

EFEITOS DO ETANOL/L-MENTOL NA DINÂMICA E PARTIÇÃO DOS MARCADORES DE SPIN NO ESTRATO CÓRNEO

MENDANHA NETO, Sebastião Antônio¹; **ALONSO**, Antônio².

Palavras-chave: Estrato Córneo, RPE, L-mentol, Etanol.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de drogas através da pele (Drug Delivery) tem se mostrado uma excelente alternativa quando comparada à rota oral devido à baixa atividade metabólica da pele, evitando assim o alto metabolismo do fígado e do trato gastrointestinal. Uma outra vantagem desta rota está associada à possibilidade de se obter um perfil contínuo de entrega, o qual é requerido para uma variedade de drogas com atividade sistêmica. A maior barreira para a penetração de agentes químicos através da pele é fornecida por sua camada superficial, o Estrato Córneo (EC). Uma boa saída para viabilizar o fluxo de moléculas através da pele pode ser encontrada no uso de aumentadores de permeação, moléculas que interagem com os constituintes da pele promovendo uma temporária e reversível redução da função de barreira do EC. Entender a função de barreira à permeabilidade da pele e a interação dos aumentadores com a mesma é importante para se estabelecer um modelo adequado do sistema de transporte de drogas transdermais.

2. METODOLOGIA

2.1 - Preparação das Membranas de EC

As amostras foram obtidas de ratos recém nascidos, menos de 24 horas de idade, da raça Wistar cedidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e preparadas de acordo com o método descrito por (ALONSO, 2000).

2.2 - Marcação das amostras de EC

As membranas de EC desidratadas (~3 mg) foram incubadas previamente em uma solução de N-etil maleimido (NEM) a 50 mM durante um período de 15 h. Os marcadores (spin label), 5-DSA, 5-DMS e 5 α -Androstano, foram adquiridos da empresa Sigma Chem. Co. (St Luis, MO). Após o período de incubação, uma pequena alíquota (1 μ L) dos marcadores, dissolvidos em solução de etanol puro (5 mg/mL), foram então aplicados sobre placas de petri, e efetuadas repetidas passagens das membranas sobre o local do marcador na placa de petri, onde foram adicionados também cerca de 50 μ L do tampão salino (pH 5.1). Logo após as amostras foram incubadas por um período de 2 h em soluções tampão-etanol. Foram preparadas soluções tampão-etanol 20% com a concentração desejada de L-menthol nas quais as membranas foram incubadas por 3 h. Por fim, as amostras foram introduzidas em tubos capilares e levadas para medidas de RPE.

2.3 - Condições de Operação do Espectrômetro

Nossas medidas foram realizadas no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica da UFG. O equipamento utilizado foi um espectrômetro Bruker ESP300 equipado com uma cavidade ressonante ER4102 ST operando em banda X (aproximadamente 9.4 GHz). Todas as operações foram realizadas com os seguintes parâmetros: potência de microonda, 10 a 14 mW; frequência de modulação, 100 KHz; amplitude de modulação, 1,024 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 ms. Neste experimento trabalhamos apenas em temperatura ambiente.

2.4 - Simulação dos Espectros de RPE

A análise dos espectros obtidos experimentalmente foi feita utilizando um programa denominado Non-Linear Least-Squares, desenvolvido por (SCHNEIDER e outros, 1989). Este programa nos permite ajustar espectros com duas componentes tendo diferentes estados de mobilidades e tensores magnéticos, a partir de parâmetros espectrais.

3. RESULTADOS

3.1 – Espectros de RPE das Amostras de Estrato Córneo Tratadas

Os espectros de RPE, experimentais e simulados, para os marcadores de spin estruturados nas membranas de EC estão mostrados na Fig. 3.1. Uma análise destes espectros de RPE revela que, eles são compostos de três componentes espectrais, cada uma indicando um estado de movimento dos marcadores. A terceira componente corresponde aos marcadores de spin que estão fora da membrana, aparecendo somente em concentrações elevadas de etanol, as componentes 1 e 2 representam os marcadores de spin que apresentam uma distribuição bimodal na membrana, uma ligada mais superficialmente nas bicamadas e outra mais inserida.

3.2- Dinâmica das cadeias lipídicas e partição dos marcadores de spin no EC

Como mostrado nas figuras 3.1A e 3.1B, a adição de L-mentol altera a distribuição dos marcadores de spin nas componentes espectrais 1 e 2. O aumento da concentração de L-mentol causa o desaparecimento da componente 1 e o aumento da componente 2, indicando que os marcadores de spin deixam a componente 1 e se transferem para a componente 2, ficando então inseridos no núcleo hidrofóbico da membrana. O estreitamento na linha espectral indica maior mobilidade dos marcadores de spin o que reflete o aumento na fluidez da membrana. A fig. 3.1C mostra as componentes 1 e 2 obtidas por simulação a partir do espectro composto (vermelho). As Figs. 3.2 e 3.3 mostram o coeficiente rotacional e as frações dos marcadores presentes na componente 1 em função das concentrações de etanol e mentol, fica evidente que o aumento na concentração de mentol diminui o número de marcadores da componente 1 reforçando a idéia da transferência dos marcadores para o núcleo hidrofóbico da membrana.

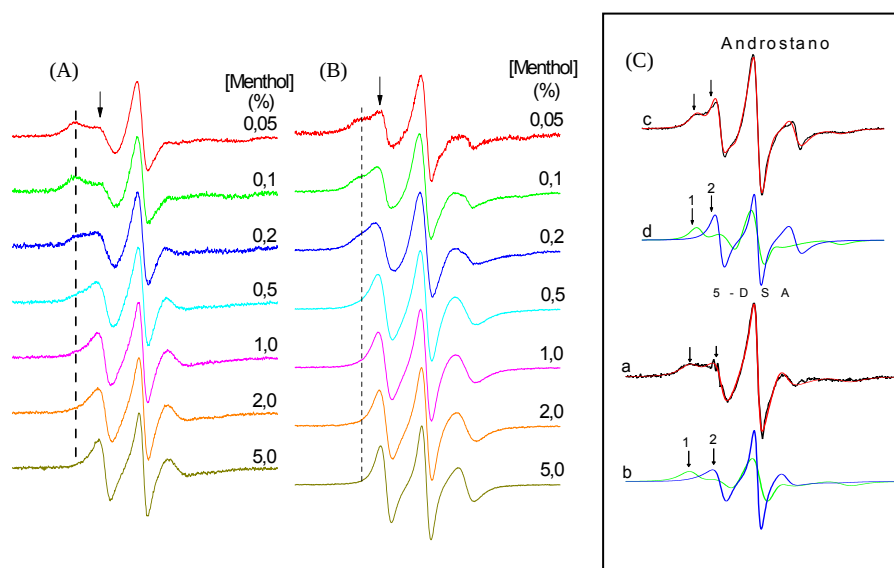


Fig. 3.1 : Evolução do comportamento do sinal de RPE dos marcadores de spin 5-DSA (A) e Androstano (B) no EC em várias concentrações de L-mentol. As linhas pontilhadas e as flechas indicam as posições das componentes 1 e 2, respectivamente. (C) Mostra o espectro experimental composto (vermelho) e as duas componentes isoladas.

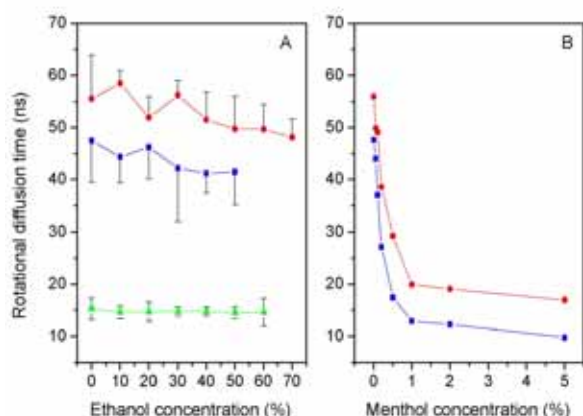


Fig. 3.2 : Coeficiente rotacional de difusão em função da concentração de mentol e etanol.

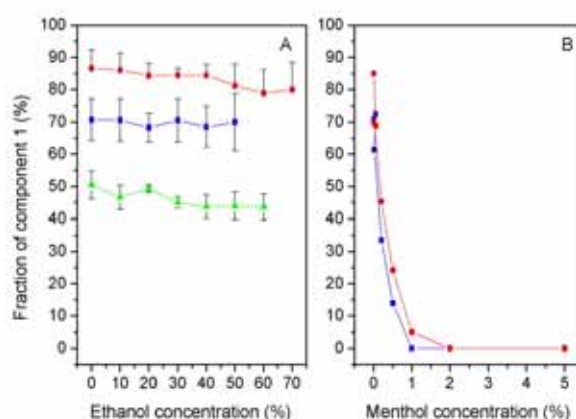


Fig. 3.3: Fração da componente 1 em função das concentrações de mentol e etanol.

4. CONCLUSÃO

Constatamos que o etanol atua como um extrator seletivo, já que os resultados mostraram uma pequena eficiência na extração do marcador mais hidrofóbico (5-DMS) e uma média extração para os marcadores menos hidrofóbicos (5-DSA e Androstano). A partir de nossos resultados podemos perceber também que o L-mentol atua no interior da membrana do EC, aumento a fluidez em seu centro hidrofóbico. Verificou-se também que na presença do L-mentol os marcadores lipídicos deixam a componente menos mobilizada (componente 1) e se transferem para a componente mais mobilizada (componente 2).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A.; MEIRELES, N.C.; TABAK, M. Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. *Chem. And Phys. Lipids* 104 (2000). 101-111.

SCHNEIDER, D.J.; FREED, J.H. Spin Labeling: Teory and application, in: L.J. Berliner, J. Reuben (eds.), *Biological magnetic Resonance*. New York, Plenum Press, 1989, vol. 8, p. 1-76.

FONTE DE FINANCIAMENTO - CNPq/PIBIC

¹Bolsista de iniciação científica. Instituto de Física – Laboratório de Biofísica, sebastiaomendanha@yahoo.com.br

²Orientador/Instituto de Física/UFG, alonso@fis.ufg.br