um composto com carga negativa como o ácido fosfatídico ou o fosfato de dicetila encurtava de maneira significativa esse tempo (0,5h). Seguiram-se a isso métodos que empregavam, ao invés do ultra-som, a injeção (112), sob condições específicas, de fosfolipídio em solvente orgânico, para o meio aquoso.

As tentativas de aprofundar o conhecimento desses sistemas levou à conclusão de que a grande curvatura dessas vesículas, além de afastar o modelo do sistema biológico, visto que células são entidades bem maiores, trazia ainda problemas específicos como a distribuição heterogênea entre a monocamada externa e a interna (113) de compostos, o que provavelmente não ocorreria no sistema vivo. Também possível seria ainda o empacotamento diferente das cadeias dos componentes da monocamada externa em relação à da interna (114). Resultados de Kornberg e McConnell sugerem que isso ocorre na região da cabeça polar (115).

Os últimos anos, em especial vem testemunhando o aparecimento de vários trabalhos que descrevem a preparação de vesículas (uni-lamelares), com ênfase no controle do tamanho das mesmas e visando a faze-las mais semelhantes a células vivas (116,117)

d. Multi-bicamadas Planas

Utilizando a técnica de deposição de lipídios em superfície originalmente descrita por Blodgett e Langmuir (118), Levine e colaboradores (119) prepararam multi-bicamadas planas de DPPC sobre lâminas de alumínio para estudos com raios X.

Os grupos de Jost e Griffith (120) e de Smith (121), descreveram o preparo de multi-bicamadas planas para estudos com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de espectros de marcadores de spin.

Multi-bicamadas planas podem ser obtidas por evaporação do solvente orgânico da solução de lipídios depositadas sobre uma superfície plana. Em geral os últimos resíduos de solventes são removidos a vácuo e a seguir é adicionado o meio aquoso, para hidratar o sistema. Em 1971, Jost e colaboradores (122) descreveram o preparo de multi-bicamadas planas através da evaporação de dispersões aquosa de fosfolipídios colocadas sobre uma superfície plana e aquecida a cerca de 40°C. Para medidas de RPE nas amostras eram depois colocadas em uma câmara de umidade controu

lada e a hidratação efetuada dessa maneira, em analogia com estudos com raios X em que se examinavam parâmetros dimensionais do sistema em função da umidade (123).

Liposomas, vesículas e multi-bicamadas planas são os sistemas empregados em estudos com marcadores de spin.

e. Uni-bicamadas Planas

Durante muito tempo, grupos de pesquisa originários de eletro-fisiologia procuraram desenvolver um sistema modelo de membrana em que pudessem reproduzir fenômenos de excitação nervosa e efetuar medidas elétricas relacionadas a variações de permeabilidade.

Em 1962 Mueller e colaboradores (124) descreveram a obtenção de um sistema que se prestava à finalidade desejada. Numa parede separando dois compartimentos aquosos onde se inseriam os eletrodos era perfurado um orifício de cerca de 1 mm de diâmetro. Sobre o orifício era pincelada uma solução de fosfolípido em solvente orgânico, em geral um hidrocarboneto de cadeia longa, como o n-decano. Essa pincelada deixava um filme que ia-se tornando mais fino o que era evidenciado por uma etapa em que ocorria difração da luz, até uma fase final em que a membrana se apresentava negra. Isso levou a crer que essas membranas negras de lipídios (black lipid membranes) teriam apenas uma bicamada. Muitos estudos se seguiu

ram fazendo uso dessas preparações (125-130). Em vários desses estudos foram empregados antibióticos como modelos de proteínas transportadoras de íons (125, 126). Foram ainda examinados efeitos de íons (127), pH (128), e de um material proteínáceo impuro (EIM, excitability inducing material) (129) que era capaz de induzir resposta dessas membranas. Mais recentemente, Montal e Muller (130) desenvolveram um método que tornou possível a preparação de membranas assimétricas isto é, o componente em contacto com um dos compartimentos aquosos difere daquele em contacto com o outro.

As membranas negras de lipídios apresentaram, contudo, sempre aspectos criticáveis. Por exemplo, não se sabe qual a fração de material depositado que realmente constitui a bicamada e quanto permanece fora formando o chamado "torus" à volta do orifício. Em muitos estudos foi empregado um lipídio que era denominado pelos autores de "colesterol oxidado" (131, 132). Além de não se conhecerem membranas biológicas em que o colesterol seja o único ou o principal componente lipídico, não é clara a constituição química do colesterol oxidado.

Finalmente, sempre foi mencionado a preocupação do desconhecimento da proporção de solvente orgânico que permanecia na membrana após o afinamento do filme. Estudos recentes com espectroscopia de fluorescência (133) demonstraram que grande quantidade de solvente permanece retida, fazendo com que as membranas lipídicas negras sejam mais es

peças do que liposomas e vesículas sugerindo que os resultados obtidos nos estudos com aquelas podem não ter grande significado com relação a sistemas biológicos.

O preparo de membranas lipídicas negras sem retenção do solvente foi recentemente descrito, fazendo-se uso de esqualeno (134) para solubilizar os lipídios.

f. Monocamadas

Monocamadas lipídicas são preparadas na interface que separa dois meios, em geral, água e ar, podendo também ser solvente orgânico e água. No caso da água e ar, lipídios são espalhados na superfície aquosa de um assim chamado poço de Langmuir. Devido ao seu caráter anfifílico, as moléculas se orientam com a parte polar na água e a cauda apolar no ar. São comuns estudos da área ocupada por molécula em função de uma pressão aplicada (135). Quando se deseja estudar o efeito de um agente, ele é introduzido sob a monocamada na solução aquosa. Quando o efeito da variação de pressão sobre a área molecular é pequeno o filme é dito condensado. Quando é o oposto, o filme é dito expandido.

Medidas de variação de potencial por um eletrodo colocado acima da monocamada também são utilizadas para obter informações sobre o sistema (136).

B. O Método de Marcador de Spin

O Método de Marcador de Spin (Spin Label) (1-6) consiste no emprego de uma molécula repórter, através de cujo espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) se procura obter informação de caráter estrutural a respeito do sistema ao qual a molécula repórter se encontra ligada.

A possibilidade de obter informações de natureza conformacional, especialmente a respeito de macromoléculas ou agregados moleculares reside no fato de a ressonância paramagnética eletrônica ser uma técnica que opera na região de micro-ondas (9,24,35 GHz) do espectro eletromagnético, (137, 138), o que corresponde à frequência de movimentos translacionais, rotacionais e (ou) segmentais das estruturas em estudo.

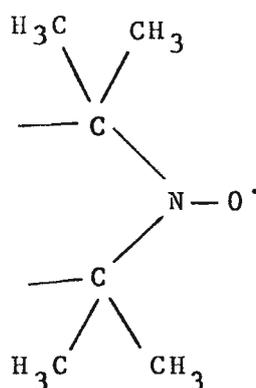
1. Histórico, Radicais Nitróxido

O primeiro experimento baseado no princípio do Marcador de Spin consistiu na introdução do radical cátion da cloropromazina em moléculas de ácido desoxi-ribonucleico (7).

Porém, uma das dificuldades de aplicação da técnica de ressonância paramagnética eletrônica consiste no fato de que ela depende da presença de um eletron livre, e é amplamente conhecido o fato de que radicais são espécies instáveis devido à sua alta reatividade.

Uma vez que o maior interesse é o de se poder estudar estruturas de importância biológica em con

condições de pH e temperatura na região da fisiológica, bem como em meio aquoso, tornou-se necessário desenvolver a busca de radicais livres que fossem estáveis nessas condições de trabalho. Os radicais nítróxido mostraram-se extremamente adequados aos requisitos acima.



A presença de grupos metila nos carbonos vizinhos ao átomo de nitrogênio confere estabilidade adicional ao radical permitindo a realização de estudos espectroscópicos em condições semelhantes às fisiológicas. Muitos dos estudos das propriedades químicas de nítróxidos tem sido efetuados pelo grupo de Rosantzev (139), e o grupo Rassat (140,141) tem também contribuído muito para o estudo de propriedades físico-químicas e espectroscópicas desses compostos.

2. Ressonância Paramagnética Eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica espectroscópica que depende da presença de radicais e se baseia na aplicação de um campo magnético, H , sob a ação do qual os níveis de energia do momento magnético de spin (M_s) se tornam divergentes (Fig. 5), (137, 138). Se, agora, for aplicada a energia adequada

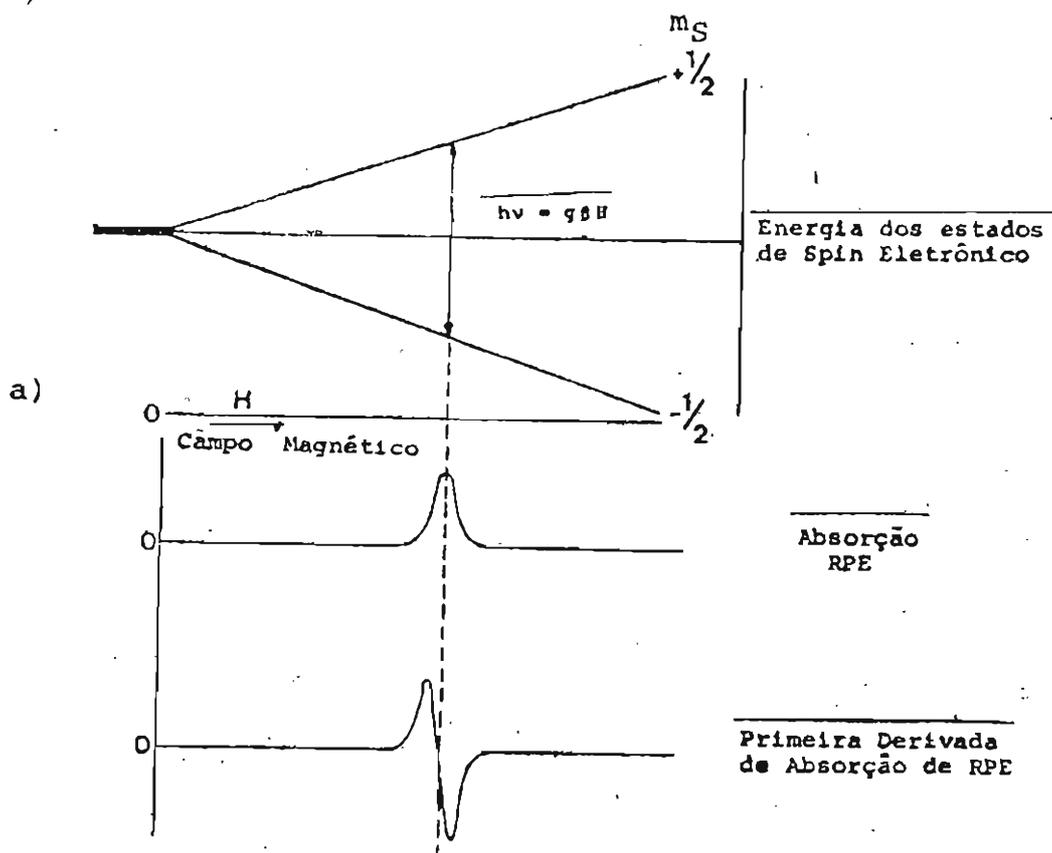


Fig. 5 Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico em presença de um campo magnético. Os espectros de RPE registraram, em geral, a derivada primeira da absorção.

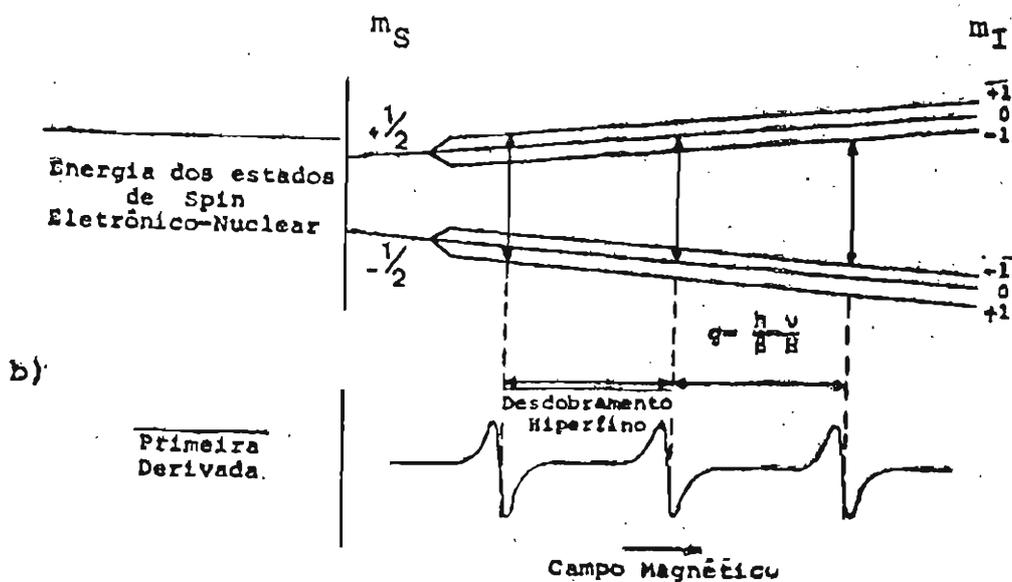


Fig. 6 Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico para um átomo com spin nuclear ($I=1$). A separação entre as linhas espectrais mede o desdobramento hiperfino.

($h\nu$, Fig. 5) é possível induzir a transição entre os dois níveis. Essa absorção de energia vai gerar um espectro, que normalmente é registrado na forma da derivada primeira da absorção (Fig. 5).

Em geral, o campo aplicado é de cerca de 3 kG e a frequência de microondas é de cerca de 9 GHz (espectrometro de banda X). O espectrômetro de banda K opera a 24 GHz e o de banda Q a 35 GHz.

3. Espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Nitróxidos

A energética das transições envolvendo momento magnético de spin pode ser representada através da hamiltoniana de spin, a qual é expressa pela equação (1):

$$\mathcal{H} = \beta_e \bar{H} \cdot \hat{g} \cdot \hat{S} + \hat{S} \cdot \hat{T} \cdot \hat{I} - \beta_N \bar{H} \cdot \hat{g}_N \cdot \hat{I} + \mathcal{H}_{\text{troca}} + \mathcal{H}_{\text{dipolo}} \quad (1)$$

onde o primeiro termo representa a interação eletrônica de tipo Zeeman, o segundo a interação hiperfina (spin eletrônico-spin nuclear), o terceiro a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (que é desprezível nas condições normais do experimento de RPE) e $\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ representam as energias envolvidas em interações entre eletrons livres, que só ocorrem em bi- ou poli-radicaís ou em concentrações elevadas de mono-radicaís. $\mathcal{H}_{\text{troca}}$ depende da interpenetração das orbitais dos radicaís e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ depende da geometria do sistema,

uma vez que envolve uma dependência angular. Na equação (1), \vec{H} é o vetor de campo magnético, β_e e β_N são os magnetons eletrônico e nuclear, respectivamente, \bar{g}_N é o fator de desdobramento nuclear Zeeman, \bar{g} é o tensor g do elétron, \hat{S} é o operador de momento angular do spin do elétron, \hat{I} é o operador de momento angular de spin nuclear e \bar{T} ou (\bar{A}) é o tensor de desdobramento hiperfino.

Em radicais nítróxido, a maior parte da densidade eletrônica está localizada no átomo de nitrogênio. O isótopo mais abundante do nitrogênio, ^{14}N , possui spin nuclear $=1$ ($I=1$), podendo na presença de um campo magnético apresentar três valores para o momento magnético de spin nuclear ($M_I = -1, 0 + 1$). A interação entre o spin nuclear e o spin eletrônico dá origem ao desdobramento hiperfino (segundo termo da equação (1)). O spin nuclear $=1$ ($I=1$) causa o desdobramento de cada nível energético de spin eletrônico em três (Fig. 6). Portanto, na ausência de interações spin eletrônico-spin eletrônico ($\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}=0$), podem-se observar três transições, uma vez que somente transições com $\Delta M_I=0$ são permitidas. A separação entre as linhas é o desdobramento hiperfino.

4. Marcadores de Spin

Este trabalho ater-se-á ao emprego de marcador de spin de natureza lipídica ou aquo-solúveis. Passaremos, no entanto, uma breve revista dos marcadores de spin para grupos presentes em proteína.

Em geral, marcadores de spin para proteínas são ligados às mesmas através de ligação covalente. Os mais comuns possuem grupamentos que reagem com grupos -SH, tais como iodo-acetamida ou N- etil maleimida. A seletividade às vezes não é total, podendo grupos -NH₂ livres reagir também (142). Além disso, foram descritos marcadores seletivos para tirosina (143), para serina, (144) etc.

Marcadores de spin de natureza lipídica são empregados para o estudo de membranas artificiais ou para o exame de porções lipídicas de membranas biológicas. Estes são apenas intercalados de maneira física, em baixa concentração, tornando-se mais um constituinte da porção lipídica. Os marcadores de spin lipídicos comercialmente encontrados são derivados de ácidos graxos ou esteróides.

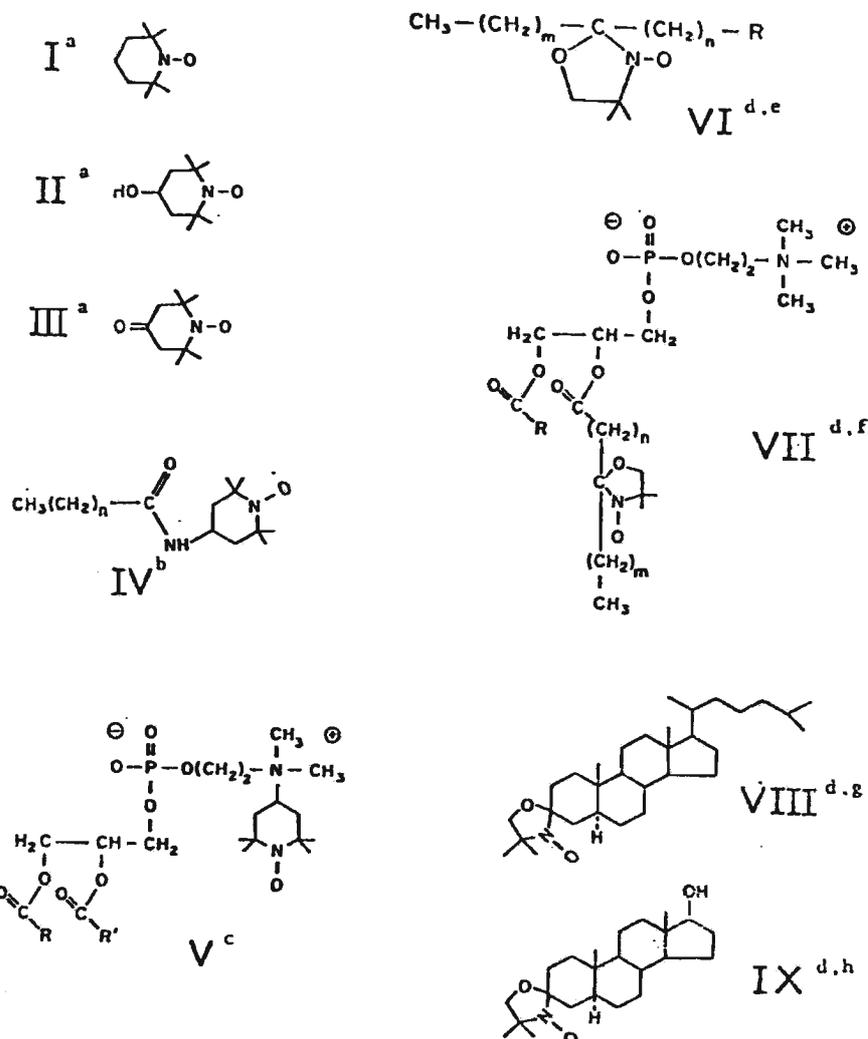
Em alguns laboratórios outros marcadores tem sido sintetizados, especialmente derivados de fosfolipídios (69-71, 11, 145-147). A tabela I mostra alguns dos marcadores de spin lipídicos mais comumente empregados no estudo de membranas.

A Fig. 7 mostra a orientação do sistema de coordenadas do grupo N-O para um marcador de spin em que o grupamento paramagnético se encontra localizado ao longo de uma cadeia alifática, como em ácido graxos e fosfolipídios, e o mesmo sistema de coordenadas para um marcador de natureza esteroídica. Verifica-se que no primeiro caso o eixo z é paralelo ao eixo longo da molécula, enquanto que no segundo, é o eixo y.

Quando tais moléculas são intercaladas em bi

TABELA - I

Alguns Marcadores de Spin Empregados no Estudo de Membranas



- a- I= TEMPO, II= TEMPOL, III= TEMPONA, são derivados da 2,2,5,5 - tetra metil piperidina-N-oxil.
- b- IV= estrutura geral dos N-TEMPO amidas de ácidos graxos; quando o ácido é o esteárico, o marcador é simbolizado por SSL.
- c- V= marcador de spin derivado da fosfatidil colina, marcador na cabeça polar
- d- VI-IX= contém o grupamento 2,2-dimetil-N-oxil-oxazolidina.
- e- Mais comumente R = -COOH, -COOCH₃. Quando R= - COOH, e a cadeia tem 18 átomos de carbono, os marcadores mais empregados são o 5-, 12 e 16-SASL (stearic acid spin label), onde os números representam a posição na cadeia onde o anel oxazolidinina está ligado.
- f- VII= fosfatidil colina contendo cadeia de ácido graxo com anel oxazolidino
- g- VIII= derivado marcado do colestano (CSLP)
- h- IX= derivado marcado do androstan -17β-ol-(ASL).

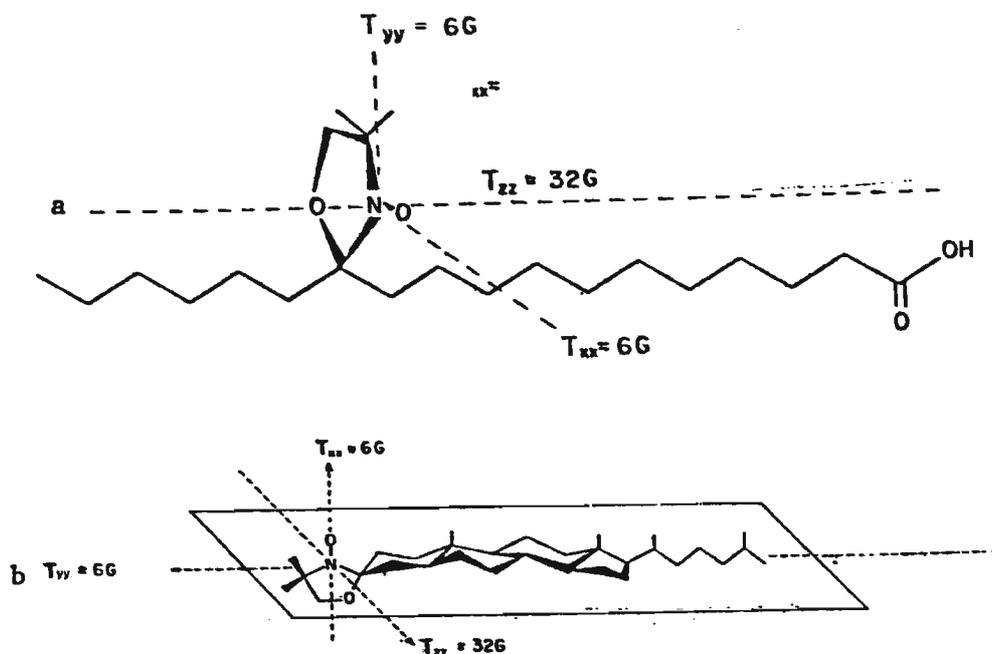


Fig. 7 Sistemas de coordenadas para radical N-O em um marcador de spin a) derivado de ácido graxo e b) esteróidico.

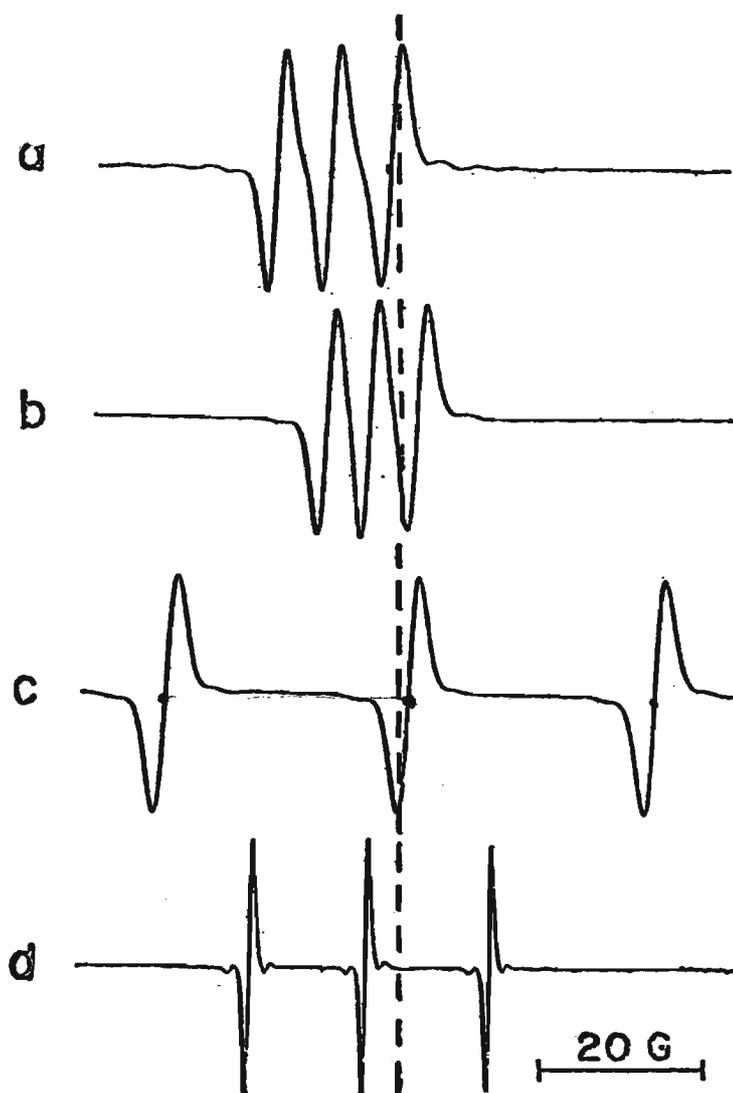


Fig. 8 Espectro de um marcador de spin introduzido em um mono-cristal de um composto diamagnético a) campo magnético paralelo ao eixo x do nitroxídeo; b) idem, eixo y; c) idem, eixo z; d) espectro do marcador de spin em um solvente de baixa viscosidade.

camadas, a tendência, devido à estrutura química, é de elas se orientarem com seus eixos longos aproximadamente paralelos à normal à bicamada, com as previsíveis consequências para a natureza dos espectros obtidos.)

A tabela I apresenta também as estruturas de alguns marcadores de spin que apresentam tendência de sofrer partição entre os meios aquoso e membranoso e cujas propriedades espectrais são discutidas na Sec. I.B.7.

5. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Orientação - Parâmetro de Ordem

A natureza tensorial de g e T gera uma dependência dos espectros de RPE da orientação da amostra (anisotropia) exceto nos casos de soluções, (ver Sec. I.B.6) em relação ao campo magnético.

Podemos atribuir ao grupo nitróxido um sistema de coordenadas de sorte que o eixo x é paralelo à ligação N-O, o eixo z é paralelo à orbital $2p_{\parallel}$ que contém a maior parte da densidade eletrônica do elétron desemparelhado, ficando o eixo y perpendicular aos outros dois (Fig. 7). Em geral esses eixos coincidem com as direções dos componentes principais dos tensores g e T (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} e T_{xx} , T_{yy} , T_{zz} , Fig.7) É possível determinar os valores de g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , T_{xx} , T_{yy} e T_{zz} , introduzindo radicais nitróxido como impurezas substitucionais em mono-cristais de compostos semelhantes diamagnéticos e estudando os espectros em função do ângulo entre o mono-cristal e o campo magnético aplicado (148). Uma análise dos valores obtidos a diferen-

tes orientações permite obter os valores principais. A Fig. 8 mostra os espectros de um radical nitróxido em um monocristal, obtidos quando o campo magnético aplicado é paralelo aos eixos x, y e z. Pode-se notar como variam os valores de g (posição das linhas no campo magnético) e T (o desdobramento hiperfino). A tabela II mostra os valores de g e T mais comumente encontrados.

A anisotropia de g e T é a base do cálculo de parâmetros de ordem em membranas.

O parâmetro de ordem é uma medida da orientação molecular em relação a um eixo de referência (o diretor). Este eixo em geral é tomado como a normal à superfície da membrana, embora em alguns casos tenha sido sugerido que ele é inclinado com relação à normal (184). A orientação preferencial, dada por um ângulo β com relação ao diretor, pode ser interpretada como se originando de um pseudo-potencial de interação devido a ação de todas as moléculas sobre uma dada molécula (150).

O parâmetro de ordem é definido com a média para o conjunto de moléculas:

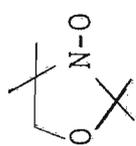
$$S = \frac{\langle 3\cos^2 \beta - 1 \rangle}{2} \quad (2)$$

Seelig (151) demonstrou que o parâmetro de ordem para um marcador de spin em membranas pode ser calculado através da medida do desdobramento hiperfino do espectro de RPE.

TABELA II

Principais valores dos tensores de desdobramento hiperfino e g de nitróxidos orientados em cristais diamagnéticos

Nitróxido	Cristal diamagnético	A_{xx} (G)	A_{yy} (G)	A_{zz} (G)	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	Referência
CSL	Cloreto de colestera	$6,3 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,2$	$31,9 \pm 0,1$	$2,0090$	$2,0060$	$2,0024$	149
						$\pm 0,0001$		
	Tetra metil-1,3-ciclo butano-di-ona	5,9	5,4	$32,9 \pm 0,5$	$2,0088$	$2,0058$	$2,0022$	148
						$\pm 0,0005$		



a. Determinação do Parâmetro de Ordem em Multi-bicamadas Planas

A fim de calcular o parâmetro de ordem para um marcador de spin intercalado em multi-bicamadas planas é necessário obter os espectros com o campo magnético orientado perpendicular e paralelamente à superfície das membranas. Nesse caso T'_{\parallel} e T'_{\perp} são respectivamente o desdobramento hiperfino medido com o campo magnético paralelo (0°) e perpendicular (90°) à normal à bicamada. Para um marcador de spin orientado com seu eixo longo molecular paralelo à normal à bicamada onde o eixo longo molecular coincide com a direção do componente principal do tensor hiperfino T_{zz} , o parâmetro de ordem é dado por:

$$S = \frac{T'_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{zz} - (T_{xx} + T_{yy})/2} \quad (3)$$

Às vezes torna-se necessário usar um fator de correção que leva em conta a polaridade do meio (145).

A expressão varia quando o eixo longo molecular do marcador de spin coincide com outros componentes principais do tensor hiperfino.

A derivação do parâmetro de ordem não envolve explicitamente as velocidades de movimento do marcador de spin (145). Pressupõe, contudo, que eles são rápidos na escala de tempo do experimento (ver Sec. I.B.6.), isto é, pressupõe simetria cilíndrica

ao redor do eixo longo da molécula.

Os valores de $T'_{||}$ e T'_{\perp} podem ser afetados pela existência de uma distribuição de eixos de orientação em relação à normal à bicamada caracterizada por um ângulo de espalhamento (5,63,122,149,152-154) ou pela ocorrência de uma inclinação do eixo de orientação em relação à normal à bicamada (63,149,184). Neste último caso, os valores de $T'_{||}$ e T'_{\perp} podem ser encontrados efetuando-se um estudo completo da dependência angular dos espectros em relação ao campo magnético aplicado (63,148).

b. Determinação do Parâmetro de Ordem em Liposomas e Vesículas.

Os espectros de marcadores de spin intercalados em liposomas e vesículas representam a soma dos espectros de todas as possíveis orientações do eixo longo da molécula em relação ao campo magnético aplicado. Embora haja distribuição isotrópica dos lipídios (a amostra é macroscopicamente isotrópica), os espectros que se somam refletem a orientação de cada molécula. Hubbell e McConnell (145) demonstraram que os espectros de certos marcadores de spin nesses sistemas apresentam pontos dos quais é possível extrair $T'_{||}$ e T'_{\perp} e, portanto, calcular o parâmetro de ordem (ver Fig. 36).

6. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Mobilidade-Tempo de Correlação Rotacional.

Moléculas esféricas em fluidos isotrópicos em geral possuem movimento isotrópico. Esse movimento é caracterizado por um tempo de correlação rotacional τ . Se o movimento é rápido na escala de tempo do RPE ($\tau < 10^{-9}$ s), o espectro de um marcador de spin apresentará valores de g e de desdobramento hiperfino (a_N) que são as médias dos principais valores dos respectivos tensores (Fig. 8).

A velocidade do movimento determina a largura das linhas espectrais. Estas são estreitas para movimentos rápidos e vão se alargando à medida que o movimento se torna mais lento (Fig.9). Quando a frequência do movimento se torna comparável à diferença entre os valores principais de T ou g (medidos em unidades de frequência), obtém-se linhas de formas mais complexas. No caso extremo, quando o movimento molecular é lento na escala de tempo do experimento ($\tau > 3 \cdot 10^{-7}$ s), cada molécula contribui um espectro individual, obtendo-se um espectro resultante que representa a soma de todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético. Espectros desse tipo são chamados espectros de pó.

→ É possível calcular o tempo de correlação rotacional a partir das larguras e alturas das linhas espectrais. A teoria que foi desenvolvida para o cálculo de τ gera dois valores, denominados τ_B e τ_C , a partir de duas expressões diferentes (156,157). As expressões

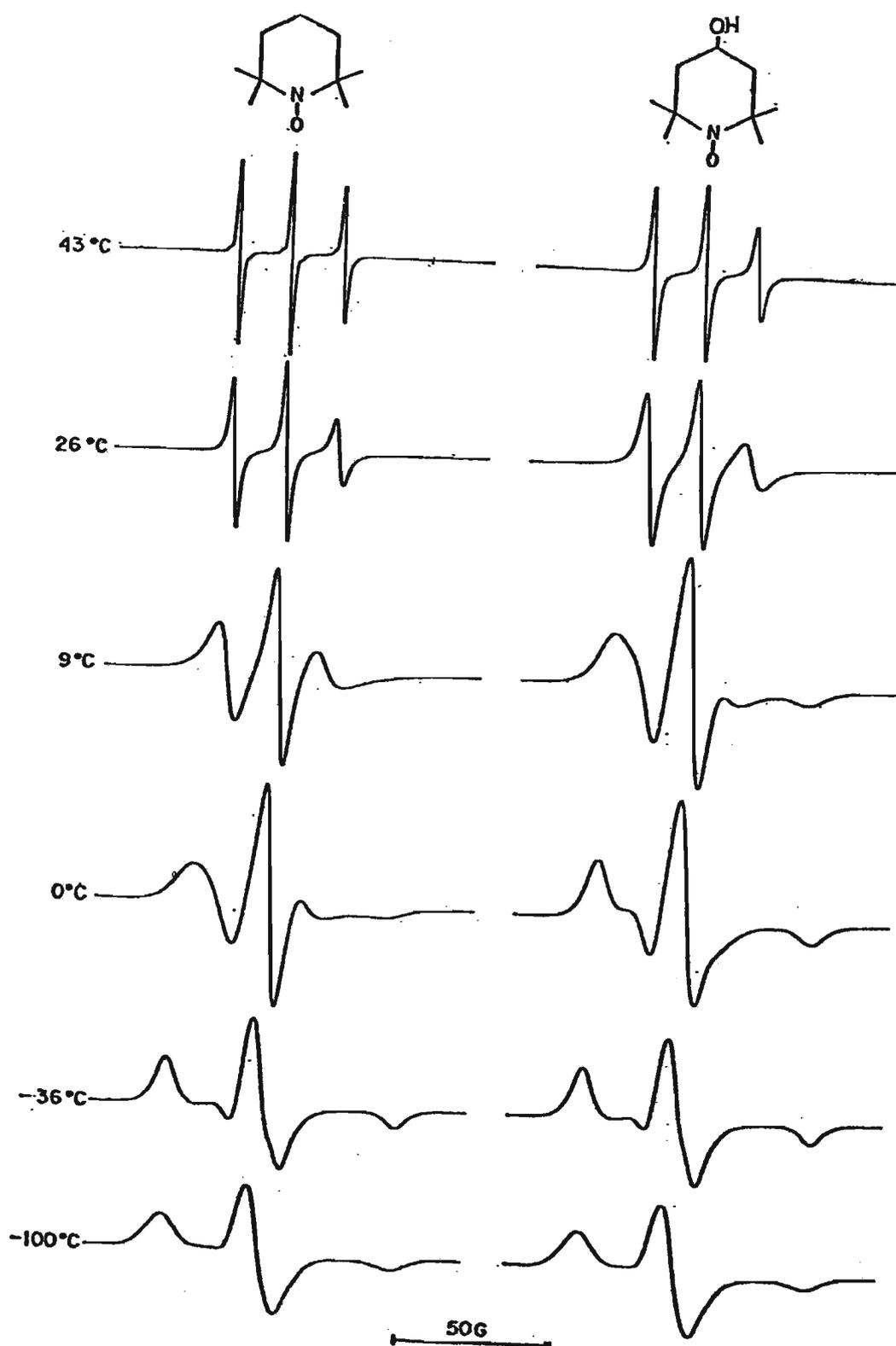


Fig. 9 Espectros de marcadores de spin TEMPO e TEMPOL em glicerol

para o cálculo de τ_B e τ_C se aplicam de maneira rigorosa apenas para o caso do movimento perfeitamente isotrópico e no intervalo $5 \cdot 10^{-11} < \tau < 10^{-9}$ s. Nesse caso, dever-se-ia obter $\tau_B = \tau_C$.

Verifica-se, porém que, mesmo em meios isotrópicos, frequentemente $\tau_B \neq \tau_C$ (157-160). Isso se deve ao fato de que, devido a existência de um eixo preferencial de rotação e/ou a movimento intra-molecular, o movimento é anisotrópico. Nesse caso, foi desenvolvida teoria que analisa os espectros em termos de dois tempos de correlação $\tau_{||}$ e τ_{\perp} que caracterizam, respectivamente, o tempo de rotação ao redor de um eixo molecular principal e o tempo de rotação do próprio eixo (157-160).

Em sistemas de membranas, a anisotropia do movimento se torna uma imposição do próprio meio. Apesar disso, as equações empregadas para cálculo de τ_B e τ_C tem sido utilizadas para analisar espectros de marcadores de spin em membranas (161), quando esses espectros apresentam linhas estreitas, indicativas de alta mobilidade e quando se observa que o parâmetro de ordem é muito baixo (impossível de ser determinado através do espectro, às vezes).

O cálculo de τ a partir das larguras e alturas das linhas espectrais pode ainda fornecer valores errados devido a contribuição para a forma das linhas de outros fatores. Foi claramente demonstrado que o desdobramento hiperfino não resolvido devido a prótons existentes na molécula pode resultar em erros considerá

veis no cálculo de τ (162).

Valores de Υ podem às vezes ser calculados para marcadores de spin em membranas (154,163,164). Se caracterizarmos o movimento da molécula por dois tempos de correlação Υ_{\parallel} e Υ_{\perp} (onde as definições são as mesmas da p.36) e se Υ_{\perp} for muito longo ($>10^{-7}$ s), pode ser calculado do espectro de multi-bicamadas planas tirado com o campo magnético perpendicular à normal à bicamada. Nesse caso determinam-se os parâmetros B e C (150):

$$B = 1,22 \times 10^{-7} \text{ g H } \left(\frac{1}{g_{xx}} - \frac{1}{g_{zz}} \right) (a_{zz} - a_{xx}) \quad (4)$$

$$C = 0,61 \times 10^7 (a_{zz} - a_{xx})^2 \quad (5)$$

$$\text{onde } g = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) / 3 \quad (6)$$

Essas equações são válidas para $\Upsilon_{\parallel} < 3 \cdot 10^{-9}$ s.

Para rotação ao redor do eixo y (como é o caso dos marcadores de spin de natureza esteroídica).

$$\Upsilon_{\parallel} = -2,82 \times 10^{-10} B \quad (7)$$

$$\text{e } \Upsilon_{\parallel} = 2,25 \times 10^{-10} C \quad (8)$$

$$\text{onde } B = 1/2 \Delta H_0 (\sqrt{I_0/I_{+1}} - \sqrt{I_0/I_{-1}}) \quad (9)$$

$$\text{e } C = 1/2 \Delta H_0 (\sqrt{I_0/I_{+1}} + \sqrt{I_0/I_{-1}} - 2) \quad (10)$$

onde ΔH_0 é a altura pico a pico da linha de campo médio medida em gauss e I_1 , I_0 , I_{-1} são respectivamente

as alturas das linhas de campo baixo, médio e alto.

Pode-se notar que as unidades de τ são segundo x ra-
diano⁻¹; contudo, geralmente τ é dado apenas em segundos.

Mailer e colaboradores (164) também apresentara
ram as bases para o cálculo do tempo de correlação τ
para marcadores de spin em membranas através de um modelo
simples que considera o eletrôn livre como sendo capaz
de saltar entre estados caracterizados por diferentes
parâmetros espectrais (fator g e desdobramento hiper-
fino). A forma pela qual estes estados determinam a
forma das linhas espectrais depende do tempo de corre-
lação rotacional da molécula. Este tratamento será discu-
tido mais pormenorizadamente na Sec. II. B.2.

7. Dependência dos Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Polaridade do Meio-Parâmetro de Partição

Rassat e colaboradores já em 1965 (140) mos-
traram como os valores de g e T dependem da polaridade
do meio, os primeiros decrescendo e os últimos aumen-
tando com o aumento da polaridade.

Esse efeito serviu de base para a proposta
da localização dos grupamento N-O de diferentes marca-
dores de spin em membranas (151) e também para um estudo
do perfil de hidrofobicidade da membrana (165).

Além disso, no caso de marcadores de spin
que, devido à sua estrutura, são capazes de sofrer par-
tição entre o meio aquoso e a membrana (166), as dife-
renças entre g e desdobramento hiperfino podem gerar
espectros em que as três linhas espectrais se encon-

tram resolvidas para cada meio (167). Mais comumente, observa-se resolução apenas da linha de campo alto, ainda assim com alguma superposição dos espectros correspondente aos dois meios (166). Apesar disso, foram definidos parâmetros de partição do marcador de spin, (30,168) baseados em medidas de alturas das linhas relativas às fases membranosa e aquosa e vários fenômenos tem sido estudados com base em variações desses parâmetros de partição. Entre esses fenômenos citam-se transições de fase gel-cristal líquido (30,54,169,170) separação lateral de fases em misturas de fosfolipídios (30, 66-68) e em membranas (171,172) e formações de ilhas de agregado em membranas modelos e biológicas (168).

Na Sec. III A.2 será discutido o emprego desses parâmetros de partição e os erros que podem ser introduzidos devido à medida de alturas como sendo proporcionais à concentração.

8. Dependência de Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Concentração da Espécie Paramagnética

Na apresentação da equação (1) foi indicado que dois termos, $\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$, estão relacionados com a ocorrência de interação spin eletrônico - spin eletrônico. Foi também colocado que $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ apresenta uma dependência angular. Isto significa que contribuições devidas a $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ podem aparecer em espectros de marcadores de spin intercalados em membranas (53,54, 173,174). No caso de soluções isotrópicas, a expressão da dependência angular faz com que o termo $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ de

sapareça.

Foi observado também que $\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ devem ser considerados no caso de bi ou poli-radicais (175). No caso de mono-radicais, esses termos só se tornam importantes quando a concentração da espécie paramagnética é alta.

Os efeitos espectrais introduzidos por essas interações podem ser úteis no estudo de membranas e alguns serão citados na Sec. III.A.1.

Uma aplicação importantíssima de interações spin eletrônico-spin eletrônico consistiu no emprego do fenômeno para demonstração da ocorrência de difusão lateral de lipídios em membranas e para determinar o coeficiente de difusão (53,54,174,176-178).

Contribuição do Método de Marcador de Spin ao Estudo de Membranas.

1. Membranas Artificiais

a. Organização Molecular

Inúmeras revisões tratam da aplicação do Método de Marcador de Spin ao estudo de membranas (6,150,155,179-183). O primeiro trabalho data de 1968 (166) e é de autoria de Hubbell e MacConnell. Nesse trabalho, os autores introduziram o marcador TEMPO no nervo de caminhar de lagosta. Num raciocínio análogo ao de Steim e colaboradores (15) (o fato de que o espectro obtido era semelhante ao fornecido por

dispersões lipídicas), Hubbell e McConnell propuseram que a porção lipídica da membrana do nervo se constituía também de bicamadas.

b. Tipos de Movimento Molecular

i. Rotação ao Redor do Eixo Longo Molecular

Até 1969, as únicas informações disponíveis para propriedades de lipídios em membranas ao nível molecular eram as obtidas através de estudos de raios X (73,74) e alguns resultados iniciais de ressonância magnética nuclear (RMN) (89,90). Os dados de raios X diziam que no estado gel, medidas de alto ângulo davam um espaçamento entre as cadeias alifáticas de 0,42 nm, em um pico agudo, que sugeria ausência de movimento. No estado de cristal líquido, no entanto, medidas de alto ângulo davam uma banda difusa de 0,46 nm (73,74). Esse resultado sugeria que nesse estado deveria haver maior liberdade de movimento das cadeias alifáticas, que seria responsável pela difusão da banda.

Espectros de RMN mostraram que os grupos metila terminais das cadeias alifáticas gozavam de liberdade de movimento bem mais ampla (linhas estreitas) do que os grupos metileno ao longo da cadeia (linha larga) (89,90).

A introdução de marcadores de spin de natureza esteroídica em membranas veio evidenciar de maneira incontestável a ocorrência de um movimento de ro

tação ao redor do eixo longo molecular (120,121).

Quando um marcador esteroídico é introduzido numa membrana, ele se orienta com seu eixo longo aproximadamente paralelo à normal à bicamada. Do sistema de coordenadas que caracteriza o grupamento N-O, é o eixo y que é aproximadamente paralelo ao eixo longo da molécula. Em sistemas de bicamadas planas, se o espectro for observado com o campo magnético paralelo à normal à bicamada, os valores de T e g observados deverão corresponder aproximadamente a T_{yy} ($\sim 6G$) e g_{yy} (~ 2.006). Por outro lado, para o espectro obtido com o campo magnético paralelo à superfície das bicamadas, existem duas possibilidades. Na ausência de rotação ao redor do eixo longo originar-se-ia um espectro de pó bi-dimensional com contribuição dos componentes T_{xx} , T_{zz} e g_{xx} , g_{zz} em todas as possíveis orientações no plano da membrana, ou seja, o desdobramento hiperfino máximo seria de 32G. Se, por outro lado, ocorrer a rotação ao redor do eixo longo, ao invés da soma apresentada no espectro de pó, observar-se-á uma média dos valores principais, ou seja $T_{\text{observado}} = \frac{T_{xx} + T_{zz}}{2} \sim 19G$ e $g_{\text{observado}} = \frac{g_{xx} + g_{zz}}{2} \sim 2,006$.

Exatamente esta última situação foi observada para bicamadas planas consistindo de fosfatidil colina de ovo (120,121) e fosfatidil colina de ovo + colesterol (121).

ii. Movimento do Eixo Longo Molecular

A fim de analisar esse tipo de movimento torna-se mais simples empregar uma molécula rija, do tipo dos marcadores esteroídicos, que não possuem movimento de segmentos intra-moleculares.

O parâmetro de ordem para esse tipo de moléculas pode ser redefinido em função do fato que agora o eixo longo molecular coincide aproximadamente com o eixo y do sistema de coordenadas do radical N-O (5,150).

$$S = \frac{T'_{yy} - T'_z}{T'_{yy} - (T'_{xx} + T'_{zz})/2} \quad (11)$$

onde todos os valores expressos representam médias devidas à ocorrência de movimento ao redor do eixo longo, que confere simetria cilíndrica no plano da bicamada.

Assim definido, verifica-se que, novamente o valor máximo de S é 1, o que representaria uma situação de ordem máxima dos eixos longos moleculares.

Experimentalmente, o valor S=1 é raramente obtido e vários modelos tem sido propostos para explicar os resultados, todos eles envolvendo movimento do eixo longo molecular em relação à normal à bicamada (5,6,122,145,151).

O modelo mais simples é aquele no

qual o eixo longo molecular precessaria rapidamente com um ângulo β em relação à normal à bicamada (150). O ângulo β poderia ser obtido da expressão

$$S(\beta) = 1/2 (3 \cos^2 \beta - 1) \quad (12)$$

Em geral, os movimentos são mais complexos e a equação (12) deve ser substituída pela média no tempo, onde a forma da média depende da natureza do movimento.

Um modelo mais complexo descreve o movimento do eixo longo molecular como constituído de um caminho ao acaso dentro de um espaço cônico definido por um ângulo γ (5,122,152,153). Nesse caso

$$S(\gamma) = 1/2 (\cos \gamma + \cos^2 \gamma) \quad (13)$$

Uma complexidade adicional pode ser introduzida, qual seja, uma distribuição de valores de γ . Simulações espectrais indicam que uma distribuição em forma Gaussiana pode explicar certos efeitos sobre a largura de linhas espectrais (152).

É o caso da adição de colesterol à lecitina de ovo (152). Em ausência do mesmo, era necessário introduzir um parâmetro de distribuição de 10^0 ; esse valor decresceu em presença de quantidades crescentes de colesterol.

Mc Farland e McConnel (184) propuseram ainda que, para explicar os espectros obtidos em multi-bicamadas planas de fosfatidil colina de ovo contendo 25 moles% de colesterol e 25% de água, era necessário levar em conta que o eixo longo da molécula do marcador de spin possuía uma inclinação em relação à normal à bicamada.

Neal e colaboradores (185) mostraram que o grau de ordem de um sistema pode também ser correlacionado com a relação (b/c) entre as alturas das linhas do campo baixo (b) e de campo médio (c) em espectros de marcadores esteróidicos tirados com o campo magnético paralelo à normal à bicamada. Uma discussão pormenorizada das idéias desenvolvidas a respeito do parâmetro de ordem é dada por Griffith e Jost, no capítulo 12 da ref. 6.

iii. Movimento de Segmentos Intra-moleculares

Para marcadores de spin do tipo de ácidos graxos ou fosfolípidios, torna-se evidente que o movimento intra-molecular da cadeia hidrocarbônica deve contribuir para o parâmetro de ordem observado. Esse movimento intra-molecular se origina da rotação ao redor de ligações simples -C-C-, responsáveis por interconversões entre rotâmeros *trans* e *gauche*. O parâmetro de ordem foi analisado em termos da contribuição das probabilidades P_t e P_g de conformação *trans* e *gauche* ao longo da cadeia (151).

Admitindo-se que P_g é pequena, uma vez que a conformação *gauche* é energeticamente desfavorecida, e que P_t e P_g são constantes para todas as ligações -C-C ao longo da cadeia, pode-se mostrar que o parâmetro de ordem no carbono n é dado por (145):

$$\log S_n = n \log P_t + C \quad (14)$$

onde C é um pequeno fator de correção que depende pouco de n .

Seelig (151) e Hubbell e McConnell (145) verificaram experimentalmente a validade da equação (14).

Hubbell e McConnell (145) apresentaram também uma expressão em que o parâmetro de ordem medido depende, além do movimento intra-molecular, dado por S_n da orientação do eixo longo molecular em relação à normal à bicamada, dada por S_o . A expressão se torna:

$$\log S_n \text{ (na bicamada)} = n \log P_t + \log S_o + C \quad (15)$$

A medida experimental do parâmetro de ordem para no mínimo duas posições do radical N-O na cadeia hidrocarbônica permite a avaliação de P_t e de S_o , o parâmetro de ordem para o eixo longo da molécula.

Uma simplificação adotada na derivação das expressões acima é a de que P_t tem o mesmo valor para todas as ligações -C-C, o que provavelmente não ocorre.

A análise do parâmetro de ordem em termos das probabilidades P_t , P_g foi posteriormente estendida por Schindler e Seelig (185).

A discrepância entre o comportamento de S em função de n em resultados de RPE quando comparados com resultados de RMN de deutério será discutida na Sec. IV.

iv. Difusão Lateral

Uma das principais contribuições ao estudo de membranas pelo Método de Marcador de Spin consiste na evidência do movimento de translação de moléculas de lipídios no plano de membranas e na medida do coeficiente de difusão (53,54, 174,176-178).

Essa determinação é fundamentada na observação de interação spin eletrônico-spin eletrônico, principalmente por troca, a qual se evidencia na forma das linhas espectrais, em presença de concentração suficientemente elevada de marcador de spin. Quanto maior a concentração, maior a frequência de troca, a qual, em membranas, é controlada pela difusão.

Sackmann e Träuble (176,177), Träuble e Sackmann (174) e Devaux e McConnel (178) determinaram o coeficiente de difusão lateral em

membranas modelos como sendo da ordem de 3×10^{-8} cm^2/s e Scandella e colaboradores (53) e Overath e colaboradores (54) determinaram os valores de $\sim 7,5 \times 10^{-8}$ cm^2/s e $3,25 \times 10^{-8}$ cm^2/s respectivamente em membranas de retículo sarcoplasmático e de E. coli.

c. Temperatura de Transição de Fase de Fosfolipídios

Os espectros de RPE de marcadores de spin tem sido utilizados para detectar a temperatura de transição de fase de fosfolipídios, T_c (30,54,66-68,145,169,170,187).

Em alguns experimentos empregando marcadores de spin de ácidos graxos foi verificado que a temperatura indicada pelos espectros do marcador como sendo a de transição não correspondia à dada por calorimetria diferencial de varredura (54).

A partição de marcador de spin TEMPO tem sido muito utilizada no estudo de temperatura de transição (30,66-68,170). Pode-se observar um acentuado decréscimo da solubilidade de TEMPO na membrana na fase gel. A partição do TEMPO também tem sido capaz de revelar a pré-transição mencionada na Sec. I.A.2.a.

d. Fusão de Membranas

O fenômeno de fusão de membranas tem sido considerado como de potencial grande impor-

tância em certos processos biológicos a nível de membrana (60). No entanto, nenhum experimento até hoje realizado realmente descartará outros possíveis mecanismos (além da fusão) como responsáveis pela mistura dos constituintes de duas membranas diferentes (188).

Feita essa ressalva, podem-se citar os trabalhos de Taupim e McConnell (189) como propondo a evidenciação de ocorrência de fusão entre vesículas de DPPC. Grant e McConnell (190) estudaram esse processo ocorrendo entre vesículas de DPPC e membranas de *Acholeplasma laidlawii* e Maeda e colaboradores (191) examinaram a fusão de células vermelhas do sangue induzida por vírus de Sendai.

e. Separação Lateral de Fases

i. Termotrópica

A importância do fenômeno de separação lateral de fases já foi amplamente enfocada nas Sec. I.A.1.b e I.A.2.a. A maior parte desses estudos, em que se estabeleceram diagramas de fase para misturas binárias de fosfolipídios foi efetuada no laboratório de McConnell (30,66-68), através da análise da partição de um marcador de spin entre as fases aquosa e membranosa. Esses diagramas de fase permitem estabelecer as temperaturas de início e término de separação lateral de fases

e esses conceitos foram posteriormente aplicados a sistemas de membranas biológicas (171,172, ver Sec. I.B.7).

ii. Ionotrópica

A maior parte dos estudos de separação lateral de fases induzida por ação de íons, em geral Ca^{++} , em misturas foi efetuada no laboratório de Ohnishi (69-71). O efeito é observado através do emprego de concentrações relativamente elevadas de fosfolipídio marcado. Ao se promover a separação de fases, fortes interações spin-spin são observadas nos espectros devido a um aumento efetivo da concentração do fosfolipídio nas regiões segregadas.

O efeito de Ca^{++} , pH e de polilixina na separação lateral de fases em misturas de DPPC e ácido dipalmitil fosfatídico foi cuidadosamente examinado por Galla e Sackmann (72).

f. Interações a Nível de Membranas

É conhecido o fato de que vários compostos de importância biológica ou farmacológica atuam a nível de membranas. Os pesquisadores envolvidos com a aplicação de Método de Marcador de Spin tem procurado empregá-lo no estudo dessas interações. Assim, tem sido examinado o efeito de esteróis (152,153,164,192-197), íons (69-72,198-200) · pH

(172, 200), anestésicos gerais (201-204) e locais (205-208), antibióticos (209-212) desacopladores de oxidação fosforilativa (213). proteínas e peptídios (72,214,220), pigmentos foto-sensíveis (221,222) etc.

Alguns desses agentes são objeto de estudo do presente trabalho: colesterol, íons, pH, antibióticos, peptídios.

Um grande número de trabalhos engloba o estudo do efeito desses agentes e outros sobre membranas. Não nos estenderemos aqui na descrição desses trabalhos uma vez que isso significa um alongamento excessivo desta Introdução.

2. Membranas Biológicas

a. Membranas Estudadas

Muitos estudos tem sido efetuados utilizando-se membranas biológicas. Nesse sentido, não só a parte lipídica tem sido marcada mas também componentes proteicos.

Dentre as membranas de mamíferos estudadas, podem citar-se, entre outras, células vermelhas do sangue (223,224), retículo sarcoplasmático (53,228,229), mitocôndrias, retículo endoplasmático (233) e outras, tendo sido executados estudos dos mais variados com essas membranas.

Além disso, foram marcadas membranas de vários microorganismos (234-243), virus (244-246), clo-

roplastos, (247,248) nervos de lagosta, (166,249,250) etc.

b. Interação Lipídio-Proteína

Um dos problemas mais interessantes na área de estrutura e função de membranas é o da interação entre os lipídios e proteínas constituintes das mesmas. Vários estudos tem sido realizados na tentativa de elucidar o que ocorre com lipídios que interagem tanto com proteínas periféricas (251,252) como com proteínas integrais (168, 215-220).

A maior parte dos estudos relacionados com proteínas integrais aborda o problema através da reconstituição gradativa de membranas, isto é, através, da análise dos espectros de marcadores de spin lipídicos adicionados a misturas contendo proporções variadas de lipídio e proteína. Uma exceção é o trabalho de Stier e Sackmann (253), onde se empregaram membranas de retículo endoplasmático. Nesse caso foi examinada a atividade do sistema citocromo P₄₅₀-citocromo P₄₅₀ NADPH redutase sobre a redução de marcadores de spin e, através dos resultados, foi concluído que havia uma camada de lipídios rígidos rodeando a proteína imersa na membrana.

O conceito de lipídio limítrofe (ou halo) foi desenvolvido de maneira muito elegante no trabalho pioneiro de Jost e colaboradores (215-217) em que se promoveu a reconstituição de membranas de citocromo oxidase. Esse sistema continua sendo objeto de es-

tudos dessa natureza (219).

Outros sistemas enzimáticos ou proteicos que tem sido objeto desse tipo de estudo são a ATPase dependente de Ca^{++} e Mg^{++} de retículo sarcoplasmático (168,254), o receptor de acetil colina (255), rodopsina (220, 256). Em geral existe uma concordância sobre a existência de lipídio limítrofe, mais imobilizado do que o restante dos lipídios ao redor da proteína. Essa concordância porém não é total (220). Também, trabalho recente de Seelig e Seelig (257), empregando ressonância magnética nuclear de ^{31}P e de deutério afirma que os resultados obtidos por esses autores não permitem concluir a existência de lipídio limítrofe em membranas de citocromo oxidase.

c. Biossíntese de Fosfolipídios Marcados com Marcadores Spin

A incorporação biossintética de ácidos graxos marcados com marcadores de spin em lipídios mais complexos foi verificada para vários microorganismos (234 - 237), indicando que o anel oxazolidínico era uma perturbação aceitável pelos sistemas enzimáticos desses microorganismos.

Estudos posteriores vieram revelar que mitocôndrias (258) e fração microsomal de célula de mamífero (259-261) também são capazes de sintetizar fosfolipídios a partir de ácidos graxos marcados.

A importância desses processos é discutida na Sec. III.C.1.

3. Reatividade de Marcadores de Spin

Em vários estudos que empregaram marcadores de spin intercalados em membranas biológicas foi verificada a destruição do sinal de RPE, por vezes bastante acelerada (262-265) provavelmente devido à ação redutora de alguma enzima ou enzimas.

Alguns pesquisadores procuraram fazer uso desse processo para estudar aspectos funcionais de membranas (264; 266).

Também, a reatividade química dos radicais nítróxido, em particular com o íon ascorbato foi utilizada para o estudo de processos em membranas artificiais tais como mobilidade transversal (115), permeabilidade (267) e a ocorrência de regiões heterogêneas durante a transição gel-cristal líquido (169).

A Sec. III.A.3 descreve o emprego da reação entre ascorbato e nítróxido em membranas com vistas ao estudo de propriedades de permeabilidade das mesmas. Na Sec. III.B.5, a mesma reação é utilizada para examinar o efeito do antibiótico poliênico anfotericina B sobre membranas. Finalmente, a destruição do sinal de RPE de marcadores de spin por mitocôndrias e fração microsomal de fígado de cobaia foi examinada na tentativa de verificar a transferência de marcadores de spin entre membranas e de determinar a localização dos sítios de redução (Sec. III.C.2).

I - MATERIAIS E MÉTODOS

A. Compostos

De Lipid Products, South Nutfield, Inglaterra obtiveram-se: PC, PA, PE, PI e PS (Grau I).

De Serdary Research Laboratory, London, Ontário, Canadá, obtiveram-se: PC, monolaurina, monopalmitina, monoestearina, monooleína, monolinoleína, dipalmitina e diglicerídios insaturados.

De Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, E.E.U.U., obtiveram-se PA e lisofosfatidil colina.

DPPC procedeu de Mann Research Laboratories, N.Iorque, N.Iorque, E.E.U.U., de General Biochemicals, de Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Iorque, E.E.U.U. e de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, E.E.U.U., que também forneceu DMPC, TRIZMA e ácido oleico (pureza > 99%).

Colesterol, recristalizado duas vezes de metanol, veio de Steraloids, Inc., Pawling, N.Iorque, E.E.U.U.

De Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Iorque, E.E.U.U., obtiveram-se: cloreto de hexadecil trimetil amônio (HDTMA), octadecano, ácido decanoico, 1,2-benzantraceno, 9-metil antraceno e 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno.

PE foi também obtida de Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, Inglaterra.

De British Drug House, Poole, Inglaterra, veio óleo de parafina (parafina líquida, óleo mineral (pesado)) e 2-cloro etanol.

Naftaleno, 1,2,5,6-dibenzantraceno, 3, 4-benzopireno e 20-metil colantreno foram de L. Light Co. Ltd., Colnbrook, Inglaterra.

Naftaleno, antraceno, pireno e fenantreno foram purificados de acordo com procedimento usuais. Os respectivos pontos de fusão foram 79-80, 217-218, 156 e 99-100°C.

Os marcadores de spin CSL, ASL 5-, 12-, e 16-SASL provieram de Syva Corp., Palo Alto, California. E.E.U.U. Também, CSL e SSL foram sintetizados pelo Dr. J.C. Hsia no National Research Council do Canadá (Ottawa, Ontário). TEMPO foi sintetizado pela Dra. F. Hasan, na mesma instituição. TEMPONA per-deuteriada foi sintetizada pelo Dr. R.P. Mason, da Universidade Cornell, Ithaca, N. Iorque, E.E.U.U. TEMPO-colina foi doação do Dr. A.C. Oehlschlager, da Simon Frazer University, Burnaby, Bristish Columbia, Canadá. Estearil coenzima A (estearil CoA) contendo o anel oxazolidínico na posição 12 foi preparado pelo Dr. N. Z. Stanacev, da Universidade de Toronto, Toronto, Ontário, Canadá.

Glucagon marcado foi preparado pelo Dr. R. M. Epand da McMaster University, Hamilton, Ontário, Canadá.

Os derivados 5α e 7α -hidroperoxi de colesterol foram doação do Dr. M. Nakano, da Universidade de Gunma, Gunma, Japão. O derivado 13-hidroperoxi do ácido linoleico foi preparado pelo Dr. N. Durán, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

Anfotericina B e nistatina foram doação do Laboratório Squibb.

Todos os demais reagentes apresentaram grau analítico ou foram purificados.

B. Equipamento

Foram utilizados os seguintes espectrômetros de RPE da Varian: um E-3, um E-3 acoplado a um computador 620i, um E-4, um E-9 e um E-12. Foi ainda empregado um espectrômetro de banda K, feito no laboratório do Dr. C.P.S. Taylor da Universidade de Western Ontário (Canadá).

Foram empregadas celas de quartzo para solução aquosa ou para estudo a temperatura variável de James Scanlon, Costa Mesa, Califórnia. Para os estudos a 24 e 35 GHz (Sec. III.B.2) foram usadas lâminas de quartzo para o preparo das amostras.

Nos estudos de temperatura variável era empregado o equipamento padrão da Varian para solução ou dispersões. Filmes depositados em celas para solução aquosa eram inseridos em um encaixe especial de quartzo desenhado pelo Dr. K.W. Butler.

Medidas de temperatura foram efetuadas inserindo-se um par termo elétrico na cela contendo a amostra ou retirando-se a mesma e inserindo um termômetro digital Mettler TM 15.

O pH foi medido com o aparelho Metrohm E-152. Aparelhos de ultra-som empregados foram Cole-Parmer modelo 8845-3 e Branson.

A dosagem dos hidrocarbonetos aromáticos descrita na Sec. III.B.4 foi feita num espectrofotômetro Zeiss DMR-21.

C. Preparo de amostras

As soluções aquosas empregadas eram 0,15M em NaCl, exceto quando indicado de outra forma. Na Sec. III.A.1.a.i foram empregados tampões variados e na Sec. III.A.2 o pH foi ajustado para 7,4 com TRIS.

1. Multi-bicamadas Planas

Soluções clorofórmicas contendo todos os componentes da membrana são introduzidas nas celas de quartzo para soluções aquosas e o solvente removido por um fluxo de nitrogênio úmido, ficando depositados nas paredes da cela os filmes lipídicos. A seguir, as amostras são submetidas a vácuo por um período de pelo menos 1,5 horas.

No caso geral, as amostras são hidratadas com solução salina e/ou tampão e a solução de hidratação é drenada antes do registro dos espectros.

A solução de hidratação (contendo ascorbato ou Fe^{2+}) não foi removida nos estudos descritos nas

Secs. III.A.3 e III.B.3.b. Os espectros foram registrados com o campo magnético paralelo à normal à bicamada.

As amostras preparadas em placas de quarzo (Sec. III.B.2) foram hidratadas com solução salina e o excesso de água removido com papel absorvente para os espectros a 24 GHz. Para os estudos a 35 GHz, a hidratação foi efetuada pela passagem de nitrogênio úmido através da cavidade durante a tomada dos espectros.

Filmes de lisofosfatidil colina foram hidratados conforme descrito na Sec. III.A.1. Esse composto não é totalmente solúvel em clorofórmio, de sorte que as soluções de partida continham também metanol. O mesmo aconteceu para o preparo de membranas contendo anfotericina B (Sec. III.B.5).

As amostras são preparadas contendo aproximadamente 1 mg de lipídio e cerca de 1 mol% de marcador de spin.

As concentrações dos componentes são sempre dadas em mol%.

2. Liposomas

Liposomas são preparados por evaporação de uma solução clorofórmica dos componentes da membrana por meio de um fluxo de nitrogênio úmido, restando um filme lipídico nas paredes do teto. Após remoção do solvente residual a vácuo (.5 horas), adiciona-se solução salina e/ou tampão (se necessário) e agita-se

no Vortex (em geral cerca de 5 a 10 minutos), transferindo-se a dispersão para a cela para tomada de espectros.

3. Vesículas

Uma vez preparados os liposomas, estes são submetidos ao ultra-som por períodos de até 2 horas, com interrupções durante o processo, a fim de facilitar o resfriamento da amostra. Quando o fosfolipídio é a fosfatidil colina de ovo, a amostra é imersa em banho de água e gelo, e submetida a um fluxo de nitrogênio para minimizar o risco de reações de oxidação e outras.

4. Amostras Contendo Glucagon Marcado

A Sec. III.B.6 descreve estudos com o hormônio peptídico glucagon ao qual se ligou um penta-nel contendo o grupamento nitróxido. Essa ligação foi efetuada em duas posições no peptídio, o amino grupo terminal da histidina 1 (dando origem ao composto aqui denominado G-1) e o amino grupo ϵ da lisina 12- (dando origem ao composto aqui denominado G-12).

Amostras contendo glucagon marcado eram preparadas da seguinte maneira: o volume desejado de G-1 ou G-12 de uma solução estoque em 2-cloro etanol era evaporado com um fluxo de nitrogênio, deixando um filme, o qual era submetido a vácuo no des

secador durante 30 minutos. Vesículas de fosfolipí-
dio eram então adicionadas em quantidade suficiente
para se obter a relação molar desejada. O conjunto
era submetido à agitação num Vortex por 60 minutos.

D. Registro dos Espectros

A fim de se evitar distorções nos espec-
tros devidas à escolha inadequada dos ajustes do apa-
relho, é importante verificar quais são os valores
adequados de potência, amplitude de modulação e da
combinação tempo de varredura/constante de tempo.

Nesse sentido, para os espectros obtidos
no presente trabalho, procurou-se empregar valores
de potência de 5 mW para marcadores em solução e de
5,10 ou no máximo 20 mW (se necessário, para amos-
tras de baixa concentração) para marcadores em mem-
branas ou outros sistemas que conferem menor mobi-
lidade.

A amplitude de modulação variou de 0,4
a 1,0 gauss para marcadores em solução, e em geral
foi de 1,6 ou 2,0 gauss (podendo chegar a 2,5 gauss
para amostras de baixa concentração) em membranas.

Para marcadores em solução os espectros
eram registrados (em geral) empregando-se tempos
de varredura de 4 ou 8 minutos, acoplados a cons-
tantes de tempo de 0,1 e 0,3 segundos, respectiva-
mente. Espectros de marcadores em membranas em ge-
ral requeriam tempo de varredura de 4 minutos e

constante de tempo de 1,0 segundo. Quando as amostras apresentavam baixa concentração, a constante de tempo era aumentada para 3,0 segundos e o tempo de varredura para 8 ou 16 minutos.

Espectros foram registrados à temperatura ambiente (20-23°C.), a não ser quando indicado de outra forma.

II - RESULTADOS

Os estudos a serem aqui apresentados se enquadram em três categorias principais:

- A. Estudos de Caráter Estrutural
- B. Estudos de Interações com Agentes que Atuam ao Nível de Membranas
- C. Estudos com Membranas Biológicas

Dentro de cada uma dessas categorias aspectos variados foram abordados, assim como também variaram as formas de exame desses aspectos. Assim, em várias oportunidades, como será visto no decorrer do trabalho, foram empregadas, além das técnicas convencionais de análise espectral, como descrito na Sec. I.B, propriedades de reatividade dos radicais nitróxido. Desta maneira, podem-se obter informações de caráter relevante para o conhecimento de membranas através de estudo de processos químicos em matrizes membranosas.

A. Estudos de Caráter Estrutural

Dividiremos esses estudos em três partes: na primeira procurou-se estudar uma série de compostos anfífilicos e estabelecer ao nível molecular, quais os requisitos estruturais para que esses compostos tenham a habilidade de formar bicamadas em que as moléculas possuam elevado grau de ordem; na segunda parte, fazendo uso das propriedades de partição membrana-água de alguns marcadores de spin,

procurou-se avaliar as condições em que esse tipo de estudo pode ser empregado para examinar questões como temperatura de transição de fase gel-cristal líquido e separação lateral de fases em misturas de fosfolipídios; finalmente, num terceiro estudo, foram examinadas propriedades de permeabilidade de bicamadas em função da composição da membrana. Para isso, foi explorada a reação radicalar que ocorre entre o íon ascorbato e o grupamento nitróxido. A cinética desse processo permitiu obter informações sobre o mecanismo de permeabilidade de membranas lipídicas.

1. Características Estruturais para Formação de Bicamadas Organizadas por Compostos Anfifílicos.*

Os espectros de marcadores de spin intercalados em vários compostos anfifílicos foram examinados. A estrutura desses compostos variou quanto à cabeça polar, carga na cabeça polar, número de cadeias alifáticas e comprimento e grau de insaturação dessas cadeias.

Assim, foram investigados os fosfolipídios fosfatidil etanolamina (PE), fosfatidil serina (PS) e ácido fosfatídico (PA). Para pesquisar o efeito da remoção de uma cadeia alifática empregou-se lisofosfatidil colina.

Mono e di-glicerídios (que só possuem grupamentos -OH na parte polar) foram empregados para avaliar a importância da geometria e das interações eletrostáticas ao nível da cabeça polar dos fosfolipídios. A utilização de glicerídios saturados e insaturados e possuidores de cadeias de variados comprimentos permitiu também o exame

*Ref. 200

do efeito desses fatores nas propriedades organizacionais desses compostos.

A fim de efetuar o estudo proposto foi investigado o efeito de pH, íons, colesterol e temperatura sobre os espectros de marcadores de spin introduzidos nos sistemas escolhidos.

Em vários estudos, o grau de ordem foi avaliado pela medida do parâmetro b/c como descrito na Sec. I.C. 1.b.ii.) Em outros casos, pela diferença entre os desdobramentos hiperfinos medidos com o campo magnético paralelo e perpendicular à normal a bicamadas planas.

a. Estudos com Fosfolípidios

i. Efeito do pH

O grau de ordem de marcadores de spin introduzidos em filmes de PE, PS ou uma mistura de fosfatidil colina de ovo (61 mol%)-PA (6 mol%)-colesterol (33 mol%) revelou uma dependência do pH do meio. A Fig. 10 mostra espectros tirados com o campo magnético paralelo à normal à bicamada do marcador de spin CSL em PE a pH 10,4 e a pH 6,6. No primeiro caso a molécula possui carga negativa uma vez que o amino grupo já se encontra desprotonado. No segundo caso a molécula é zwitteriônica.

A Fig. 11 está mostrando como variou a relação b/c em função do pH para os três sistemas

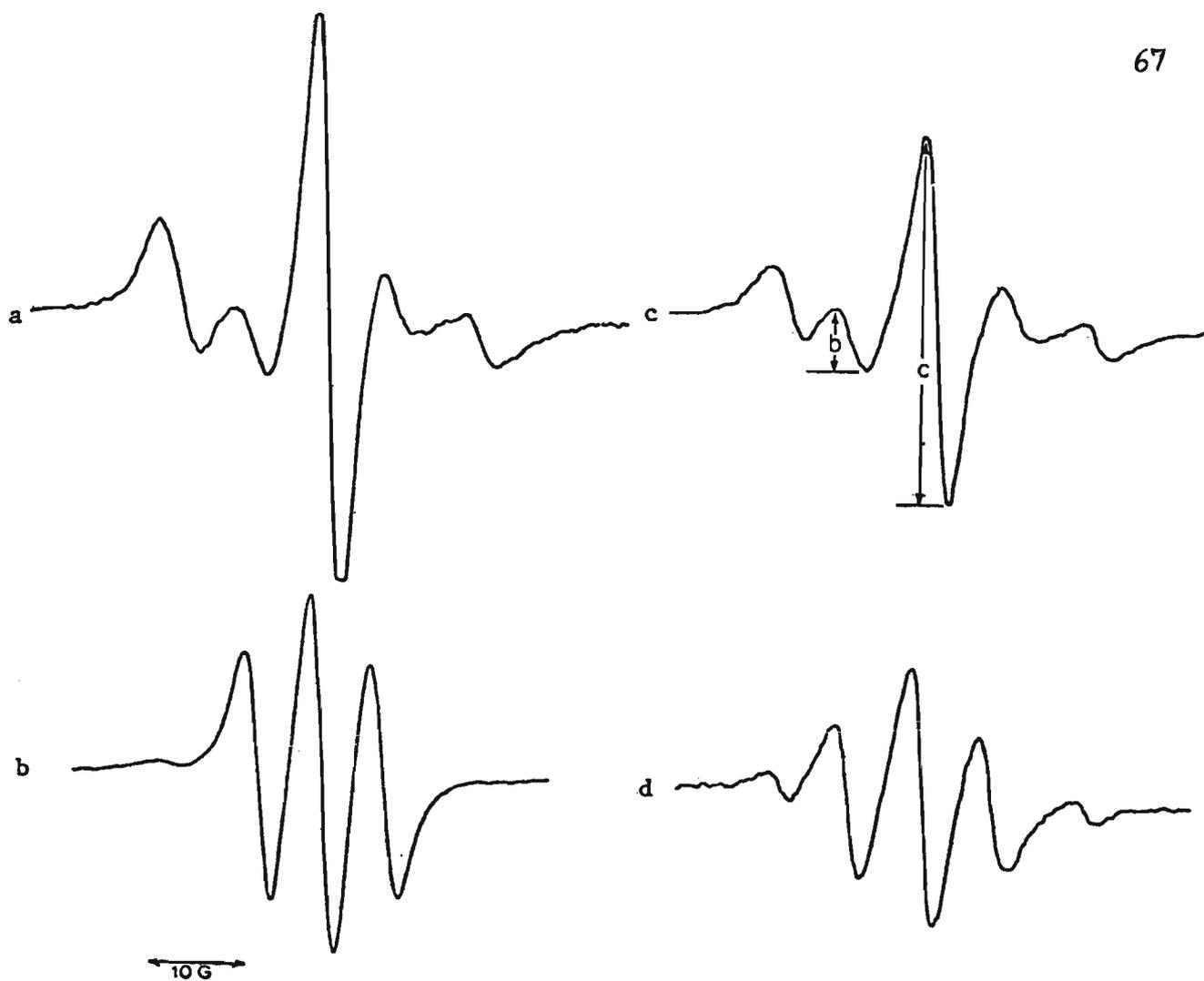


Fig. 10 Espectros de marcador de spin ASL em filmes de 8C (61%)-colesterol (33%)-PA (6%) em presença de Ca^{++} $8 \times 10^{-4}\text{M}$ (a) e $6 \times 10^{-3}\text{M}$ (b). Espectros do marcador de spin CSL em filmes de PE a pH 10,4 (c) e 6,6 (d). Campo magnético paralelo à normal à bicamada.

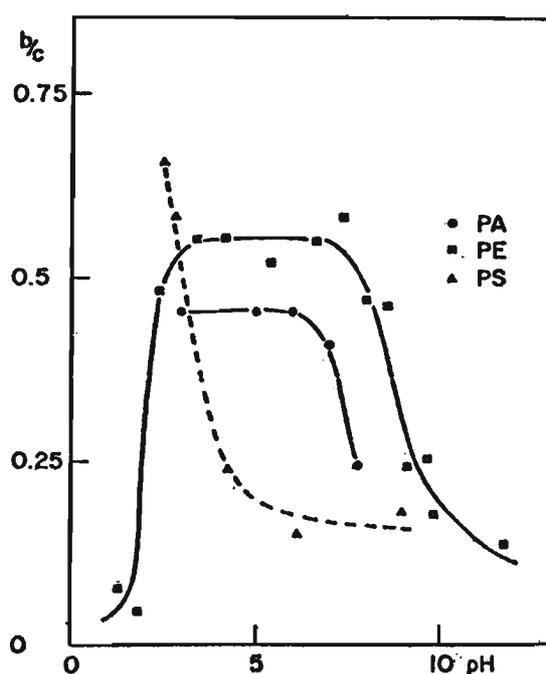


Fig. 11 Relação b/c em função do pH para filmes de PE, PS e PC (61%)-colesterol (33%)-PA 96%). Marcador de spin: CSL.

estudados. As curvas são claramente indicativas da titulação de grupos ionizáveis dos compostos estudados. Observa-se também que o grau de ordem é maior quanto menor a carga total.

ii. Efeito de Íons

O estudo do efeito de íons de Ca^{++} sobre ácido fosfatídico foi efetuado com um sistema da mesma composição que o empregado no estudo de pH. Isso deveu-se ao fato que filmes de ácido fosfatídico puro ou em presença de colesterol, apresentaram pouca ou nenhuma anisotropia, isto é houve pouca ou nenhuma diferença entre espectros tirados com o campo magnético paralelo e perpendicular à normal à bicamada (Fig. 12). Essa baixa anisotropia permaneceu em presença de íons Ca^{++} (0,1 a 1M).

Em sistemas contendo PC (61%)-PA (6%)-colesterol (33%), o efeito de Ca^{++} foi acentuado (Figs. 10 e 12). A Fig. 13 mostra a variação de b/c para ASL em função da concentração de Ca^{++} e a Fig. 14 mostra a variação na diferença $T'_{\parallel} - T'_{\perp}$ (tomado o valor absoluto) para os marcadores 5-SASL, 12-SASL e CSL.

Quando íons Ca^{++} são adicionados a filmes de PS a pH acima de 3,5, estes são removidos da superfície onde foram depositados.

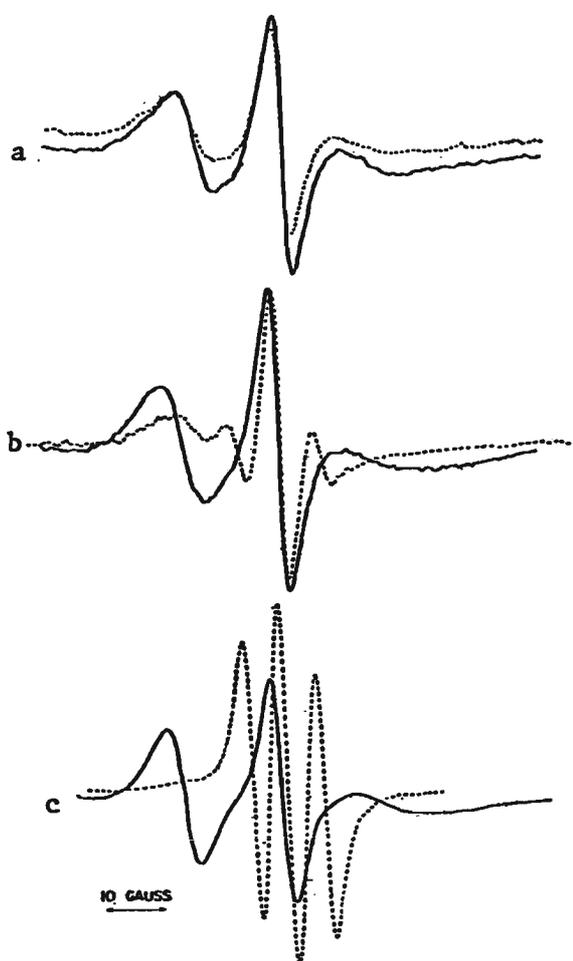


Fig. 12 Espectros de ASL em filmes de PA, (a), PA-colesterol (35%) (b) PC (61%) -colesterol (33%)-PA (6%) em presença de Ca^{++} $2 \times 10^{-3}\text{M}$ (c). (---) campo magnético paralelo à normal à bicamada. (—) campo magnético perpendicular à normal à bicamada.

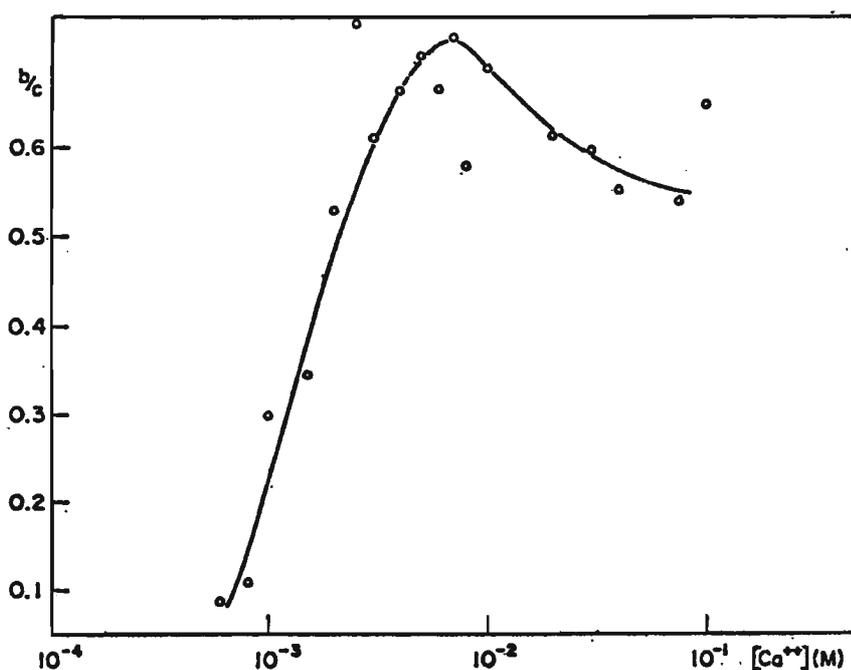


Fig. 13 Relação b/c em função da concentração de Ca^{++} para filmes de PC (61%) colesterol (33%)-PA (6%). Marcador de spin: ASL.

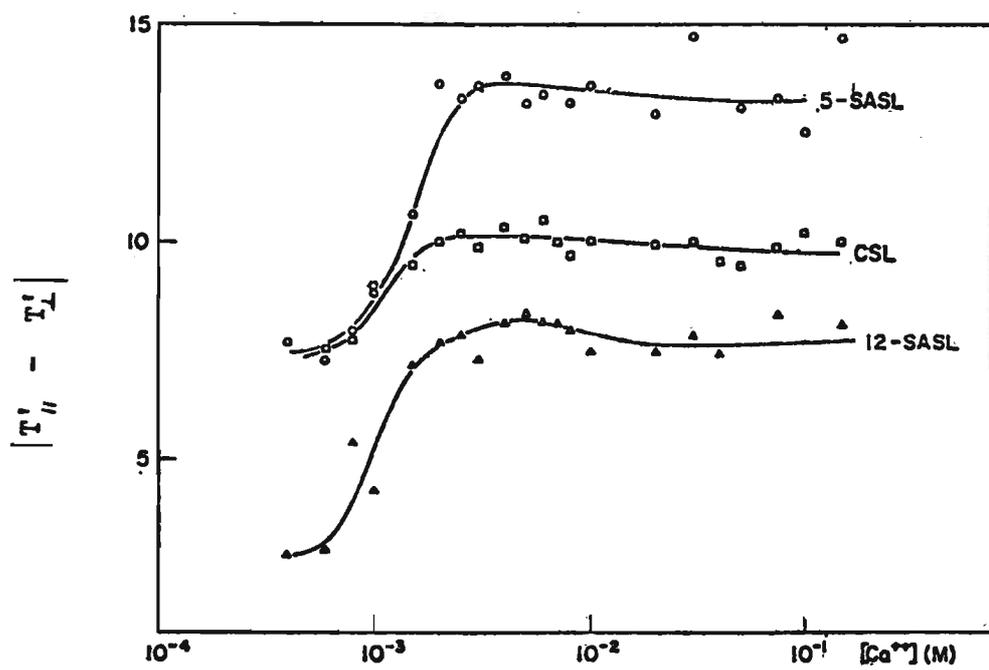


Fig. 14 $|T'' - T'_L|$ em função da concentração de Ca^{++} para filmes de PC (61%)-colesterol (33%)-PA (6%) contendo os marcadores de spin 5-SASL e 12-SASL e CSL.

iii. Lisofosfatidil colina

A falta de uma cadeia de ácido graxo aumenta muito a solubilidade desse composto em água, a ponto de a solução de hidratação remover os filmes preparados nas paredes da cela de quartzo, provavelmente com formação de micelas.

A fim de evitar esse processo promoveu-se a hidratação por equilíbrio das amostras com vapor d'água a baixa pressão. A Fig. 15 mostra os espectros de marcadores de spin em filmes anidros de lisofosfatidil colina e após hidratação pelo processo acima. Em lisofosfatidil colina anidra o CSL se apresenta altamente imobilizado, porém com elevado grau de anisotropia espectral; o 5-SASL também se apresenta imobilizado, porém a anisotropia espectral é menor; finalmente, o 12-SASL apresenta um efeito de alargamento das linhas devido à interação spin-spin por troca. Isto sugere que este composto é excluído do sistema lipídico, formando um agregado à parte.

A hidratação produz espectros onde não ocorre anisotropia e que são indicativos de grande mobilidade, sugerindo a formação de estruturas de tipo micelar, que no entanto permanecem aderidas à superfície da cela.

A adição de colesterol induz um aumento da resistência à solubilização do sistema pela solução hidratante e fornece espectros altamente anisotrópicos, característicos da rotação da molécula de marca

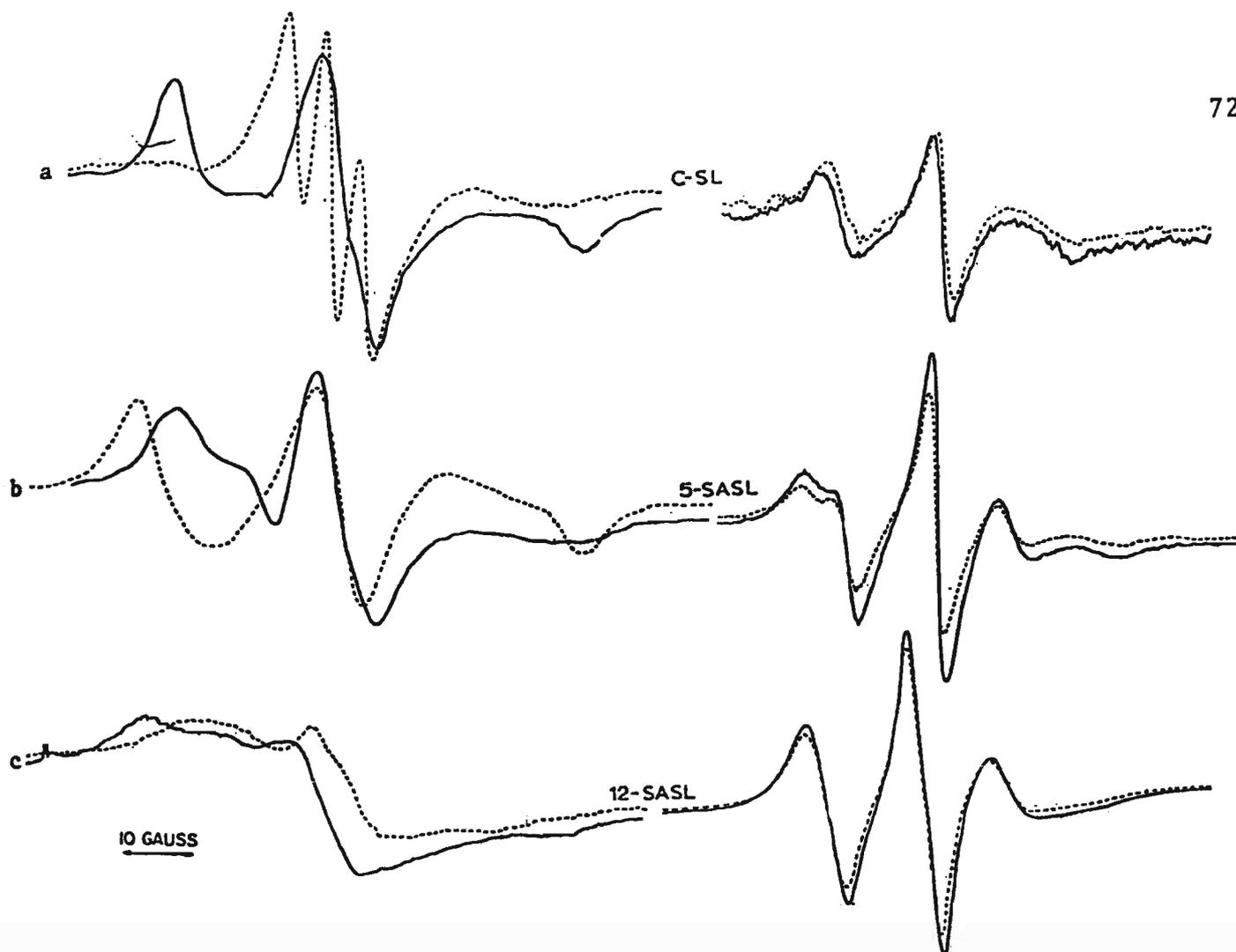


Fig. 15 Espectros dos marcadores de spin CSL (a), 5-SASL (b) e 12-SASL (c) em lisofosfatidil colina anidra (à esquerda) e hidratada (à direita) (—) campo magnético perpendicular à normal à bicamada (---) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

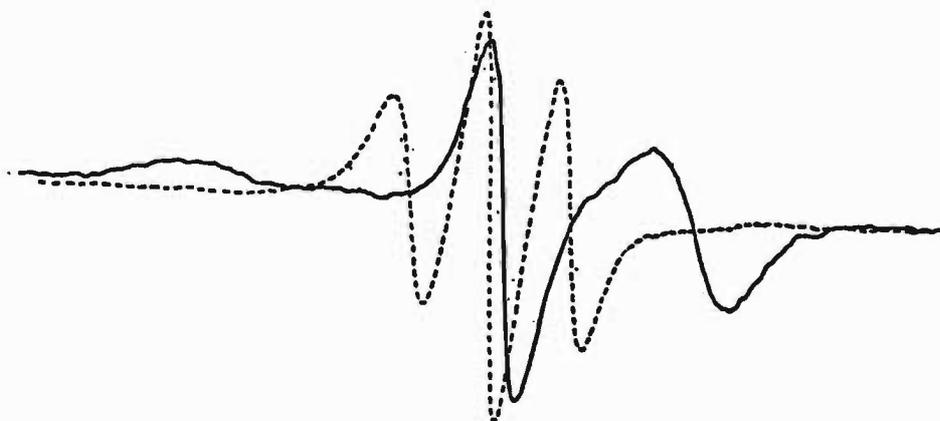


Fig. 16 Espectro do marcador de spin CSL em filmes de lisofosfatidil colina-colesterol (50%) (—) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (---) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

dor ao redor de seu eixo longo e indicativos da formação de uma fase lamelar ordenada (Fig. 16).

b. Monoglicerídios

Foram examinados os monoglicerídios saturados monolaurina, monopalmitina e monoestearina e os insaturados monooleína e monolinoleína.

Todos os saturados geraram espectros de CSL indicativos de interação spin-spin (Fig. 17), provavelmente devido à exclusão do marcador do sistema lipídico, em virtude do empacotamento denso das moléculas.

É interessante observar que a adição de pequena quantidade de colesterol (5 mol%) à monolaurina abole o efeito de troca e dá origem a espectros altamente anisotrópicos (Fig. 17). O aumento do número de átomos na cadeia requer quantidade maior de colesterol (50 mol%) para que o mesmo efeito ocorra na monopalmitina. E, na monoestearina, mesmo essa quantidade elevada de esterol não é suficiente para abolir o efeito de troca.

Foi também examinado o efeito da temperatura sobre esses monoglicerídios. Quando a temperatura é aumentada, o alargamento das linhas espectrais devido à troca desaparece, dando origem a espectros característicos de um sistema anisotrópico (Fig. 18).

O alargamento por troca inexistente nos monoglicerídios insaturados. Os espectros são destituídos de anisotropia tanto em ausência quanto em presença de colesterol (Fig. 19). Nestes sistemas o

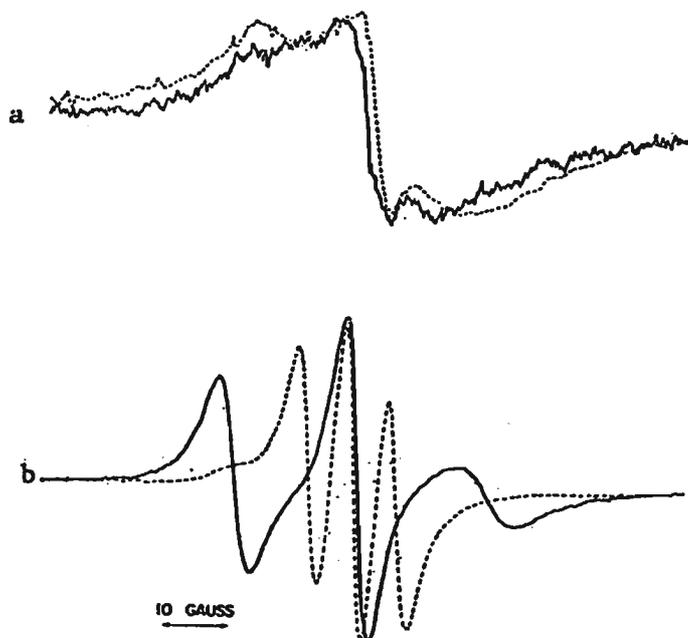


Fig. 17 Espectros do marcador de spin CSL em filmes de monolaurina (a) e monolaurina-colesterol (5%) (b), (—) campo magnético perpendicular à normal à bicamada, (---) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

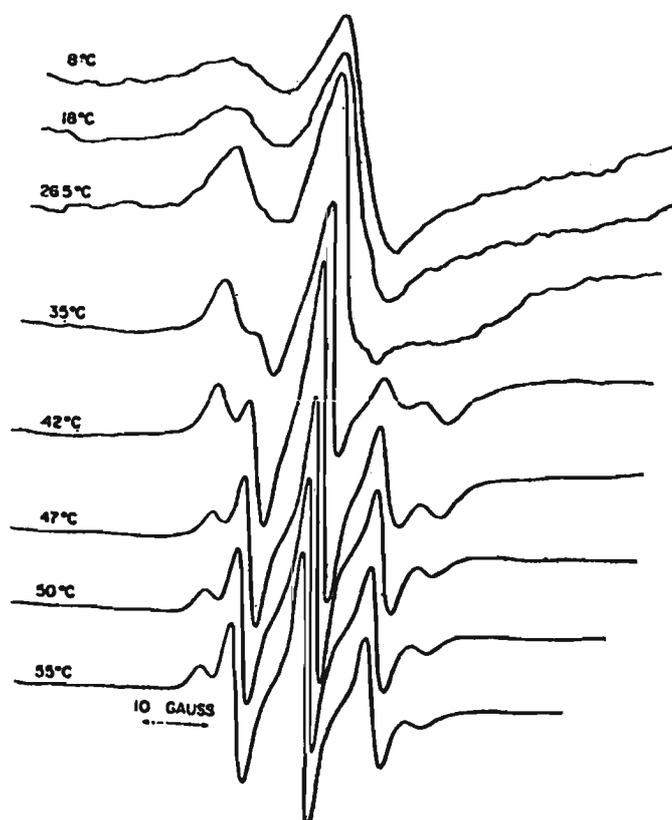


Fig. 18 Espectros de marcador de spin CSL em filmes de monolaurina nas temperaturas indicadas. Campo magnético paralelo à normal à bicamada.

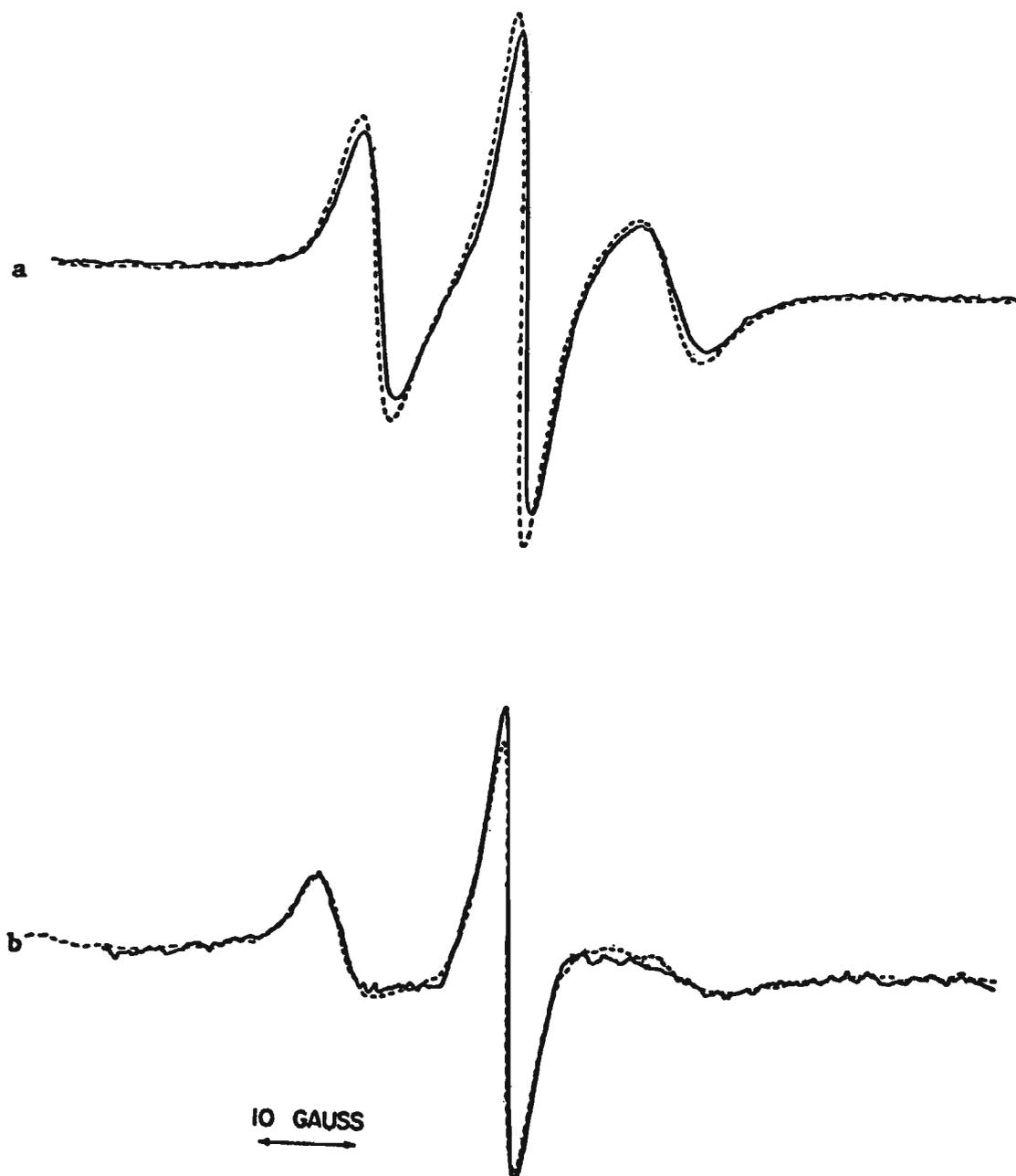


Fig. 19 Espectros do marcador de spin CSL em filmes de monooleina (a) e monooleina-colesterol (33%) (b) (—) campo magnético perpendicular à normal à bicamada, (---) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

colesterol tem a habilidade de diminuir a velocidade de rotação do marcador de spin, o que é evidenciado pelo alargamento das linhas espectrais (Fig. 19).

c. Diglicerídios

Foi estudado o composto saturado dipalmitina e uma mistura de diglicerídios insaturados de cadeias variadas.

Dipalmitina deu também origem a espectros com alargamento por troca, não tendo o colesterol (40 mol%) sido capaz de alterar esse comportamento. O aumento de temperatura diminui o efeito de troca fornecendo espectros desprovidos de anisotropia.

Diglicerídios insaturados se comportam de maneira análoga aos monoglicerídios correspondentes, tendo também o efeito do colesterol sido semelhante.

Os resultados acima sugerem que a organização de compostos anfifílicos em bicamadas deve ser encarada como uma consequência da tendência das partes hidrofóbicas de permanecerem juntas, e das partes hidrofílicas de fazerem o mesmo. A orientação da parte polar da molécula para o exterior da bicamada em presença de água é uma extensão do que foi colocado acima. Portanto, a formação de bicamadas é um proce

so energeticamente favorecido. Contudo, a formação de lamelas líquido-cristalinas altamente organizadas apresenta requisitos estruturais delicados.

Os resultados obtidos indicam que a habilidade de formar lamelas líquido-cristalinas organizadas depende do balanço de interações inter-moleculares polares e não polares.

A influência do pH no grau de ordem indica que maior organização é alcançada quando a carga total no fosfolipídio é zero.

O ácido fosfatídico, mesmo em presença de íons Ca^{++} produz espectros que correspondem a uma grande distribuição de orientações. Isto sugere que não apenas a carga total, mas também o arranjo geométrico são responsáveis pelo grau de ordem.

Os resultados aqui obtidos no estudo do efeito de íons e pH se correlacionam bem com estudos semelhantes feitos através de outras técnicas (127, 128, 268-310) bem como por RPE (198-200). Estudos recentes de RPE tem indicado que a adição de Ca^{++} a misturas de fosfatidil colina- ácido fosfatídico causa separação deste último em agregados ilhados (71, 72). Como citado na Sec. I.C.1.e.i, resultados deste tipo foram obtidos através de RPE com o emprego de fosfolipídios marcados, cujos espectros revelam interação por troca quando da adição de Ca^{++} (69-72). Esse tipo de efeito não foi observado em nossos experimentos, sendo várias as possíveis explicações. Primeiramente, foram empregados marcadores derivados de ácidos graxos ou de esteróis. Esses poderiam

ser menos capazes de acompanhar a separação de fases, ou seja, de agregar-se concomitantemente. Por outro lado, a concentração de marcador empregada foi baixa (1 mol%, ou menos), dificultando ainda mais a observação da interação por troca. Restaria ainda a possibilidade de que a presença de apenas 6 mol% de PA num meio contendo colesterol não fosse suficiente para produzir, de maneira acentuada, a separação de fases. De qualquer forma, o que as alterações espectrais indicam é que a adição de concentrações de Ca^{++} maiores do que cerca de 2 mM induz a formação de estruturas bastante ordenadas, o que poderia ocorrer devido à diminuição de repulsão entre as cargas negativas do PA, com ou sem separação de fases.

Foi proposto que o complexo Ca^{++} -PS difere do complexo Ca^{++} -PA pelo fato de que o primeiro envolve o íon hexa-coordenado enquanto que o segundo produz Ca^{++} tetra-coordenado (277). Medidas de raios X mostraram que a adição de Ca^{++} a PS faz com que as distâncias de repetição da estrutura lamelar passem de 7,5 para 5,2 nm (276). Foi também observado que Ca^{++} causa a ruptura de membranas negras de PS quando adicionado apenas de um lado (282). Foi ainda verificado que Ca^{++} pode induzir a formação de estruturas cilíndricas (305). Outros fenômenos induzidos por Ca^{++} em fosfolipídios carregados negativamente incluem a separação lateral de fases (69-72,294) a agregação de membranas (303) e a fusão das mesmas (294,301,303,306,309).

Mais recentemente, microscopia eletrônica

de fraturamento revelou estruturas que foram denominadas cocleatos, em que aparentemente superfícies lamelares se enrolariam sobre si mesmas (como num rocambole) sendo mantidas assim por ligações com Ca^{++} (294).

Os resultados acima parecem explicar as observações do presente trabalho, quando se verificou que Ca^{++} remove os filmes de PS depositados na superfície da cela de RPE.

Nossas observações com lisofosfatidil colina demonstram novamente a importância do balanço das interações hidrofóbicas e polares para a formação de lamelas líquido-cristalinas. A presença de uma cadeia hidrocarbônica por cabeça polar aumenta muito a sua solubilidade em água, capacitando-a a formar agregados menores, de natureza micelar. Por outro lado, o espectro de CSL em lisofosfatidil colina anidra indica que o grau de cristalinidade do sistema é elevado. As diferenças entre os resultados obtidos para os diferentes marcadores, CSL, 5-SASL e 12-SASL, evidenciam um dos problemas existentes em técnicas que utilizam moléculas repórteres. A informação é condicionada também por estas últimas. No caso em questão, provavelmente devido a um problema de forma molecular, o 5-SASL não fornece em lisofosfatidil colina anidra espectros anisotrópicos como os do CSL. Por outro lado, o grupamento relativamente volumoso do anel oxazolidínico parece constituir-se numa perturbação inaceitável quando localizado no carbono 12 da cadeia, fazendo com que o 12-SASL seja excluído do sistema.

É interessante notar que o colesterol, molécua bastante hidrofóbica, contribui para aumentar o caráter hidrofóbico do sistema, tornando-o mais resistente à ação solubilizadora da água e gerando lamelas líquido-cristalinas altamente organizadas.

Os mono e diglicerídios saturados estudados encontram-se em estado cristalino à temperatura ambiente (311-313). O alargamento por troca observado em todos os casos indica que o empacotamento molecular é suficientemente denso para não permitir a intercalação do marcador de spin no sistema. Colesterol e aumento de temperatura acarretam a transição para o estado líquido-cristalino de fosfolípidios que estão em fase gel. O mesmo é visto com monolaurina. Monopalmitina e monoestearina, contudo, parecem possuir cadeias muito longas para que a parte hidrofílica dessas moléculas permita alcançar o balanço adequado. Assim, mesmo a adição de colesterol não é suficiente para atingir o estado líquido-cristalino. Também, o aumento de temperatura produz espectros menos anisotrópicos que os da monolaurina. O mesmo se aplica à dipalmitina, onde existe somente um grupamento-OH para duas cadeias alifáticas.

Nossas conclusões relativas ao denso empacotamento dos glicerídios saturados estão de acordo com as observações de Krasne e colaboradores (314) que encontraram que o transporte de íons através de membranas negras de diglicerídios por antibióticos que atuam por um mecanismo de transportador é drás-

ticamente diminuído em temperaturas em que ocorre mudanças de um estado "líquido" para um estado "congelado".

Os espectros isotrópicos obtidos com monooleína, monolinoleína e a mistura de diglicerídios insaturados sugerem que a insaturação causa um empacotamento muito menos denso, por dificultar interações intermoleculares fortes. Pode-se verificar que o colesterol se dissolve nesses sistemas, produzindo um ambiente em que os marcadores de spin se movem mais lentamente. O efeito da insaturação, produzindo sistemas menos empacotados, foi também observado com fosfatidil colinas altamente insaturadas de soja e de levedura (315). Filmes desses lipídios apresentaram espectros de baixa anisotropia (uma elevada mobilidade causa diminuição da anisotropia). A presença de grande número de insaturações foi também relacionada com a elevada permeabilidade de lipossomas (316-318).

Recentemente, Taylor e colaboradores (319) também efetuaram estudos de monoglicerídios empregando marcadores de spin.

Espectros em que a anisotropia é pequena podem ser devidos a um ou mais dos fatores abaixo:

Desordem intra-lamelar. As moléculas podem estar organizadas em multibicamadas planas, mas com pouca ordem dentro das lamelas. Essa desordem pode originar-se de um empacotamento molecular pouco denso, o qual permite um alto grau de mobilidade, e portanto, uma diminuição da anisotropia espectral. Um movimento molecular rápido de grande amplitude leva a linhas estreitas e decresce a diferença

entre os desdobramentos hiperfinos extremos. Esse parece ser o caso com as fosfatidil colinas altamente insaturadas.

Uma segunda causa seria uma grande distribuição de orientações moleculares em relação à normal à bicamada. Empregando esse modelo, espectros simulados em computador foram obtidos para o CSL (girando rapidamente ao redor de seu eixo longo) (185). Se o movimento dos eixos moleculares para fora de sua posição de equilíbrio for lento, as linhas espectrais serão largas. O aumento da distribuição de orientações causa uma diminuição da anisotropia e os espectros se assemelham a um espectro de pó caracterizado por desdobramentos hiperfinos principais de 6 e 19 gauss. Sistemas relativamente imóveis tais como a dipalmitil fosfatidil colina na fase gel apresentam tais espectros (Sec. III.B.1.c). O mesmo comportamento é apresentado por lipídios da matéria branca de cérebro de boi dos quais se removeu colesterol (205). Medidas de raios X de baixo ângulo para este sistema, bem como para PA em presença de Ca^{++} 1M, indicam que existe organização lamelar periódica, o mesmo ocorrendo para DPPC (62).

No caso de uma grande distribuição de orientações moleculares onde a velocidade de movimento para fora da posição de equilíbrio é maior, um espectro com duas componentes será observado na direção paralela à normal à bicamada (para marcadores esteróidicos). Aparece um pico em campo baixo com correspondente diminuição da linha correspondente a

$m_I = + 1$. A Fig. 10 mostra esse tipo de espectros para a concentração baixa de Ca^{++} no estudo com PA e a pH alto no estudo com PE.

Desordem inter-lamelar. Baixa anisotropia espectral poderia também ser causada por falta de coplanaridade para uma fração significativa das bicamadas. Sabe-se que, quando a força iônica é baixa, liposomas contendo lipídios carregados tendem a inchar, com quantidades cada vez maiores de água separando as bicamadas (108,279, 280). Em nossos estudos, poderia ocorrer ausência de coplanaridade nas situações em que se empregam baixa força iônica.

Foi verificado que em condições de alta força iônica ocorre desordem intra-lamelar quando existe um lipídio negativamente carregado no sistema (PA). É possível que a baixa anisotropia observada a baixa força iônica seja decorrente de desordem intra e inter-lamelar. Uma vez que os efeitos espectrais são semelhantes, não é possível distinguir entre ambos.

Organização não-lamelar. Finalmente, as moléculas lipídicas podem não estar organizadas na forma de bicamadas, mas em outras estruturas sob as quais lipídios podem se organizar (59,73,74). É o caso da lisofosfatidil colina (320), dos mono e diglicerídios insaturados e da dipalmitina a temperaturas mais altas. A completa isotropia dos espectros, bem como dados de raios X e de estudos ópticos (311-313) indicam que o arranjo desses compostos deve ser isotrópico ao nível microscópico.

Os estudos efetuados fornecem ainda informações sobre a capacidade de marcadores de spin para examinar as propriedades do sistema em que se encontram. Observa-se que (a) quando o sistema é densamente empacotado, ele tende a excluir o marcador; (b) nesses sistemas, a perturbação exercida pelo anel oxazolidínico pode alterar a vizinhança imediata do marcador e levar a conclusões erradas sobre o sistema; (c) quando o sistema em estudo é altamente ordenado na forma de lamelas líquido-cristalinas, os marcadores de spin fornecem, em geral, espectros altamente anisotrópicos, os quais permitem avaliar o grau de ordem e mobilidade nesses sistemas.

2. Efeito da Estrutura de Membranas sobre os Espectros de Marcadores que Sofrem Partição entre as Fases Lipídica e Aquosa*

Conforme descrito na Sec. I.B.7, alguns marcadores de spin são capazes de sofrer partição entre as fases lipídica e aquosa, fornecendo, em geral, espectros onde a linha de campo alto é parcialmente resolvida para os dois meios (Fig. 20). Tais espectros tem sido analisados admitindo-se que as alturas relativas das duas linhas são proporcionais às concentrações de marcador nos dois meios.

O parâmetro de partição ($f = H/(H+P)$, onde H e P são medidos como indicado na Figura 20) tem sido empregado para determinação de temperaturas

* Ref. 170

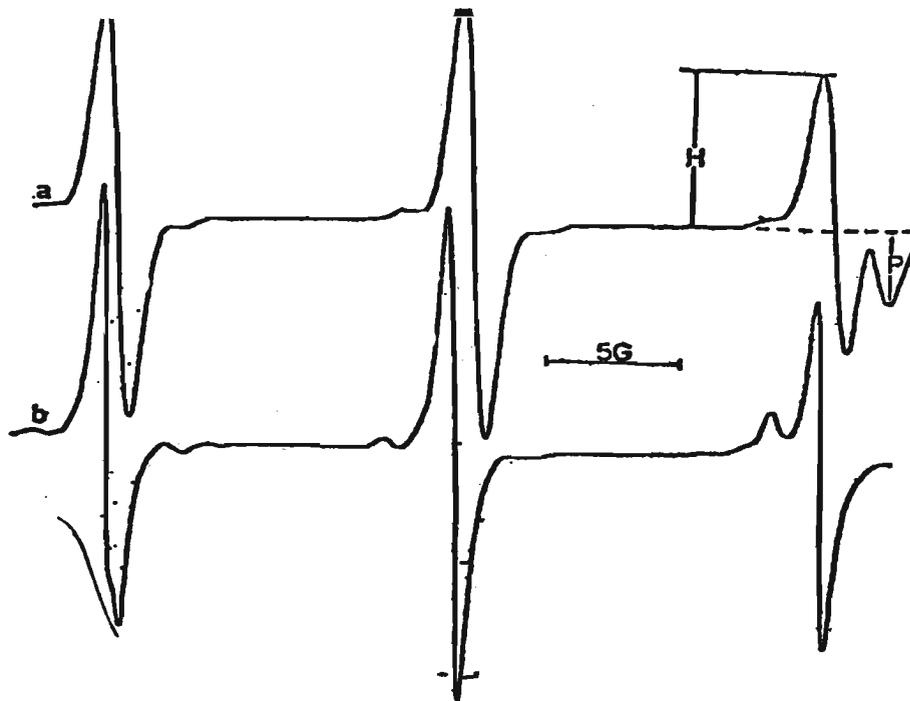


Fig. 20 Espectros dos marcadores de spin TEMPO (a) e pd-TEMPONA (b) em dispersões de PC a 33,4°C.

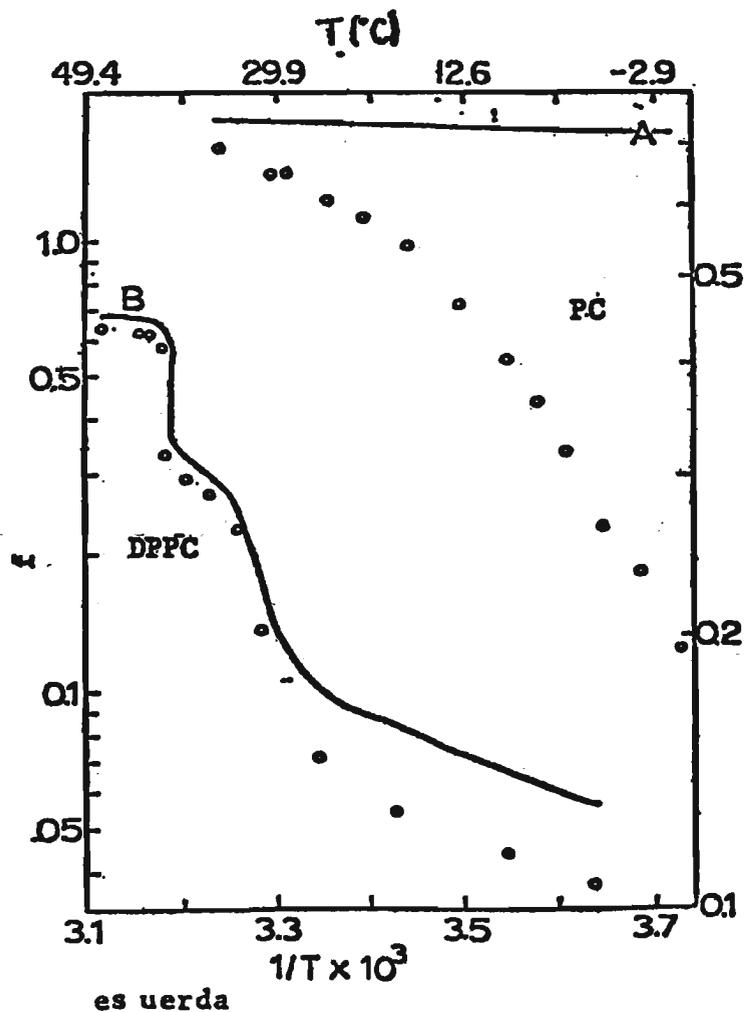


Fig. 2 Log f em função de $1/T$ em dispersões de fosfolipídios (o). O logaritmo da fração de marcador em lipídios, determinada através de medidas de concentração é dado pelas linhas sólidas. A- dispersões de PC (escala da direita). B- dispersões de DPPC (escala da esquerda).

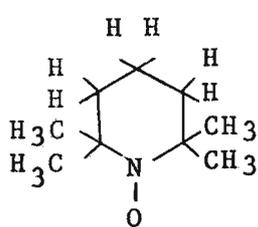
de transição de fase gel-cristal líquido (30,169), diagramas de fase de misturas lipídicas (30,66-68), temperaturas de início e término de separação lateral de fases em membranas biológicas (171) e ainda nas monocamadas internas e externas dessas membranas separadamente (172).

Um outro parâmetro relacionado com partição, α ($\alpha = H/P$, Fig. 20) foi definido, e a formação de agregados ilhados de lipídios acima da temperatura de transição foi sugerida a partir de quebras em gráficos de α em função da temperatura (168).

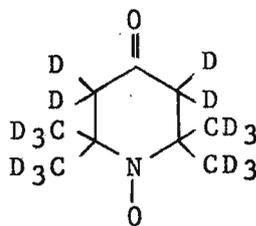
Experimentos de partição forneceram evidências para a existência de lipídio limítrofe numa enzima que atravessa a membrana, a ATPase dependente de Ca^{++} e Mg^{++} do retículo sarcoplasmático (254).

O presente trabalho inspirou-se na possibilidade de que as medidas de relações de alturas não refletem corretamente a variação da concentração nos dois meios (membrana e água) com a variação de temperatura, uma vez que a concentração é efetivamente proporcional à área sob as linhas espectrais e esta, por sua vez, é proporcional não só à altura mas também à largura. Assim, se a energia de ativação para rotação molecular for diferente na membrana e na água, a variação das larguras das linhas espectrais com a temperatura (e conseqüentemente, a variação das alturas) será diferente em cada meio, o que introduzirá erros em valores de parâmetros de partição calculados apenas a partir de alturas..

A fim de averiguar essa possibilidade foram examinados os espectros de dois marcadores de spin, TEMPO e pd-TEMPONA (TEMPONA per-deuteriada)



TEMPO



pd-TEMPONA

em uma série de sistemas. A TEMPONA per-deuteriada tem a vantagem de não possuir átomos de hidrogênio, eliminando assim a contribuição do desdobramento hiperfino dos mesmos para a largura das linhas. Apesar de deutério possuir spin nuclear, o desdobramento hiperfino devido a este elemento é muito menor, fazendo com que o triplete hiperfino do grupoamento N-O apresente linhas bem mais estreitas (Fig. 20).

Os experimentos foram executados com misturas de fosfolipídios - água (fosfatidil colina de ovo, e DPPC), ácidos graxos de cadeia longa (ácido oleico e ácido decanóico), hidrocarbonetos de cadeia longa (octadecano e óleo de parafina, que consiste de uma mistura com diferentes comprimentos e com ramificações), e água.

a. Fosfolipídios

A Fig. 20 mostra os espectros de TEMPO e pd-TEMPONA em liposomas de fosfatidil colina de ovo. Esses espectros foram estudados em função da tempe-

ratura e analisados sob dois aspectos: (i) determinação da concentração efetiva de marcador na membrana e (ii) avaliação do tempo de correlação rotacional do marcador na membrana e na água. O comportamento de ambos os parâmetros foi comparado com o de f. Foram ainda estudados espectros dos marcadores em multi-bicamadas planas dos fosfolipídios (iii).

i. Determinação da Concentração Efetiva de Marcador na Membrana.

A concentração total do marcador (em unidades arbitrárias) é dada por:

$$(\text{Marcador})_{\text{total}} = (\text{Marcador})_{\text{membrana}} + (\text{Marcador})_{\text{água}} \quad (16)$$

Esta concentração foi obtida por dupla integração dos espectros (a primeira integral dá o espectro de absorção, a segunda dá a área, ver Fig. 70), através do uso de um computador Varian 620 I acoplado ao espectrômetro.

A fração de marcador no meio aquoso foi calculada da seguinte maneira: (1º) admitiu-se que a metade inferior da segunda linha de campo alto (P na Fig. 20) no espectro dos liposomas era devida somente ao marcador em água; (2º) espectros do marcador em concentração conhecida em água forneceram um valor P' para a metade inferior da linha de campo

alto e um valor A'_{H_2O} para a segunda integral. Normalizando-se P e P' para os mesmos ajustes do aparelho a $(\text{Marcador})_{\text{água}}$ para a dispersão lipídica é dada por

$$(\text{Marcador})_{\text{água}} = \frac{P}{P'} \times A'_{H_2O} \quad (17)$$

A $(\text{Marcador})_{\text{membrana}}$ foi calculada subtraindo-se o valor encontrado através da equação (17) da $(\text{Marcador})_{\text{Total}}$.

A fig. 21 compara o comportamento de $\ln f$ com o de $\ln [\text{marcador}]_{\text{membrana}}$ de $1/T$ para TEMPO em membranas de fosfatidil colina de ovo e DPPC. Neste último caso o paralelo entre os dois parâmetros é bom e forneceu valores para as temperaturas de pré-transição e transição de 32,5 e 40,7°C, respectivamente. Contudo, no caso de fosfatidil colina de ovo, a discrepância é grande, indicando que a partição do marcador entre os dois meios não é sempre o principal fator determinante do valor de f .

ii. Avaliação do Tempo de Correlação Rotacional do Marcador na Membrana.

A fim de avaliar a contribuição do tempo de correlação rotacional para os valores obtidos de f , aqueles foram calculados fazendo uso da teoria de estreitamento por movimento pelo Dr. C.P. Polnaszek. Os cálculos foram efetuados através do emprego de computação, uma vez que foi verificado que era ne-

cessário levar em conta a contribuição de fatores outros para a forma das linhas, entre os quais, desdobramento hiperfino de proton (TEMPO) e desdobramento hiperfino devido ao ^{13}C . Um certo grau de ordem do marcador pd-TEMPONA nas membranas (como será visto adiante) não permitiu o cálculo de τ para esta molécula repórter.

A fim de eliminar a contribuição do espectro do marcador no meio aquoso foram adicionados à solução íons, ou de Ni^{2+} ou de ferricianeto, que por uma interação paramagnética com o radical nitróxido tem a habilidade de alargar o espectro deste a ponto de ele não ser mais detetável. Em vista da grande impermeabilidade da membrana aos íons acima, o marcador presente neste meio continua fornecendo um espectro detetável, se bem que nas condições empregadas no presente trabalho, um certo alargamento por interação dipolar tenha sido observado mesmo no espectro da molécula repórter no meio lipídico (Fig. 22).

A Fig. 23 mostra a variação do $\ln \tau_B$ em função de $1/T$. Este gráfico é indicativo da temperatura de transição (observada a $39,1^\circ\text{C}$) da DPPC, da mesma forma como $\ln f$ versus $1/T$ também refletia essa temperatura ($40,7^\circ\text{C}$, Tabela IV). Porém a mudança de coeficiente angular para f observada com fosfatidil colina de ovo a cerca de 13°C , não ocorre para τ_B .

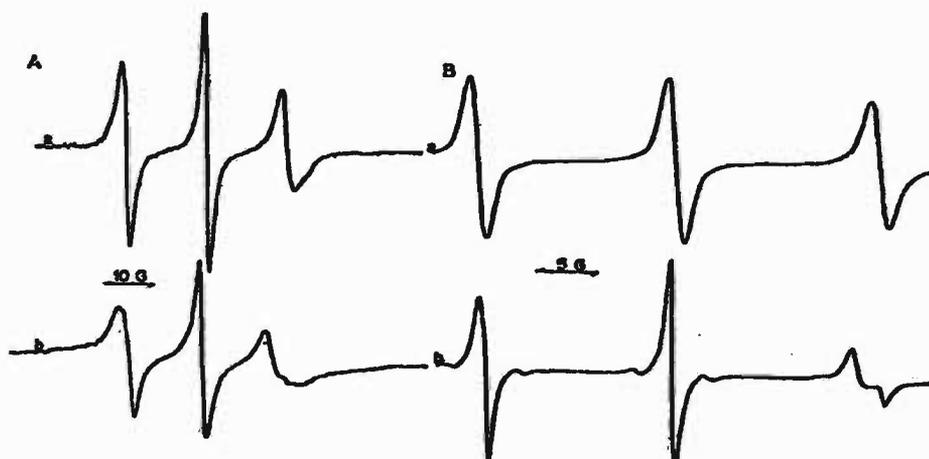


Fig. 22 Espectros de TEMPO (a) e pd-TEMPONA (b) em PC (A) e DPPC (B) na presença de solução de Ni^{2+} 0,125M a 25° C.

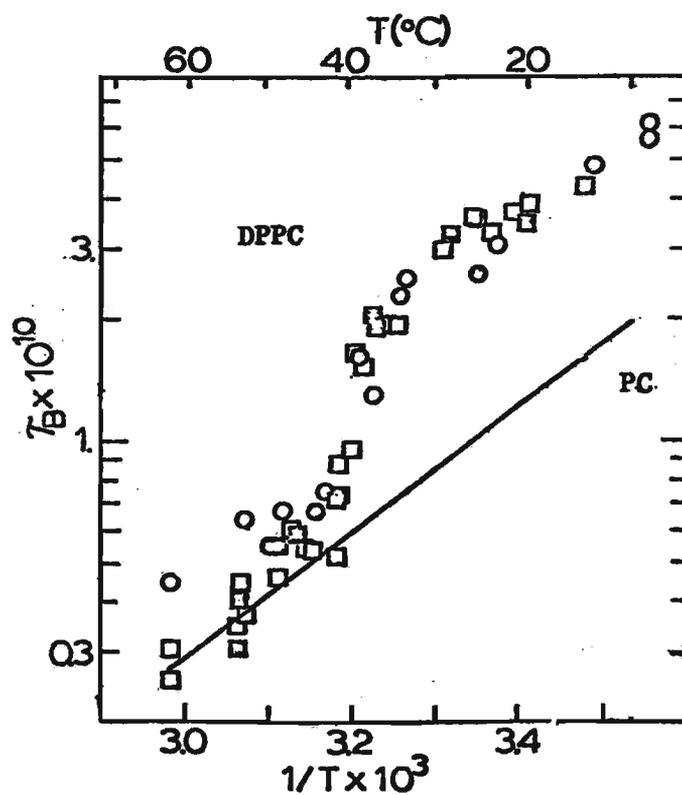


Fig. 23 $\log \tau_B$ em função de $\frac{1}{T}$ para TEMPO em PC (linha reta) e em DPPC (o, □)

iii. Espectros de TEMPO e pd-TEMPONA em Multi-bicamadas Planas.

Os espectros dos marcadores em multi-bicamadas planas de fosfolipídios foram obtidos em função do ângulo entre o campo magnético e a normal à bicamada. A dependência do espectro da orientação devida ao ordenamento da molécula repórter é especialmente evidente para pd-TEMPONA (Fig. 24), tanto pelo desdobramento hiperfino como pela forma das linhas. O espectro a 90° e, menos pronunciadamente, o espectro a 60° , apresentam resolução de todas as três linhas para as fases aquosa e lipídica. De acordo com o esperado, os espectros do marcador na fase aquosa são independentes da orientação da membrana em relação ao campo magnético.

b. Ácidos Graxos e Hidrocarbonetos de Cadeias Longas

Foi efetuado um experimento em que se colocou o composto orgânico e água, ambos contendo marcador, em compartimentos separados. Os espectros foram registrados em função da temperatura, e se assemelhavam aos de dispersões fosfolipídicas. O parâmetro "f" aparente foi calculado e gráficos de $\ln "f"$ versus $1/T$ apresentavam quebras acentuadas em temperaturas próximas do ponto de fusão dos compostos. A Fig. 25 mostra os resultados para TEMPO em octadecano. Evidentemente,

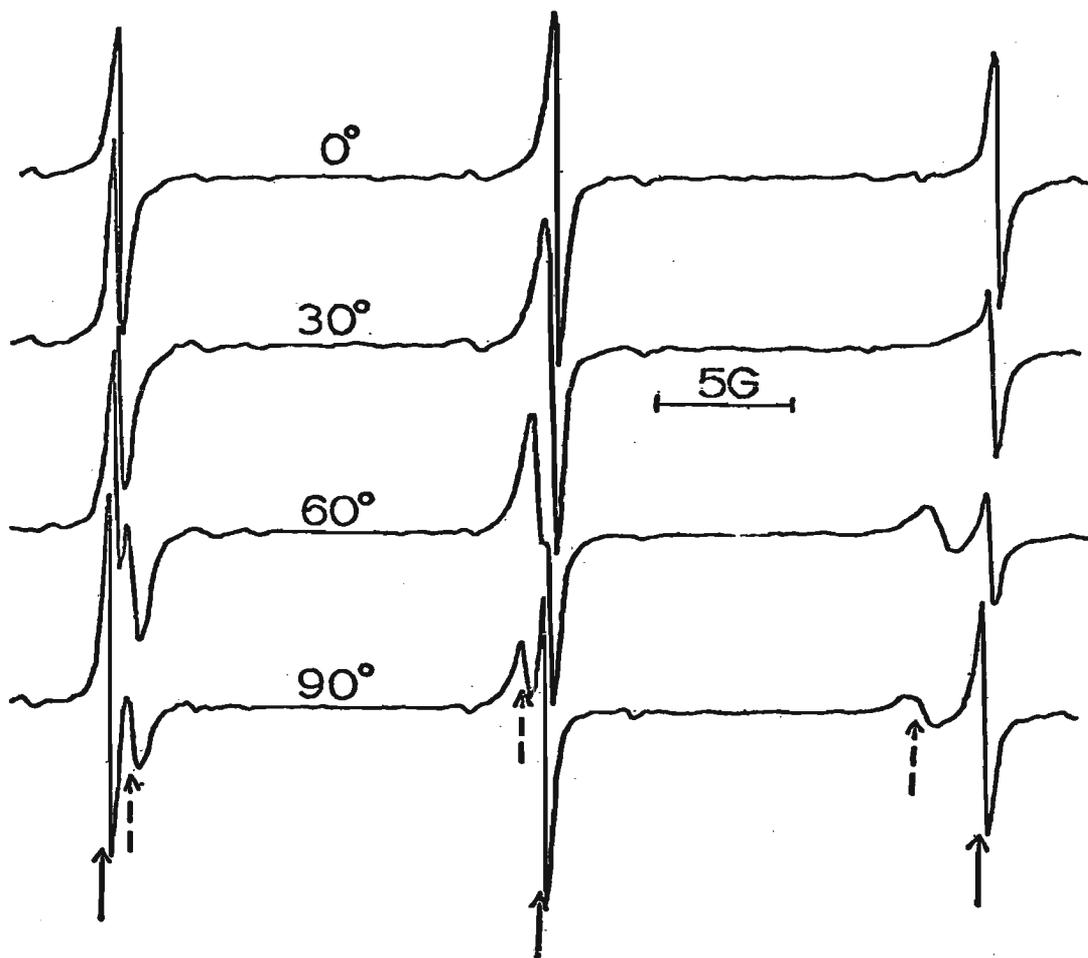


Fig. 24 Espectros de pd-TEMPONA em multi-bicamadas planas de PC a ângulos de 0, 30, 60 e 90° entre o campo magnético e a normal à bicamada. Setas sólidas, marcador na fase aquosa; setas pontilhadas, marcador na fase lipídica.

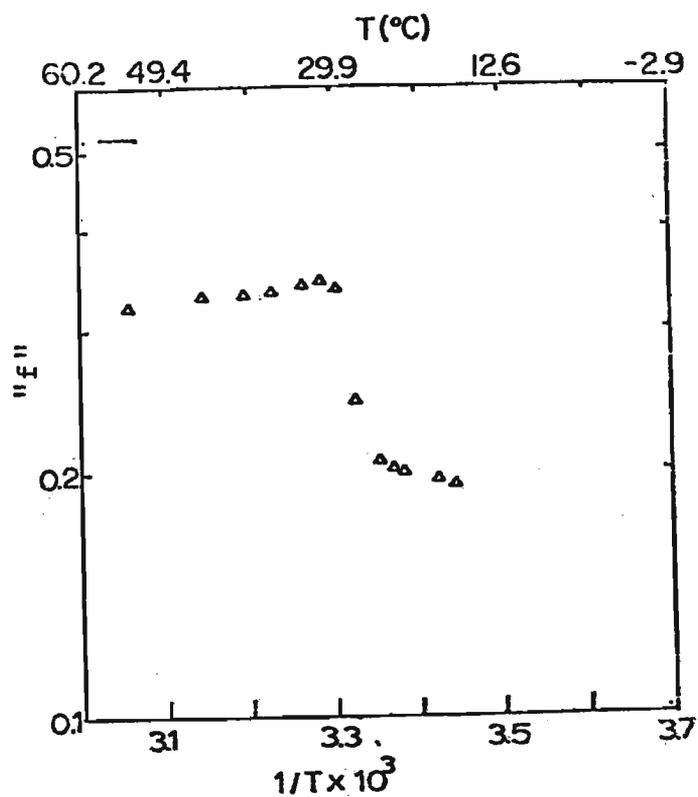


Fig. 25 Log "F" em função de $1/T$ para TEMPO em octadecano e em água em compartimentos separados.

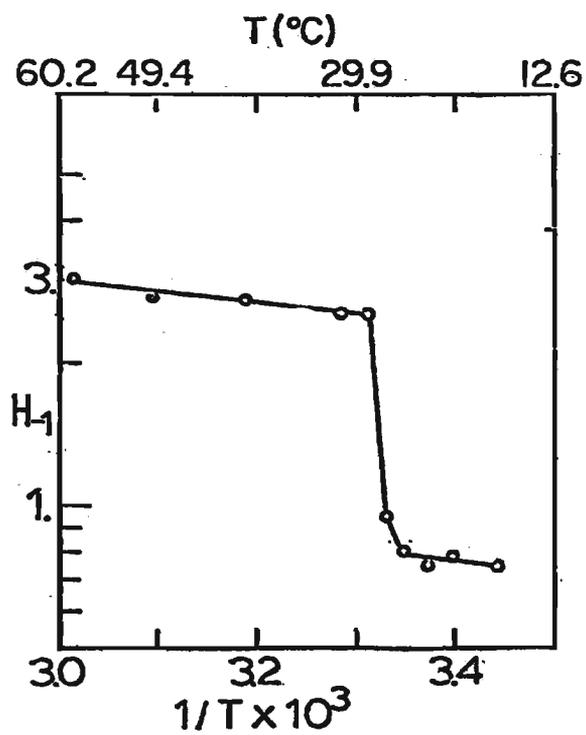


Fig. 26 Log H_1 em função de $1/T$ para TEMPO em octadecano e em água em compartimentos separados.

não ocorre partição e a mudança de "f" é devida à mudança de espectro do marcador em octadecano. Isto pode ser visto na Fig. 26 onde se verifica o comportamento de $\ln H_{-1}$ (altura da linha de campo alto) em função de $1/T$ para o espectro do marcador em octadecano apenas.

No caso do óleo de parafina-água (em compartimentos separados), uma mudança na inclinação de \ln "f" versus $1/T$ ocorreu a $\sim 15^{\circ}\text{C}$ (Fig. 27), enquanto que o óleo de parafina sozinho apresentou uma quebra no gráfico de $\ln H_{-1}$ a cerca de 20°C . Não ocorre uma mudança de fase aguda, uma vez que o sistema é constituído de uma mistura de compostos. Cálculos de τ foram efetuados. Os resultados para TEMPO e pd-TEMPONA em óleo de parafina estão na Fig. 28. Para compostos com pontos de fusão definidos foram observadas mudanças nas inclinações dos gráficos obtidos na região de temperatura de fusão quando se usou pd-TEMPONA. Para os ácidos graxos não houve variação na inclinação quando se empregou TEMPO. Abaixo do ponto de fusão de todos os compostos para ambos os marcadores ocorreu um aumento de interações spin-spin, resultantes de agregação dos marcadores. O alargamento das linhas devido a interações spin-spin é grandemente responsável pelas quebras observadas na Fig. 26.

A tabela III apresenta valores de τ calculados no presente trabalho.

Os gráficos de $\ln \tau$ versus $1/T$ permitiram a determinação das energias de ativação apresentadas na Tabela IV.

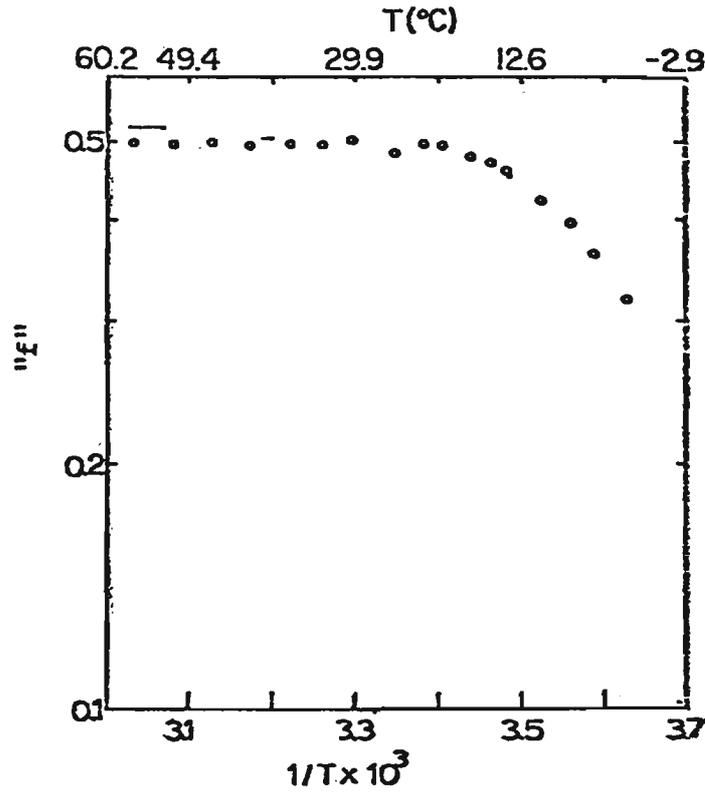


Fig. 27 Log. "f" em função de $1/T$ para TEMPO em óleo de parafina e em água em compartimentos separados.

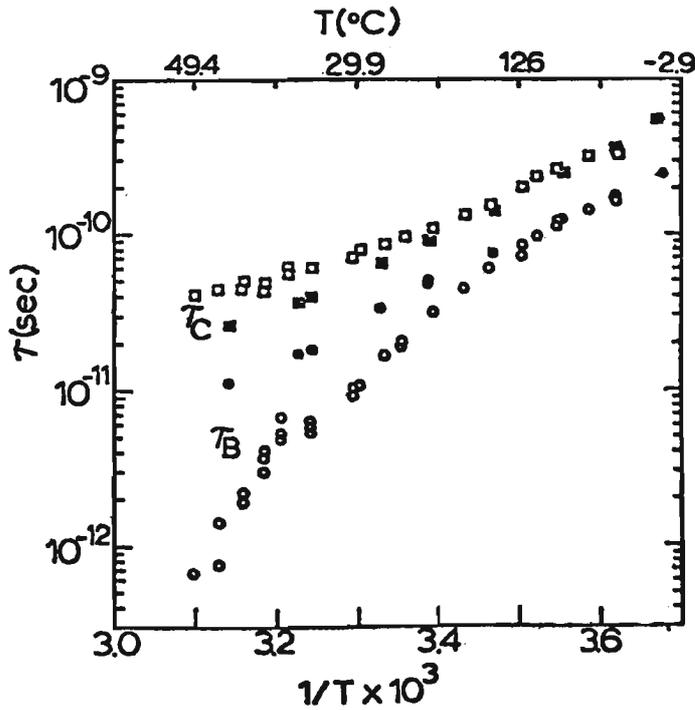


Fig. 28 Logaritmo de τ_B (círculos) e τ_C (quadrados) em função de $1/T$ para TEMPO (o, o) e pd-TEMPONA (•, ■) em óleo de parafina.

TABELA III

Valores de tempos de correlação rotacional (τ_B e τ_C) para os marcadores de spin TEMPO e pd-TEMPO nos sistemas estudados

Sistema	Marcador	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$\tau_B \times 10^{11}$ (segundos)	$\tau_C \times 10^{11}$ (segundos)
Óleo de parafina	TEMPO	25	2,0	9,5
	pd-TEMPO	25	3,7	7,6
	pd-TEMPO	40	0,34	1,2
Ácido oleico	TEMPO	25	4,0	4,1
	pd-TEMPO	25	6,5	6,0
H_2O	TEMPO	25	1,0	1,0
D_2O	pd-TEMPO	25	1,6	1,7
Fosfatidil colina de ovo	TEMPO	25	10	12
DPPC	TEMPO	50	4,5	5,6
	TEMPO	25	35	63

Valores deduzidos de energias de ativação (E_a) para rotação dos marcadores de spin TEMPO e pd-TEMPONA nos sistemas estudados (l=líquido e s=sódio) e temperaturas de mudança de fase ou de ocorrência de mudança de coeficiente angular em gráficos de parâmetros analisados no presente trabalho.

Sistema	Parâmetro	Marcador	E_a^l (kcal/mol)	E_a^s (kal/mol)	Temperatura (°C)	Referência
Óleo de parafina	τ_B	pd-TEMPONA	11,7	-	-	presente trabalho
	τ_C	pd-TEMPONA	11,6	-	-	" "
	f	TEMPO			-15	" "
	H_{-1}	TEMPO			-20	" "
Octadecano	τ_B	pd-TEMPONA	11,5	38	28,7	" "
	τ_C	pd-TEMPONA	4,6	30	29,9	" "
	f	TEMPO			28	" "
	H_{-1}	TEMPO			28	" "
Ácido decanoico	ponto de con- gelamento				28,2	(321)
	τ	pd-TEMPONA	4,3	13,2	30,1	presente trabalho
	τ	TEMPO	4,1	-	(não foi de- tetado)	" "
	f	TEMPO			30	" "
Ácido Oleico	H_{-1}	TEMPO			30	" "
	ponto de con- gelamento				31,4	(322)
	τ	TEMPO	6,1	-	(não foi de- tetado)	presente trabalho
	τ	pd-TEMPONA	6,9	2,4	4,2	" "
Fosfatidil coli- na de ovo	ponto de con- gelamento				4	(322)
	τ	TEMPO	7,7		<-4	presente trabalho
	f	TEMPO			-13	" "
	τ	DTBN ^a	6,8			(323)
DPPC	f	DTBN			-9	(323)
	fluorescência	DPH ^b	8,3		<4	(324)
	f	TEMPO ^d			40,7	presente trabalho
	τ_B	TEMPO ^d	7,5		39,1	" "
	τ_B	TEMPO ^e	4,8		36,6	" "
	f	TEMPO ^d			40,5	(30)
	f	TEMPO ^e			36,5	(325)
	fluorescência	DPH ^d	12,5		41,1	(324)
"	DPH ^e	12,3		36,4	(324)	
H ₂ O	CDV ^{c,d}				41,1	(326)
	CDV ^e				36,9	(326)
	τ	TEMPO	4,8			presente trabalho
	τ	pd-TEMPONA	4,0			" "

^a- di-tert-butil nitróxido; ^b- 1,6-difenil -1,3,5-hexatrieno; ^c- calorimetria diferencial de varredura; ^d- liposomas; ^e- vesículas.

A tabela IV apresenta também as temperaturas em que é observada mudança de fase do sistema ou alteração do coeficiente angular em gráficos de parâmetros analisados no presente trabalho.

A energia de ativação para rotação de TEMPO em fosfatidil colina de ovo é maior do que em água e o valor deduzido de τ é aproximadamente uma ordem de grandeza maior à temperatura ambiente. Portanto, a linha de campo alto de TEMPO em fosfatidil colina de ovo deve alargar-se mais acentuadamente do que em água com o abaixamento da temperatura, fazendo com que f varie de maneira não linear, como visto na Fig. 21. Isso sugere que os efeitos atribuídos a alterações dos parâmetros f (ou α), tais como agregação de lipídios ou mudanças de fase múltiplas podem ocorrer como resultado do alargamento diferencial das linhas espectrais para marcador em água e na membrana.

Para TEMPO em DPPC há uma variação aguda (não observada em nenhum outro sistema) nos valores de τ_B e τ_C na temperatura de transição obtendo-se $T_C = 39,1^\circ\text{C}$ para liposomas e $36,6^\circ\text{C}$ para vesículas. A pré-transição não foi detectada. A grande variação de τ_B na transição de fase e a concomitante diminuição da amplitude da linha de campo alto devida a marcador na membrana, resultam no grande abaixamento de f abaixo de T_C .

Em conclusão, os resultados indicam que mudanças de coeficiente angular em gráficos de parâmetros de partição em função da temperatura podem não ser devidas apenas a mudanças na concentração de marcador de spin nas fases aquosa e membranosa.

Diferenças nos valores de energia de ativação para o movimento dos marcadores de spin nos dois meios afetarão de maneira diferente as larguras das linhas espectrais, especialmente a de campo alto nos espectros dos marcadores na membrana e em água, introduzindo erros em valores de parâmetros de partição calculados a partir das alturas das linhas.

Mudanças muito acentuadas em tais gráficos usualmente correspondem a verdadeiras mudanças de estado, e provavelmente também, de partição de solutos(327).

3. Influência da Estrutura de Membranas sobre Propriedades de Permeabilidade das Mesmas*

O efeito da natureza dos componentes da membrana sobre sua estrutura, com conseqüente influência sobre suas propriedades de permeabilidade foi examinado estudando-se a cinética de reação do íon ascorbato com radicais nitróxido intercalados na membrana. Esse estudo foi efetuado observando-se a queda do sinal de RPE em função do tempo.

* Ref. 267

A particularidade desse método em relação a qualquer método anteriormente empregado no estudo de permeabilidade reside no fato de se poder observar os eventos de permeação em pontos definidos ao longo da espessura da membrana através da escolha de marcadores de spin que apresentam os grupamentos N-O localizados de tal forma na molécula que, quando intercalados na membrana, eles se situem em diferentes regiões da mesma.

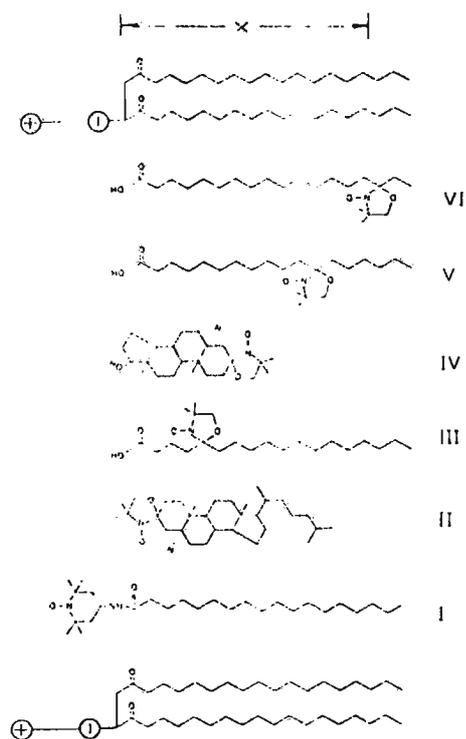
O fenômeno de permeação de solutos, iônicos e não iônicos, e de água, tem sido tratado teórica e experimentalmente de diferentes maneiras(328-331). Assim, modelos baseados em Termodinâmica irreversível (332) ou em explicações ao nível molecular (333) tem sido propostos para o mecanismo de permeação.

Uma grande quantidade de dados experimentais tem sido acumulada a respeito da permeabilidade de membranas biológicas(334) e artificiais(335). Numerosos estudos, tais como, da difusão de espécies permeantes radioativas(272), medidas elétricas(336), ópticas(108) e de pressão superficial(135), espectroscopia de RMN(89-95) e de RPE(96-100), têm sido usados para uma variedade de sistemas lipídicos organizados em monocamadas(135), multi-bicamadas planas (119), liposomas(101), vesículas(110), ou membranas negras(124), a fim de relacionar seu comportamento com propriedades de permeabilidade.

Foi encontrado que as características de permeabilidade dependem da composição da cabeça polar e do grau de fluidez do "core" hidrofóbico de membranas(337), tendo-se verificado que este último depende do comprimento e grau de insaturação das cadeias fosfolipídicas e da presença de compostos do tipo de colesterol(337).

Em alguns estudos tem sido sugerido que os valores de energia de ativação do processo de permeação refletem a remoção de água de hidratação do soluto permeante como sendo a etapa determinante da velocidade de partição de um soluto em uma membrana (338-340).

A Fig. 29 mostra os marcadores de spin usados no presente estudo. Os sistemas empregados foram fosfatidil colina de ovo (PC) e PC (65 mol%)-colesterol (35 mol%) a fim de examinar o efeito da fluidez do "core" hidrofóbico na velocidade de redução do radical N-O. Empregaram-se ainda PC(35 mol%)-PS(30 mol%)-colesterol (35 mol%) e PC (50 mol%)-cloreto de hexadeciltrimetil amônio (HDMTA, 15 mol%)-colesterol (35 mol%), que foram comparados com PC (65 mol%)-colesterol (35 mol%) para analisar o efeito da carga na cabeça polar. O mesmo conteúdo de colesterol faz com que se obtenha aproximadamente o mesmo grau de empacotamento na parte hidrofóbica, como evidenciado pela semelhança da forma das linhas de marcadores inseridos nos diferentes sistemas.



- 29 Marcadores de spin empregados no presente estudo. A figura representa as posições em que os marcadores se encontram em bicamadas lipídicas, de acordo com o concluído através dos resultados. I-SSL; II- CSL; III- 5-SASL; IV- ASL; V- 12-SASL; VI- 16-SASL.

a. A Cinética de Reação

i. Meias Vidas

Contrariamente ao que é observado para a reação de ascorbato com o grupamento N-O em meio aquoso, ou seja, uma rápida redução da espécie paramagnética (a amplitude do sinal fornecido por 50 μ l de uma solução $3,3 \times 10^{-3}$ M de marcador caiu de 99,9% em 2 minutos ao se adicionarem 5 μ l de ascorbato de sódio 0,35 M, pH 7,5 (115), a velocidade de desaparecimento do sinal de RPE de marcadores intercalados em bicamadas planas é muito mais baixa e depende da estrutura molecular do marcador e da composição lipídica da membrana.

A queda da altura do sinal de RPE foi usada para acompanhar o processo, uma vez que não houve mudança na forma das linhas durante o experimento. A Fig. 30 ilustra um desses experimentos. Os espectros foram tirados em intervalos de tempo definidos, deslocando-se o espectro de 1 gauss a cada vez, com o campo magnético paralelo à normal à bicamada. A queda exponencial é evidente. A Fig. 31 é um gráfico do logaritmo da altura das linhas em função do tempo, indicando que o processo é de primeira ordem em relação ao marcador de spin. O mesmo foi observado para ascorbato.

A Tabela V dá as meias vidas ($t_{1/2}$) para a reação à 19°C para todos os sistemas estudados. A meia vida a essa temperatura não pode ser determinada para o marcador SSL, pois a reação foi

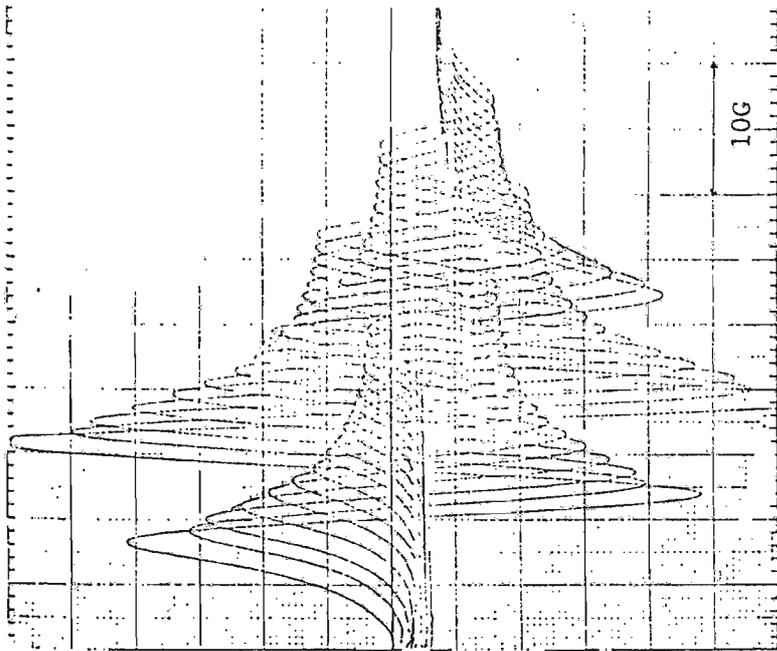


Fig. 30 Espectros de CSL em multi-bicamadas planas de PC (50%) -colesterol (35%)-HDMA (15%) em função do tempo, após hidratação com ascorbato de sódio 10^{-3} M, pH 6,5, 6°C. Os espectros foram tirados em intervalos de 2 minutos, mudando-se o valor do campo de 1G: Campo magnético para \vec{h} normal à bicamada.

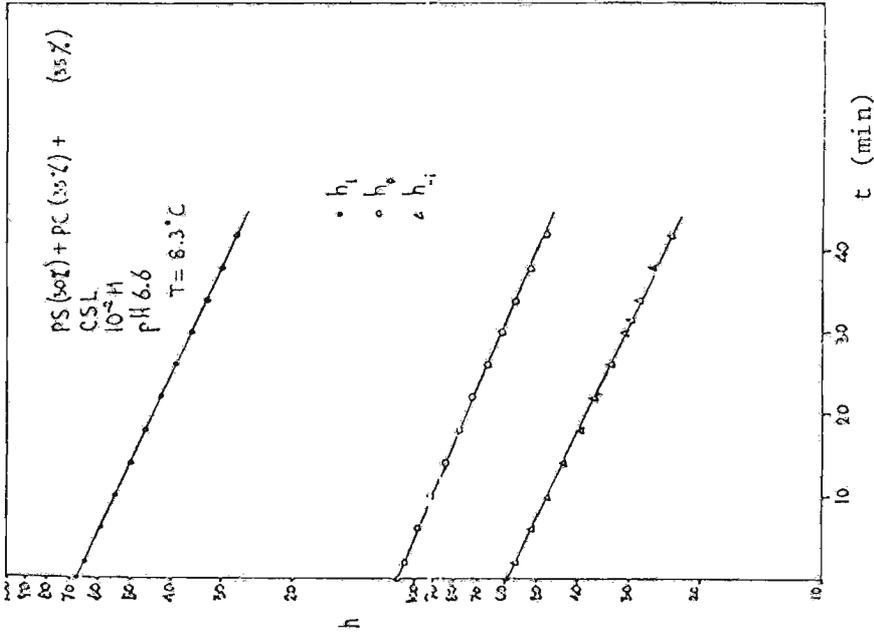


Fig. 31 Logaritmo das alturas das linhas dos espectros de RPE do marcador de spin CSL em multi-bicamadas de PC (35%)-colesterol (35%)-PS (30%) hidratadas com ascorbato de sódio 10^{-2} M, pH 6,6, 80°C, em função do tempo de hidratação. • h_1 , ○ h_0 , △ h_{-1} .

TABELA V

Meias vidas ($t_{1/2}$) a 19°C para a reação entre ascorbato (10^{-2}M , pH 6,2-6,8) e marcadores de spin em multi-bicamadas planas de composição variada.

Marcador de spin	$t_{1/2}$ (min)			
CSL	-	3,2	12	5,9 ^a
5-SASL	9,5	11,5	51	-
ASL	16	29	85	16
12-SASL	30	60	136	-
16-SASL	32	-	166	34

a - ascorbato = 10^{-3}M

muito rápida. A $3,5^{\circ}\text{C}$, $t_{1/2}$ foi 3 min para SSL em PC (65mol%)-colesterol (35mol%). Isto deve ser comparado a um valor de 13 min a $4,0^{\circ}\text{C}$ para CSL. Estes resultados e os da Tabela V indicam que o acesso do N-O ao ascorbato diminui à medida que o primeiro se localiza em regiões mais afastadas da cabeça polar (de acordo com o que se esperaria pela estrutura das moléculas e também tomando por base valores estimados do desdobramento hiperfino isotrópico(151)).

A Tabela V mostra também que para um dado marcador, o processo é mais lento se o "core" lipofílico é mais densamente empacotado (comparar PC com PC-colesterol). $t_{1/2}$ também é maior para membranas contendo PS (carga negativa) do que para aquelas contendo apenas PC (carga total zero), que por sua vez apresentam $t_{1/2}$ maior do que as que contem HDTMA (carga positiva) (todas com 35 mol% de colesterol). Este fato também está de acordo com as expectativas, considerando que o ascorbato possui uma carga negativa ($\text{pK}_{a1} = 4,2$) nas condições do experimento (pH 6,2-6,8).

ii. Energias de Ativação

As energias de ativação foram calculadas a partir de experimentos à temperatura variada e encontram-se na Tabela VI. Verifica-se que a energia de ativação não variou significativamente nem com o marcador de spin, nem com a composição da cabeça polar. Uma queda considerável foi observada, no entanto, quando se alterou o empacotamento da região lipofílica.

TABELA VI

Energias de ativação (E_a) para a reação entre ascorbato ($10^{-2}M$, pH 6,2-6,8) e marcadores de spin em multi-bicamadas planas de composição variada.

Marcador de spin	E_a (.kcal/mol)		
	PC	PC (65%) + colesterol (35%)	PS (30%) + PC (35%) + colesterol (35%)
CSL	-	14	15
5-SASL	6	13	-
ASL	6	16	14
12-SASL	6	15	-
			HDTMA (15%) + PC (50%) + colesterol (35%)
			16
			-

b. Localização dos Marcadores de Spin

Os resultados da Tabela V permitem concluir que as posições relativas dos grupamentos N-O dos marcadores de spin em bicamadas são as mostradas na Fig. 29.

Foi anteriormente mostrado que uma molécula repórter solúvel na água e um fosfolipídio marcado na cabeça polar(115) sofrem redução por ascorbato muito rapidamente. Nossos resultados com SSL, cujo grupamento paramagnético se encontra provavelmente na interface membrana-água, são coerentes com as observações anteriores.

É digno de nota que, embora o CSL seja reduzido muito mais depressa do que 5-, 12- e 16-SASL e ASL, o $t_{1/2}$ para sua redução é consideravelmente maior que para SSL nas mesmas condições. Isto indica que o anel oxazolidínico do CSL, embora consideravelmente exposto à interface aquosa, está localizado mais fundo do que o anel de TEMPO do SSL, e, portanto não se localiza na região da cabeça polar da membrana. Este é um fato importante para a análise espectral. Por exemplo, no estudo do efeito do colesterol em membranas de fosfatidil colina de ovo e de DPPC, a ser relatado na Sec.III.B.1 foram encontrados resultados quantitativamente diferentes para marcadores esteroidícos e para marcadores derivados de ácidos graxos. Estes foram interpretados como devidos a diferenças entre as formas

e a rigidez dos diferentes grupos e não ao fato de que eles se localizariam em diferentes regiões da membrana. Essa interpretação está de acordo com os resultados aqui obtidos.

c. Características de Permeabilidade de Bicamadas Lipídicas. Mecanismo de Permeação.

Foi anteriormente mencionado que a velocidade de reação de ascorbato com marcadores de spin em solução é muito rápida. Admitindo que a polaridade do ambiente não afeta significativamente a velocidade de reações radicalares, analisamos os resultados em membranas como sendo devidos ao processo de permeação.

Um mecanismo foi proposto(333) pelo qual a permeação de um soluto através de uma membrana dependeria de seu coeficiente de partição membrana-água (K_p), do coeficiente de difusão (D) na membrana e da espessura da membrana (l). O coeficiente de permeabilidade (P) é dado por

$$P = \frac{K_p D}{l} \quad (18)$$

Os resultados experimentais podem ser interpretados com base na equação (18). Nesse sentido, as cargas na superfície da membrana (respectivamente negativa e positiva em membranas contendo PS e HDTMA) repelirão ou atrairão o íon ascorbato, diminuindo ou aumentando sua concentração efetiva

na dupla camada difusa se comparado com o sistema contendo apenas PC (carga total nula, todos em presença de 35% mol % de colesterol. Isto afetará a partição do ascorbato na membrana. A Tabela V mostra que as meias vidas de redução para um dado marcador aumentam de acordo com o esperado nesses sistemas.

Um exame dos valores da energia de ativação (Tabela VI) revela que estes praticamente não são afetados pela variação da composição da cabeça polar. Isto sugere que a etapa de partição não contribui de maneira significativa para a energia de ativação do processo global, isto é, não é a etapa determinante da velocidade para a permeação de ascorbato. De fato, a contribuição do potencial de superfície à energia de ativação devida à presença dos lipídios carregados foi calculada pelo Dr. D. Marsh. Foi observado que a carga afetaria a energia de ativação em quantidade comparável ao erro experimental.

de Gier e colaboradores (338), Kroes e Ostwald (339), McElhaney e colaboradores (356) e Graziani e Livne (340) não observaram alterações na energia de ativação para permeação de uma série de solutos não-iônicos e água através de uma série de membranas quando se variava o conteúdo de colesterol. Assim, foi proposto que, no caso de solutos não-iônicos, a etapa determinante da velocidade seria a partição do soluto na membrana. A remoção da água de hidratação para que os compostos

pu^{de}sem penetrar na membrana foi sugerida como sendo o fator principal determinante da energética da partição. Em contraste com esses resultados, a variação do conteúdo de colesterol nos sistemas por nós estudados, causou alteração tanto das meias vidas como das energias de ativação (Tabelas V e VI) para a redução de marcadores de spin por ascorbato.

A discussão sobre efeitos da composição da cabeça polar girou em torno de sistemas cujo empacotamento da região hidrofóbica era essencialmente o mesmo. Um empacotamento muito menos denso é encontrado em PC apenas (ver Sec.III.B.1). Comparando-se PC e PC-35 mol% colesterol, observa-se (Tabelas V e VI) que tanto $t_{1/2}$ como a energia de ativação variam para um dado marcador de spin. Estes resultados sugerem que a difusão de ascorbato na membrana tem um papel importante no processo global, contribuindo significativamente para a energia de ativação. Assim, a difusão no "core" lipofílico da bicamada constitui a etapa determinante da velocidade no processo de permeação do ascorbato. Isto está de acordo com o papel postulado por Lieb e Stein (333) para a difusão no mecanismo de permeação.

A maior permeabilidade de membranas de PC está de acordo com a teoria de Träuble (330) de permeabilidade que sugere que o mecanismo molecular de transporte de solutos através de membranas se baseia na formação de dobras transientes (kinks) nas cadeias de ácidos graxos através da combinação de isô

meros *trans* e *gauche*, um maior número de conformações *gauche* gerando um maior número de dobras. Um aumento do conteúdo de colesterol promove uma diminuição da população de isômeros *gauche* (Sec III. B.1) e também aumenta a barreira de energia para a interconversão *trans* - *gauche*, o que por sua vez diminuiria a população de dobras. Isto acarretaria uma diminuição na velocidade de permeação, assim como um aumento da energia de ativação do processo.

d. Aplicabilidade do Princípio Envolvido no Presente Trabalho.

A maior parte dos experimentos que estudam propriedades de permeabilidade de membranas são baseados na medida de propriedades macroscópicas, muitas vezes efetuadas na região aquosa que banha a membrana.

O uso de marcadores de spin com a parte paramagnética localizada em diferentes regiões de bicamadas lipídicas, oferece uma maneira conveniente de analisar o processo de permeação *dentro* da bicamada, a distâncias variadas da interface aquosa.

O princípio envolvido na execução dos presentes experimentos poderia facilmente ser estendido a outras técnicas, introduzindo um grande número de possibilidades para o estudo do processo de permeação ao nível molecular.

B. Estudos de Interações com Agentes que Atuam ao Nível de Membranas.

1. Efeito do Colesterol sobre a Estrutura de Membranas*.

Entre os componentes de membranas de mamíferos, o colesterol é um dos mais estudados. Investigações a respeito da ação desse esterol ao nível molecular procuram relacionar esse tipo de dados com o papel do colesterol ao nível biológico e clínico.

Estudos em sistemas de monocamadas revelam que o colesterol é capaz de condensar filmes expandidos de fosfatidil colinas (341-345). O fenômeno de condensação consiste na medida de uma área para o sistema colesterol-fosfolipídio que é menor do que a soma das áreas colesterol isolado + fosfolipídio isolado.

Medidas de raios X também permitem um cálculo indireto de área molecular e indicaram que em bicamadas o colesterol diminui a área ocupada por lipídios em fase líquido-cristalina (119,346, 347)

* Ref. 153

enquanto que fluidiza as cadeias de fosfolipídios em fase gel (62).

Experimentos de RMN indicaram que o colesterol causa um alargamento do pico devido aos grupos metilênicos das cadeias alifáticas dos fosfolipídios (348-350).

De fato, esse tipo de informações levou à proposta de que o colesterol atuaria com um tampão de fluidez de membranas (351) ou, em outras palavras, como um mediador de fluidez, podendo aumentar ou diminuir a mesma dependendo do estado inicial do fosfolipídio. Estudos de permeabilidade estão de acordo com esse papel, em um grande número de casos (352-357).

A literatura sobre o efeito do colesterol continua a crescer muito (358-394). Alguns estudos recentes propõem a distribuição desigual de colesterol entre as monocamadas interna e externa de vesículas (362, 372). O arranjo minucioso do ajustamento entre o esqueleto do colesterol e as cadeias do fosfolipídio também foi descrito(377).

O problema de se o colesterol forma complexos estequiometricamente definidos permanece uma questão em aberto (349, 350, 359,360,369, 370). O que é certo é que os requisitos estruturais para que o colesterol exerça os efeitos observados são vários e foram verificados através de estudos comparativos com vários esteróis e esteroides(197, 395-398). Assim o grupo β -OH é fundamental, bem co

mo a coplanaridade dos anéis; ainda, a presença da cadeia alifática na posição 17 tem participação. Apenas a dupla ligação 5, 6 não parece ser indispensável, de sorte que o colestanol é equivalente ao colesterol em quaisquer tipos de estudos efetuados.

Já em 1969 o grupo de Smith (121) publicava o primeiro trabalho em que se aplicava o método de marcador de spin ao estudo da ação do colesterol em membranas fosfolipídicas. Outros se seguiram (192, 399) e em 1972, Lapper e colaboradores (152) publicaram um estudo em que se examinavam os efeitos da adição de colesterol à fosfatidil colina de ovo através da análise minuciosa dos espectros de CSL intercalados em bicamadas planas.

Espectros simulados em computador indicavam que a execução de um caminho ao acaso dentro de um volume cônico do eixo longo molecular do CSL era um modelo adequado para descrever os espectros obtidos. Colesterol foi considerado como sendo capaz de diminuir o ângulo que caracterizava esse volume cônico e ainda de diminuir o parâmetro de largura da distribuição dos valores desse ângulo (Secs. I.B.5 e I.C.1.b.ii).

Nós nos propusemos a ampliar esse estudo fazendo uso dos outros marcadores de spin, em especial, os derivados de ácidos graxos, a fim de verificar o comportamento de cadeias flexíveis em face à adição de colesterol, em contrapartida ao empre-

go da molécula rígida do CSL. A fim de confirmar os resultados para outra molécula rija, foi utilizado o ASL e os resultados comparados com os obtidos para o CSL. Foi ainda empregada outra molécula flexível, o SSL, cujo grupamento N-O se situa na região da interface membrana-água. Os sistemas estudados foram fosfatidil colina de ovo (PC) e DPPC, na forma de multi-bicamadas planas e na forma de liposomas.

Os espectros foram analisados em termos de parâmetros de ordem, S , que no caso dos marcadores derivados dos ácidos graxos foi analisado em termos da teoria de Hubbell e McConnell (145) (Sec. I.C.1.b.iii), tendo sido calculados valores de S_0 e P_t em função da quantidade de colesterol adicionada aos sistemas.

a. Multi-bicamadas Planas de Fosfatidil Colina de Ovo

A Fig. 32 mostra os espectros para os marcadores empregados em multi-bicamadas planas de PC em presença de 0 e 30 mol% de colesterol. A anisotropia dos espectros é maior na segunda série. A Fig. 33 mostra o efeito de crescentes concentrações de colesterol sobre o parâmetro de ordem para todos os marcadores, exceto o SSL. Para este último foi colocado nas ordenadas o valor da diferença ($T'_\parallel - T'_\perp$).

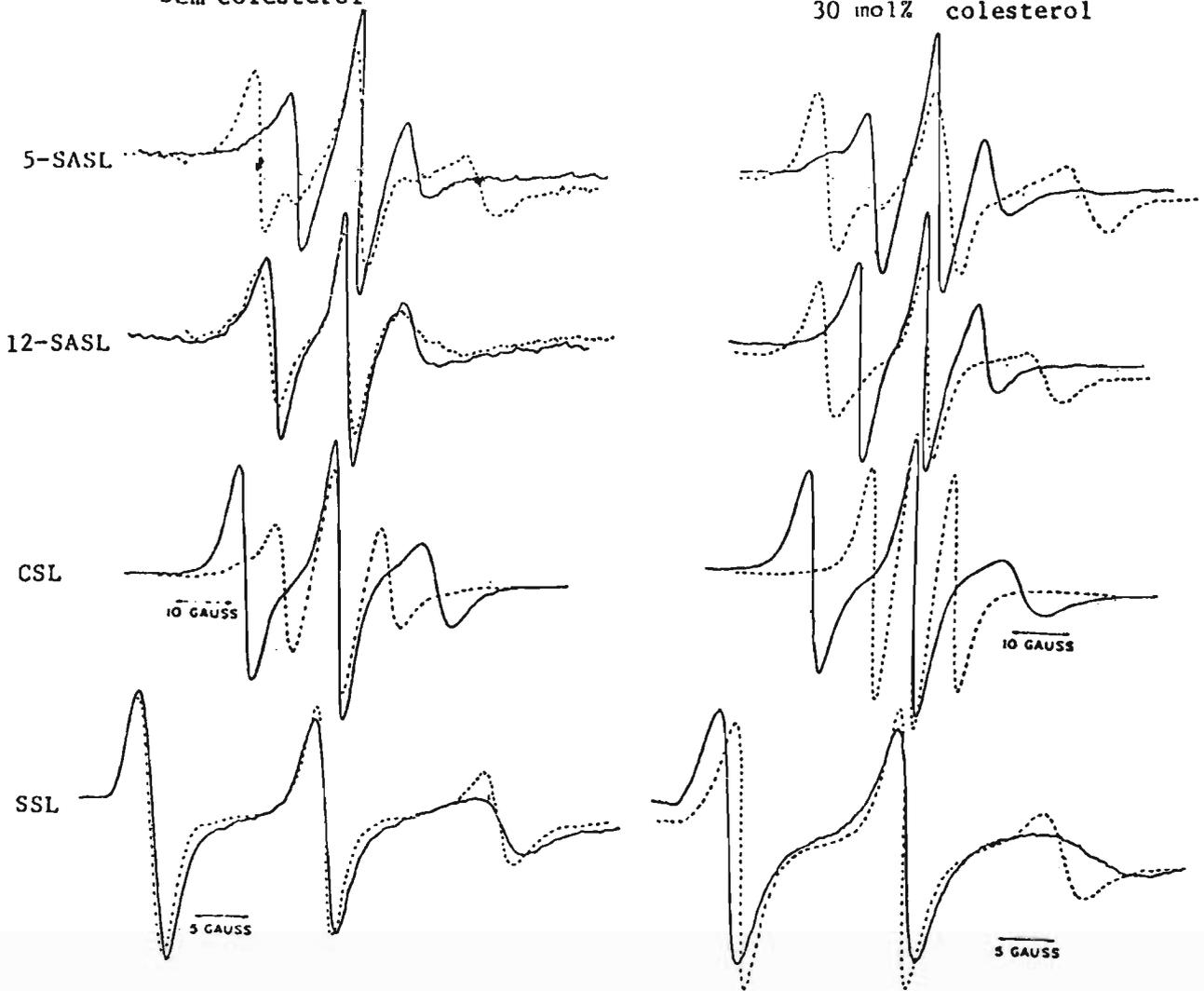
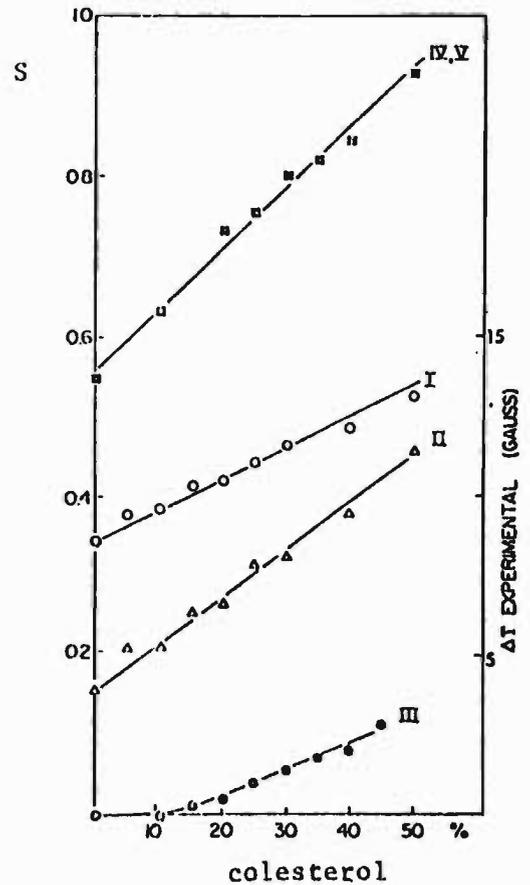


Fig. 32 Espectros dos marcadores 5-SASL, 12-SASL, CSL e SSL em multi-bicamadas planas de PC e PC-colesterol (30%).

Fig. 33 Parâmetro de ordem, S , para os marcadores I- 5-SASL, II- 12-SASL, III- SSL, IV- ASL e V- CSL em multi-bicamadas planas de PC com conteúdo variável de colesterol.



Os resultados para o ASL coincidem com aqueles para o CSL. Os valores de S foram calculados a partir de $T'_{||}$ e T'_{\perp} efetuando-se as correções apontadas no trabalho de Hubbell e McConnell (145); foi introduzido o fator de correção da polaridade e T'_{\perp} efetivo = T'_{\perp} medido + 0,8 gauss.

Idealmente deveriam ser estudados vários marcadores derivados de ácidos graxos com o anel oxazolidínico em variadas posições ao longo da cadeia, a fim de verificar se nossos sistemas apresentavam a mesma linearidade no gráfico de $\log S$ versus n (n = posição do anel oxazolidínico na cadeia) observada para outros sistemas. Isso não foi efetuado mas admitiu-se como sendo verdadeiro.

Os valores de S_0 e P_t para as misturas de PC-colesterol estão na Fig. 34. O aumento de P_t com quantidades crescentes de colesterol indica que ocorre uma interação entre este e o fosfolipídio que causa uma diminuição da área ocupada pelo último através de uma extensão das cadeias devido ao aumento da população de conformação *trans*. Isso explica, ao menos parcialmente, o efeito de condensação do colesterol. S_0 também aumenta com o aumento de colesterol. Valores dos ângulos β e γ definidos nas Secs. I.B.5 e I.C.1.b.ii calculados para 5- e 12-SASL a partir de S_0 e para CSL a partir de S em função da porcentagem de colesterol, são dados na Fig. 35.

Uma comparação de S_0 (Fig. 34) com S (Fig. 33) para CSL e ASL, ou da mudança de ângulos (Fig.

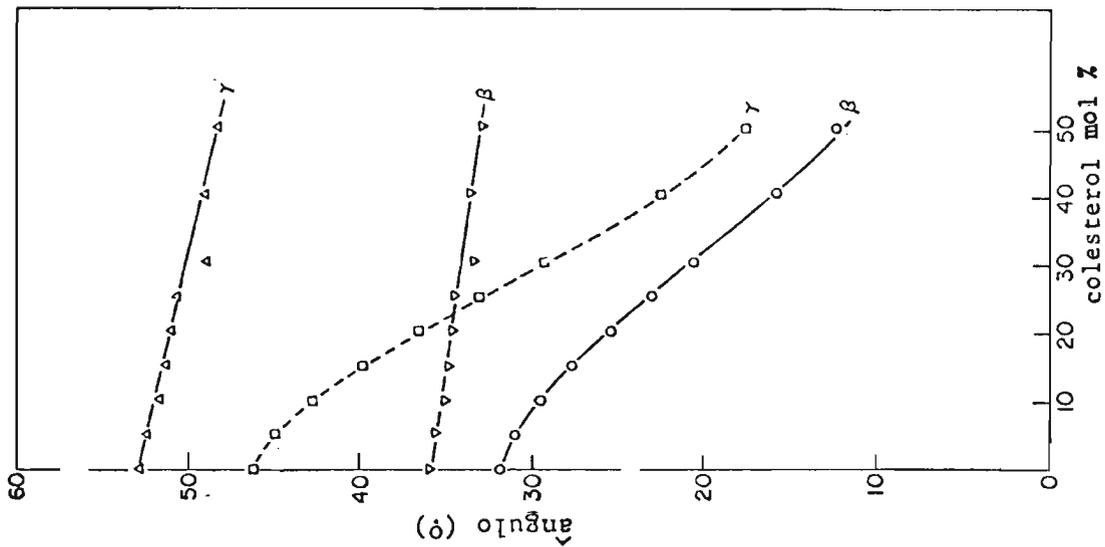


Fig. 34 Probabilidade de conformação *trans* (P_t) e parâmetro de ordem S_0 para marcadores de spin derivados de ácidos graxos em multi-bicamadas planas de PC com conteúdo variável de colesterol.

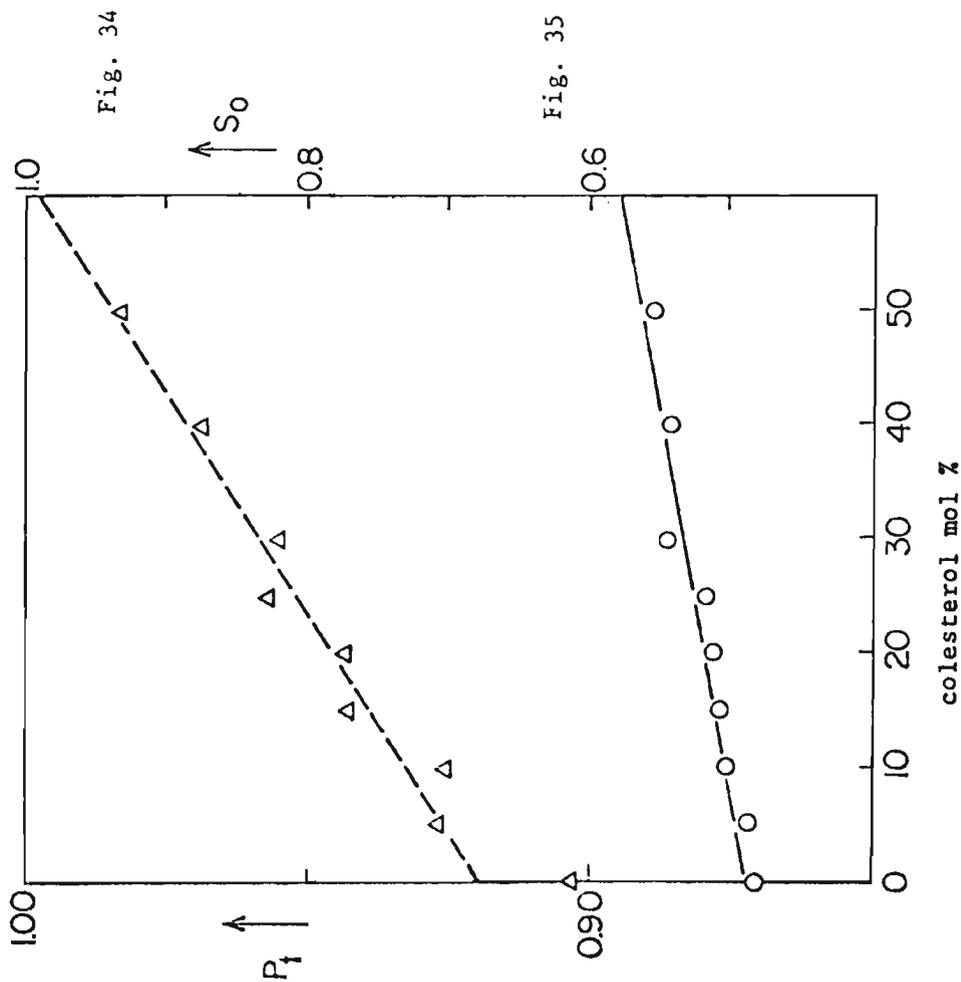


Fig. 35 Ângulos β e γ para os marcadores de spin derivados de ácidos graxos (∇ e Δ) e esteróides (\circ e \square) em multi-bicamadas planas de PC com conteúdo variável de colesterol.

35), indica que o grau de ordem do eixo longo é menor para os ácidos graxos que para os esteróis e que a mudança induzida por colesterol é maior para estes últimos. Os resultados obtidos no estudo da reação com ascorbato (Sec. III.A.3) indicam que os marcadores de spin estão todos na mesma região da bicamada e que as diferenças de forma e flexibilidade são tais que uma diminuição do espaço disponível afeta mais os marcadores esteroidicos.

A Fig. 35 mostra que o colesterol tem a habilidade de diminuir o ângulo que caracteriza a orientação do marcador de spin. Os resultados de Lapper e colaboradores (152) para CSL bem como os de Jost e colaboradores (122) para marcadores derivados de ácidos graxos em bicamadas de PC a variadas temperaturas e graus de umidade, sugerem que o caminho ao acaso é um bom modelo para descrever o comportamento de 5-SASL e 12-SASL no presente estudo. Desta maneira o aumento de S_0 pode ser atribuído a uma diminuição na amplitude de movimento das cadeias alifáticas com o aumento de colesterol. Em síntese, os resultados obtidos indicam que a adição de colesterol a PC, que se encontra no estado líquido-cristalino, altera a natureza e a intensidade da interação lipídio-lipídio, causando uma extensão das cadeias alifáticas, um aumento do grau de ordem do eixo longo das moléculas e uma redução da fluidez do sistema.

O movimento do SSL é muito rápido em bicamadas com baixo conteúdo de colesterol. Esta mobilidade é atribuída ao grau de liberdade conferido pela ligação simples que une o anel de seis membros que contêm o grupamento N-O à cadeia longa da molécula, e, provavelmente, a interconversões intra-anel. O efeito de condensação do colesterol pode ser observado, porém de maneira menos pronunciada do que para os outros marcadores. Na ausência de colesterol, o movimento do SSL parece ser isotrópico. Isto poderia ser causado por movimento rápido anisotrópico dentro de um espaço cônico de grande amplitude. Os parâmetros g e de desdobramento hiperfino efetivos resultantes deste movimento são tais que a linha de campo baixo aparece como a mais estreita no espectro de RPE. A adição do colesterol aparentemente restringe tanto a velocidade como a amplitude desse movimento, fazendo com que os parâmetros g e de desdobramento hiperfino resultantes dêem origem a espectros em que a linha central é a mais estreita na situação em que o campo magnético é paralelo à normal à bicamada, porém permanecendo a linha de campo baixo a mais estreita na orientação complementar. O efeito do colesterol foi semelhante nos espectros de SSL em liposomas (ref.399 e Sec. III.B.1.b). O valor do desdobramento hiperfino isotrópico sugere que o anel contendo o nitróxido está localizado na região da cabeça polar, provavelmente perto da interface membrana-água. Esta conclusão é corroborada pelos estudos da Sec.III.A.3.

Assim, a influência do colesterol se estende através da região hidrofóbica, chegando a atingir a região da cabeça polar.

b. Liposomas de Fosfatidil Colina de Ovo

Um estudo empregando SSL e CSL já havia sido publicado (399). No presente trabalho empregamos também 5- e 12-SASL. Espectros para 5-SASL e SSL são dados na Fig. 36. A forma das linhas para o 5-SASL reflete um espectro de pó de um conjunto de marcadores dotados de movimento anisotrópico. Isto se deve ao fato de que, devido à difusão rotacional lenta do liposoma na escala de tempo do aparelho, os espectros individuais de cada marcador, correspondentes a diferentes orientações (dentro do liposoma) em relação ao campo magnético, se somam. O método de deduzir os valores de $T_{||}$ e T_{\perp} de tais espectros é indicado na Fig. 36. Os parâmetros de ordem para 5-SASL a diferentes concentrações de colesterol e lipídio total são dados na Fig. 37. Nota-se que esses valores são maiores do que os obtidos para bicamadas planas. Isto poderia dever-se a um ou mais dos seguintes fatores: (i) o método de determinação de S a partir de espectros de liposomas é menos sensível; (ii) se o eixo longo molecular possuir uma inclinação em relação à normal à bicamada, isso não seria detectado em liposomas, uma vez que os marcadores de spin teriam ainda todas

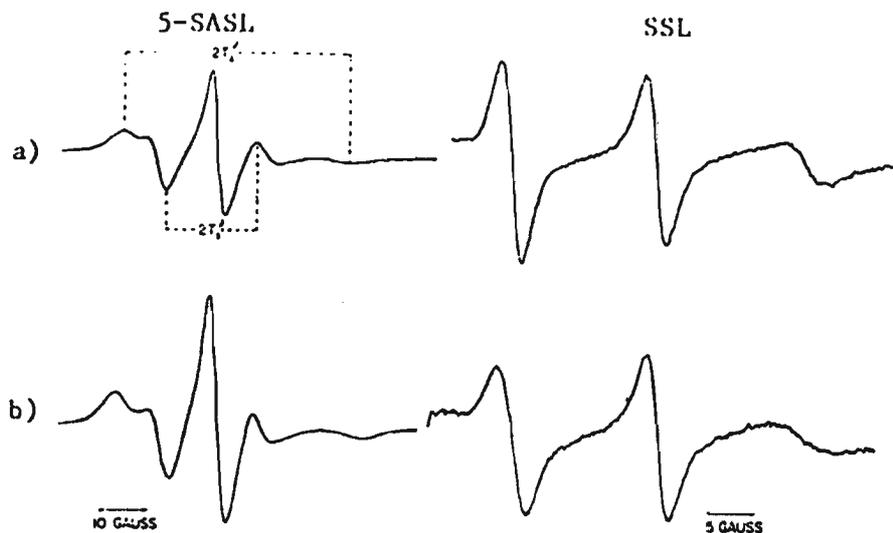


Fig. 36 Espectros de 5-SASL e SSL em liposomas de PC (a) e de PC- colesterol (35%) (b).

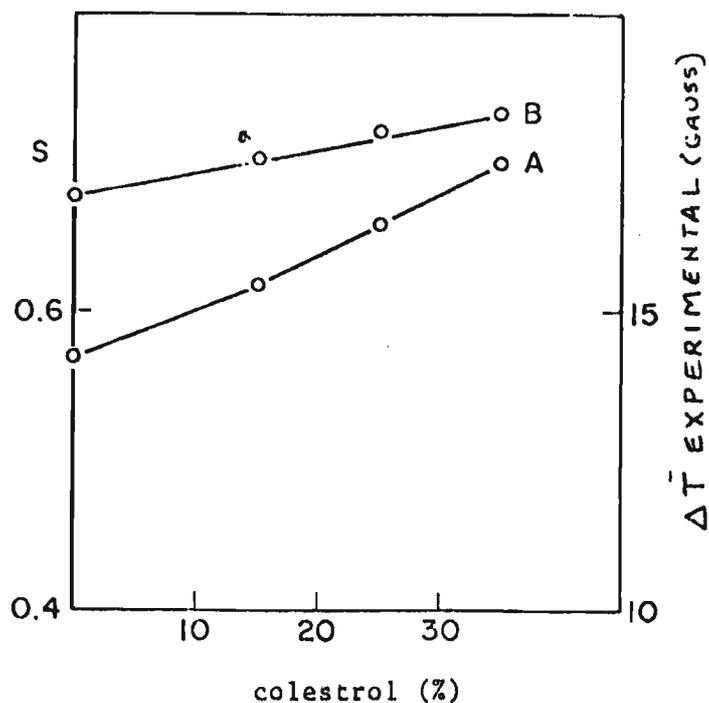


Fig. 37 Parâmetro de ordem, S e ΔT experimental para liposomas de PC 1×10^{-1} M (A) e $7,5 \times 10^{-3}$ M (B) com conteúdo variado de colesterol.

as possíveis orientações em relação ao campo magnético, o que geraria valores maiores de S ; (iii) em espectros de liposomas torna-se difícil separar efeitos de ordem de efeitos de velocidade de movimento assim, Polnaszek (400) demonstrou que quando o tempo de correlação rotacional é suficientemente grande, existe a possibilidade de se medirem parâmetros de ordem maiores do que os reais.

Não foi feito o cálculo de S_0 e P_t a partir de espectros de liposomas porque os espectros de 12-SASL não apresentam as características necessárias para determinar S .

Os valores de S dependem da concentração de lipídio para liposomas preparados por agitação no Vortex (Fig. 37 e Tabela VII). Esse efeito desaparece se se submete o sistema ao ultra-som por um tempo mínimo de 20 minutos (Tabela VII). Aparentemente, ocorre alteração no arranjo molecular da bicamada ao se alterar o tamanho dos agregados. Deve-se notar, contudo, que trabalho subsequente de Marsh e colaboradores (401) que procurou comparar valores de parâmetros de ordem para liposomas com os obtidos para populações de vesículas uni-lamellares puras, preparadas pelo método de Huang(110), relata valores menores de S para estas últimas do que para liposomas.

A liberdade de movimento do SSL dá origem a linhas estreitas nos liposomas (Fig.36). Assim como nos filmes, há uma mudança nas larguras

TABELA VII

Dependência do parâmetro S da concentração de liposomas de fosfatidil colina de ovo contendo o marcador de spin 5-SASL.

PC

S

(M)	(submetidos a 6 min de ultra-som) (sem colesterol)	(25% de colesterol)	(submetidos a 20 min de ultra-som) (sem colesterol)	(25% de colesterol)
1×10^{-1}	0,570	0,645		
5×10^{-2}			0,625	0,680
1×10^{-2}	0,595	0,670		
5×10^{-3}			0,627	0,686
1×10^{-3}	0,665	0,690		
5×10^{-4}			0,634	0,684
1×10^{-4}	0,680	0,710		

relativas das linhas central e de campo baixo com o aumento do colesterol. Isto indica que o grupamento nitróxido está executando movimento anisotrópico que produz a média de alguns componentes dos tensores g e hiperfino. Com a mudança da amplitude e velocidade do movimento, também ocorre alteração desses valores médios, com os consequentes resultados espectrais.

c. Multi-bicamadas Planas de Dipalmitil fosfatidil colina.

Foram empregados os marcadores 5- e 12-SASL e ASL. Num estudo anterior, o CSL havia sido utilizado (192). Espectros típicos são dados na Fig. 38. A 0% de colesterol os espectros são característicos de elevado grau de imobilidade e baixo grau de ordem, tornando difícil a determinação de S . Acima de cerca de 20 mol% de colesterol, os espectros de 5- e 12-SASL são razoavelmente bem definidos e foram analisados para se obter S_o e P_t .

A Fig. 39 dá os valores de S para 5- e 12-SASL, bem como S_o e P_t calculados a partir daqueles. Verifica-se que esse sistema difere de PC em que a probabilidade de conformações *gauche* permanece aproximadamente constante a partir de ~ 25 mol% de colesterol, enquanto que S_o decresce. Tal diferença de comportamento entre PC e DPPC com relação a P_g pode, presumivelmente ser atribuída a

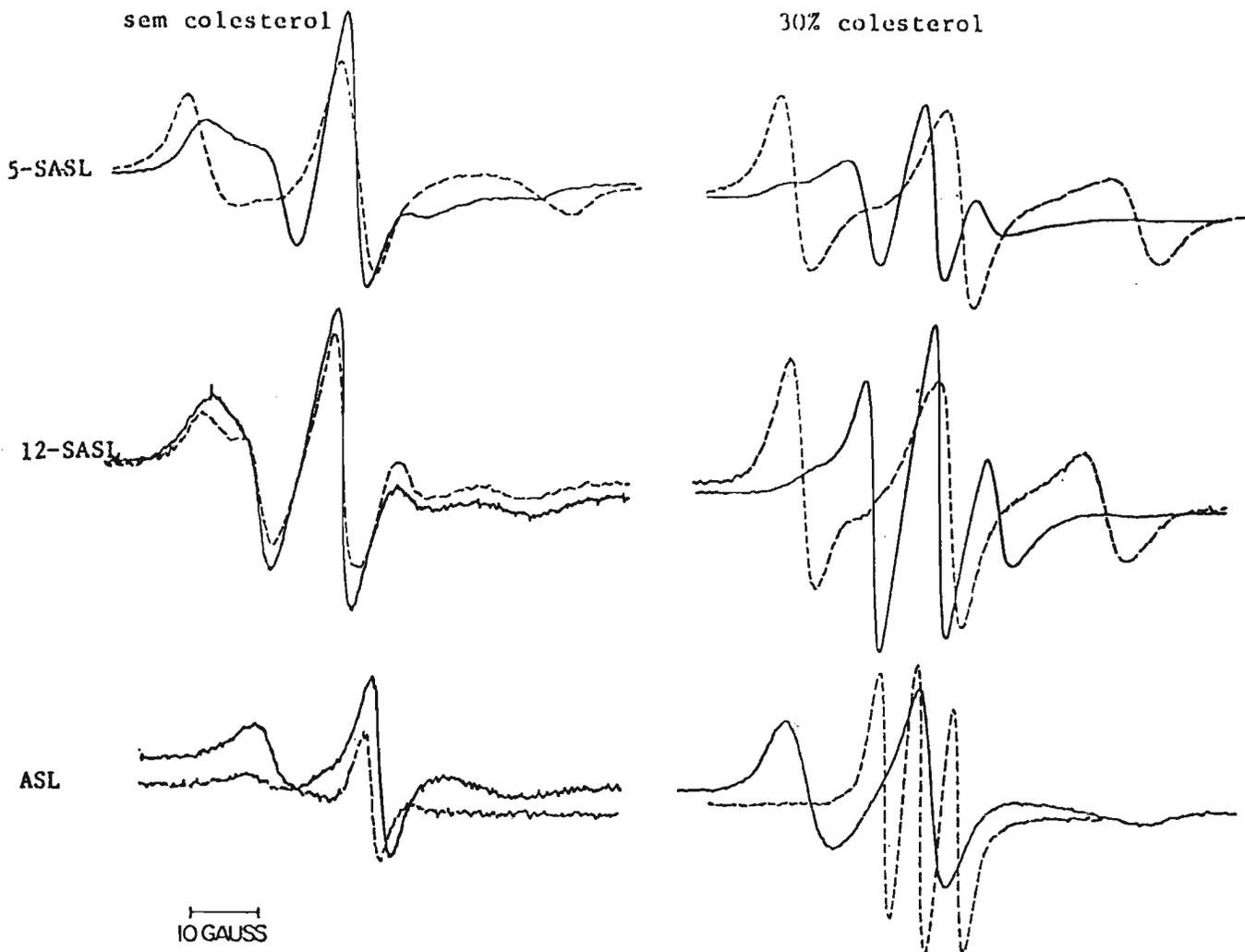


Fig. 38 Espectros de 5-SASL, 12-SASL e ASL em multi-bicamadas de DPPC e DPPC- colesterol (30%).

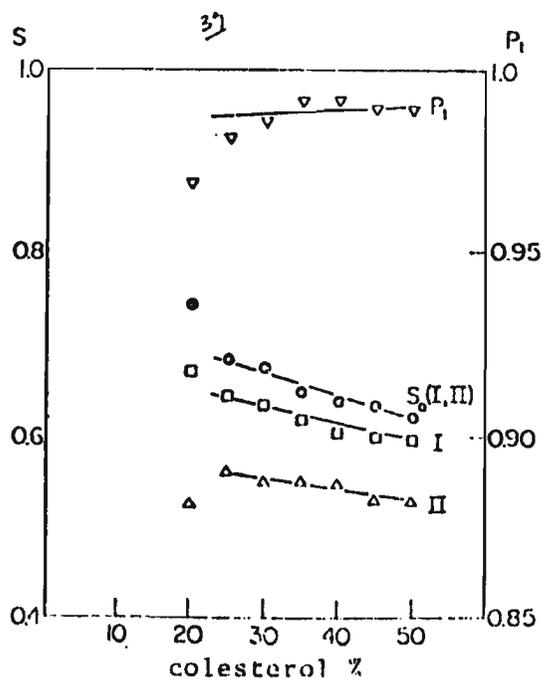


Fig. 39 Valores de S , S_0 e P_1 para marcadores de spin derivados de ácidos graxos em multi-bicamadas planas de DPPC com conteúdo variado de colesterol. I- 5-SASL; II- 12-SASL.

um empacotamento mais denso em DPPC, originário da total saturação das cadeias. Esse empacotamento mais denso seria devido a interações lipídio-lipídio mais fortes, resultando em menor flexibilidade (maior extensão das cadeias). A diminuição de S_0 , implicando numa diminuição do grau de ordem dos eixos longos moleculares, indica que o colesterol tem um efeito diferente em DPPC e em PC, conforme já sugerido por medidas de permeabilidade (352-357). A adição de colesterol enfraquece a forte interação entre as cadeias de DPPC e promove a transição do estado gel, que é um estado com elevado grau de cooperatividade, para o estado líquido-cristalino. Tal transição se evidencia nos espectros de RPE que indicam elevada imobilização dos marcadores a 0% de colesterol (Fig. 38) e um aumento da mobilidade entre 10 e 20 mol% de colesterol. O grau de orientação dos eixos longos moleculares diminui acima de 20 mol% de colesterol, como é mostrado pela diminuição de S_0 (Fig. 39). Provavelmente, na ausência de colesterol $P_g \sim 0$, adquirindo valor finito entre 10 e 20 mol%. Estes resultados estão de acordo com estudos de laser-Raman (402) e medidas de espaçamento por raios X de alto ângulo (62), que indicam que a 7,5 mol% de colesterol, o valor de 0,42 nm para as cadeias alifáticas ainda é bem definido. Concentrações mais altas de colesterol causam uma difusão na banda de alto ângulo, aproximando-se do valor de 0,46 nm característico de cristais líquidos (59,73,74). Ao mesmo tem

po medidas de baixo ângulo mostram uma diminuição do espaço interlamelar (62), o que foi interpretado como uma diminuição da espessura da bicamada, devida à fluidização das cadeias, o que está de acordo com o aumento de P_g verificado no presente trabalho.

Também, medidas de calorimetria diferencial de varredura mostram que a 20 mol% de colesterol, há uma mudança drástica na capacidade calorífica, enquanto que a 12,5 mol%, ela é aproximadamente a mesma que para DPPC pura (62).

O fato de que S_o é maior em DPPC do que em PC (eles se aproximam a 50 mol% de colesterol) e o valor baixo e constante de P_g , indicam que, mesmo após a adição de colesterol, o sistema é ainda bastante empacotado.

Há uma alteração drástica nos espectros de ASL ao passar de 0 para 10 mol% de colesterol. Um comportamento análogo foi observado para lipídios de cérebro de boi dos quais o colesterol foi previamente removido (185). Na presença do esteroide obtem-se um elevado grau de anisotropia, indicando que o eixo longo molecular está praticamente paralelo à normal à bicamada. O desdobramento hiperfino na direção complementar indica que a rotação ao redor do eixo longo da molécula é suficientemente rápida para fornecer a média de T_{xx} e T_{zz} , porém a largura das linhas indica que o tempo de correlação dessa rotação é elevado (ver

Sec. III.B.2). A mudança nos espectros do ASL ao se passar de 0 para 10 mol% de colesterol parece correlacionar-se com o que foi medido por Ladbrooke e colaboradores (62) como um aumento no espaço interlamelar, em vista de se passar de uma situação em que o eixo longo de DPPC estaria formando um ângulo de -32° com a normal à bicamada (0% colesterol) para um ângulo de 0° em relação à normal (a 7,5% colesterol).

Trabalho mais recente de Birrell e Griffith (63), em que se executou um estudo dos espectros em função da variação de ângulos entre o campo magnético e a normal à bicamada confirmaram que em DPPC no estado gel (em ausência de colesterol) o eixo longo molecular forma um ângulo de $\sim 35^{\circ}$ com relação à normal à bicamada.

d. Liposomas de Dipalmitil fosfatidil colina

Assim como em filmes, observou-se um aumento na mobilidade do 5-SASL por adição de colesterol a liposomas de DPPC. Os espectros são semelhantes aos obtidos por Oldfield e Chapman (403) usando derivados marcados de metil ésteres do ácido esteárico. Os dados não foram tratados de maneira minuciosa devido aos fortes efeitos de imobilização.

O presente estudo permitiu verificar que o colesterol aumenta a extensão das cadeias, bem como a orientação do eixo longo molecular em PC, ao passo que praticamente não afeta o primeiro aspecto em DPPC (a partir de 25 mol%), fazendo diminuir o segundo. Esse efeito se explicaria pelo fato de que as cadeias homogêneas e saturadas de DPPC permitem empacotamento mais denso devido a interações mais fortes entre as cadeias, e provavelmente entre as cabeças polares. A introdução do colesterol força uma separação entre as moléculas de fosfolípido, com o esteroi colocado entre elas. A forma assimétrica do colesterol em relação ao fosfolípido resulta em diminuição da interação inter-cadeias (efeito de fluidização) e o aumento do colesterol causa uma diminuição do grau de orientação. Em PC, insaturação e heterogeneidade das cadeias resultam num espaçamento maior entre as moléculas, interações inter-moleculares mais fracas e, conseqüentemente, no estado líquido-cristalino (à temperatura ambiente). A fosfatidil colina de ovo à temperatura ambiente interage com colesterol e o resultado é uma extensão das cadeias, um aumento do grau de orientação molecular e uma diminuição da rotação do eixo longo molecular (conforme refs. 152 e 164 e Sec. III.B.3). Esta extensão das ca-

deias é parcialmente responsável pela diminuição da área molecular descrita pelo efeito de condensação (341-345). Marsh e Smith (173) em estudo posterior forneceram evidências que sugerem que um outro efeito também contribui para a aparente diminuição da área molecular qual seja, o fato de que o colesterol se ajustaria parcialmente em cavidades (404) geradas nas cadeias alifáticas graças a um maior grau de liberdade devido a um maior espaçamento entre as moléculas e à presença de duplas ligações.

Os efeitos espectrais aqui observados, traduzidos em termos de mobilidade e ordem molecular, oferecem uma explicação para os efeitos de colesterol sobre a permeabilidade de lipossomas de PC e DPPC (352-357).

2. Estudo a Frequência Variável do Efeito do Colesterol*.

Os espectros de marcadores esteroídicos em bicamadas planas de PC revelam que concentrações crescentes de colesterol causam um aumento da diferença entre os desdobramentos hiperfinos medi-

* ref. 164

dos com o campo magnético perpendicular e paralelo à normal à bicamada, diminuindo o segundo e tornando-se as linhas mais estreitas e aumentando o primeiro, ao mesmo tempo em que se observa alargamento das linhas nos espectros tirados nessa direção (refs. 152, 153 e 164, Sec. III.B.1, Fig. 32 e Fig. 40 a e b).

Os espectros para CSL simulados por Lapper e colaboradores (152), utilizando o modelo do caminho ao acaso do eixo longo molecular, explicavam de maneira satisfatória (ver Sec.I.C.1.b.ii) os resultados obtidos para o efeito do colesterol, exceto a última observação, ou seja, o alargamento das linhas na direção perpendicular à normal à bicamada.

Este resultado poderia ser explicado por uma diminuição na velocidade de rotação ao redor do eixo longo molecular. Uma possível maneira de examinar essa possibilidade é o estudo dos espectros a diferentes frequências, uma vez que a forma das linhas deve depender dessas no caso do envolvimento de fenômenos relacionados ao tempo de correlação rotacional.

Foram examinados os espectros de CSL em PC em função da concentração de colesterol a frequências de 9,5 (banda X), 24 (banda K) e 35 GHz (banda Q). Um estudo semelhante foi posteriormente publicado (383).

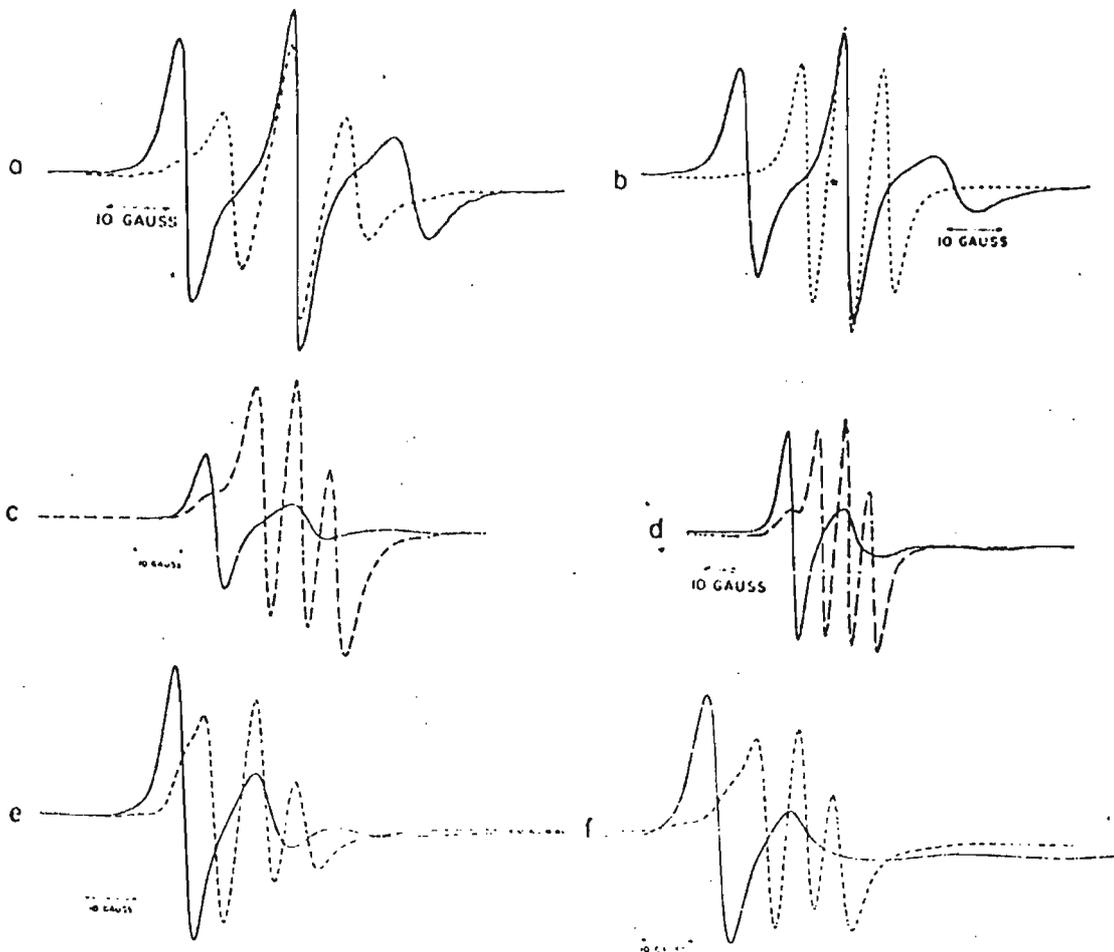


Fig. 40 Espectros do marcador de spin CSL em multi-bicamadas de PC (a,c,e) e PC-colesterol (30%) (b,d,f). a e b - 9,5 GHz; c e d - 24 GHz; e e f - 35 GHz. (—) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (---) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

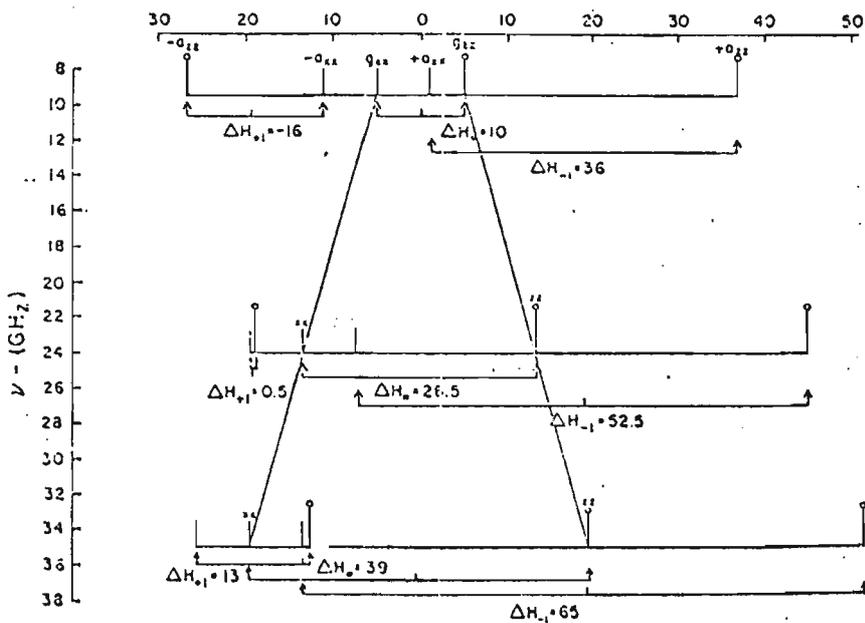


Fig. 41 Posições relativas dos componentes x e z dos tensores g e hiperfina a 9,5, 24 e 35 GHz para $\theta = 90^\circ$. Os valores de ΔH indicam a extensão do alargamento para uma dada linha.

A dependência da forma das linhas da frequência de microondas empregada foi evidente. A Fig. 40 mostra os resultados para os sistemas contendo 0 e 30 mol% de colesterol.

Os valores de desdobramento hiperfino obtidos para a direção do campo magnético perpendicular à normal à bicamada são indicativos de um movimento rápido em redor do eixo longo molecular, com a obtenção de médias dos componentes nas direções x e z dos tensores g e de desdobramento hiperfino. Quando a velocidade desse movimento se torna comparável às diferenças de energia entre os vários estados de g e desdobramento hiperfino (em unidades de frequência), efeitos apreciáveis de alargamento das linhas podem ser obtidos. As mudanças na forma das linhas causadas por aumento no tempo de correlação rotacional dependem da frequência do experimento de RPE.

a. Larguras das Linhas - O Modelo do Spin Cambiante.

A influência da variação do tempo de correlação na forma das linhas pode ser tratado por uma variedade de abordagens teóricas. As equações de Bloch modificadas (138) oferecem um formalismo bastante simples que permite obter um quadro físico bastante bom do fenômeno. Este método foi empregado para analisar os resultados experimentais obtidos.

Um elétron desemparelhado em uma molécula paramagnética pode ser considerado como sendo capaz de saltar entre estados caracterizados por diferentes parâmetros espectrais (valores dos tensores g e hiperfino). A maneira como estes determinarão a forma das linhas dependerá do tempo de correlação rotacional da molécula. A teoria do spin cambiante foi dada por vários autores e encontra-se sumarizada no livro de Wertz e Bolton (138).

De acordo com esse modelo, se a frequência do salto entre dois estados com diferentes espectros é suficientemente baixa, o espectro resultante é a soma dos dois espectros. Contudo, se a frequência de interconversão for suficientemente alta, obtém-se um espectro médio, cujas linhas ocupam posições médias. A largura das linhas dependerá da diferença entre as posições das linhas dos dois estados.

Os resultados para o sistema PC-colesterol indicam que a velocidade de rotação do marcador de spin ao redor de seu eixo longo é tal que ocorre a média dos componentes que dão origem ao espectro com o campo magnético perpendicular à normal à bicamada ($\theta = 90^\circ$), mas a velocidade com que esse movimento ocorre é alterada por alteração da concentração de esterol.

Empregando-se o modelo acima e admitindo que o eixo longo da molécula executa um cami-

nho ao acaso dentro de um espaço cônico, a dependência da largura das linhas do tempo de correlação será dada por:

$$\Gamma = \Gamma_0 + [(\gamma_e \zeta)/4] (\Delta H)^2 \quad (19)$$

onde Γ é a meia largura na meia altura, em gauss, Γ_0 é a largura natural na meia altura, em gauss, em ausência de rotação, γ_e é a relação giromagnética ($1,7608 \times 10^7$ radiano \times gauss $^{-1}$ \times seg $^{-1}$) e ζ é o tempo para saltar $\pi/2$ radianos, em segundos. ΔH é a distância de salto em gauss entre as linhas, determinada pelos estados envolvidos (caracterizados por T_{xx} , g_{xx} e T_{zz} , g_{zz} no presente caso). ΔH varia com o número quântico de spin nuclear ($m_I = +1, 0, -1$ para o átomo de nitrogênio do marcador de spin) do núcleo que dá origem ao desdobramento hiperfino (conforme Fig. 41).

Os espectros observados são apresentados na forma da primeira derivada da absorção. A fim de facilitar as medidas, a equação (19) pode se transformar em

$$\Gamma_{\text{ptp}} = \Gamma_{0, \text{ptp}} + 1,27 \times 10^6 \zeta_c (\Delta H)^2 \quad (20)$$

onde agora Γ_{ptp} e $\Gamma_{0, \text{ptp}}$ são as larguras, pico a pico no espectro obtido e $\zeta_c = 4\zeta$ e corresponde a uma rotação de 2π radianos.

ΔH vai depender da frequência de microondas empregada (ν), bem como do ângulo entre a normal à bicamada e o campo magnético aplicado (θ).

b. Dependência de ΔH da Frequência, ν

A Fig. 41 mostra como ΔH varia para cada uma das linhas espectrais nas diferentes frequências quando $\theta = 90^\circ$. O zero da escala representa o valor de g_{yy} e os traçados para as três frequências indicam as posições relativas dos valores g e dos desdobramentos hiperfinos. É a mudança nessas posições relativas que dá origem aos diferentes efeitos de alargamento nas diferentes frequências. Os valores de ΔH mostram que a linha de campo alto ($m_I = -1$) deve ser mais larga que a linha de campo baixo ($m_I = +1$), e esta por sua vez deve ser mais larga que a linha de campo médio ($m_I = 0$) a 9,5 GHz. Por outro lado, a 24 e a 35 GHz, a linha de campo alto continua a mais larga, porém a linha de campo central passa a ser mais larga que a de campo baixo. A Fig. 40 mostra a confirmação experimental dessa previsão.

c. Dependência de ΔH da Orientação em Relação ao Campo Magnético.

Esta variação é dada pela expressão

$$\Delta H(\theta) = \frac{h\nu}{\beta} \cdot \left\{ \frac{1}{g_{xy}(\theta)} - \frac{1}{g_{yz}(\theta)} \right\} - m_I \{T_{xy}(\theta) - T_{yz}(\theta)\} \quad (21)$$

$$m_I = +1, 0, -1$$

onde as componentes xy e yz para vários valores de g e T são calculados de acordo:

$$g_{yz}^2(\theta) = g_{yy}^2 \cos^2 \theta_{HY} + g_{zz}^2 \cos^2 \theta_{HZ} \quad (22)$$

$$g_{yx}^2(\theta) = g_{yy}^2 \cos^2 \theta_{HY} + g_{xx}^2 \cos^2 \theta_{HX} \quad (23)$$

$$T_{yz}^2(\theta) = T_{yy}^2 \cos^2 \theta_{HY} + T_{zz}^2 \cos^2 \theta_{HZ} \quad (24)$$

$$T_{yx}^2(\theta) = T_{yy}^2 \cos^2 \theta_{HY} + T_{xx}^2 \cos^2 \theta_{HX} \quad (25)$$

onde θ_{HX} , θ_{HY} e θ_{HZ} são os ângulos formados entre o campo magnético e os eixos do sistema de coordenadas que caracteriza o nitróxido (138).

A Fig. 42 dá a variação da parte dependente de xy e da parte dependente de yz quando θ varia de 0 a 90° a 35 GHz. A diferença entre ambas permite obter o valor de ΔH para cada valor de θ , conforme indicado na figura. A Fig. 43 mostra valores já obtidos de ΔH em função de θ para $\nu = 9,5$ GHz e indica que as linhas espectrais devem alargar-se quando θ varia de 0 a 90°, sendo o efeito maior para a linha de campo alto.

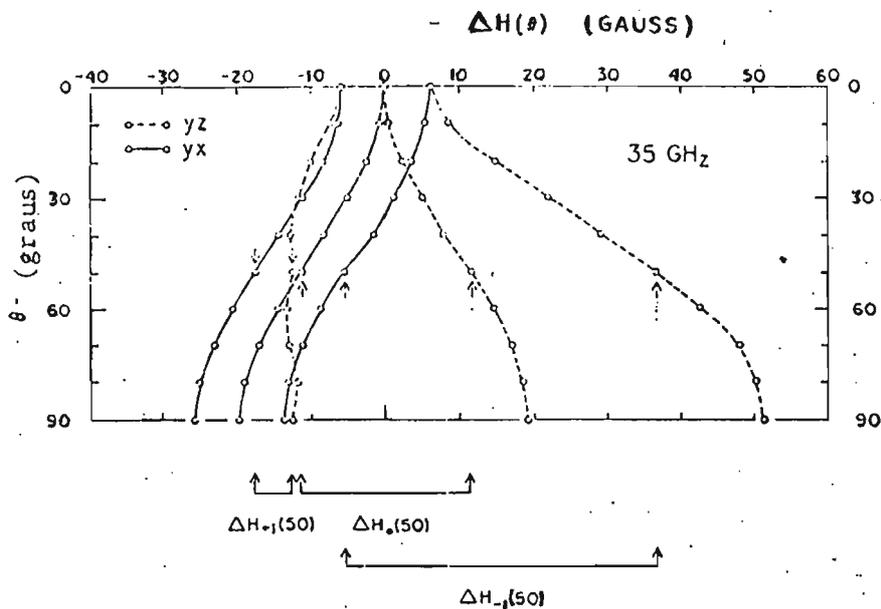


Fig. 42 Variação das posições das linhas espectrais em função do ângulo θ a 35 GHz. As setas indicam como ΔH é medido para $m_I = 1$ (+), 0 (+), -1 (+).

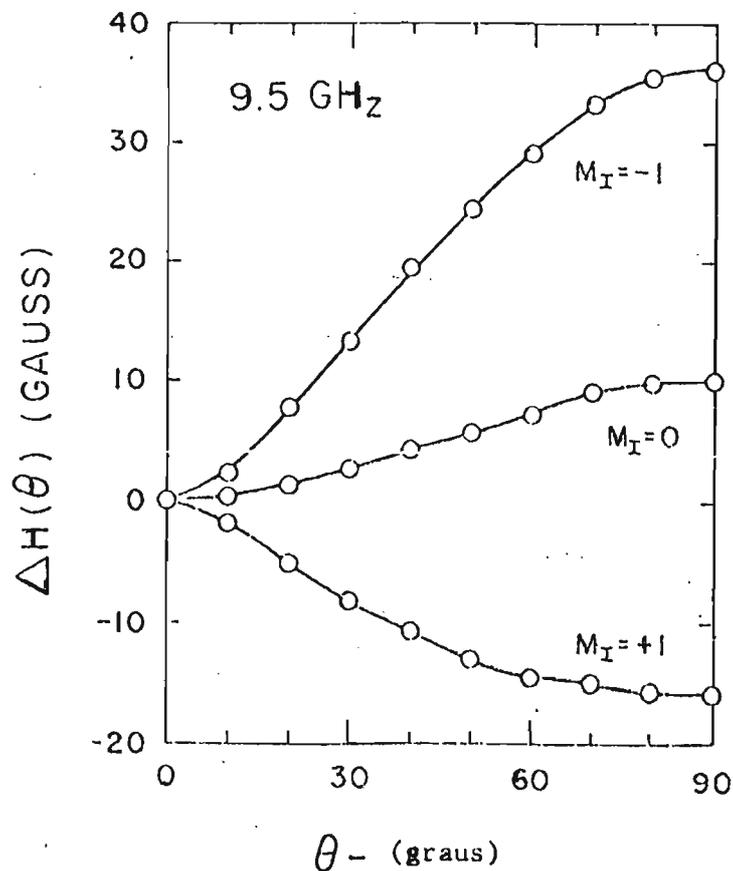


Fig. 43 ΔH em função de θ para $\nu = 9,5$ GHz

Os resultados experimentais confirmam também essas previsões. Verifica-se também que, quanto maior o conteúdo de colesterol, maior o alargamento, a uma dada frequência ($\theta = 90^\circ$). Para o mesmo conteúdo de colesterol a linha de campo alto ($\theta = 90^\circ$) se alarga mais em frequências mais altas.

d. Cálculo do Tempo de Correlação Rotacional

As larguras das linhas espectrais (Γ_{ptp}) foram medidas em função de θ nas três frequências. A Fig. 44 mostra os resultados para filmes de PC-30mol% colesterol.

Acoplando esses resultados experimentais com a relação teórica (como na Fig. 43) entre ΔH e θ é possível correlacionar Γ_{ptp} com ΔH e fazendo uso da equação (20), calcular o tempo de correlação ζ . A Fig. 45 mostra um gráfico de Γ_{ptp} em função de $(\Delta H)^2$ para algumas concentrações de colesterol. O coeficiente angular das retas indica que o tempo de correlação aumenta com o aumento de colesterol. A Fig. 46 e a Tabela VIII indicam como o tempo de correlação varia com a quantidade de colesterol. Observa-se o aumento de ζ com crescentes quantidades do esterol. Esses resultados demonstram a validade do modelo adotado para explicar o efeito do colesterol sobre a largura das linhas espectrais e evidenciam a ha-

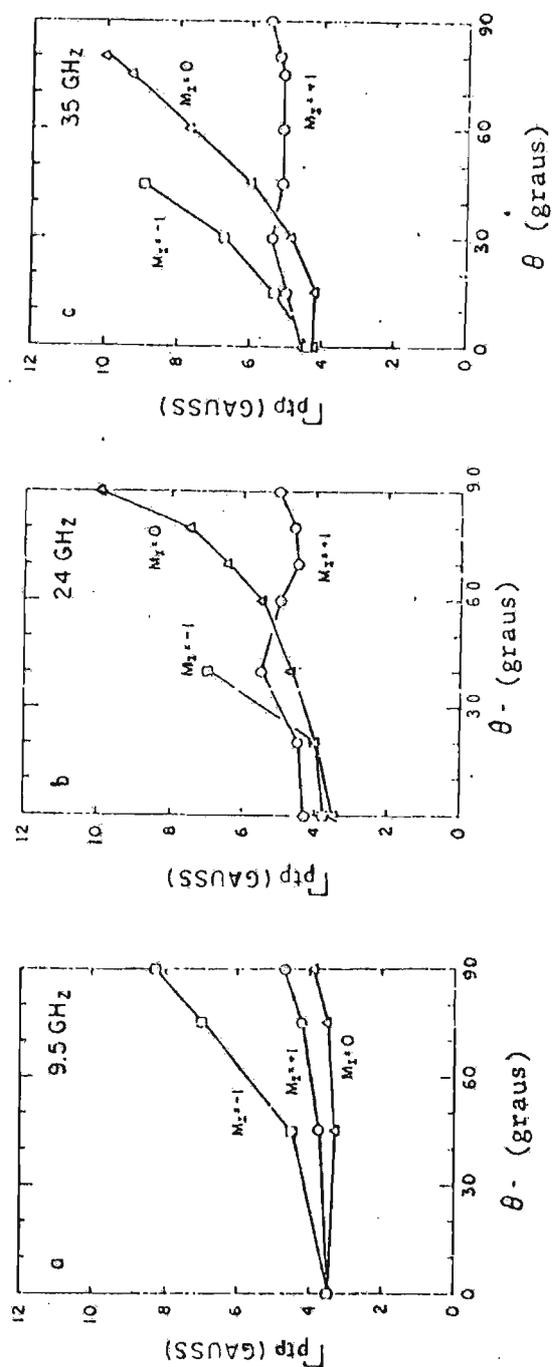


Fig. 44 Variação da largura das linhas pico a pico (Γ_{ptp}) em função de θ para uma mistura de PC-colesterol (30%). a-9,5 GHz; b-24 GHz; c-35 GHz. Os símbolos \circ, Δ e \square representam os dados para as linhas de $m_I = +1, 0$ e -1 , respectivamente.

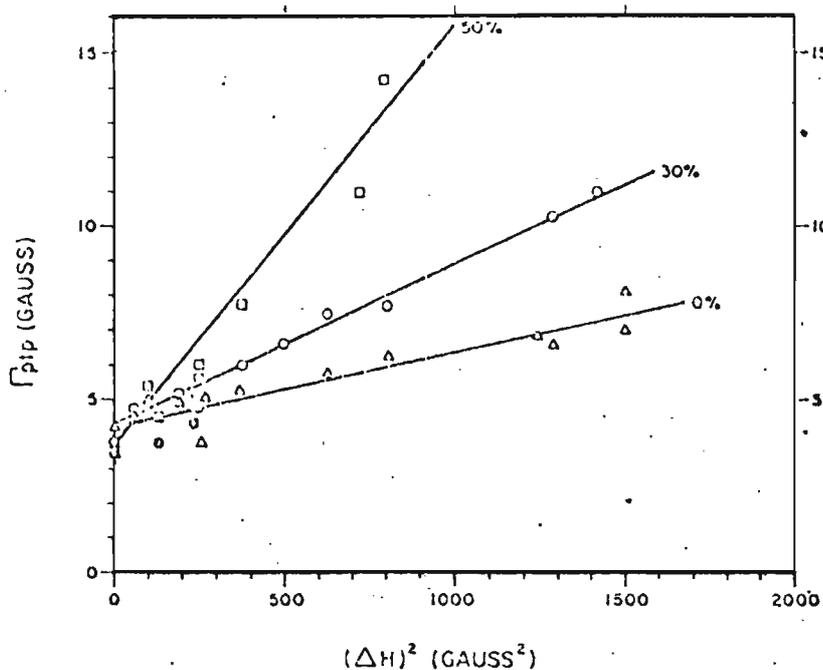


Fig. 45 Variação da largura das linhas pico a pico (Γ_{ptp}) em função de $(\Delta H)^2$ para PC contendo 0,30 e 50% de colesterol. Os símbolos Δ, \circ, \square são para as linhas centrais a 35 GHz; \bullet e \blacksquare são para as linhas de campo baixo a 9,5 GHz.

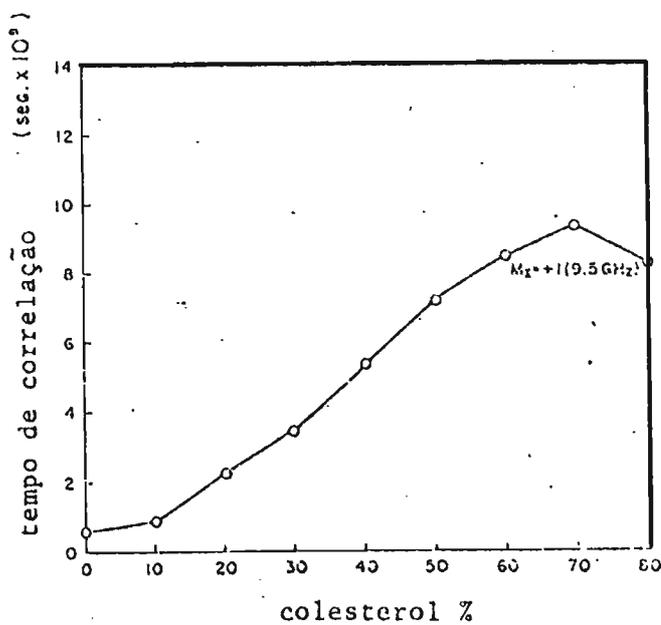


Fig. 46 Tempo de correlação rotacional para CSL em multi-bicamadas planas de PC com conteúdo de colesterol calculados a partir das larguras das linhas de campo baixo dos espectros tirados a 9,5 GHz.

TABELA VIII

Tempos de correlação rotacional para o marcador de spin CSL em multi-bicamadas de fosfatidil colina de ovo com conteúdo variável de colesterol.

% colesterol	τ_c (s x 10 ⁹)
0	0,6
10	0,9
20	2,3
30	3,4
40	5,4
50	7,2
60	8,5
70	9,4
80	8,3

bilidade do esterol de afetar a velocidade de rotação do marcador de spin ao redor de seu eixo longo. Esse efeito provavelmente se estende aos outros componentes da bicamada.

Em síntese, uma avaliação da contribuição do método de marcador de spin para a compreensão dos efeitos de colesterol sobre PC ao nível molecular permite dizer que: 1 - o colesterol diminui a amplitude de movimento do eixo longo molecular das moléculas, aumentando o grau de ordem desse eixo (conforme refs. 152 e 153 e Sec. III.B.1); 2 - a aparente diminuição da área ocupada pelas moléculas de fosfolipídio deve-se parcialmente a uma extensão das cadeias de ácidos graxos (aumento da população *trans*); 3 - o restante do efeito de condensação deve-se também à acomodação parcial do colesterol em cavidades que resultam de dobras que ocorrem nas cadeias devido à presença de duplas ligações ou a ocorrência de conformações *gauche*(173); foi observado ainda que a separação entre marcadores de spin (e, provavelmente, entre outras moléculas presentes) diminuiu com o aumento do colesterol (173); 5 - finalmente, os resultados descritos nesta secção indicam que o colesterol diminui a velocidade de rotação das moléculas ao redor de seu eixo longo.

Os estudos com colesterol forneceram a base para a análise do efeito de outros compostos sobre membranas fosfolípídicas. Assim, foram realizados estudos das interações de hidroperóxidos derivados de colesterol (Sec. III. B.3) e de hidrocarbonetos aromáticos cancerígenos e não cancerígenos com membranas (Sec. III.B.4).

3. Estudos de Efeitos Estruturais e da Reatividade de Hidroperóxidos Lipídicos em Matrizes Membranas

A ocorrência de peroxidação de lipídios tem sido verificada in vivo (405-415). Foi observada peroxidação em homogenatos de tecidos (416) e a destruição de componentes de membrana e do citoplasma causada pelos produtos de peroxidação de lipídios de membranas (417-419).

Produtos de peroxidação de lipídios tem sido considerados como envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos. A toxicidade desses compostos foi verificada por vários autores (420-426). A ocorrência de hidroperóxidos de colesterol foi observada em eritrócitos de portadores de hiperporfiria eritropoiética (427). A incidência de radiação ultravioleta sobre essas células causava hemólise (427). Verificou-se também a presença de peróxidos lipídicos após foto-hemólise (428). Tem sido proposto também que o processo de envelhecimento está relacionado com o aumento de produtos de peroxidação (429-430).

As duplas ligações das cadeias de ácido graxos de fosfolipídios de membranas se constituem nos sítios reativos para a formação de hidroperóxidos lipídicos (431-441).

No processo de envelhecimento, os produtos de peroxidação de lipídios participariam de reações radicalares, gerando pigmentos fluorescentes (lipofuscina, refs. 442-449). As propriedades ópticas dos pigmentos dever-se-iam ao grupo $-N=C-C=C-N<$, resultante da reação entre o malondialdeído (produto das reações radicalares, refs. 450 e 451) e amino grupos livres, por exemplo, da fosfatidil etanolamina ou de proteínas (452, 453).

A decomposição não enzimática de hidroperóxidos dos lipídios requer a presença de metais de transição, de um redutor (em geral, ascorbato) e de oxigênio (454-460). A reação de iniciação mais provável seria (461).



Em membranas, a propagação da reação muito provavelmente seria controlada pela difusão dos radicais. De fato, foi verificado que ocorre inibição da reação quando os componentes da membrana são fixados por glutaraldeído (462).

a. Efeitos Estruturais

Nós procuramos examinar, primeiramente, o papel estrutural que hidroperóxidos de colesterol poderiam ter sobre a organização de membranas. Foram empregados os derivados 5α -OOH e 7α -OOH do colesterol. Em princípio poder-se-ia esperar que a presença de um grupo altamente polar como é o caso do grupamento -OOH, poderia conferir à molécula um caráter muito mais hidrofílico, fazendo com que ela interagisse com membranas de maneira diferente do colesterol. Esse raciocínio era ainda mais justificado em face dos estudos que mostraram que vários aspectos estruturais são necessários para que o colesterol presente atue sobre membranas da maneira como se conhece (197,395-398). Seria de esperar que o grupamento -OOH causasse mudança de localização do colesterol da membrana e dessa maneira, modificasse as propriedades de caráter estrutural da molécula, e, como consequência, de permeabilidade.

Filmes de PC foram preparados contendo concentrações variáveis de 5α -hidroperoxi-colesterol ou 7α -hidroperoxi-colesterol e os marcadores de spin CSL e ASL. O efeito desses compostos sobre a organização das membranas foi o mesmo que o exercido por colesterol, ou seja observou-se um aumento no grau de ordem das moléculas em presença dos hidroperóxidos (Fig. 47).

Também, em membranas de DPPC, os hidroperóxidos do colesterol causaram o mesmo efeito que o com-

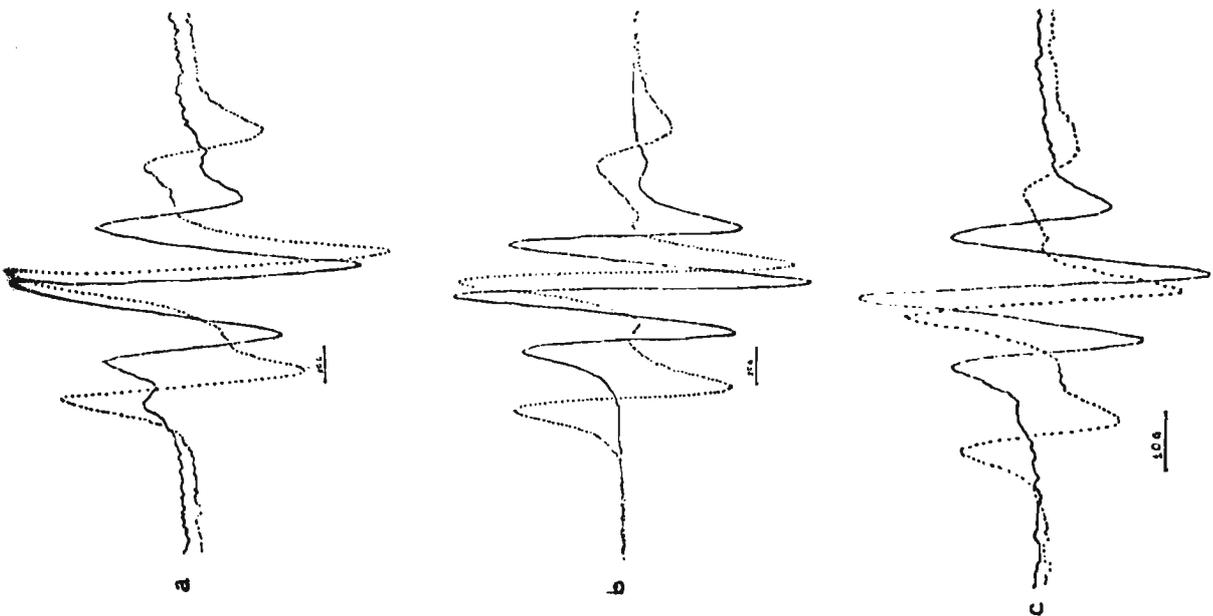


Fig. 47

Espectros de CSL em multi-bicamada das planas de PC (a), PC-colesterol (30%) (b) e PC-5 α -hidroperoxi-colesterol (30%) (c). (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

Fig. 48

Espectros de CSL em multi-bicamada das planas de DPPC (a); DPPC-colesterol (30%) (b) e DPPC-5 α -hidroperoxi-colesterol (30%) (c). (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

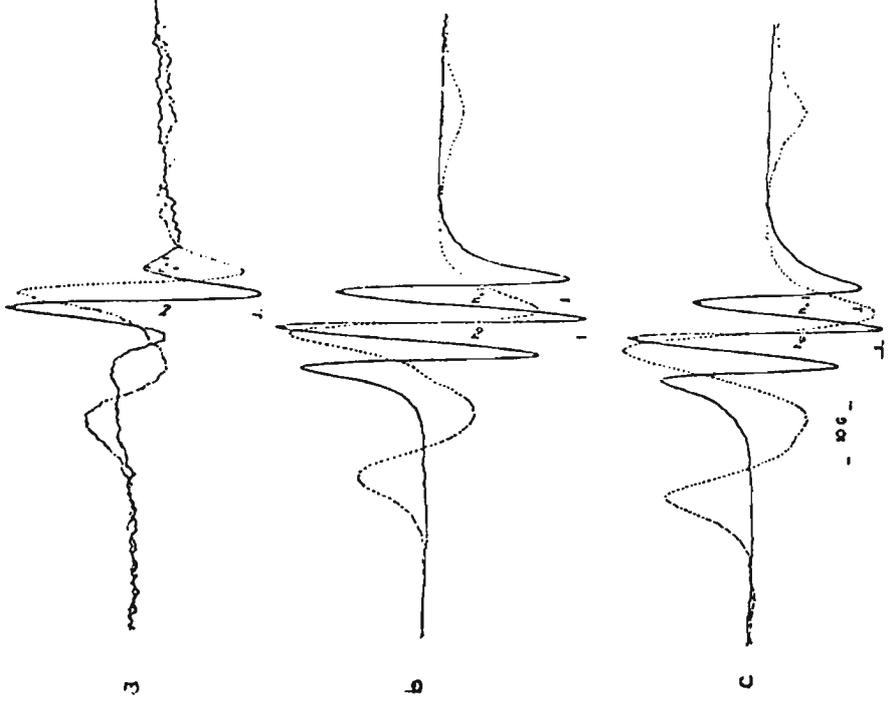


Fig. 47

Espectros de CSL em multi-bicamada das planas de PC (a), PC-colesterol (30%) (b) e PC-5 α -hidroperoxi-colesterol (30%) (c). (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

Fig. 48

Espectros de CSL em multi-bicamada das planas de DPPC (a); DPPC-colesterol (30%) (b) e DPPC-5 α -hidroperoxi-colesterol (30%) (c). (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

posto nativo. A Fig. 48 mostra o efeito de 30 mol% de 5 α -hidroperóxi colesterol sobre o espectro de CSL em bicamadas planas de DPPC. Observa-se que o efeito é o mesmo que o registrado na Fig. 38 (Sec. III. B. 1.c.) quando se examinou a ação do colesterol sobre DDPC.

O mesmo resultado foi obtido para o 7 α -hidroperoxi derivado.

Os dados obtidos indicam que o grupamento -OOH, quer na posição 5, quer na posição 7, não impede os compostos de exercerem efeitos análogos aos de colesterol, tanto em PC como em DPPC. O significado desses resultados espectrais ao nível molecular foi amplamente discutido nas Secs. III.B.1.e III.B.2.

Seria de se esperar, contudo, que, quando da eventual formação de derivados hidroperoxi de lípidios, a estrutura da membrana pudesse ser alterada e conseqüentemente, propriedades funcionais dependentes de estrutura.

A possibilidade de ocorrência desse evento foi verificada ao se examinar o efeito dos hidroperóxidos sobre membranas de fosfatidil etanolamina (PE). Filmes preparados de misturas desse fosfolipídio com o 5 α -hidroperoxi-colesterol forneceram espectros indicativos de alto grau de desorganização (Fig. 49) Essa desorganização deve-se à interação do grupamento -OOH do colesterol com o grupamento -NH₂ do fosfolipídio. Esses grupamentos podem interagir, formando inicialmente um complexo, com subseqüente ocorrência de uma série de reações químicas (463). É possível

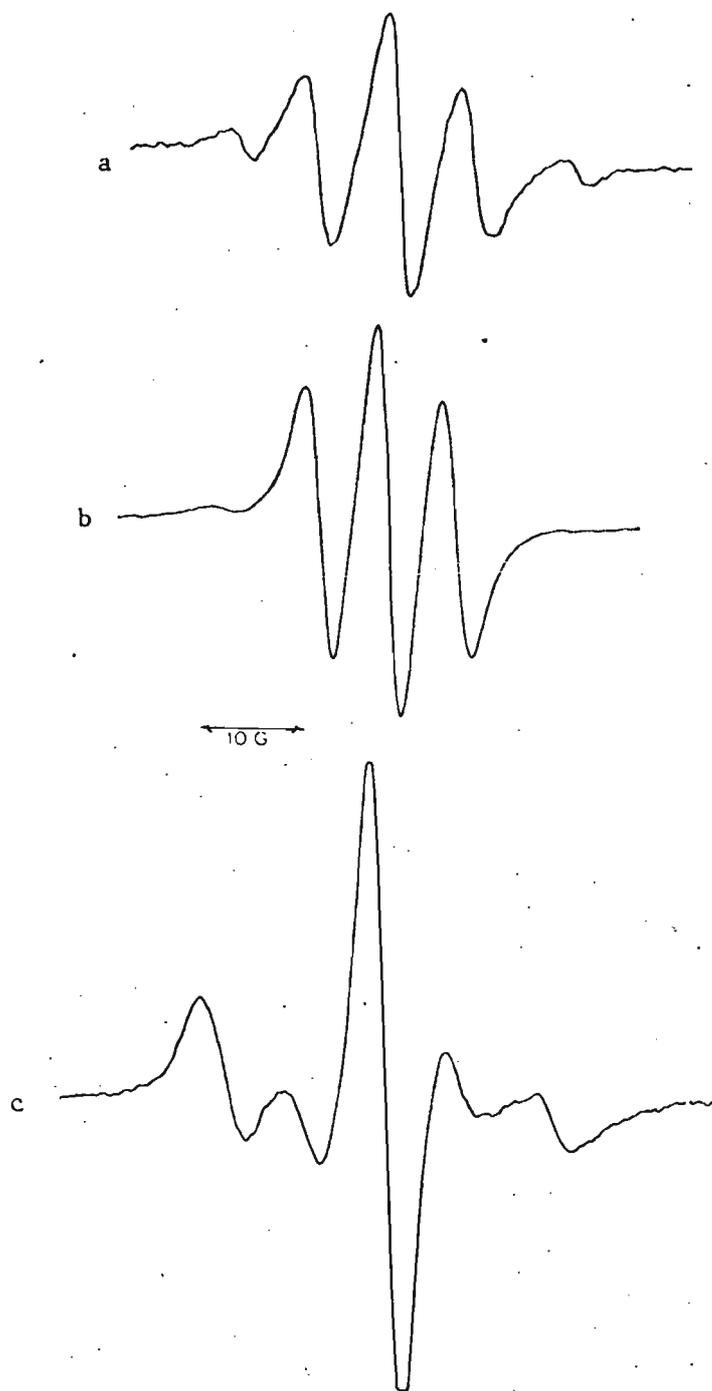


Fig. 49 Espectros de CSL em multi-bicamadas planas de PE (a); PE-colesterol (30%) (b) e PE - 5 α -hidroperoxi-colesterol (30%) (c), campo magnético paralelo à normal à bicamada.

que a participação do amino grupo da PE destrua a zwitterionicidade da cabeça polar do fosfolípido, com conseqüente diminuição da ordem do sistema. Não se pode eliminar, no entanto, a possibilidade de que as interações tenham ocorrido ainda no solvente orgânico em que se solubilizaram os compostos antes da formação dos filmes, o que eventualmente poderia significar que não tenha chegado a haver formação de bicamadas.

Os experimentos com PE vieram demonstrar que os hidroperóxidos podem alterar a estrutura de membranas, desde que se encontrem presentes os compostos adequados. Provavelmente outros lipídios possuidores de grupos $-NH_2$ teriam a habiliade de interagir da mesma maneira, assim como os aminos grupos livres de proteínas conforme sugerido nas ref. 452 e 453. Grupos $-OOH$ facilmente dão origem a radicais (454-461) e nessa forma, participam de reações provavelmente importantes do ponto de vista biológico (420-430). Os resultados acima mostram, contudo, que mesmo sem que ocorra a formação de radicais os hidroperóxidos podem participar de eventos importantes ao nível estrutural de membranas com possíveis conseqüências ao nível funcional.

b. Reatividade

Marcadores de spin atuam como anti-oxidantes (465). Também, nitróxidos foram detetados como produtos de peroxidação de lipídios quando a reação ocorria em presença de um precursor (466).

Tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} são capazes de induzir formação de radicais a partir de hidroperóxidos (464), processo catalizado por Fe^{2+} foi es-

tudado por RPE através da cinética de desaparecimento do sinal do grupamento N-O por reação deste com o radical formado pelo hidroperóxido.

A fim de se examinar o efeito da estrutura da membrana sobre essa cinética, ela foi estudada em bicamadas planas de PC e DPPC, empregando-se inicialmente os marcadores de spin CSL e ASL e os hidroperóxidos derivados do colesterol. O procedimento experimental foi análogo ao descrito na Sec. III.A.3. A tabela IX apresenta as meias vidas para o desaparecimento do sinal de RPE observado para os diferentes sistemas. Cada número apresentado representa o resultado para um experimento. Verificou-se que a reprodutibilidade não é muito boa. Apesar disso, pode-se observar que: 1 - as meias vidas da reação são mais longas em sistemas contendo DPPC; 2- para um mesmo fosfolipídio, as meias vidas são aproximadamente as mesmas, independente do marcador de spin e do hidroperóxido empregados, exceto para a dupla ASL-7 α -hidroperoxi-colesterol em DPPC, onde $t_{1/2}$ é menor.

O fato de que os valores de $t_{1/2}$ são menores quando o fosfolipídio é PC poderia dever-se a diferentes fatores: a presença de duplas ligações nas cadeias de ácidos graxos favorecia a formação de radicais (431-441) que ficariam disponíveis para a reação com o nitróxido, que seria acelerada devido à concentração mais alta de radicais nessa situação. Uma outra possibilidade é a de que a reação, ao ocorrer na membrana, se torne um processo dependen-

TABELA IX

Meias vidas ($t_{1/2}$) para o desaparecimento do sinal de RPE de marcadores de spin em multi-bicamadas planas contendo hidroperóxidos de colesterol.

Sistema ^a	Marcador de spin	$t_{1/2}$ (min)
DPPC-5 α -OOH ^b	CSL	16; 30
DPPC-7 α -OOH ^c	CSL	16; 20
DPPC-5 α -OOH	ASL	18; 28
DPPC-7 α -OOH	ASL	12; 7
PC-7 α -OOH ^d	CSL	6
PC-7 α -OOH	ASL	6

^a - Todos os sistemas continham 30 mol% de esterol total dos quais 34,6% eram hidroperóxido e o restante, colesterol. A concentração de sal de Fe²⁺ empregada ((NH₄)₂ Fe (SO₄)₂) foi 1 mM.

^b - 5 α -OOH é o derivado 5 α -hidroperoxi do colesterol

^c - 7 α -OOH é o derivado 7 α -hidroperoxi do colesterol

^d - a concentração de sal de Fe⁺⁺ empregada nos sistemas contendo PC foi 0,25mM.

te de difusão lateral dos reagentes, sendo a velocidade de difusão maior nos sistemas contendo PC, ainda em consequência das insaturações e heterogeneidade do comprimento das cadeias.

A pouca dependência dos valores de $t_{1/2}$ da posição relativa dos grupamentos N-O na molécula repórter e -OOH no esterol poderia ser devida ao facto de que, na sequência de eventos, radicais pequenos são gerados (461-464) cuja mobilidade ao longo da membrana não é seletiva, e que possuiriam a mesma habilidade para atingir o grupamento N-O do CSL perto da região da cabeça polar da membrana quanto o grupamento N-O do ASL, localizado no outro extremo do esqueleto esteroídico. Existe, no entanto, a possibilidade de que a espécie reativa predominante seja o radical do esterol (461) e que a pouca variação de $t_{1/2}$ seja devida à pequena diferença entre as distâncias dos variados grupos, a qual poderia ser ainda reduzida pela ocorrência de um movimento das moléculas paralelo ao eixo longo das mesmas.

Que a espécie reativa predominante é o radical do esterol é sugerido por um outro experimento em que o hidroperóxido empregado foi o derivado do ácido linoleico contendo o grupamento -OOH na posição 13. Quando se compararam os valores de $t_{1/2}$ para a reação desse composto com marcadores de spin CSL e 12-SASL, a diferença foi considerável, sendo $t_{1/2}$ para 12-SASL consideravelmente menor (5 minutos, em contraposição a 20 minutos para CSL). Nesse caso, a geometria das moléculas permite admitir que os grupamen

tos -OOH do ácido linoleico e N-O de 12-SASL se encontram muito mais próximos do que no caso do CSL. Pode-se sugerir, portanto, que a espécie reativa mais importante é o radical que se forma na molécula que continha o grupamento -OOH.

Procurou-se examinar se o processo de formação de radicais desencadeado por adição de Fe^{2+} às membranas contendo os hidroperóxidos, levariam a reações (além daquela com o marcador de spin) com outros componentes da membrana (duplas ligações das cadeias de PC) levando a possíveis alterações estruturais de tetáveis nos espectros de RPE.

Para isso permitia-se que a reação ocorresse em tempos variados (0,5 a 48 horas) e após esses tempos comparavam-se o espectro obtido no tempo zero com o final, obtido após nova adição de marcador spin ao sistema. Esse procedimento não permitiu observar diferenças estruturais esperadas no caso da formação de novos componentes (compostos de cadeia mais curta, que confeririam mais fluidez à membrana, ou produtos polimerizados, que teriam o efeito oposto). Dobretsov e colaboradores (467) relataram o aumento da rigidez da membrana após a peroxidação de lipídios.

Também não foi possível detetar produtos de peroxidação através da dosagem de malondialdeído (468).

A reação com radical nitróxido constitui-se numa reação modelo para o estudo de peroxidação de lipídios in situ, ou seja em matrizes membranosas, que é onde esses processos ocorrem na situação biológica.

4. Interação entre Hidrocarbonetos Aromáticos e Membranas Lipídicas*

Em todos os estudos relatados até agora, os agentes cuja interação com membranas foi examinada eram compostos cuja ação ao nível de membrana é um fato reconhecido. O estudo que apresentamos a seguir não se enquadra nessa categoria. Trata-se da interação entre hidrocarbonetos aromáticos (cancerígenos e não cancerígenos) e bicamadas lipídicas (planas).

O campo da carcinogênese química é muito vasto. Assim o é também a pesquisa relativa aos hidrocarbonetos aromáticos condensados cancerígenos. Muitos estudos tem sido efetuados procurando estabelecer as razões a nível molecular e as interações bioquímicas a nível celular da ação cancerígena desses compostos (470).

No entanto, interações a nível de membrana não tem sido objeto de muita investigação, em particular, de membranas artificiais. A maior parte dos trabalhos que empregam estas últimas foi efetuada em sistemas de monocamadas (471-474) e forneceram informações interessantes a respeito da solubilidade dos hidrocarbonetos (por vezes, bastante reduzido) em lipídios organizados em monocamadas (472,473).

Porém, é evidente que a primeira etapa para o acesso dos hidrocarbonetos a estruturas intra-celulares é a passagem através da membrana plasmática.

* Ref. 469

Foi verificado que a permeação de hidrocarbonetos através de membranas celulares obedece a lei da difusão passiva (475), o que sugere que o meio atravessado por esses compostos seria a região de bicamada lipídica das membranas. Esse fator de per se, sugere o interesse de um estudo da interação entre os hidrocarbonetos aromáticos e membranas fosfolipídicas. Um aspecto mais interessante é o da possibilidade dessa interação resultar em alterações estruturais da membrana, e de conseqüentes mudanças funcionais, que em última análise poderiam estar vinculadas ao mecanismo de ação dos hidrocarbonetos.

Em base a isso, decidimos recorrer ao método de marcador de spin para examinar o efeito de hidrocarbonetos aromáticos sobre membranas lipídicas. Foi empregada uma série de compostos não cancerígenos e outra de cancerígenos, a fim de se comparar o comportamento de ambos os grupos.

A fig. 50 mostra os compostos utilizados em ordem crescente de tamanho e de habilidade cancerígena (o 1,2-benzantraceno é fracamente cancerígeno, sendo os compostos seguintes mais poderosos).

Empregaram-se membranas de DPPC e PC. Na Fig. 51 apresentamos dois espectros de CSL em DPPC, obtidos como controle durante o presente estudo. A comparação com o espectro do ASL em DPPC mostrado na Fig. 38 e com o espectro do CSL em DPPC mostrado na Fig. 48 vem indicar que a reprodutibilidade das preparações de multibicamadas planas tem um certo intervalo o que faz com que seja desejável sempre comparar um

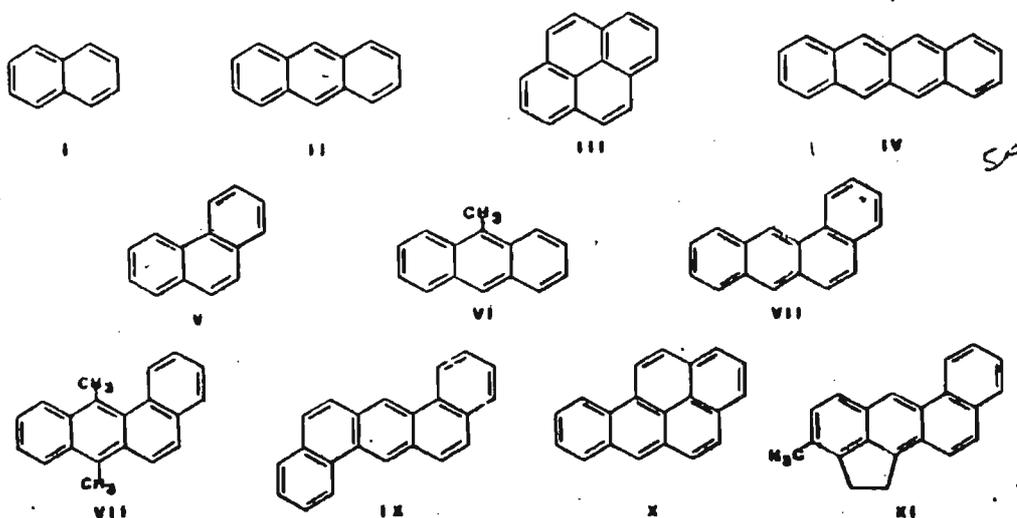


Fig. 50 Hidrocarbonetos empregados no presente trabalho: I- naftaleno; II- antraceno; III-pireno; IV-naftaceno; V-fenantreno; VI-9-metil antraceno; VII- 1,2 benzantraceno; VIII-9,10- dimetil-1,2-benzantraceno; IX 1,2,5,6-dibenzantraceno; X- 3,4-benzopireno; XI- 20-metil colantreno.

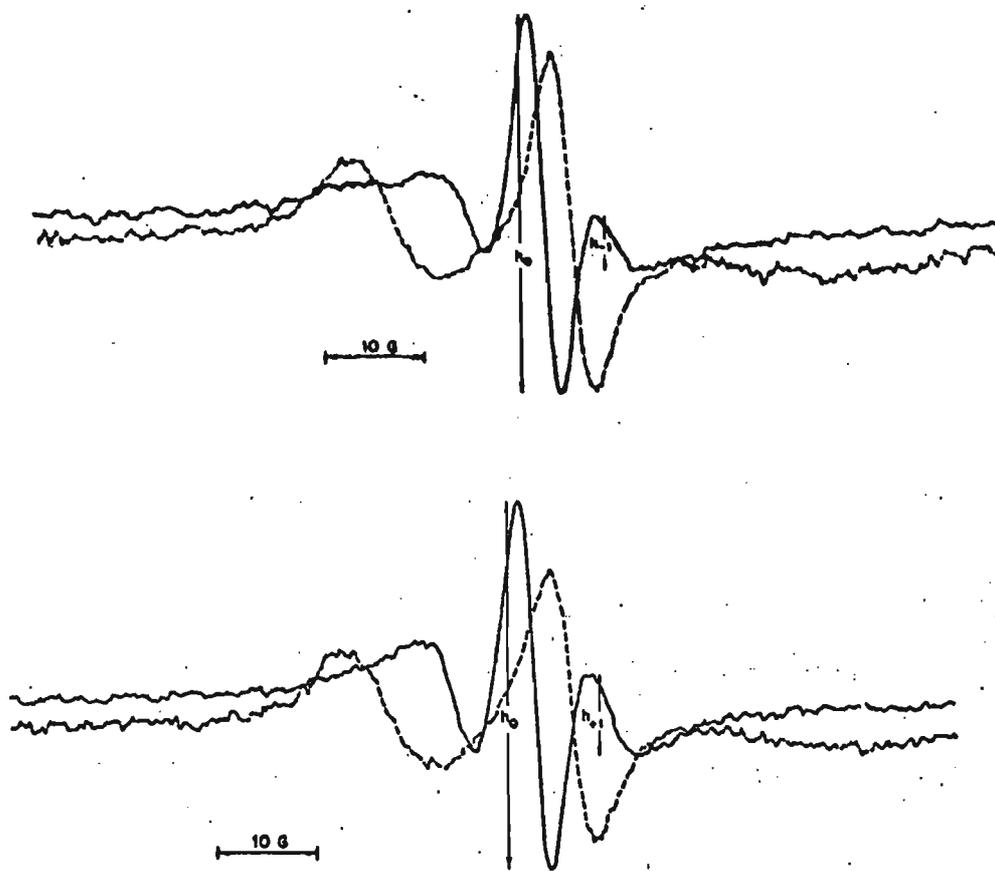


Fig. 51 Dois espectros de CSL em multi-bicamas planas de DPPC. (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

número razoável de amostras de uma mesma composição.

Os espectros apresentados nas figuras são espectros típicos que descrevem bem a média do comportamento de um dado sistema.

Como discutido anteriormente (Sec. III. B. 1.c), o grau de ordem de membranas de DPPC revelado por marcadores de spin é baixo. Associado à considerável imobilidade característica desse sistema e que permaneceu em presença dos hidrocarbonetos estudados (Figs. 52 e 53), pareceu-nos indesejável avaliar o efeito da interação sobre os espectros através da medida do parâmetro de ordem. Por outro lado, foi, na Sec. I.C.1.b.ii, indicado que a utilização da relação b/c , como deduzida a partir da Fig. 10, também permite uma avaliação do grau de ordem.

No presente estudo, decidimos empregar a relação h_{-1}/h_0 conforme deduzida a partir da Fig. 51, em que no espectro tirado com o campo magnético paralelo à normal à bicamada, foi utilizada a altura da linha de campo alto, ao invés da linha de campo baixo como na Fig. 10. Essa escolha se deveu ao fato de que, no presente sistema, a linha de campo alto sempre se apresentou melhor definida que a de campo baixo, que muitas vezes se revelou bastante alargada devido ao elevado grau de imobilização e a uma distribuição considerável de orientações do eixo longo do marcador em relação à normal à bicamada.

Assim, a relação h_{-1}/h_0 foi tomada como uma medida da orientação molecular. Quanto maior a relação, maior o grau de ordem.

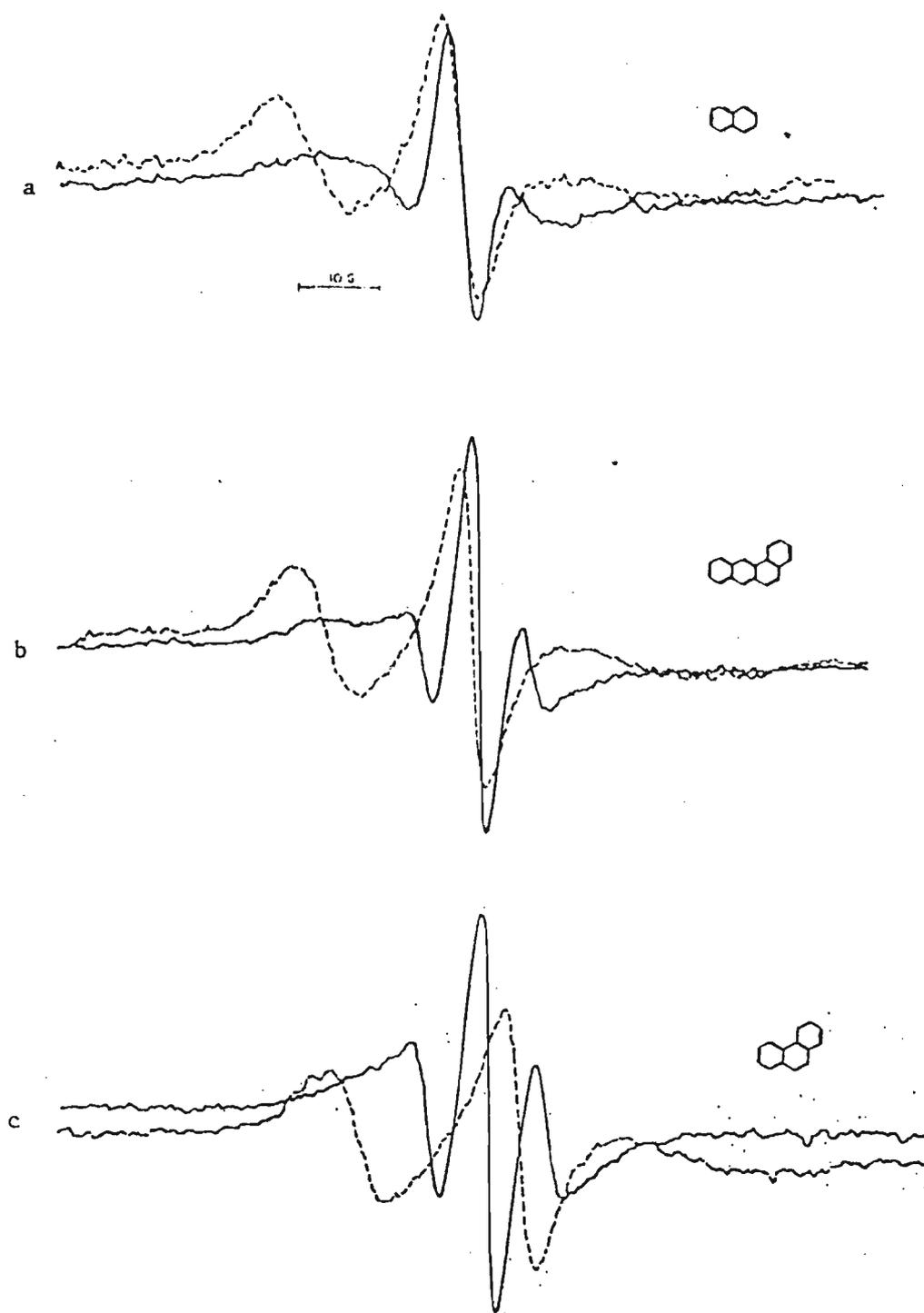


Fig. 52 Espectros de CSL em multi-bicamadas planas de DPPC contendo 5 mol% de naftaleno (a), 5 mol% de 1,2-benzantraceno (b) e 15 mol% de fenantreno (c). (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

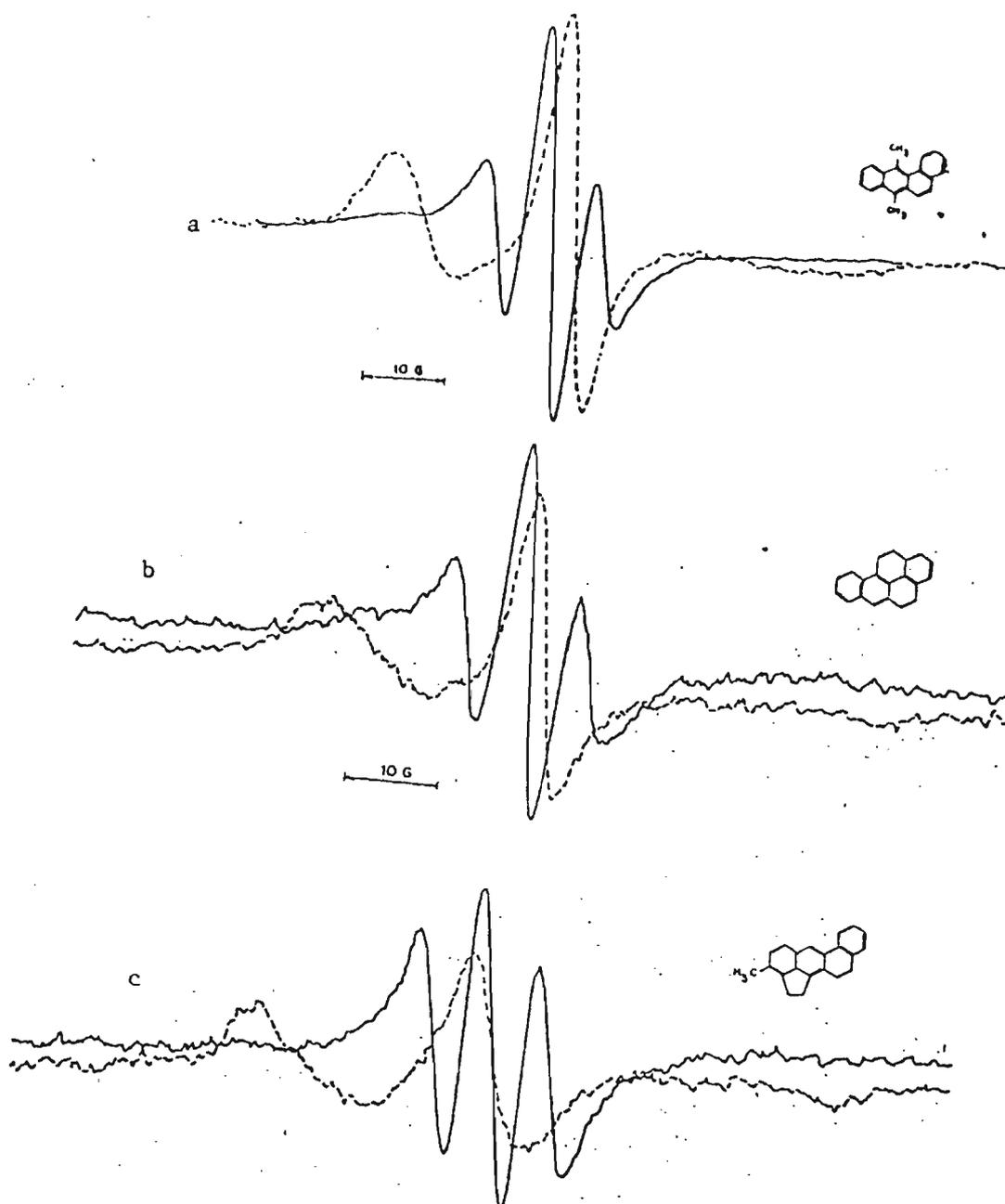


Fig. 53 Espectros de CSL em multi-bicamadas planas de DPPC contendo 5 mol% de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (a), 15 mol% de benzopireno (b) e 15 mol% de 20-metil colantreno (c). (---) campo magnético perpendicular à normal à bicamada; (—) campo magnético paralelo à normal à bicamada.

Os hidrocarbonetos aromáticos foram intercalados em bicamadas de DPPC em concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 mol%. A fim de se provar que a etapa de remoção do solvente a vácuo não havia causado uma eventual sublimação dos hidrocarbonetos, amostras preparadas da mesma forma foram em seguida redissolvidas e dosadas espectrofotometricamente. As quantidades obtidas foram as mesmas que antes da exposição ao vácuo, exceto no caso do naftaleno, que forneceu resultados mais irregulares, sugerindo a possibilidade de uma certa sublimação.

Os hidrocarbonetos menores praticamente não causaram alterações nos espectros do CSL, quando comparados com DPPC sozinha. A Fig. 52 ilustra os resultados para filmes contendo 5 mol % de naftaleno e 1, -benzantraceno e 15 mol % de fenantreno.

A relação h_{-1}/h_0 cresceu gradualmente com o aumento do tamanho dos hidrocarbonetos. Isto é mostrado na Fig. 53 para filmes de DPPC contendo 5 mol% de 9,10-dimetil-1,2-benzantreceno e 15 mol% de 3,4-benzopireno e 20-metil colantreno.

A sequência do aumento de h_{-1}/h_0 foi: naftaleno \approx pireno $<$ antreceno $<$ naftaceno \approx 1,2-benzantraceno \approx fenatreno $<$ 1,2,5,6 - dibenzantreceno \approx 9,10 dimetil- 1,2-benzantraceno $<$ 9-metil antraceno \approx benzopireno $<$ 20-metil colantreno. O aumento de h_{-1}/h_0 é paralelo ao aumento no tamanho dos hidrocarbonetos, sendo os angulares mais capazes de aumentar h_{-1}/h_0 do que os lineares. A sequência de aumento da relação é paralela à potência carcinogênica dos compostos, com exceção do 9-metil antraceno.

Os resultados foram independentes da fra-

ção molar dos hidrocarbonetos. Isso se deve possivel_{mente} à não solubilização total destes na membrana. De fato, resultados de medidas de fluorescência (476) sugerem que a solubilidade do pireno em DPPC é muito baixa (<2 mol%) e que a solubilidade de 3,4-benzopireno poderia atingir cerca de 15 mol%. Também os estudos com monocamadas revelam que a miscibilidade dos hidrocarbonetos com lipídios é baixa (472,473). É possível que os diferentes resultados espectrais (valores de h_{-1}/h_0) obtidos para os diferentes hidrocarbonetos estudados se devam ao diferente grau de solubilização dos mesmos na membrana.

No entanto, esse aspecto refletiria, ainda uma seletividade nos termos da afinidade membrana - hidrocarboneto que varia na mesma ordem que a potencia cancerígena destes.

Os efeitos espectrais, quando observados, indicam que os hidrocarbonetos cancerígenos, em maior extensão, tem a capacidade de alterar a organização da membrana. Se nos reportarmos à Sec. III.B.1. verificamos que esses compostos atuam qualitativamente de maneira semelhante ao colesterol em DPPC, aumentando o grau de anisotropia espectral. Esse aumento se deveria a alteração na orientação do eixo longo molecular, que no caso de DPPC é -32° , em relação à normal à bicamada, para uma orientação em que o eixo longo molecular se tornaria paralelo à normal. No caso do colesterol o novo ângulo é próximo de zero. No caso dos hidrocarbonetos não foi feita uma avaliação.

quantitativa.

A habilidade dos hidrocarbonetos maiores (cancerígenos) de causar esses efeitos espectrais sugere que estes são capazes de se intercalar entre as cadeias de ácido graxo dos fosfolipídios, alinhando-se paralelamente a elas e modificando as interações lipídio-lipídio. Independentemente das causas que determinam esse resultado (solubilidade e/ou forma geométrica, os hidrocarbonetos menores são menos capazes de produzir o mesmo efeito. Estas diferenças entre os dois grupos de compostos podem vincular-se a outros aspectos. Por exemplo, a permeação desses compostos através de membranas pode ser diferente. Também, ao serem capazes de alterar as propriedades de organização da membrana, os hidrocarbonetos maiores poderiam, talvez modificar as propriedades de permeabilidade da mesma. Seria de interesse avaliar a ocorrência desses eventos e sua possível correlação com o mecanismo de carcinogênese.

Tentativas de examinar a interação dos hidrocarbonetos aromáticos com um fosfolipídio em fase líquido-cristalina, PC, resultaram na não observação de alterações espectrais. É interessante notar que os compostos que tem a capacidade de atuar de maneira semelhante ao colesterol sobre fosfolipídios em fase gel (fluidização) não possuem a mesma habilidade de agir como o esteroi em fosfolipídios no estado de cristal-líquido (condensação). Isto evidencia a importância dos requisitos estruturais para o efeito de condensação. Por outro lado, o efeito de flui

dização parece se constituir na habilidade de um composto se intercalar na fase lipídica e agir, de certa maneira, como impureza, diminuindo as fortes interações cadeia-cadeia e destruindo um estado de alta cooperatividade que é o estado gel. Vários compostos foram descritos na literatura como sendo capazes de atuar da mesma maneira (477, 478). Na Sec. III. B.6. será discutida a interação do hormônio peptídico glucagon e será visto que também no caso desse composto ocorre interação com fosfatidil colinas em fase gel, e aparentemente em menor escala na fase líquido-cristalina.

Deve-se notar ainda que os resultados obtidos com os hidrocarbonetos aromáticos são o resultado de interações hidrofóbicas e outras interações de natureza não covalente em consequência das quais os hidrocarbonetos aromáticos grandes, cancerígenos se intercalam entre as cadeias alifáticas dos fosfolipídios. É possível que essa intercalação apresente semelhança com as que ocorrem em regiões hidrofóbicas de outras estruturas biológicas tais como ácidos nuclêicos e proteínas.

Um aspecto final digno de interesse é a baixa miscibilidade de compostos de natureza aromática com outros de natureza alifática. As implicações dessa observação provavelmente podem se estender a um número amplo de interações de importância biológica.

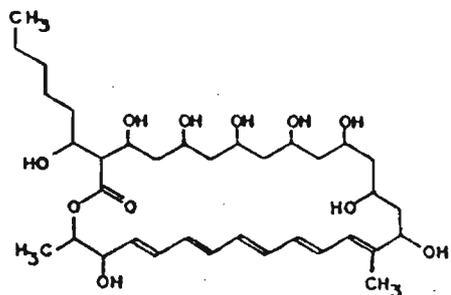
5. Efeito do Antibiótico Poliênico Anfotericina B sobre a Estrutura e a Permeabilidade de Membranas Lipídicas*

Outra classe de compostos que atua ao nível de membranas é a dos antibióticos poliênicos. Esses compostos caracterizam-se por apresentar em sua estrutura um grande anel macrolídeo cujo tamanho pode variar de 12 a 37 átomos de carbono (479). No anel encontra-se uma sequência de duplas ligações, que dá origem a intensa absorção no ultra-violeta e permite também o emprego de técnicas de fluorescência para estudos com esses compostos. Encontra-se ainda uma sequência de grupamentos -OH, que conferem hidrofiliidade ao lado da molécula onde ocorrem. A Fig. 54 mostra alguns dos antibióticos poliênicos mais estudados e que tem a estrutura elucidada.

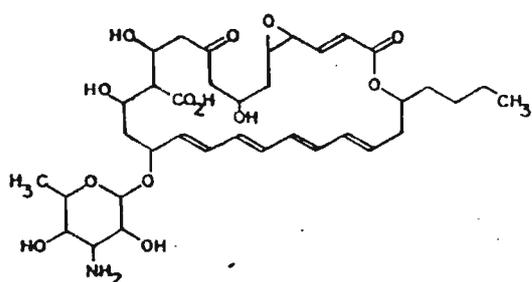
Observa-se que a filipina não possui substituintes carregados, sendo relativamente apolar. A anfotericina B, a nistatina e a etruscomicina, contudo, possuem um grupamento carboxila e um amino grupo e podem, portanto, apresentar-se com carga negativa, positiva ou na forma zwitteriônica. Verifica-se também nesses compostos, a presença de um anel cetálico de seis membros e de um anel de micosamina, ligada por ligação α -glicosídica ao anel macrolídeo.

Devido a essa estrutura química, a solubilidade dos polienos é extremamente limitada em água sendo baixa mesmo em solventes orgânicos como álcoois, éteres e ésteres (479). Conseguem dissolver-se bem

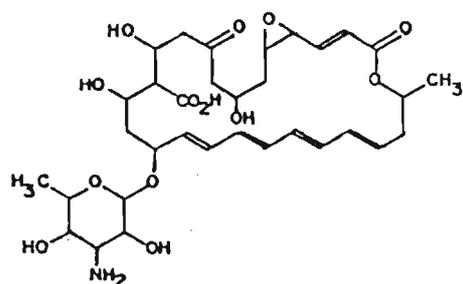
* Este estudo constitui parte do trabalho de doutoramento da srta. Yasco Aracava.



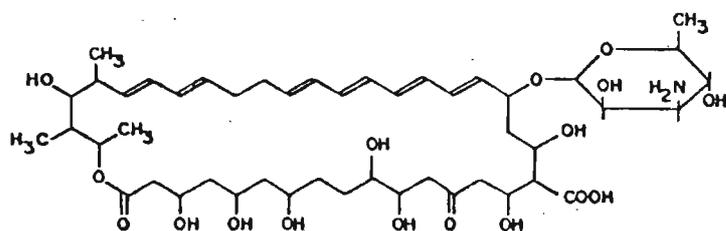
FILIPINA



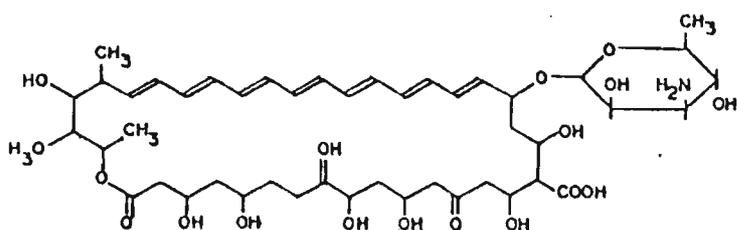
ETRUSCOMICINA



PIMARICINA



NISTATINA



ANFOTERICINA B

Fig. 54 Estruturas de alguns antibióticos poliênicos

em solventes do tipo dimetil sulfóxido (DMSO) e dimetil formamida (DMF)

Os antibióticos poliênicos são produzidos por diferentes espécies de Streptomyces (479) e apresentam a característica de exercerem pouco ou nenhum efeito sobre bactérias, possuindo, contudo ação tóxica sobre células de fungos e leveduras (480-485), cujas membranas plasmáticas apresentam entre seus constituintes quantidades consideráveis de esteróis. Em células de mamíferos verificou-se que esses antibióticos eram capazes de causar hemólise de eritrócitos (486), os quais são portadores de elevadas quantidades de colesterol.

Foi verificado que a ação tóxica dos antibióticos poliênicos se efetua através de alterações da permeabilidade celular (480-485). Os estudos iniciais com microrganismos não permitiram distinguir se essas alterações eram devidas a uma ação do antibiótico ao nível de membrana ou se o composto atuava após penetrar na célula. A evolução dos trabalhos veio esclarecer que a interação responsável pelos efeitos biológicos ocorria a nível de membrana (482, 485, 487-496).

A observada ação seletiva sobre membranas que continham esteróis levou necessariamente ao estudo de sistemas modelos em que se procurou avaliar a participação destes compostos no mecanismo de ação dos antibióticos poliênicos.

Grande quantidade de trabalhos seguiu-se, com o estudo da influência de antibióticos poliênicos sobre a permeabilidade de membranas negras (497-505)

e liposomas (506-518) e com estudos de caráter estrutural fazendo uso de microscopia eletrônica (508,513,514) de medidas de absorção (506,507) de dicroísmo circular e fluorescência (513, 516-521). O emprego de técnicas de ressonância magnética foi efetuado em muito pequena escala (211,212,522,523).

Os dados obtidos levaram a propostas de modelos para a ação dos antibióticos poliênicos que dependiam do composto específico em questão (499,501,511,512). Existe uma grande quantidade de trabalhos feitos com a filipina, que são importantes no presente estudo apenas para fins comparativos, uma vez que este foi realizado quase que exclusivamente com anfotericina B, e, ocasionalmente com nistatina.

Os modelos para o mecanismo de ação da anfotericina B (499,501,511,512) foram formulados parcialmente em base ao fato de que as medidas de condutividade indicavam uma dependência da concentração do antibiótico elevada a um expoente n que variava de 4 a 12, dependendo do experimento (497-501). Essa dependência levou à proposta de que o antibiótico complexaria com o esterol, formando canais de cerca de 0,8 nm de diâmetro, onde o lado apolar do antibiótico (duplas ligações) estaria voltado para a membrana e o lado contendo os grupos -OH formaria as paredes do canal pelo qual passariam água e solutos não maiores do que o diâmetro proposto (497-501). A seletividade por tamanho foi observada experimentalmente (497-501), bem como a necessidade da presença do antibiótico de ambos os lados da membrana negra para que se

observasse um efeito considerável (497).

Foi ainda proposto que os canais formados pelo complexo antibiótico-esterol teriam natureza dinâmica, formando-se e desfazendo-se continuamente (497-501,511,512). Experimentos com membranas lipídicas negras tem apresentado resultados contraditórios. Hladky e Haydon (502) colocam que tais canais, se ocorrerem, teriam duração de menos de 100ms. Romine e colaboradores (503) em estudo comparativo de nistatina e gramicidina (sobre cujo mecanismo de ação não existem dúvidas, sabendo-se que a mesma forma canais), mostraram que a primeira se comporta de maneira diferente da segunda e sugerem que seus resultados se constituem em evidência de que a nistatina não forma canais. Ao mesmo tempo, contudo, Ermishkin e colaboradores (504,505) publicaram dados que refletem a formação transiente de canais individuais.

A síntese do conceito de formação de canais por anfotericina B, se encontra no trabalho de Kruijff e Demel (511), os quais, através da manipulação de modelos moleculares, chegaram a construção do que seria o poro formado por anfotericina B e colesterol (Fig. 55). O modelo que emprega os compostos alternadamente, numa relação de 1:1 num total de 8 da cada, permite alguma variação nessa relação, acomodando mais moléculas do esteroi. Uma vez que o comprimento do complexo corresponde apenas à espessura de metade da bicamada seria necessário que dois poros, um em cada monocamada, e cada um com a orientação correta, se encontrassem para que toda a membrana fosse atravessada,

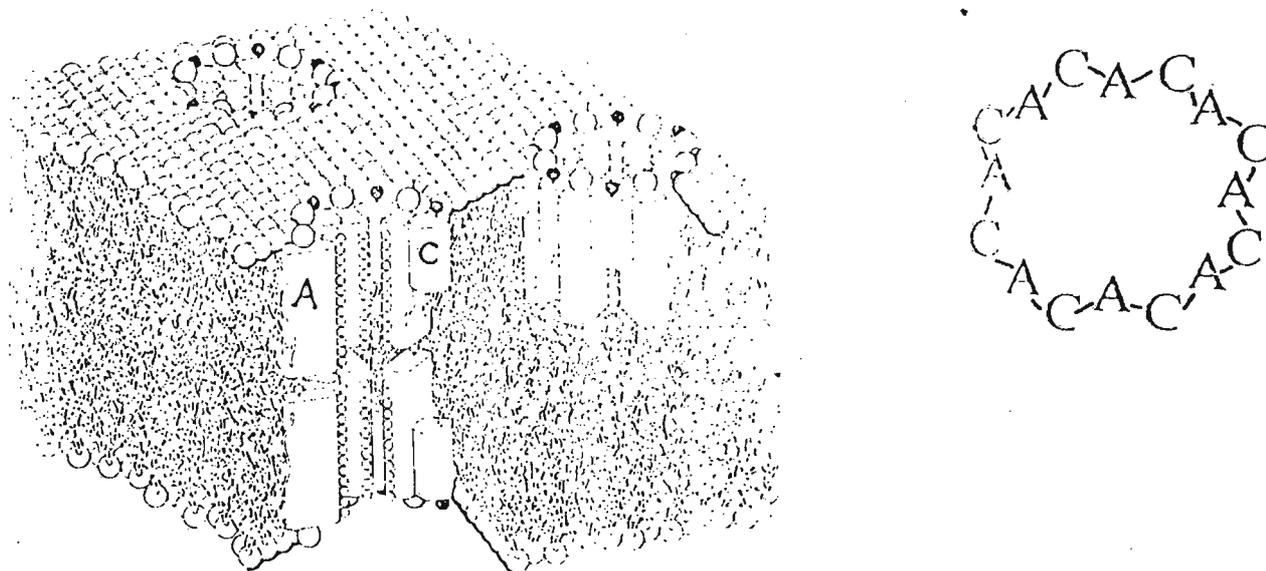


Fig. 55 Estrutura do poro formado por anfotericina B e colesterol proposta de Kruijff e Demel (ref. 511).

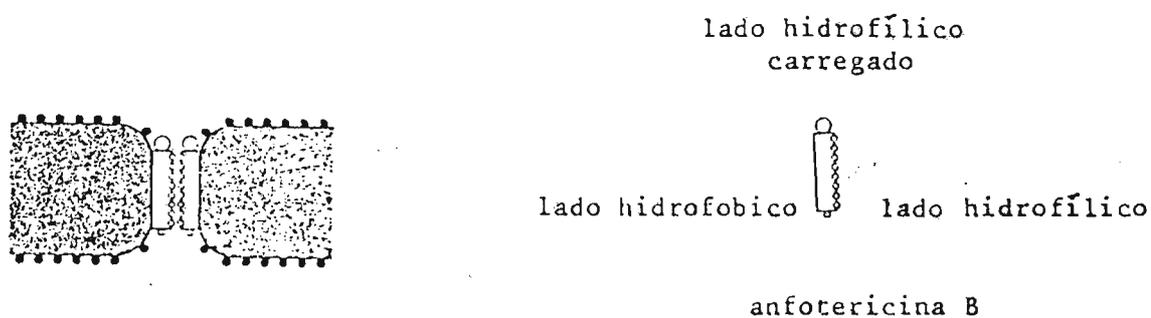


Fig. 56 Estrutura do poro formado por anfotericina B e colesterol proposta por van Hoogevest e de Kruijff (ref. 512).

permitindo a passagem de solutos.

A verificação, no entanto, (1º) da necessidade da presença de anfotericina B em ambos os lados de membranas lipídicas negras (497), bem como (2º), a noção generalizada de que a difusão transversal de compostos em membranas artificiais (pelo menos) é um processo relativamente lento (523,526) (o que dificultaria esse movimento para moléculas do antibiótico e provavelmente muito mais para o complexo), e mais ainda, (3º) a observação (consequência óbvia do acima exposto de que a anfotericina B não atravessa a membrana, atuando somente sobre a primeira bicamada de liposomas (refs. 509 e 512 e o presente trabalho)) se constitui em fatos que põem em dúvida a validade do uso do modelo acima. O próprio de Kruijff, recentemente, retificou o modelo (512) propondo agora que apenas um complexo anfotericina-esterol seria responsável pelo canal e que na região onde esse complexo existisse, a membrana teria apenas a espessura deste (ou seja, aproximadamente a metade da sua espessura total, ajustando-se os lipídios ao redor, pela formação de uma espécie de menisco (Fig. 56).

Adicionam-se ao exposto as indicações existentes de que anfotericina B encontra-se em forma agregada em solução aquosa (479) e esse evento poderia ter influência sobre os resultados obtidos. Por exemplo, a variação do expoente n na concentração do antibiótico, citado anteriormente observada em diferentes experimentos (499,501) poderia estar ligada à história da preparação que seria responsável por dife

rentes estados de agregação. Também, em vários estudos, é indicado a necessidade de um tempo de incubação para efetuação de medidas (479).

Todos esses fatos sugeriram que seria de interesse empregar a técnica de marcador de spin para tentar elucidar alguns aspectos da interação anti-biótico poliênico-membrana.

Os estudos dividiram-se basicamente em dois tipos:

- a - Estudos de Caráter Estrutural
- b - Estudos de Permeabilidade

a. Estudos de Caráter Estrutural

Esses estudos foram executados em multi-bicamadas planas de PC e DPPC e em liposomas de PC, empregando-se os marcadores de spin ASL e CSL, em presença de concentrações variáveis de colesterol.

i. Multi-bicamadas Planas

Foram preparadas multi-bicamadas planas de PC e DPPC, contendo o marcador CSL. Anfotericina B foi adicionada ao sistema de duas maneiras: durante a preparação das membranas, ou por adição à solução hidratante. Os resultados dependeram da forma de preparação.

O grau de organização da membrana, avaliado pela relação b/c ou pelo parâmetro de ordem não foi afetado por anfotericina B presente na solução de hidratação. Esse resultado foi o mesmo para membranas de PC e DPPC, com todas as concentrações de colesterol empregadas.

Quando anfotericina B era incluída como um constituinte da membrana, havia uma diminuição do grau de ordem, que independia da concentração de colesterol (Fig. 57). Esses resultados foram observados tanto para PC como para DPPC.

Durante a execução do presente trabalho, foi publicado artigo de Flick e colaboradores (212) relatando o mesmo tipo de observação que as descritas acima.

ii. Liposomas

Liposomas de PC contendo quantidades variáveis de colesterol e o marcador CSL, não evidenciaram nenhuma alteração espectral em presença de anfotericina B. Por outro lado, um efeito espectral foi observado quando o marcador empregado era o ASL. Este marcador foi escolhido com a intenção de atuar ele mesmo como esterol e, desta forma, interagir diretamente com o antibiótico. A tentativa foi feita, apesar de se ter conhecimento de que os requisitos estruturais para que esteróis interajam com o polieno são os mesmos que os necessários para o efeito de condensação (506-509). O ASL, contudo, possui o grupa-

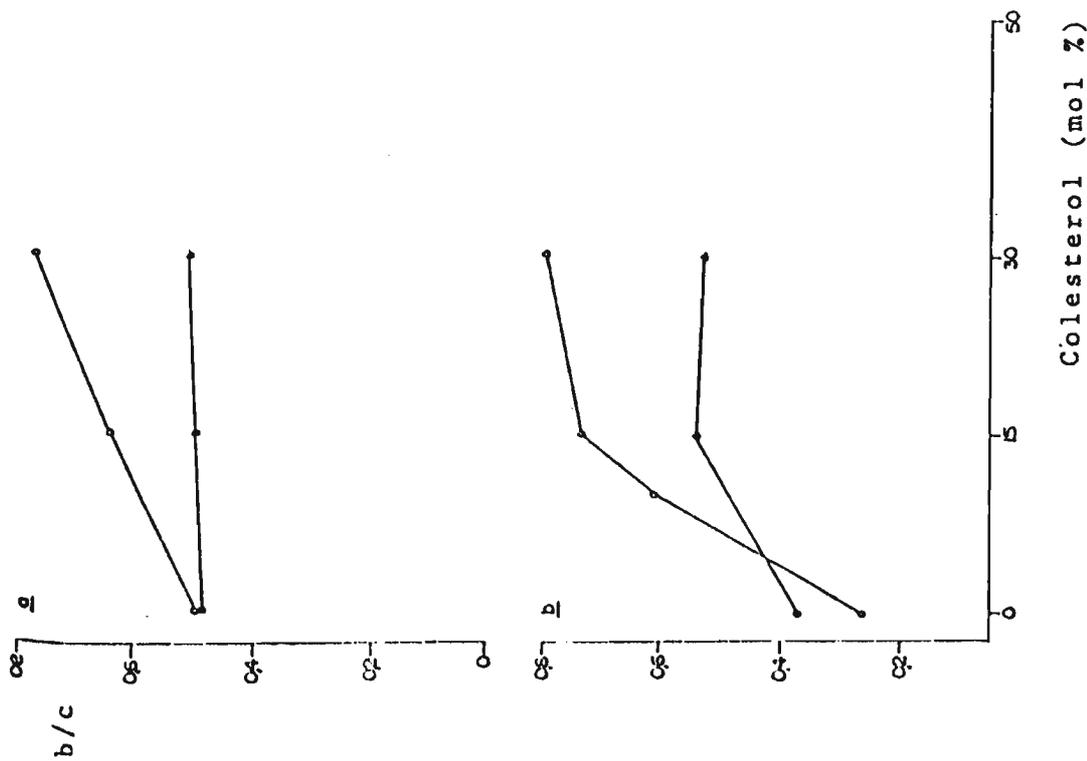


Fig. 57 Relação b/c para filmes de PC (a) e DPPC (b) contendo quantidades variáveis de colesterol em ausência (o) e em presença (●) de anfotericina B. A concentração do antibiótico na membrana era 5% do fosfolípido (em moles). O tampão empregado neste experimento e nos apresentados nas figuras 58 a 61 foi fosfato isotônico, pH 7,4.

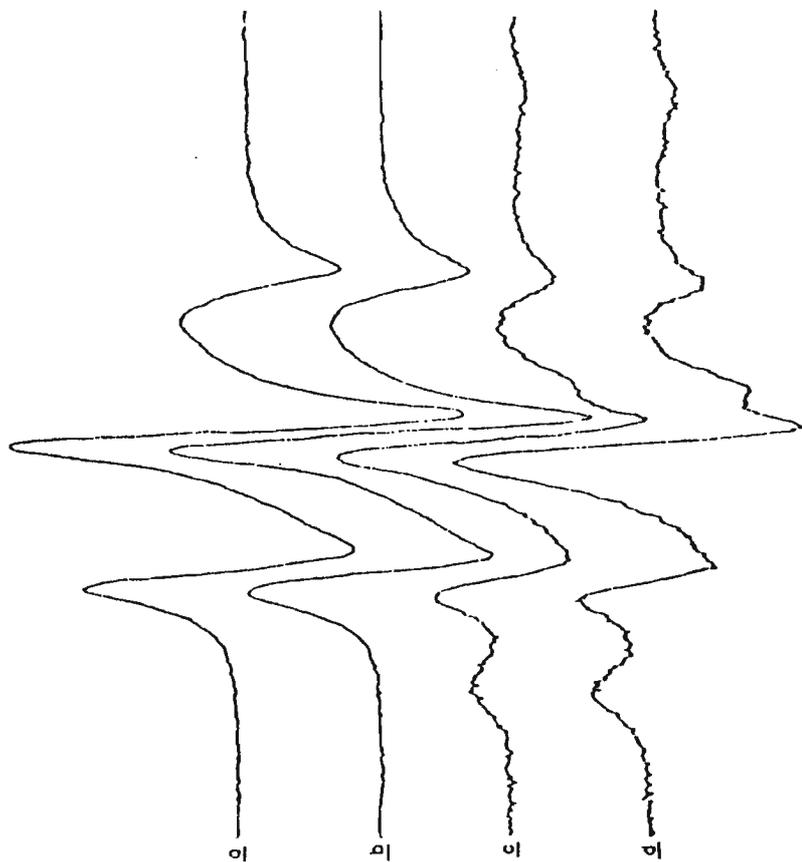


Fig. 58 Espectros de ASL (8×10^{-5}) em liposomas de PC (a); em presença de DMSO (10% em volume) (b); cinco minutos após a adição de anfotericina B 5×10^{-3} M (c); trinta minutos após a adição do antibiótico (d). PC = 5×10^{-3} M.

mento -OH na posição 17 β (e não 3 β) e, como consequência, não apresenta a necessária cadeia alifática lateral na posição 17 (tabela I).

Dentro do objetivo dos experimentos, foram preparados amostras com 0% de colesterol, de sorte que o único esterol presente era o ASL. A Fig. 58 mostra o efeito da adição da anfotericina B sobre os espectros de ASL: observa-se o aparecimento de um pico largo devido a ASL altamente imobilizado, ao mesmo tempo que é modificada a relação das alturas dos picos de campo baixo e central. O efeito permanece à medida que aumenta a concentração de colesterol na membrana. A Fig. 59 mostra a relação entre as alturas dos picos de campo baixo (h_{+1}) e de campo central (h_0) dos espectros de ASL em dispersões de PC contendo concentrações crescentes de colesterol. Verifica-se que essa relação cai à medida que aumenta o esterol. Pode-se observar, contudo, que a alteração é a mesma em ausência de anfotericina B.

Esses resultados poderiam ser explicados de duas maneiras: 1 - a interação entre ASL e anfotericina B ocorre ao nível da membrana. A fração de marcador que interage com o antibiótico dá origem à população imobilizada responsável pelo pico alargado que aparece no espectro. 2 - O ASL é uma molécula que, pelo seu balanço hidrofóbico-hidrofílico apresenta detetável solubilidade em água (527).

Em membranas, o ASL sofre partição entre estas e o meio aquoso. A anfotericina B, nas concentrações empregadas, devido à sua baixíssima solubilidade em água, apre-

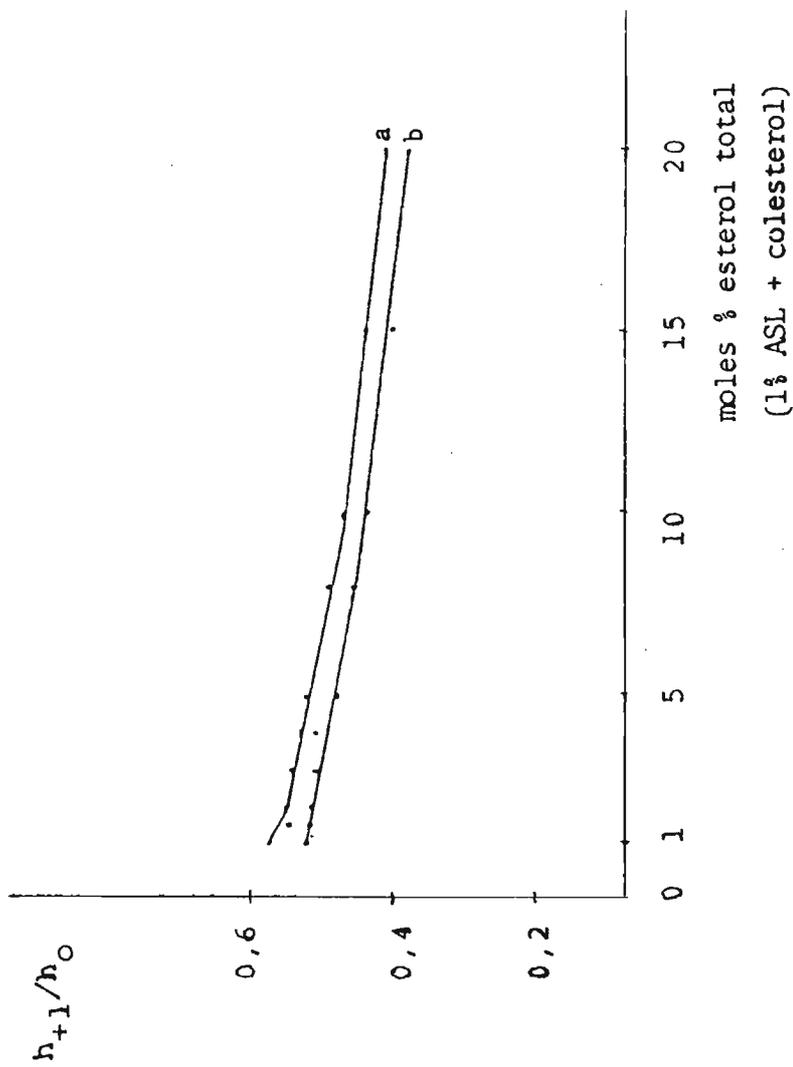


Fig. 59 Relação h_{+1}/h_0 para espectros de ASL em liposomas de PC contendo concentrações crescentes de colesterol, a- em ausência e b- em presença de anfotericina B ($5 \times 10^{-4}M$).

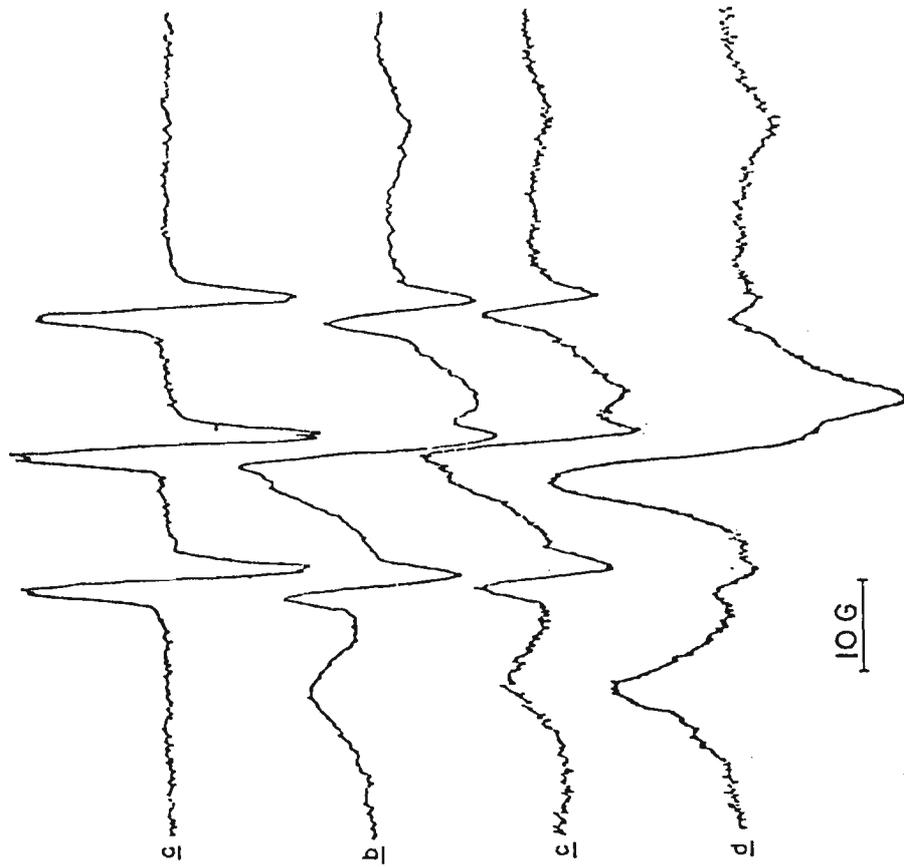


Fig. 60 Espectros de ASL ($8 \times 10^{-5}M$) em a-solução 20% em volume de DMSO; e em presença de anfotericina B, b-0,5 mg/ml; c-1,0 mg/ml; d-2,0 mg/ml.

senta-se sob a forma agregada, em partículas macroscópicas, até. Uma possibilidade é de que o ASL dissolvido no meio aquoso se ligue às partículas sólidas de anfotericina B e esta seja a origem do pico alargado no espectro. Esse, aliás, é um problema que deve ser sempre levado em conta quando o sistema em estudo contém mais de uma fase agregada no meio aquoso: a de que o marcador de spin empregado se ligue a uma nova fase adicionada fazendo com que as alterações espectrais observadas se devam, não ao efeito de mudança da primeira, mas ao fato de que o marcador se ligou à segunda. Essa possibilidade é mais viável quando a solubilidade de marcador em água é finita, pois aí a transferência pode ser mediada por este meio.

Isso explicaria a ausência do efeito de colesterol nos resultados apresentados na Fig. 59. Se o fenômeno ocorresse na membrana, esperar-se-ia que o colesterol competisse com o ASL, deslocando-o do complexo e causando o desaparecimento do pico imobilizado devido à interação ASL-anfotericina B.

Alguns experimentos foram efetuados no sentido de testar as duas hipóteses. Uma tentativa foi a de verificar a ligação entre ASL e anfotericina B em solução aquosa, em ausência de membrana. A Fig. 60 mostra que ASL, inicialmente livre em solução, é capaz de ligar-se a partículas sólidas, dando origem a espectros que correspondem a um marcador altamente imobilizado.

Essa habilidade de ligar-se ao antibiótico não parece sequer ser específica da estrutura esteroídica do marcador. Soluções contendo 5-SASL também evidenciaram a capacidade desse marcador de interagir com anfotericina B, sugerindo que o caráter hidrofóbico das moléculas é o bastante para garantir a interação. Interação entre antibióticos poliênicos e esteróis em solução tem sido bastante estudadas (506, 507, 509, 516-521, 528, 529).

Outro experimento fez uso do raciocínio de que concentração de marcador em cada fase (membrana e água) depende da concentração de cada uma delas. Um aumento da concentração de membrana deveria causar uma diminuição de quantidade de marcador na água e, se a ligação com o antibiótico ocorrer fora da membrana, ela deverá ser observada em menor extensão na presença de concentrações maiores de membranas. A Fig. 61 mostra que esse foi realmente o caso. Os experimentos acima sugerem que a interação entre ASL e anfotericina B realmente não ocorre na membrana.

Os estudos estruturais efetuados pela técnica de marcador de spin não permitiram observar modificações na organização da membrana quando o antibiótico era adicionado exteriormente à mesma (em concentrações superiores às necessárias para observar grandes mudanças de permeabilidade (509)). O fato de que alterações espectrais foram observadas quando o antibiótico era incorporado à membrana durante a sua preparação sugere que, ou o mecanismo de ação depende de maneira como o antibiótico é adicionado, ou

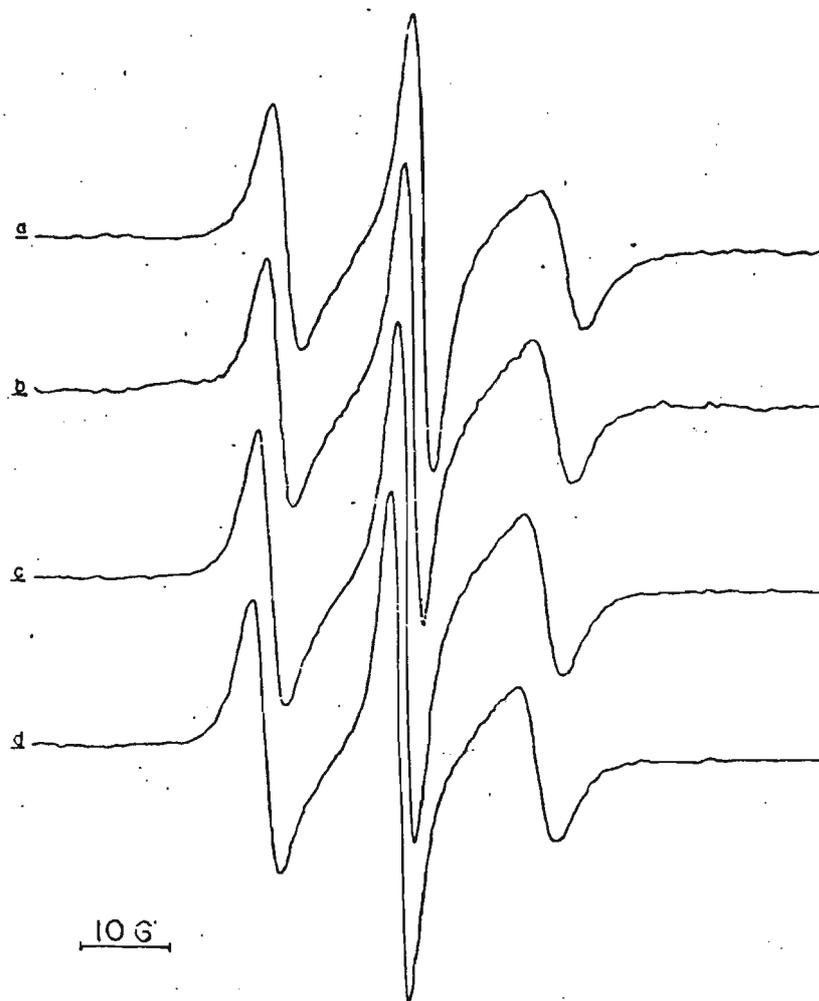


Fig. 61 Espectros de $ASL 5 \times 10^{-5} M$ em liposomas de $PC 5 \times 10^{-3} M$ (a e b), em presença de 2% em volume de DMSO (a) e anfotericina B ($5 \times 10^{-4} M$) (b); e liposomas de $PC 5 \times 10^{-2} M$ (c e d), em presença de 2% em volume de DMSO (c) e anfotericina B ($5 \times 10^{-4} M$) (d).

é apenas uma fração muito pequena do antibiótico presente no meio aquoso que se liga à membrana, sendo suficiente para promover as observadas alterações de permeabilidade, mas não para promover alterações espectrais que dependem da modificação de uma fração significativa da membrana. Que este poderia ser o caso é sugerido pelo experimento de van Hoogevest e de Kruijff (512) em que são necessários 15 minutos para liberar todo o K^+ de uma população de vesículas que se encontra em presença de 3 moléculas da anfotericina B por vesícula. Também nesse trabalho foi verificado que uma molécula de anfotericina B é ligada para cada 5000 moléculas de colesterol.

Nossos resultados não explicam, contudo, a abolição do efeito do colesterol num estudo de calorimetria diferencial de varredura (506,507), em que o pico de absorção de energia devido à transição gel-cristal líquido de fosfolipídio volta a aparecer nítido e estreito num sistema contendo colesterol, ao se adicionar o antibiótico poliênico.

b. Estudos de Permeabilidade

Existem poucos trabalhos que procuram empregar o método de marcador de spin como uma técnica para estudar a permeabilidade de membranas (169,267). No entanto, isto pode ser efetuado, e de maneira bastante simples.

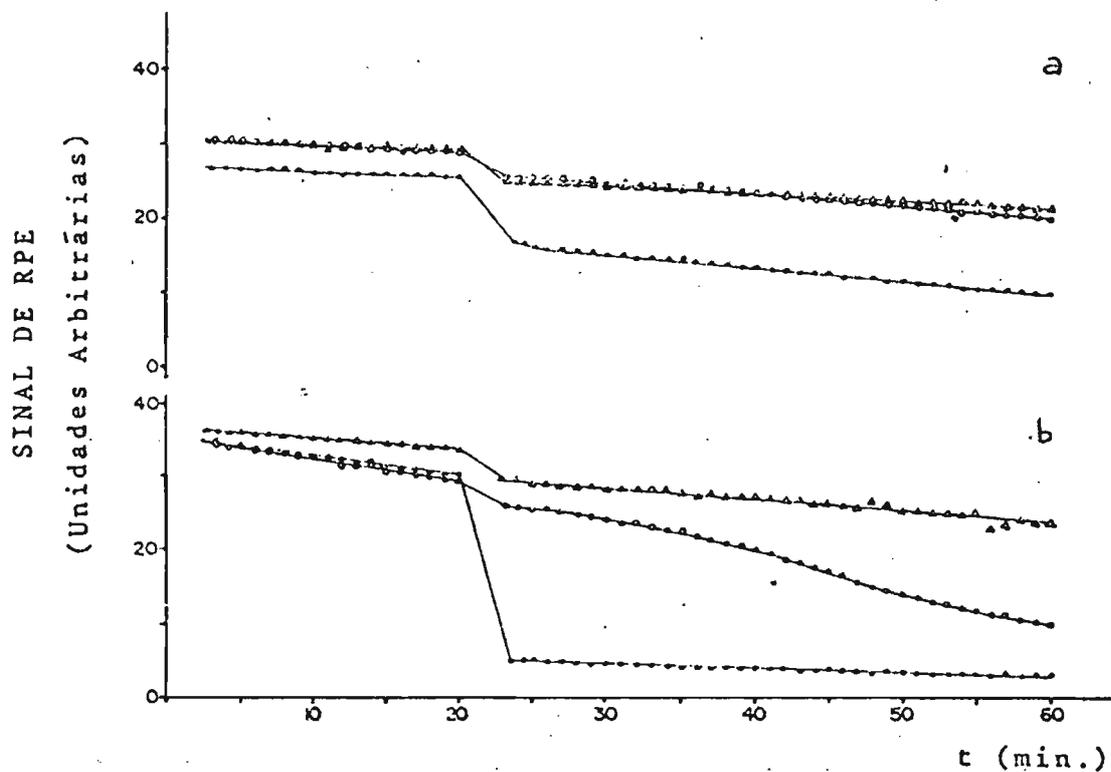


Fig. 62 Queda do sinal de RPE da TEMPO-colina (em unidades arbitrárias) em função do tempo, após adição de ascorbato a vesículas de PC-DCP (7,5%) (a) e PC (67,5%)-DCP (7,5%)-colesterol (25%) (b). Ascorbato foi adicionado no tempo zero e a queda do sinal seguiu durante 20 minutos após os quais adicionou-se o agente desejado: Δ -tampon; \circ -DMSO; \square -anfotericina B equimolar ao colesterol. Tampão isotônico NaCl/fosfato pH 7,4.

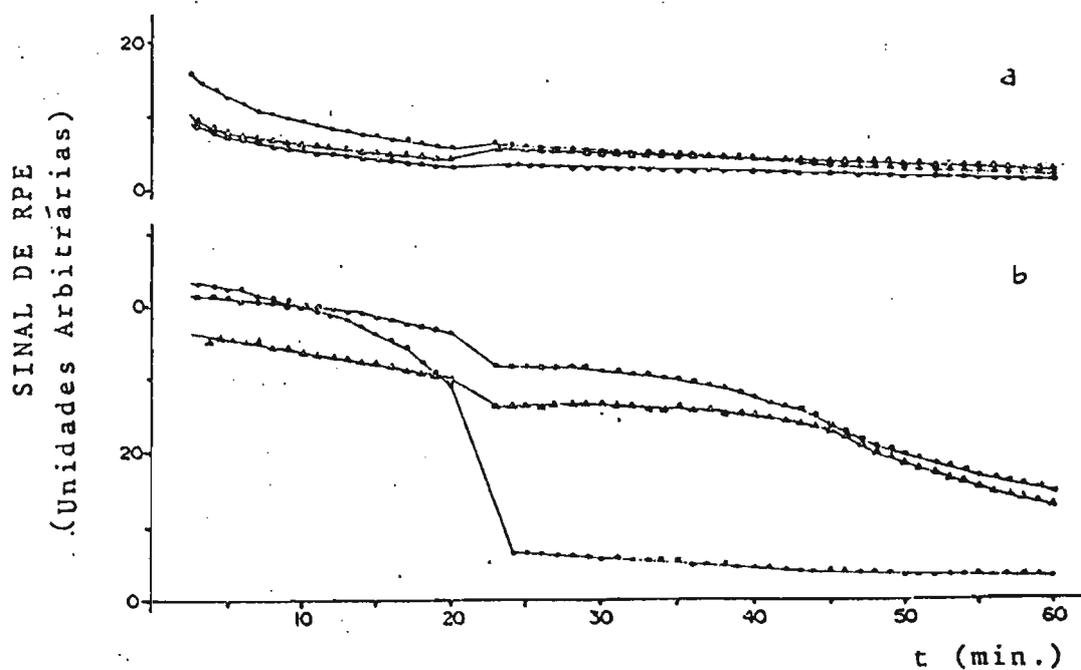


Fig. 63 Experimento análogo ao da figura 62, onde a -PC e b- PC-colesterol (25%).

ção mais rápida da TEMPO-colina do que os sem o este-
rol, com exceção do sistema PC-HDTMA-colesterol, que
se comportou como esperado. Relatos mais recentes in-
dicam, em vários estudos, comportamento de exceção
(530-533) em que se observou aumento da permeabilida-
de de um soluto por adição de colesterol.

No presente trabalho, uma hipótese possível
é a de que a permeação do íon ascorbato, que é um
processo que deve ser levado em conta, é mediada pe-
la presença de colesterol da maneira esperada; porém
a permeação da TEMPO-colina poderia eventualmente dar-
se através de um mecanismo diferente, de sorte que a
presença de colesterol aceleraria esse evento. Uma
possibilidade é que a passagem do cátion-radical ocor-
resse através de rachaduras presentes devido à hete-
rogeneidade da membrana e que esse fenômeno fosse
mais frequente em presença de colesterol.

Durante o período inicial anterior à adi-
ção de qualquer agente observou-se lenta diminuição
da altura h_{+1} . Imediatamente após a adição de tampão
e DMSO, observaram-se variações de h_{+1} aproximadamen-
te proporcionais às variações de volume. A redução len-
ta do sinal da TEMPO-colina continuou após essas adi-
ções por períodos de cerca de 30 minutos, após os
quais a queda do sinal acentuou-se. A reprodutibili-
dade desse fenômeno foi muito grande, sugerindo que
algum processo físico deveria estar associado ao mes-
mo. Uma possibilidade seria a ocorrência de fusão de
membranas, mas isso não foi confirmado.

O solvente DMSO parece exercer um efeito

sobre a permeabilidade das membranas. Esse problema encontra-se no momento sob investigação. A mudança abrupta no valor de h_{+1} por adição de anfotericina B a membranas contendo, colesterol veio confirmar a habilidade do antibiótico de atuar sobre esses sistemas. Pode-se verificar que o efeito era dependente da concentração do polieno (Fig. 64), de acordo com obser-
vações anteriores (509,510).

Alguns experimentos preliminares foram efe-
tuados para testar uma possível fusão de membranas induzidas por anfotericina B, e resultados prelimina-
res forneceram evidências sugerindo a ocorrência do fenômeno.

Outras verificações efetuadas através dos presentes experimentos foram: 1- a anfotericina B age somente sobre a primeira bicamada em liposomas (503, 509). Isto é claramente visto quando se compara o total de TEMPO-colina reduzido em liposomas (~5%, Tabela X), com a quantidade afetada em vesículas (> 80 % (Fig. 62,63 e 64). A não total redução em vesículas deve-se provavelmente a uma pequena população multi-lamelar; 2- o volume aquoso inter-lamelar depende da carga da membrana (101) sendo aproximadamente 5 e 2,5 vezes maior em membranas contendo respectivamente DCP e HDTMA do que em membranas contendo apenas PC (Tabela XI); 3- o colesterol também parece aumentar o volume aquoso inter-lamelar de cerca de 20-40% (362,363,365,372 e Tabela XI).

Os experimentos acima relatados vem evidenciar a utilidade do método de marcador de spin como uma técnica simples para o estudo de propriedades de

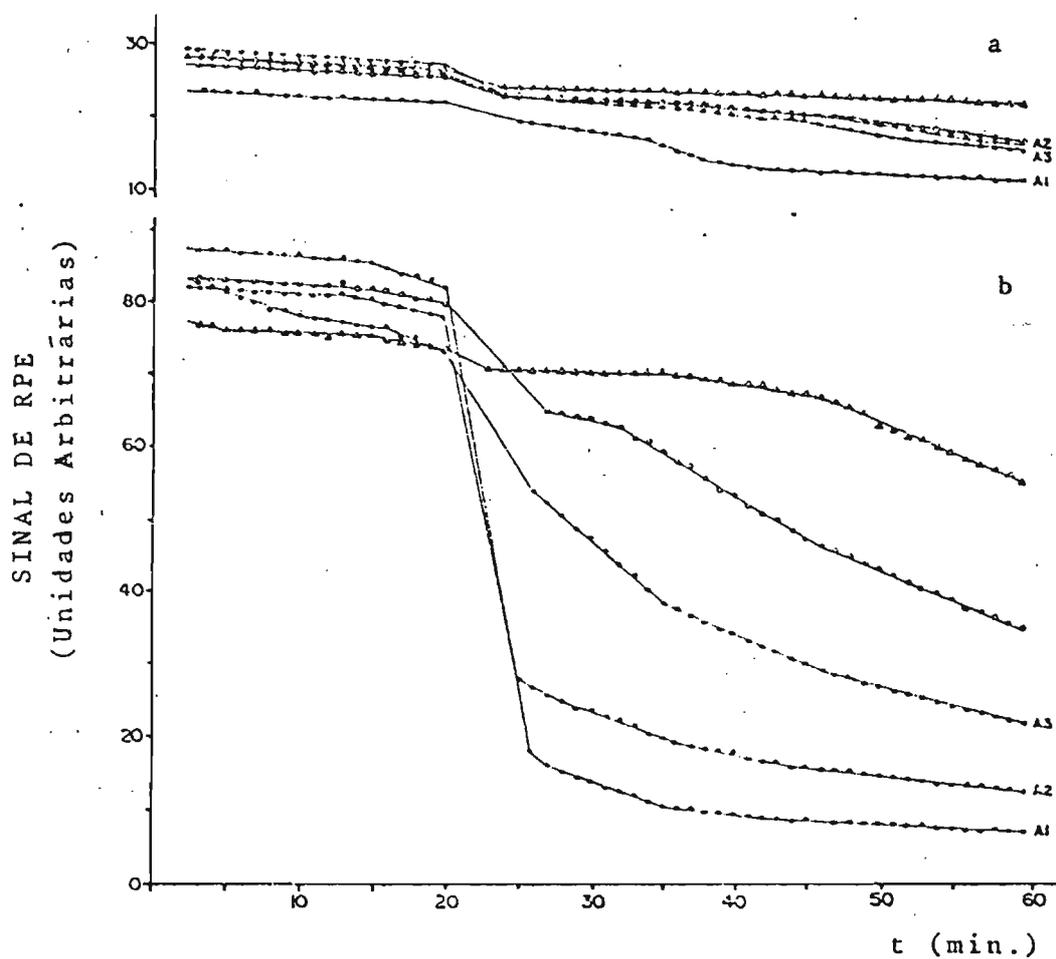


Fig. 64 Experimento análogo ao da figura 62, onde a-PC-DCP(7,5%) e b-PC (67,5%)-DCP(7,5%)-colesterol(25%). As concentrações de anfotericina B foram: $A_1 - 2,7 \times 10^{-3} M$ (equimolar ao colesterol), $A_2 - 2,7 \times 10^{-4} M$; $A_3 - 2,7 \times 10^{-5} M$.

TABELA X

Porcentagem de queda de sinal por adição de tampão, DMSO e anfotericina B a liposomas de diferentes composições.

Sistema	Tampão	DMSO	Anfotericina B
PC	16,5	—	10,1
PC-colesterol(25%)	16,6	7,8	47,0
PC-DCP(7,5%)	-	16,0	25,0
PC(67,5%)-DCP(7,5%)-colesterol(25%)	9,0	14,8	49,7
PC-HDTMA(15%)	30,0	23,7	13,5
PC(60%)-HDTMA(15%)-colesterol(25%)	17,1	16,7	62,2

TABELA XI

Quantidade de TEMPO-colina retida (em unidades arbitrárias) em liposomas de diferentes composições.

Sistema	Quantidade retida
PC	17,8
PC-colesterol (25%)	25,6
PC-DCP (7,5%)	71,8
PC (67,5%) - DCP (7,5%) - colesterol (25%)	109,2
PC-HDTMA (15%)	48,2
PC (60%) - HDTMA (15%) - colesterol	60,6

permeabilidade de membranas. Várias das observações efetuadas vem confirmar resultados obtidos por outros autores (101,509,512), o que confere credibilidade ao método.

Os estudos efetuados evidenciaram também que os antibióticos poliênicos podem ser empregados como instrumento para o estudo de propriedades de membranas de maneira mais ampla que a que se refere ao seu mecanismo específico de ação. Por exemplo, o fato de que apenas a primeira bicamada de liposomas é acessível à anfotericina B permite que através de seu uso se torne acessível a outros agentes apenas o primeiro espaço aquoso inter-lamelar, bem como apenas a monocamada interna da primeira bicamada e a monocamada externa da segunda bicamada. Esse é um recurso que pode encontrar muitas aplicações futuras (por exemplo, para dimensionamento de liposomas).

6. Interação entre o Hormônio Peptídico Glucagon e Membranas Lipídicas*

Várias atividades hormonais são exercidas por compostos de natureza oligopeptídica, entre eles o glucagon. O mecanismo de ação do glucagon ao nível de células alvo encontra-se bastante elucidado (534) sabendo-se que o hormônio se liga a um receptor específico no lado externo da membrana celular, ativando dessa maneira a adenil ciclase no lado interno da mem

*Ver nota de rodapé na p. 192

brana, ocorrendo a síntese de AMP cíclico e daí toda a seqüência de eventos que culmina na liberação de glicose.

Os hormônios peptídicos se ligam à membrana através de um receptor específico (de natureza protéica), tendo mesmo sido, em alguns casos, isolado esse receptor (535,536). É também sabido que alguns desses hormônios podem possuir atividades outras diferentes daquelas pelas quais são mais conhecidos. A maneira como diferentes funções são executadas por esses hormônios não é conhecida. Uma hipótese concebível seria a ação de um mecanismo diferente, por exemplo, a interação com lipídios de membranas.

Por isso, assim como no caso do estudo da interação de membranas com hidrocarbonetos aromáticos, (Sec. III.B.4) propusemo-nos a examinar a interação entre o hormônio peptídico glucagon e membranas lipídicas, apesar de não se conhecerem na atualidade estudos biológicos que evidenciem um papel para tal interação.

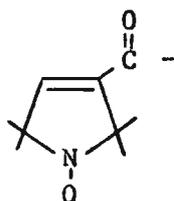
* Esse projeto está sendo elaborado em colaboração com Dr. R.M. Eppard da Universidade McMaster (Canadá), o qual tem investigado os mesmos sistemas (ou semelhantes através do emprego de outras técnicas tais como, fluorescência, dicroísmo circular, microscopia eletrônica e ressonância magnética nuclear. O trabalho realizado em nosso laboratório envolve a aplicação do método de marcador de spin ao problema e se constitui no trabalho de tese de doutoramento do Sr. José Roberto Ernandes. Os dados aqui apresentados foram extraídos desse trabalho.

Um outro motivo para o estudo dessa interação prende-se à possibilidade de que o glucagon, para atingir o seu receptor, deva primeiramente ligar-se à membrana. Nesse caso, resulta de interesse examinar como ocorre a interação entre o hormônio e os lipídios da membrana.

Encontram-se na literatura outros estudos de interação de hormônios peptídicos com membranas artificiais (537-539).

Foram empregadas no presente trabalho membranas de PC, DPPC, dimiristil fosfatidil colina (DMPC), PS, PA e PI.

Foram empregados neste projeto derivados marcados de glucagon, preparados pelo Dr. R.M. Epanand, contendo um grupamento nitróxido em um pentanel ligado ao amino grupo livre da histidina terminal (G-1) e o outro possuindo o mesmo pentanel ligado ao ϵ -amino grupo da lisina 12 (G-12). O grupamento ligado aos aminos grupos é:



O glucagon é um peptídio contendo 29 aminoácidos (PM~3500) dotado de grande liberdade conformacional em solução aquosa (540). Não seria, portanto, de se esperar que os espectros da molécula marcada apresentassem indicações de elevado grau de imobilização em água. Soma-se a isso o fato de que o anel contendo o marcador liga-se aos amino grupos por ligação simples, o que confere ao grupamento nitróxido

um grau de liberdade adicional. No caso G-12, poder-se-ia esperar uma grande mobilidade, uma vez que o anel contendo o grupamento nitróxido está ligado à porção terminal da cadeia lateral da lisina.

No entanto, estudos em solução e em solventes orgânicos indutores de α -hélice (541, 542) indicaram para o G-12 uma maior imobilidade que para G-1, (543). Isto está de acordo com dados de raios X (544) que revelam que o terminal amino do peptídeo goza de maior liberdade de movimento mesmo no estado cristalino.

A interação de glucagon com estruturas lipídicas já havia sido examinado através de medidas de fluorescência e dicroísmo circular por Elelloch e colaboradores (545, 546). Esses autores encontram que o peptídeo não interagia com membranas de PC, (546), mas que a formação de α -hélice era induzida por micelas de lisofosfatidil colina. Uma forte interação foi também observada neste laboratório entre glucagon e micelas de HDTMA e de docecil sulfato de sódio (547).

Ao mesmo tempo em que eram realizados os experimentos de RPE, Epanand e colaboradores (548) mostraram, através do emprego técnicas de fluorescência e dicroísmo circular que o hormônio era capaz de interagir com um fosfolípido em fase gel, a DMPC, adquirindo conformação em α -hélice sem modificar a temperatura de transição de fase do fosfolípido. Acima de T_c não ocorriam alterações na emissão de fluorescência ou no dicroísmo circular do glucagon.

Estudos posteriores de Epanand e colaboradores (549-551) forneceram mais informações sobre a estrutura do complexo glucagon-DMPC, vindo a ser proposto um modelo em que cerca de 1.800 moléculas do lipídio estariam formando uma micela alongada, nas extremidades da qual se localizariam moléculas do hormônio numa proporção de 57 moléculas de lipídio para uma do hormônio.

A interação G-1 e G-12 e vesículas de DMPC foi examinada em função da temperatura.

Observou-se (Fig. 65) que houve pouca alteração nos espectros de RPE de G-1 em presença de DMPC, em temperaturas, quer abaixo, quer acima da temperatura de transição desse fosfolípido ($T_c=23^\circ\text{C}$). Admitindo-se que a interação entre glucagon e DMPC ocorre abaixo de T_c , em vista dos resultados obtidos com outras técnicas e também com G-12 (ver abaixo) os resultados vem indicar que o amino grupo terminal do peptídeo não está envolvido na maneira acentuada na interação com a membrana ou na alteração conformacional decorrente desta.

A Fig. 66 mostra que G-12, por outro lado é uma molécula capaz de monitorar a interação hormônio-membrana. Os espectros de G-12 apresentaram em presença de DMPC, graus de imobilização inexistente

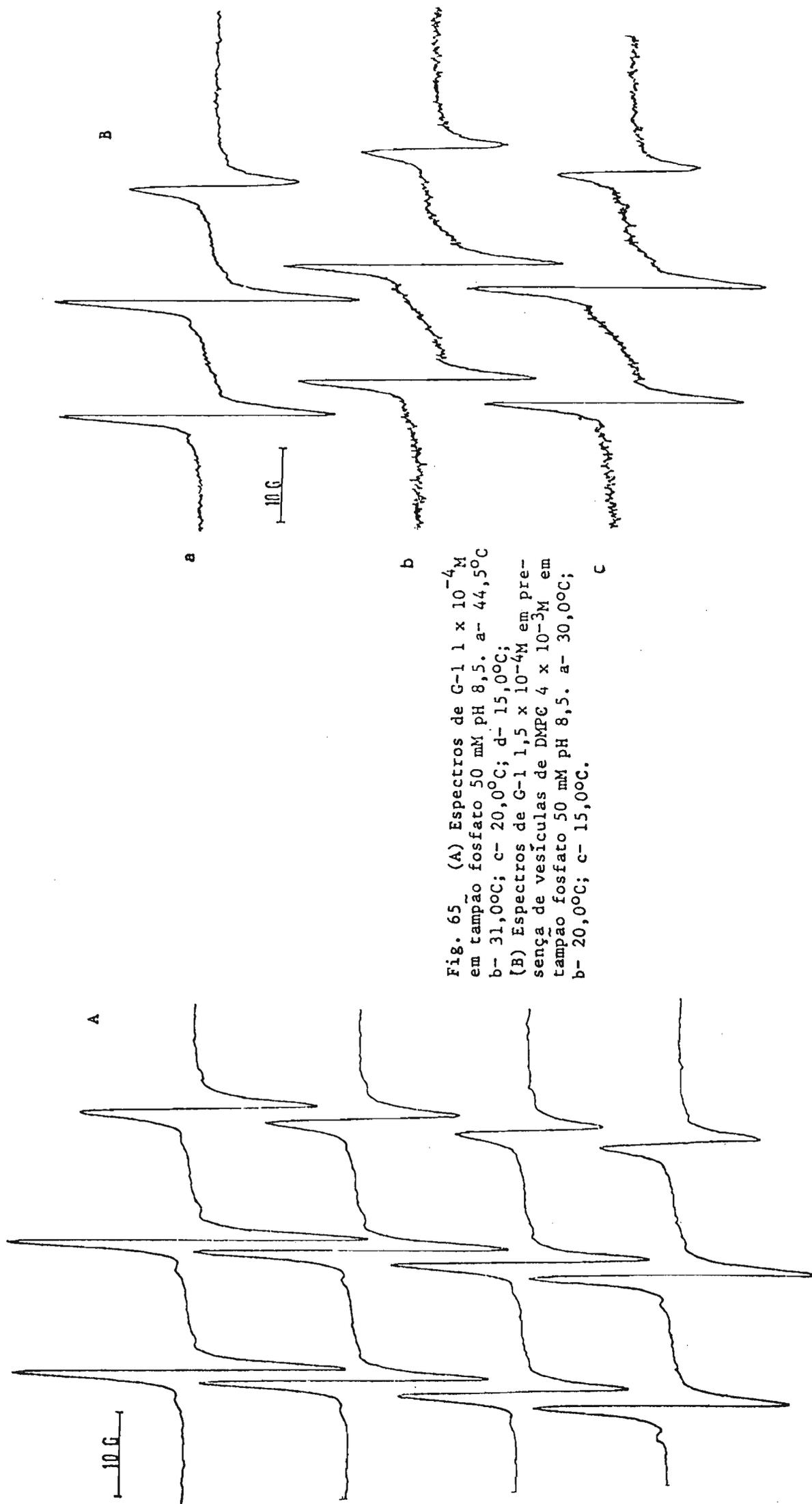


Fig. 65 (A) Espectros de G-1 $1 \times 10^{-4}M$ em tampão fosfato 50 mM pH 8,5. a- 44,5°C b- 31,0°C; c- 20,0°C; d- 15,0°C; (B) Espectros de G-1 $1,5 \times 10^{-4}M$ em presença de vesículas de DMPC $4 \times 10^{-3}M$ em tampão fosfato 50 mM pH 8,5. a- 30,0°C; b- 20,0°C; c- 15,0°C.

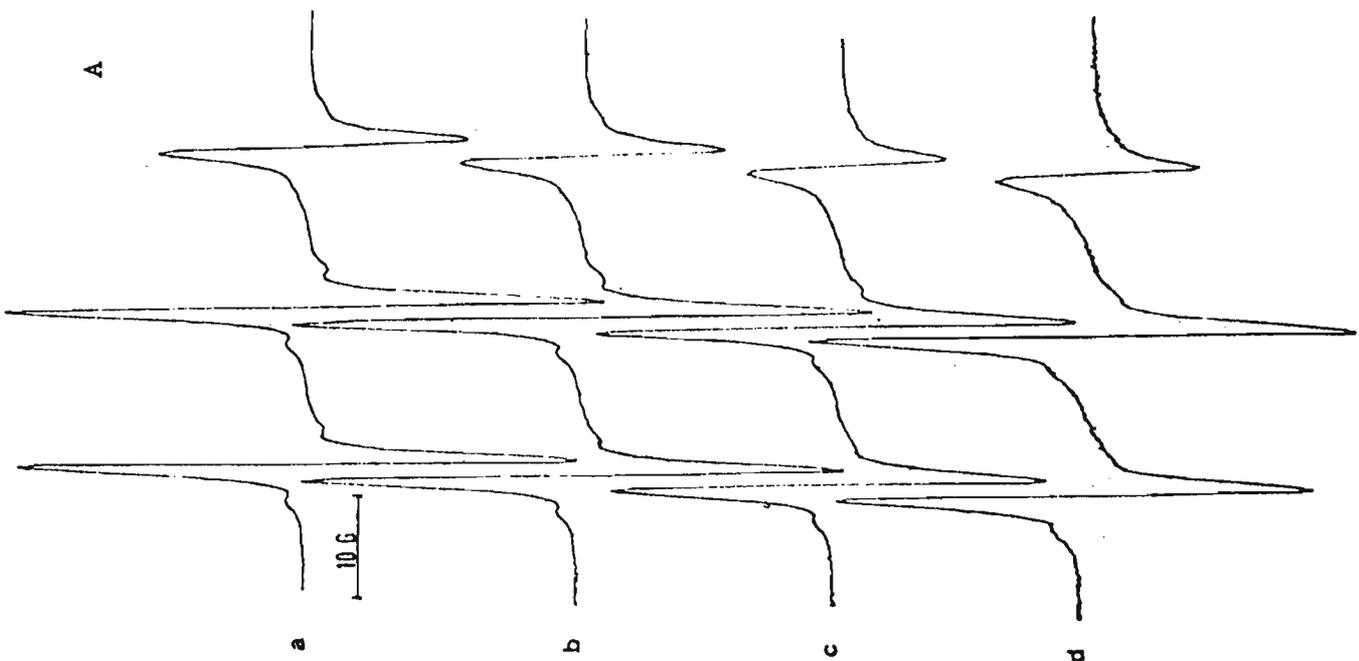
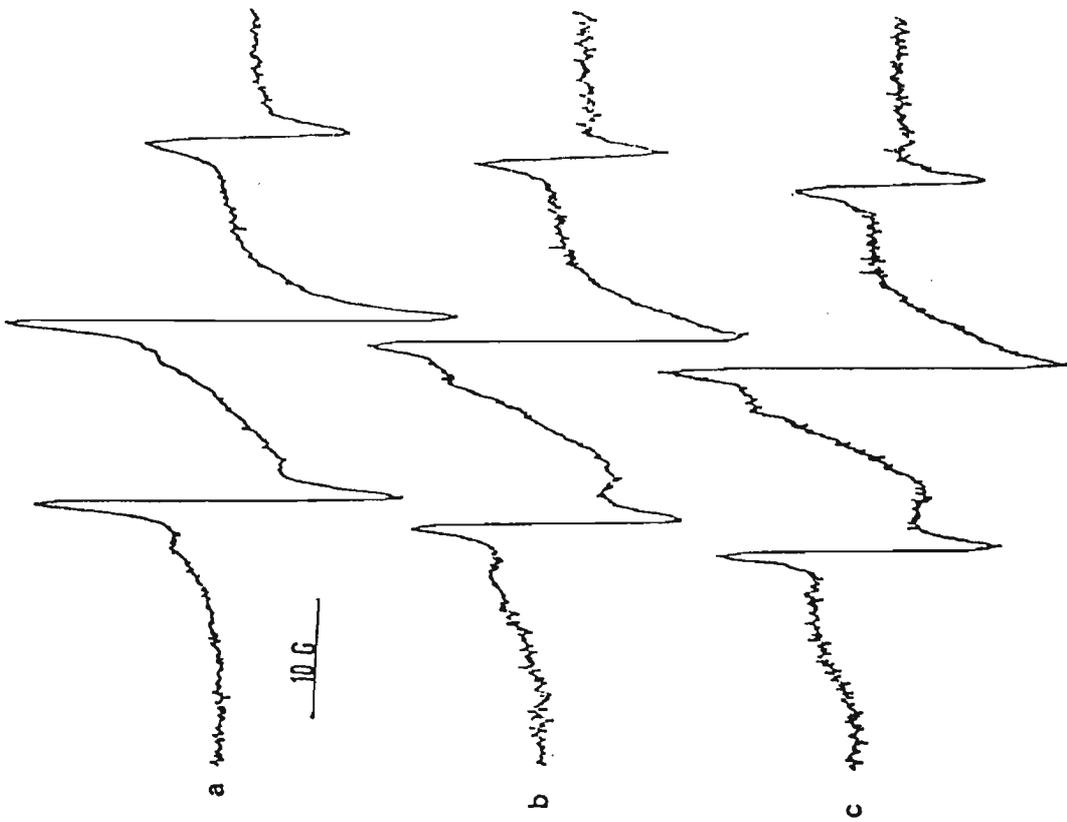


Fig. 66

(A) Espectros de G-12 1×10^{-4} M em tampão fosfato 50 mM pH 8,5 a - 42,0°C, b - 33,0°C, c - 23,0°C e d - 14,0°C

(B) Espectros de G-12 $1,5 \times 10^{-5}$ M em presença de vesículas de DMPC 4×10^{-3} M em tampão fosfato 50 mM pH 8,5 a - 30,0°C; b - 20,0°C; c - 15,0°C.



em solução aquosa à mesma temperatura. Os efeitos de alterações espectrais são visíveis tanto abaixo (mais intensamente) como acima da temperatura de transição do fosfolípido. Isto sugere que, ou a técnica de marcador de spin está sendo capaz de detectar um efeito que as outras técnicas não detectaram (ou seja, a interação acima de T_c), ou a molécula marcada possui um comportamento diferente da nativa.

A possibilidade de verificar o envolvimento ou não de resíduos individuais de amino ácidos em interações, torna o método aqui empregado bastante interessante para o estudo pormenorizado dessas interações.

Quando se empregou DPPC os resultados foram menos evidentes, como verificado também por Epanand e colaboradores (549). Também, quando PC foi usada não se verificou a ocorrência de qualquer alteração nos espectros de G-1 ou G-12. Esses resultados também estão de acordo com os de Schneider e Edelhoich (546).

Um comportamento bastante diferente foi, no entanto, observado quando se examinou a interação entre G-1 e G-12 e membranas de fosfolipídios carregados negativamente. Nas Figs. 67 e 68 encontram-se os espectros de G-1 e G-12, respectivamente, em presença de PA, PS e PI. Verifica-se pelo grau de imobilização refletido nos espectros, que ambos os compostos marcados interagem de maneira intensa com os fosfolipídios, sendo a interação menos intensa aparentemente com a PS. Observa-se que, no caso dos fosfolipí-

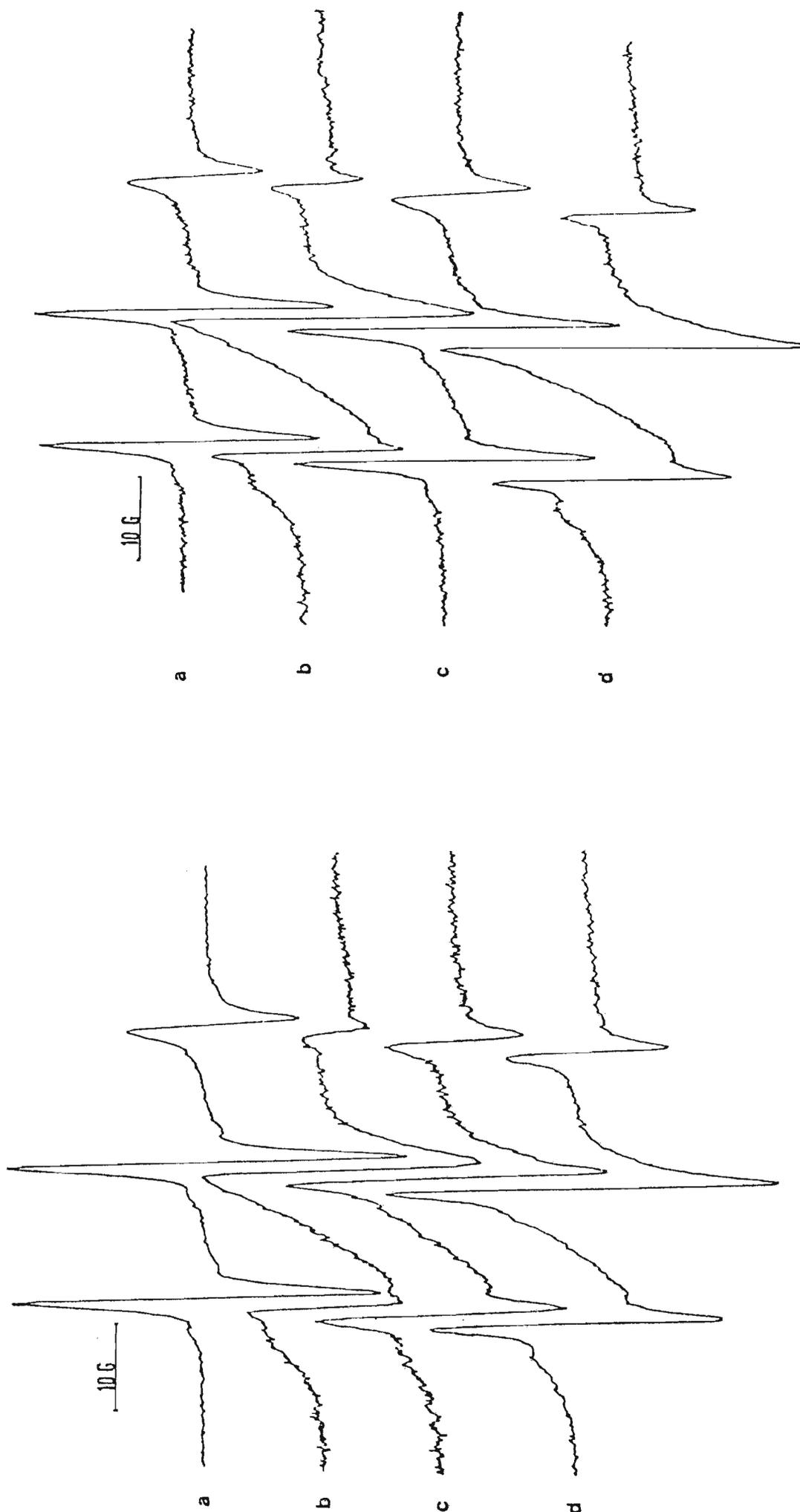


Fig. 67 Espectros de G-1 1×10^{-4} M, em solução; b- em presença de PA $5,0 \times 10^{-3}$ M; c- PS-8, 3×10^{-3} M d- G-1 $7,5 \times 10^{-5}$ M em presença de PI $5,0 \times 10^{-3}$ M. Tampão fosfato 50 mM pH 8,5.

Fig. 68 Espectros de G-12 1×10^{-4} M, a- em solução b - em presença de FA $5,0 \times 10^{-3}$ M; c-PS 5×10^{-3} M; d- G-12 $7,5 \times 10^{-5}$ M em presença de PI 5×10^{-3} M. Tampão fosfato 50. mM pH 8,5.

dios carregados negativamente tanto o amino grupo terminal como a lisina 12 estão envolvidos, na medida em que esse envolvimento é retratado pelas alterações espectrais.

Os estudos da interação entre glucagon e membranas artificiais, da maneira como foram efetuados, empregando-se o hormônio marcado, permitiram obter informações sobre as alterações conformacionais do hormônio em consequências dessa interação.

As alterações espectrais observadas com G-12 em presença de DMPC e com G-1 e G-12 em presença de fosfolipídios carregados negativamente estariam de acordo com a aquisição pelo peptídeo de uma conformação mais empacotada (como a α -hélice) que restringiria a mobili-dade do grupo paramagnético, como visto no estudo do efeito de solventes que sabidamente induzem o glucagon a adotar essa conformação (541,542).

O presente estudo também se apresenta como excelente modelo para o exame de interações lipídio-proteína em membranas, que vem sendo alvo de intensa investigação nos últimos anos. A influência recíproca de ambos os componentes sobre as propriedades estruturais do sistema (ou seja, alterações do peptídeo pelo lipí-dio e alterações da estrutura da membrana pelo peptídeo são aspectos que se deseja examinar e o estudo aci-ma evidencia a viabilidade de estudos dessa natureza.

Finalmente, o efeito mais intenso (ou único) do glucagon sobre membranas em fase gel parece origi-

nar-se do mesmo princípio invocado anteriormente no caso dos hidrocarbonetos cancerígenos (Sec. III.B.4): o glucagon atuaria de certa forma como uma impureza que tem a capacidade de se intercalar entre as cadeias de ácidos graxos do fosfolipídio.

C. Estudos com Membranas Biológicas

1. Biossíntese de Fosfolípido por Sistemas Enzimáticos de Mamíferos*

A maneira mais comum de introduzir marcadores de spin lipídicos em membranas biológicas baseia-se na intercalação física de compostos de natureza lipídica na região de mesma natureza da membrana.

Em vista da heterogeneidade da organização de membranas, os marcadores provavelmente são incapazes de se distribuir por toda a membrana, e mais, de maneira uniforme. Tem sido verificado que marcadores de spin podem ser excluídos de sistemas lipídicos densamente empacotados (ref. 200 e Sec. III.A.1.). A própria estrutura do marcador pode influir no processo de exclusão (Sec. III.A.1.). Em estudos de interação lipídio-proteína foi sugerido que as moléculas repórteres poderiam ter sido excluídas da vizinhança onde ocorre uma forte interação entre lipídios e proteínas (235,256). Por outro lado, vários estudos tem mostrado que em alguns sistemas os espectros RPE de marcadores de spin podem fornecer informações a respeito da natureza e intensidade da ligação de lipídios a proteínas (215,216, 219).

Uma forma atraente para abordar o estudo de marcadores de spin em membranas biológicas se constitui no emprego de compostos marcados especifi

* Refs.259 e 260

camente selecionados para o exame de um componente particular da membrana. Assim, por exemplo, para o estudo da proteína carregadora de ADP, que interage com acil coenzima A, foi preparada uma série de derivados marcados desse composto (552). Uma abordagem análoga foi empregada através da síntese de derivados marcados de acil colina para o estudo do receptor da acetil colina em eletroplaca (255). Preparações de compostos de importância biológica marcados tem sido descritas na literatura e alguns tem sido utilizados no estudo de membranas. Uma série de referências relacionadas a esse assunto é dada na ref. 150.

Uma forma extremamente conveniente de introduzir um marcador de spin lipídico em uma membrana é através da via biossintética. Essa seria a maneira mais garantida de se obter o marcador nos mesmos locais em que o composto nativo provavelmente se localizaria.

A maioria dos trabalhos que descreveram a habilidade de um sistema biológico de utilizar um marcador de spin (em geral, ácido graxo) como substrato para incorporação em membranas se relaciona com microorganismos (234-237). Colbeau e colaboradores (258), obtiveram fosfolipídios marcadores através da incorporação de ácido esteárico marcado em lisofosfatidil colina em presença de fração microsomal ou mitocôndria interna de fígado de rato.

O presente trabalho se constituiu no primeiro relato da biossíntese de um fosfolípido (o

ácido fosfatídico) a partir do ácido esteárico em fração microsomal de fígado de cobaia. A manipulação bioquímica foi efetuada pelo Dr. N.Z. Stanacev e pela sra. L. Stuhne-Sekalec., de acordo com os procedimentos descritos nas refs. 259 e 260.

O material de partida se constitui de sn-glicerol-3-fosfato contendo ^{14}C na posição 2 e de 12-SASL. O meio de incubação escolhido foi aquele que favorece a síntese de ácido fosfatídico.

A Fig. 69 apresenta a cromatografia em coluna de DEAE-celulose num gradiente de acetato de amônio dos líquidos preparados biossinteticamente parcialmente purificados através de passagem por coluna cromatográfica de ácido silícico.

A frações contendo a maior parte da radioatividade (linha cheia) e do sinal de RPE (linha tracejada) foram obtidas em concentrações de acetato de amônio que produzem a liberação de ácido fosfatídico. Amostras do eluato se comportam em cromatografia em camada delgada da mesma forma que um padrão de ácido fosfatídico e a hidrólise alcalina forneceu o glicerol-3-fosfato.

Quando a fração microsomal era inativada por ação de calor, a incorporação de 12-SASL em ácido fosfatídico era menor que 1% daquela obtida enzimaticamente.

A biossíntese de PA foi também efetuada empregando-se o sn-glicerol-3-fosfato tritiado na posição 2. Como ácidos graxos foram empregados o 12-SASL, seu sal sódico e ainda palmitato, esteara

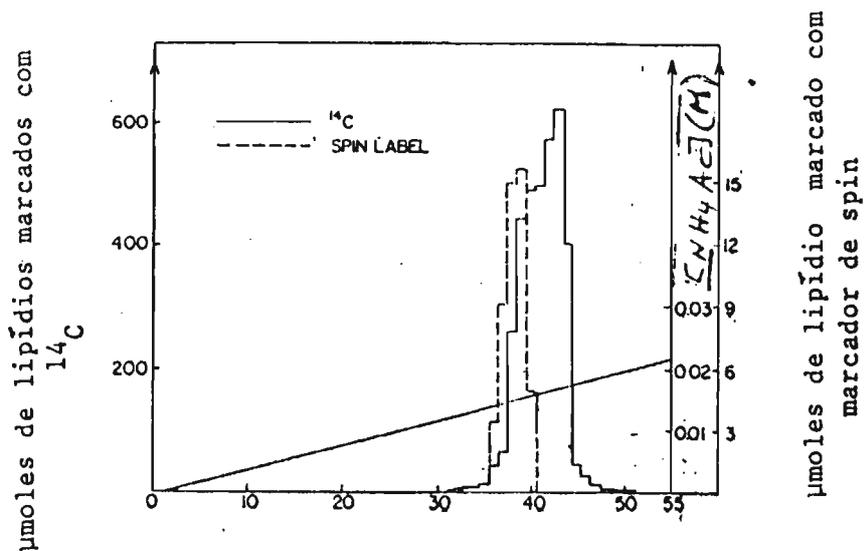


Fig. 69 Cromatografia em coluna de DEAE-celulose de lipídios marcadores com ^{14}C e com marcador de spin, obtidos através de preparação em larga escala.

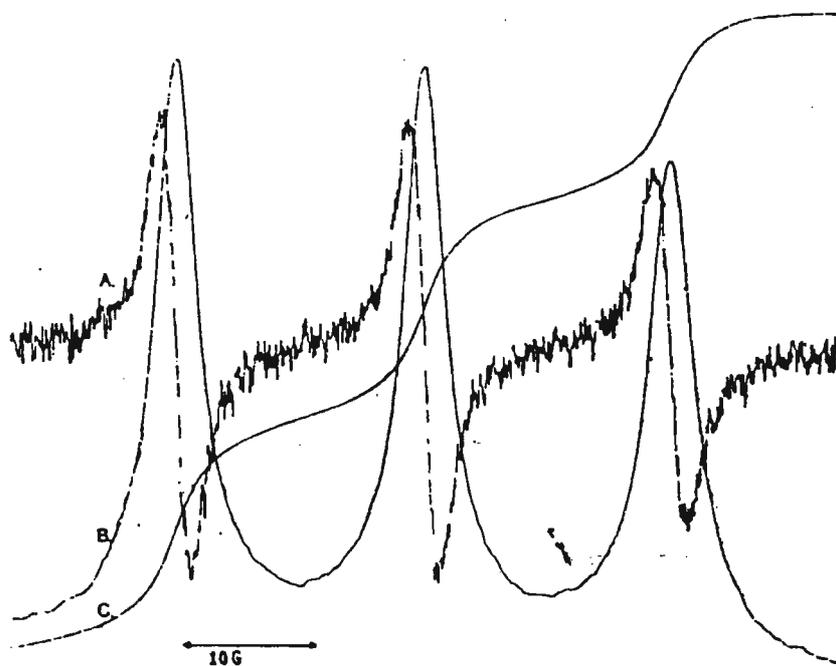


Fig. 70 Espectros de PA contendo marcador de spin obtido biossinteticamente em clorofórmio-metanol 1:1 (v/v) A- primeira derivada; B- espectro de absorção, fornecido pelo computador por integração de A; C- segunda integral de A, calculada pelo computador e que fornece a concentração.

to e oleato de sódio. A tabela XII compara os rendimentos obtidos. Verifica-se que estes são maiores com o sal sódico do 12-SASL do que com o ácido. Isso é provavelmente devido à maior solubilidade do sal em meio aquoso. Por outro lado não há uma linearidade entre os rendimentos e as concentrações iniciais de marcador de spin.

Numa preparação em larga escala, após purificação, a preparação de ácido fosfatídico revelou conter 17% de espécie paramagnética. A concentração de radical nitróxido foi calculada por dupla integração dos espectros (conforme Fig. 70) empregando-se um padrão de concentração conhecida de 12-SASL.

Estudos de degradação do ácido fosfatídico através de veneno de Crotalus adamanteus ao liso derivado vieram indicar que não existe ligação do 12-SASL a uma posição preferencial do glicerol-3-fosfato, obtendo-se quantidades aproximadamente iguais nas posições 1 e 2, ou seja, concentrações aproximadamente iguais de espécie paramagnética foram encontradas na forma de 12-SASL e de ácido lisofosfatídico após a ação do veneno.

O espectro de ácido fosfatídico marcado, obtido biossinteticamente, apresentou, em membranas microsomais, a forma revelada na Fig. 71 (espectro superior). Extratos lipídicos dessas membranas dispersos em meio aquoso, apresentaram o espectro da Fig. 71 (inferior). Também nessa figura constam o espectro de absorção, obtido por integração simples e a du-

TABELA XII

Efeito da concentração de 12-SASL na incorporação de sn-glicerol3-fosfato-2-³H em lipídios catalisada por fração microsomal de fígado de cobaia.

Ácido graxo adicionado	Quantidade (μmol/1,2ml)	Síntese de lipídios tritiados nmol/mg proteína	% em relação ao 12-SASL
12-SASL	1,0	27,1	100
sal sódico do 12-SASL	1,0	39,8	143
sal sódico do 12-SASL	0,5	34,0	125
sal sódico do 12-SASL	0,25	29,3	108
palmitato de sódio	1,0	72,1	266
esterato de sódio	1,0	71,4	263
oleato de sódio	1,0	83,3	307
—	—	14,4	53

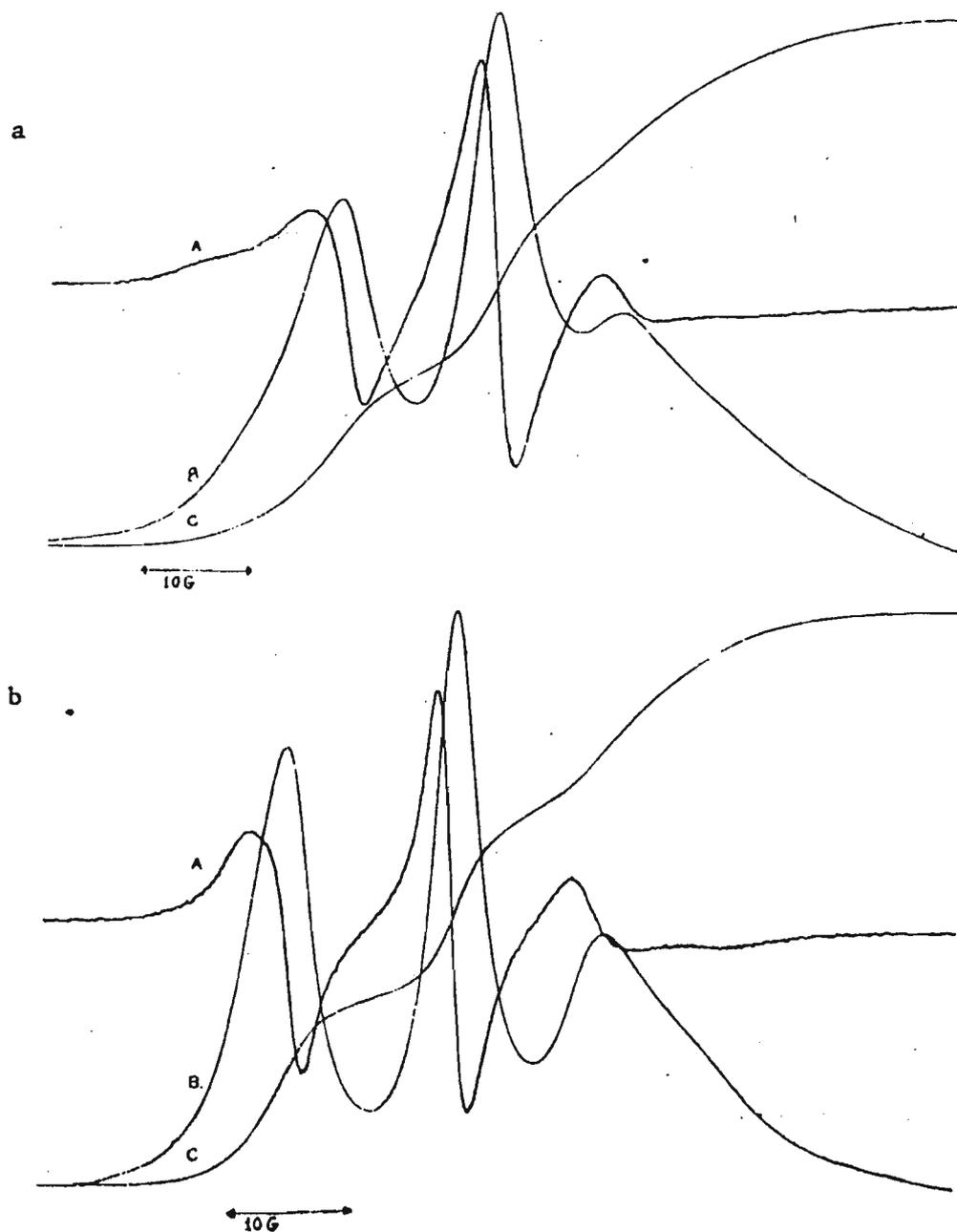


Fig. 71 Espectros de PA, a - em fração microsomal de fígado de cobaia, onde ocorreu a biossíntese do marcador de spin e b - em liposomas preparados com os lipídios extraídos das membranas. A-primeira derivada; B- espectro de absorção; C - segunda integral de A.

pla integral, que forneceu as concentrações das amostras.

As diferenças observadas nas formas das linhas dos dois espectros são do mesmo tipo que as encontradas para comparações semelhantes em outros trabalhos. Essas diferenças devem-se provavelmente à maior imobilização de pelo menos uma fração dos marcadores devida provavelmente à ocorrência de interação lipídio-proteína nas membranas microsomais. De fato o espectro superior da Fig. 71 apresenta indicações de superposição de componentes devido à presença de mais de uma população.

Espectros semelhantes tem sido analisa dos como sendo constituídos pela soma de uma componente que corresponde à população do marcador envolvida em interação direta lipídio-proteína (mais imobilizada) e de outra componente relativa à popu lação de lipídio formador da região da bicamada (mais móvel).

O presente trabalho estabelece que o 12-SASL é um substrato aceitável para a formação do ácido fosfatídico catalisada por fração microsomal de fígado de cobaias. Os resultados demonstram a viabilidade de se introduzir marcadores de spin em membranas biológicas na forma de componentes intrínsecos das mesmas através de via biossintética, e da sua quantificação através da dupla integração dos espectros de RPE e da dosagem concomitante de um elemento radioativo. Marcadores de spin ligados covalentemente a componentes intrínsecos de membra nas (lipídios ou proteínas) se constituem provavelmente

em repórteres mais adequados das características estruturais do sistema. A possibilidade de obtenção de espectros de estruturas membranosas imediatamente após a ocorrência do processo biossintético também representa uma vantagem, pois elimina etapas de manipulação que envolvem a introdução de um marcador extrínseco em membranas.

2. Estudos da Destruição do Paramagnetismo do Radical Nitróxido por Sistemas Enzimáticos de Membranas

Componentes de membranas biológicas possuem muitas vezes a habilidade de reagir com radicais nitróxido causando o desaparecimento do paramagnetismo (262-265). As reações são provavelmente devidas a ação de enzimas ou sistemas enzimáticos, tendo o fenômeno sido inclusive empregado para estudar a cadeia respiratória localizada na membrana de E. coli (264).

A reação em presença de mitocôndrias foi estudada por Quintanilha e Packer (266) que concluíram que nessas organelas a transferência de eletrons é mediada pela ubiquinona.

Em estudos com mitocôndrias e fração microsomal de fígado de cobaia, nós observamos também a habilidade dessas organelas de catalisar a destruição do sinal de RPE do marcador de spin. O exame da cinética de reação em diferentes condições de trabalho permitiu a obtenção de uma série

de informações, tanto a respeito da reação como de caráter estrutural.

Nesse sentido variaram-se os seguintes as pectos:

1º. Marcadores de spin - Foram utilizados o 12-SASL, seu sal sódico, o 5-SASL, o ácido fosfatídico contendo ácido esteárico marcador na posição 12, o estearil coenzima A marcado na posição 12, a SSL, e a TEMPO-colina.

2º. Frações sub-celulares. Comparou-se a habilidade das seguintes frações de reagir com o radical N-O: mitocôncrias, mitocôndrias delipidadas, mitocôndrias internas, matriz mitocondrial, fração microsomal e fração microsomal delipidada.

3º. Forma de fornecimento do marcador
Foram empregadas duas maneiras: ou o marcador era incorporado nas membranas por contacto com um filme depositado nas paredes por evaporação de solvente orgânico, ou era fornecido ao sistema biológico por liposomas de PC aos quais o marcador havia sido incorporado durante a sua preparação.

4º. Foi ainda investigado o efeito da presença de grupamento -SH no meio, na forma de mercapto etanol.

Foi efetuado um estudo de estearil CoA. Verificou-se que o mesmo em solução forma micelas, apresentando um espectro indicativo de forte interação spin-spin. Quando a solução é diluída ocorre o desaparecimento dessa interação (0,47 mM), sugere-

rindo que foi atingida a concentração micelar crítica (cmc) abaixo da qual só existiriam monômeros (ver conteúdo da ref. 527). Esse valor da cmc difere daquele para o composto nativo (553). Verificou-se que esse marcador não se incorpora a liposomas de PC, sendo porém capaz de ligar-se às membranas biológicas. A forma de linhas espectrais sugere que o estearil CoA marcado poderia estar ligado a proteínas das membranas (Fig. 72).

O marcador SSL, por sua vez, dificilmente é incorporado a membranas biológicas. Das várias tentativas efetuadas, apenas uma vez foi obtido um espectro indicativo de alargamento por troca. Espectro semelhante já havia sido observado quando um marcador da mesma natureza foi adicionado à preparação de membranas em solução alcoólica (554). Tal fato foi explicado em termos do marcador formar micelas, em vista de sua reduzida solubilidade tanto em água como na membrana. (Um comportamento semelhante foi também observado quando se tentou incorporar o marcador CSL a partir de um filme em membranas de eritrócitos (150)). O fato foi discutido em termos da incapacidade da membrana de solubilizar mesmo proporções muito baixas de um composto altamente hidrofóbico, em base a um estudo pormenorizado da distribuição heterogênea de CSL em micelas de brometo de hexadecil trimetil amônio (555). Em vista do acima, a destruição do sinal de RPE do SSL foi somente estudada com o marcador incorporado em liposomas de PC.

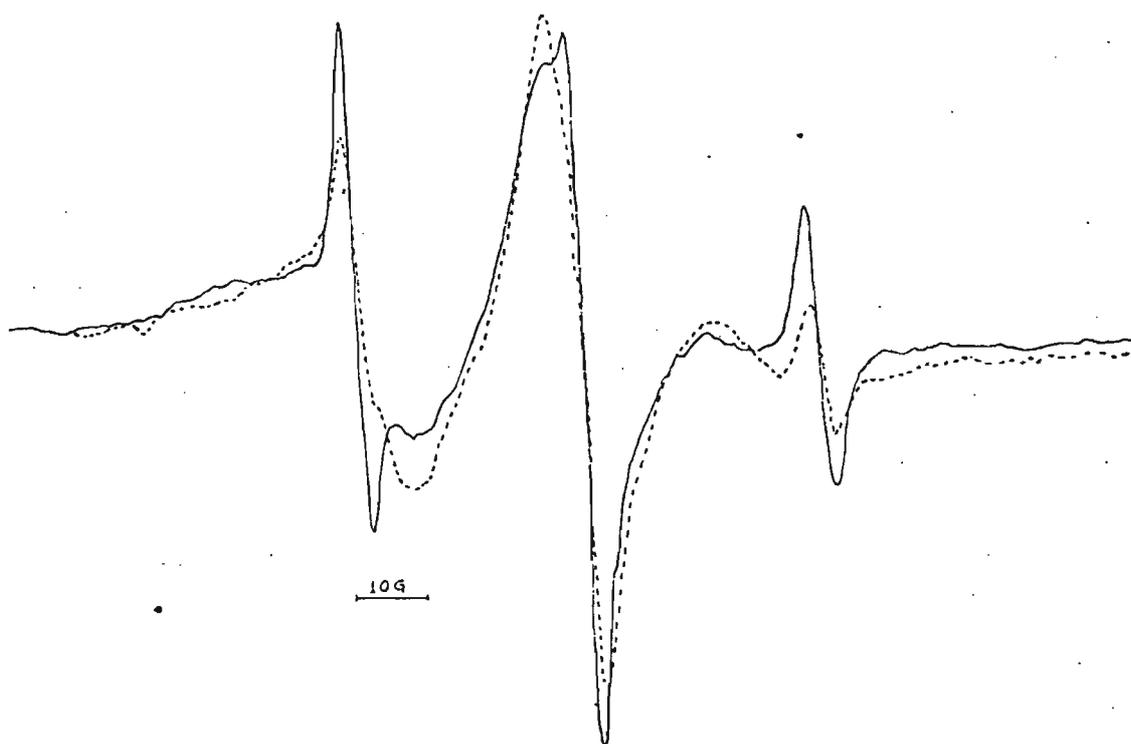


Fig. 72 Espectros de estearil CoA marcado na posição 12 em membranas internas de mitocôndrias de fígado de cobaia em presença de mercaptoetanol. Observam-se elevado grau de imobilização do marcador ligado à membrana, bem como linhas estreitas devidas ao composto na fase aquosa. (—) espectros inicial; (---) espectro após 20 minutos. A meia vida para o desaparecimento do espectro do marcador em água é de 1000 segundos; enquanto que na membrana é de 2800 segundos

TEMPO-colina, o sal sódico de 12-SASLe estearil CoA foram adicionados ao meio aquoso de suspensão das frações sub-celulares.

A Tabela XIII mostra as meias vidas medidas para cinética de desaparecimento do sinal de RPE dos vários marcadores em presença dos vários sistemas estudados. Observa-se que todas as reações são mais rápidas em presença de mercapto etanol. Contudo, não é esse composto, por si, o responsável pela reação (sabe-se que radicais nitróxi do são reduzidos por cisteína em presença de Fe^{3+} (556)), uma vez que o composto é muito ativo sobre marcadores de spin incorporados em liposomas de PC, em ausência das preparações biológicas.

Esses resultados sugeriram que o sítio redutor é de natureza proteica, sendo ativado por mercapto etanol.

A velocidade da reação dependeu da concentração do marcador, aumentando para concentrações menores (para a mesma quantidade de proteína da fração sub-celular, Tabela XIV).

Fração microsomal e mitocôndrias delipidadas reduziram os marcadores com velocidades menores que as organelas intactas (Tabela XV). O mesmo ocorreu com mitocôndrias internas e matriz mitocôndrial (Tabela XV). Esses resultados sugerem que, apesar do sítio de reação ser de natureza proteica, a integridade da membrana é necessária para conferir a essas estruturas o arranjo adequado para funcionamento mais eficiente, ou seja, a conformação

TABELA XIII

Meias vidas ($t_{1/2}$, em segundos) para a queda da altura da linha de campo central (h_0) nos espectros de marcadores de spin nos sistemas estudados.^a

Marcador de spin	Forma de fornecimento do marcador	(Marcador) M x 10 ⁵	Mitocôndrias		Fração microsomal		Fração microsomal		$t_{1/2}$
			+mercapto- etanol	-mercapto- etanol	+mercapto- etanol	-mercapto- etanol	+mercapto- etanol	-mercapto- etanol	
PA marcado	liposomas de PC	2,0	2500,1400 ^c	10000,5400	3700,1900	5900			
	filme	2,0	6200,1250	— ^d	3450	—			
12-SASL	filme	5,0							1540,670
	liposomas de PC	2,5	3300,2500	7800	2100,4600				
	filme	2,5	2100	4600	6600	—			
sal sódico do 12-SASL	solução	3,3	4600,1200		> 20000				
estearil CoA marcado ^b	solução	3,0	3100,1700	8400	—,7450	—			—,775
5-SASL	filme	1,8	2100,900	3500	1600	9300			990,580
TEMPO-colina	solução	12	110	2100	550	2900			
SSL	liposomas de PC	4,0	940	4800	830	4350			

a - foram empregadas membranas (preparadas pelo Dr. N.Z. Stanacev e pela Sra. L. Stuhne-Sekalec de acordo com a ref. 557) contendo 4 mg proteína/ml; b - foi medida a linha devida a marcador na membrana; c - dois números, separados por uma vírgula, representam os dois valores de meias vidas para os casos em que ocorreu quebra no gráfico da variação de h_0 em relação ao tempo; d - um traço significa que a velocidade de queda do sinal foi praticamente nula

TABELA XIV

Efeito da concentração de marcador sobre a meia vida ($t_{1/2}$, em segundos) para a queda da altura da linha de campo central (h_0) nos espectros de marcadores de spin em mitocôndrias em presença de mercaptoetanol.^a

Marcador de spin	Forma de fornecimento do marcador	(Marcador) M x 10 ⁵	$t_{1/2}$
12-SASL	liposomas de PC	10	-10000
	liposomas de PC	5,0	4000,2100 ^c
	liposomas de PC	2,5	3300,2500
	liposomas de PC	1,0	1000,870
sal sódico de 12-SASL	solução	6,6	6350,2700
	solução	3,3	4600,1200
	solução	1,7	2500,1100
estearil CoA marcado ^b	solução	3,3	5400,1800
	solução	3,0	3500,1500
	solução	1,5	2700,1300
	solução	1,5	^d —,880

a, b, c e d são os mesmos que na Tabela XIII.

Meias vidas ($t_{1/2}$, em segundos) para a queda da altura da linha de campo central (h_0) nos espectros de marcadores de spin nos sistemas estudados^a.

Marcador de spin	Forma de fornecimento do marcador	M x 10 ⁵	$t_{1/2}$			
			Mitocôndrias lipídicas +mercaptoetanól	Mitocôndrias internas +mercaptoetanól	Matriz mitocondrial +mercaptoetanól	-mercaptoetanól
PA marcado	liposomas de PC	2,0	7100			
	filme	2,0	5500			
	liposomas de PC	1,0	2600			
estearil CoA marcado ^b	solução	5,0	— ^d	8700		
	solução	2,5	2800	>10000	6400, 3300 ^c	—, 5100

a, b, c e d - são os mesmos que na Tabela XIII

mais ativa das proteínas é obtida em presença dos lipídios e provavelmente através de interações com estes. O fato de se obter alguma reatividade em presença de matriz mitocondrial sugere que várias atividades enzimáticas devem ser responsáveis pela atividade máxima observada em presença de organelas intactas.

As meias vidas para a reação dadas nas Tabelas XIII-XV parecem depender da posição do marcador na cadeia do ácido esteárico. Assim, os compostos possuindo o anel oxazolidínico no carbono 12 da cadeia apresentaram meias vidas mais longas do que o 5-SASL. O valor de $t_{1/2}$ para SSL, Tabela XIII, é para uma concentração do marcador maior do que a empregada no experimento com 5-SASL. Considerando-se a tendência manifestada na Tabela XIV esperar-se-ia um valor de $t_{1/2}$ mais baixo para concentrações comparáveis às dos outros marcadores na Tabela XIII. Finalmente é patente que a redução da TEMPO-colina se dá numa velocidade muito maior do que a dos outros marcadores. O estearil CoA apresenta picos devidos a marcador em solução (Fig. 72). Estes também desaparecem rapidamente. Esses resultados sugerem que o sítio de redução deve encontrar-se próximo à superfície da membrana.

Nota-se também que a velocidade independente de se o marcador se encontra na membrana biológicas ou em liposomas (Tabela XIII). O provável mecanismo para essa observação é que ocorre transferência de marcador do liposoma para a membrana biológica mediada pela fração de marcador dissolvida em água (558) (devido à solubilidade finita do

marcador nesse meio) e que essa etapa é mais rápida do que a redução.

A transferência através do meio aquoso talvez não ocorra no caso do ácido fosfatídico, uma vez que a solubilidade de fosfolipídios em água é muito baixa. É possível que o grupamento N-O e o anel oxazolidínico aumentem essa solubilidade, mas provavelmente, o efeito não seria suficiente para produzir concentrações comparáveis com as dos outros compostos (5- e 12-SASL, o sal sódico de 12-SASL e 12-SASL-CoA). Nesse caso a transferência se daria provavelmente através do contacto (colisão) entre as duas membranas.

É possível ainda que a redução seja mediada por difusão lateral dos componentes que se encontram na membrana (253) e isso explica em parte a considerável diferença entre TEMPO-colina e os marcadores solúveis na membrana.

Convém notar que a fusão entre liposomas e as membranas biológicas não deveria ocorrer nas condições experimentais. Um resultado que sugere que a fusão realmente não ocorre, pode ser visto na forma das linhas espectrais obtidas quando se misturam os liposomas com as frações sub-celulares. A forma das linhas não se altera permanecendo aquela característica de liposomas (e diferente da obtida para os marcadores nas membranas biológicas, Fig. 71)

Como se vê na Tabela XIII, a velocidade da reação foi maior em presença de mitocôndrias do que em presença de fração microsomal (para a mesma

quantidade de proteína). Também, na maioria dos casos, houve uma quebra no gráfico do logaritmo da altura das linhas espectrais em função do tempo no caso de mitocôndrias, na presença de -SH. Este efeito quase nunca ocorre com fração microsomal. É possível que a quebra, com aumento posterior da velocidade (em geral) se devesse à necessidade de um tempo de espera para ativação do sistema redutor. Talvez alguma alteração estrutural da membrana ocorra, expondo mais o sítio de reação.

As diferenças entre mitocôndrias e microsomas sugeriram que uma possível transferência de marcador entre as organelas poderia ser detetada através do estudo da cinética de redução.

A tabela XIII mostra que quando marcadores de spin são intercalados em membranas microsomais e, a seguir, estas são expostas a mitocôndrias a redução ocorre com velocidade bem maior do que na presença de apenas um dos sistemas. Observa-se ainda uma quebra no gráfico de $\log h$ versus tempo, como usualmente é observado com mitocôndrias. Os resultados sugerem que também entre organelas é possível efetuar a transferência de marcadores de spin.

Recentemente, Stuhne-Sekalec e Stanacev (559,560) estudaram esse processo através de experimentos análogos. Iida e colaboradores (561) também estudaram a transferência de marcadores de spin entre diferentes organelas.

Membranas biológicas ou células intactas, em várias oportunidades revelaram a propriedade de interagir com o grupamento nítróido numa reação provavelmente de redução desse grupo com perda do para

magnetismo (262-266). Esse processo pode às vezes se constituir num inconveniente, uma vez que, no caso de velocidades muito altas, a obtenção de espectros para informações de caráter estrutural pode ser prejudicada.

O estudo da cinética de tais reações e dos fatores que influem essa cinética pode contribuir para o estabelecimento de condições em que essas dificuldades sejam superadas. Ao mesmo tempo, variando-se uma série de aspectos das condições de trabalho, torna-se possível uma análise das características dos sítios responsáveis pela reatividade das membranas, tais como, natureza química, localização e necessidade da presença dos lipídios para conferir às proteínas uma conformação mais ativa.

IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O capítulo I tratou das bases do Método de Marcador de Spin, bem como de algumas de suas aplicações no estudo de propriedades dinâmicas de membranas.

O capítulo III apresentou trabalhos realizados com participação da autora dentro da área.

Procurar-se-á aqui efetuar uma avaliação crítica do método e comparar os resultados obtidos através dele com aqueles obtidos por outras técnicas, apresentando as vantagens e limitações encontradas nos estudos com marcadores de spin.

Um dos aspectos do trabalho com marcadores de spin que deve ser analisado é o da localização dos mesmos em membranas.

Em membranas artificiais de um componente apenas esperar-se-ia uma distribuição homogênea de um marcador de spin. O único problema a ser considerado é o da localização em termos das regiões polares e apolares da membrana. Por exemplo, espera-se que o grupamento carboxila de ácidos graxos se localize na região polar da membrana, próximo da interface membrana-água.

Um problema diverso surge quando os marcadores não são capazes de se intercalar no sistema em estudo, o que em geral ocorre devido a um empacotamento denso das moléculas. O fenômeno se manifesta, como observado com lisofosfatidil colina anidra (Sec. III. B.1.b) e com os monos e diglicerídios saturados (Secs. III B.1.c e III. B.1.d). A exclusão de marcadores pode também ocorrer de forma seletiva, determinada pela sua

estrutura molecular, como no caso de 12-SASL na liso-fosfatidil colina anidra (Sec. III. B.1.b.), onde o anel oxazolidínico constitui uma perturbação muito grande na posição 12, ao passo que o 5-SASL não é excluído do sistema.

Quando um sistema artificial possui mais de um componente, surge outro problema: a possibilidade da localização preferencial de marcadores em um ambiente formado por apenas um ou alguns dos componentes. Algumas misturas lipídicas apresentam distribuição heterogênea, possibilitando a localização seletiva de marcadores. Tal fenômeno foi descrito (562,563). Esse é um problema sério para o estudo de membranas biológicas, onde se sabe que o arranjo molecular não é homogêneo. Estudos com marcadores de spin podem revelar as propriedades apenas de parte das bio-membranas.

Em alguns casos foi sugerido que os marcadores de spin poderiam não estar localizados em regiões de mais denso empacotamento (235,256) (a de interação lipídio-proteína). Por outro lado, em vários sistemas, a presença de uma população de marcador mais imobilizada foi interpretada como correspondendo a lipídio interagindo diretamente com proteína (215,216, 219).

Um outro tipo de problema reside na dificuldade de incorporar marcadores de natureza muito hidrofóbica (como CSL e o SSL) em membranas biológicas. Em geral, obtem-se um espectro indicativo de um elevado grau de interação por troca (150,554) sugerindo solubilização limitada do marcador pela membrana. A solu-

bilização do CSL por micelas de brometo de hexadecil trimetil amônio foi estudada por Schreier e colaboradores (555) e também neste caso o processo apresenta limitações, provavelmente devido ao caráter hidrofóbico do marcador.

Um outro aspecto do trabalho com marcadores de spin que é sujeito a críticas é o da perturbação causada pelo próprio marcador, especialmente no caso em que o grupamento volumoso do anel oxazolidínico aumenta a área ocupada pela molécula como é o caso dos ácidos graxos. Tem sido sugerido que o marcador poderia estar relatando as propriedades de um ambiente criado por ele mesmo. Uma boa maneira de minimizar esse tipo de problema é o trabalho com uma variedade de marcadores, a fim de confirmar as conclusões obtidas.

Uma variedade de técnicas físicas tem sido empregada no estudo de propriedades dinâmicas e estruturais de membranas. Entre elas, a ressonância magnética nuclear (de proton, deutério, carbono 13, fósforo 31, fluor 19, refs 89-95). Uma desvantagem da ressonância magnética nuclear (RMN) é a baixa sensibilidade. Enquanto concentrações de radical da ordem de $10^{-5}M$ são suficientes para detetar o sinal de RPE, concentrações muito mais elevadas são necessárias para experimentos de RMN. A principal vantagem de RMN é a de se poder estudar os componentes naturais de membranas sem introduzir a perturbação de um marcador.

A análise espectral, contudo apresenta dificuldades diversas para os diferentes núcleos. A interpretação dos espectros de proton de membranas é contro

vertida (564,565). Medidas de tempos de relaxação spin retículo de ^{13}C dão informações sobre movimentos rápidos em membranas, mas os espectros não são indicativos do grau de ordem. Parâmetros de ordem são obtidos diretamente dos espectros de ^2H , (91,94), mas é difícil a obtenção de dados sobre a velocidade de movimentos. Os espectros de ^{31}P são sensíveis ao movimento e à ordem moleculares (385). A análise dos espectros de ^{19}F apresenta as mesmas dificuldades encontradas com ^1H , agravadas pelo fato de o fluor não ser necessariamente um bom substituto para o hidrogênio. Contudo, a maior parte dos experimentos de RMN em membranas pode ser interpretada em termos da teoria para movimentos rápidos ($\tau < 10^{-6}$ para ^2H), o que representa uma vantagem em relação a RPE, onde frequentemente é necessário uma teoria mais complexa para movimentos lentos. Por outro lado, a análise de valores de tempos de relaxação spin retículo em sistemas ordenados já atingiu um estágio mais avançado em RPE do que em RMN de ^2H e ^{13}C . Deve-se lembrar ainda a sensibilidade dos espectros de RPE à variações de frequências e da polaridade do meio.

A espectroscopia de fluorescência é ainda mais sensível do que a de RPE, mas apresenta em muitos experimentos a mesma desvantagem que o método de marcador de spin: é o emprego de uma molécula repórter estranha ao sistema. A análise de experimentos de despolarização de fluorescência é geralmente feita em termos de uma teoria desenvolvida para movimento isotrópico em meio não ordenado (566). Isto pode levar a grandes erros na avaliação de tempos de correlação ou viscosidade devido à forma anisotrópica das moléculas e à existência de ordem na membrana.

A técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência tem sido usada para estudar processos de difusão lateral e pode também ser aplicada para difusão rotacional. A recuperação de fluorescência após foto-destruição se constitui em uma excelente técnica para o estudo da difusão lateral de componentes de membranas (55).

A espectroscopia Raman é sensível à isomerização *trans-gauche* e ao empacotamento das cadeias (84-86) mas a interpretação dos dados em termos de um parâmetro de ordem ainda não foi efetuada. A espectroscopia de infra-vermelho também vem sendo aplicada no estudo de membranas (82,83), sendo de grande utilidade no estudo de sistemas altamente ordenados, que apresentam, nesses estudos, linhas estreitas.

Difração de raios X pode ser usada para medir distâncias como a espessura da bicamada ou a separação entre as cadeias de ácidos graxos (73,74). Difração de neutrons pode ser usada para localizar átomo de deutério de compostos seletivamente deutériados na bicamada (87,88). Contudo, nenhum dos dois métodos fornece informação a respeito da dinâmica molecular, diminuindo a resolução de ambos com o aumento da velocidade de movimento.

Um dos principais pontos de desacordo entre os resultados de RPE e de RMN de ^2H se situa no comportamento diferente do parâmetro de ordem ao longo da cadeia (93). É possível que a perturbação devida ao anel oxazolidínico seja em parte responsável pela discrepância. Deve-se, no entanto, levar em conta

ainda que as escalas de tempo dos dois experimentos são diferentes. Para o RPE uma distribuição que tem uma duração de $<10^{-7}$ s aparece como estática, enquanto que para o RMN de ^2H essa duração tem que ser $>10^{-5}$ s. Assim, movimentos com tempos de correlação intermediários entre esses valores darão origem a diferentes parâmetros de ordem para RPE e para deutério. De qualquer forma, não se encontra presentemente esclarecida a diferença experimental obtida entre os resultados de RPE e RMN de ^2H . O trabalho recente de Polnaszek e Mason discute as possíveis causas desse efeito (566).

Em síntese, o método de marcador de spin apresenta limitações, tais como: 1º - introdução de uma molécula não intrínseca ao sistema; 2º - a possível perturbação causada por essa molécula; 3º - a possível localização heterogênea do marcador no plano da membrana; 4º - a possível destruição do marcador em sistemas biológicos. Por outro lado, o método oferece uma série de vantagens: 1º alta sensibilidade, sendo necessárias baixas concentrações do sistema e da molécula repórter; 2º a obtenção de espectros pode ser efetuada em tempos curtos, o que facilita a parte experimental; 3º os espectros são extremamente sensíveis ao grau de orientação e à mobilidade dos marcadores de spin; 4º as teorias para interpretação desses espectros se encontram em nível bastante desenvolvida, permitindo a análise dos mesmos em um nível bastante satisfatório; 5º a reatividade química de marcadores de spin também pode ser utilizada para obter informações relevantes a respeito dos sistemas estudados.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - H.M. McConnell e B.G. McFarland, *Quart.Rev.Biophys.* 3, 91 (1970).
- 2 - O.H. Griffith e A.S. Waggoner, *Accounts Chem.Res.* 2, 17 (1969).
- 3 - I.C.P. Smith, in "Biological Applications of Electron Spin Resonance" (H.M. Swartz, J.R. Bolton e D.C. Borg, eds.), pp. 483-539, Wiley (Interscience), N.Iorque, (1972).
- 4 - G.I. Likhtenshtein, "Spin Labeling Methods in Molecular Biology", Wiley, N.Iorque (1976).
- 5 - I.C.P. Smith, S. Schreier-Muccillo e D. Marsh, in "Free Radicals in Biology" (W.A.Pryor, ed.), pp. 148-197, Academic Press, N.Iorque (1976).
- 6 - L.J. Berliner, editor, "Spin Labeling Theory and Applications", Academic Press, N.Iorque (1976).
- 7 - S.Ohnishi e H.M. McConnell, *J.Amer.Chem.Soc.* 87, 2293 (1965).
- 8 - E. Gorter e F. Grendel, *J.Exp.Med.* 41, 439 (1925).
- 9 - J.D. Robertson, *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 94, 339 (1961).
- 10 - J.F. Danielli e H. Davson, *J.Cell Comp.Physiol.* 5, 495 (1935).
- 11 - W.D. Stein e J.F. Danielli, *Disc.Faraday Soc.* 21, 238 (1956).
- 12 - T.A. Lucy, *J.Theoret.Biol.* 7, 360 (1964).

- 13 - A.A. Benson, J.Amer.Oil Chem.Soc. 43, 265 (1966).
- 14 - G. Vanderkooi e D.E. Green, Proc.Nat.Acad.Sci, U.S.A. 66, 615 (1970).
- 15 - J.Steim, M.E. Tourtellotte, J.C. Reinert, R.D.McElhaney e L.D. Rader, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 63, 104 (1969).
- 16 - M.H.F. Wilkins, A.E. Blaurock e D.M. Engelman, Nature 230, 72 (1971).
- 17 - M. Esfahafani, A.R. Limbrick, S. Knutton, T. Oka e S.J. Wakil, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 68, 3180 (1971).
- 18 - S.J. Singer e G.L. Nicolson, Science 175, 720 (1972).
- 19 - D.E. Green e D.H. McLennan, Bioscience 17, 213 (1969).
- 20 - G. Guidotti, Ann.Rev.Biochem. 41, 731 (1972).
- 21 - G. Vanderkooi, Ann.N.Y. Acad. Sci. 195, 6 (1972).
- 22 - A. Martonosi e R.A. Halprin, Arch.Biochem.Biophys. 144, 66 (1971).
- 23 - J.K. Blaisie e C.R. Worthington, J.Mol.Biol. 39, 417 (1969).
- 24 - M.S. Bretscher, Nature New Biol. 231, 229 (1971).
- 25 - J.E. Rothman e J.Lenard, Science 195, 743 (1977).
- 26 - J.P. Segrest, I. Kahane, R.L. Jackson e V.T. Marchesi, Arch.Biochem.Biophys. 155, 167 (1973).
- 27 - R.C. Hughes, Essays in Biochem. 11, 1 (1975).
- 28 - M.S. Bretscher, J.Mol.Biol. 71, 523 (1972).

- 29 - M.C. Phillips, B.D. Ladbroke e D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* 193, 35 (1970).
- 30 - E.J. Shimshick e H.M. McConnell, *Biochemistry* 12, 2351 (1973).
- 31 - G.L. Nicolson, *Nature New Biol.* 239, 193 (1972).
- 32 - F. Loor, *Eur. J. Immunol.* 3, 112 (1973).
- 33 - F. Wunderlich, V. Speth, W. Batz e H. Kleinig, *Biochim. Biophys. Acta* 298, 39 (1973).
- 34 - A.J. Verkleij, P.H.J. Ververgaert, L.L.M. van Deenen e P.F. Elbers, *Biochim. Biophys. Acta* 288, 326-332 (1972).
- 35 - P. Pinto da Silva, *J. Cell. Biol.* 53, 777 (1972).
- 36 - V.T. Marchesi, T.W. Tillack, R.L. Jackson, J.P. Segrest e R.E. Scott. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1445 (1972).
- 37 - J.A. McIntyre, M.J. Karnovsky e N.B. Gilula, *Nature New Biol.* 245, 147 (1973).
- 38 - W. Kleeman e H.M. McConnell, *Biochim. Biophys. Acta* 419, 206 (1976).
- 39 - P.C. Jost e O.H. Griffith, *Biomol. Struct. Funct. (Symp.)* pp. 25-54 (1978).
- 40 - C. Montecucco, G. Smith, G.B. Warren e J.C. Metcalfe, *Biochim. Biophys. Acta Library*, V.14: Structure and Function of Energy-Transducing Membranes (1977).
- 41 - J.C. Owicki, M.W. Springgate e H.M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1616 (1978).

- 42 - B.M. Moore, B.R. Lentz e G. Meissner, *Biochemistry* 17, 5248 (1978).
- 43 - G.A. Jamieson e T.J. Greenwalt, eds. "Red Cell Membrane", Lippincott, Philadelphia (1969).
- 44 - D.A. Thorley-Lawson e N.M. Green, *Eur.J.Biochem.* 40, 403 (1973).
- 45 - P.K. Brown, *Nature New Biol.* 236, 35 (1972).
- 46 - S. Razin, *Ann.Rev.Microbiol.* 23, 317 (1969).
- 47 - J.E. Cronan e E.P. Gelmann, *Bacteriol.Revs.* 39, 232 (1975).
- 48 - K. Hunter e A.H. Rose, *in* "The Yeast" (A.H. Rose e J.S. Harrison, eds.). V. 2, pp. 211-270, Academic Press, London (1971).
- 49 - D. Osterhelt e W. Stockenius, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 70, 2853 (1973).
- 50 - S. Razin, *Biochim.Biophys.Acta* 265, 241 (1972).
- 51 - P. Gazzotti, H.G. Bocke S. Fleischer, *J.Biol. Chem.* 250, 5782 (1975).
- 52 - L.D. Frye e M. Edidin, *J.Cell Sci.* 7, 319 (1970).
- 53 - C.J. Scandella, P. Devaux e H.M. McConnell, *Proc.Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2056 (1972).
- 54 - E. Sackmann, H. Träuble, H.J. Galla e P. Overath, *Biochemistry* 12, 5360 (1973).
- 55 - D.E. Wolf, J. Schlessinger, E.L. Elson, W.W. Webb, R. Blumenthal e P. Henkert, *Biochemistry* 16, 3476 (1977).
- 56 - M.G. McNamee e H.M. McConnell, *Biochemistry* 12, 2951 (1973).

- 57 - B. Bloj e D.B. Zilversmit, *Biochemistry* 15, 1277 (1976).
- 58 - J. Lenard e J.E. Rothman, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 73, 391 (1976).
- 59 - V. Luzzati, *in* "Biological Membranes" (D. Chapman, ed.) pp. 71-123, Academic Press, N.Iorque (1968).
- 60 - J.A. Lucy, *Nature* 227, 815 (1970).
- 61 - R.M. Williams e D. Chapman, *in* "Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids" (R.T. Holman, ed.) pp. 1-79, Pergamon Press, N.Iorque (1970).
- 62 - B.D. Ladbroke, R.M. Williams e D.Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* 150, 333 (1968).
- 63 - G.B. Birrell e O.H. Griffith, *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 455 (1976).
- 64 - D. Chapman e S. Chen, *Chem.Phys.Lipids* 8, 318 (1972).
- 65 - R.P. Rand. D. Chapman e K. Larsson, *Biophys. J.* 15, 1117 (1975).
- 66 - S.H.W. Wu e H.M. McConnell, *Biochemistry* 14, 847 (1974).
- 67 - W. Kleeman, C.W.M. Grant e H.M.McConnell, *J.Supramol. Struct.* 2, 609 (1974).
- 68 - E. Luna e H.M.McConnell, *Biochim.Biophys.Acta* 466, 381 (1977).
- 69 - T. Ito e S. Ohnishi, *Biochim.Biophys.Acta* 352, 29 (1974).
- 70 - S. Oshnishi e T. Ito, *Biochemistry* 13, 881 (1974).
- 71 - T. Ito, S.Ohnishi, M. Ishinaga e M.Kito, *Biochemistry* 14, 3063 (1975).

- 72 - H.J. Galla e E. Sackmann, *Biochim.Biophys. Acta* 401, 509 (1975).
- 73 - G.G. Shipley, *in* "Biological Membranes" (D. Chapman e D.F.H. Wallach, eds.) pp. 1-85, Academic Press, N.Iorque (1973).
- 74 - M.H.F. Wilkins, *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 195, 291 (1972).
- 75 - D. Chapman, R.M.Williams e B.D. Ladbroke, *Chem.Phys. Lipids* 1, 445 (1967).
- 76 - W. Hartmann, H.J. Galla e E. Sackmann, *FEBS Lett.* 78, 169 (1977).
- 77 - A. Watts, K. Harlos, W. Maschke e D. Marsh, *Biochim. Biophys.Acta* 510, 63 (1978).
- 78 - A.Azzi, *Quart.Rev.Biophys.* 8, 237 (1975).
- 79 - M. Shinitzky e Y. Barenholz, *Biochim.Biophys.Acta* 515, 367 (1978).
- 80 - J.C. Selser, Y.Yeh e R.J. Baskin, *Biophys.J.* 16, 337 (1976).
- 81 - N. Ostrowski e C. Hessebezot, *Chem.Phys.Lett.* 52, 141 (1977).
- 82 - D.G. Cameron e H.H. Mantsch, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 83, 886 (1978).
- 83 - S.Sunder, D. Cameron, H.H. Mantsch e H.J. Bernstein, *Can. J.Biochem.* 56, 2121 (1978).
- 84 - R.C. Spiker e I.W. Lewin, *Biochim.Biophys.Acta* 433, 457 (1976).
- 85 - B.P. Gaber e W.L. Peticolas, *Biochim.Biophys.Acta* 465, 260 (1977).

- 86 - R. Mendelsohn, S. Sunder e H.J. Bernstein, *Biochim. Biophys. Acta* 419, 563 (1976).
- 87 - B.P. Schoenborn, *Biochim. Biophys. Acta* 457, 41 (1976).
- 88 - G. Büldt, H.U. Gally, A. Seelig, J. Seelig e G. Zaccai, *Nature* 271, 182 (1978).
- 89 - D. Chapam e N.J. Salsbury, *Trans. Faraday Soc.* 62, 2607 (1966).
- 90 - D. Chapman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 195, 179 (1972).
- 91 - A.G. Lee, J.M. Birdsall e J.C. Metcalfe, *in* "Methods in Membrane Biology" (E.D. Korn, ed.) V.2, pp. 1-156, Plenum Press, N. Iorque (1974).
- 92 - H.M. Mantsch, H. Saitô e I.C.P. Smith, *in* "Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" (J.W. Emsley, J. Feeney e L.H. Sutcliffe, eds.) V.11, pp. 211-272, Pergamon Press, Oxford (1977).
- 93 - J. Seelig, *Quart. Rev. Biophys.* 10, 3 (1977).
- 94 - I.C.P. Smith, A.P. Tulloch, G.W. Stockton, S. Schreier, A. Joyce, K.W. Butler, Y. Boulanger, B. Blackwell e L.G. Bennett, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 308, 8 (1978).
- 95 - D.F. Bocian e S.I. Chan, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 29, 307 (1978).
- 96 - W.L. Hubbell e H.M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 64, 20 (1969).
- 97 - J.A. Dix, J.M. Diamond e D. Kivelson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 474 (1974).
- 98 - J.K. Lanyi, W.Z. Plachy e M. Kates, *Biochemistry* 13, 4914 (1974).

- 99 - R.P.Mason, E.B. Giavedoni e A.P. Dalmasso, *Biochemistry* 16, 1196 (1977)
- 100 - J.T. Lewis e H. M. McConnell, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 308, 124(1978).
- 101 - A.D. Bangham, M.M. Standish e J.C. Watkins, *J.Mol. Biol.* 13, 238 (1965).
- 102 - G. Sessa e G. Weissmann, *J.Lipid Res.* 9, 310 (1968).
- 103 - G.B. Ansell e J.N. Hawthorne, "Phospholipids: Metabolism and Function", Elsevier, Amsterdam (1964).
- 104 - N.H. Tattrie, J.R. Bennett e R. Cyr, *Can.J.Biochem.* 46, 819 (1968).
- 105 - A.D. Bangham, M.M. Standish e N. Miller, *Nature* 208, 1295 (1965).
- 106 - J. de Gier, C.W.M. Haest, J.G. Mandersloot e L.L.M. van Deenen, *Biochim.Biophys.Acta* 211, 373 (1970).
- 107 - B.E. Cohen e A.D. Bangham, *Nature* 236, 173 (1972).
- 108 - A.D. Bangham, J. de Gier e D. Greville, *Chem.Phys.Lipids* 1, 225 (1967).
- 109 - D.W. Fry, J. C. White e I.D. Goldman, *Anal.Biochem.* 90, 809 (1978).
- 110 - C.Huang, *Biochemistry* 8, 344 (1969).
- 111 - S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill e E.D. Korn, *Biochim.Biophys.Acta* 233, 820 (1971).

- 112 - S. Batzri e E.D. Korn, *Biochim.Biophys.Acta* 298, 1015 (1973).
- 113 - D.M. Michaelson, A.F. Horwitz e M.P. Klein, *Biochemistry* 12, 2637 (1973).
- 114 - J.T. Mason e C. Huang, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 308, 29 (1978).
- 115 - R.D. Kornberg e H.M. McConnell, *Biochemistry* 10, 1111 (1971).
- 116 - D.W. Deamer e A.D. Bangham, *Biochim.Biophys.Acta* 443, 629 (1976).
- 117 - J.M.H. Kremer, M.W.J. v.d. Esker, C. Pathmanoharan e P.H. Wiersema, *Biochemistry* 16, 3932 (1977).
- 118 - K.B. Blodgett e I. Langmuir, *Phys.Rev.* 51, 964 (1937).
- 119 - Y.K. Levine, A.I. Bailey e M.F.H. Wilkins, *Nature* 220, 577 (1968).
- 120 - L.J. Libertini, A.S. Waggoner, P.C. Jost e O.H. Griffith *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 64, 13 (1969).
- 121 - J.C.Hsia, H. Schneider e I.C.P. Smith, *Biochim.Biophys. Acta* 202, 399 (1970).
- 122 - P.Jost, L.J. Libertini, V.C. Hebert e O.H. Griffith, *J.Mol.Biol.* 59, 77 (1971).
- 123 - D.M. Small, *J. Lipid Res.* 8, 551 (1967).
- 124 - P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien e W.C. Wescott, *Circulation* 26, 1167 (1962).
- 125 - M.M. Shemyakin, Yu.A. Ovchinikov, V.T. Ivanov, H.A. Kiryushkin, G.L. Zhdanov e I.D. Ryabova, *Experientia* 19, 566 (1963)

- 126 - G. Stark, Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 82, 890 (1978).
- 127 - S.G.A. McLaughlin, G. Szabo e G. Eisenman, J.Gen.Physiol. 58, 667 (1971).
- 128 - S.G.A. McLaughlin, G. Szabo, G. Eisenman e S.M. Ciani, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 67, 1268 (1970).
- 129 - P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien e W.C. Westcott, Nature 194, 979 (1962).
- 130 - M. Montal e P. Mueller, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 69, 3561 (1972).
- 131 - P. Mueller e D.O. Rudin, J.Theoret.Biol. 18, 222 (1968).
- 132 - H.T. Tien e A.L. Diana, Papers Colloid.Symp., 419, Buffalo, N.Iorque (1967).
- 133 - P.F. Fahey e W.W. Webb, Biochemistry 17, 3046(1978).
- 134 - S.H. White, Biophys.J. 21, 123a (1978).
- 135 - M.C. Phillips, in "Progress in Surface and Membrane Science" (J.F. Danielli, M.D. Rosenberg e D.A. Cadenhead, eds.). V. 5, pp. 139-221, Academic Press, N. Iorque (1972).
- 136 - D.A. Cadenhead e F. Müller-Landau, Biochim.Biophys. Acta 382, 253 (1975).
- 137 - A. Carrington e A.D. McLachlan, "Introduction to Magnetic Resonance", Harper and Row, N.Iorque (1967).
- 138 - J. Wertz e J.R. Bolton, "Electron Spin Resonance", McGraw-Hill, N.Iorque (1972).

- 139 - E.G. Rozantsev, "Free Nitroxyl Radicals" (traduzido por B.J. Hazzard), Plenum Press, N.Iorque (1970).
- 140 - R. Brière, H. Lemaire e A. Rassat, Bull.Soc.Chim. France, 3283 (1965).
- 141 - G. Chapelet-Letourneaux, H. Lemaire e A.Rassat, Bull. Soc.Chim.France, 3283 (1965).
- 142 - D. Chapman, M.D. Barratt e V.B. Kamaç, Biochim.Biophys. Acta 173, 154 (1969).
- 143 - M.D. Barratt, G.H. Dodd e D. Chapman, Biochim.Biophys. Acta 194, 600 (1969).
- 144 - M. Sentjurc, A. Stalc, A.O. Zupancic e M. Schara, Biochim. Biophys.Acta 429, 421 (1976).
- 145 - W.L. Hubbell e H.M. McConnell, J.Amer.Chem.Soc. 93, 314 (1971).
- 146 - W.F. Boss, C.J. Kelley e F.R. Landsberger, Anal.Biochem. 64, 289 (1975).
- 147 - M.B. Cable, J.Jacobus e G.L. Powell, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 75, 1227 (1978).
- 148 - O.H. Griffith, D.W. Cornell e H.M. McConnell, J.Chem. Phys. 43, 2909 (1965).
- 149 - B.J. Gaffney e H.M. McConnell, J.Magn.Res. 16, 1(1974).
- 150 - S. Schreier, C.F. Polnaszek e I.C.P. Smith, Biochim. Biophys.Acta 515, 375 (1978).
- 151 - J. Seelig, J.Amer.Chem.Soc. 92, 3881 (1970).
- 152 - R.D. Lapper, S.J. Paterson e I.C.P. Smith, Can.J. Biochem. 50, 969 (1972).

- 153 - S. Schreier - Muccillo, D. Marsh, H. Dugas, H. Schneider e I.C.P. Smith, Chem.Phys.Lipids 10, 11 (1973).
- 154 - H. Schindler e J. Seelig, J.Chem.Phys. 61, 2946 (1974).
- 155 - P. Jost, A.S. Waggoner e O.H. Griffith, in "Structure and Function of Biological Membranes" (L.I. Rothfield, ed) pp. 84-144, Academic Press, N.York (1971).
- 156 - D. Kivelson, J.Chem.Phys. 33, 1094 (1960).
- 157 - J.H. Freed e G.H. Fraenkel, J.Chem.Phys. 39, 326 (1963).
- 158 - S.A. Goldman, G.V. Bruno, C.F. Polnaszek e J.H. Freed, J.Chem.Phys. 56, 716 (1972).
- 159 - C.F. Polnaszek e J.H. Freed, J.Phys.Chem. 79, 2283 (1975).
- 160 - J.S. Hwang, R.P. Mason, L.P. Hwang e J.H. Freed, J.Phys. Chem. 79, 489 (1975).
- 161 - J.S. Snipes e A.Keith, Research/Development, 20-36(1970).
- 162 - G. Poggi e C.S.Johnson, J.Magn.Res. 3, 436 (1971).
- 163 - B. Cannon, C.F. Polnaszek, K.W. Butler , L.E.G. Eriksson e I.C.P. Smith, Arch.Biochem.Biophys. 167, 505 (1975).
- 164 - C. Mailer, C.P.S. Taylor, S. Schreier-Muccillo e I.C.P. Smith, Arch.Biochem.Biophys. 163, 671 (1974).
- 165 - O.H. Griffith, P.G. Dehlinger e S.P. Van, J.Membrane Biol. 15, 159 (1974).
- 166 - W.L. Hubbell e H.M. McConnell, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 61, 12 (1968).
- 167 - W.Z. Plachy e D.A. Windrem, J.Magn.Res.27, 237 (1977).

- 168 - A.G. Lee, N.J.M. Birdsall, J.C. Metcalfe, P.A. Toon e G.B. Warren, *Biochemistry* 13, 3699 (1974).
- 169 - D. Marsh, A.Watts e P.F. Knowles, *Biochemistry* 15, 3570 (1976).
- 170 - C.F. Polnaszek, S. Schreier, K.W. Butler e I.C.P. Smith, *J.Amer.Chem.Soc.* 100, 8223 (1978).
- 171 - C.D. Linden, K. L. Wright, H.M. McConnell e C.F. Fox, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 70, 2271 (1973).
- 172 - B.J. Wisnieski, J.G. Parkes, Y.O. Huang e C.F. Fox, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 71, 4381 (1974).
- 173 - D. Marsh e I.C.P. Smith, *Biochim.Biophys Acta* 298, 133 (1973).
- 174 - H. Träuble e E. Sackmann, *J.Amer.Chem.Soc.* 94, 4499 (1972).
- 175 - G.R. Luckhurst e G.P. Pedulli, *Mol.Phys.* 20, 1043(1971).
- 176 - E. Sackmann e H. Träuble, *J.Amer.Chem.Soc.* 94, 4482 (1972).
- 177 - E. Sackmann e H. Träuble, *J.Amer.Chem.Soc.* 94, 4492 (1972).
- 178 - P. Devaux e H.M. McConnell, *J.Amer.Chem.Soc.* 94, 4475 (1972).
- 179 - P. Jost e O.H. Griffith, in "Methods in Pharmacology" (C.F.Chignell, ed.) V. 2, pp. 223-276, Appleton, N.Iorque (1972).
- 180 - A.D. Keith, M. Sharnoff e G.E. Cohn, *Biochim.Biophys. Acta* 300, 379 (1973).

- 181 - S.I. Ohnishi, *Adv. Biophys.* 8, 35 (1975).
- 182 - B.J. Gaffney, *in* "Methods in Enzymology" (S.Fleischer e L. Packer, eds.) V. 32B, pp. 161-198, Academic Press, N. Iorque (1974).
- 183 - D. Marsh, *Essays in Biochim.* 11, 139 (1975).
- 184 - B.G. McFarland e H.M. McConnell, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 68, 1274 (1971).
- 185 - M.J. Neal, K.W. Butler, C.F. Polnaszek e I.C.P. Smith, *Mol.Pharmacol.* 12, 144 (1976).
- 186 - H. Schindler e J. Seelig, *J.Chem.Phys.* 59, 1841(1973).
- 187 - S. Mabrey e J.M. Sturtevant, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 73, 3862 (1976).
- 188 - D.Papahadjopoulos, *in* "Membrane Fusion" (G. Poste e G.L.Nicolson eds.) pp.765-790,Elsevier-North Holland Biomedical Press,Amsterdam(1978).
- 189 - C. Taupin e H.M. McConnell, *in* "Mitochondria/Biomembranes", pp. 219-229, North Holland, Amsterdam (1972).
- 190 - C.M.W. Grant e H.M. McConnell, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 70, 1238 (1973).
- 191 - T. Maeda, A. Asans, K. Ohki, Y. Okada e S. Ohnishi, *Biochemistry* 14, 3736 (1975).
- 192 - J.C. Hsia, H. Schneider e I.C.P. Smith, *Can. J. Biochem.* 49, 614 (1971).
- 193 - J.M. Boggs e J.C. Hsia, *Biochim.Biophys.Acta* 290, 32 (1972).
- 194 - J.C. Hsia, R.A. Long, F.E. Hruska e H.D. Gesser, *Biochim. Biophys.Acta* 290, 22 (1972).

- 195 - M. Hemminga, Chem.Phys.Lipids 14, 141 (1975).
- 196 - M. Hemminga, Chem.Phys.Lipids 14, 151 (1975).
- 197 - K.W. Butler, I.C.P. Smith e H. Schneider, Biochim. Biophys.Acta 219, 514 (1970).
- 198 - K.W. Butler, H. Dugas, I.C.P. Smith e H. Schneider, Biochem.Biophys.Res.Comm. 40, 770 (1970).
- 199 - M.Ehrstrom, L.E.G. Eriksson, J. Israelachvili e A. Ehrenberg, Biochem. Biophys.Res.Comm. 55, 396 (1973).
- 200 - S. Schreier - Muccillo, K.W. Butler e I.C.P. Smith, Arch.Biochem.Biophys. 159, 297 (1973).
- 201 - S.J. Paterson, K.W. Butler, P. Huang, J.Labelle, I.C.P. Smith e H. Schneider, Biochim.Biophys.Acta 266, 597 (1972).
- 202 - J.R. Trudell, W.L. Hubbell e E.N. Cohen, Biochem.Biophys. Acta 291, 321 (1973).
- 203 - J.R. Trudell, D.G. Payan, J.H. Chin e E.N. Cohen, Biochim. Biophys.Acta 373, 436 (1974).
- 204 - J.R. Trudell, D.G. Payan, J.H. Chin e E.N. Cohen, Proc. Nat.Acad.Sci. U.S.A. 72, 210 (1975).
- 205 - K.W. Butler, H. Schneider e I.C.P. Smith, Arch. Biochem. Biophys. 154, 548 (1973).
- 206 - G.J. Giotta, R. Gargiulo e H.H. Wang, J. Membrane Biol. 13, 233 (1973).
- 207 - C.J. Giotta, D.S. Chan e H.H. Wang, Arch. Biochem.Biophys. 163, 453 (1974).

- 208 - J.Z. Yeh, K. Takeno, G.M. Rosen e T. Narahashi, J. Membrane Biol. 25, 237 (1975).
- 209 - W. Pache e D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 255, 348 (1972).
- 210 - W. Pache, D. Chapman e R. Hillaby, Biochim. Biophys. Acta 255, 358 (1972).
- 211 - C. Flick e E. Gelerinter, Chem. Phys. Lipids 18, 62 (1977).
- 212 - C. Flick, E. Gelerinter e R. Semer, Mol. Cryst. Liquid Cryst. 37, 71 (1976).
- 213 - S.P. Verma, H. Schneider e I.C.P. Smith, Arch. Biochem. Biophys. 154, 400 (1973).
- 214 - K.W. Butler, A.W. Hanson, I.C.P. Smith e H. Schneider, Can. J. Biochem. 51, 980 (1973).
- 215 - P.C. Jost, O.H. Griffith, R.A. Capaldi e G. Vanderkooi, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 480 (1973).
- 216 - P.C. Jost, O.H. Griffith, R.A. Capaldi e G. Vanderkooi. Biochim. Biophys. Acta 311, 141 (1973).
- 217 - P.C. Jost, K.K. Nadakavukaren e O.H. Griffith, Biochemistry 16, 3110 (1977).
- 218 - P.J. Dehlinger, P.C. Jost e O.H. Griffith, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2280 (1974).
- 219 - D. Marsh, A. Watts, W. Maschke e P.F. Knowles, Biochem. Biophys. Res. Commun 81, 397 (1978).
- 220 - A. Rousselet e P.F. Devaux, FEBS Lett. 93, 161 (1978)

- 221 - S.P. Verma, H. Schneider e I.C.P. Smith, FEBS Lett. 25, 197 (1972).
- 222 - S.P. Verma, H. Schneider e I.C.P. Smith, Arch.Biochem. Biophys. 162, 48 (1974).
- 223 - H.E. Sandberg, R.G. Bryant e L.H. Piette, Arch.Biochem. Biophys. 133, 144 (1969).
- 224 - H. Schneider e I.C.P. Smith, Biochim.Biophys.Acta 219, 73 (1970).
- 225 - F.R. Landsberger, J. Paxton e J. Lenard, Biochim.Biophys. Acta 266, 1 (1971).
- 226 - K. Tanaka e S. Ohnishi, Biochim.Biophys.Acta 426, 218-231(1976).
- 227 - A. Rousselet, C. Guthman, J. Matricon, A. Bienvenue e P. F. Devaux, Biochim.Biophys.Acta 426, 357 (1976).
- 228 - J. Seelig e W. Hasselbach, Eur.J.Biochem. 21, 17 (1971).
- 229 - G. Inesi, M. Millman e S. Eletr, J.Mol.Biol. 8, 483 (1973).
- 230 - J.K. Raison e E.J. McMurchie, Biochim.Biophys.Acta 363, 135 (1974).
- 231 - C. Montecucco e A. Azzi, J.Biol.Chem. 250, 5020 (1975)
- 232- R.J. Mehlhorn e L. Packer, Biochim.Biophys.Acta 423, 382, (1976).
- 233 - B. Annayev, V.K. Koltover, O.N. Mamedniyazov, L.M. Raikhman e E.G. Rozantsev, Biofizika 17, 224 (1972).
- 234 - A.D. Keith, A.S. Waggoner e O.H. Griffith, Proc.Nat.Acad. Sci. U.S.A. 61, 819 (1968).

- 235 - M.E. Tourtellotte, D. Branton e A.D. Keith, Proc.Nat. Acad.Sci. U.S.A. 66, 909 (1970).
- 236 - S.A. Henry e A.D. Keith, J.Bacteriol. 106, 174 (1971).
- 237 - M. Nakamura e S. Ohnishi, Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 926 (1972).
- 238 - S. Eletr e A.D. Keith, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 69, 1353 (1972).
- 239 - M. Sinenski, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 71, 522 (1974).
- 240 - A.E.Esser e K.A. Souza, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 71, 4111 (1974).
- 241 - C.F. Chignell e D.A. Chignell, Biochem.Biophys.Res. Commun. 64, 7 (1975).
- 243 - K.W. Butler, K.G. Jonhson e I.C.P. Smith, Arch.Biochem. Biophys. 191, 289 (1978).
- 244 - F.R. Landsberger, J. Lenard, J. Paxton e R.W. Compans, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 68, 2579 (1971).
- 245 - F.R. Landsberger, R.W. Compans, P.W. Choppin e J.Lenard, Biochemistry 12, 4498 (1973).
- 246 - B.M. Sefton e B.J. Gaffney, J.Mol.Biol. 90, 343 (1974).
- 247 - A.I. Tsapin, K.N. Timofeyer, M. Goldfeld, A.V. Filyushina e T.Ye. Krenledeva, Biofizika 19, 122 (174).
- 248 - J. Torres-Pereira, R. Mehlhorn, A.D. Keith e L. Packer, Arch.Biochem.Biophys. 160, 90 (1974).
- 249 - W.L. Hubbell e H.M. McConnell, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 63, 16 (1969).

- 250 - H. Simpkins, E. Panko e S. Tay, *Biochemistry* 10, 3579 (1971).
- 251 - D.A. Butterfield, A.L. Crumbliss e D.B. Chesnut, J. *Amer.Chem.Soc.* 97, 1388 (1975).
- 252 - L.R. Brown e K. Wütrich, *Biochim.Biophys.Acta* 464, 356 (1977).
- 253 - A. Stier e E. Sackmann, *Biochim.Biophys.Acta* 311, 400 (1973).
- 254 - T.R. Hesketh, G.A. Smith, M.D. Houslay, K.A. McGill, N.J.M. Birdsall, J.C. Metcalfe e G.B. Warren, *Biochemistry* 15, 4145 (1976).
- 255 - A. Bienvenue, A. Rousselet, G. Kato e P. Devaux, *Biochemistry* 16, 841 (1977).
- 256 - H. Kong e W.L. Hubbell, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 69, 2617 (1972).
- 257 - A. Seelig e J. Seelig, *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol.Chem.* 359, 1747 (1978).
- 258 - A. Colbeau, P.M. Vignais e L.H. Piette, *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 48, 1495 (1972).
- 259 - N.Z. Stanacev, L. Stuhne-Sekalec, S.Schreier-Muccillo e I.C.P. Smith, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 46, 114 (1972).
- 260 - N.Z. Stanacev, L.Stuhne-Sekalec, S.Schreier-Muccillo e I.C.P. Smith, *Can.J.Biochem.* 52, 884 (1974).
- 261 - L. Stuhne-Sekalec e N.Z. Stanacev, *Can.J.Biochem.* 54, 553 (1976).
- 262 - J.K. Raison, J.M. Lyons, R.J. Mehlhorn e A.D. Keith, *J.Biol.Chem.* 246, 4036 (1971).

- 263 - J. Kaplan, P.G. Canonico e W.J. Caspary. Proc.Nat.Acad. Sci. U.S.A. 70, 66 (1973).
- 264 - J.J. Baldassare, D.E. Robertson, A.G. McAfee e C.Ho, Biochemistry, 13, 5210 (1974).
- 265 - J.S. Goldberg, E.J. Rauckman e G.M. Rosen, Biochem. Biophys.Res.Comm. 79, 198 (1977).
- 266 - A.T. Quintanilha e L. Packer, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 74, 570 (1977).
- 267 - S.Schreier-Muccillo, D. Marsh e I.C.P. Smith, Arch. Biochem.Biophys. 172, 1 (1976).
- 268 - D.J. Wilkins, R.H. Ottewill e A.D. Bangham, J.Theoret. Biol. 2, 165 (1962).
- 269 - D.J. Wilkins, R.H. Ottewill w A.D. Bangham, J.Theoret. Biol. 2, 176 (1962).
- 270 - H.S. Hendrickson e J.G. Fullington, Biochemistry 4, 1599 (1965).
- 271 - A.D. Bangham e D. Papahadjopoulos, Biochim.Biophys.Acta 126, 181 (1966).
- 272 - D. Papahadjopoulos e A.S. Bangham, Biochim.Biophys.Acta 126, 185 (1966).
- 273 - M.B. Abramson, R. Katzman, H. Gregor e R. Curci, Biochemistry 5, 2207 (1966).
- 274 - D. Papahadjopoulos e J.C. Watkins, Biochim.Biophys.Acta 135, 639 (1967).
- 275 - H. Hauser e R.C.M. Dawson, Eur.J.Biochem. 1, 61 (1967).
- 276 - D. Papahadjopoulos, Biochim.Biophys.Acta 135, 624 (1967).

- 277 - D. Papahadjopoulos, *Biochim.Biophys.Acta* 163, 240(1968).
- 278 - P.G. Barton, *J.Biol.Chem.* 243, 3884 (1968).
- 279 - T. Gulik-Krzywicki, A. Tardien e V. Luzzati, *Mol.Cryst. Liquid Cryst.* 8, 285 (1969).
- 280 - E.Rivas e V. Luzzati, *J.Mol.Biol.* 41, 261 (1969).
- 281 - H. Hauser, D. Chapman e R.C.M. Dawson, *Biochim.Biophys. Acta* 183, 320 (1969).
- 282 - D. Papahadjopoulos e S. Ohki, *Science* 164, 1075 (1969).
- 283 - D. Papahadjopoulos e S. Ohki, *in* "Liquid Crystals and Ordered Fluids", pp. 13-23, Plenum Press, N.Iorque(1970).
- 284 - S. Ohki e D. Papahadjopoulos, *in* "Surface Chemistry of Biological Systems" (M.Blank, ed.) V.7, pp. 155-174, Plenum Press, N.Iorque (1970).
- 285 - D. Papahadjopoulos, *Biochim.Biophys.Acta* 241, 254 (1971).
- 286 - D.E. Graham e E.J.A. Lea, *Biochim.Biophys.Acta* 274, 286 (1972).
- 287 - S. Ohki, *Biochim.Biophys.Acta* 282, 55 (1972).
- 288 - T. Seimiya e S. Ohki, *Nature*, 239, 26 (1972).
- 289 - R.P. Rand e S. Sengupta, *Biochim.Biophys.Acta* 255, 484 (1972).
- 290 - H.Hauser, D.Oldani e M.C. Phillips, *Biochemistry* 12, 4507 (1973).

- 291 - D. Wobschall e S. Ohki, *Biochim.Biophys.Acta* 291, 363 (1973).
- 292 - H. Trauble e H. Eibl, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 71, 214 (1974).
- 293 - A.J. Verkleij, B.de Kruijff, P.H.J.Th. Ververgaert, J. F. Tocanne e L.L.M. van Deenen, *Biochim.Biophys.Acta* 339, 432 (1974).
- 294 - D. Papahadjopoulos, G.Poste, B.E. Schaeffer e W.J.Vail; *Biochim.Biophys.Acta* 352, 10 (1974).
- 295 - H.K. Kimelberg e D. Papahadjopoulos, *J.Biol.Chem.* 249, 1071 (1974).
- 296 - P.H.J.Th.Ververgaert, B.de Kruijff, A.J. Verkleij, J.F. Tocanne e L.L.M. van Deenen, *Chem.Phys.Lipids* 14, 97 (1974).
- 297 - K. Jacobson e D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* 14, 152 (1975).
- 298 - H. Hauser, M.C. Phillips e M.D. Barratt, *Biochim.Biophys. Acta* 413, 341 (1975).
- 299 - D. Papahadjopoulos, W.J. Vail, K. Jacobson e G. Poste, *Biochim. Biophys.* 394, 483 (1975).
- 300 - P.W. van Dijck, P.H.J. Th. Ververgaert, A.J. Verkleij, L. L.M. van Deenen e J. de Gier, *Biochem. Biophys. Acta* 406, 465 (1975).
- 301 - D. Papahadjopoulos, W.J.Vail, W.A. Pangborn e G. Poste, *Biochim. Biophys. Acta* 448, 245 (1976).
- 302 - W.E. Harris, *Chem.Phys.Lipids* 19, 243 (1977).
- 303 - D. Papahadjopoulos, W.J. Vail, C. Newton, S.Nir e K. Jacobson, G.Poste e R. Lazo, *Biochim.Biophys.Acta* 465, 579 (1977).

- 304 - M. Mille e G. Vanderkooi, J. Colloid Interf. Sci. 61, 475 (1977).
- 305 - P.W.M. van Dijck, B. de Kruijff, A.J. Verkleij, L.L.M. van Deenen e J. de Gier, Biochim. Biophys. Acta 512, 84 (1978).
- 306 - C. Newton, W. Pangborn, S. Nir e D. Papahadjopoulos, Biochim. Biophys. Acta 506, 281 (1978).
- 307 - S. Nir, C. Newton e D. Papahadjopoulos, Bioelectrochem. Bioenerg. 5, 116 (1978).
- 308 - S. Ohki e R. Sauve, Biochim. Biophys. Acta 511, 377 (1978).
- 309 - M. Koter, B. de Kruijff e L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 514, 255 (1978).
- 310 - E.J. Findlay e P.G. Barton, Biochemistry 17, 240 (1978).
- 311 - E.S. Lutton, J. Amer. Oil. Chem. Soc. 42, 1068 (1965).
- 312 - K. Larsson, Z. Phys. Chem. (Frankfurt am Main) 56, 173 (1967).
- 313 - N. Krof e K. Larsson, Chem. Phys. Lipids 2, 129 (1968).
- 314 - S. Krasne, G. Eisenman e G. Szabo, Science 174, 412 (1971).
- 315 - K. W. Butler, S. Schreier-Muccillo e I.C.P. Smith (não publicado).
- 316 - A. Scarpa e J. de Gier, Biochim. Biophys. Acta 241, 789 (1971).
- 317 - J. de Gier, J.G. Mandersloot e L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 150, 666 (1968).
- 318 - R.A. Demel, W.S.N.G. van Kersel e L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 266, 26 (1972).

- 319 - A. R. Taylor, W.T. Roubal e U. Varanasi, *Lipids* 10, 535 (1975).
- 320 - F. Reiss-Husson, *J.Mol.Biol.* 25, 363 (1967).
- 321 - R.C. Weast, ed., "Handbook of Chemistry and Physics", 57a. edição, The Chemical Rubber Co., Cleveland (1976).
- 322 - M. Windholz, ed, "The Merck Index", 9a. edição, Merck and Co. Inc., Rahaway, N.Jersey, 1976.
- 323 - M. Tomkiewicz e G.A. Corker, *Biochim.Biophys.Acta* 406, 197 (1976).
- 324 - B.R. Lentz, Y. Barenholz e T.E. Thompson, *Biochemistry* 15, 4521 (1976).
- 325 - D. Marsh, A. Watts e P.F. Knowles, *Biochim.Biophys.Acta* 465, 500 (1977).
- 326 - J. Suurkuusk, B.R. Lentz, Y. Barenholz, R. Biltonen e T. E. Thompson, *Biochemistry* 15, 139 (1976):
- 327 - Y.Katz e J.M. Diamond, *J. Membrane Biol.* 17, 101 (1974).
- 328 - V.S. Vaidhyanathan, W.H. Perkins e E.J. Towbin, *J. Theoret. Biol.* 7, 339 (1964).
- 329 - G.S. Manning, *J.Chem.Phys.* 49, 2668 (1968).
- 330 - H. Träuble, *J.Membrane Biol.* 4, 193 (1971).
- 331 - R.B. Fisher e I.A. Nimmo, *J.Exper.Physiol.* 57, 162 (1972).
- 332 - O. Kedem e A.Katchalsky, *Biochim.Biophys.Acta* 27, 229 (1958).

- 333 - W.R. Lieb e W.D. Stein, in "Current Topics in Membrane Transport" (F. Bronner e A. Kleinzeller eds.) pp. 1-39, Academic Press, N.Iorque e Londres (1971).
- 334 - J.M. Diamond e E.M. Wright, *Ann.Rev.Physiol.* 31, 581 (1969).
- 335 - A.D. Bangham, *Ann.Rev.Biochem.* 41, 753 (1972).
- 336 - H.T. Tien e A.L. Diana, *Chem.Phys.Lipids* 2, 55 (1968).
- 337 - L.L.M. van Deenen, *Naturwis.* 59, 485 (1972).
- 338 - J. de Gier, J.G. Mandersloot, J.V. Hupkes, R. N. McElhaney e W.P. Van Beek, *Biochim.Biophys. Acta* 233, 610 (1971).
- 339 - J. Kroes e R. Ostwald, *Biochim.Biophys. Acta* 249, 647 (1971).
- 340 - Y. Graziani e A. Livne, *J. Membrane Biol.* 7, 275(1972).
- 341 - D.G. Dervichian, *Progress in Biophys.Mol.Biol.* 14, 265 (1964).
- 342 - D.O. Shah e J.H. Schulman, in "Molecular Associations in Biological and Related Systems", *Advances in Chemistry Series*, n° 84, American Chemical Society, p. 189 (1968).
- 343 - J. Tinoco e D.J. McIntosh, *Chem.Phys.Lipids* 4, 72(1970).
- 344 - D. Chapman, N.F. Owens, M.C. Phillips e D.A. Walker, *Biochim.Biophys. Acta* 183, 458 (1969).
- 345 - R.A. Demel, L.L.M. van Deenen e B.A. Pethica, *Biochim. Biophys. Acta* 135, 11 (1967).
- 346 - M.Bourges, D.M. Small e D.G. Dervichian, *Biochim.Biophys. Acta* 137, 157 (1967).

- 347 - H. Lecuyer e D.G. Dervichian, J.Mol.Biol. 45, 39 (1969)
- 348 - D.Chapman e S.A. Penkett, Nature 211, 1304 (1966).
- 349 - A. Darke, E.G. Finer, A.G. Flook e M. C. Phillips, J. Mol.Biol. 63, 265 (1972).
- 350 - M. C. Phillips e E.G. Finer, Biochim.Biophys.Acta 356, 199 (1974).
- 351 - E. Oldfield e D. Chapman, FEBS Lett 23, 285 (1972).
- 352 - J. de Gier, J.M. Mandersloot e L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys.Acta 173, 143 (1969).
- 353 - K.R. Bruckdorfer, R.A. Demel, J. de Gier e L.L.M. van Deenen, Biochim.Biophys.Acta 183, 334 (1969).
- 354 - E. Gallucci, S. Micelli e C. Lippe, Nature 255, 722 (1975).
- 355 - R. Bittman e L. Blau, Biochemistry 11, 4831 (1972).
- 356 - R.N. McElhaney, J. de Gier e E.C.M. van der Neut-Kok, Biochim.Biophys.Acta 298, 500 (1973).
- 357 - M.C. Block, L.L.M. van Deenen e J. de Gier, Biochim. Biophys.Acta 484, 509 (1977).
- 358 - R.A. Demel e B. de Kruijff, Biochim.Biophys.Acta 457, 109 (1976).
- 359 - J.E. Rothman e D.M. Engelman, Nature New Biol. 237, 42 (1972).
- 360 - D.M. Engelman e J.E. Rothman, J.Biol.Chem. 247, 3694 (1972).

- 361 - B. de Kruijff, R.A. Demel, A.J. Slotboom, L.L.M. van Deenen e A.F. Rosenthal, *Biochim.Biophys.Acta* 307, 1 (1973).
- 362 - C. Huang, J.P. Sipe, S.T. Chow e R.B. Martin, *Proc.Nat. Acad.Sci. U.S.A.*, 71, 359 (1974).
- 363 - M.P.Gent e J.H. Prestegard, *Biochemistry* 13, 4027(1974).
- 364 - B. de Kruijff, P.R. Cullis e G.K. Radda, *Biochim.Biophys. Acta* 406, 6(1975).
- 365 - P.R. Cullis, *FEBS Lett.* 70, 223 (1976).
- 366 - N.P. Franks, *J.Mol.Biol.* 100, 345 (1976).
- 367 - D.L. Worcester e N.P. Franks, *J.Mol.Biol.*, 100, 359 (1976).
- 368 - K.E. Suckling e G.S. Boyd, *Biochim.Biophys.Acta* 436, 295 (1976).
- 369 - G.W. Stockton e I.C.P. Smith, *Chem.Phys.Lipids* 17, 257 (1976).
- 370 - A. G. Lee, *FEBS Lett.* 62, 359 (1976).
- 371 - P.W.M. van Dijck, B.de Kruijff, L.L.M. van Deenen, J. de Gier e R.A. Demel, *Biochim.Biophys.Acta* 455, 576 (1976).
- 372 - B. de Kruijff, P.R. Cullis e G.K. Radda, *Biochim.Biophys. Acta* 436, 729 (1976).
- 373 - S.J. Opella, J.P. Yesinowski e J.S. Waugh, *Proc.Nat. Acad.Sci. U.S.A.* 73, 3812 (1976).
- 374 - H.U. Gally, A.Seelig e J. Seelig, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 357, 1447 (1976).

- 375 - A.M.W. Lanc e-Hermkens e B. de Kruijff, Biochim.Biophys. Acta 470, 141 (1977).
- 376 - R.A. Demel, J.W.C.M. Jansen, P.W.M. van Dijck e L.L.M. van Deenen, Biochim.Biophys.Acta 465, 1 (1977).
- 377 - C.Huang, Chem.Phys.Lipids 19, 150 (1977).
- 378 - R.A. Haberkorn, R.G. Griffin, M.D. Meadows e E.Oldfield, J.Amer.Chem.Soc. 99, 7353 (1977).
- 379 - W.R. Veatch e L. Stryer, J.Mol.Biol. 117, 1109 (1977)
- 380 - P.L. Yeagle, R.B. Martin, A.K. Lala, H.K. Lin e K. Bloch, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 74, 4924 (1977).
- 381 - R.P. Taylor, C.Huang, A.V. Brocoli e L. Leake, Arch. Biochem.Biophys. 183, 83 (1977).
- 382 - E. Oldfield, M. Meadows, D.Rice e R. Jacobs, Biochemistry 17, 2727 (1978).
- 383 - Y. Shimoyama, L.E.G. Eriksson e A. Ehrenberg, Biochim. Biophys.Acta 508, 213 (1978).
- 384 - B. de Kruijff, Biochim.Biophys.Acta 506, 172 (1978).
- 385 - P.R. Cullis e B. de Kruijff, Biochim.Biophys.Acta 507, 207 (1978).
- 386 - M.F. Brown e J.Seelig, Biochemistry 17, 381 (1978).
- 387 - S. Mabrey, P.L. Mateo e J.M. Sturtevant, Biochemistry 17, 2464 (1978).
- 388 - B.R. Martin e P.L. Yeagle, Lipids 13, 594 (1978).
- 389 - S. Kawato, K. Kinosita, A. Ikegami, Biochemistry 17, 5026 (1978).

- 390 - H. Reiber, *Biochim.Biophys.Acta* 512, 72 (1978).
- 391 - T.J. McIntosh, *Biochim.Biophys.Acta* 513, 43 (1978).
- 392 - D.A. Pink e C.E. Carroll, *Phys.Lett.A* 66A, 157 (1978).
- 393 - T.N. Estep, D.B. Mountcastle, R.L. Biltonen e T. E. Thompson, *Biochemistry* 17, 1984 (1978).
- 394 - I.F. Craig, G.S. Boyd e K.E. Suckling, *Biochim.Biophys. Acta* 508, 418 (1978).
- 395 - R.A. Long, F. Hruska, H.D. Gesser, J.C. Hsia e R. Williams *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 41, 321 (1971).
- 396 - R.A. Demel, K.R. Bruckdorfer e L.L.M. van Deenen, *Biochim.Biophys.Acta* 255, 311 (1972).
- 397 - D.Ghosh e J. Tinoco, *Biochim.Biophys.Acta* 266, 41 (1972)
- 398 - R.A. Demel, K.R. Bruckdorfer e L.L.M. van Deenen, *Biochim.Biophys.Acta* 255, 321 (1972).
- 399 - J.C. Hsia, H. Schneider e I.C.P. Smith, *Chem.Phys. Lipids* 4, 238 (1970).
- 400 - C.F. Polnaszek, *Quart.Rev.Biophys* (em preparação).
- 401 - D. Marsh, A.D. Phillips, A.Watts e P.F. Knowles, *Biochim.Biophys.Res.Commun.* 49, 641 (1972).
- 402 - J.L. Lippert e W.L. Peticolas, *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.* 68, 1572 (1971).
- 403 - E. Oldfield e D. Chapman, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 43, 610 (1971).
- 404 - N.D. Weiner e A. Felmeister, *J.Lipid Res.* 11, 220 (1970).

- 405 - A.A. Barber e F. Bernheim, Adv. Gerontol. Res. 2, 355 (1967).
- 406 - L. Packer, D.W. Deamer e R.L. Heath, Adv. Gerontol. Res. 2, 77 (1967).
- 407 - A.U. Arstila, M.A. Smith e B.F. Trump, Science 175, 530 (1972).
- 408 - K.S. Chio, U. Reiss, B. Fletcher e A.L. Tappel, Science 166, 1535 (1969).
- 409 - J. Glavind, S. Hartmann, J. Clemmensen, K.E. Jessen e H. Dam, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 30, 1 (1952).
- 410 - E.D. Wills e A.E. Wilkinson, Radiat. Res. 31, 732 (1967).
- 411 - C.E. Mengel, H.E. Kann, A. Heyman e E. Meta, Blood 25, 822 (1965).
- 412 - C.A. Berry, Aerosp. Med. 41, 500 (1970).
- 413 - H.V. Thomas, P.K. Mueller e R.L. Lyman, Science 159, 552 (1968).
- 414 - J.N. Roehm, J.G. Hadley e D.B. Menzel, Arch. Environ. Health 23, 142 (1971).
- 415 - T.C. Evans e R.N. Feinstein, eds. "Implications of Organic Peroxides in Radiobiology", Radiat. Res., Suppl. 3, Academic Press, N. Iorque (1963).
- 416 - A.A. Barber e K.M. Wilbur, Radiat. Res. 10, 167 (1959).
- 417 - F. Bernheim, K.M. Wilbur e C.B. Kenaston, Arch. Biochem. Biophys. 38, 177 (1952).
- 418 - A.L. Tappel, Geriatrics 23, 97 (1968).

- 419 - A.L. Tappel, Arch.Biochem,Biophys. 113, 5 (1966).
- 420 - G.O. Burr e R.H. Barnes, Physiol.Rev. 23, 256 (1943).
- 421 - T. Kaneda, H. Sakai e S.Ishii, J.Biochem. 42, 561(1955).
- 422 - N. Matsuo, J.Biochem. 41, 647 (1954).
- 423 - V.J. Horgan, J.St.L. Philpot, B.W. Porter e D.B. Roodyn, Biochem.J. 67, 551 (1957).
- 424 - H. Dam e H. Granados, Acta Physiol.Scand. 10, 162 (1945).
- 425 - F. Christensen, H. Dam, I. Prange e E. Sondergaard, Acta Pharmacol.Toxicol. 15, 181 (1958).
- 426 - E.D. Wills e A.E. Wilkinson, Biochem.J. 99, 656 (1966).
- 427 - A.A. Lamola, T. Yamane e A.M. Trozzolo, Science 179, 1131 (1973).
- 428 - B.D. Goldstein e L.C. Harber, J.Clin.Invest. 51, 892 (1972).
- 429 - D. Harman, J.Gerontol. 11, 298 (1956).
- 430 - W.A. Pryor, Sci.Amer. 223, 70 (1970).
- 431 - L. Reich e S.S. Stivala, "Autoxidation of Hydrocarbons and Polyolefins", M. Dekker, N.Iorque (1969).
- 432 - W.O. Lundberg, "Autoxidation and Antioxidants", V. 1, Wiley (Interscience) N.Iorque (1961).
- 433 - H.W. Schulz, E.A. Day e R.O. Sinnhuber, eds. "Lipids and their Oxidation", Avi Publ., Westport, Connecticut (1962).
- 434 - W.A. Pryor, Chem.Eng.News 49, 34 (1971).

- 435 - B. Samuelsson, in "Lipid Metabolism" (S.J. Wakil, ed.) p. 107, Academic Press, Nova Iorque (1970).
- 436 - M. Hamberg, B. Samuelsson, I. Bjorkhem e H. Danielsson, in "Molecular Mechanisms of Oxigen Activation" (O. Hayaishi, ed.) p. 29, Academic Press, N. Iorque (1974).
- 437 - F. Franks, M. Gent e B. Roberts, J. Appl. Chem. 15, 243 (1965).
- 438 - A.L. Tappel, in "Autoxidation and Antioxidants" (W.O. Lundberg, ed.) V. 1, p. 325, Wiley (Interscience), N. Iorque (1961).
- 439 - K.V. Ingold, in "Lipids and their Oxidation" (H.W. Schulz, E.A. Day e R.O. Sinnhuber, eds.) p. 93, Avi Publ., Westport, Connecticut (1962).
- 440 - J.L. Bolland e H.P. Kock, J. Chem. Soc., 445 (1945).
- 441 - N. Uri, in "Autoxidation and Antioxidants" (W.O. Lundberg, ed.), V. 1, pp. 55-106, Wiley (Interscience), N. Iorque (1961).
- 442 - A.N. Siakotos e N. Koppang, Mech. Ageing Develop. 2, 177 (1973).
- 443 - K.S. Chio e A.L. Tappel, Biochemistry 8, 2821 (1969).
- 444 - A.L. Tappel, B. Fletcher e D. Deamer, J. Gerontol. 28, 415 (1973).
- 445 - D.E. Philpot, K.G. Bensch e J. Miquel, Aerosp. Med., 283 (1973).
- 446 - H. Stubel, Pflueger's Arch. Gesamte Physiol. Menschen. Tiere 142, 1 (1911).

- 447 - E.A. Porta e W.S. Hartroft, in "Pigments in Pathology" (M.Wolman, ed.) pp. 191-235, Academic Press, N.Iorque (1969).
- 448 - W.S. Hartroft e E.A. Porta, in "Present Knowledge of Nutrition" 3a. edição, pp. 28-31, Nutr.Found., N.Iorque (1967).
- 449 - D.D. Hendley, B.L. Strehler, M.C. Reporter e M.V. Gee, Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. 20, 998 (1961).
- 450 - T.W. Kwon e H.S. Olcott, Nature 210, 214 (1966).
- 451 - A.Ottolenghi, Arch.Biochem.Biophys. 79, 335 (1959).
- 452 - C.J. Dillard e A.L. Tappel, Lipids 6, 715 (1971).
- 453 - K. Reddy, B. Fletcher, A. Tappel e A.L. Tappel, J.Nutr. 103, 908 (1973).
- 454 - E.D. Wills, Biochem.J. 113, 315 (1969).
- 455 - J.L. Poyer e P.B.M. McCay, J.Biol.Chem. 246, 263 (1971).
- 456 - A.L. Tappel, in "Lipids and Their Oxidation" (H.W. Schulz, E.A. Day e R.O. Sinnhuber, eds.) p. 122, Avi Publ., Westport, Connecticut (1962).
- 457 - A.A. Barber, Lipids 1, 146 (1966).
- 458 - P. Hochstein e L. Ernster, Biochem.Biophys.Res.Commun. 12, 388 (1963).
- 459 - E. Wills, Biochim.Biophys.Acta 98, 238 (1965).
- 460 - E. Wills, Biochem. J. 113, 315 (1969).
- 461 - J.F. Mead, in "Free Radicals in Biology" (W.A. Pryor, ed.) pp. 51-68, Academic Press, N.Iorque (1976).

- 462 - A.A. Barber, H.M. Tinberg e E.J. Victoria, Proc. 8th. Int.Congr. Nutr., 1969, Int. Congr. Ser. N° 213, p. 39 (1971).
- 463 - R. Hiatt, in "Organic Peroxides" (D. Swern, ed.). V.II, pp. 1-151, Wiley (Interscience), N.Yorke (1971).
- 464 - W.A. Pryor, in "Free Radicals in Biology" (W.A. Pryor, ed.) pp. 1-49, Academic Press, N.Yorke (1976).
- 465 - J.S.Lin, V. Smith e H.S. Olcott, J.Agr. Food Chem. 22, 682 (1974).
- 466 - A.N. Saprin e L.H. Piette, Arch.Biochem.Biophys. 180, 480 (1977).
- 467 - G.E. Dobretsov, T.A. Borschevskaia, V.A. Petrov e Yu. A. Vladmirov, FEBS Lett. 84, 125 (1977).
- 468 - H. Abramson, J.Biol.Chem. 178, 179 (1949).
- 469 - D.L. Sanioto e S.Schreier, Biochem.Biophys.Res.Comm. 67, 530 (1975).
- 470 - J.C. Arcos e M.F. Argus, "Chemical Introduction to Cancer", V.IIA, Academic Press, N.Yorke (1974).
- 471 - R.S. Snart, Biochim.Biophys.Acta 144, 10 (1967).
- 472 - A. Felmeister, D. Tsai e N.D. Weiner, J.Pharm.Sci. 61, 1065 (1972).
- 473 - A.A. Belmonte e J.Swarbrick, J.Pharm.Sci. 62, 481(1973).
- 474 - A.A. Belmonte e J. Swarbrick, Biochim.Biophys.Acta 323, 467 (1973).
- 475 - F.G. Bock e M. Burnham, Cancer Res. 21, 510 (1961).

- 476 - D.L. Sanioto, S. Schreier e F.H. Quina (resultados não publicados).
- 477 - M.K. Jain, N.Y.-M. Wu e L.V. Wray, *Nature* 255, 494(1975).
- 478 - B.A.Cater, D.Chapman, S.Hawes e J. Saville, *Biochim. Biophys.Acta* 363, 54 (1974).
- 479 - A.W. Norman, A.M. Spielvogel e R.G. Wong, *Adv.Lipid Res.* 14, 127 (1976).
- 480 - S.C. Kinsky, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 4, 353 (1961)
- 481 - S.C. Kinsky, *J. Bacteriol.* 82, 889 (1961).
- 482 - P.G. Caltrider e D. Gottlieb, *Trans.Ill.State Acad.Sci.* 54, 189 (1961).
- 483 - D.D. Sutton, P.M. Arnow e J.O. Lampen, *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 108, 170 (1961).
- 484 - F.P. Marini, P.M. Arnow e J.O. Lampen, *J.Gen.Microbiol.* 24, 51 (1961).
- 485 - D. Gottlieb, H.E. Carter, J.H. Slonecker, L.C. Wu e E. Gandy, *Physiopathology* 51, 321 (1961).
- 486 - S.C. Kinsky, *Arch.Biochem.Biophys.* 102, 180 (1963).
- 487 - D. Gottlieb, H.E. Carter, J.H. Slonecker e A. Amman, *Science* 128, 361 (1958).
- 488 - J.O. Lampen, P.M. Arnow, Z. Borowska e A. I. Laskin, *J. Bacteriol.* 184, 1152 (1962).
- 489 - A.Ghosh e J.J. Ghosh, *Ann.Biochim.Exp.Med.* 23, 101(1963).
- 490 - A. Ghosh e J.J. Ghosh, *Ann.Biochem.Exp.Med.* 23, 603 (1963).

- 491 - S.C. Kinsky, Antimicrob. Ag. Chemother. pp. 384-394 (1964).
- 492 - D.S. Feingold, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 261 (1965).
- 493 - M.M. Weber e S.C. Kinsky. J. Bacteriol. 89, 306 (1965).
- 494 - E. Schlosser e D. Gottlieb, J. Bacteriol. 91, 1080 (1966).
- 495 - E. Schlosser e D. Gottlieb, Arch. Mikrobiol. 61, 246 (1968).
- 496 - E. Schlosser, P.D. Shaw e D. Gottlieb, Arch. Mikrobiol. 66, 147 (1969).
- 497 - A. Cass, A. Finkelstein e V. Krespi, J. Gen. Physiol. 56, 100 (1970).
- 498 - R. Holz e A. Finkelstein, J. Gen. Physiol. 56, 125 (1970).
- 499 - A. Finkelstein e R. Holz, in "Membranes" (G. Eisenman, ed.) V. 2 pp. 377-407, M. Dekker, Inc., N. Iorque (1973).
- 500 - V.W. Dennis, N. W. Stead e T.E. Andreoli, J. Gen. Physiol. 55, 375 (1970).
- 501 - T.E. Andreoli, Ann N.Y. Acad. Sci. 235, 448 (1974).
- 502 - S.B. Hladky e D.A. Haydon, Nature 225, 451 (1970).
- 503 - W.O. Romine, G.R. Sherette, G.B. Brown e R.J. Bradley, Biophys. J. 17, 269 (1977).
- 504 - L.N. Ermishkin, Kh.M. Kasumov e V.M. Potzeluyev. Nature 262, 699 (19706).
- 505 - L.N. Ermishkin, Kh. M. Kasumov e V.M. Potzeluyev, Biochim. Biophys. Acta 470, 357 (1977).

- 506 - A.W. Norman, R.A. Demel, B. de Kruijff e L.L.M. van Deenen, J.Biol.Chem 247, 1918 (1972).
- 507 - A.W. Norman, R.A. Demel, B. de Kruijff, W.S.M. G r s t - van-Kessel e L.L.M. van Deenen, Biochim.Biophys.Acta 290, 1 (1972).
- 508 - G. Weissman e G. Sessa, J.Biol.Chem. 242, 616 (1967)
- 509 - B. de Kruijff, W.J. Gerritsen, A.Oerlemans, R.A. Demel e L.L.M. van Deenen, Biochim.Biophys.Acta 339, 30(1974).
- 510 - B. de Kruijff, W.J. Gerritsen, A. Oerlemans. P.W.M. van Dijck, R.A. Demel e L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys.Acta 339, 44 (1974).
- 511 - B. de Kruijff e R.A. Demel, Biochim.Biophys.Acta 339, 57 (1974).
- 512 - P. van Hoogevest e B. de Kruijff, Biochim.Biophys.Acta 511, 397 (1978).
- 513 - R. Bittman, W.C. Chen e O.R. Anderson, Biochemistry 13, 1364 (1974).
- 514 - A.J. Verkleij, B. de Kruijff, W.J. Gerritsen, R.A. Demel L.L.M. van Deenen e P.H.J. Ververgaert, Biochim.Biophys. Acta 291, 557 (1973).
- 515 - W.C. Chen e R. Bittman, Biochemistry 16, 4145 (1977).
- 516 - R. Bittman e S.A. Fischkoff, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 69, 3795 (1972).
- 517 - F. Schroeder, J.F. Holland e L.L. Bieber, Biochemistry 11, 3105 (1972).
- 518 - F. Schroeder, J.F. Holland e L.L. Bieber, Biochemistry 12, 4785 (1973).

- 519 - R. Strom, C. Crifò e A. Bozzi, *Biophys.J.* 13, 568 (1973).
- 520 - R. Strom, C. Crifò e A.S. Santoro, *Biophys.J.* 13, 581 (1973).
- 521 - R. Strom, W.E. Blumberg, R.E. Dale e C. Crifò, *Biophys. J.* 16, 1297 (1976).
- 522 - M.P.N. Gent e J.H. Prestegard, *Biochim.Biophys.Acta* 426, 17 (1976).
- 523 - H.D.Pierce,Jr.,A.M.Unrau e A.C.Oehlschlager, *Can.J.Biochem.*56, 801(1978).
- 524 - M. Poznanski e Y.Lange, *Nature* 259, 420 (1976).
- 525 - B. Bloj e D.B. Zilversmit, *Biochemistry* 16, 3943 (1977).
- 526 - S. Rottem, G.M. Slutzky e R. Bittman, *Biochemistry* 17, 2723 (1978).
- 527 - J.R. Ernandes, H. Chaimovich e S. Schreier, *Chem.Phys. Lipids* 18, 304 (1977).
- 528 - J.O. Lampen, P.M. Arnow e R.S. Safferman, *J.Bacteriol.* 80, 200 (1960).
- 529 - M.G. Kleinschmidt, K.S. Chough e J.B. Mudd, *Plant Physiol.* 49, 852 (1972).
- 530 - G. Szabo, *Nature* 252, 47 (1974).
- 531 - T.Y. Tsong, *Biochemistry* 14, 5415 (1975).
- 532 - E.F. LaBelle e E. Racker, *J. Membrane Biol.* 31, 301 (1977).
- 533 - R.Benz e D. Cros, *Biochim.Biophys.Acta* 506, 265 (1978).

- 534 - E.W. Sutherland e T.W. Rall, *Pharmacol.Rev.* 12, 265 (1960).
- 535 - D.M. Neville Jr. e C.R. Kahn, *in* "Methods in Molecular Biology" (A.I. Lastin e J.A. Last, eds.) V. 5 pp. 57-85, Marcel Dekker, N. Iorque (1974).
- 536 - C.R. Kahn, *in* "Methods in Membrane Biology" (E.D. Korn, ed.) V. 3, pp. 81-145, Academic Press, N.Iorque (1975).
- 537 - M.S. Kafka e C.Y.Pak, *Biochim.Biophys.Acta* 163, 117 (1969).
- 538 - M.S. Kafka e C.Y. Pak, *J. Colloid Interf.Sci.* 41, 148 (1972).
- 539 - Y. Graziani e A. Livne, *Biochim.Biophys.Acta* 291, 612 (1973).
- 540 - W.B. Gratzer e G.H. Beaven, *J.Biol.Chem.* 244, 6675 (1969).
- 541 - W.B. Gratzer, G.H. Beaven, H.W.E. Rattle e E.M.Bradbury, *Eur..J.Biochem.* 3, 276 (1968).
- 542 - C.C. Contaxis e R.M. Epand, *Can.J.Biochem.* 52, 456 (1974).
- 543 - S.Schreier e R.M. Epand (em preparação).
- 544 - K. Sasaki, S. Dockerill, D.A. Adamiak, I.J. Tickle e T. Blundell, *Nature* 257, 751 (1975).
- 545 - H. Bornett e H. Edelhoich, *J.Biol.Chem.* 246, 1785 (1971).
- 546 - A.B. Schneider e H. Edelhoich, *J.Biol.Chem.* 247, 4986 (1972).
- 547 - J.R. Ernandes, R.M. Epand e S. Schreier (em preparação).
- 548 - R.M. Epand, A.J.S. Jones e S.Schreier, *Biochim.Biophys. Acta* 491, 296 (1977).

- 549 - R.M. Epand, A.J.S. Jones e B. Sayer, *Biochemistry* 16, 4360 (1977).
- 550 - A.J.S. Jones, R.M. Epand, K.F. Lin, D. Walton e W.J. Vail, *Biochemistry* 17, 2301 (1978).
- 551 - R.M. Epand, *Biochim.Biophys.Acta* 514, 185 (1978).
- 552 - P.F. Devaux, A. Bienvenue, G. Lauquin, A.D. Brisson, P.M. Vignais e P.V. Vignais, *Biochemistry* 14, 1272.
- 553 - W.L. Zahler, R.E. Barden e W.W. Cleland, *Biochim.Biophys. Acta* 164, 1 (1968).
- 554 - V.K. Koltover, L.M. Reichman, A.A. Yasaitis e L.A. Blumenfeld, *Biochim.Biophys.Acta* 234, 306 (1971).
- 555 - S. Schreier, J.R. Ernandes, Y. Cuccovia e H. Chaimovich, *J.Mag. Res.* 30, 283 (1978).
- 556 - J.D. Morrisett e H.R. Drott, *J.Biol.Chem.* 244, 5083 (1969).
- 557 - S. Fleischer e B. Fleischer, in "Methods in Enzymology" (R.W. Estabrook e M.E. Pullman, ed.) v.10, p. 82, Academic Press, N.Yorke, (1967).
- 558 - G. Ducwitz-Peterlein e G. Eilenberger, *Biochim.Biophys. Acta* 469, 311 (1977).
- 559 - L. Stuhne-Sekalec e N.Z. Stanacev, *Can.J.Biochem.* 55, 1159 (1977).
- 560 - L. Stuhne-Sekalec e N.Z. Stanacev, *Can.J.Biochem.* 56, 722 (1978).
- 561 - H. Iida, T. Maeda, K. Ohki, Y. Nozawa e S.I. Ohnishi, *Biochim.Biophys.Acta* 508, 55 (1978).

- 562 - E. Oldfield, K.M. Keough e D. Chapman, FEBS Lett. 20, 344 (1972).
- 563 - K.W. Butler, N.H. Tattrie e I.C.P. Smith, Biochim. Biophys. Acta 363, 351 (1974).
- 564 - N.O. Petersen e S.I. Chan, Biochemistry 16, 2657 (1977).
- 565 - M. Bloom, E.E. Burnell, A.L. Mackay, C.P. Nichol, M.I. Valic e G. Weeks, Biochemistry 17, 5750 (1978).
- 566 - M. Shinitzky, A.C. Dianoux, C. Gitler e G. Weber, Biochemistry 10, 2106 (1971).
- 567 - R.P. Mason e C.F. Polnaszek, Biochemistry 17, 1758 (1978).

R E S U M O

Uma revisão é efetuada sobre: 1 - os principais aspectos da pesquisa no ramo de membranas biológicas e 2 - no ramo de membranas artificiais; 3 - os princípios do Método de Marcador de Spin; 4 - as aplicações do método no campo de membranas.

São descritas uma série de investigações em que foi aplicado o Método de Marcador de Spin para estudo de propriedades estruturais e dinâmicas de membranas e do efeito de agentes adicionados às mesmas. Nesse sentido foram examinados: 1 - os requisitos estruturais para que compostos anfifílicos formem bicamadas organizadas; 2 - a influência da composição de membranas na partição de marcadores de spin que se distribuem entre a membrana e a fase aquosa; 3 - a dependência da permeabilidade de membranas da composição lipídica das mesmas; 4 - o efeito do colesterol sobre o grau de organização e a mobilidade de componentes da membrana; 5 - o papel estrutural de hidroperóxidos lipídicos, bem como a sua reatividade em matrizes membranosas; 6 - a interação entre hidrocarbonetos aromáticos cancerígenos e não cancerígenos e membranas lipídicas; 7 - o efeito do antibiótico poliênico anfotericina B sobre a estrutura e permeabilidade de membranas; 8 - a interação entre o hormônio peptídico glucagon e membranas; 9 - a biossíntese de fosfolípidios contendo marcador de spin e os espectros fornecidos pelos mesmos em membra

nas; 10 - a reatividade de membranas biológicas, mediando reações de destruição de paramagnétismo de marcadores de spin e o emprego dessa propriedade para estudar a transferência de lipídios entre organelas.

São ainda discutidas as vantagens e as limitações do método empregado e é efetuada uma comparação com outros métodos espectroscópicos utilizados no estudo de membranas.

ABSTRACT

A review is presented about: 1 - the main aspects of research in the field of biological membranes; 2 - and in the field of artificial membranes; 3 - the principles of the Spin Label Method; 4 - the application of spin labeling in the field of membranes.

The Spin Label Method was employed for the study of structural and dynamic properties of membranes and of the effect of added agents on those properties. The following problems were examined: 1 - structural requirements for the formation of organized bilayers by amphiphilic compounds; 2 - the influence of membrane composition on the partition of spin probes between aqueous and membrane phases; 3 - the dependence of membrane permeability on its lipid composition; 4 - the effect of cholesterol upon the degree of order and mobility of membrane components; 5 - the structural role of lipid hydroperoxides, as well as their reactivity in membrane matrices; 6 - the interaction between carcinogenic and non-carcinogenic aromatic hydrocarbons and lipid membranes; 7 - the effect of the polyenic antibiotic amphotericin B on the structure and permeability of membranes; 8 - the interaction between the peptide hormone glucagon and membranes; 9 - the biosynthesis of spin label-containing phospholipids and their spectra in biological membranes; 10 - the reactivity of biological membranes mediating the loss of paramagnetism of spin probes, and the use of this property to study lipid transfer between organelles.

Finally, the advantages and disadvantages of the method are discussed, and a comparison is made with other spectroscopic methods employed in the study of membranes.