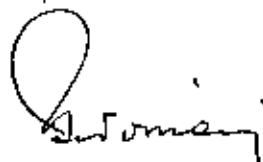


INCORPORAÇÃO DE ELIPTICINAS EM MEMBRANAS-MODELO

ESTUDO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo aluno Carlos Renato
Zacharias e aprovada pela Comissão Julgadora.


26/09/91

SETEMBRO/1991

CARLOS RENATO ZACHARIAS

ORIENTADORA:

Prof. Dra. IRIS C. L. TORRIANI

TESE APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN"
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP ,
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS

Este trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física "Gleb Wataghin" da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sendo os cálculos computacionais e análise dos resultados, parcialmente realizados no Departamento de Física e Química (DFQ) da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS "GERAIS"

- à minha Família, por todo apoio;
- ao pessoal do Lab. de Cristalografia, pela convivência;
- ao pessoal da Biblioteca do IFGW, pela competência;
- ao pessoal do "Bandeirão", pelo meu dente quebrado;
- às minhas colegas de sala (UNICAMP), pelo "empréstimo" das mesas
e bolachas;
- aos funcionários do DFQ (Guará), que não só trabalham,
como são competentes;
- ao David e Família, por toda a ajuda;
- à CAPES e CNPQ pela ajuda financeira;
- à UNESP, pelo respeito.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS "ESPECIAIS"

- à meus pais, pelo apoio irrestrito;
- à Iris, pela amizade;
- à Eneida, pelas dicas, discussões e tampões (EPC também);
- Ao jovem casal jovem Rogério e Miriam, pelo pedaço de chão,
num momento de abismo !!!!! ;
- à Rita pela amizade e ao Iong pela "cobrança";
- ao amigo "Müller", pelo empurrão inicial;
- à turma do Antonio, Bacon, Tocha, Hamurah, ... ;
- ao Seu Alfredo, pelos ensinamentos;
- à todos que em silêncio me ajudaram;
- à todos que "em silêncio" me decepcionaram;
- aos outros Eu's pelas confusões.

Muito Obrigado.

Dedico este trabalho àqueles que,

olhando para a Física, vêem a Ciência;

olhando para a Ciência, vêem a Vida;

olhando para a Vida, conseguem permanecer de olhos abertos !!!

... até mesmo quando vêem a "própria vida".

LISTA DE ABREVIÇÕES USADAS NO TEXTO

DPPC - DIPALMITIL FOSFATIDIL-COLINA
(DIPALMITOYL PHOSPHATIDYLCHOLINE)

DPPG - DIPALMITIL FOSFATIDIL-GLICEROL
(DIPALMITOYL PHOSPHATIDYLGLYCEROL)

CL - CARDIOPINA
(CARDIOLIPIN)

EPC - FOSFATIDIL COLINA DE OVO
(PHOSPHATIDYLCHOLINE FROM EGG)

ELPT - ELIPTICINA
(ELLIPTICINE)

RESUMO

A incorporação de Elipticina, uma droga anticancerígena, em membranas-modelo é estudada por técnicas de difração de raios-X a baixo ângulo. Através de diagramas de difração estudamos as alterações estruturais dos fosfolípidos, induzidas pela Elipticina, assim como o processo de cristalização da droga nas bicamadas. Usando diferentes sistemas de membranas-modelo (DPPC, CL, EPC), com várias concentrações Lipídeo:Droga, mostramos que a permeabilidade e a carga líquida dos fosfolípidos, bem como o pH da fase aquosa contribuem no mecanismo de incorporação da droga. A presença de ELPT incorporada na região hidrofóbica induz variações na espessura da bicamada. A cristalização da droga é dependente da concentração e pH, sendo observada apenas na fase aquosa.

ABSTRACT

The incorporation of Ellipticine, an anticancer drug, in lipid model membranes is studied by low angle X-ray diffraction technique. Using diffraction patterns we have studied the structural changes of the lipid bilayers induced by Ellipticine, as well as the crystallization mechanism of the compound in the multilayer system. Using different model membrane systems (DPPC, CL, EPC), with different Lipids:Drug concentrations, we show that the permeability and net charge of the phospholipids, as well as the pH of the aqueous phase, contribute to drug incorporation. The Ellipticine located in the hydrophobic region of the bilayer induces changes in its thickness. The formation of Ellipticine crystals is observed only in the aqueous phase and is pH- and concentration-dependent.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. ELIPTICINA E SEUS DERIVADOS	4
2.1 ESTRUTURA CRISTALINA DA ELIPTICINA	6
3. INTERAÇÃO ELIPTICINA-DNA	8
4. INTERAÇÃO ELIPTICINA-MEMBRANA	10
4.1 MEMBRANAS NATURAIS	10
4.2 MEMBRANAS-MODELO	13
5. PROPRIEDADES CITOTÓXICAS DA ELIPTICINA	20
5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	22
5.2 EFEITOS BIOQUÍMICOS	25
6. INTRODUÇÃO A TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	33
7. INTERAÇÃO RADIAÇÃO-MATÉRIA	34
7.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X POR UM ELÉTRON	34
7.2 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X POR UM ÁTOMO	38
7.3 LEI DE BRAGG	41
7.4 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X POR UMA CELA UNITÁRIA	43

8.	APLICAÇÕES DE SÉRIES DE FOURIER EM DIFRAÇÃO DE RAIOS-X ..	50
8.1	REPRESENTAÇÃO DA DENSIDADE ELETRÔNICA	50
8.2	A FUNÇÃO DE PATTERSON	55
9.	DIFRAÇÃO POR SISTEMAS DE MULTIBICAMADAS	58
10.	O PROBLEMA DA FASE	65
11.	CORREÇÃO DAS INTENSIDADES OBSERVADAS	69
11.1	GEOMETRIA DA AMOSTRA E DO SUBSTRATO	70
11.2	FATOR DE ABSORÇÃO	72
11.3	FATOR DE POLARIZAÇÃO	74
11.4	FATOR DE TEMPERATURA	76
12.	PARTE EXPERIMENTAL	82
12.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	83
12.2	DEPOSIÇÃO SOBRE SUBSTRATO	88
12.3	ARRANJO EXPERIMENTAL	89
12.4	OBTENÇÃO DOS RESULTADOS	90
12.5	CONSIDERAÇÕES EXPERIMENTAIS	92
13.	PROGRAMAS UTILIZADOS	98
14.	RESULTADOS	101

15. ANÁLISE DOS RESULTADOS	106
15.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS SISTEMAS EM ESTUDO ...	111
15.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS	113
15.2.1 DPPC (7,2) / EPC (7,2)	113
15.2.2 DPPC (7,2) / DPPC : CL (7,2)	115
15.2.3 DPPC (7,2) / DPPC (9,7)	116
15.2.4 EPC (7,2) / DPPC : CL (7,2)	117
15.2.5 EPC (7,2) / DPPC (9,7)	118
15.2.6 DPPC : CL (7,2) / DPPC (9,7)	119
15.2.7 CRISTALIZAÇÃO X INCORPORAÇÃO	120
15.3 VARIAÇÃO DA ESPESSURA DAS BICAMADAS	121
15.4 PERFIL DE DENSIDADE ELETRÔNICA	124
16. CONCLUSÃO	128
17. APÊNDICE	132
A1. TOXICIDADE SELETIVA	132
A1.1 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA SELETIVIDADE	132
A1.1.1 SELETIVIDADE POR ACUMULAÇÃO	133
A1.1.2 BIOQUÍMICA COMPARADA	133
A1.1.3 CITOLOGIA COMPARADA	134

A2. QUIMIOTERAPIA	135
A2.1 HISTÓRIA DA QUIMIOTERAPIA	135
A2.2 CONTRIBUIÇÕES DE PAUL EHRLICH	136
A3. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE	139
A4. BIBLIOGRAFIA	143

1. INTRODUÇÃO

A máquina humana, magnífico complexo desenvolvido no decorrer dos tempos, revela-se ainda para nós, habitantes do século XX (e quase XXI !!!), um exemplo de harmonia e cooperatividade. Ao penetrar nos mecanismos dessa máquina, o Homem descobriu alguns de seus mistérios, e seus principais agentes. Do momento da concepção, quando éramos uma pequena célula-ovo, até nosso estágio atual, inúmeros processos de duplicação e diferenciação celular permitiram o desenvolvimento de um novo ser. Durante esse processo, a maior parte dos constituintes de célula foram usados pela atividade celular e renovados, sem cessar, por "empréstimo" do meio exterior. Porém, como todo processo transformador, a necessidade de uma liderança, fiel aos princípios da *Evolução*, torna-se vital, sob pena de auto-destruição e conseqüente falência de todo o processo. Surge, então, a figura dos ácidos desoxirribonucléicos, conhecidos por DNA's, presentes em todos os núcleos das células, e apenas dentro deles, que ao contrário da maioria dos outros constituintes celulares, "jamais" se modificam, instruindo a todos para o perfeito andamento do processo, e trabalhando na formação de novos líderes, cópias fiéis de seus ideais. São autênticos "invariantes celulares" e sabemos a importância que devemos dar aquilo que se conserva em todos os fenômenos, principalmente em processos tão complexos como os do ser vivo.

Há situações, porém, que corrompem a estrutura dos DNA's, gerando um desequilíbrio no processo e, assim, surgem processos localizados, fomentando a desarmonia que pode levar a um fim precoce e traumático a revolução iniciada num momento de união e entrega...

Eis os processos carcinogênicos tomando conta de nosso corpo, induzidos por inúmeras fontes, tais como radiação, resíduos industriais, aditivos químicos, etc, que na "era atômica" em que vivemos, podem ser transmitidos pelos alimentos, pela água e pelo ar!!!

Existem, porém, substâncias que agem seletivamente em células cancerosas, através de processos farmacológicos, que podem ser usadas como agentes anti-cancerígenos (Apêndice A1).

A eficiência de um citotóxico reside na sua especificidade e na sua ação direta ou indireta no DNA.⁽⁴⁾ Entretanto, é claro que existem substâncias que interagem com o DNA e não agem como drogas citotóxicas, e um parâmetro crítico envolvido na expressão desse potencial é a natureza do dano causado no DNA.

Nas situações onde a droga interage diretamente no DNA, a natureza do dano depende de dois fatores:

- i) o tipo de interação entre droga-DNA;
- ii) a reatividade química intrínseca da droga.

Do outro lado, em situações onde a ação da droga no DNA é indireta, ela geralmente resulta da interação da droga com enzimas envolvidas no metabolismo do DNA, tais como enzimas reparadoras, polimerases, ligases e topoisomerases. Nesse caso, a natureza do dano depende da atividade catalítica da enzima afetada.

Uma grande dificuldade no estudo de drogas citotóxicas é a simultaneidade dos efeitos produzidos. Um grande desafio para a Farmacologia Molecular é determinar o grau com o qual cada efeito individual contribui para a atividade citotóxica da droga. Pesquisas nessa área consistem no estudo da relação Estrutura-Atividade (Apêndice A3) a fim de determinar parâmetros críticos envolvidos em um dado efeito biológico. Estas pesquisas requerem a síntese de vários compostos de uma série homóloga na qual apenas um parâmetro é alterado por vez, e também o uso de modelos biológicos apropriados.

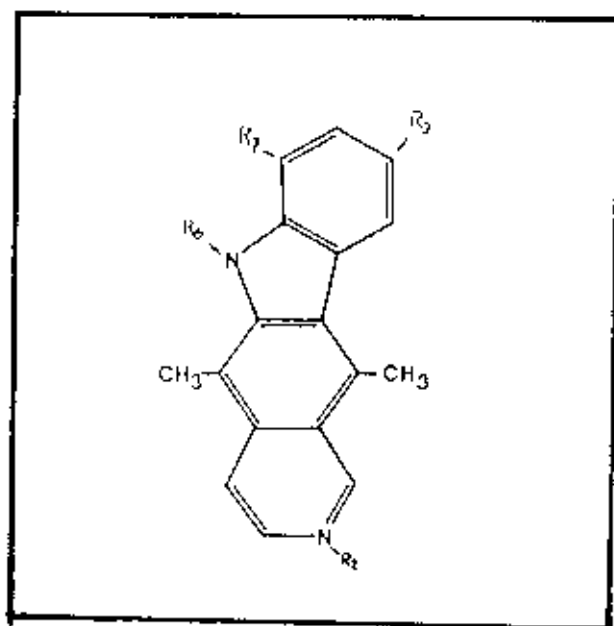
A Elipticina e seus derivados representam materiais adequados para essas pesquisas uma vez que mais de 70 compostos sintéticos vem sendo desenvolvidos e analisados fornecendo informações sobre a relação estrutura-atividade⁽⁴⁾ responsável pela atividade anticancerígena.^{[2][3]}

Procuremos inicialmente, conhecer um pouco mais sobre a Elipticina para que possamos entender algo sobre como ela interage com as células, tanto a nível de DNA como de membrana.

2. ELIPTICINA E SEUS DERIVADOS

A Elipticina (ELPT) é um alcalóide extraído da *Ochrosia elliptica labill* (família das Apocynaceae), uma pequena árvore que ocorre naturalmente na Austrália, Madagascar, Havai e muitas outras ilhas do Pacífico, e acredita-se que foi introduzida na América no Jardim Botânico Real em *Port-of-Spain*, em Trinidad-Tobago onde é conhecida por *Ochrosia moorei*. Alcalóides podem ser encontrados no tronco e nos galhos da *Ochrosia*, o mesmo não acontecendo nos frutos.

A primeira extração de ELPT foi feita em 1959 com amostras de árvores adaptadas à Flórida. Sua estrutura cristalina foi resolvida em 1974⁽⁵⁾ e sua fórmula estrutural é mostrada na figura 2.1.



5,11-dimetil-[6 H]-piridino [4,3b]-carbazol

Fig 2.1 - Elipticina (ELPT)

O núcleo da ELPT é composto de um carbazol ligado a um anel piridina caracterizando um composto planar hidrofóbico altamente aromático. Sua estrutura relativamente simples permite modificações estruturais para a obtenção de derivados mais ativos e de maiores informações sobre sua atividade biológica. A tabela abaixo resume seus principais derivados:

	R ₂	R ₆	R ₇	R ₉
ELIPTICINA	-	H	H	H
9-BROMOELIPTICINA	-	H	H	Br
9-AMINOELIPTICINA	-	H	H	NH ₂
9-HIDROXIELIPTICINA	-	H	H	OH
7-HIDROXIELIPTICINA	-	H	OH	H
9-METOXIELIPTICINA	-	H	H	OCH ₃
ELIPTICINIUM	CH ₃	H	H	H
2N-METIL-9-HIDROXI- ELIPTICINIUM	CH ₃	H	H	OH
2N-METIL-6N-METIL- ELIPTICINIUM	CH ₃	CH ₃	H	H
2N-METIL-6N-METIL-9- HIDROXIELIPTICINIUM	CH ₃	CH ₃	H	OH

Tabela 2.1 - Principais Derivados da Elipticina

Vários derivados da ELPT, incluindo os dois compostos naturais, Elipticina e θ -Metoxi-Elipticina, apresentam propriedades citotóxicas em culturas de células malignas⁽⁶⁾. Alguns estudos indicam que a ELPT apresenta poucos efeitos colaterais e nenhuma toxicidade hematológica, o que fomenta um grande interesse clínico por essa família de drogas⁽⁴⁾.

2.1 - ESTRUTURA CRISTALINA DA ELIPTICINA

A Elipticina cristaliza-se no sistema monoclinico, com grupo espacial $P2_1/C$, cujos parâmetros de rede são dados abaixo:

$$a = 5,105 \text{ \AA}$$

$$b = 15,588 \text{ \AA}$$

$$c = 15,161 \text{ \AA}$$

$$\beta = 97.03^\circ$$

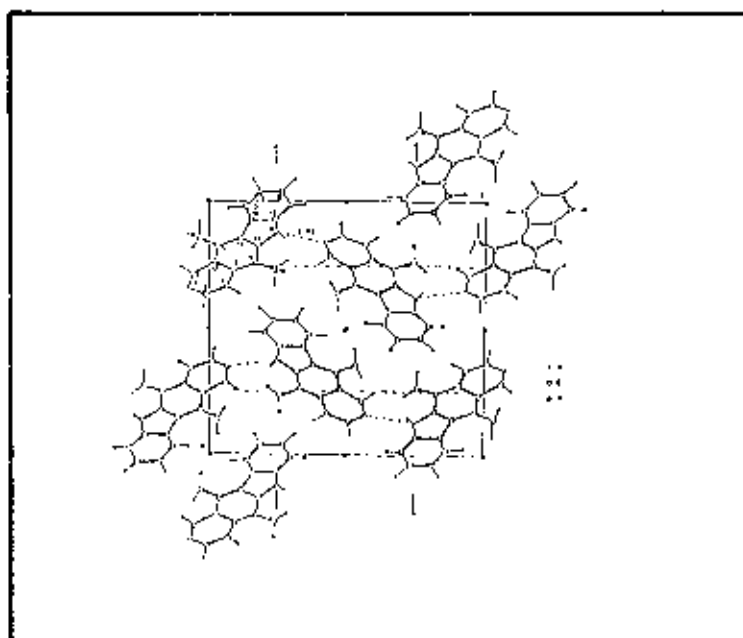


Fig. 2.1.1 - Projeção da cela unitária (direção do eixo a)

Possui 4 moléculas por cela unitária com densidade de $1,29 \text{ g/cm}^3$ ^[5]. A figura 2.1.1 mostra a projeção da cela unitária vista na direção do eixo a.

A ELPT é uma molécula com estrutura planar possuindo dimensões da ordem de $(11,5 \times 5,0) \text{ \AA}^2$. Os espaçamentos interplanares do composto policristalino ^[52] são dados na tabela abaixo:

d (Å)	2θ
11,1	7,97
7,79	11,36
7,10	12,47
5,81	15,80
4,80	18,49

Obs: reflexões principais

Tabela 2.1.1 - Espaçamentos interplanares

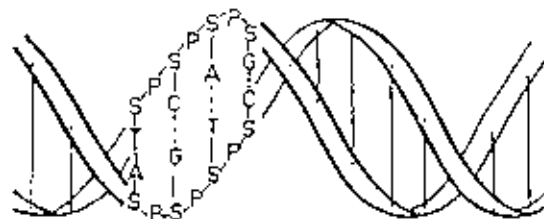
3. INTERAÇÃO ELIPTICINA-DNA

A hipótese de que a ELPT age diretamente sobre o DNA baseia-se em evidências físico-químicas e biológicas. Seu tamanho e forma assemelham-se ao par de bases complementares purina-pirimidina (fig 3.1), possibilitando condições favoráveis para a intercalação na dupla hélice do DNA.

A característica aromática policíclica da molécula propicia fortes interações com regiões hidrofóbicas do DNA. Assim, tem-se observado, *in vitro*, que a ELPT e seus derivados interagem com o DNA através de processos de intercalação⁽¹⁾. Anormalidades cromossômicas aparecem em culturas de células e em células extraídas da medula óssea de camundongos, tratadas com ELPT. Seguindo uma regra geral para as drogas que agem no DNA, a ELPT e seus derivados inibem a formação da fase G₂ do ciclo celular (mitose)⁽²⁾.

A ação indireta sobre o DNA é observada por sua interferência na atividade da DNA-polimerase, RNA-metilase e topoisomerase II. (3)(4)

Porém, para que a ELPT atinja o DNA, que como sabemos localiza-se dentro do núcleo das células, ou mesmo alguma enzima envolvida no metabolismo do DNA, dando início ao mecanismo da carcinogênese, é preciso que a droga penetre na célula, o que envolve necessariamente sua passagem através da membrana celular.



a) Dupla Hélica do DNA.

P = Ácido Fosfórico

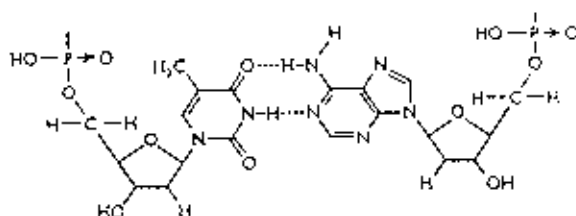
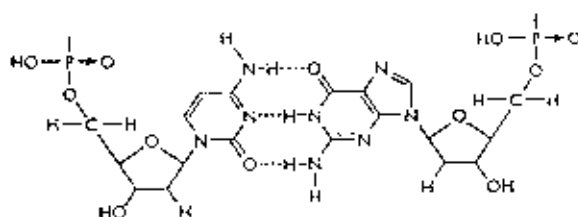
S = Açúcar (desoxirribose)

T = Timina

A = Adenina

G = Guanina

C = Citosina



b) Par de Bases do DNA

acima: Citosina → Guanina

abaixo: Timina → Adenina

Fig. 3.1 - Estrutura do DNA^[4]

4. INTERAÇÃO ELIPTICINA-MEMBRANA

Para podermos entender melhor a interação da ELPT com membranas-modelo por métodos de difração de Raios-X, façamos inicialmente algumas considerações sobre membranas naturais para, a seguir, entender que tipo de sistema pode ser simulado com uma membrana-modelo.

4.1 MEMBRANAS NATURAIS

Na Natureza, membranas naturais não são encontradas apenas delimitando o volume das células mas, também em torno de todas as organelas celulares, tais como mitocôndrias, vacúolos, retículos endoplasmático, ... Além da função de compartimentalização física e química, elas servem de "palco" onde se desenvolvem processos com a participação de proteínas, lipídeos, açúcares, etc., processos esses que dependem das finalidades do sistema em questão.

Num sistema real, o processo de transporte através da membrana pode envolver receptores, carreadores, enzimas, cofatores, etc., o que implica em um transporte ativo, com gasto de energia, ou pode se dar de forma passiva, de acordo com características físico-químicas das substâncias envolvidas, através de interações hidrofóbicas, atrações eletrostáticas e difusão simples.

O modelo aceito, atualmente, para membranas biológicas foi proposto em 1972 por Singer e Nicolson ⁽¹⁰⁾ e descreve a membrana como uma bicamada lipídica fluída, onde podemos encontrar proteínas distribuídas na matriz lipídica. (fig 4.1.1)

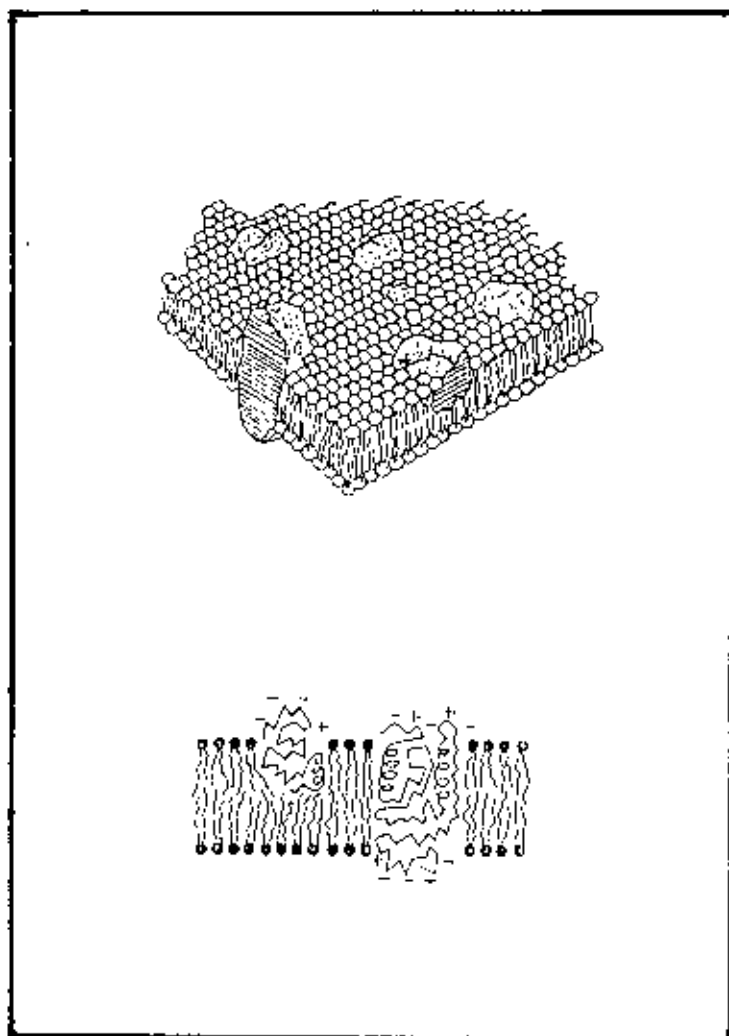


Fig. 4.1.1 - Representação esquemática do modelo do mosaico-fluido para membranas biológicas proposto por Singer e Nicolson. ⁽¹⁰⁾

Esse modelo, conhecido por *mosaico-fluido* pode ser visto como uma solução viscosa bidimensional de moléculas lipídicas orientadas, que permite explicar sua fluidez, flexibilidade, resistência elétrica e permeabilidade seletiva. Esse modelo é consistente com restrições impostas pela Termodinâmica. Nele podemos encontrar proteínas ditas integrais embebidas na matriz lipídica.

Estas proteínas (globulares) se orientam de acordo com suas características anfifílicas, com os grupos polares voltados para a parte externa das membranas, onde encontramos uma fase aquosa, e os grupos apolares incrustados no interior hidrofóbico (fig 4.1.1). Algumas proteínas encontram-se parcialmente embebidas na matriz lipídica, dando uma característica assimétrica à membrana.

A estrutura mosaico-fluida não é estática nem fixa, pois as proteínas podem difundirem-se lateralmente^[55]. A viscosidade relativa da membrana é da ordem de 100 a 1000 vezes maior que a da água. Esse modelo não considera interações fortes entre lipídeos e proteínas. O conteúdo protéico de uma membrana está intimamente ligado a sua atividade: quanto mais proteínas, maior é a diversidade de funções da membrana.

4.2 MEMBRANAS-MODELO

A base das membranas-modelo é a bicamada lipídica, cuja estrutura termodinamicamente estável surge de interações hidrofóbicas e de forças de Van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas dos lipídeos, assim como de interações eletrostáticas e pontes de Hidrogênio entre as cabeças polares e a água.

Numa membrana natural, inúmeros processos ocorrem simultaneamente, envolvendo várias substâncias sob condições específicas. Porém, devido à complexidade, um número incontável de parâmetros dificultam o entendimento do sistema em estudo. Se, por um lado, uma membrana modelo, formada apenas de lipídeos é uma idealização muito simplificada, por outro lado, temos condições de entender como algumas propriedades, tais como hidrofobicidade ou interações eletrostáticas, interferem num determinado processo, uma vez que temos poucos parâmetros envolvidos.

Assim, sistemas-modelo de membranas permitem entender como propriedades físico-químicas de uma droga favorecem, ou dificultam, a interação com sistemas anfifílicos, que são encontrados não apenas em membranas, mas em proteínas e no próprio DNA.

As membranas-modelo usadas em nossos estudos são formadas basicamente pelo fosfolípideo "Dipalmitil Fosfatidil-Colina" (fig 4.2.1).

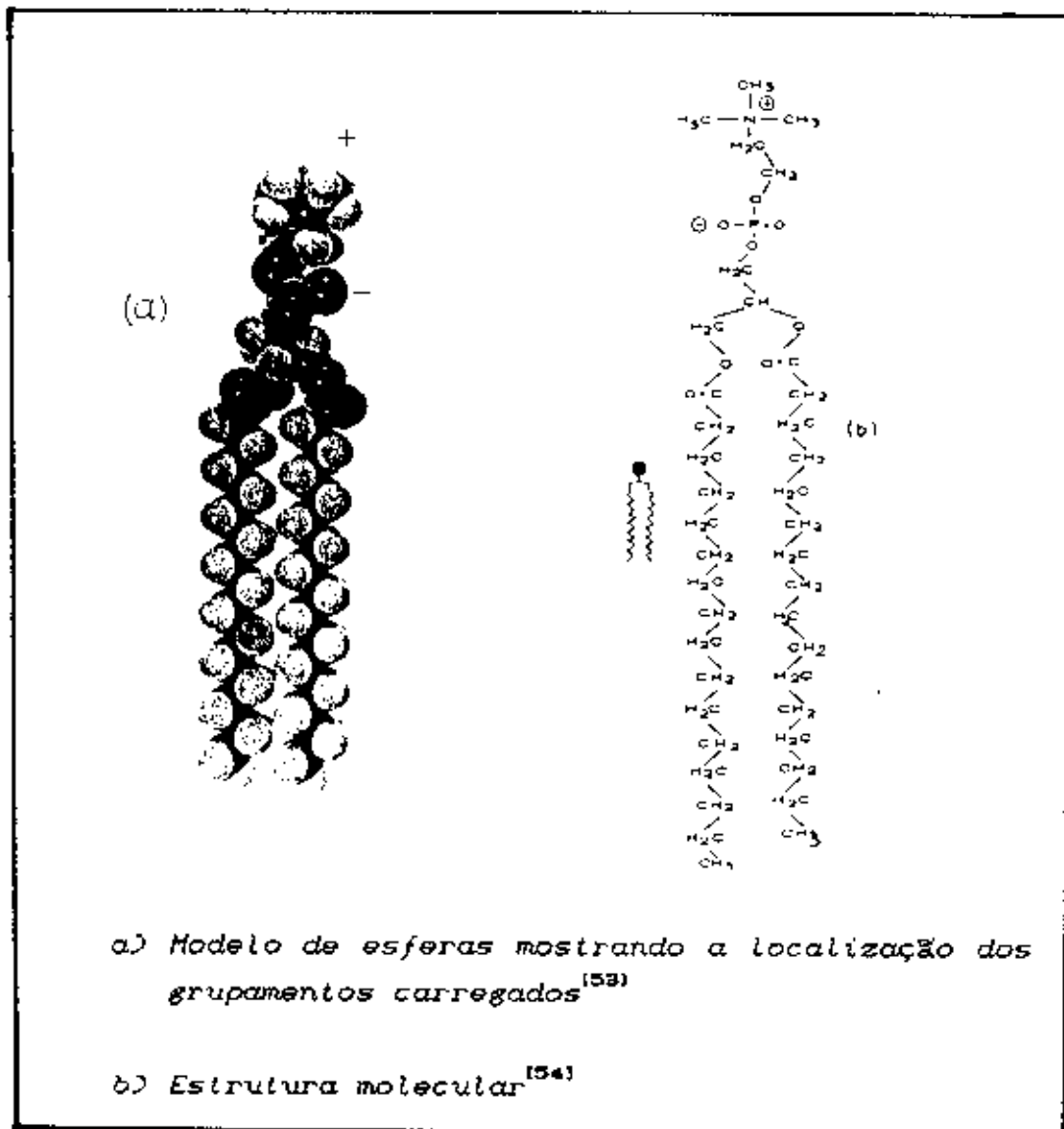


Fig. 4.2.1 - Dipalmitil Fosfatidil-Colina (DPPC)

O DPPC é um fosfolipídeo zwitteriônico apresentando numa de suas extremidades (cabeça polar) o grupamento colina, carregado positivamente e no seu interior um grupamento fosfato, carregado negativamente, sendo a carga elétrica líquida da molécula nula para pH 7,2 e pH 9,7.

Ligada à cabeça polar formada pelos grupamentos colina - fosfato - glicerol estão dois ácidos palmíticos, que formam a cauda apolar, hidrofóbica, do sistema (fig. 4.2.1).

Usamos, também, em nossos estudos os fosfolipídeos Cardiolipina (CL) (fig 4.2.2) e Fosfatidil-Colina extraída de ovo (EPC).

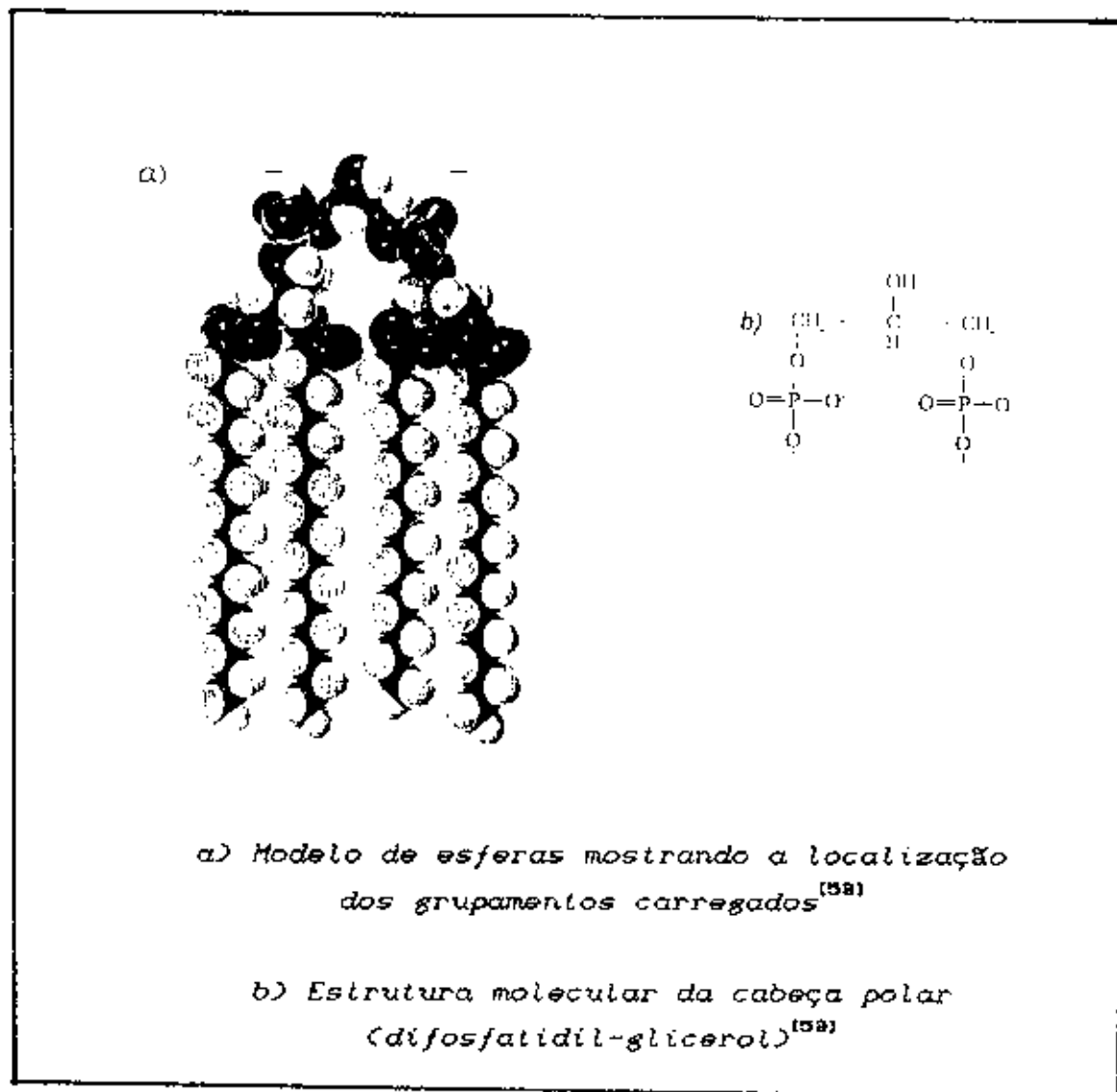


Fig 4.2.2 - Cardiolipina (CL)

A Cardiolipina em pH neutro é um fosfolípideo aniônico que apresenta dois grupamentos fosfatos (negativos) e quatro cadeias hidrofóbicas.

A Fosfatidil-Colina de ovo (EPC) possui a mesma cabeça polar do DPPC, sendo também um fosfolípideo zwitteriônico. Ligada à cabeça polar temos duas cadeias hidrocarbonadas, caracterizando um sistema anfifílico. No EPC, porém, as caudas hidrofóbicas variam em tamanho (número de grupos CH_2) e no grau de insaturação (ligações duplas), o que acarreta uma grande desordem no sistema.

Em solução aquosa, os fosfolípidos podem se associar em uma variedade de estruturas dependendo da natureza de seu grupo polar, do meio e do comprimento e grau de insaturação das cadeias hidrocarbonadas.^[11] Esse polimorfismo deve-se, principalmente a interações hidrofóbicas (entre cadeias hidrocarbonadas) e interações hidrofílicas (entre grupos polares e moléculas de água).

A figura 4.2.3 mostra, esquematicamente, o diagrama de fase para um sistema diacil-fosfatidil-colina/água^[12]. No limite de concentração lipídica muito baixa (0,1%) o estado termodinamicamente estável é a dispersão de vesículas de paredes simples constituídas por uma bicamada de fosfolípidos. Acima de 80% de conteúdo lipídico, obtém-se bicamadas lipídicas empilhadas paralelamente. No intervalo de concentrações intermediárias, são formadas estruturas do tipo "casca de cebola", multilamelares, fechadas.

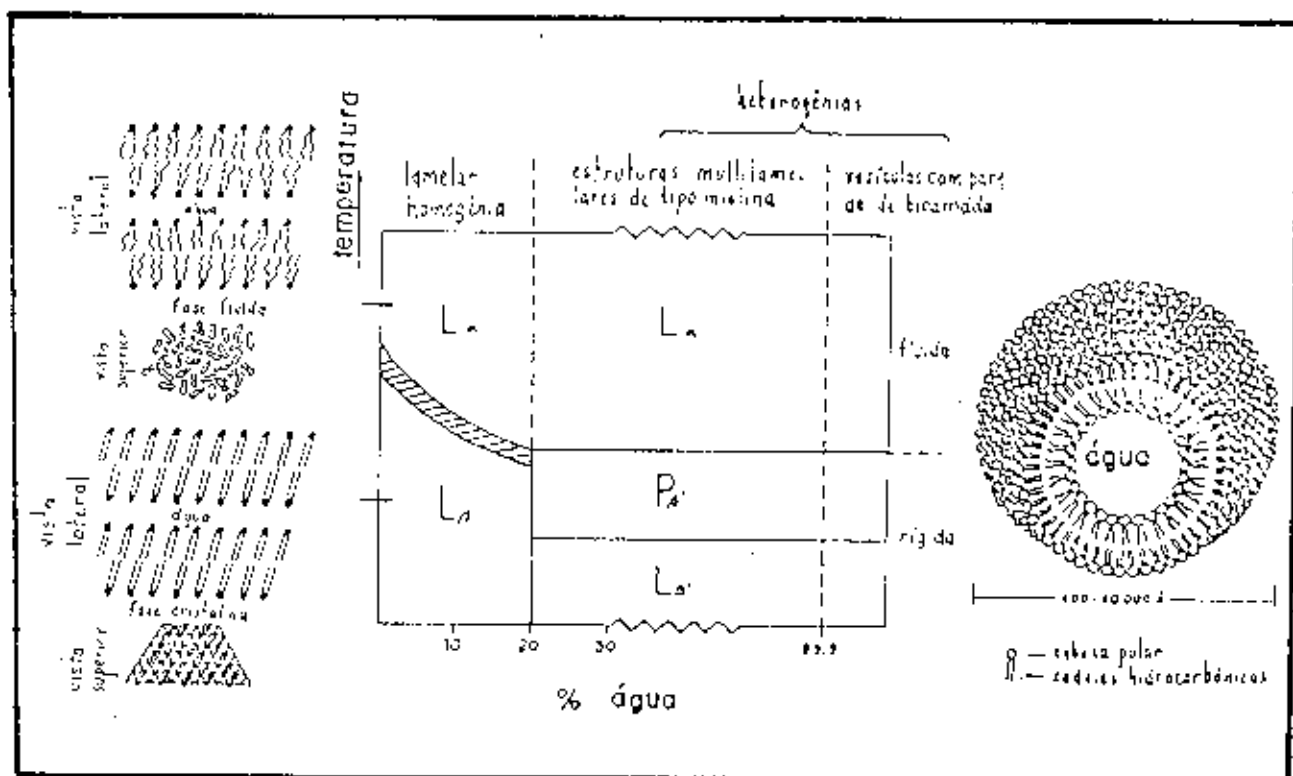


Fig. 4.2.3 - Diagrama de Fases para o sistema Diacyl-fosfatidil-colina/água^[50]

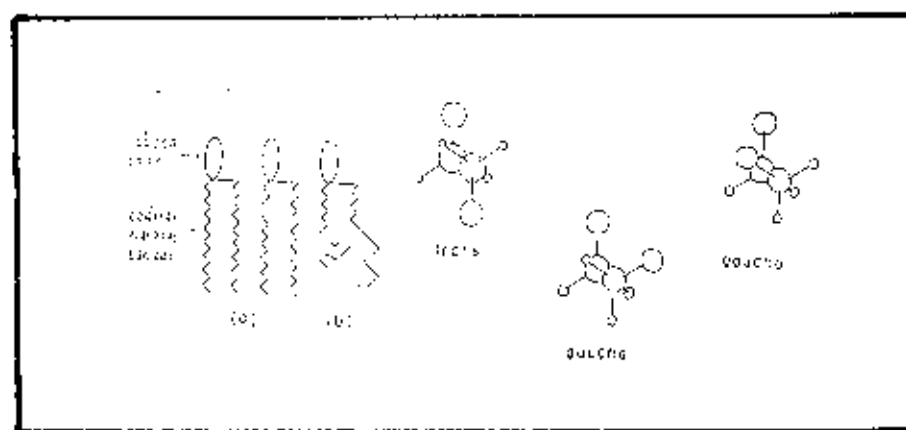


Fig. 4.2.4 - Esquema das configurações das cadeias hidrocarbonadas em bicamadas^[19]

Sob variação de temperatura todos esses sistemas sofrem transições de fase estruturais. Abaixo de determinada temperatura crítica T_c , (no caso do DPPC é da ordem de 42°C) as cadeias hidrocarbônicas estão na configuração *trans*, rígidas (fig 4.2.4) conhecida como estado gel. O aumento de temperatura gera o aparecimento de rotações *gauche* ao redor de ligações C-C, os quais levam a um estado de maior desordem das cadeias, chamado de estado fluido ou estado líquido-cristalino. As interações hidrofóbicas entre as cadeias dificultam a transição *trans-gauche* até determinada temperatura (que depende do comprimento e do grau de saturação das cadeias) onde ocorre uma fusão cooperativa.⁽¹⁸⁾

À temperatura ambiente ($\cong 20^\circ\text{C}$) o DPPC apresenta-se na fase *gel*, com suas cadeias hidrocarbonadas rígidas, numa configuração *trans*.

A Cardiolipina apresenta-se, também, na fase *gel*, à temperatura ambiente. Devido ao fato de possuir uma cabeça polar "estreita" em relação às caudas hidrofóbicas, um sistema com alta concentração de Cardiolipina pode apresentar duas formas termodinamicamente estáveis: bicamadas empilhadas paralelamente ou vesículas de perfil hexagonal. A importância da Cardiolipina no nosso trabalho deve-se ao fato de possuir carga elétrica líquida negativa permitindo o estudo de efeitos relacionados a afinidades eletrostáticas entre droga e membrana.

O EPC, ao contrário do DPPC e da CL, apresenta-se, a temperatura ambiente no estado líquido-cristalino. As membranas-modelo de EPC são importantes pois simulam de maneira mais adequada sistemas de membranas naturais, por apresentar vários tipos de cadeias hidrocarbonadas na cauda hidrofóbica.

A conformação das cadeias hidrocarbônicas e o grau de movimentação que apresentam seus diferentes segmentos a uma dada temperatura são fatores que delimitam a fluidez e permeabilidade da fase lipídica da bicamada.

5. PROPRIEDADES CITOTÓXICAS DA ELIPTICINA

Como vimos anteriormente, a ELPT possui uma estrutura simples e apresenta um caráter hidrofóbico. Vimos também que a membrana é concebida como uma bicamada lipídica e sabemos que substâncias hidrofóbicas, tais como hidrocarbonetos, atravessam a membrana obedecendo uma lei de difusão passiva ⁽¹⁴⁾ e que várias drogas anticancerígenas tais como Nitrosoureia ⁽¹⁵⁾, Clorambucil ⁽¹⁶⁾, Busulfan ⁽¹⁷⁾, Procarbazina ⁽¹⁸⁾, Hexametilmelanina ⁽¹⁹⁾, Hidroxiureia ⁽²⁰⁾ e Mitoxantrona ⁽²¹⁾, seguem essa mesma lei.

Estudos por ESR (Electron Spin Ressonance) ⁽²²⁾ demonstram que a interação entre uma série de hidrocarbonetos aromáticos de diferentes formas e tamanhos (fig. 5.1), com membranas-modelo (DPPC), induz a alteração do grau de organização das moléculas de fosfolipídeos. Hidrocarbonetos menores, promovem apenas uma pequena desordem enquanto hidrocarbonetos maiores induzem uma transição de fase gel-líquido cristalina, acarretando o aumento da permeabilidade da bicamada ⁽²³⁾.

Estudos por difração de raios-X demonstram que a inclusão de vários hidrocarbonetos cancerígenos em membranas-modelo (DPPC) alteram o perfil de densidade eletrônica da bicamada, evidenciando sua inclusão na região hidrofóbica. ⁽¹²⁾⁽²⁴⁾

Vemos, então, que características anfifílicas de drogas podem ser vitais no entendimento da interação com sistemas de membranas-modelo. Analisemos, pois, algumas das propriedades da Elipticina.

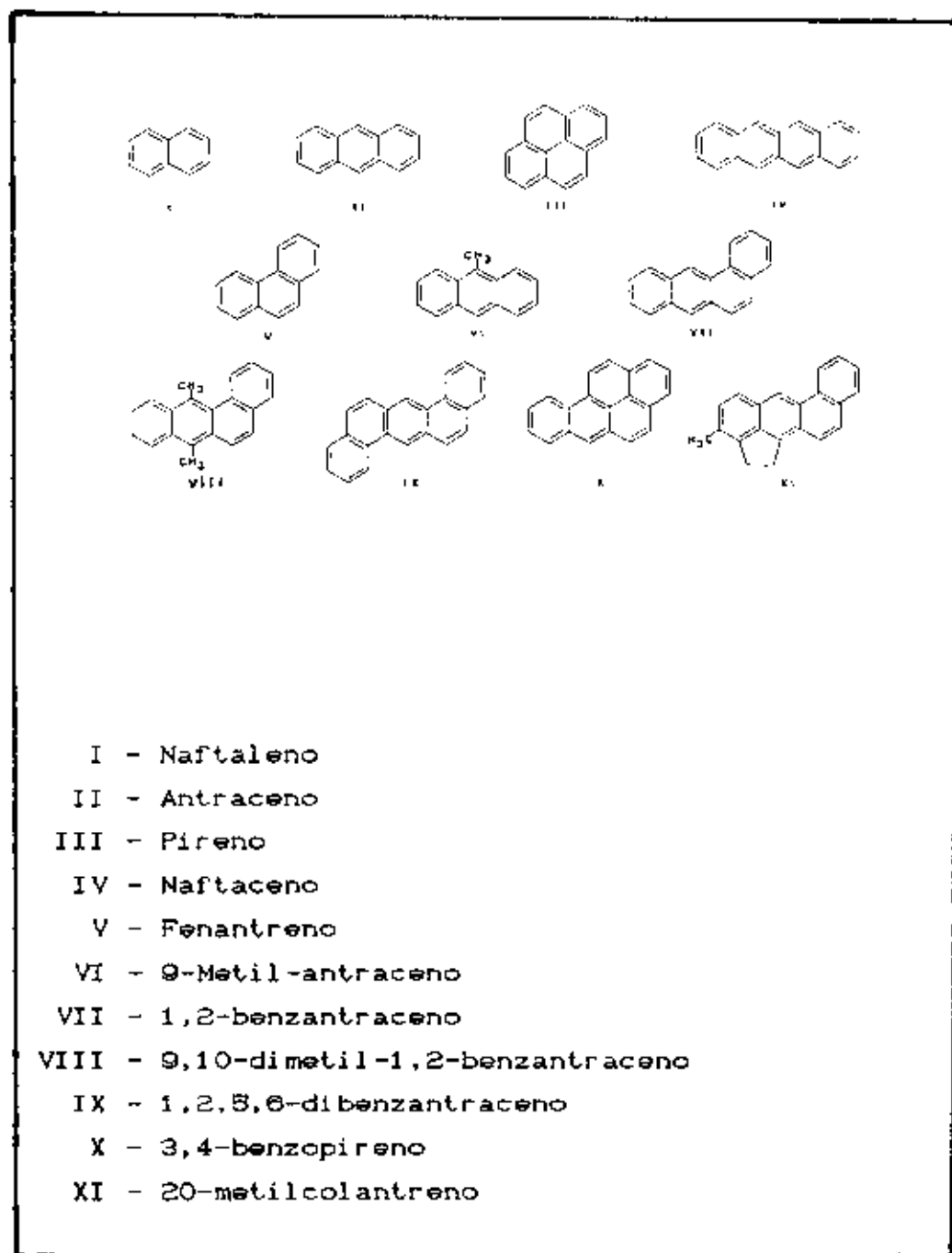


Fig. 5.1 - Hidrocarbonetos Aromáticos

5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA ELIPTICINA

A ELPT apresenta-se sob duas formas, de acordo com o pH: neutra e protonada. O Nitrogênio da posição 2 (piridina) pode se apresentar carregado positivamente, o que altera algumas propriedades da molécula. Assim, é importante definir o pK_a da ELPT, ou seja, o pH na qual a droga está 50% neutra e 50% protonada. Segundo Le Peck ⁽²⁵⁾, seu pK_a é 6,8. Porém, quando colocamos a ELPT em contato com membranas, se os coeficientes de partição das duas formas, entre membrana e água, forem muito diferentes, haverá um "sequestro" da forma mais lipofílica pela membrana, de modo que o meio externo não estará mais equilibrado. No caso da ELPT, sabemos que a forma neutra tem maior coeficiente de partição, o que implica em uma predominância da forma protonada fora da membrana. Assim, para que haja um novo equilíbrio, é preciso aumentar o pH, e isso define o pK aparente da droga, isto é, o pH em água onde há 50% de cada uma das formas. Segundo Terce ⁽²⁶⁾, o pK aparente da ELPT, na presença de DPPC é 7,2 enquanto que na presença de Dipalmitil-Fosfatidilglicerol (DPPG), um fosfolípido aniônico, é 8,6. Isso indica que de alguma forma a carga líquida da membrana altera sua interação com a ELPT, ou seja, interações eletrostáticas também são essenciais no entendimento dos mecanismos de ação da droga.

Essas ideias são comprovadas por estudos em monocamadas ou por espectroscopia.

Estudos espectrofotométricos⁽²⁶⁾ indicam que o espectro na região do UV é fortemente influenciado pelo grau de ionização da droga: em etanol, a forma neutra apresenta 3 picos enquanto a forma protonada apenas 1, com um desvio para o vermelho (red shift) sem alterações significativas do coeficiente de absorção; em água, o mesmo desvio para o vermelho é observado, porém com um grande decréscimo no coeficiente de absorção, o que indica a formação de dímeros e oligômeros em soluções aquosas neutra e básicas. (fig. 5.1.1)

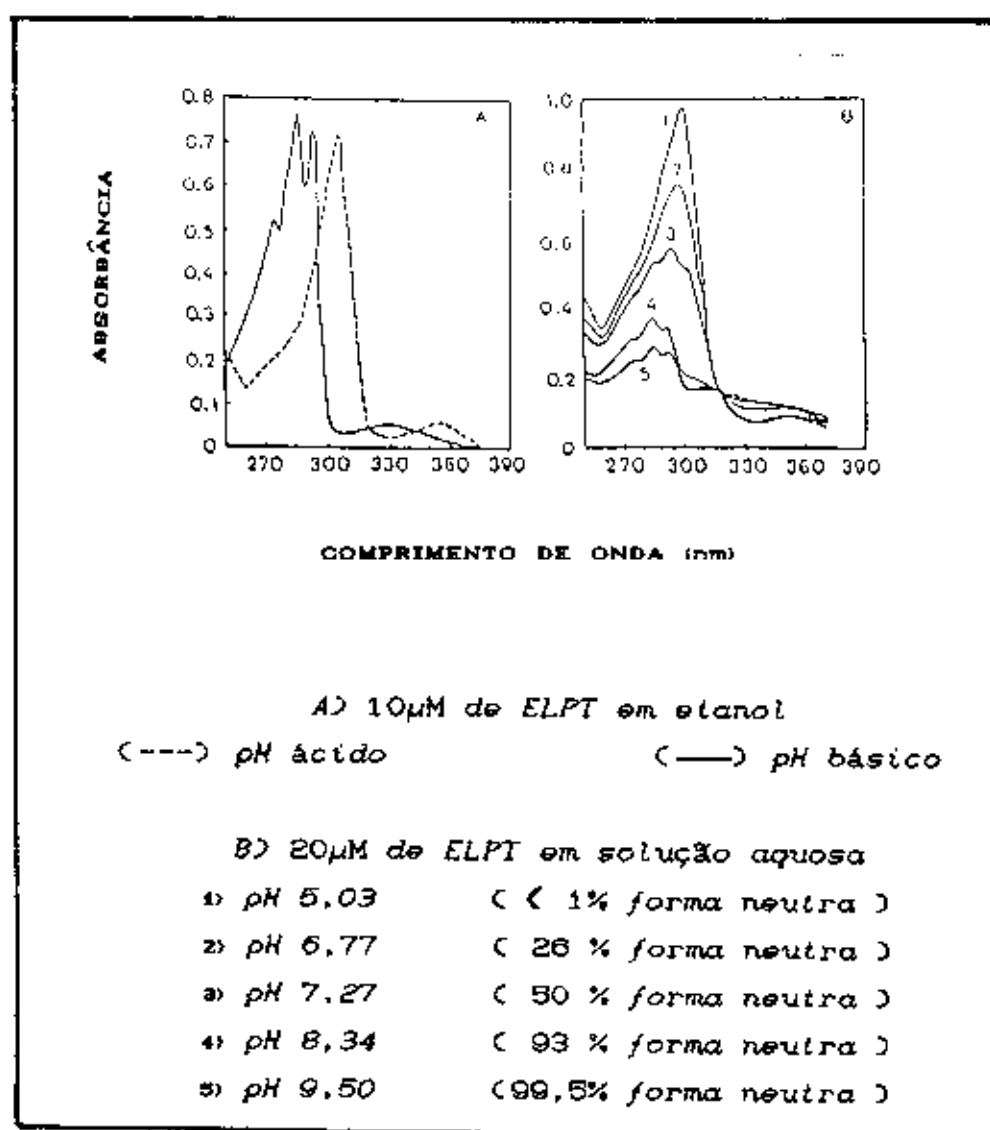


Fig. 5.1.1 - Espectro UV da ELPT⁽²⁶⁾

Estudos em monocamadas⁽²⁵⁾⁽³⁷⁾, através da monitoração da pressão superficial (Π) (fig. 5.1.2) e do potencial de superfície ($\Delta\psi$) indicam que a ELPT na forma protonada (pH 5,0 a 6,0) praticamente não interage com lipídeos zwitteriônicos, enquanto que com lipídeos aniônicos a interação é muito forte (na razão estequiométrica de 1:1 droga:lipídeo). Um resultado interessante é a ação do cátion Ca^{2+} desestabilizando a interação ELPT-lipídeo aniônico⁽²⁵⁾. Sabe-se que o Ca^{2+} tem grande afinidade pelo grupamento fosfato de fosfolipídeos aniônicos, o que sugere que haja uma competição por esses sítios da membrana, evidenciando a interação eletrostática entre $(\text{ELPT})^+$ e $(\text{fosfato})^-$.

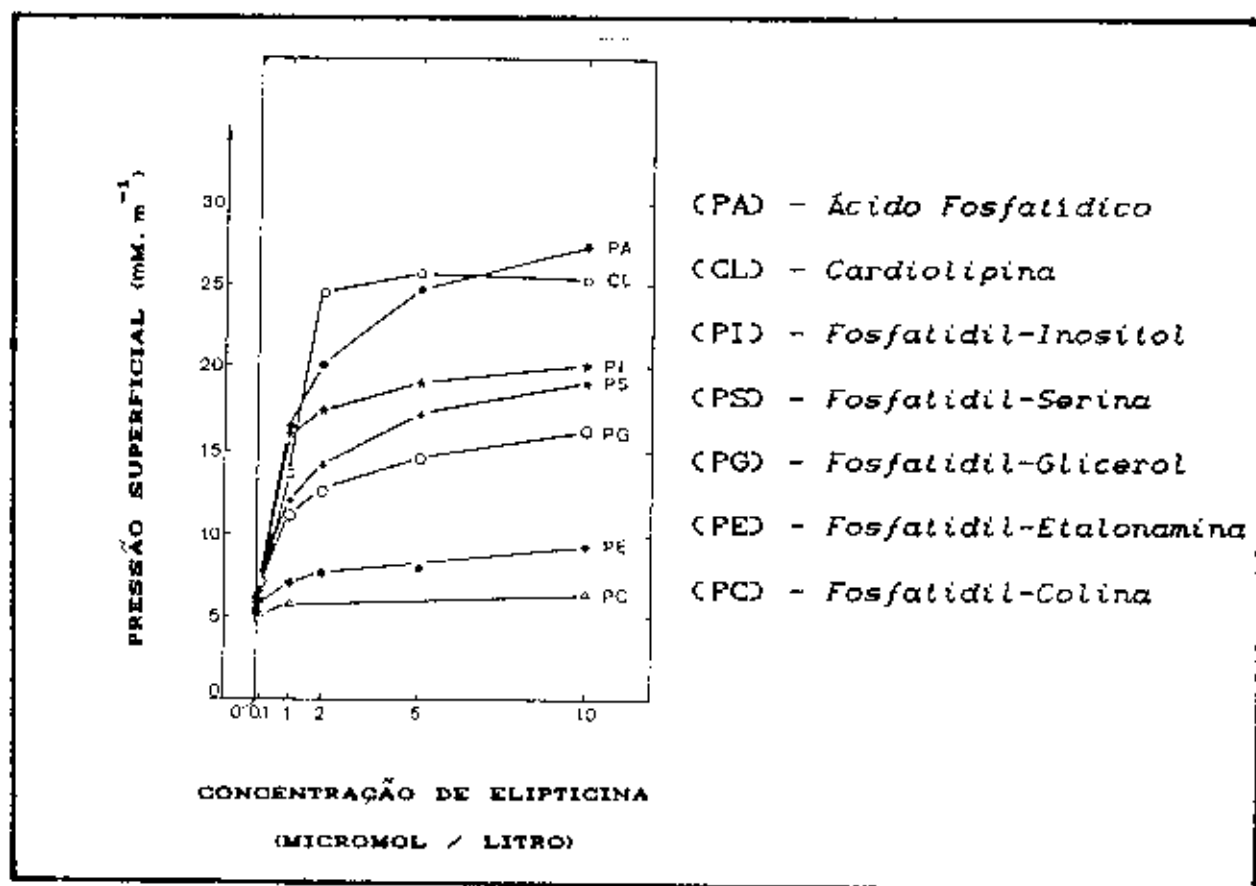


Fig. 5.1.2 - Pressão Superficial versus Concentração de ELPT⁽²⁵⁾

$\Pi_0 = 5 \text{ mN/m}$ - Subfase: 10^{-2} M NaCl - pH 6,0

5.2 EFEITOS BIOQUÍMICOS DA ELIPTICINA

Na busca do entendimento da ação da Elipticina, como agente anti-cancerígeno, várias idéias foram propostas a partir de estudos com células leucêmicas, *in vivo* ou *in vitro*. Estes estudos procuram determinar a relação Estrutura-Atividade (Apêndice A3) através da utilização de vários derivados da ELPT.

Procuremos compilar alguns dos efeitos bioquímicos produzidos pela ELPT (forma natural) em células com atividade leucêmica (Leucemia L1210), uma vez que são as mais estudadas, em especial pelos franceses.

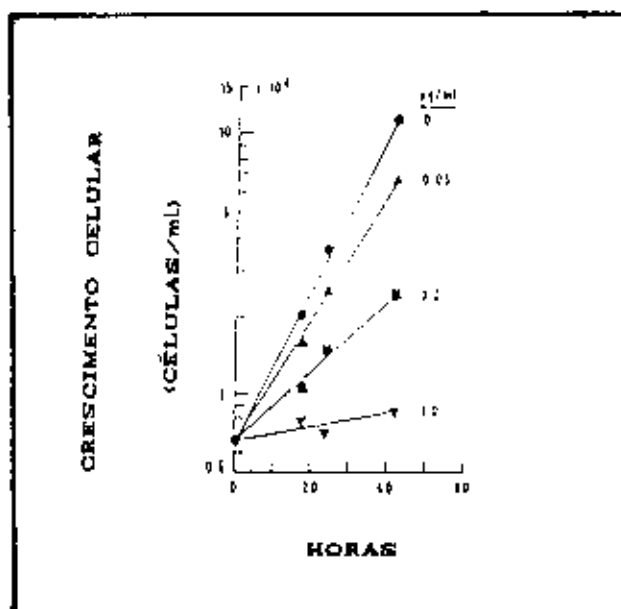


Fig 5.2.1 - Ação Inibitória da ELPT⁽²⁷⁾

Incubação de aproximadamente 5×10^5 células/ml a 37°C em diferentes concentrações da droga. Determinação no número de células duas vezes ao dia, por 3 dias, sendo feita comparação com células-controle (sem droga).

Um dos primeiros resultados, comum a varios os trabalhos nessa linha, é a capacidade da ELPT em diminuir o número de células (3)(27)(31)(50) por unidade de volume. Essa diminuição não indica que a ELPT seja capaz de destruir a célula, mas sim, sua ação inibitória no mecanismo de divisão celular (fig 5.2.1) (27)

Observa-se que células crescidas, in vitro, em contato com a droga, quando reinjetadas em animais, não produzem tumores, ao contrário de células controle. (9)

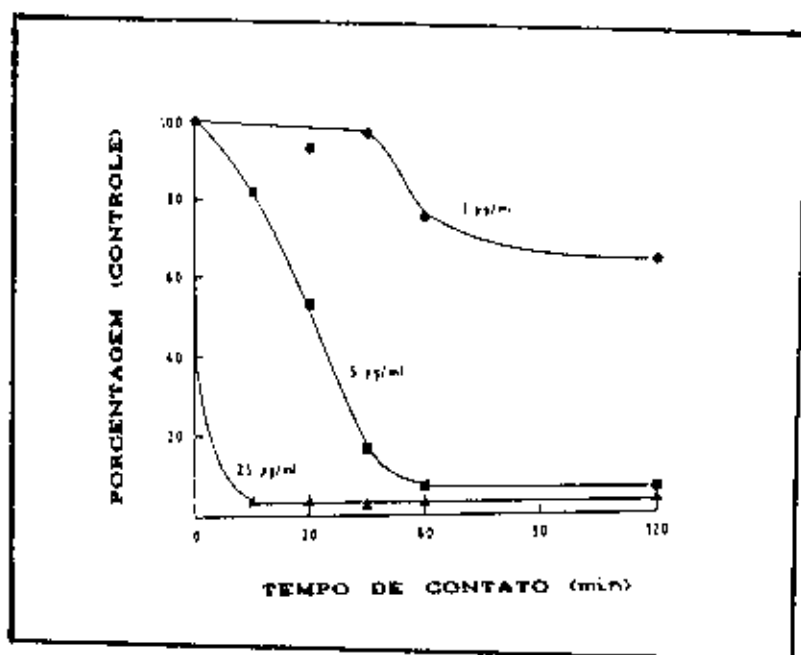


Fig. 5.2.2 - Ação Inibitória residual da ELPT (27)

Incubação de aproximadamente 5×10^5 células/ml em diferentes concentrações de ELPT por períodos de 15 a 120 minutos. Após incubação, a droga é removida por centrifugação; após lavagem, as células são incubadas a 37°C por 3 dias. A seguir é determinado o número de células existentes e comparado com o controle.

A ELPT inibe a divisão celular tão logo ela entra em contato com a célula.⁽²⁷⁾ Células expostas a droga por um curto período de tempo (15 - 120 minutos) demonstram uma inibição na taxa de crescimento, mesmo que a droga seja removida por centrifugação e lavagem. Este fenômeno, porém, depende da concentração usada. Para concentrações baixas ($1\mu\text{g ELPT}/5 \times 10^5$ células), a inibição é observada apenas após 1 hora de contato enquanto que doses altas ($25\mu\text{g ELPT}/5 \times 10^5$ células) inibem por completo a divisão após apenas 15 minutos de contato (fig 5.2.2).⁽²⁷⁾

A inibição do crescimento celular pela ELPT não é revertida pela adição de vários metabólitos como por exemplo purinas, pirimidinas, ácidos carboxílicos, vitaminas e aminoácidos. Assim, não se conhece nenhum inibidor disponível para a ELPT (fig 5.2.3).⁽²⁷⁾

Observa-se também a inibição da síntese de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) de acordo com a dose aplicada (fig 5.2.4).⁽²⁷⁾ O mesmo efeito residual observado na inibição do crescimento celular aparece na síntese de macromoléculas mostrando que em altas doses a inibição da ação da ELPT é irreversível após períodos de apenas 30 minutos.

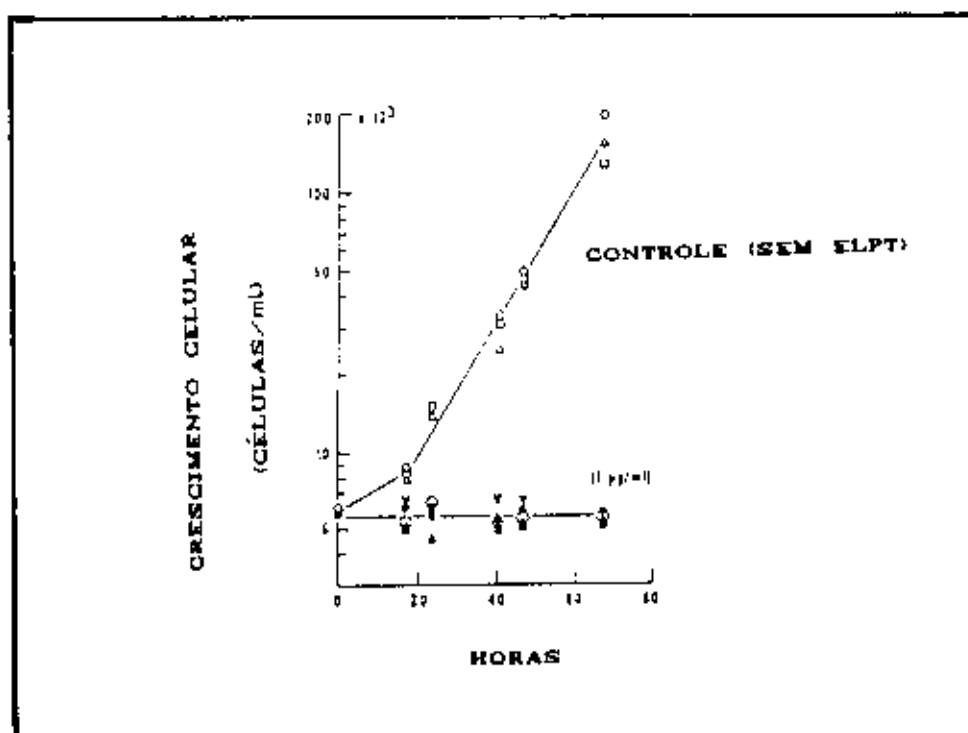


Fig. 5.2.3 - Desativação da ELPT⁽²⁷⁾

Incubação de aproximadamente 6×10^3 células/ml a 37°C com 0,5 ml de metabólitos e 0,5 ml de ELPT (ou não). O número de células é contado duas vezes ao dia por 3 dias.

- sem ELPT
- com ELPT
- purina (50 $\mu\text{g/ml}$) e pirimidina (50 $\mu\text{g/ml}$)
- ELPT e mistura purina-pirimidina
- △ vitaminas (50 $\mu\text{g/ml}$)
- ▲ ELPT e vitaminas
- intermediários do ácido tricarboxílico
- ELPT e intermediários do ácido tricarboxílico
- ▽ amino-ácidos
- ▼ ELPT e amino-ácidos

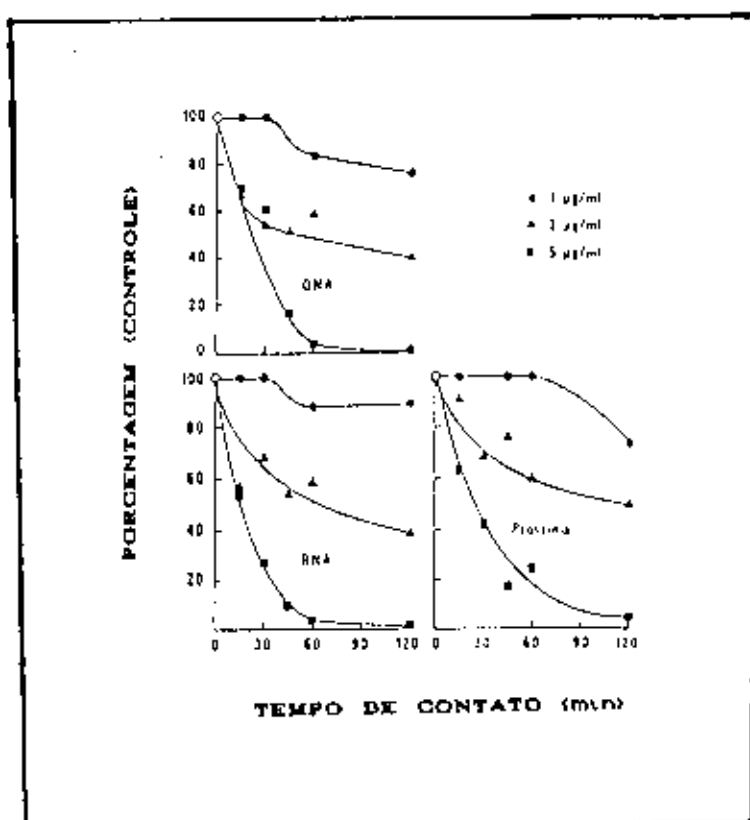


Fig 5.2.4 - Inibição da Síntese de Macromoléculas⁽²⁷⁾

Incubação de aproximadamente 5×10^5 células/ml em diferentes concentrações de ELPT por períodos de 15 a 120 minutos. A seguir a droga é retirada por centrifugação e lavagens sucessivas. As células "lavadas" são ressuspensas na presença de precursores radioativos (timidina, uridina e leucina). A partir da atividade específica (cpm/ 10^5 células) é calculada a eficiência da inibição, em comparação com células controle.

Estudos em núcleos de células hepáticas de camundongos normais e leucêmicos indicam que a ELPT é ineficaz na inibição da RNA-polimerase, mesmo em doses altas^[27] (50 µg ELPT / 5×10^5 células). Esse resultado está de acordo com estudos feitos em bactérias *Micrococcus Lysodeikficus*^[27] e *Escherichia Coli*^[48].

A ELPT é uma droga que apresenta um baixo poder de inibição sobre a atividade da RNA-polimerase, quando comparada com outros agentes quimioterápicos (Apêndice A2) com comprovada ação no DNA^[49]. A discrepância entre a ineficiência da ELPT sobre a RNA-polimerase e o grande poder inibitório da síntese de RNA permanece em aberto, havendo alguns estudos que demonstram a ação da ELPT sobre processos de maturação de RNA's ribossômicos^[49].

Em células leucêmicas L1210 não se observa nenhum subproduto da transformação da ELPT. Isso leva-nos a concluir que, nesse caso específico, estudos "in vitro" possuem uma grande correlação com situações "in vivo" e que a eficiência da droga deve-se exclusivamente à sua ação direta.

A ELPT é capaz de causar danos intracelulares não específicos:^[3] multilobação do núcleo, aumento do número de grânulos lipídicos, diminuição do tamanho e aumento da variedade de formas das mitocôndrias (configuração condensada), formações concêntricas do retículo endoplasmático rugoso, ao redor do núcleo, inchamento da membrana celular e do retículo endoplasmático liso e início de necrose, evidenciada por forte coloração da cromatina e mitocôndrias.

Comparando com outra droga usada em células L1210, a "Actinomicina D", a ELPT é 1000 vezes menos eficaz (relação molar); já o derivado 9-Hidroxi-Elipticina (9-OH-ELPT) é apenas 15 vezes menos eficiente.^[19]

Um outro resultado importante é o efeito imunossupressor em células L1210. O efeito imunossupressor é um grave efeito colateral presente na Quimioterapia.^[20] A ELPT é capaz de reduzir em até 350 vezes o número de células formadoras de anticorpos; a 9-OH-ELPT, em até 1000 vezes. Esse efeito pode ser explorado em transplantes.^[29]

Uma grande discussão aparece em relação aos efeitos das Elipticinas quaternarizadas (série do Elipticinium) (tabela 2.1). Essa série foi sintetizada com a finalidade de aumentar a afinidade pelo DNA^[30] através de uma provável interação entre o Nitrogênio N2 da ELPT com grupamentos fosfato (PO_4^{2-}).

Muitos trabalhos discutem a eficiência desses derivados carregados positivamente, comparando-os com a ELPT natural, porém a um pH ácido ou neutro. Como vimos anteriormente (item 5.1) o pK varia na presença de membranas. Assim, em pH ácido temos, predominantemente a forma protonada da ELPT, que não se diferencia eletrostaticamente do Elipticinium (tabela 2.1). Com isso, muitas conclusões tornam-se inviáveis, pois são baseadas em raciocínios sobre a forma neutra, com dados obtidos na forma protonada.

Existem casos onde a forma neutra da ELPT é fundamental na ação da droga. Sabe-se que em sistemas enzimáticos, que metabolizam uma ampla variedade de substâncias tóxicas (drogas, pesticidas, etc), durante o processo de desintoxicação, geram-se um grande número de metabólitos com atividade carcinogênica. Essa biotransformação consiste em uma oxidação mediada pelo citocromo P450.^[92] Sabe-se que a ELPT tem forte afinidade a esse citocromo e estudos espectroscópicos mostram que essa afinidade é decorrente da interação do Nitrogênio N2 da ELPT com o grupo Heme do citocromo. (fig 5.2.5)^[93]

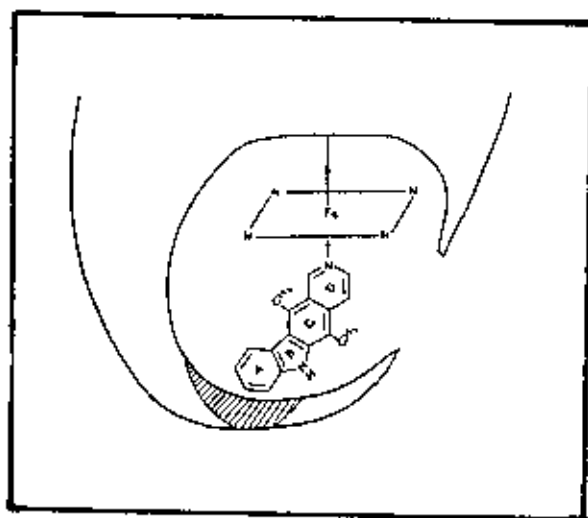


Fig. 5.2.5 - Interação ELPT-Citocromo^[93]

6. INTRODUÇÃO À TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Sabemos que uma bicamada lipídica tem uma espessura da ordem de 60 Å. Isso impossibilita sua observação por microscopia óptica e não é adequadamente resolvida por microscopia eletrônica. Assim, técnicas de difração de raios-X, cujo comprimento de onda é da ordem de 1,5 Å servem como instrumento para determinação da estrutura desses sistemas à nível molecular (item 0).

Sabemos que a difração de raios-X não é a única técnica apropriada para estudar sistemas de membranas, havendo também estudos usando EPR, NMR, espectroscopia de fluorescência e Raman. A difração de raios-X à baixo ângulo torna-se interessante por ser uma técnica não-destrutiva que dispensa o uso de sondas, permitindo a observação da bicamada (cela unitária, item 0) como um todo.

Para que haja difração, é necessário que o sistema em estudo seja periódico (item 7.3). Assim, torna-se vital a preparação de sistemas multilamelares (multibicamadas) que possuam ordem suficiente para produzir a difração, e condições de umidade, pH, temperatura e concentração que permitam uma correlação com membranas naturais (item 12.1).

Procuremos agora entender como técnicas de difração de raios-X podem ser úteis no estudo dos mecanismos de ação da Elipticina, discutindo seus fundamentos, vantagens e limitações, bem como as técnicas de preparação das amostras.

7. INTERAÇÃO RADIAÇÃO-MATÉRIA

7.1 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X POR UM ELÉTRON

A dualidade onda-partícula das radiações eletromagnéticas foi alvo de muita atenção e controvérsia no início desse século. A natureza ondulatória dos raios-X era facilmente observada através de fenômenos de interferência (M. Von Laue recebeu, em 1914, o prêmio Nobel por usar cristais como rede de difração; W. L. Bragg recebeu-o em 1915 por seu modelo de "planos refletivos" das ondas de raios-X). Em 1923, através de experiências realizadas por A. H. Compton, pode ser constatada a natureza corpuscular dos raios-X, estabelecendo-se, assim, a dualidade onda-partícula das radiações eletromagnéticas.

Segundo a teoria eletromagnética clássica, se um feixe incidente monocromático de raios-X fosse espalhado por um alvo, os feixes espalhados deveriam ter o mesmo comprimento de onda λ da radiação incidente. Compton realizou esse experimento e observou, além do feixe com comprimento de onda λ , um segundo feixe espalhado com comprimento de onda $\lambda' > \lambda$. Observou também que a frequência dessa segunda radiação era independente do alvo, e concluiu que era devido à interação da radiação com os elétrons do alvo. Compton interpretou seus resultados considerando a radiação incidente como um conjunto de fótons que, ao colidirem com os elétrons do alvo, transferiam parte de sua energia, dando origem, assim, a um feixe espalhado com um comprimento de onda maior que o incidente.

Supondo os elétrons livres e inicialmente em repouso, Compton deduziu uma equação que descrevia o aparecimento de um segundo feixe, com comprimento de onda λ' :⁽³⁴⁾

$$\Delta\lambda = \lambda' - \lambda = 0,0243 (1 - \cos \theta)$$

onde, θ = ângulo de espalhamento

As suposições feitas por Compton podem ser justificadas se considerarmos que a energia de um fóton de raios-X ($\approx 10^4$ eV) é várias ordens de grandeza maior do que a energia de ligação de um elétron (≈ 10 eV).

O processo de espalhamento de fótons no qual não há diferença entre os comprimentos de onda das radiações incidente e espalhada é chamado de *espalhamento Thomson*, em homenagem a J. J. Thomson que desenvolveu, por volta de 1900, uma teoria clássica de espalhamento de raios-X por elétrons. Thomson considerou os raios-X como sendo um feixe de ondas eletromagnéticas cujo campo elétrico oscilante interagiu com os elétrons do alvo. Esta interação faz com que os elétrons oscilem na mesma frequência. Como resultado de suas acelerações, os elétrons irradiam ondas eletromagnéticas com mesma frequência e fase da onda incidente. Assim, a energia do feixe incidente é espalhada em todas as direções sem modificação do comprimento de onda.

É extremamente interessante analisarmos como os espalhamentos Thomson e Compton interferem num estudo de difração de raios-X. No caso Compton não existe uma relação constante entre as fases dos fótons incidente e espalhado e, sendo a difração um fenômeno essencialmente de interferência, observamos apenas um espalhamento difuso, tornando-se mais intenso quanto maior for o ângulo de espalhamento.

No espalhamento Thomson as ondas incidentes e espalhadas possuem a mesma frequência e fase e podem sofrer interferências construtivas ou não. O espalhamento Thomson pode ser explicado usando-se a Teoria Cinemática ou a Teoria Dinâmica de raios-X. Na Teoria Cinemática não são levadas em conta as interações entre as ondas incidentes e espalhada; essa teoria é indicada no caso de pequenos cristais ou estruturas cristalinas imperfeitas. Quando se deseja estudar cristais altamente ordenados, recorreremos à Teoria Dinâmica na qual as ondas incidentes e espalhada formam um sistema acoplado alterando a intensidade dos espectros obtidos.

Uma análise quantitativa do espalhamento Thomson nos fornece a expressão da intensidade espalhada por um elétron (I_e):⁽⁹⁵⁾

$$I_e = I_0 \frac{e^4}{r^2 m^2 c^4} \left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \right) \quad \text{eq. 7.1}$$

O tratamento feito por Thomson é válido para elétrons livres. Sabemos que os elétrons de um átomo estão ligados ao núcleo por forças que dependem do tamanho do átomo e do estado quântico do elétron. Desde que a energia envolvida na interação seja muito maior do que a energia de ligação do elétron, a hipótese de elétron-livre é válida.

Sabemos também que os elétrons em um átomo podem ser analisados como osciladores, cuja frequência depende da energia de ligação. Quando a frequência da onda incidente é próxima a frequência de oscilação do elétron, ocorre a chamada "dispersão anômala", que causa uma mudança da fase da onda espalhada⁽⁹⁵⁾. Se as frequências são bem diferentes ocorre apenas uma mudança na velocidade de propagação da onda transmitida, o que caracteriza o índice de refração do meio. Experimentalmente sabe-se que o índice de refração para raios-X difere de 1 em uma parte por milhão para a maioria dos materiais.

7.2 ESPALHAMENTO DE RAIÓ-X POR UM ÁTOMO

Quando um feixe de raios-X encontra um átomo, cada um de seus elétrons espalha parte da radiação, coerentemente, de acordo com a equação de Thomson (eq. 7.1). O núcleo também é capaz de espalhar a radiação, pois também possui carga elétrica e pode oscilar sob a ação do feixe incidente. Porém, devida a sua grande massa em relação a do elétron, sua influência torna-se desprezível. Analisando a equação de Thomson, vemos que a intensidade do espalhamento é inversamente proporcional ao quadrado da massa. Sendo a relação entre as massas do núcleo e do elétron da ordem de 10^4 , temos que a relação de intensidades é da ordem de 10^{-8} .

$$\frac{m_{\text{nucleo}}}{m_{\text{eletron}}} \cong 10^4 \implies \frac{I_{\text{nucleo}}}{I_{\text{eletron}}} \cong 10^{-8}$$

O fato de os elétrons de um átomo estarem "localizados" em pontos diferentes do espaço faz com que as ondas espalhadas por diferentes elétrons possuam fases diferentes.

Podemos visualizar esse efeito com ajuda da figura 7.1. As ondas espalhadas na direção $2\theta = 0^\circ$ pelos elétrons A e B atingem a linha XX' em fase pois, percorreram caminhos equivalentes. As ondas espalhadas numa direção $2\theta \neq 0^\circ$, atingem uma linha YY' fora de fase, pois percorreram caminhos diferentes. A diferença de caminho ($CB - AD$) faz com que haja uma interferência parcial de forma que a intensidade espalhada nessa direção seja menor do que na direção $2\theta = 0^\circ$.

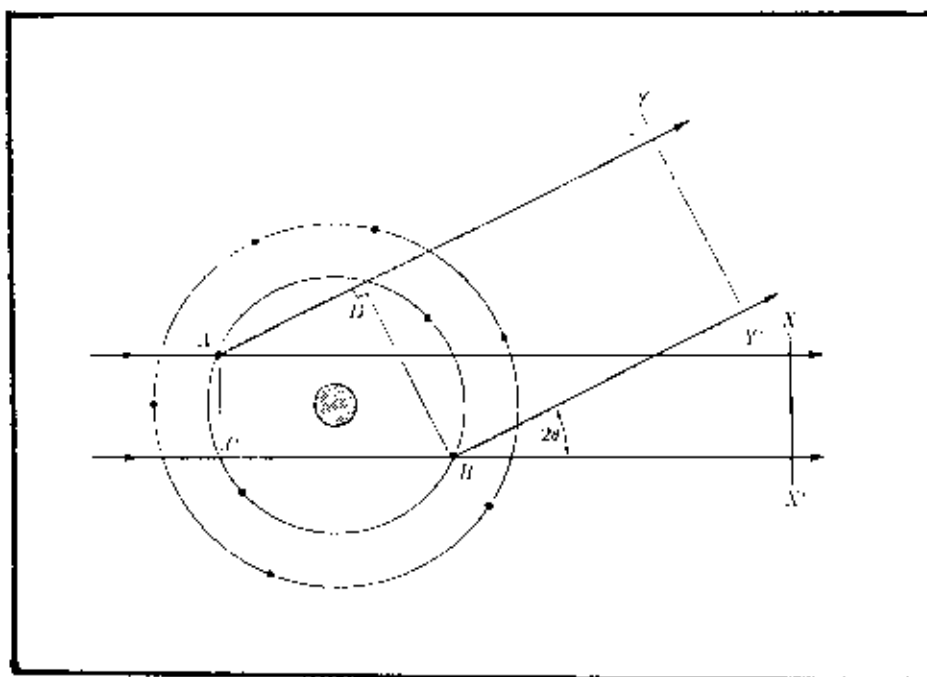


Fig. 7.1 - Espalhamento por um átomo ⁽¹⁸⁶⁾

A "eficiência" no espalhamento de um dado átomo, numa certa direção, chamada de fator de espalhamento atômico é definida por:

$$f = \frac{\text{amplitude da onda espalhada por um átomo}}{\text{amplitude da onda espalhada por um elétron}}$$

O fator de espalhamento atômico depende da direção (θ) da onda espalhada e do comprimento de onda (λ) do feixe incidente (fig 7.2).

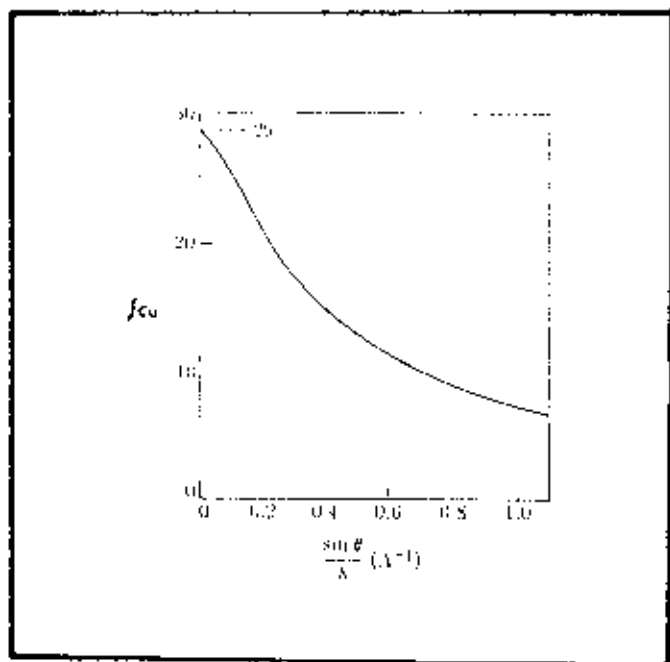


Fig. 7.2 - Fator de espalhamento Atômico (Cobre)⁽²⁰⁾

Vimos anteriormente que o efeito Compton, ou seja, o espalhamento incoerente da radiação, pode ser significativo para átomos cujos elétrons estão fracamente ligados. Assim, a intensidade do espalhamento tipo-Compton aumenta conforme o número atômico Z diminui. Essa é uma das dificuldades de obtermos bons diagramas de difração de raios-X de amostras de material biológico, pois o espalhamento incoerente produz um ruído de fundo que se sobrepõe às linhas de difração.

7.3 LEI DE BRAGG

A difração de raios-X por um arranjo de átomos é um fenômeno essencialmente de interferência de ondas. Para duas ondas sofrerem interferência construtiva elas devem ter a mesma frequência e fase.

Bragg havia observado que um feixe de raios-X incidindo sobre determinado alvo era difratado em apenas algumas direções. Em 1912 propôs um modelo de "planos refletores de raios-X", em analogia a fenômenos ópticos.

Consideremos um conjunto de átomos dispostos como na figura a seguir:

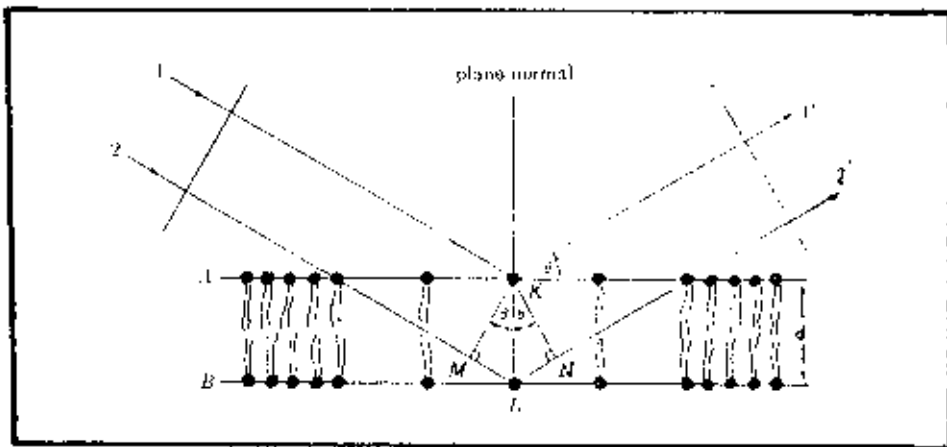


Fig. 7.3 - Lei de Bragg

Sejam os feixes incidentes 1 e 2 com mesmo comprimento de onda λ . Para que eles sofram interferência construtiva é essencial que a diferença de caminho ($ML + LN$) seja igual a um número inteiro n de comprimentos de onda λ . Assim, temos,

$$n\lambda = ML + LN$$

$$n\lambda = d \operatorname{sen}\theta + d \operatorname{sen}\theta$$

$$n\lambda = 2 d \operatorname{sen}\theta$$

eq. 7.2

Esta relação, conhecida por *Lei de Bragg*, estabelece as condições para que a difração possa ocorrer. Ela pode ser encarada como uma "lei restritiva", pois estabelece que a difração ocorre apenas em algumas poucas direções.

7.4 ESPALHAMENTO POR UMA CELA UNITÁRIA

Analisemos o espalhamento por um cristal restringindo-nos ao caso de espalhamento coerente, de acordo com as observações anteriores.

Vimos anteriormente que a radiação é espalhada pelos elétrons de um átomo. No caso de um cristal, onde os átomos estão localizados em um arranjo periódico, estaremos em condições de interferência construtiva apenas em direções particulares. As radiações espalhadas nessas direções são chamadas de feixes difratados e são descritas pela Lei de Bragg (eq. 7.2).

Procuremos determinar a intensidade do feixe difratado por um cristal em função da posição dos átomos, assumindo que a Lei de Bragg é satisfeita. Uma vez que um cristal pode ser tratado como uma repetição de uma cela unitária, é suficiente considerar a forma na qual o arranjo de átomos dentro da cela unitária afeta a radiação incidente.

De forma similar ao espalhamento por um átomo, devido aos elétrons, as ondas espalhadas por uma cela unitária, devido aos átomos, não estão necessariamente em fase (exceto na direção do feixe incidente) e podemos determinar como a diferença de fases depende do arranjo dos átomos.

Por conveniência, analisemos uma cela unitária ortogonal, cuja secção é mostrada na figura 7.4

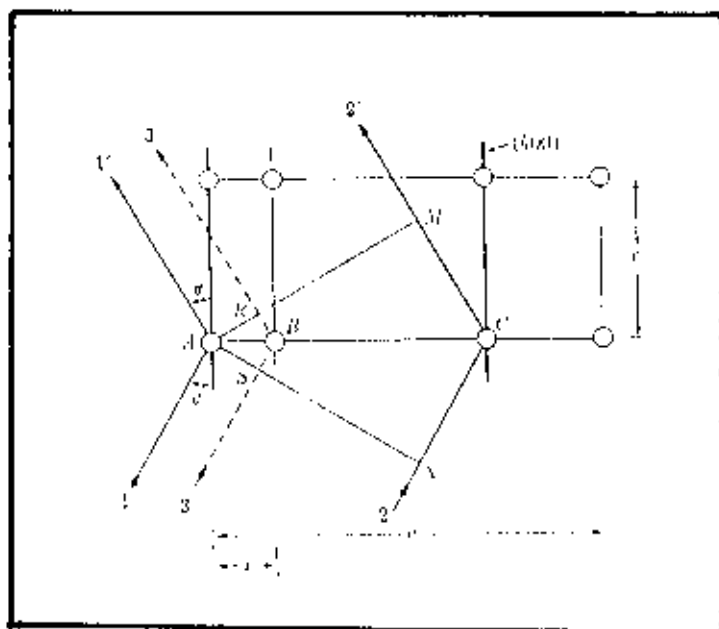


Fig. 7.4 - Espalhamento por uma cela unitária^[26]

Analiseemos a diferença de fase entre as ondas espalhadas por um átomo na origem e outro cuja posição pode variar apenas na direção x . Seja o átomo A localizado na origem e analisemos a difração nos planos $(h00)$. Assim, a diferença de caminho $\delta_{2,1'}$ entre os feixes $2'$ e $1'$ é dada por:

$$\delta_{2,1'} = MN = 2 d_{h00} \sin\theta = \lambda$$

Da definição de índices de Miller¹⁹⁰³, temos:

$$d_{h00} = AC = \frac{a}{h}$$

No caso de um átomo B , localizado a uma distância x de A , podemos escrever a diferença de caminhos $\delta_{g'1'}$, como:

$$\delta_{g'1'} = RBS = 2 BS = 2 \frac{AB}{AC} CN = \frac{AB}{AC} \lambda = \frac{x}{a/h} \lambda$$

Geralmente definimos a diferença de fase ϕ em unidades angulares. Se a diferença de caminho é δ , a diferença de fase é dada por :

$$\phi = \frac{\delta}{\lambda} 2\pi$$

Assim, podemos escrever:

$$\phi_{g'1'} = \frac{\delta_{g'1'}}{\lambda} 2\pi = \frac{2\pi hx}{a}$$

Se a posição de B for escrita em termos de coordenadas fracionais u, teremos:

$$u = \frac{x}{a}$$

$$\phi_{21'} = 2\pi hu$$

Extendendo para 3 dimensões (figura 7.5), podemos escrever que a diferença de fase entre as ondas espalhadas por um átomo A na origem e um átomo B, localizado no ponto (x,y,z), pelo plano (hkl), é dado por:

$$\phi = 2\pi (hu + kv + lw)$$

onde

$$u = \frac{x}{a}$$

$$v = \frac{y}{b}$$

$$w = \frac{z}{c}$$

Esta relação é geral e aplicável para células unitárias de formato qualquer (fig. 7.5).

Duas ondas podem diferir não apenas na fase, mas também na amplitude se os átomos espalhadores forem diferentes. Nesse caso, a amplitude das ondas é dada em termos do fator de espalhamento atômico.

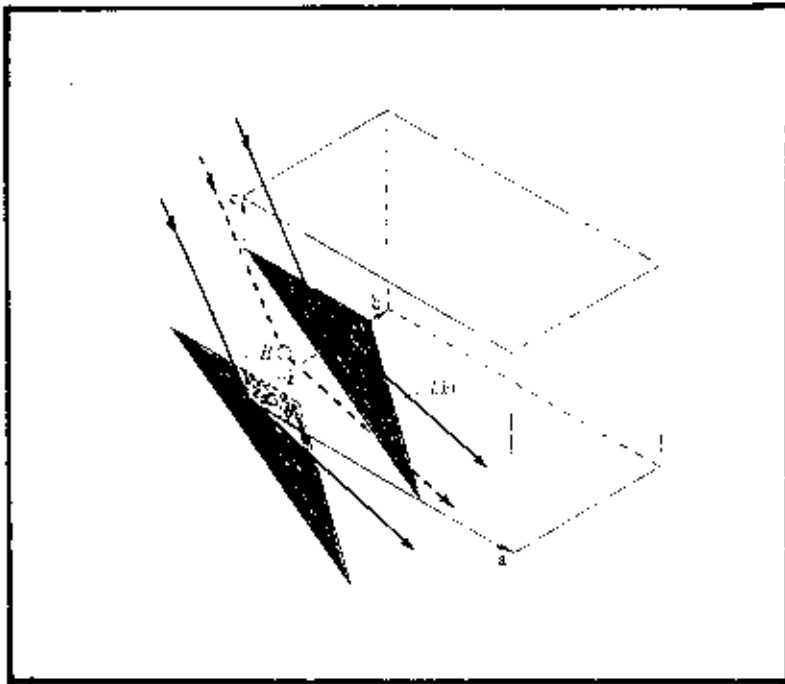


Fig. 7.5 - Espalhamento por uma cela unitária qualquer⁽³⁰⁾

Analisemos agora como as ondas espalhadas pelos átomos de uma cela unitária, com amplitudes e fases diferentes, interferem-se, gerando um feixe difratado.

Podemos representar uma onda de amplitude A e fase ϕ por:

$$\Psi = Ae^{i\phi} = A(\cos\phi + i\sin\phi)$$

Sabemos que a intensidade dessa onda é proporcional a:

$$\Psi^* \Psi = A^* e^{-i\phi} A e^{i\phi} = A^2$$

A intensidade da onda espalhada por um átomo é proporcional ao fator de espalhamento atômico f . A fase da onda é, como visto anteriormente, dada em função das coordenadas fracionais uvw do átomo e dos índices hkl da reflexão. Assim, podemos expressar uma onda espalhada por um átomo como:

$$Ae^{i\phi} = f e^{2\pi i(hu + kv + lw)}$$

Seja agora uma cela unitária contendo os átomos $1, 2, \dots, N$, com coordenadas fracionais $u_1, v_1, w_1, u_2, v_2, w_2, \dots, u_n, v_n, w_n$, e fatores de espalhamento atômico f_1, f_2, \dots, f_n . A onda espalhada resultante, devido a todos os átomos, para uma reflexão hkl , é dada por:

$$F_{hkl} = \sum_1^n f_n e^{2\pi i(hu_n + kv_n + lw_n)} \quad \text{eq. 7.9}$$

F_{hkl} descreve como o arranjo de átomos da cela unitária contribui para o feixe espalhado. F_{hkl} recebe o nome de *Fator de Estrutura* (ou fator de forma) e é em geral um número complexo que expressa tanto a amplitude como a fase da onda resultante. O valor absoluto $|F_{hkl}|$ fornece a amplitude da onda resultante em termos da amplitude da onda espalhada por um simples elétron, e pode ser definido por:

$$F_{hkl} = \frac{\text{amplitude da onda espalhada pelos átomos da cela unitária}}{\text{amplitude da onda espalhada por um elétron}}$$

A intensidade do feixe difratado, cuja direção é prevista pela lei de Bragg, é proporcional a $|F_{hkl}|^2$.

8.1 REPRESENTAÇÃO DA DENSIDADE ELETRONICA

Podemos representar uma estrutura cristalina por dois métodos:

- a) por átomos ligados a uma rede;
- b) por uma função contínua que descreve a densidade eletrônica, sendo os átomos representados por picos na função.

No primeiro método, o problema da difração é tratado em duas etapas. Inicialmente precisamos descrever a ação de todos os elétrons de um átomo por meio do fator de espalhamento atômico^[95]:

$$f_n = \int 4\pi r^2 \rho_n(r) \frac{\sin kr}{kr} dr$$

onde f_n pode ser interpretado como o número efetivo de elétrons concentrados no centro do átomo.

Numa segunda etapa podemos combinar todos os átomos de uma cela unitária por meio do fator de estrutura:

$$F_{hkl} = \sum_n f_n e^{2\pi i (hu_n + kv_n + lv_n)} \quad \text{eq. 8.1}$$

onde F_{hkl} pode ser interpretado como o número efetivo de elétrons concentrados na origem da cela unitária.

Um segundo método de representar uma estrutura cristalina é introduzir uma função contínua $\rho(xyz)$ representando a densidade eletrônica dentro da cela unitária, expressa em número de elétrons por unidade de volume.

Sendo $\rho(xyz)$ uma função periódica, podemos representá-la por uma série de Fourier:

$$\rho(xyz) = \sum_p \sum_q \sum_r^{+\infty} C_{pqr} e^{-2\pi i (pu+qv+rw)} \quad \text{eq. 8.2}$$

Multiplicando ambos os lados da equação 8.2 por $e^{2\pi i (hu+kv+lw)}$, onde h, k, l são inteiros, e integrando sobre todo o volume da cela, temos:

$$\int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} \int_{-\frac{c}{2}}^{\frac{c}{2}} \rho(xyz) e^{2\pi i(hu+kv+lw)} dx dy dz =$$

$$= \sum_p \sum_q \sum_r C_{pqr} \int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} \int_{-\frac{c}{2}}^{\frac{c}{2}} e^{-2\pi i[(p-h)u + (q-k)v + (r-l)w]} dx dy dz$$

Como,

$$\int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} e^{-2\pi i(p-h)u} du = \begin{cases} a & \text{se } p=h \\ 0 & \text{se } p \neq h \end{cases}$$

temos:

$$\int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} \int_{-\frac{c}{2}}^{\frac{c}{2}} \rho(xyz) e^{2\pi i(hu+kv+lw)} dx dy dz = abc C_{hkl}$$

eq. 8.9

Se representarmos o fator de espalhamento atômico f_n por uma distribuição contínua de densidade eletrônica, podemos reescrever a equação 7.3 como:

$$F_{hkl} = \frac{V}{abc} \int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \int_{-\frac{b}{2}}^{\frac{b}{2}} \int_{-\frac{c}{2}}^{\frac{c}{2}} \rho(xyz) e^{2\pi i(hu+kv+lv)} dx dy dz$$

eq. 8.4

onde o fator geométrico V/abc serve para normalizar os coeficientes no caso da cela unitária não ser ortogonal.

Comparando 8.3 com 8.4, temos:

$$V C_{hkl} = F_{hkl}$$

ou seja, da equação 8.2 podemos expressar a densidade eletrônica $\rho(xyz)$ por uma série de Fourier cujos coeficientes são os fatores de estrutura F_{hkl} :

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} e^{-2\pi i(hu+kv+lv)}$$

eq. 8.5

Notemos da equação 8.5 que para conhecermos a função $\rho(xyz)$ é necessário sabermos o módulo e a fase do feixe difratado na direção hkl ($F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\phi}$). Num experimento de difração de raios-X, somos capazes de detetar apenas a intensidade do feixe difratado na direção hkl , que se relaciona com o fator de estrutura pela relação:

$$I \propto |F_{hkl}|^2$$

Dessa forma, não temos informação da fase do feixe difratado, o que constitui nosso principal problema no cálculo do perfil da densidade eletrônica da cela unitária, o que discutiremos no item 10.

8.2 A FUNÇÃO DE PATTERSON

Uma vez que obtemos apenas $|F_{hkl}|$ num experimento de difração de raios-X, que informações podemos obter desse conjunto de valores? A. L. Patterson mostrou, em 1934, que poderíamos obter uma função que, apesar de não ser tão completa quanto $\rho(xyz)$, ajuda-nos a compreender a geometria da cela unitária.

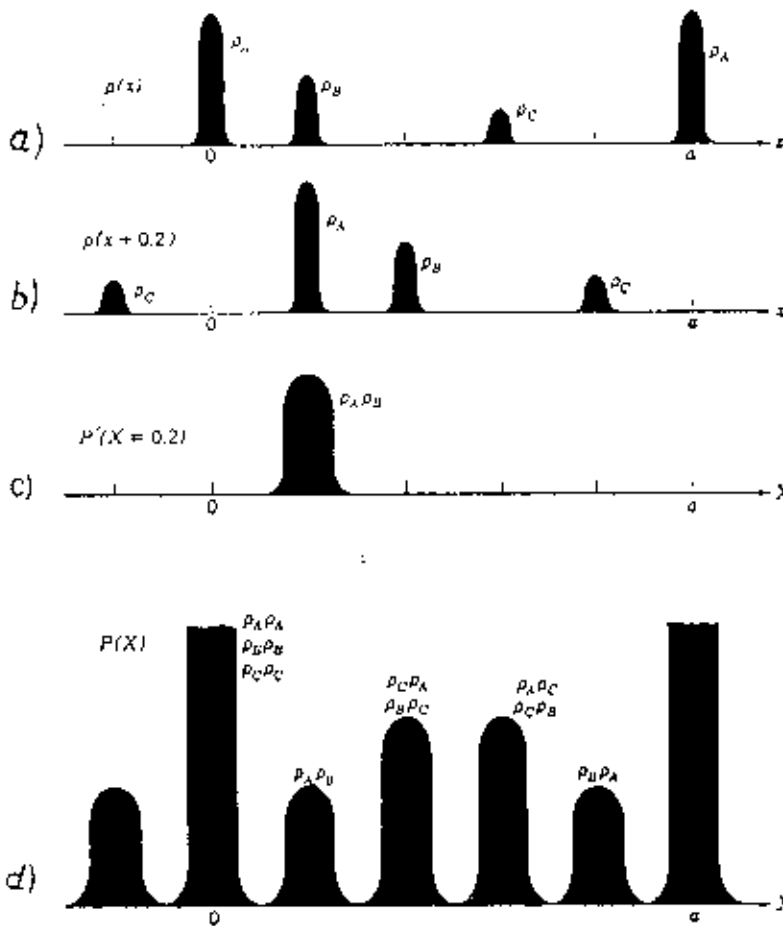
Vamos deduzir, para facilitar os cálculos, a função de Patterson para um cristal unidimensional. Consideremos a figura B.2.1, que representa a densidade eletrônica $\rho(x)$ para um cristal unidimensional com 3 átomos por cela unitária A, B e C.

Podemos definir uma função $P(x)$ (função de correlação), chamada Função de Patterson como:

$$P(X) = \frac{1}{a} \int_{-\frac{a}{2}}^{\frac{a}{2}} \rho(x) \rho(x + X) dx \quad \text{eq. 8.6}$$

Analisando a equação B.6, notamos que $P(X) \neq 0$ apenas quando $\rho(x)$ e $\rho(x + X)$ forem simultaneamente não nulas.

A função $\rho(x + X)$ para $X = 0,2$ é mostrada na figura B.2.1b. Notemos da figura B.2.1c que apenas para $X = 0,2$ temos $P(X) \neq 0$. Com X variando entre 0 e a , obteremos um pico sempre que o valor X corresponda a uma distância inter-picos ou inter-átomos.



Cálculo da Função de Patterson unidimensional. As figuras a e b mostram $\rho(x)$ e seu deslocamento por $X = 0.2$, indicado por $\rho(x + 0.2)$. A figura c mostra o produto $\rho(x) \rho(x + X) = P(X = 0.2)$. A figura d mostra a Função de Patterson unidimensional completa.

Fig 8.2.1 - Função de Patterson^[95]

Podemos notar assim que a função de Patterson não representa a posição dos átomos na cela unitária, mas sim as distâncias relativas entre eles. A função de Patterson é uma função de correlação que indica a posição de cada átomo em relação ao outro e não a uma origem fixa.

Substituindo 8.5 na equação 8.6 e expandindo para 3 dimensões, obtemos:

$$P(XYZ) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hU+kV+lW)}$$

onde U , V e W são as coordenadas fracionais dadas por:

$$U = \frac{X}{a} \qquad V = \frac{Y}{b} \qquad W = \frac{Z}{c}$$

9. DIFRAÇÃO POR SISTEMAS DE MULTIBICAMADAS

Com o desenvolvimento da tecnologia para crescimento de filmes finos e, mais recentemente com o desenvolvimento dos filmes de Langmuir-Blodgett (LB films), inúmeros sistemas de multicamadas são utilizados na Ciência e na tecnologia.⁽⁹⁷⁾

Geralmente uma multicamada é formada por monocamadas "bidimensionais". Se empacotarmos essas monocamadas, uma sobre as outras, poderemos ter um sistema caracterizado por um parâmetro a , a espessura de cada camada (fig 9.1)

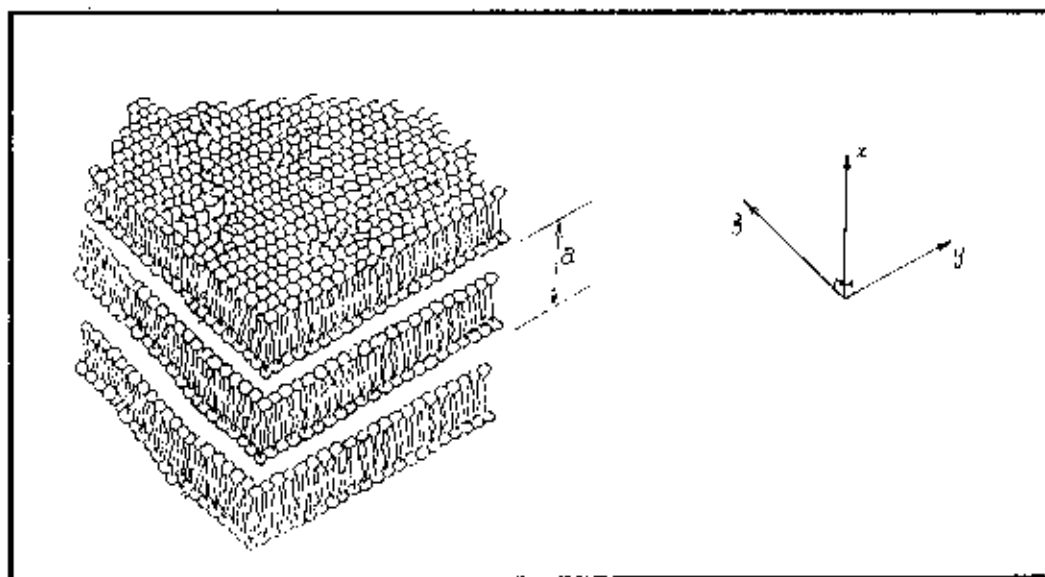


Fig 9.1 - Multibicamadas

Recorrendo à Lei de Bragg, se tivermos um sistema com periodicidade a , é possível obtermos um espectro de difração, usando uma radiação adequada.

Seja, pois, uma multicamada com periodicidade a numa direção definida (consideremos na nossa dedução a direção paralela ao eixo x) (fig 0.1). Se existe uma periodicidade a , poderemos definir uma cela unitária de tamanho a , cuja densidade eletrônica é dada pela função $\rho(x)$. (fig 0.2)

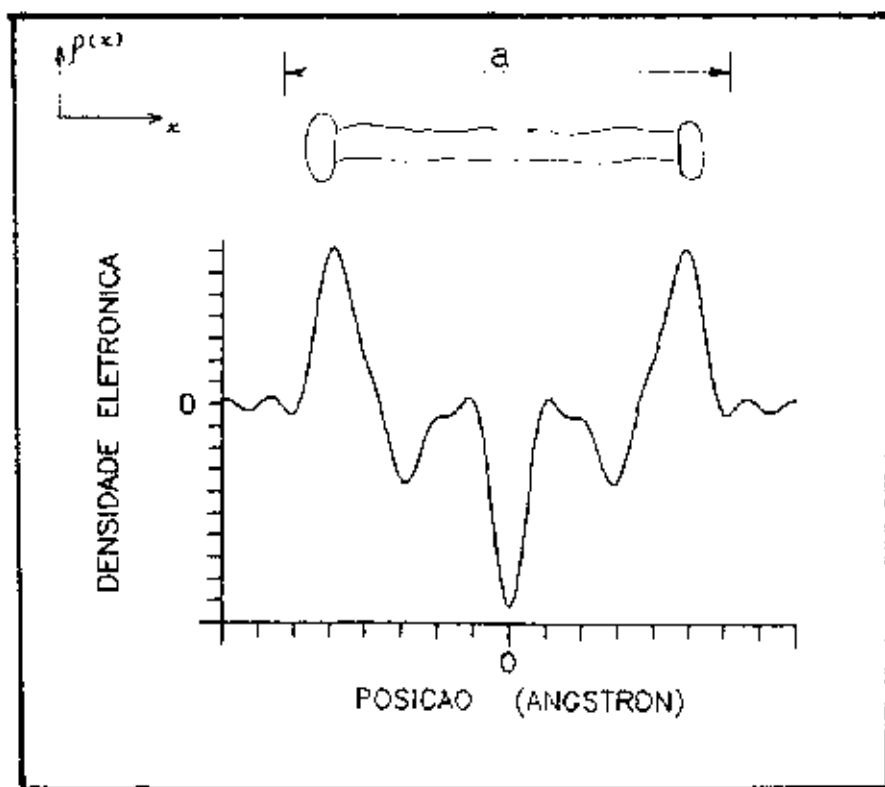


Fig. 0.2 - Cela Unitária

Vimos no item 7 como uma cela unitária pode espalhar um feixe incidente, dando origem a um feixe difratado. Procuremos nesse capítulo adaptar o estado geral das celas unitárias para o caso de multibicamadas.

Um feixe difratado pode ser descrito pelo fator de estrutura F_{hkl} , e é dado por:

$$F_{hkl} \longrightarrow F_h = |F_h| e^{i\phi_h}$$

Já dissemos que o problema da fase é intrínseco ao experimento de difração de raios-X. Algumas considerações podem ser feitas para contornar essa dificuldade (ver item 10). Suponhamos que nossa cela unitária é centrossimétrica, ou seja,

$$\rho(x) = \rho(-x)$$

Nosso objetivo principal é o cálculo da função densidade eletrônica. Adaptando a eq 8.5 para nosso arranjo unidimensional temos:

$$\rho(x) = \frac{1}{a} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} F_h e^{2\pi i h \frac{hx}{a}} \quad \text{eq. 9.1}$$

O fator de estrutura é geralmente um número complexo e como tal pode ser escrito por:

$$F_h = A(h) + i B(h)$$

$$F_h = \sum_{j=1}^N f_j e^{-2\pi i h \frac{x_j}{a}}$$

$$F_h = \sum_{j=1}^N f_j \cos(2\pi h \frac{x_j}{a}) - i \sum_{j=1}^N f_j \sin(2\pi h \frac{x_j}{a})$$

Assim, podemos definir um módulo e uma fase para F_h :

$$F_h = |F_h| e^{i\phi(h)}$$

$$\phi(h) = \arctg \frac{B(h)}{A(h)}$$

Considerando as propriedades de simetria de nossas multicamadas, podemos concluir que:

$$B(h) = \sum_{j=1}^N f_j \operatorname{sen}(2\pi h \frac{x_j}{a}) = 0$$

Assim,

$$\phi(h) = \arctg 0 \implies \begin{cases} \phi(h) = 0 \\ \phi(h) = \pi \end{cases}$$

Temos então que, para uma estrutura centrossimétrica o fator de estrutura é dado por:

$$F_h = \pm |F_h|$$

Dessa forma, damos um primeiro passo para a determinação da função densidade eletrônica $\rho(x)$, faltando decidir qual a combinação de fases adequada para representar a cela unitária. A eq. 9.1 pode, então, ser reescrita como:

$$\rho(x) = \frac{2}{a} \sum_{h=0}^{+\infty} \pm |F_h| \cos\left(2\pi x \frac{h}{a}\right) \quad \text{eq. 9.2}$$

A função de Patterson, porém, pode ser determinada independente da fase. Num arranjo periódico unidimensional, podemos escrever:

$$\rho(x) = \frac{1}{a} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} F_h e^{-2\pi i \frac{h}{a} x} = \frac{1}{a} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} F_h \cos\left(2\pi x \frac{h}{a}\right) \quad \text{eq. 9.3}$$

Assim, podemos calcular a função de Patterson pela expressão:

$$P(X) = \frac{1}{a} \int_{-z/a}^{z/a} \rho(x) \rho(x + X) dx \quad \text{eq. 9.4}$$

Substituindo 9.3 em 9.4 temos:

$$P(X) = \frac{2}{a^2} \sum_{h=0}^{+\infty} |F_h|^2 \cos(2\pi x \frac{h}{a})$$

10. O PROBLEMA DA FASE

Num experimento de raio-X podemos medir a intensidade do feixe espalhado em função do ângulo. Se usarmos um método fotográfico, um detetor ou um contador, estaremos medindo a quantidade de energia do feixe difratado pela amostra. Vimos anteriormente que a intensidade medida é proporcional ao quadrado do fator de estrutura. Lembrando que F_{hkl} é um número complexo, temos:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}}$$

$$I \propto (F_{hkl})^2 = F_{hkl}^* F_{hkl}$$

$$I \propto |F_{hkl}|^2 \quad \text{eq. 10.1}$$

Podemos ver, então, pela equação 10.1 que o experimento de difração de raios-X fornece-nos apenas o módulo do fator de estrutura, sendo a fase impossível de ser medida.

O principal objetivo no estudo da determinação de estruturas por métodos de difração de raios-X é o cálculo da função densidade eletrônica $\rho(r)$.

$$\rho(x) = \frac{1}{a} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} F_h e^{2\pi i \frac{hx}{a}} \quad \text{eq. 9.1}$$

Porém, observando a equação 9.1 notamos que o cálculo de $\rho(xyz)$ depende do conhecimento integral de F_{hkl} , ou seja, seu módulo e sua fase.

No estudo de multicamadas centrossimétricas esse problema é simplificado, uma vez que as fases podem ser apenas 0 ou π . (item 9)

$$F_h = + |F_h|$$

ou

$$F_h = - |F_h|$$

Ainda assim, temos uma indeterminação pois precisamos saber qual dessas duas fases corresponde à reflexão de índice h . Como veremos adiante (item 14) o índice h varia de 1 a um valor finito h_{\max} , devido às limitações impostas pelo experimento. Sendo assim, se tivermos h_{\max} ordens de difração, teremos $2^{h_{\max}}$ possibilidades para arranjar as fases.

Essa indeterminação pode ser resolvida a partir de informações estruturais provindas de análises químicas ou bioquímicas. Geralmente sabemos se a nossa cela unitária é composta por alguma região de densidade eletrônica constante, como uma cadeia hidrocarbonada $(-\text{CH}_2)_n-$ de um ácido graxo, ou de alguma região com alta densidade eletrônica como um átomo mais eletrôn-denso.

Essas informações permitem estimar um perfil aproximado ou uma referência inicial a partir da qual possamos refinar nosso modelo, obtendo por fim um perfil de densidade eletrônica coerente que nos forneça as características estruturais desejadas, dentro de certa resolução.

Um segundo método usado para o caso específico de multicamadas é o chamado "Método do Inchamento".

Vamos admitir que com o aumento da umidade do ar, nossa cela unitária sofra um processo de inchamento, implicando numa mudança na estrutura, de forma simples e fisicamente plausível. Segundo Torbet e Wilkins ⁽³⁹⁾ o fator de estrutura deve alterar de forma simples e gradual durante o inchamento. Essas alterações podem ser melhor observadas através de análises gráficas. ⁽⁴²⁾

É imprescindível nesse método que os dados obtidos para cada unidade sejam normalizados. Esse problema pode ser resolvido usando o método proposto por Worthington e Blaurock. ⁽⁴⁰⁾

$$K \left(\frac{a}{d_1} \right) \sum_{h=1}^{h_{\max}} I_1(h) = \left(\frac{a}{d_2} \right) \sum_{h=1}^{h_{\max}} I_2(h)$$

eq. 10.2

Esse método pode ser implementado fazendo-se passar pela amostra um fluxo de gás (N_2 , por exemplo) com a umidade desejada, o que pode ser obtido fazendo-o borbulhar em recipientes contendo soluções salinas saturadas adequados. ⁽⁴²⁾⁽⁴¹⁾

Um terceiro método para a determinação das fases é o chamado "Método da Substituição Isomorfa".⁽⁹⁸⁾ Esse método consiste em trocar um átomo da cela unitária por outro similar, mais pesado (ex. Enxofre por Selênio, Bromo por Iodo, ...). Um derivado isomorfo ideal difere da estrutura original, apenas por um pico extra, no perfil de densidade eletrônica, na posição do átomo pesado substituído. Em alguns casos esse método pode se tornar complexo exigindo técnicas sofisticadas. Esse método é extremamente usado no estudo de cristais de proteínas. Se o átomo pesado substituído é suficientemente elétron-denso, ele provocará mudanças significativas no espectro de difração de raios-X. Analisando as diferenças de intensidade dos espectros original e substituído, podemos resolver o problema da fase, desde que a posição do átomo pesado seja conhecida.

11. CORREÇÃO DAS INTENSIDADES OBSERVADAS

A intensidade de um feixe difratado, observada num experimento de difração de raios-X à baixo ângulo, é afetada por uma série de fatores, o que torna necessária sua correção, a fim de que possamos trabalhar com informações que reflitam a estrutura da amostra a nível molecular.

Discutiremos nesse item algumas correções relevantes ao estudo de difração de raios-X por multicamadas:

- Geometria da amostra e do substrato;
- Fator de Absorção;
- Fator de Polarização;
- Fator de Temperatura.

11.1 GEOMETRIA DA AMOSTRA E DO SUBSTRATO

Quando incidimos um feixe sobre uma amostra ligeiramente desordenada, seja pelas próprias características da amostra ou devido à curvatura do substrato, fazemos com que o ponto que seria esperado no espaço recíproco (teoricamente, um conjunto de planos infinitos, paralelos entre si, separados por uma distância constante, define um ponto na rede recíproca)⁽³⁵⁾ alargue-se, dando origem a uma casca esférica⁽²⁴⁾. A área dessas cascas é proporcional a seus raios, ou seja, à coordenada recíproca h , ou ainda, ao número da ordem de difração n (eq. 7.2).

O efeito dessas irregularidades pode ser observado com a ajuda de métodos fotográficos. Um esquema de um filme fotográfico obtido num experimento de difração de raios-X por sistemas de multicamadas é mostrado na figura 11.1 .

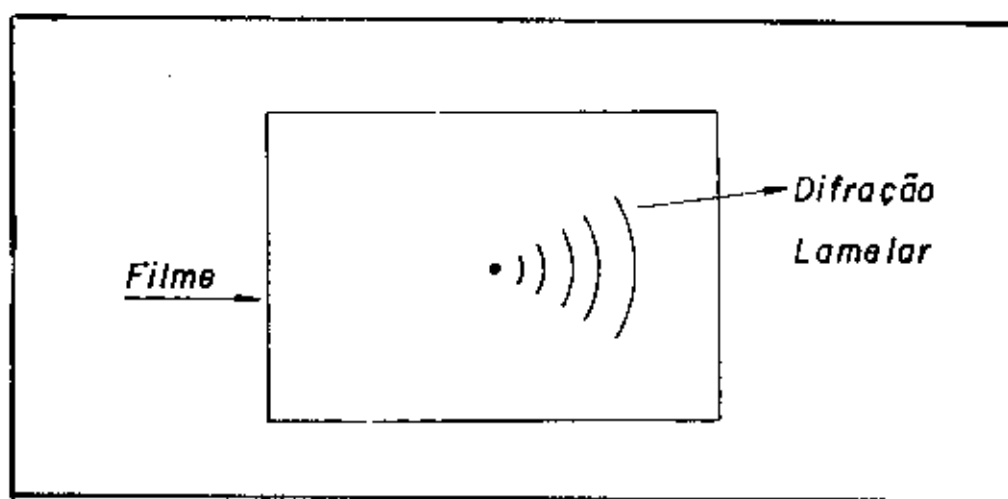


Fig. 11.1 - Filme Fotográfico (esquema)

Vemos, então, que a energia difratada por cada conjunto de planos (h00) é distribuída sobre um segmento de arco de circunferência.

Dado que a fenda do detetor tem uma altura fixa e limitada, apenas a parte central do feixe difratado pela amostra é registrada, havendo assim uma aparente diminuição na intensidade.

Devemos, então corrigir as intensidades observadas por um fator correspondente ao índice h da reflexão

$$I_{\text{corr}}(h) = h I_0(h)$$

11.2 FATOR DE ABSORÇÃO

Sempre que um feixe de raios-X interage com a matéria, ele é parcialmente absorvido. A absorção de um feixe que atravessa uma distância x de uma substância homogênea é dada por:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x}$$

onde μ é o coeficiente de absorção linear, que depende da substância considerada, da densidade ρ e do comprimento de onda λ incidente.

A equação acima pode ser reescrita em forma mais conveniente, em termos do coeficiente de absorção de massa (μ/ρ) que é característica do material, independente do seu estado físico:

$$I(x) = I_0 e^{-(\mu/\rho)\rho x} \quad \text{eq. 11.1}$$

O coeficiente de absorção linear μ para um dado λ é muito maior para a água do que para o vapor, ou qualquer mistura estequiométrica de Oxigênio e Hidrogênio, enquanto que o coeficiente de absorção de massa (μ/ρ) é o mesmo nos 3 casos.

Essa propriedade distingue bem os raios-X da luz visível. Por exemplo, diamantes são muito transparentes à luz visível enquanto grafite é extremamente absorvedor; ambos, porém, possuem o mesmo coeficiente de absorção de massa para o raio-X. Mercúrio sólido ou líquido são opacos à luz visível, enquanto o vapor de mercúrio é transparente; as 3 formas de mercúrio possuem o mesmo (μ/σ) .

Quando o material absorvedor é uma substância composta como uma liga, um composto químico, uma solução, etc., seu coeficiente de absorção de massa é simplesmente a média ponderada dos coeficientes de absorção de massa de cada elemento constituinte. Ou seja, se w_1, w_2, \dots, w_n são as frações em peso dos elementos 1, 2, ..., n, e $(\mu/\sigma)_1, (\mu/\sigma)_2, \dots, (\mu/\sigma)_n$ são seus coeficientes de absorção de massa, então a substância terá um coeficiente dado por:

$$\frac{\mu}{\sigma} = w_1 \left(\frac{\mu}{\sigma} \right)_1 + w_2 \left(\frac{\mu}{\sigma} \right)_2 + \dots + w_n \left(\frac{\mu}{\sigma} \right)_n$$

11.3 FATOR DE POLARIZAÇÃO

A radiação não polarizada, proveniente de um tubo de raio-X, ao ser espalhada pelos elétrons de um átomo, adquire uma polarização parcial que depende do ângulo de espalhamento. Inúmeros resultados experimentais estão de acordo com os resultados estabelecidos por Thomson em 1900⁽¹⁹⁶¹⁾. Consideremos um feixe não polarizado incidindo com ângulo θ (em condição de Bragg) sobre um cristal (fig 11.2). O campo elétrico desse feixe vibra em todas as direções perpendiculares à direção de propagação do feixe:

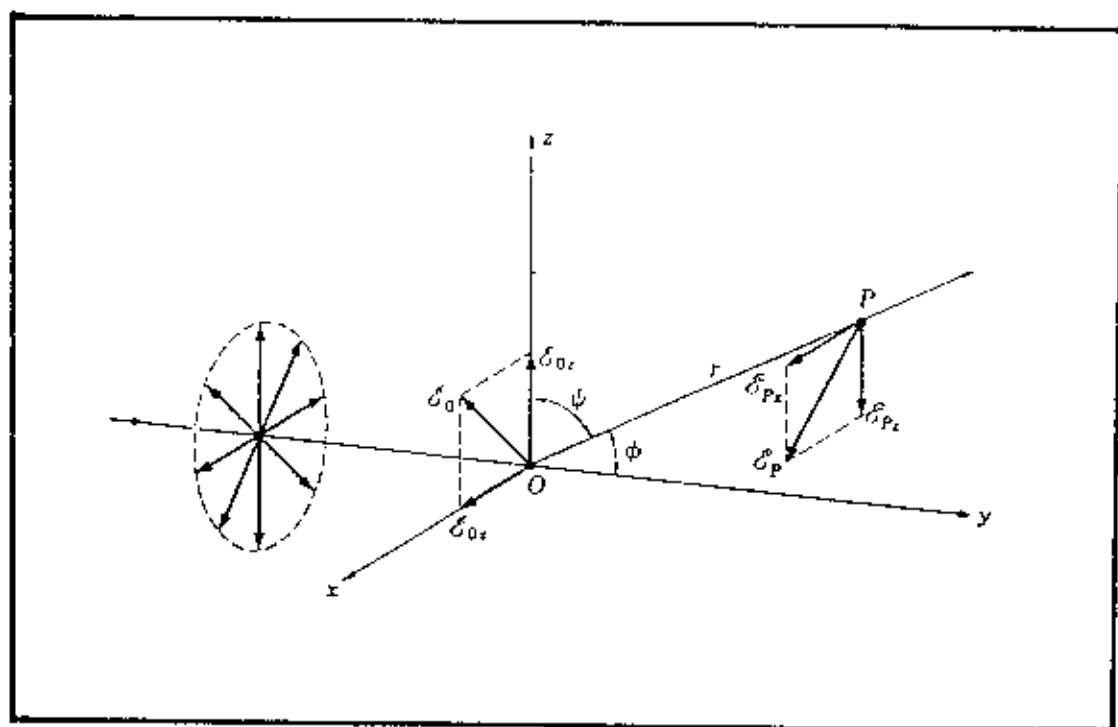


Fig. 11.2 - Fator de Polarização

Podemos representar as várias posições do vetor campo elétrico em termos de uma base de dois vetores. Quando o feixe de raio-X atinge um elétron, este começa a vibrar num plano paralelo à direção $\phi = 2\theta$, a direção de propagação do feixe. Assim, a intensidade do feixe espalhado nessa direção é proporcional a⁽²⁵⁾:

$$I \propto \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \right) \quad \text{eq. 11.2}$$

O termo da direita é chamado *fator de polarização* e indica o grau de polarização do feixe espalhado em função do ângulo 2θ .

11.4 FATOR DE TEMPERATURA

A consideração de que um cristal é formado por átomos bem localizados dentro de uma rede nem sempre é válida. Sabemos que os átomos vibram em torno de suas posições de equilíbrio (mesmo para $T = 0^{\circ}\text{K}$) e que a amplitude dessas vibrações aumenta com o aumento da temperatura.

O efeito da vibração térmica, decorrente do aumento da temperatura, na intensidade das linhas de difração foi primeiro analisado por Debye, em 1913. As primeiras teorias sobre esse assunto tratavam apenas de arranjos cristalinos cúbicos, e consideravam a vibração de um átomo independente da vibração dos outros. Ainda que essa última aproximação seja incorreta, esse modelo explica, de forma qualitativa, o decréscimo na intensidade dos picos de difração e do aumento da radiação de fundo (background) num difratograma. Uma teoria rigorosa considerando cristais poliatômicos em uma rede qualquer ainda não foi desenvolvida, de forma que a teoria de Debye ainda é utilizada, dentro de certos limites.^[95]

A agitação térmica faz com que os planos da rede vibrem, de forma que a concepção matemática de planos refletores com espessura mínima torna-se incorreta. Assim, a condição de difração de Bragg nem sempre é respeitada, uma vez que a distância interplanar d oscila constantemente em torno de um valor médio.

Vimos anteriormente que um feixe difratado é formado pela interferência construtiva de várias ondas coerentemente espalhadas no ângulo de Bragg, e que essa condição decorre da diferença de caminho percorrido por cada onda, que por sua vez é função da distância d (item 7).

Devido à agitação térmica, a "largura" do plano refletor é 2μ (μ = amplitude média de vibração dos átomos da rede), o que faz com que a condição de interferência construtiva seja parcialmente respeitada, implicando num decréscimo da intensidade do feixe difratado. A intensidade diminui conforme a razão μ/d aumenta. Isso ocorre ou quando a temperatura aumenta (a amplitude de vibração μ aumenta) ou para reflexões de ordem superior (reflexões a alto ângulo) relacionadas com famílias de planos com espaçamentos d menores.

Podemos quantificar o efeito da temperatura na diminuição das intensidades dos feixes difratados fazendo considerações sobre o fator de espalhamento atômico f .

Seja f_0 o fator de espalhamento atômico para um suposto átomo em repouso na rede. Consideremos também, em primeira aproximação, que os átomos da rede vibram em movimento harmônico isotrópico e independente, e que o deslocamento quadrático médio em torno da posição de equilíbrio ($\bar{\mu}^2$) seja descrito por uma função gaussiana $g(\mu)$ e que a densidade eletrônica do cristal em repouso seja dada por $\rho_0(x)$.

Podemos calcular a densidade eletrônica $\rho(x)$, do cristal em vibração, pela convolução (*) entre $\rho_0(x)$ e $g(\mu)$ ⁽²⁴⁾:

$$\rho(x) = \rho_0(x) * g(\mu)$$

Desta forma, o fator de espalhamento atômico (à temperatura ambiente) f será dado por:

$$f = \int \rho_0(x) * g(\mu) \, dV = f_0 \exp \left[- 2\pi^2 \frac{\bar{\mu}^2}{d^2} \right]$$

onde f_0 é o fator de espalhamento atômico teórico (geralmente esses fatores são calculados para átomos em repouso).⁽²⁴⁾

Podemos também definir o fator de estrutura como:

$$F = \exp \left[- 2\pi^2 \frac{\bar{\mu}^2}{d^2} \right] = F_0 \exp \left[- \theta\pi^2 \bar{\mu}^2 \left(\frac{\sin \theta}{\lambda} \right)^2 \right]$$

eq. 11.2

uma vez que

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}$$

A exponencial da equação 11.3 é chamada de *fator de Debye-Waller* (D)

$$D = \exp \left[- B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right]$$

onde

$$B = 8 \pi^2 \overline{\mu^2} \quad (\text{fator de temperatura})$$

Debye desenvolveu sua teoria supondo vibrações atômicas independentes e Waller fez algumas correções admitindo a interdependência entre as vibrações dos átomos, chegando a expressar o fator de temperatura (B) por:

$$B = \frac{8 h^2 T}{m K \Theta^2} \left[\Phi(x) + \frac{x}{4} \right] \quad \text{eq. 11.4}$$

onde

h = constante de Planck

T = temperatura absoluta

m = massa do átomo vibrante

K = constante de Boltzmann

Θ = temperatura de Debye característica da substância

$x = \Theta / T$

$\Phi(x)$ = função de Debye (tabelada)⁽⁴⁶⁾

A expressão do fator de temperatura 11.4 é válida apenas para estruturas cúbicas, contendo apenas um tipo de átomo. Para estruturas mais complexas, com menor simetria e vários tipos de átomos usam-se fatores de temperatura anisotrópicos.⁽⁴⁵⁾

Reescrevendo a equação 11.3 e lembrando que a intensidade do feixe difratado é proporcional ao quadrado do fator de estrutura, temos:

$$F = F_0 D(\theta)$$

$$I(\theta) = I_0(\theta) D^2(\theta) = I_0(\theta) \exp \left[-2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right]$$

eq. 11.5

Assim, temos que a intensidade observada é "amortecida" exponencialmente pelo efeito da temperatura.

12. PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física "Gleb Wataghin", UNICAMP. Analisamos por difração de Raios-X à baixo ângulo amostras de multibicamadas de fosfolípidos incorporadas com Elíptica, em pH 7,2 e 9,7, crescidas em substratos de vidro planos.

12.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usamos no preparo das amostras os seguintes materiais:

- a) Dipalmitil Fosfatidil-Colina (L α -DPPC) sintética, produzida pela Sigma Chemical Co., USA, com 99% pureza;
- b) Cardiolipina (CL) (Difosfatidil-Glicerol), natural, produzida pela Sigma Chemical Co., USA, com 95% pureza;
- c) Fosfatidil-Colina de Ovo (EPC), cedida pelo Depto. de Bioquímica da UNICAMP (Prof. Eneida);
- d) Elipticina (6,11-Dimetil-6H-Pirido[4,3-b]Carbazol) produzida pela Sigma Chemical Co., USA;
- e) Clorofórmio P.A. produzido pela Merck;
- f) Metanol P.A. produzido pela Merck;
- g) Tampão Fosfato 5mM, pH 7,2, preparado no Instituto de Biologia, UNICAMP;
- h) Tampão Bicarbonato de Sódio, 0,1mM, pH 9,7, preparado no Instituto de Biologia, UNICAMP.

Os pesos moleculares do DPPC, CL, EPC e ELPT são dados na tabela 12.1.1:

SUBSTANCIA	PESO MOLECULAR	N. DE MOLES/DOSE
DPPC	(734,1 ± 0,1) g	variável
CL	(1485 ± 1) g	(58 ± 2) nMol/dose
EPC	(770 ± 1) g	(556 ± 7) nMol/dose
ELPT	(248,3 ± 0,1) g	(52 ± 1) nMol/dose

Tabela 12.1.1 - Pesos Moleculares

Para obtermos maior controle e precisão no preparo das amostras, dissolvemos a ELPT em metanol, a Cardiolipina em etanol e o DPPC e EPC em Clorofórmio; utilizando-se uma pipeta automática (25 µl) tínhamos uma boa precisão nas quantidades usadas no preparo das amostras. O número de moles por dose para a solução de ELPT, Cardiolipina e EPC é mostrado na tabela 12.1.1. Várias soluções foram preparadas para o DPPC, de acordo com a relação Lipídeo-Droga desejada.

As amostras foram preparadas em dispersões de acordo com o seguinte método: colocávamos num tubo de ensaio o número de doses necessárias de DPPC, Cardiolipina, EPC e ELPT para obtermos a relação Lipídeo-Droga desejada. Fazíamos passar por essa primeira solução um fluxo de Nitrogênio gasoso, até evaporarmos todo o solvente. Adicionávamos, a seguir, a solução tampão de forma a obtermos uma dispersão final com a concentração da ordem de 10 mg/ml.

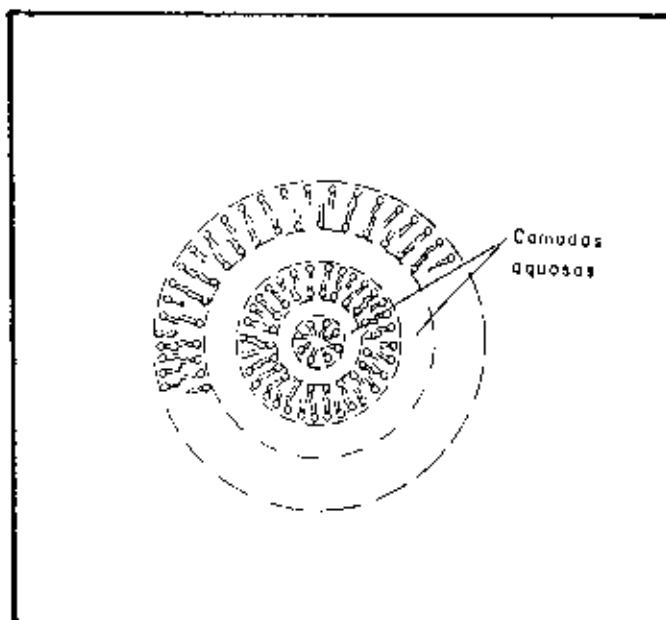


Fig 12.1.1 - *Vesículas Multilamelares*

A dispersão assim preparada apresentava vesículas multilamelares concêntricas de fosfolípidios separadas por camadas aquosas. (fig 12.1.1)

No intuito de obter vesículas unilamelares, submetíamos a dispersão ao ultra-som (20 KHz, 75 KW), durante 3 a 4 períodos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto^[24]. Provocávamos o rompimento das vesículas multilamelares através do fenômeno de cavitação gerado pelo ultra-som (a propagação da onda através da dispersão cria regiões de compressão e rarefação gerando pressões extremamente altas, capazes de romper as vesículas).

Usamos um aparelho de ultra-som Sonomax modelo SX-B30.

Assim, obtivemos quatro séries de amostras descritas nas tabelas abaixo:

DPPC (μMol)	ELPT (μMol)	DPPC : ELPT
(10,40 \pm 0,02)	-----	puro
(10,46 \pm 0,01)	(0,208 \pm 0,004)	(50 : 1)
(10,34 \pm 0,02)	(0,416 \pm 0,008)	(25 : 1)
(10,47 \pm 0,03)	(1,04 \pm 0,02)	(10 : 1)

Tabela 12.1.2 - DPPC:ELPT - pH 7,2

DPPC (μMol)	ELPT (μMol)	DPPC : ELPT
(6,53 \pm 0,03)	-----	puro
(4,36 \pm 0,02)	(0,052 \pm 0,001)	(84 : 1)
(3,63 \pm 0,01)	(0,052 \pm 0,001)	(70 : 1)
(4,13 \pm 0,01)	(0,104 \pm 0,002)	(40 : 1)
(4,13 \pm 0,01)	(0,208 \pm 0,004)	(20 : 1)
(4,13 \pm 0,01)	(0,416 \pm 0,008)	(10 : 1)
(4,13 \pm 0,01)	(0,83 \pm 0,02)	(5 : 1)

Tabela 12.1.3 - DPPC:ELPT - pH 9,7

DPPC (μMol)	CL (μMol)	ELPT (μMol)	DPPC : CL : ELPT
(3,90 \pm 0,01)	(0,99 \pm 0,03)	-----	(3,9 : 1 : 1)
(2,14 \pm 0,01)	(0,52 \pm 0,02)	(0,052 \pm 0,001)	(41 : 10 : 1)
(3,02 \pm 0,01)	(0,70 \pm 0,02)	(0,156 \pm 0,003)	(20 : 4,5 : 1)
(2,45 \pm 0,01)	(0,64 \pm 0,02)	(0,260 \pm 0,005)	(9,4 : 2,5 : 1)
(2,62 \pm 0,01)	(0,70 \pm 0,02)	(0,416 \pm 0,008)	(6,3 : 1,7 : 1)
(2,44 \pm 0,01)	(0,64 \pm 0,02)	(0,79 \pm 0,01)	(3,1 : 0,8 : 1)
(1,59 \pm 0,01)	(0,41 \pm 0,01)	(0,83 \pm 0,02)	(1,9 : 0,5 : 1)

Tabela 12.1.4 - DPPC:CL:ELPT - pH 7,2

EPC (μMol)	ELPT (μMol)	EPC : ELPT
(2,22 \pm 0,03)	-----	puro
(3,34 \pm 0,04)	(0,104 \pm 0,002)	(32 : 1)
(2,22 \pm 0,03)	(0,104 \pm 0,002)	(21 : 1)
(2,22 \pm 0,03)	(0,208 \pm 0,004)	(11 : 1)
(1,11 \pm 0,01)	(0,208 \pm 0,004)	(5 : 1)
(1,11 \pm 0,01)	(1,04 \pm 0,02)	(1 : 1)

Tabela 12.1.5 - EPC:ELPT - pH 7,2

12.2 DEPOSIÇÃO SOBRE SUBSTRATO

Usamos como substrato lâminas de vidro (usadas em microscopia óptica) lavadas inicialmente com Clorofórmio e a seguir com água destilada. Depositamos 4 doses (0,100 ml) de cada dispersão de forma a obtermos uma amostra com formato retangular ($\cong 17 \times 4 \text{ mm}^2$).

As amostras secavam durante 24 horas em atmosfera com 75% de umidade relativa (solução saturada de NaClO_3 a 20°C). Durante a secagem, ocorre a formação das multibicamadas de fosfolipídeos (fig 12.2.1)

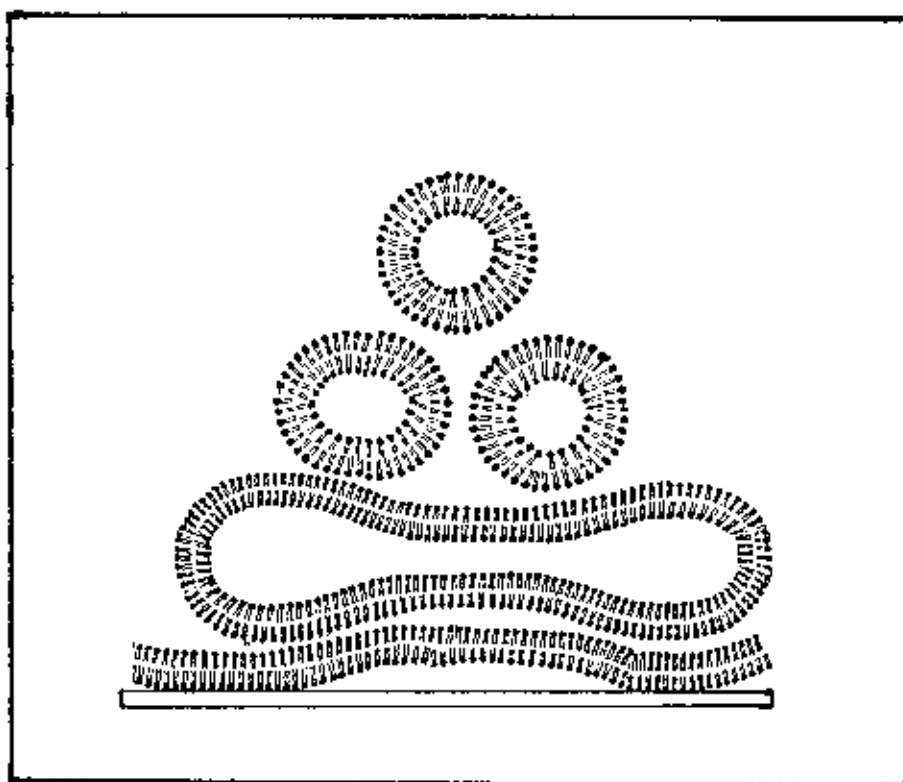


Fig 12.2.1 - Idealização da Formação da Multibicamada

12.3 ARRANJO EXPERIMENTAL

O equipamento foi preparado para usarmos uma geometria θ - 2θ (fig. 12.3.1) com fendas lineares e detector de cintilação. Usamos um gerador com anodo rotatório (Rotaflex - Rigaku) de Cobre (filtro de níquel) com feixe linear e potência de 1,75 KW (50mA/35 KV). Usamos as seguintes fendas:

- DS - Fenda de Divergência : $\frac{1}{2}^\circ$
- RS - Fenda Receptora : 0,15 mm
- SS - Fenda de Espalhamento . . . : $\frac{1}{2}^\circ$

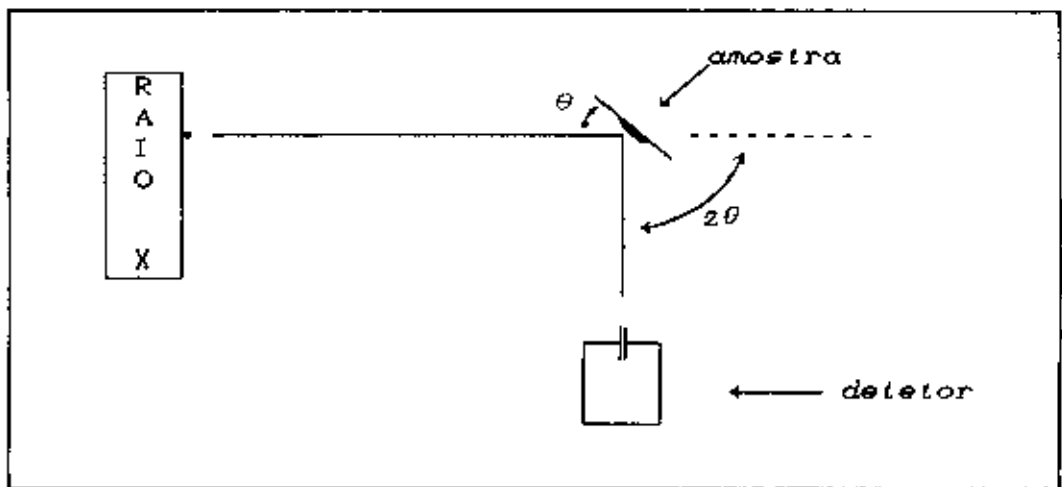


Fig. 12.3.1 - Geometria θ - 2θ

As amostras eram analisadas sob umidade controlada através de um fluxo de Nitrogênio proveniente de um frasco lavador contendo uma solução saturada de NaClO_9 .

12.4 OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Obtinhamos, inicialmente, um difratograma com varredura $\Delta 2\theta = 0,02^\circ$ com $\Delta t = 1$ seg por passo, entre os ângulos (2θ) $1,2^\circ$ e $13,0^\circ$, com a finalidade de observarmos a perfeição da amostra e a localização dos prováveis picos de difração. A seguir fazíamos uma varredura $\Delta 2\theta = 0,01^\circ$ com $\Delta t = 10$ seg para todos os picos. Uma terceira varredura era feita entre $10,0^\circ$ e $17,0^\circ$, no intuito de obtermos alguns picos da ELPT. Assim determinávamos as intensidades dos picos de difração, bem como o ruído de fundo, o que dava-nos informações sobre as estruturas de bicamadas, a formação de cristais de Elipticina e o grau de ordenação das multibicamadas.

As amostras ficavam no máximo 1 hora em exposição, e ao final era feita uma nova varredura entre $1,2^\circ$ e $7,0^\circ$ para verificar uma possível degradação da amostra. Foram analisadas em torno de 100 amostras.

A figura 12.4.1 mostra um exemplo de difratograma obtido em nossos experimentos.

DPPC (PURO)

30 kV / 30 mA

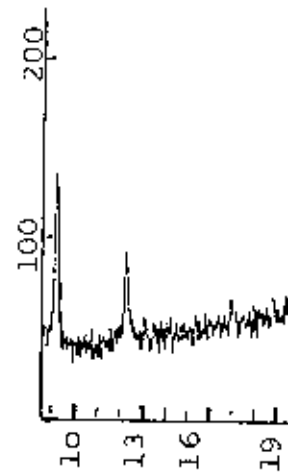
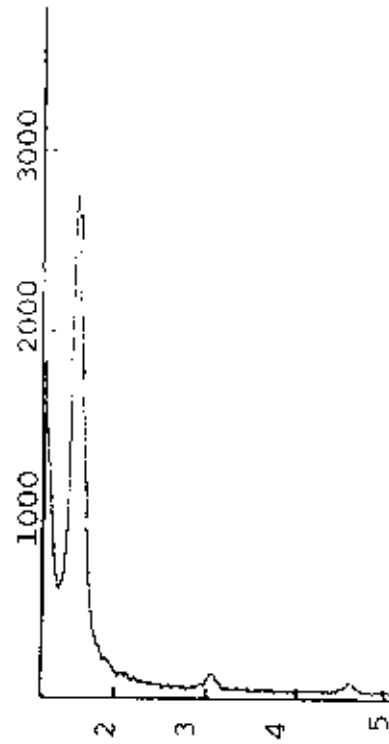
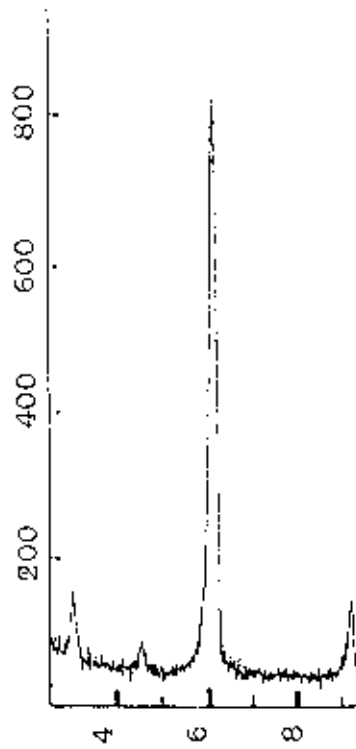
$1/2^\circ / 0.15 / 1/2^\circ$

$\Delta 2\theta = 0,02^\circ$

$\Delta t = 1 \text{ seg}$

pH 7,2

75 % H_2O



CONTAGENS POR SEGUNDO X 2θ

Fig 12.4.1 - Exemplos de difratogramas

12.5 CONSIDERAÇÕES EXPERIMENTAIS

O estudo de membranas-modelo por difração de raios-X a baixo ângulo encontra seus limites nas condições impostas pelas amostras, pelo gerador de raios-X e pelas técnicas de análise. Procuremos nesse item verificar esses limites para avaliarmos a amplitude de nossos resultados e conclusões.

Todo trabalho com material biológico deve levar em conta uma possível degradação da amostra, em função do tempo de análise. Em particular, processos oxidativos devido à presença de ar atmosférico são os mais frequentes. Sabemos que multibicamadas de DPPC e CL são relativamente estáveis (o mesmo não acontecendo com o EPC que sofre oxidação em contato com o ar), o que monitorávamos através da comparação de difratogramas obtidos no início e no final dos experimentos.

Um sistema de multibicamadas pode ser encarado como um cristal unidimensional cuja periodicidade é dada pela espessura da bicamada. Sabemos, porém, que esses sistemas não se comportam como um cristal perfeito o que implica numa forte limitação no número máximo de ordens de difração (h_{\max}) observadas. Esse número reflete a "eficiência" do sistema em se auto-orientar (devido a interações hidrofóbicas e hidrofílicas) e o grau de mobilidade das cadeias hidrocarbonadas. As consequências disso podem ser analisadas com ajuda da eq. 9.2: a função densidade eletrônica $\rho(x)$ é descrita por uma série de Fourier truncada para $h = h_{\max}$.

Esse truncamento reflete a resolução do perfil de densidade eletrônica. O conceito de resolução em difração de raios-X é similar ao usado em microscopia óptica e é definido como o menor espaçamento interplanar cujo fator de estrutura é incluído no cálculo da função $\rho(x)$.

No nosso estudo, as bicamadas apresentavam uma espessura da ordem de 58 Å e obtivemos 8 ordens de difração para as amostras de DPPC, o que implica numa resolução da ordem de 7,2 Å. Para amostras de DPPC:CL e EPC, obtivemos apenas 4 ordens de difração.

O gerador de raios-X nos limita em relação a intensidade do feixe incidente e conseqüente relação sinal-ruído dos feixes difratados. Usamos um gerador de anodo rotatório que permite-nos trabalhar com maior potência, usando um feixe linear que faz com que uma região maior da amostra seja iluminada, implicando num número maior de células unitárias em condição de difração. A utilização de filtros permite uma monocromatização adequada, mas não perfeita; elimina a linha K_{β} , mas não impede a influência da componente $K\alpha_2$ na linha $K\alpha_1^{(96)}$, o que aumenta a largura espacial dos feixes difratados. A não utilização de caminho de vácuo (o equipamento utilizado não permite a utilização desse sistema) faz com que os feixes sejam dispersos e absorvidos pelo ar, diminuindo a relação sinal-ruído, tornando crítica a leitura de difrações a ângulos maiores.

Usamos um sistema de fendas adequado às nossas condições, permitindo uma varredura de $\Delta\theta = 0,01^\circ$ com boa relação sinal-ruído.

Como vimos no item 11.2 o feixe ao atravessar a amostra é parcialmente absorvido. Para calcular os efeitos de absorção, pela amostra, nas intensidades difratadas, foram feitas as seguintes considerações: sabemos que a área efetiva da cabeça polar do DPPC é da ordem de 40 \AA^2 .^[45] Sabemos também que sua densidade é de $1,02 \text{ g/cm}^3$ e que o coeficiente de absorção de massa, levando-se em conta todos os átomos que compõe a molécula é da ordem $3,06 \text{ cm}^2/\text{g}$ ^[24].

Assim, considerando uma dispersão com 10 mg/ml , uma bicamada com 58 \AA de espessura e uma amostra com 68 mm^2 de área, temos que a altura y da amostra no substrato é da ordem de $14 \text{ }\mu\text{m}$. (fig 12.4.1)

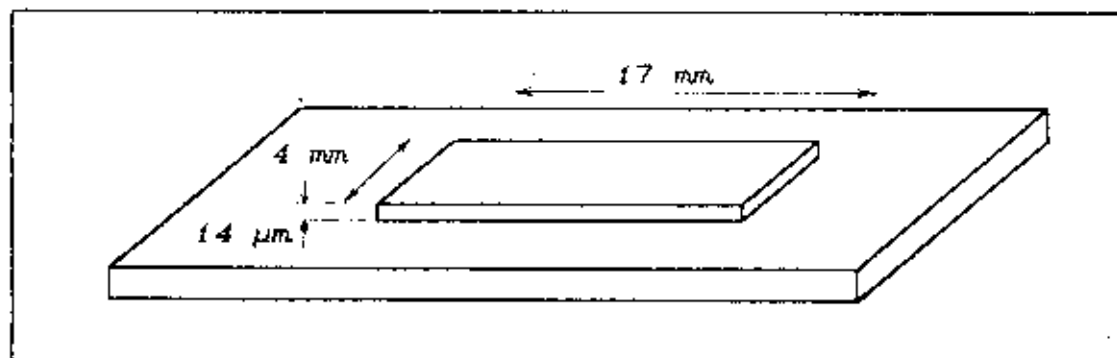


Fig 12.4.1 - Dimensões da Amostra (fora de escala)

Os valores do fator de absorção A_h , calculados usando a eq. 11.1, para cada uma das 8 ordens de difração é mostrado na tabela 12.4.1 .

h	1	2	3	4	5	6	7	8
A_h	0,52	0,72	0,80	0,85	0,88	0,90	0,91	0,92

Tabela 12.4.1 - Fator de Absorção

Concluimos então que o fenômeno da absorção altera os valores das intensidades observadas para baixos ângulos como mostra o gráfico abaixo (fig. 12.4.2).

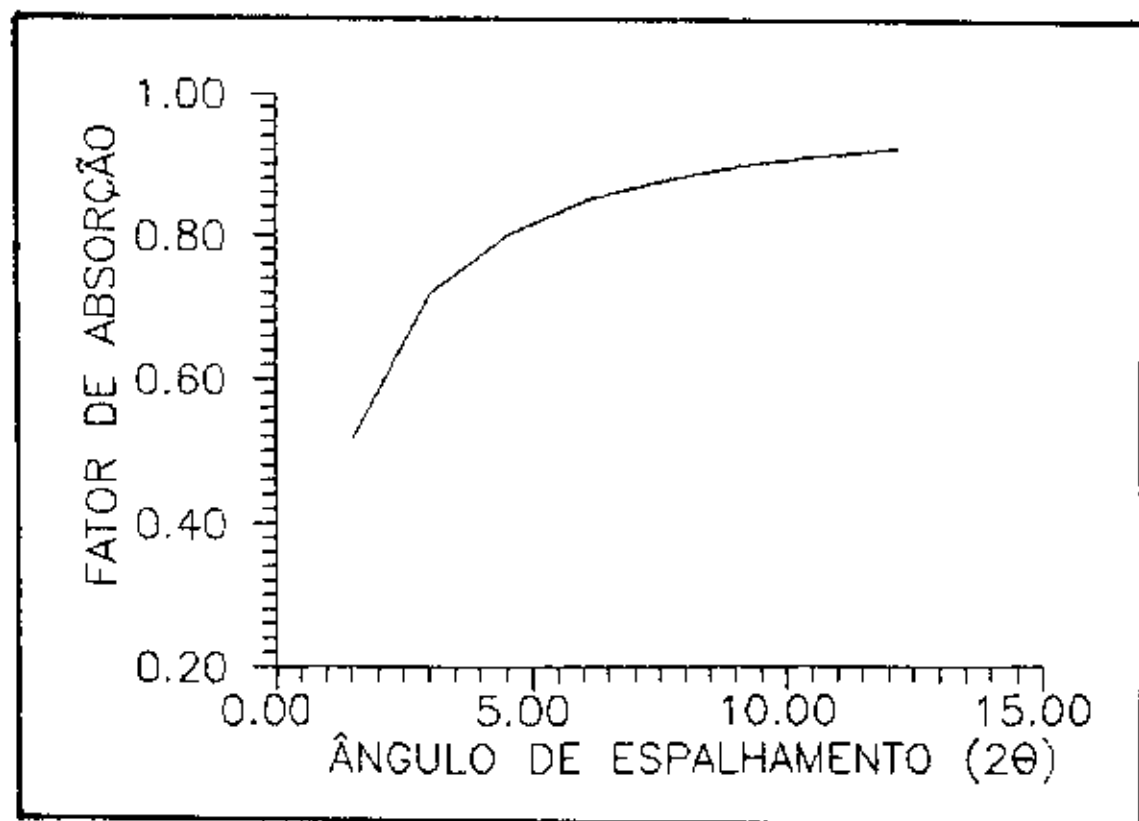


Fig 12.4.2 - Fator de Absorção versus Ângulo de Espalhamento

Considerando os efeitos de polarização nas nossas análises (item 11.3), temos que o fator de correção devido à polarização $P(\theta_h)$ é dado por:

$$P(\theta_h) = \left[\frac{1 + \cos^2 2\theta_h}{2} \right]$$

Calculando esse fator para a primeira e oitava ordem de difração, supondo um espaçamento de 58Å, temos:

$$P(\theta_1) = 1,00$$

$$P(\theta_8) = 0,98$$

Como podemos ver, a maior correção devido à polarização é da ordem de 2% .

Podemos, também, avaliar o efeito da temperatura (item 11.4) com ajuda da equação 11.5:

$$T(\theta_h) = \frac{I(\theta_h)}{I_0(\theta_h)} = \text{EXP} \left[- 2 B \frac{\text{sen}^2 \theta_h}{\lambda^2} \right]$$

Os valores típicos do fator de temperatura B para multibicamadas de fosfolípidos encontram-se entre 2 e 3 Å^2 . (24) Assim, supondo um espaçamento de 58 Å , $\lambda = 1,542 \text{ Å}$ e $B = 2 \text{ Å}^2$, temos:

$$T(\theta_1) = 0,99$$

$$T(\theta_0) = 1,00$$

Concluimos dessa forma que, assim como o fator de polarização, o efeito da temperatura é desprezível. Portanto esses dois fatores não foram levados em conta na correção das intensidades difratadas usadas em nossos cálculos

13. PROGRAMAS UTILIZADOS

O programa utilizado para o cálculo do perfil de densidade eletrônica foi desenvolvido por W. Lesslauer, J.K. Blasie e J. Cain; Universidade de Pensilvania, usando a linguagem FORTRAN, sendo adaptado para ambiente Vax e micros-PC.

O arquivo de entrada consiste do valor do espaçamento interplanar, do número de ordens de difração obtidas, das intensidades de pico e da fase de cada ordem de difração. A partir dos máximos de intensidade de cada pico de difração, o programa calcula uma função contínua para o fator de estrutura $F(x^*)$, usando o Teorema da Amostragem^[54].

Este teorema diz que se a transformada de Fourier (TF) de uma função é zero fora de um determinado intervalo

$$\text{TF} \left\{ F(x^*) \right\} = \rho(x) = 0 \quad , \text{ para } |x| \geq \frac{d}{2}$$

então a função pode ser determinada a partir de uma série de valores

$$F_n = F \left(\frac{n}{d} \right) \quad , \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$$

como,

$$F(x^*) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} F_n \frac{\text{sen } \pi(x^*d - n)}{\pi(x^*d - n)}$$

No nosso caso temos:

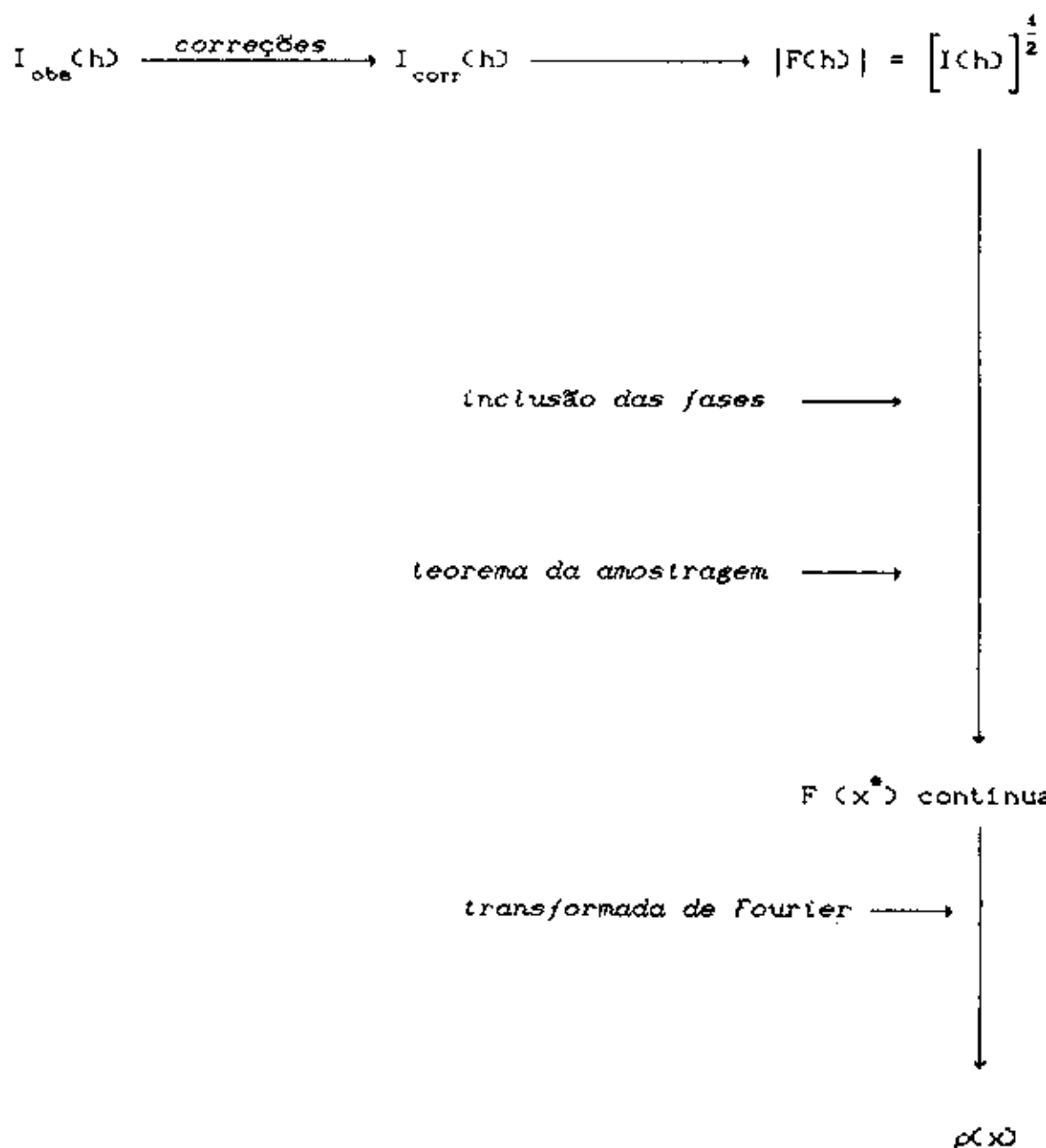
$$F(x^*) = \sum_{n=-h_{\max}}^{h_{\max}} \left[I(h) \right]^{\frac{1}{2}} e^{i\alpha(h)} \frac{\text{sen } \pi(x^*d - n)}{\pi(x^*d - n)}$$

Assim, conhecendo-se integralmente o fator de estrutura (módulo e fase) podemos, usando a equação 9.2, calcular a função $\rho(x)$ desejada.

O programa adaptado corrige as intensidades observadas em relação ao feixe, a amostra e a absorção (itens 11 e 12.5).

Desenvolvemos algumas versões do programa otimizando o processo de escolha de fases e os cálculos dos desvios nos valores das intensidades observadas e na posição de cada ponto do perfil de densidade eletrônica.

Esquematizando o funcionamento do programa, temos:



14. RESULTADOS

Os resultados aqui mostrados foram selecionados dentre uma série de aproximadamente 100 amostras, usando como critério de seleção o número de ordens de difração observadas, a largura dos picos e a relação sinal-ruído.

Todas as amostras foram analisadas usando as mesmas condições para o feixe incidente, mesma umidade (75%) e temperatura (20°C).

Foram estudados 4 (quatro) sistemas de membranas-modelo envolvendo lipídeos zwitteriônicos e também aniônicos. A tabela abaixo indica o pH usado e o número máximo de ordens de difração observado para cada sistema.

MEMBRANA	pH	Número de ordens de difração
DPPC : ELPT	7,2	8
DPPC : ELPT	9,7	8
DPPC : CL :ELPT	7,2	4
EPC : ELPT	7,2	4

Tabela 14.1 - pH e número de ordens de difração

As amostras foram preparadas segundo o método descrito nos itens 12.1 e 12.2.

As tabelas a seguir mostram os valores de intensidade observada para cada ordem de difração normalizadas para primeira ordem igual a 1000 (míl), a espessura de cada bicamada (cela unitária) e os picos dos cristais de ELPT observados.

h	PURO	50:1	25:1	10:1
1	1000	1000	1000	1000
2	24	23	23	21
3	21	20	15	15
4	182	204	192	192
5	0	0	0	0
6	20	23	25	29
7	0	0	0	0
8	16	18	13	15

Tabela 14.2 - Intensidades observadas

DPPC : ELPT - pH 7.2

h	PURO	95:1	70:1	40:1	20:1	10:1	5:1
1	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2	62	51	44	39	38	32	24
3	42	32	27	33	32	22	21
4	163	172	137	98	97	91	76
5	0	0	0	0	0	0	0
6	17	18	13	14	9	10	8
7	0	0	0	0	0	0	0
8	13	12	12	10	9	10	7

Tabela 14.3 - Intensidades observadas

DPPC : ELPT - pH 9,7

h	PURO	51 : 1	25 : 1	12 : 1	4 : 1	2,2 : 1
1	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2	63	76	41	51	91	67
3	48	69	41	29	60	67
4	484	625	588	468	400	417

Tabela 14.4 - Intensidades observadas - pH 7,2

LIPIDEO : ELPT - pH 7,2

LIPIDEO = DPPC : ELPT (4 : 1)

h	PURO	30:1	20:1	10:1	5:1	1:1
1	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2	7	7	4	1	1	1
3	28	20	20	18	20	18
4	20	27	26	25	21	26

Tabela 14.5 - Intensidades observadas

EPC : ELPT - pH 7,2

DPPC : ELPT	d (Å)
PURO	(58,5 ± 0,5)
50 : 1	(57,7 ± 0,5)
33 : 1	(57,7 ± 0,5)
25 : 1	(57,7 ± 0,5)
10 : 1	(57,7 ± 0,5)

Tabela 14.6 - Espessura da Bicamada - pH 7,2

DPPC : ELPT	d (Å)
PURO	(59,7 ± 0,5)
85 : 1	(59,7 ± 0,5)
70 : 1	(59,3 ± 0,5)
40 : 1	(58,5 ± 0,5)
20 : 1	(58,1 ± 0,9)
10 : 1	(57,7 ± 0,5)
5 : 1	(57,4 ± 0,5)

Tabela 14.7 - Espessura da Bicamada - pH 9,7

LIPIDEO : ELPT	d (Å)
PURO	(58,2 ± 0,5)
51 : 1	(57,7 ± 0,5)
25 : 1	(57,7 ± 0,5)
12 : 1	(57,7 ± 0,5)
6 : 1	(58,2 ± 0,9)
4 : 1	(58,2 ± 0,5)
2,2 : 1	(58,5 ± 0,5)

Tabela 14.8 - Espessura da Bicamada

LIPIDEO : ELPT - pH 7,2

LIPIDEO = DPPC : CL (4 : 1)

EPC : ELPT	d (Å)
PURO	(45,6 ± 0,1)
30 : 1	(48,5 ± 0,6)
20 : 1	(48,8 ± 0,6)
10 : 1	(49,1 ± 0,3)
5 : 1	(49,4 ± 0,6)
1 : 1	(49,4 ± 0,3)

Tabela 14.9 - Espessura da Bicamada

EPC : ELPT - pH 7,2

MEMBRANA	33 : 1	25 : 1	10 : 1
ELPT 1	8,35	8,37	8,37

Tabela 14.10 - Picos de difração da ELPT (2θ)

DPPC : ELPT - pH 7,2

MEMBRANA	20 : 1	10 : 1	5 : 1
ELPT 1	8,40	8,33	8,33
ELPT 2	- - -	11,28	11,28
ELPT 3	- - -	12,50	12,50
ELPT 4	- - -	- - -	15,53

Tabela 14.11 - Picos de difração da ELPT (2 θ)

DPPC : ELPT - pH 9,7

MEMBRANA	2,2 : 1
ELPT 1	8,35

Tabela 14.12 - Picos de difração da ELPT (2 θ)

DPPC : CL : ELPT - pH 7,2

MEMBRANA	10 : 1	5 : 1	1 : 1
ELPT 1	8,35	8,40	8,32
ELPT 2	- - -	- - -	11,26
ELPT 3	- - -	- - -	12,55
ELPT 4	- - -	- - -	15,70

Tabela 14.13 - Picos de difração da ELPT (2 θ)

EPC : ELPT - pH 7,2

15. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Um dos primeiros resultados observados durante a obtenção dos difratogramas é a capacidade que a ELPT tem de formar cristais num sistema de multibicamadas úmidas, a partir de determinada concentração crítica. Estes cristais são capazes de difratar os raios-X independentemente do sistema lamelar. Podemos, portanto, observar algumas das características do mecanismo de cristalização da ELPT em membranas-modelo. A tabela abaixo mostra um resumo dos resultados:

MEMBRANA	pH	CONCENTRAÇÕES CRÍTICAS	NÚMERO DE PICOS
DPPC : ELPT	7,2	(33 : 1)	1
EPC : ELPT	7,2	(10 : 1)	1
		(1 : 1)	4
DPPC : CL : ELPT	7,2	(6,3 : 1,7 : 1)	1
DPPC : ELPT	9,7	(20 : 1)	1
		(10 : 1)	3
		(1 : 1)	4

Tabela 15.1 - Picos de difração da ELPT

As figuras a seguir mostram exemplos de difratogramas correspondentes ao processo de cristalização da ELPT.

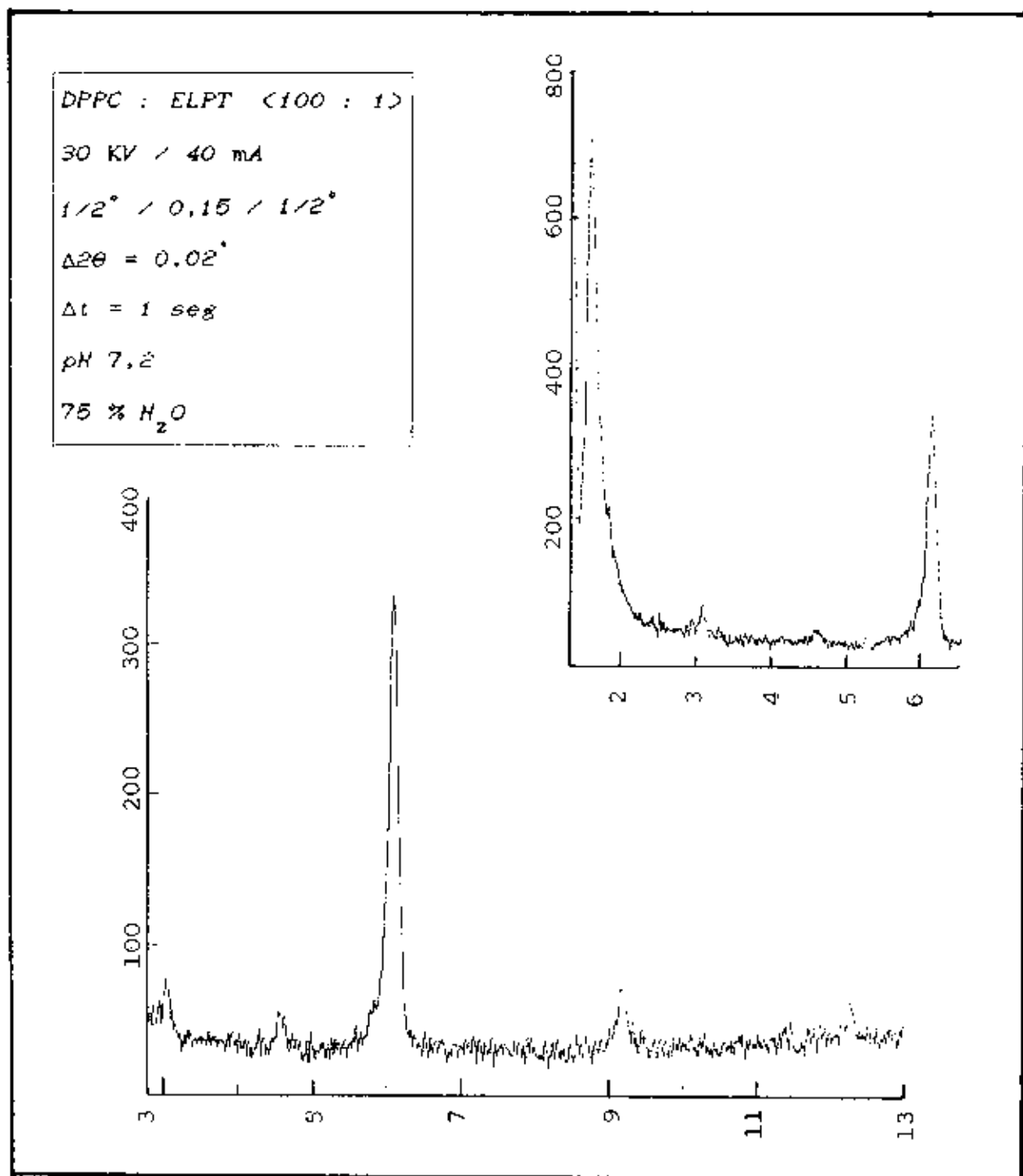


Fig. 15.1 - Difratograma (antes da concentração crítica)

DPPC : ELPT (10 : 1)

30 KV / 40 mA

$1/2^\circ / 0,15 / 1/2^\circ$

$\Delta 2\theta = 0,02^\circ$

$\Delta t = 1 \text{ seg}$

pH 7,2

75 % H_2O

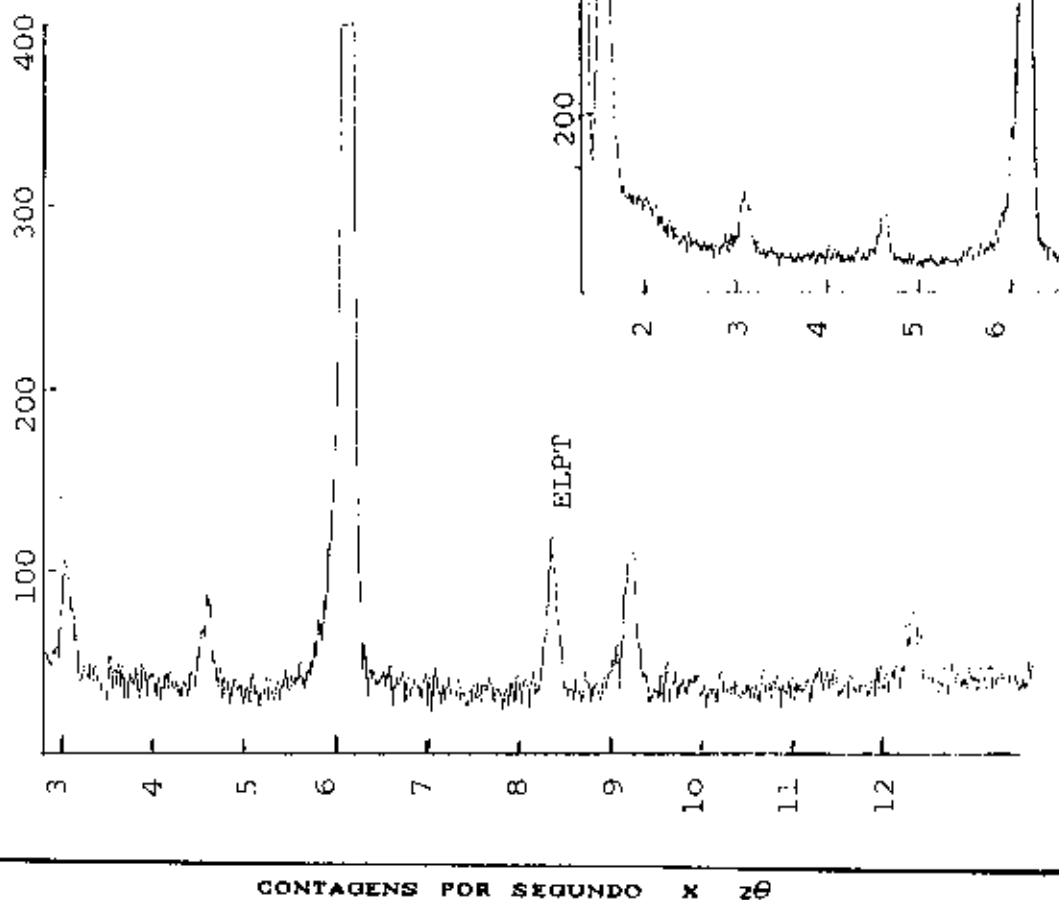


Fig. 15.2 - Difratoograma (após concentração crítica)

Os mecanismos de incorporação e cristalização da ELPT são analisados nos parágrafos seguintes, tendo em conta a composição e propriedades de cada um dos sistemas de membranas-modelo utilizados.

15.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS SISTEMAS EM ESTUDO

Sabemos que a fluidez e permeabilidade de uma membrana dependem da conformação das cadeias hidrocarbonadas^(2a). A fluidez é maior quanto mais desordenado é o sistema, de forma que a membrana torna-se mais permeável quando sofre uma transição de fase de um estado gel para um estado líquido-cristalino.

Vimos que o DPPC apresenta-se no estado gel à temperatura ambiente e que possui carga líquida nula em pH 7,2 e pH 9,7 (item 4.2).

Sabemos que a Cardiolipina é um fosfolípido aniônico, ou seja, com carga líquida negativa. A Cardiolipina sozinha não é capaz de formar multibicamadas ordenadas, essenciais para o estudo de difração de raios-X. Um artifício usado para o estudo de membranas-modelo com carga líquida negativa é a introdução de CL numa matriz DPPC; assim obtínhamos uma membrana com carga líquida negativa, devido à presença da CL, com um bom grau de ordenação das multibicamadas, devido ao DPPC, que possibilita interações eletrostáticas mais intensas e uma permeabilidade de membrana maior.

À temperatura ambiente, o EPC encontra-se no estado líquido-cristalino o que dificulta o estudo por difração de raios-X, uma vez que apenas 4 (quatro) ordens são observadas. Por outro lado, a desordem nas cadeias hidrocarbonadas aumenta a permeabilidade da membrana.

Resumindo algumas propriedades dos sistemas usados em nossos estudos com membranas-modelo, temos:

SISTEMA	N. DE ORDENS DE DIFRAÇÃO	FASE ESTRUTURAL	PERMEABILIDADE RELATIVA (*)	CARGA LÍQUIDA
DPPC : ELPT	8	GEL	BAIXA	NULA
EPC : ELPT	4	LIQUIDO CRISTALINA	ALTA	NULA
DPPC : CL : ELPT	4	GEL	MÉDIA	NEGATIVA

(*) comparação entre os sistemas usados

Tabela 15.2 - Resumo das propriedades

Procuramos analisar os sistemas em estudo, comparando-os entre si, a fim de entender os efeitos da permeabilidade, afinidade eletrostática e pH, no mecanismo de cristalização e incorporação da ELPT.

O fenômeno da cristalização é observado pelo aparecimento de picos característicos do cristal de ELPT nos difratogramas.

15.2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS

15.2.1 - DPPC (7,2) / EPC (7,2)

Nas experiências de difração de raios-X usando o sistema DPPC:ELPT, a pH 7,2, a concentração crítica de ELPT que dá origem ao aparecimento de um pico proveniente de cristais de ELPT é (33 : 1) enquanto que para o sistema EPC:ELPT é de (10:1). Isso indica que quanto maior a permeabilidade do sistema, uma maior concentração de ELPT é necessária para a cristalização e separação de fase da ELPT nas multibicamadas.

Recorrendo aos resultados descritos no item 5.1, obtidos por análises espectrofotométricas⁽²⁶⁾, podemos concluir que a ELPT cristaliza em solventes hidrofílicos (água - fig. 5.1.1b), o mesmo não acontecendo em solventes hidrofóbicos (etanol - fig 5.1.1a).

Isso leva-nos a concluir que cristais de ELPT formam-se apenas fora da bicamada (na fase aquosa), e que a ELPT incorporada não contribui na formação dos cristais.

Com o aumento da concentração de ELPT (10 : 1) no sistema EPC:ELPT, observamos apenas ainda um único pico de difração, o que indica que a cristalização é bastante imperfeita ou leva à formação de cristais de dimensões pequenas. Apenas em concentrações extremamente altas (1 : 1) observamos o aparecimento de 4 (quatro) picos de difração para o sistema EPC:ELPT.

Concluimos, então, que quanto maior a permeabilidade do sistema, menor a quantidade de ELPT disponível para a cristalização na fase aquosa, indicando, assim, uma grande quantidade de ELPT incorporada.

Vimos anteriormente que a Cardiolipina, um fosfolípido aniônico, tem grande afinidade com a forma protonada da ELPT (item 5.1) devido a sua carga líquida negativa decorrente da presença dos grupamentos Fosfatos⁽²⁵⁾. Com a introdução de Cardiolipina na membrana, observa-se que a concentração crítica (Lípido:ELPT) aumenta para (8 : 1). Assim, é necessária uma maior concentração de ELPT no sistema DPPC:CL:ELPT para a obtenção do primeiro pico de difração da ELPT cristalina em relação ao sistema DPPC:ELPT.

Assim, vemos que a presença de lípidos aniônicos favorece a incorporação da ELPT na bicamada.

Mesmo em concentrações extremamente altas (2,2 : 1) observamos ainda apenas um único pico de difração referente a cristais de ELPT.

Porém, devemos lembrar que na presença de fosfolípidos aniônicos o pK aparente da ELPT é da ordem de 8,5 (para o DPPG) (item 5.1). Assim, o sistema DPPC:CL induz, a pH 7,2, uma maior concentração da forma protonada na fase aquosa, uma vez que $7,2 < pK_{ap} < 8,5$.

É esperado que, na presença de CL, a eficiência da forma protonada da ELPT no processo de incorporação seja maior, prejudicando o processo de cristalização.

Observamos inicialmente que a concentração crítica de ELPT para conseguir a cristalização, a pH 9,7 é maior (20 : 1) quando comparada ao mesmo sistema a pH 7,2 (33 : 1). Isso leva-nos a concluir que, em sistemas zwitteriônicos, há uma maior incorporação da forma neutra da ELPT em relação à forma protonada.

Aumentando a concentração para (10 : 1), observamos 3 (tres) picos de difração dos cristais de ELPT para o sistema DPPC:ELPT a pH 8,7.

Este resultado parece indicar que a cristalização a partir da forma neutra é mais ordenada.

Observamos que a alta permeabilidade do EPC "equivale" a alta afinidade eletrostática do DPPC:CL, uma vez que as concentrações críticas de cristalização da ELPT nas bicamadas são bem próximas: (10 : 1) e (8 : 1), respectivamente.

É interessante notar que em concentrações mais altas, temos o aparecimento de 4 (quatro) picos de difração para o sistema EPC:ELPT, enquanto apenas 1 (um) para o sistema DPPC:CL:ELPT.

A formação de cristais de ELPT parece ser mais ordenada no sistema EPC:ELPT. No sistema DPPC:CL:ELPT a cristalização se mostra mais imperfeita. A razão disso pode ser devido à presença de uma maior concentração da forma protonada na fase aquosa, uma vez que a presença de Cardiolipina induz um aumento no pK aparente da ELPT. De acordo com resultado anterior, acreditamos que a forma protonada não favoreça o processo de cristalização.

Assim, concluímos que a permeabilidade é tão importante quanto a afinidade eletrostática no processo de incorporação da ELPT.

Tendo em vista, novamente, a cristalização da ELPT, nos sistemas EPC:ELPT (7,2) e DPPC:ELPT (9,7), observamos que a maior permeabilidade do EPC torna esse sistema mais eficiente para a incorporação da ELPT, quando comparado ao efeito da desprotonação da ELPT no sistema DPPC:ELPT (9,7), uma vez que a concentração crítica para a cristalização é maior para o sistema EPC:ELPT.

Por outro lado, lembrando que para a forma neutra da ELPT o processo de cristalização é mais ordenado, e que a pH 7,2 temos 50% de ELPT na forma protonada, é esperado que no sistema EPC haja uma menor formação de cristais, fazendo com que a concentração crítica seja maior.

Assim, concluímos que a desprotonação da ELPT e a permeabilidade são importantes no processo de incorporação na membrana.

Como vimos anteriormente (item 15.2.2) a presença de Cardiolipina induz um aumento no pK aparente da ELPT, que implica no aumento da concentração da forma protonada, que por sua vez é menos eficaz na formação de cristais, necessitando uma concentração maior para a formação dos cristais de ELPT.

Assim, concluímos que a afinidade eletrostática da ELPT protonada no sistema DPPC:CL:ELPT (7,2) é tão eficaz na incorporação da droga quanto a desprotonação da ELPT no sistema DPPC:ELPT.

15.2.7 - CRISTALIZAÇÃO x INCORPORAÇÃO

Resumindo as conclusões anteriores, temos:

i) fatores que favorecem a cristalização da ELPT:

(na fase aquosa das multibicamadas)

- presença de ELPT na forma neutra;
- concentração de ELPT;
- ELPT não incorporada à membrana.

ii) fatores que favorecem a incorporação (na fase lipídica):

- permeabilidade da membrana;
- afinidade eletrostática entre droga-membrana;
- presença de ELPT na forma neutra.

15.3 - VARIAÇÃO DA ESPESSURA DAS BICAMADAS

Observando as tabelas 14.6 a 14.8 notamos que com o aumento da concentração de ELPT, o tamanho da cela unitária varia.

A cabeça polar de um fosfolípideo é relativamente rígida, com poucas variações em suas dimensões. O mesmo não acontece com as cadeias hidrocarbonadas.

De acordo com o grau de desordem, as cadeias hidrocarbonadas podem reduzir seus "tamanhos efetivos" através de mudanças conformacionais *trans-gauche* (fig. 4.2.4).

Assim podemos associar a diminuição da espessura da bicamada com o aumento da desordem das cadeias hidrocarbonadas, o que reflete no aumento da permeabilidade da bicamada.

Da tabela 14.6, para DPPC:ELPT (pH 7,2) podemos observar que há um leve encolhimento da bicamada, que não pode ser considerado significativo por estar dentro dos limites de erro da medida.

Por outro lado, para DPPC:ELPT (pH 9,7), tabela 14.7, temos uma variação significativa da espessura da bicamada, o que nos leva a concluir que a incorporação de ELPT no sistema é capaz de induzir uma desordem nas cadeias hidrocarbonadas. Nesse caso haveria um aumento da permeabilidade da bicamada.

Esses resultados leva-nos a concluir que a forma neutra da ELPT é capaz de induzir uma maior desordem em relação à forma protonada porque é mais facilmente incorporada.

Ao ser incorporada na fase lipídica da bicamada, a ELPT encontra um pH neutro, e um novo equilíbrio neutro \rightleftharpoons protonado é atingido, independente do pH da fase aquosa.

Assim, podemos concluir que o excesso da forma neutra favorece a penetração na bicamada (para fosfolípidos zwitteriônicos), mas ao penetrar, teremos as duas formas em concentrações praticamente iguais, de modo que as duas formas da ELPT podem ser capazes de induzir a desordem.

Observando os resultados para o sistema DPPC:CL, tabela 14.8, notamos que até uma concentração da ordem de (10 : 1) existe um leve encolhimento na bicamada e a partir desse valor, a espessura volta a crescer, havendo, inclusive, um inchamento para concentrações extremamente altas (2,2 : 1). Essa variação, porém, não é significativa uma vez que está dentro dos erros experimentais.

A tabela 14.9, para EPC, pH 7,2, mostra um crescente e significativo aumento da espessura da bicamada. Esse aumento, porém, não é associado a uma "ordenação" das cadeias hidrocarbonadas, mas sim a um inchamento devido a presença de um número cada vez maior de moléculas de ELPT. Podemos notar também que após a concentração crítica (10 : 1) (tabela 15.1) o processo de inchamento parece cessar, caracterizando um estado de saturação.

Resumindo as informações a respeito da variação da espessura da bicamada, podemos concluir que, quando incorporada, a ELPT é capaz de induzir desordem na bicamada. Poderíamos concluir também que, após a concentração crítica, a espessura atinge um valor praticamente constante.

15.4 - PERFIL DE DENSIDADE ELETRONICA

Para obtermos informações sobre a estrutura da bicamadas a nível molecular, calculamos os perfis de densidade eletrônica para os sistemas DPPC:ELPT a pH 7,2 e pH 9,7, dos quais puderam ser observados 8 (oito) ordens de difração.

Os resultados são mostrados nas figuras abaixo:

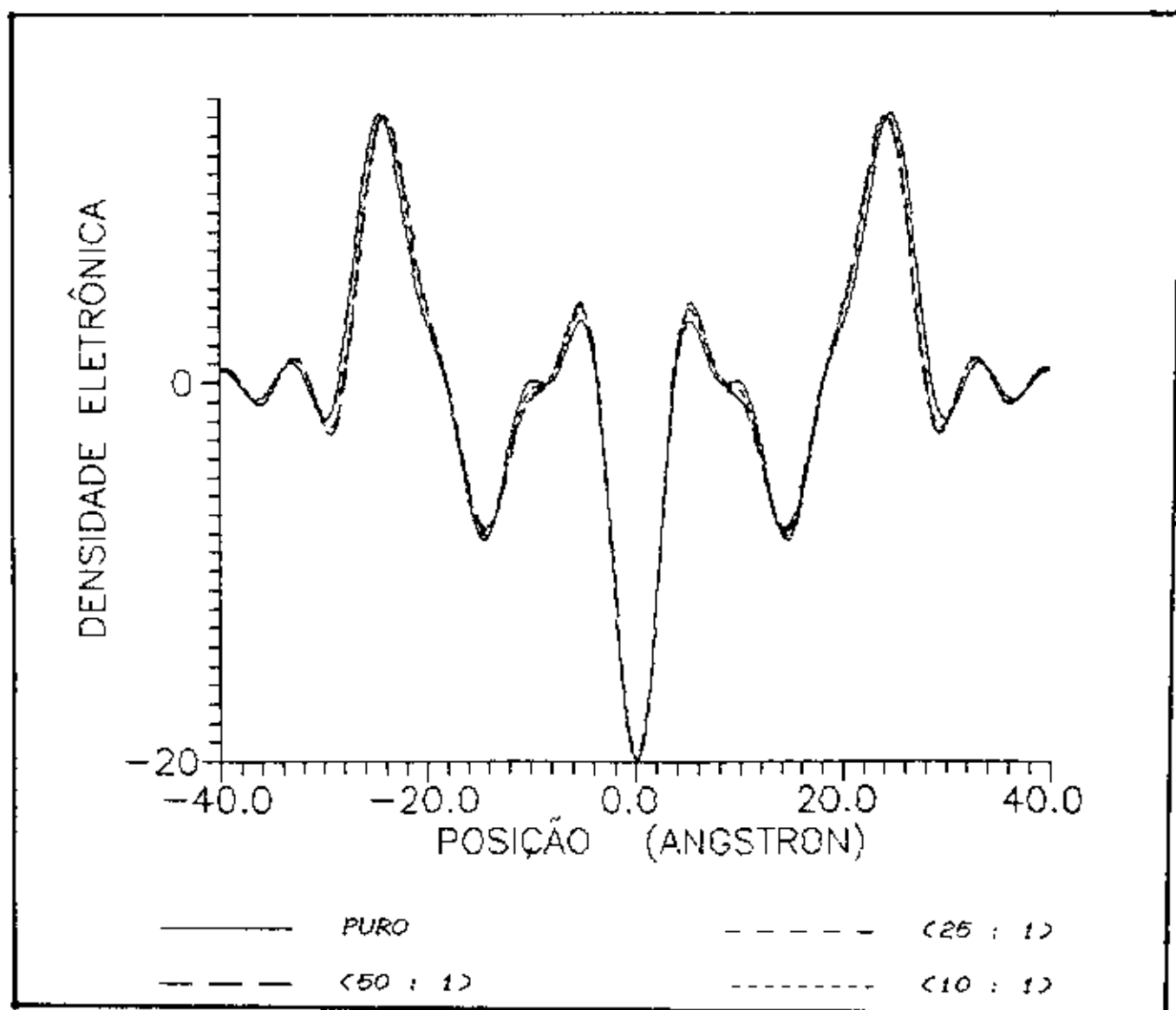


Fig. 15.4.1 - DPPC : ELPT (pH 7,2)

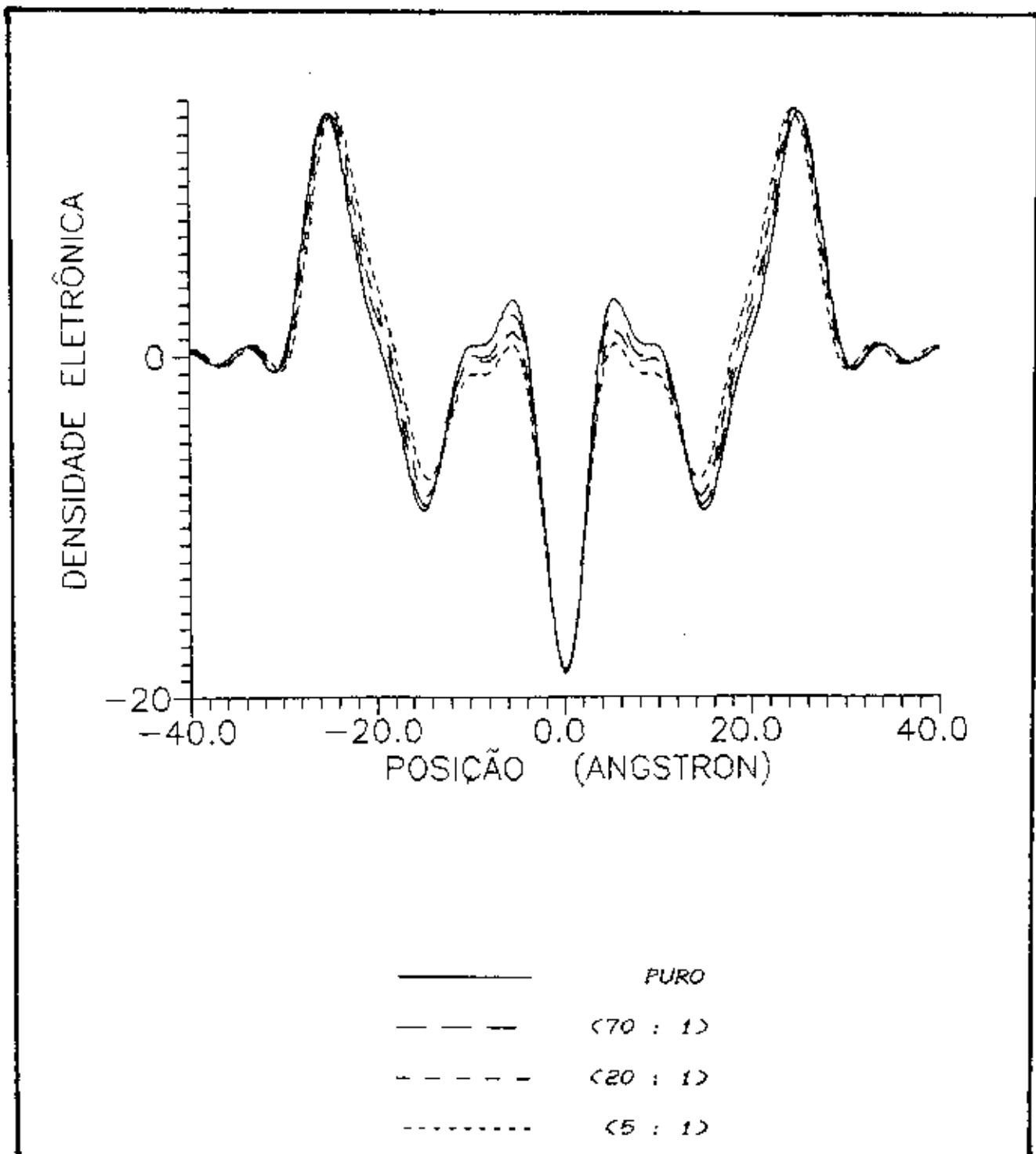


Fig. 15.4.2 - DPPC : ELPT (pH 9,7)

Podemos associar algumas regiões do perfil com os grupamentos constituintes dos fosfolípidos na bicamada (fig. 15.4.3).

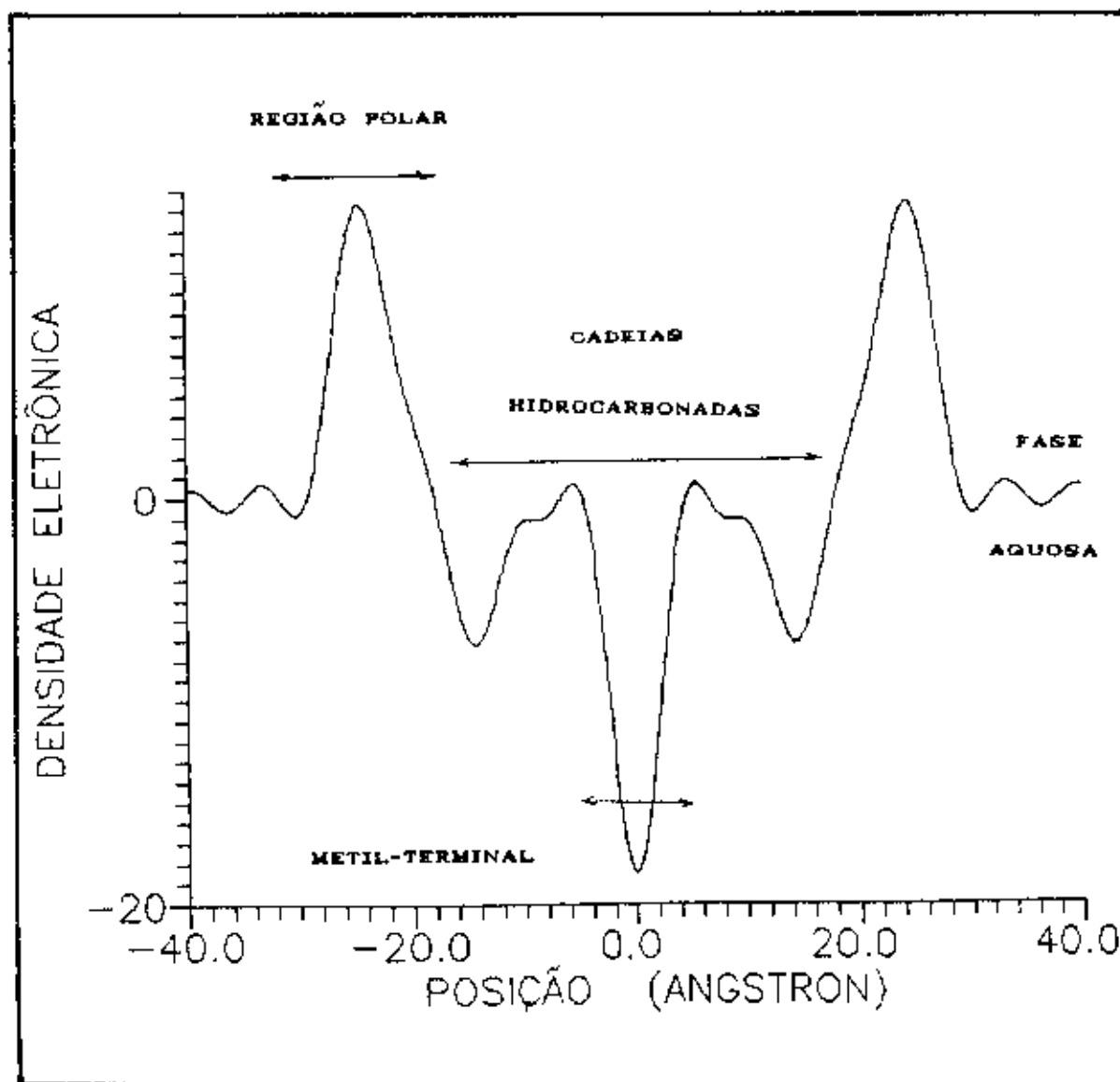


Fig. 15.4.3 - Regiões da Bicamada

Observando a figura 15.4.1, notamos uma pequena variação da posição do pico referente à região polar, conforme a concentração de ELPT aumenta. Isso confirma a idéia de que a incorporação de ELPT induz desordens nas cadeias hidrocarbonadas fazendo com que a espessura da bicamada diminua (item 15.3).

Notamos, também, que o perfil para as concentrações (25:1) e (10:1) são praticamente iguais. Lembrando que a concentração crítica para a observação dos cristais de ELPT (tabela 15.1) é (33:1), podemos confirmar o fenômeno da saturação da bicamada.

Observando a figura 15.4.2 (pH 9,7), vemos uma variação significativa da posição dos picos, evidenciando uma maior desordem nas cadeias hidrocarbonadas (confirmando os resultados anteriores).

Comparando as duas amostras, percebemos que a presença de ELPT a pH 9,7 causa uma variação maior na densidade eletrônica da região das cadeias hidrocarbonadas e nas proximidades da região polar, evidenciando uma maior incorporação, de acordo com as conclusões do item 15.2.3.

18. CONCLUSÃO

O estudo da incorporação de ELPT em membranas-modelo, por técnicas de difração de raios-X a baixo ângulo, leva-nos a conclusões a respeito dos processos de cristalização da ELPT nas bicamadas, da potencialidade de incorporação da droga por sistemas anfifílicos e das alterações estruturais das bicamadas.

Uma primeira conclusão diz respeito ao fato da ELPT formar uma fase cristalina nas multibicamadas de fosfolipídeos, a partir de uma concentração crítica.

Assim, a presença da ELPT manifesta-se por duas formas:

- i) um espectro de difração sobreposto às linhas de difração dos fosfolipídeos;
- ii) alterações no espectro da difração da bicamada.

A primeira forma caracteriza a capacidade de cristalização da ELPT em fase aquosa [Ref. 26]; é interessante lembrar que os dados cristalográficos encontrados na Literatura são decorrentes de processos de cristalização a partir de Metanol [Ref. 5 e 52]. A segunda forma indica que a ELPT é capaz de se incorporar na bicamada causando alterações na espessura e na distribuição eletrônica da bicamada.

Os cristais de ELPT formados a partir da forma neutra (pH 9,7) mostram-se bem mais perfeitos, quando comparados aos formados na presença da forma protonada (pH 7,2). É importante ressaltar que a cristalização ocorre apenas na fase aquosa do sistema e que a ELPT incorporada não participa do processo de cristalização. Assim, concluímos que o estudo do fenômeno da cristalização da ELPT na presença de sistemas anfífilicos pode dar informações sobre a capacidade de incorporação da droga.

Nossas experiências demonstram a possibilidade de estudarmos a incorporação de ELPT em sistemas de membranas naturais, pois baseiam-se simplesmente na obtenção de difratogramas com poucas ordens de difração.

Concluimos, também, que a quantidade de ELPT incorporada depende das características da membrana (permeabilidade e carga líquida dos fosfolípidos), bem como da protonação ou não da ELPT. Essas propriedades da membrana e da droga podem contribuir para os mecanismos de seletividade da droga, à nível de membrana.

Estes resultados podem ter uma aplicação importante no estudo da formação de vesículas lipídicas, contendo ELPT, que podem ser usadas como "veículo de transporte da droga.

O cálculo do perfil de densidade eletrônica mostra que a incorporação da ELPT dá-se na região hidrocarbonada da bicamada, confirmando o caráter hidrofóbico da ELPT.

Concluimos, também, que a protonação da ELPT altera sua capacidade de incorporação, o que pode ser visto na comparação dos perfis de densidade eletrônica para pH 7,2 e pH 9,7.

Um recurso que não pode ser explorado durante nosso trabalho é a obtenção de registros fotograficos dos feixes difratados pelas amostras.

A implementação desse recurso exigiria a montagem de uma geometria específica, inviável durante nosso trabalho. Essa técnica permitiria a melhor observação da ordenação dos cristais de ELPT, bem como das cadeias hidrocarbonadas. Poderíamos estudar também efeitos da incorporação da ELPT na temperatura de transição dos fosfolípidos.

Assim, nosso trabalho abre a perspectiva para a continuação do estudo da interação MEMBRANA : DROGA, usando diferentes técnicas de difração de raios-X, assim como outras técnicas experimentais e teóricas, revelando o caráter interdisciplinar do assunto.

A1. TOXICIDADE SELETIVA^(*)

A Toxicidade seletiva de uma droga refere-se à destruição de um determinado tecido ou tipo de matéria orgânica sem causar danos a outra, mesmo que intimamente relacionada à primeira. Os danos podem ser reversíveis ou não.

Anestésicos ilustram de forma admirável o que significa toxicidade seletiva. Quanto mais lipofílico um anestésico, mais difícil será sua metabolização e excreção, permanecendo, assim, mais tempo no organismo, o que aumenta sua eficiência. A toxicidade, porém, deve ser seletiva para o sistema nervoso central e também completamente reversível com o tempo. O uso de Éter por Morton em 1846 foi uma das primeiras e mais convincentes demonstrações de toxicidade seletiva.

A1.1 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA SELETIVIDADE

Existem 3 princípios básicos que determinam a seletividade dos citotóxicos e seus efeitos: por um grande acúmulo, principalmente pelas células doentes, por processos bioquímicos que afetam parâmetros fundamentais para as células doentes (mas não para as saudáveis), ou por alguma característica citológica das células doentes. Esses 3 processos agem com frequência de forma simultânea, ainda que com preponderância de um deles.

A1.1.1 SELETIVIDADE ATRAVES DE ACUMULAÇÃO

Um exemplo comum é o combate a insetos que infectam determinados mamíferos: como os insetos possuem, comparativamente, uma grande área superficial em relação ao seu volume, a absorção de agentes tóxicos pela superfície, é mais significativa do que para os mamíferos.

A1.1.2 SELETIVIDADE ATRAVES DA BIOQUÍMICA COMPARADA

Até a metade do século acreditava-se que toda matéria viva apresentava uma bioquímica comum, o que impossibilitaria uma base bioquímica para a toxicidade seletiva. Essas idéias baseavam-se no fato de que todas as formas de vida apresentavam a célula como unidade básica, apresentando também ácidos nucleicos que possibilitam a codificação genética de informações necessárias para o bom funcionamento do organismo, que são transmitidas pela síntese de mais ácidos nucleicos e de proteínas específicas, como as enzimas. Drogas como a *Colchicina* podem interferir em um particular estágio da mitose celular em todas as espécies. Além disso, muitos processos catabólicos são semelhantes. O metabolismo de carboidratos e gorduras é feito por processos similares, usando enzimas similares. O mecanismo da glicólise é semelhante desde formas de vida mais simples, encontradas em leveduras, até em tecidos altamente organizados, tais como músculos e fígado humanos.

A presença da molécula Adenosina-Trifosfato (ATP), fundamental em processos metabólicos, é uma característica comum das células. As células requerem Ferro ou outros materiais pesados como cofatores. Algumas vitaminas, tais como Tiamina (B1), Riboflavina (B2) e Nicotinamida (PP), formam partes essenciais das coenzimas de todos os sistemas vivos.

Porém, apesar de todas essas similaridades, o fato é que cada espécie tem suas características próprias, o que indica que possuem processos bioquímicos diferentes. Mesmo nos vários tecidos de uma mesma espécie podem haver diferenças bioquímicas. As diferenças mais significativas entre as espécies tem sido encontradas não nos processos degradativos, mas sim na escolha e biossíntese de enzimas e substâncias ainda menores, usadas para o crescimento e divisão celular.

A1.1.3 SELETIVIDADE ATRAVÉS DE CITOLOGIA COMPARADA

Sabemos que entre plantas e animais existem inúmeras diferenças citológicas. As paredes celulares, à base de celulose, e os processos fotossintéticos são exclusivos de plantas, enquanto nervos e músculos são exclusivos de animais. Após o desenvolvimento da microscopia eletrônica, pode-se constatar a existência de inúmeras organelas intracelulares e que cada espécie, ou mesmo diferentes tecidos de uma mesma espécie apresentam diferenças na quantidade e qualidade de organelas.

A2. QUIMIOTERAPIA: HISTÓRIA E PRINCÍPIOS⁽⁴⁾

Bactérias foram descobertas por Antonie van Leeuwenhoek em Drecht, Holanda, em 1676, mas sua relação com infecções, pestes e epidemias foi estabelecida apenas dois séculos mais tarde por Robert Koch em seus estudos sobre o "antrax". Koch postulou a relação entre microbios e doenças, o que possibilitou aos biólogos estudarem, pela primeira vez, doenças infecciosas em laboratórios. Este era o cenário inicial a partir do qual se desenvolveu a Quimioterapia.

A2.1 HISTÓRIA DA QUIMIOTERAPIA

Em 1891, Romanovisky descobriu que o parasita da malária, no sangue de pacientes, era destruído pelo tratamento com Quinina. Isto levou Romanovisky a estabelecer que a droga Quinina era capaz de curar a malária destruindo preferencialmente o parasita, do que o hospedeiro. Essa conclusão tem importância histórica pois até este momento, ninguém havia imaginado que uma droga pudesse agir dessa maneira. Romanovisky predisse, ainda em 1891, que outras drogas específicas para determinadas doenças viriam a ser descobertas, drogas essas que causariam um dano mínimo nos tecidos do hospedeiro e máximo no parasita. Essa linha de pensamento estava fora de sintonia com a comunidade científica da época e apenas mais tarde, com os trabalhos de Paul Ehrlich, o assunto tomou forma e definiram-se os princípios da Quimioterapia.

O termo Quimioterapia foi estabelecido por Ehrlich, significando o uso de drogas para destruir um organismo invasor sem destruir o hospedeiro. A essência da Quimioterapia é favorecer as diferenças entre hospedeiro e parasita de forma que os leucócitos do hospedeiro e outras defesas naturais vençam a "batalha" contra o parasita, ou seja, uma droga é eficaz quando ela faz com que a batalha tenda a favor do hospedeiro.

A2.2 CONTRIBUIÇÕES DE PAUL EHRLICH

O interesse de Ehrlich na Quimioterapia começou efetivamente em 1890. Nesse ano ele foi escolhido para Diretor do Instituto de Terapias Experimentais em Frankfurt. Tinha então 45 anos de idade. Em visitas a HOECHST em Frankfurt, Ehrlich viu-se frente a frente com a indústria de Química sintética alemã e vendo a produção de analgésicos e anestésicos, pareceu-lhe lógico que, assim como era possível a síntese de inúmeras substâncias simples de ação específica sobre os vários tecidos humanos, seria possível também a síntese de pequenas moléculas capazes de diferenciar hospedeiros de parasitas. A ênfase em pesos moleculares baixos ilustra o contraste que Ehrlich fazia entre Imunoterapia (terapia com vacinas) e Quimioterapia. Ele conceituava a Imunoterapia como uma forma de aumentar as forças de defesa do organismo, e a Quimioterapia como uma forma de ataque direto ao parasita. O problema seria achar substâncias químicas com afinidade muito mais forte ao parasita do que aos tecidos do hospedeiro.

Um novo impulso aos trabalhos de Ehrlich foi dado em 1908 com a construção do Instituto Georg Speyer (um rico banqueiro alemão que doou parte de sua fortuna para a construção de Instituto). Ehrlich trabalhou nessa época com Sahachiro Hata que estudava a espiroqueta da sífilis (doença considerada por alguns como "castigo divino" pois vinha para liquidar as prostitutas, os maridos infiéis e os desajustados sexuais). Eles descobriram em 1910 uma droga de muita utilidade clínica, o "Salvarsan", que dispendeu muito tempo até a determinação de uma dose adequada para tratamento. Ehrlich esperava, inicialmente, curar as infecções com uma única e grande dose de sua droga, mas suas experiências demonstraram que a droga era tão tóxica ao hospedeiro que a única maneira viável de utilização era a administração de pequenas doses por um período de vários meses.

Na procura de drogas que tivessem uma grande afinidade ao parasita e pouca ao hospedeiro, Ehrlich introduziu um "Índice Quimioterápico" definido por:

$$IQ = \frac{\text{mínima dose curadora}}{\text{máxima dose tolerada}}$$

Métodos para a determinação desses índices foram aprimorados com o passar do tempo.

Ehrlich faleceu em 1915 mas deixou-nos os princípios básicos da Quimioterapia. Nos anos seguintes, novas drogas foram desenvolvidas e vários trabalhos confirmaram suas idéias sobre a natureza das ligações químicas entre droga e parasita e da ação cooperativa entre a droga e as defesas naturais do hospedeiro.

O ano de 1935 é uma divisão natural na História da Quimioterapia devido aos trabalhos de Domagk sobre as propriedades do *Protosil*, a primeira droga bactericida desenvolvida em laboratório. Essa descoberta destruiu a até então idéia de que a Quimioterapia era aplicada principalmente a doenças tropicais e inaugurou uma nova era na busca de tratamentos médicos e cirúrgicos, com a descoberta de novas drogas e o desenvolvimento de várias drogas sintéticas, à base de sulfas (fig. A3.2a) com a ajuda de técnicas mais apuradas e de estudos sobre a relação Estrutura-Atividade.

A3. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE⁽⁴⁾

Efeitos farmacológicos são altamente relacionados à estrutura química de seus agentes: se ela varia, ainda que sutilmente, o grau de atividade e eficiência podem ser altamente comprometidos. Por exemplo, a atividade da vitamina B1 (Tiamina) (figura A3.1a) decresce para apenas 5% se o grupo metil é retirado do anel de pirimidina e para < 1% se o grupo metil é retirado do anel tiazol⁽⁴⁾. Ainda mais, se um outro grupo metil é inserido no anel tiazol (entre N e S) a atividade da vitamina desaparece completamente⁽⁵⁷⁾. Essa regra de que cada parte da substância é fundamental para sua atividade não se aplica para cadeias laterais. Por exemplo, a grande cadeia hidrofóbica na posição C3 da vitamina K1 (Filoquinina) (figura A3.1b) pode ser retirada sem afetar a atividade da vitamina⁽⁴⁾. Nesse caso a cadeia lateral participa da adsorção da vitamina em receptores. Cada fármaco deve ser considerado particularmente, para se descobrir quais as regiões ou grupamentos importantes para a sua ação.

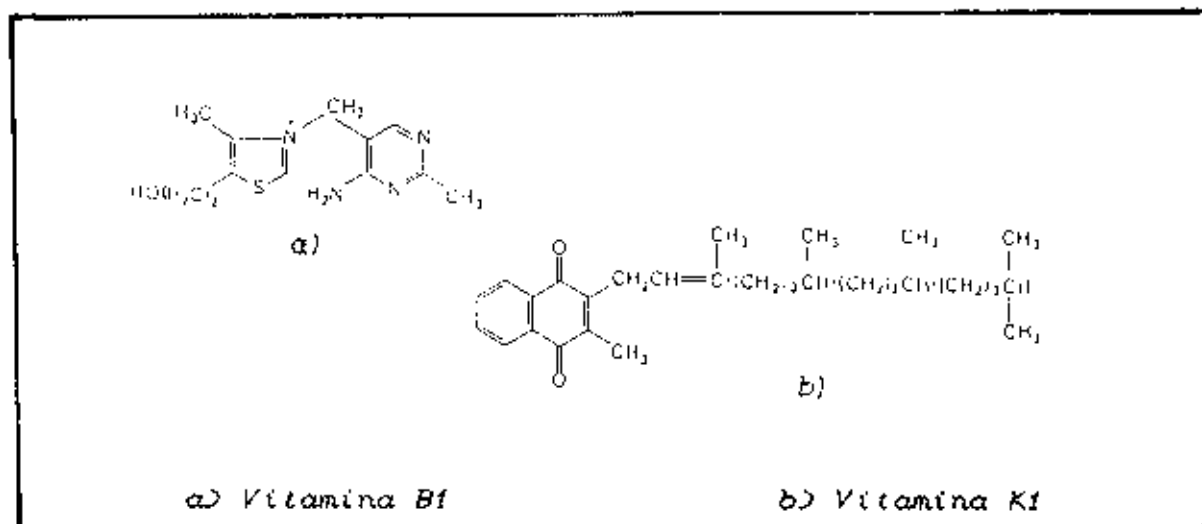


Fig. A3.1 - Relação Estrutura-Atividade

Drogas sintéticas também podem ser estudadas através da relação estrutura-atividade. Na Benzenosulfonamida (fig A3.2a) a inserção de um grupo amina em 3 posições diferentes, leva à inativação em dois dos casos; no terceiro ela se torna um eficiente bactericida⁽⁴⁾.

Na acridina (fig A3.2b) um grupo amina pode ser inserido em 5 posições diferentes: três delas são praticamente inativas mas, nas outras duas temos um poderoso bactericida⁽⁴⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾.

Na Quinolina (fig A3.2c) uma hidroxila pode ser ligada em sete pontos diferentes: em seis delas a substância é completamente inerte, mas na sétima posição temos um forte fungicida e bactericida⁽⁶⁾.

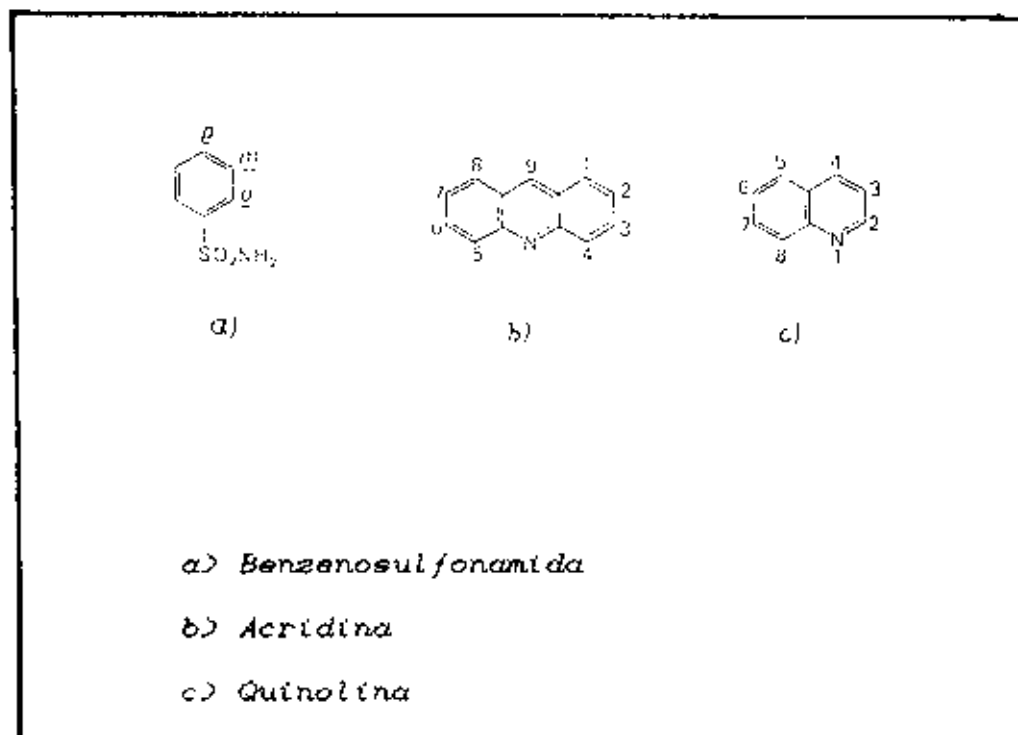


Fig A3.2 - Relação Estrutura-Atividade

Mergulhando na História das idéias que levaram ao desenvolvimento do conceito de Estrutura-Atividade, voltamos a Escócia de 1869. Crum Brown e Fraser mostraram que vários alcalóides^[4], entre eles espamogénicos e convulsantes, quando quaternarizados, perdiam suas propriedades farmacológicas e adquiriam as propriedades da curarina (relaxante muscular), cujo sítio de ação na junção nervo-músculo tinha sido determinado poucos anos antes, em 1856, por Claude Bernard. Assim, estriquinina, bruceína, tebaina, codeína, morfina, nicotina, atrofina e conina foram quaternizadas por reação com iodeto de metila. Os autores acima escreveram: "Não pode haver dúvida que existe relação entre a ação fisiológica de uma substância e sua composição e constituição química, essa última significando a interrelação dos átomos da substância" [4].

A partir de Brown e Fraser, 30 anos se passaram sem muitos avanços até que Meyer (1899) e Overton (1901), independentemente, descobriram que propriedades físico-químicas, como a hidrofobicidade, eram fundamentais na ação de drogas. Outras idéias que vieram contribuir nesses estudos foram o conceito de "receptor" e a intuição de que haveria algo em comum entre a ação das drogas em células e a inibição de enzimas.

Por volta dos anos 30, estudos sobre a inibição de enzimas por drogas geraram o conceito de que certos grupamentos eram capazes de provocar uma ação específica, hipótese conhecida por "one-group one-action" [4].

Ainda em fins dos anos 30, as vésperas da 2. Guerra Mundial, o estudo de sulfonamidas bactericidas (fig A3.2a), as quais logo após sua descoberta tornaram-se uma das principais evidências da hipótese "one-group one-action", acabou, por ironia do destino, como o golpe fatal dessa idéia. Descobriu-se que a presença do grupamento sulfonamida [$-\text{SO}_2\text{NH}_2$] não acarretava nenhuma propriedade bactericida, a menos que, outras condições, tais como substituições na posição "para", que facilitavam interação enzima-receptor, fossem observadas. Se essas condições fossem encontradas, os grupamentos sulfonamidas poderiam inclusive ser substituídos por grupos de carga similar. Estudos em aminoacridinas (fig A3.2b) levaram a conclusão que apenas substituições que possibilitavam uma ionização a pH 7,0 eram eficientes bactericidas.

Em 1953, descobriu-se que a droga "oxina" (8-hidroxiquinolina) (fig A3.2c) só era ativa quando na presença de metais (Ferro ou Cobre). Isso levou a descoberta de novos agentes fungicidas e bactericidas que apesar de terem estruturas totalmente diferentes da oxina, tinham igual afinidade por metais.

Assim, na evolução histórica da relação estrutura-atividade, a cada nova descoberta, a comunidade científica contemporânea era obrigada a repensar o processo de ação das drogas. Aceita-se hoje diferentes explicações para diferentes ações biológicas e sabemos que a interação droga-receptor envolve inúmeros processos e é só dentro de um contexto mais amplo é que podemos analisar os mecanismos de ação de uma droga.

A4. BIBLIOGRAFIA

- [1] AUCLAIR, C., (1987) ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 250, 1, 1
- [2] Le PECK, J.B., DAT-XUONG, N., GOSSE, C. and PAOLETTI, C.A., (1974) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 71, 5078
- [3] PAOLETTI, C., CROS, S., DAT-XUONG, N., LECOINTE, P. and MOISAND, A., (1979) CHEM. BIOL. INTERACT., 25, 45
- [4] ALBERT, A., (1973) *Selective Toxicity*, Chapman and Hall, London
- [5] COURSEILLE, C., BUSETTA, B. and HOSPITAL, M., (1974) ACTA CRYST., B30, 2828
- [6] DALTON, L.K., DEMERAC, S., ELMES, B.C., LODER, J.W., SWAN, J.M. and TEITEI, J., (1967) AUST. J. CHEM., 20, 2715
- [7] BUYAN, B.K., FRASER, T.J. and LI, L.H., (1972) CANCER RES., 32, 2538
- [8] ZWELLING, L.A., MICHAELIS, S., KERRIGAN, D., POMMIER, Y. and KOHN, K.W., (1982) BIOCHEM. PHARMACOL., 31, 3261
- [9] TEWEY, K.M., ROWE, T.C., YANG, L., HALLIGAN, B.D. and LIU, L.F., (1984) SCIENCE, 226, 466

- [10] SINGER, S.J. and NICOLSON, G.L., (1972) SCIENCE, 175, 720
- [11] RACEY, T.J., SINGER, M.A., FINEGOLD, L. and ROCHON, P., (1989) CHEM. and PHYS. LIPIDS, 49, 271
- [12] SOUZA, C.F., (1984) TESE DE MESTRADO, UNICAMP, IFGW
- [13] NAGLE, J.F., (1979) J. CHEM. PHYS., 58, 252
- [14] BOCK, F.G. and BURNHAM, M., (1981) CANCER RES., 21, 510
- [15] BEGLEITER, A., LAM, H.P. and GOLDENBERG, G.J., (1977) CANCER RES., 37, 1022
- [16] HILL, B.T., (1972) BIOCHEM. PHARMAC., 21, 495
- [17] KESSEL, D., MYERS, M. and WODINSKY, I., (1989) BIOCHEM. PHARMAC., 18, 1229
- [18] LAM, H.P., BEGLEITER, A., STEIN, W. and GOLDENBERG, G.J., (1978) BIOCHEM. PHARMAC., 27, 1883
- [19] BEGLEITER, A., GRAVER, J. and GOLDENBERG, G.J., (1980) CANCER RES., 40, 4489
- [20] MORGAN, J.S., CREASEY, D.C. and WRIGHT, J.A., (1986) BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 134, 1254

- [21] BURNS, C.P., HAUGSTAD, B.N. and NORTH, J.A., (1987) BIOCHEM. PHARMAC., 36, 657
- [22] SANIOTO, D.L. and SCHREIER, S., (1975) BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COM., 67, 530
- [23] de GIER, J., MANDERSLOOT, J.G. and van DEENEN, L.L.M., (1980) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 173, 143
- [24] SANTOS, R.M.Z., (1981) TESE DE MESTRADO, UNICAMP, IFGW
- [25] EL MASHAK, E.M., PAOLETTI, C. and TOCANNE, J.F. (1979) FEBS LETTERS, 107, 155
- [26] TERCE, F., TOCANNE, J.F. and LANEELLE, G., (1982) EUR. J. BIOCHEM., 125, 203
- [27] LI, L.H. and COWIE, C.H., (1974) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 353, 375
- [28] MATHE, G., (1974) Complications of Cancer Chemotherapy, Springer Verlag, Heidelberg
- [29] HAYAT, M., et. al., (1974) BIOMEDICINE, 21, 101
- [30] Le PECK, J.B., Le BRET, M., GOSSE, C., PAOLETTI, C., CHALVET, O. and DAT-XUONG, N., (1974) MOLECULAR and QUANTUM PHARMACOLOGY, 7, REIDEL DODDRECHT

- [31] LECOINTE, P., LESCA, P., CROS, S. and PAOLETTI, C., (1978)
CHEM BIOL. INTERACTIONS, 20, 113
- [32] LESCA, P., LECOINTE, P., PAOLETTI, C. and MANSUY, D., (1978)
BIOCHEM. PHARMAC., 27, 1203
- [33] LESCA, P., LECOINTE, P., PELAPRAT, D., PAOLETTI, C. and
MANSUY, D., (1980) BIOCHEM. PHARMAC., 20, 3231
- [34] EISBERG, R. and RESNICK, R., (1986) FISICA QUANTICA, Ed.
CAMPUS LTDA
- [35] AZAROFF, L.A., (1986) Elements of X-Ray Crystallography,
Mcgraw Hill Co.
- [36] CULLITY, B.D., (1978) Elements of X-Ray Diffraction, Addison-
Wesley Publishing Co.
- [37] ZACHARIAS, C.R., (1990) EXAME DE QUALIFICAÇÃO DE MESTRADO,
UNICAMP, IFGW
- [38] BLUNDELL, T.L. and JOHNSON, L.N., (1976) Protein
Crystallography, Academic Press, New York
- [39] TORBET, J. and WILKINS, M.H.F., (1976) J. THEOR. BIOL., 62,
447

- [40] WORTHINGTON, C.R. and BLAUROCK, A.E., (1969) BIOPHYS. JOURNAL, 9, 970
- [41] Handbook of Chemistry and Physics, (1973) Chemical Rubber Co.
- [42] SOUZA, C.F., (1990) TESE DE DOUTORADO, UNICAMP, IFGW
- [43] BLASIE, J.K. and LESSLAUER, W., (1972) BIOPHYS. J., 12, 176
- [44] INTERNATIONAL TABLES FOR X-RAY CRYSTALOGRAPHY, (1969), 3,
Kynoch Press, Birmingham, England
- [45] KLUG, H.P., (1974) X-Ray Diffraction Procedures, Wiley and
Sons
- [46] BIGATTO, J.O., (1979) TESE DE MESTRADO, UNICAMP, IFGW
- [47] HOLLEY, R.W., (1972) PROC. NAT. ACAD. SCI. U.S., 69, 2840
- [48] CREECH, R.H. and BORO, Jr., V.H., (1971) PROC. AM. ASSOC.
CANCER RES., 12, 17
- [49] SNYDER, A.L., KANN, Jr., H.E. and KOHN, K.W., (1971) J. MOL.
BIOL., 58, 555
- [50] SACKMANN, E., (1978) BER. BUNDESGES. PHYS. CHEM., 82, 891
- [51] SAYRE, D., (1952) ACTA CRYST., 5, 843

- [52] Powder Diffraction File Search Manual - Organic, (1973), ed. Joint, Comitee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), USA
- [53] LENINGHER, A.L., (1975) Biochemistry - The Molecular Basis of Cell Structure and Function, 2. ed., New York, Worth Publishers
- [54] PRIESTLEY, E. B., WOJTOWICZ, P.J. and SHENG, P., (1979) Introduction to Liquid Crystals, Plenum Press - New York and London
- [55] VAZ, W.L.C., GOODSID-ZALDNONDO, F. and JACOBSON, K., (1984) FEBS LETTERS, 174, 199
- [56] HARTNELL, J.L. and ABBOTT, B.J., (1969) ADV. CHEMOTHER. PHARMACOL., 7, 117
- [57] BERGEL, F. and TODD, A., (1937) J. CHEM. SOC., 1504
- [58] ALBERT, A., RUBBO, S. and GOLDACRE, R., (1941) NATURE, 147, 332
- [59] ALBERT, A., GOLDACRE, R. and PHILIPS, J., (1948) J. CHEM. SOC., 2240