ANDRÉ ROBERTO DE OLIVEIRA FREDI

Análise da formação de agregados esfingolipídicos por RMN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pósgraduação em Química de Produtos Naturais, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Luzineide Wanderley Tinoco

Rio de Janeiro 2014

F852

Fredi, André Roberto de Oliveira.

Análise da formação de agregados esfingolipídicos por RMN / André Roberto de Oliveira Fredi. -- Rio de Janeiro: UFRJ/IPPN, 2014.

100 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

Orientador: Luzineide Wanderley Tinoco.

1. Esfingosina. 2. Esfingosina-1-fosfato. 3. Ressonância Magnética Nuclear. 4. Agregados. I. Tinoco, Luzineide Wanderley. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título. CDD: 547

ANDRÉ ROBERTO DE OLIVEIRA FREDI

Análise da formação de agregados esfingolipídicos por RMN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pósgraduação em Química de Produtos Naturais, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 26/05/2014

Presidente, Profa. Dra. Luzineide Wanderley Tinoco (IPPN/UFRJ)

Profa. Dra. Rosane Aguiar da Silva San Gil (IQ/UFRJ; IPPN/UFRJ)

Profa. Dra. Monica Santos de Freitas (IBqM/UFRJ)

Profa. Dra. Maria Inês Bruno Tavares (IMA/UFRJ)

Dedico este trabalho a minha família, que sempre me ensinou e me apoiou em todos os momentos. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Luzineide Wanderley Tinoco pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por me ensinar sobre as maravilhas da RMN. Obrigado!

Em especial eu agradeço aos meus pais. Sem eles, eu não seria quem eu sou hoje. Com eles aprendi a apreciar a importância e o valor da família.

À minha mãe que sempre me apoiou em todos esses meus anos longe de casa estudando e por seu carinho e amor. A minha irmã Juliana, a minha avó Dores, meu tio Evandro, meu Pai que me ajudaram diretamente com apoio e motivação para a conclusão deste trabalho.

À minha namorada Manoela Wolfart, por todo seu amor, alegria, por sempre estar ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis, sempre com um sorriso e apoio, por ser essa pessoa incrível que eu tanto admiro e amo.

Aos meus amigos de laboratório, Carol Sarzedas, Hortência Monteiro, Ana Carolyna Vargas, Gabriel Azevedo Sales, Roberto Marcos, Marina Amaral, Marina Ferreira, Eliã Martins pelo incentivo e distração no dia-a-dia.

Ao Professor Ricardo Borges por ter me incentivado em aprender mais sobre RMN, por toda sua dedicação em me ajudar e por sua grande amizade. Seguiremos sempre aprendendo. Obrigado!

À Glória Castañeda Valencia por ter me ajudado nos momentos difíceis no mestrado, por me incentivar na conclusão do trabalho e por sua grande amizade.

Aos técnicos do LAMAR Francisco dos Santos e Camila Mansur pela ajuda com os espectrômetros, por compartilhar seus conhecimentos e por me receberem muito bem no laboratório onde me senti muito a vontade, como uma segunda casa.

Ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN) e o Prof. Dr.Fabio C. L. Almeida pela oportunidade de operar o espectrômetro de 800 MHz.

Ao Laboratório de Agregação Protéica e Amiloidogênese (LAPA, IBqM, UFRJ) e a Profa. Dra. Susana Frases Carvajal por me ajudar a realizar as medidas em DLS.

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio, FF, UFRJ), o Prof. Dr. Carlos Mauricio R Sant'ana e a doutoranda Roberta Tesch por me ajudarem com os Cálculos Teóricos.

Aos meus amigos Artur Serpa e Paula Moraes por me ajudarem com os estudos antes e durante o mestrado, pelos momentos de distração e por toda a amizade.

Aos meus amigos do IPPN: Daniel Simas, Vitor Soares, Francisco Gaspar, Julio Cesar, Juliana Coimbra, Débora Costa, Renato Soares, João Paulo Pereira, Lívia Frota, Sara Gomes que me ajudaram com seus conhecimentos e amizade.

Aos professores do IPPN por todo o ensinamento e por me receberem de braços abertos e com muita simpatia.

Aos meus cachorros Whisky, Vida e Tieta que são lindos e muito amados e o Raja que foi meu grande parceiro durante a graduação, mas infelizmente não pude trazer comigo para o Rio de Janeiro e hoje não esta mais vivo. Eu fiz o melhor que pude para lhe dar uma vida boa, sinto muita falta e agradeço por todos os momentos felizes que passamos juntos.

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sobre o próprio teto. Um homem precisa viajar para alguns lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver."

Amyr Klink, Mar sem fim.

RESUMO

A esfingosina (SP) e esfingosina-1-fosfato (S1P) são esfingolipídios com funções importantes em diferentes organismos. A natureza anfipática destas moléculas favorece a formação de micelas em meio aquoso, mas existem poucos estudos sobre este processo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de agregação dessas duas substâncias, por meio de análises por RMN, DLS e cálculos teóricos em diferentes condições experimentais. RMN de ¹H e DOSY foram utilizados para avaliar o processo de agregação de SP e S1P, partindo-se do solvente orgânico para o meio aquoso. As amostras foram diluídas em solvente polar aprótico (100% DMSO-d6) seguida por adições sucessivas de D₂O. Mesmo em DMSO-d6, sinais extras nos espectros de RMN de ¹H, que não correspondem aos sinais atribuídos aos monômeros de SP e S1P, sugerem a existência de agregados. As adições sucessivas de água causaram a alterações significativas nos espectros de RMN de ¹H e nos coeficientes de difusão da SP e da S1P. Estas alterações sugerem que as diferentes espécies (monômeros e agregados) estariam presentes em equilíbrio nas soluções estudadas e que este equilíbrio seria deslocado para a formação dos agregados com a adição de água. A avaliação do efeito do pH na formação dos agregados da SP e da S1P foi feita em pH acima e abaixo do pKa da SP (6,61). Em pH ácido, a protonação do grupo amino favorece a formação das ligações de hidrogênio intramoleculares, com deslocamento do equilíbrio para a formação dos monômeros e agregados menores. Por outro lado, em pH básico, com o grupo amino neutro, as ligações intermoleculares são estabilizadas e favorecem o aumento do número de agregados de maiores dimensões. Para avaliar o efeito da concentração sobre a formação de agregados, as amostras SP e S1P foram diluídas a partir de 1000 µM até 12 µM. Nas concentrações mais elevadas, o pequeno número de sinais observados no espectro de RMN de ¹H indicaria a existência de grandes agregados. Nas diluições iniciais, foram observados sinais distintos dos monômeros, os quais foram considerados corresponder aos agregados de tamanho intermediário, pois desaparecem nas diluições seguintes, onde há um aumento da intensidade dos sinais correspondentes aos monômeros e aos agregados menores. As análises por DLS mostraram que agregados de diferentes tamanhos são formados em solução aquosa e que estas variações em tamanho podem ocorrer através de alterações na concentração e no pH, o que confirma os resultados de RMN. Cálculos teóricos foram usados para avaliar as diferenças na formação dos dímeros de SP nas formas protonada e neutra. A entalpia de formação de dímeros de SP, para o confôrmero de menor energia, foi de 25,71 Kcal.mol⁻¹ para a forma protonada, e -65,61 kcal.mol⁻¹, para a neutra, indicando que a forma neutra é mais favorável para a agregação e corroborando os resultados obtidos por RMN e DLS.

ABSTRACT

The sphingosine (SP) and sphingosine-1-phosphate (S1P) are sphingolipids with important functions in different organisms. The amphipathic nature of these molecules favor the formation of micelles in aqueous medium, but there are few studies on the aggregation process. Thus, this study aimed to evaluate the aggregation behavior of these two substances by means of NMR analysis, DLS and theoretical calculations in different experimental conditions. ¹H NMR and DOSY were used to evaluate the aggregation process of SP and S1P, starting from the organic solvent to the aqueous medium. The analyses began with the samples in DMSO-d6 and were followed by the successive addition of D₂O. Even in DMSOd6 (100 %), extra signals that do not correspond to the signals assigned to monomers of SP and S1P, suggest the existence of aggregates. Successive additions of water led to significant changes in the spectra and the diffusion coefficients of SP and S1P, suggesting that different species (monomer and aggregates) are present in equilibrium in the solution. Since this balance is shifted towards the formation of aggregates by the water addition. The analysis of the pH effect on the formation of SP and S1P aggregates were made in the pH above and below the pKa of SP (6.61). At acidic pH, the protonation of the amino group favors formation of intramolecular hydrogen bonds, shifting the equilibrium toward the formation of monomers and smaller aggregates. While at basic pH, with neutral amino group, the intermolecular bonds are stabilized and promote the increase in the number of larger aggregates. To evaluate the effect of concentration on the formation of aggregates, the samples were diluted SP and S1P from 1000 µM to 12 µM. At higher concentrations, the small number of signals observed in the NMR spectrum indicates the existence of large aggregates. In the first dilutions, appear distinct signs of monomers. These signals were assigned to clusters of intermediate size, it disappear at the following dilutions, where there is an increase in the intensity of the corresponding monomers and smaller aggregates signals. The DLS analyzes showed that SP aggregates of different sizes are formed in aqueous solution and that these variations in size may occur through changes in pH and concentration, confirming the observations made by NMR. The theoretical calculations were used to evaluate the differences in the formation of SP dimers in the protonated neutral form. The enthalpy of formation of SP dimmers, for the lowest energy conformer, was of 25.71 Kcal.mol⁻¹ for the protonated form and -65.61 kcal.mol⁻¹ to neutral, indicating that the neutral form is most favorable for the aggregation and corroborating the results obtained by NMR and DLS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esfinganina. O "bloco de construção" mais básico e precursor de todos esfingolipídios
Figura 2: Esfingomilelina. Descoberta em 1874 pelo Dr. Johann L. W. Thudichum ¹⁴ 19
Figura 3: Esfingosina. (2S, 3R)-2-aminooctadec-4-ene-1,3-diol19
Figura 4: Estruturas mais comuns para bases esfingoides de esfingolipídios de plantas e mamíferos
Figura 5: Estruturas incomuns para bases esfingoides de esfingolipídios de plantas, mamíferos, fungos, insetos e organismos marinhos22
Figura 6: Estruturas de ceramidas mais comuns encontradas em plantas e mamíferos23
Figura 7: Estruturas de glicosilceramidas
Figura 8: Estruturas de glicosilinositolfosforilceramidas. No R ₂ pode conter um grupo hidroxila ou amina ou N-acetilamina
Figura 9: Início da rota biossíntetica dos esfingolipídios25
Figura 10: Bases esfingoides e suas modificações, encontrados em plantas e mamíferos26
Figura 11: Formação de complexos esfingolipídicos de ceramidas (GlcCer e GIPC), a partir da esfinganina. Adaptado de: MARKHAM <i>et al.</i> , 201327
Figura 12: Tipos de agregados formados por moléculas anfipáticas
Figura 13: Ilustração de como moléculas que agregam e as que não agregam se coportam com a diluição nos espectros de RMN ¹ H. (A) Compostos não agregados. (B) Compostos agregados. Tampão fosfato 50 mM pH 7,4 em 100% D2O. Adaptado de: LAPLANTE <i>et al.</i> , 2013.
Figura 14: Representação de como as partículas em movimento espalha a luz e como o aparelho de DLS detecta. Adaptado de: Zetasizer Nanoseries (2004)
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H (499,79 MHz) da esfingosina em DMSO- <i>d6</i> , concentração de 2,17 mM, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz
Figura 16: Espectro de RMN gCOSY (499,78 MHz) da esfingosina em DMSO- <i>d6</i> , concentração de 2,17 mM, a 25°C, com 128 acumulações, Ganho do receptor = 0 e 1202 pontos.
Figura 17: Espectro de RMN gHSQC (499,78 MHz) da esfingosina em DMSO- <i>d6</i> , concentração de 2,17 mM, temperatura 25°C. 128 acumulações; Ganho do receptor = 0; 1202 pontos. CH_2 (vermelho), CH e CH ₃ (azul)
Figura 18: Espectro de RMN ¹ H (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato em CD ₃ OD:D ₂ O (95:5), concentração de 1,97 mM, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz
Figura 19: Espectro de RMN COSY (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato em CD ₃ OD, concentração de 1,97 mM, a 25°C, com 128 acumulações, ganho do receptor $= 0$ e 1202 pontos

Figura 22: Expansão no espectro de RMN ¹H (499,78 MHz) da esfingosina na região de 5,7 – 5,2 ppm.......60

Figura 24: Expansão no espectro de RMN 1 H (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato na região de 1,28 – 0,78 ppm.63

Figura 27: Espectro de RMN ¹H (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato com 1mM, 100% D_2O , em diferentes valores de pH no tampão fosfato 10 mM, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz......68

Figura 30: Expansão do espectro de RMN 1 H (800,40 MHz) da esfingosina em diversas concentrações na região de 4,0 – 2,2 ppm......72

Figura 35: Medidas dos diâmetros da esfingosina em tampão fosfato com os valores de pH 5, 7,2 e 10 e nas concentrações de 1000 μ M, 200 μ M, 25 μ M e 6 μ M......77

Figura 37: Representação dos átomos da esfingosina utilizados nos cálculos teóricos.......79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparo de 100 mL de solução tampão fosfato 100 mM44
Tabela 2: Concentrações e proporção dos solventes para a SP e a S1P. 46
Tabela 3: Deslocamento químico dos sinais de hidrogênios da esfingosina por RMN ¹ H (499,78 MHz) em CDCl ₃ , em DMSO- <i>d</i> 6 e em D ₂ O a 25 °C, concentração 2,17 mM. Dados da literatura do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) 5 4
Tabela 4: Deslocamento químico dos sinais de hidrogênios da esfingosina-1-fosfato doespectro de RMN ¹ H (499,78 MHz) em CD ₃ OD e D ₂ O (95:1), a 25 °C, concentração 1,97mM.
Tabela 5: Valores da entalpia de interação dos dímeros da SP neutra para as três geometriascom menores energias e com maior similaridade às micelas.79
Tabela 6: Valores da entalpia de interação dos dímeros da SP protonada para as trêsgeometrias com menores energias e com maior similaridade às micelas

ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CMC	Concentração Micelar Crítica
CNRMN	Centro Nacional de RMN Jiri Jonas
COSY	COrrelation SpectroscopY
D_2O	Água deuterada
Dbppste	Diffusion by bipolar pulse pairs stimulated echo
DLS	Dinamic Light Scattering
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DOSY	Diffusion Ordered SpectroscopY
GIPCs	GlicosilInositolfosforilCeramidas
GlcCer	GlicosilCeramida
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Cohorence
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union Pure and Applied Chemists

J	interação escalar entre spins
LAMAR	Laboratório Multiusuário de Análises por RMN
LAPA	Laboratório de Agregação Proteica e Amiloidogênese
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
MARCKS	Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate
NNLS	Non-Negatively constrained Least Squares
PGSE	Pulsed Gradient Spin-Echo
QELS	Quase-Elastic Light Scattering
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SAXS	Small-angle X-ray Scattering
SP	Esfingosina
SPT	Serina Palmitoil-CoA Transferase
TMS	TetraMetilSilano
TSP-d4	TrimetilSililPropionato deuterado
WATERGATE	WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.2 Esfingolipídios	17
1.3 Diversidade Estrutural dos Esfingolipídios	19
1.3.1 Bases Esfingoides	20
1.3.2 Ceramidas, Glicosilceramidas e Glicosilinositolfosforilceramidas	23
1.4 Biossíntese de novo dos Esfingolipídios	25
1.5 Tipos Estruturais dos Agregados de Esfingolipídios	
1.6 Técnicas Utilizadas para Caracterização Estrutural de Agregados	
1.6.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	
1.6.1.1 Comportamento de agregados em espectros de RMN de ¹ H	
1.6.1.2 Diffusion Ordered SpectroscopY (DOSY)	
1.6.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	
2 Objetivos	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Reagentes, Solventes e Preparo das Soluções Estoques	
3.1.1 Preparo da solução estoque da SP e da S1P	44
3.1.2 Preparo do tampão fosfato	44
3.1.3 Solubilização em 90% H ₂ 0 e 10% D ₂ O	45
3.1.4 Solubilização em 100% D ₂ O	45
3.1.5 Solubilização em DMSO- <i>d6</i>	45
3.1.6 Solubilização em CDCl ₃	46
3.1.7 Solubilização em CD ₃ OD	46
3.2 Ressonância Magnética Nuclear	46
3.2.1 Parâmetros para aquisição dos espectros de RMN de ¹ H	47
3.2.2 Atribuição dos deslocamentos químicos para SP e S1P	47
3.2.3 Efeito do solvente na agregação da SP e da S1P	
3.2.4 Efeito do pH na agregação da SP e da S1P	
3.2.5 Efeito da concentração da SP e da S1P na formação dos agregados	49
3.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	49
3.4 Cálculos Teóricos	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Analises por KMN	
4.1.1 Atribuição dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de 'H	
4.1.2 Formação de agregados da SP e da S1P: efeito do solvente	
4.1.3 Formação de agregados da SP e da S1P: efeito do pH	65

4.1.4 Formação de agregados da SP e da S1P: efeito da concentração	68
4.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	76
4.3 Cálculos Teóricos	78
CONCLUSÕES	
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

A esfingosina (SP) e a esfingosina-1-fosfato (S1P) são esfingolipídios com funções celulares importantes em diversos organismos, podendo atuar como mensageiros intracelulares ou extracelulares, ou como moléculas reguladoras, que desempenham um papel essencial em inflamações, neurodegeneração, terapia para câncer e angiogênese ^{1; 2; 3; 4}. A S1P é um dos componentes principais responsáveis pela manutenção da integridade da barreira endotelial. A disfunção da barreira endotelial está associada aos processos inflamatórios, metástases tumorais, angiogêneses e arteriosclerose ⁵. A S1P também atua como um mediador rápido e específico no transporte da proteína MARCKS (*Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate*) e suas proteínas relacionadas para *rafts* de membranas. Na ausência destas proteínas, a proteção da barreira endotelial é reduzida. A S1P inibe a fosforilação da proteína MARCKS fazendo com que permaneça ligada a membrana ⁶. Além disso, a SP e a S1P são os precursores de todos os outros esfingolipídios ⁷.

A esfingosina (SP) e a esfingosina-1-fosfato (S1P) são moléculas anfipáticas, que em meio aquoso formam agregados micelares. Porém, apesar da sua importância biológica são poucos os estudos descritos na literatura visando à compreensão do seu comportamento em meio aquoso. Devido a grande importância da SP e da S1P para os processos de manutenção da barreira endotelial e da sua consequente contribuição para o tratamento de diversas doenças, este trabalho visa buscar algumas informações, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e outras técnicas, sobre o comportamento da SP e da S1P em condições próximas as fisiológicas.

1.2 Esfingolipídios

Os esfingolipídios são substâncias da classe dos lipídios, que possuem, como característica definidora e comum, a insolubilidade em água⁸. Os lipídios abrangem uma grande variedade de tipos estruturais como ácidos graxos, triacilgliceróis, glicolipídios, gorduras, ceras, terpenos, esteroides e os esfingolipídios e também assumem diferentes funções biológicas. Os lipídios são frequentemente classificados de duas formas: 1) os lipídios de armazenamento, que são substâncias derivadas dos ácidos graxos, como as gorduras ou óleos usados como forma de armazenamento de energia nos organismos vivos; 2) os lipídios estruturais de membranas, que são constituintes de membranas biológicas, são

substâncias anfipáticas e na água se organizam como bicamadas ou micelas. Os glicofosfolipídios, os esfingolipídios e os esteróis são pertencentes à classe dos lipídios estruturais⁸.

Afinal, o que são esfingolipídios? Embora exista uma grande diversidade na composição dos esfingolipídios para diferentes espécies, o "bloco de construção" básico dos esfingolipídios é um aminoálcool com uma cadeia longa de carbonos. As características principais desse "bloco de construção" são a presença de um grupo amina no carbono 2, dois grupos hidroxila nos carbonos 1 e 3 e uma cadeia carbônica composta por 18 átomos, encontrada no esqueleto da esfinganina, que é o "bloco de construção" mais básico e precursor e que define todos os esfingolipídios⁹ (Figura 1).



Figura 1:Estrutura daEsfinganina. O "bloco de construção" mais básico e precursor de todos os esfingolipídios.

Os esfingolipídios estão presentes em todos os eucariontes e em alguns procariontes ¹⁰.Segundo Merril & Sweeley¹¹, mais de 300 diferentes esfingolipídios já foram identificados estruturalmente, exibindo uma enorme diversidade estrutural, com milhares de possíveis estruturas.

Diferentes classes de esfingolipídios são encontradas em diversos organismos. As classes de esfingolipídios predominantes em mamíferos são as glicosilceramidas e as esfingomielinas (Figura 2), que constituem grande parte da bainha de mielina. Nos seres humanos, a esfingomielina constitui aproximadamente 85% de todos os esfingolipídios¹¹. No homem, já foram identificados cerca de 60 esfingolipídios nas membranas celulares. Nas plantas, os esfingolipídios são reconhecidos como os principais componentes correspondendo a 40% dos lipídios das membranas. São encontrados na membrana plasmática, nos tonoplastos (membrana que delimita os vacúolos de células vegetais) e nas endomembranas⁹. O complexo esfingolipídio predominante nos extratos de tecidos vegetais é a glicosilceramida,¹² mas também foram isolados, a partir de tecidos de plantas, glicofosfoesfingolipídios (espécies de inositolfosforilceramida glicosiladas)¹³.



Figura 2: Estrutura da Esfingomielina. Descoberta em 1874 pelo Dr. Johann L. W. Thudichum¹⁴.

Os esfingolipídios foram descobertos por um trabalho pioneiro, feito há mais de cem anos (1874), por um dos fundadores da neurociência e da neuroquímica, o médico alemão e cientista Dr. Johann Ludwig Wilhelm Thudichum (1829 – 1901), onde, a partir de extratos cerebrais, foram caracterizados dois esfingolipídios, o cerebrosídio e a esfingomielina. Nos estudos com outros extratos cerebrais, uma enigmática estrutura foi encontrada e se mostrou tão difícil de isolar e entender, devido as suas propriedades não usuais para um lipídio, que foi chamada de esfingosina (nome dado referente à palavra esfinge)¹⁴. Porém, devido a estas dificuldades, naquela época não foi possível elucidar sua estrutura^{10;15;16}. Muitos pesquisadores tentaram determinar a estrutura da esfingosina, sem sucesso. Somente muitos anos depois, Carter e colaboradores determinaram a estrutura correta da esfingosina, (2S,3R)-2-aminooctadec-4-ene-1,3-diol (Figura 3), através da preparação de vários derivados da molécula¹⁷.



Figura 3: Estrutura da Esfingosina. (2S, 3R)-2-aminooctadec-4-ene-1,3-diol.

1.3 DIVERSIDADE ESTRUTURAL DOS ESFINGOLIPÍDIOS

A International Union Pure and Applied Chemistse aInternational Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC – IUBMB) recomendam que o nome de um esfingolipídio deva ser dado a partir do esfingolipídio que o origina, incorporando-se ao nome os carbonos adicionais da cadeia carbônica (por exemplo, uma esfingosina com cadeia carbônica de 20 átomos é chamado de eicosesfingosina (Figura 4, 3). A posição e a estereoquímica da ligação dupla (E/Z é preferível a *trans/cis*) e a posição das hidroxilas, metilas, etc., devem ser adicionados ao nome de forma explícita, afim de uma melhor identificação do esfingolipídio.

É muito usada também uma abreviação do nome dos esfingolipídios, de forma que o número de hidroxilas (por exemplo, esfingosina e esfinganina por terem duas hidroxilas na abreviação aparecem como "d" ou "t" para fitoesfingosina, **4**) seguido pelo número de átomos de carbono da cadeia carbônica e do número de ligações duplas, com a localização e configuração como prefixo. Assim, a esfingosina é designada com 4E-d18:1 e a fitoesfingosina como t18:0¹⁸.

Os esfingolipídios são divididos em 4 subclasses: base esfingoides, ceramidas, GlicosilCeramidas (GlcCer) e GlicosilInositolfosforilceramidas (GIPCs). Esta divisão pode se estender ainda mais se considerarmos mais a fundo as mais diversas estruturas de esfingolipídios.

1.3.1 Bases Esfingoides

Os esfingolipídios de base esfingoide são os estruturalmente mais simples e precursores de outros esfingolipídios mais complexos. Os mais comuns são encontrados com uma cadeia carbônica composta por 18 átomos de carbono. A partir da esfinganina, ocorrem diversas variações estruturais, como insaturações entre os carbonos 4 e 5 (como a esfingosina, **2**), entre os carbonos 8 e 9 (**5**, **6**), dienos (**7**, **8**), trienos, trihidroxis saturados (como a fitoesfingosina, **4**) ou insaturados (**9**, **10**). Também pode ocorrer adição do grupo fosfato no carbono 1, como na esfingosina-1-fosfato. Porém, outros tamanhos de cadeia carbônica, entre 12 a 26 carbonos podem ser encontrados^{19;20;21}. A variação da cadeia mais comum, encontrada em mamíferos é a Eicosesfingosina-**3** (4E-d20:1), identificada em amostras de gangliosídeos do cérebro²².


Figura 4: Estruturas mais comuns para bases esfingoides de esfingolipídios de plantas e mamíferos.

Outras bases esfingoides menos comuns encontradas em plantas, mamíferos, fungos, insetos e organismos marinhos estão ilustradas na Figura 5. A 4E,14Z-esfingodienina (**11**) pode ser encontrada no plasma, no cérebro e na aorta humana²³ e a 6-hidroxiesfingosina (**12**) foi encontrada na pele^{20;21;24}. Uma esfingosina incomum, com ligação dupla entre os carbonos 3 e 4 (5-hidroxi, 3E-esfingosina; **13**)²⁵ foi encontrada em extratos ácidos do cérebro. Bases esfingoides com ramificações e variações do tamanho da cadeia carbônica (**14**, **15**) foram identificadas no leite e nos rins bovinos²⁶.

Os insetos têm principalmente, bases esfingoides com cadeia de 14 e 16 carbonos^{27;28}, tal como 4E-d14:1 (**16**) e o dieno conjugado 4E,6E-d14:2 (**17**) encontrado na *Drosophila*²⁸. Nematóides apresentam tanto iso-ramificação (4E-15-metil-d17:1) quanto anteiso-ramificação (4E-14-metil-d17:1) nas suas bases esfingoides (**18**, **19**)^{29; 30}. Essas ramificações foram relatadas em nematóides *Onchocerca volvulus*³¹ e *Ascaris suum*, com o último também contendo sulfatidos (que não é comum em invertebrados)³². Uma fitoesfingosina com 15 átomos de carbonos foi encontrada na urina de fêmeas de caranguejos peludos, *Erimacrus isenbeckii*, e serve como um feromônio sexual³³.

Em plantas, nove esfingolipídios são encontrados facilmente e são mostrados na Figura 4. Somente a eicoesfingosina (**3**) não é encontrada em plantas, mas sim em mamíferos. As bases esfingoides predominantes nas plantas são a fitoesfingosina e seus análogos monoinsaturados ($\Delta 4 \ e \ \Delta 8$)³⁴. Existem relatos na literatura de algumas outras variações incomuns da base esfingoide, presentes em menor proporção nos esfingolipídios de plantas, com diferentes tamanhos da cadeia carbônica, número de hidroxilas, posição e configuração estereoquímica da ligação dupla¹⁵. Os esfingolipídios de plantas com insaturações nas posições 4 e 8 podem apresentar uma ramificação na cadeia com um grupo metil (ou hidroxilas em outras posições)³⁴. No entanto, as bases esfingoides ramificadas, como 4E,8E,9metil-d19:2 (**20**) são consideradas mais típicas para esfingolipídios de fungos³⁵. Os fungos são fontes para uma ampla variedade de bases esfingoides únicas, como a termitomicesfina (**21**) do cogumelo chinês *Termitomyces albuminosu*³⁶.



Figura 5: Estruturas incomuns para bases esfingoides de esfingolipídios de plantas, mamíferos, fungos, insetos e organismos marinhos.

Além dos compostos descritos aqui, também podem ser encontradas muitas formas acetiladas, que são intermediários da biossíntese *de novo*, como a 3-cetoesfinganina, que não

são detectados nos organismos, porque é rapidamente reduzida a esfinganina. Também existe uma fascinante série de compostos denominados α,ω -esfingoides, que são conectadas pelo final da cadeia carbônica de cada esfingolipídio (cauda-cauda)³⁷.

1.3.2 Ceramidas, Glicosilceramidase, Glicosilinositolfosforilceramidas.

As ceramidas são produtos da condensação entre uma base esfingoide e um ácido graxo (Figura 6). O ácido graxo da ceramida é derivado de complexos de esfingolipídios e é predominantemente α-hidroxilado, com variações no tamanho da cadeia carbônica de 16 a 26 átomos de carbono⁹. Os ácidos graxos e as bases esfingoides são ligados por uma ligação amídica. A combinação de bases esfingoides com diferentes ácidos graxos rende milhares de possíveis estruturas de ceramidas, sendo conhecidas mais de 200 estruturas distintas³⁸. Embora a ceramida sirva como precursor de outros complexos de esfingolipídios, elas também podem atuar em diversas outras funções celulares, tanto como mensageiros intracelulares ou extracelulares, ou ainda, como moléculas reguladoras, que desempenham um papel essencial em inflamações, angiogênese, neurodegeneração e terapia para câncer^{39; 40; 41;} 42; 43; 44.

A nomenclatura abreviada para as ceramidas utiliza a combinação dos ácidos graxos com as bases esfingoides. Por exemplo, um ácido graxo com cadeia carbônica de 20 átomos e uma esfingosina formam uma ceramida designada como d18:1-20:0¹⁸. As ceramidas contendo esfinganina podem ser chamadas de diidroceramidas, enquanto as que contêm uma esfingosina comumente são chamadas de esfingoceramidas.



Figura 6: Estruturas de ceramidas mais comuns encontradas em plantas e mamíferos.

As outras duas subclasses de esfingolipídios encontrados são as glicosilceramidas (GlcCer) e os glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs). Para essas duas subclasses de lipídios, um grupo polar é ligado no carbono 1 da base da ceramida. Na GlcCer os grupos polares podem ser a glicose, galactose, globosídeo (Figura 7). A adição de carboidratos nas estruturas dos esfingolipídios leva a um aumento na sua complexidade e variedade.





Figura 8:Estruturas de glicosilinositolfosforilceramidas. No R₂pode conter um grupo hidroxila ou amina ou Nacetilamina.

Os Glicosilinositolfosforilceramidas (GIPCs) só ocorrem em plantas e fungos, a galactosilceramida é restrita a fungos e animais e a glicosilceramida é comum a todos os eucariontes, incluindo fungos, plantas e animais. A glicosilceramida desempenha um papel central no metabolismo dos esfingolipídios de mamíferos, uma vez que representa um intermediário biossintético para a formação de mais de 300 diferentes complexos

glicoesfingolípidos¹². A partir dessas quatro subclasses de esfingolipídios de plantas, milhares de variações são possíveis, formando assim os mais diversos e complexos esfingolipídios.

1.4 BIOSSÍNTESE DE NOVO DOS ESFINGOLIPÍDIOS

A biossíntese de esfingolipídios em mamíferos, plantas e fungos é muito similar. O que indica que eles possuem uma ancestralidade eucariótica bem antiga. Centenas de milhares de anos de evolução resultaram, surpreendentemente, em apenas algumas diferenças³⁷. Mamíferos dispõem de uma diversidade grande de bases esfingoides, prevalecendo a esfingosina e a esfingomielina, com diferentes esfingolipídios simples e complexos. Já nas plantas, a quantidade de bases esfingoides é um pouco menor e são encontradas predominantemente apenas nove bases esfingoides-C18, que estão presentes em proporções diferentes. Porém, as plantas, diferentemente dos mamíferos, possuem a Δ 8-desnaturase que introduz uma ligação dupla entre os carbonos 8 e 9, nas duas configurações (E/Z)⁴⁵.

A biossíntese dos esfingolipídios inicia-se com a condensação da serina com o palmitoil-CoA, pela ação da enzima serina palmitoil-CoA transferase (SPT), resultando na 3-ceto-esfinganina que é reduzida pela ação da 3-ceto-esfinganinaredutase dependente de NADPH à esfinganina, Figura 9⁹.



Figura 9: Início da rota biossíntetica dos esfingolipídios.

A partir da esfinganina todos os outros esfingolipídios são sintetizados. As reações que envolvem modificações na base esfingoide são catalisadas por ação de enzimas e podem levar a insaturações na cadeia carbônica, ou ainda a adição de hidroxilas, fosfato, glicose e/ou

ácidos graxos α-insaturados. A Figura 10 mostra algumas reações de esfingolipídios com base esfingoide encontrados em plantas e mamíferos^{9;16}.



Figura 10: Bases esfingoides e suas modificações, encontrados em plantas e mamíferos.

As ceramidas são formadas por duas vias: em uma as bases esfingoides contendo duas hidroxilas são preferencialmente condensadas com ácidos graxos de cadeia carbônica composta por 16 átomos (16:0-CoA), e catalisada pela ceramida sintase I. Estas ceramidas são os principais precursores da síntese de glicosilceramidas. Na outra via as bases esfingoides contendo três hidroxilas são preferencialmente condensadas com ácidos graxos maiores, e esta reação é catalisada pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicosil pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da síntese de glicos esta reação é catalisada pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicosil pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicos esta reação é catalisada pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicos esta reação é catalisada pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicos esta reação é catalisada pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicos esta reação é catalisada pela ceramida sintase II. Estas ceramidas são os principais precursores da glicos esta reação esta reace esta re

A complexidade estrutural dos esfingolipídios aumenta com a formação da ceramida. A partir da ceramida, as outras classes de ensfingolipídios (glicosilinositolfosforilceramida e glicosilceramida) são geradas. As glicosilceramidas e os outros esfingolipídios são formados exclusivamente no retículo endoplasmático. Por outro lado, para a formação das glicosilinositolfosforilceramidas é necessário que a ceramida seja transportada até o complexo de Golgi, onde o grupo inositolfosforil será condensado a esta ceramida, formando a glicosilinositolfosforilceramida⁴⁷.



Figura 11: Formação de complexos esfingolipídicos de ceramidas (GlcCer e GIPC), a partir da esfinganina. Adaptado de: MARKHAM *et al.*, 2013.

1.5 TIPOS ESTRUTURAIS DOS AGREGADOS DE ESFINGOLIPÍDIOS

Os esfingolipídios são substâncias anfipáticas que tem como característica química uma cabeça polar hidrofílica e uma longa cadeia de hidrocarbonetos hidrofóbica. Substâncias anfipáticas quando dissolvidas em água tem como característica formar agregados, nos quais a parte hidrofóbica fica para o interior, afastada da água e a cabeça polar fica para a parte externa, em contato com a água, o que favorece a solvatação da substância anfipática. Em solventes apolares ocorre a formação de micelas reversas ou invertidas, onde a parte apolar hidrofóbica fica em contato com o solvente e a cabeça polar hidrofílica fica voltada para dentro da micela. Na figura 12 podem ser observados os principais tipos de agregados⁴⁸.



Figura 12: Tipos de agregados formados por moléculas anfipáticas. A micela invertida é formada somente em solventes apolares.

Para que a agregação ocorra, a substância anfipática deve estar acima de uma concentração mínima. Esta concentração mínima é mais conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC), que é uma propriedade intrínseca e característica das substâncias anfipáticas.

Os agregados micelares diferem das demais partículas sólidas ou macromoléculas rígidas principalmente por serem flexíveis. Isto ocorre porque as forças que mantém as moléculas anfipáticas unidas em uma estrutura de micela (Figura 12) não são ligações iônicas ou ligações covalentes fortes, mas sim devida a interações fracas como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, forças de interações eletrostáticas atenuadas (screened electrostatic interations) e ligações de hidrogênio (que são interações fortes) ⁴⁸. Assim, as mudanças nas condições da solução onde essas substâncias anfipáticas se encontram como pH, concentração de eletrólitos na solução, concentração molar, não somente afeta as interações entre os agregados, mas irá também afetar as forças intramoleculares dentro de cada agregado, modificando o tamanho dos próprios agregados. Portanto, é necessário considerar os fatores que determinam como certas moléculas se associam em diferentes

estruturas. Embora as interações inter-agregados sejam algumas vezes ignoradas, em altas concentrações onde podem ocorrer forças atrativas ou repulsivas, elas devem ser consideradas.

No caso em que as forças eletrostáticas repulsivas são fortes ou há um elevado efeito estérico entre os agregados, haverá um aumento das forças repulsivas inter-agregados levando a sua separação. Com isso, diferentes fases são formadas e os agregados maiores são favorecidos. Por outro lado, quando as forças inter-agregados são atrativas, estes agregados vão formar micelas menores que podem interagir com outras micelas, originando superagregados ou interagirem até mesmo com os monômeros em solução. Essas forças atrativas podem ser devido a forças de van der Waals ou forças de íons de correlação – por exemplo, entre substâncias anfipáticas com cabeça polar não iônica ou zwtteriônica⁴⁹.

As forças majoritárias que governa a agregação micelar derivam da repulsão hidrofóbica na interface água-cadeia hidrocarbônica (que induz as moléculas a se associarem) e da atração hidrofílica da cabeça polar. Essas duas interações competem dando a ideia de duas forças opostas. Em agregados micelares, a interação hidrofóbica é maior (~50 mJ.m⁻²) comparada com a tensão da parte hidrofílica (~20 mJ.m⁻²)⁴⁹. Estas duas forças podem diminuir ou aumentar a área exposta à água. Em cada molécula há uma especificidade no tamanho da cadeia de hidrocarbonetos (l_c), no volume da cadeia de hidrocarbonetos (v) e na área que a cabeça polar ocupa, que é denominada como área ótima da cabeça polar (a_0). Com essas informações é possível calcular o Parâmetro de empacotamento (P), definido como:

$$P = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (1)$$

A partir do Parâmetro de empacotamento, uma série de estruturas possíveis é previstas e estão ilustradas no Quadro 1⁴⁸.

Tipo de lipídio	Forma de acordo com o P	Estrutura	
Lipídios com cadeia simples e grande a₀	$v \xrightarrow{P < 1/3} \int l_c$ CONE	MICELA	
Lipídios com cadeia simples e pequeno a _{0.}	$1/3 \le P < 1/2$ CONE TRUNCADO		
Lipídios com cadeia dupla e grande a _{0.}	$1/2 \le P < 1$	BICAMADA FLEXÍVEL	
Lipídios com cadeia dupla e pequeno a _{0.} Lipídios aniônicos em alta concentração de sal.		BICAMADA PLANAR	
Lipídios com cadeia dupla e pequeno a _{0.} Lipídios não iônicos, poli- insaturados.	P>1 CONE TRUNCADO INVERTIDO	MICELA INVERTIDA	

Quadro 1: O Parâmetro de empacotamento (P) usado para predizer qual tipo de estrutura possível⁴⁸.

1.6 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE Agregados

Há uma enorme variedade de técnicas para investigar as propriedades dos agregados de esfingolipídios. Algumas técnicas são espectrofotometria de fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) e estático (SLS, do inglês *Static Light Scattering*), espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS, do inglês *Small-angle X-ray Scattering*), medidas do potencial zeta, calorimetria, Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A escolha da técnica a ser utilizada vai depender das características estruturais dos agregados em estudo.

Para a caracterização estrutural dos agregados de micelas de esfingolipídios as técnicas de RMN e DLS são ótimas escolhas, pois são duas técnicas não destrutivas, não invasivas, rápidas e que oferecem informações sobre as características estruturais dos agregados, dos comportamentos dinâmicos e podem trazer informações complementares sobre as interações intermoleculares.

1.6.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a determinação estrutural, análise conformacional de moléculas, comportamentos dinâmicos (de moléculas orgânicas, inorgânicas, biomoléculas)⁵⁰ compreensão de interações inter e intramoleculares e formação de agregados simples ou complexos em amostras liquidas e sólidas^{51; 52}. A RMN é também muito utilizada nos estudos *in vivo* de Imagem por Ressonância Magnética (IRM), além de ser uma técnica rápida, não destrutiva e não invasiva. Certamente, a evolução da técnica em relação aos instrumentos nas últimas décadas culminou no posicionamento da RMN como técnica de análise principal de substâncias orgânicas e biomoléculas. Dentre os conceitos básicos da RMN, os dados obtidos acerca de deslocamento químico (δ), interação escalar entre *spins* (*J*), interação dipolar entre *spins* pelo espaço (nOe) e relaxação (T_1/T_2) permitem a interpretação de todo o comportamento de uma substância (ou grupo de substâncias) no ambiente analisado, assim como sua completa análise qualitativa.⁵¹

A técnica de RMN se baseia na absorção de energia na região das frequências de rádio (MHz), e a consequente transição de *spins* entre diferentes níveis de energia ($\alpha \in \beta$, ou

 $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$, no caso de *spins* com $I = \frac{1}{2}$) que, por sua vez, são resultado da presença de um forte campo magnético constante (B_0 , gerado pelo magneto supercondutor); tal separação entre os níveis de energia é dada por $E = -\mu_z \cdot B_0$, onde μ é o momento magnético nuclear do *spin*. As frequências utilizadas em RMN são na ordem de 10⁶ Hz; faixa de frequência correspondente às transições dos *spins* nucleares. A transferência de *spins* entre os estados α e β ocorre após absorção de energia quando a frequência da energia emitida se equipara a frequência de precessão de cada *spin* do sistema analisado (frequência de Larmor); dada por $\omega_0 = \gamma B_0$, onde γ é a razão magnetogírica. O requisito essencial para o funcionamento da técnica é a ocorrência de spins com número de spin, I, diferente de zero. Os núcleos com $I = \pm \frac{1}{2}$ apresentam apenas dois estados de energia quando estão sob influência do campo magnético **B**₀: é o caso de ¹H, ¹³C, ³¹P, ¹⁹F, ¹⁵N, dentre outros. Em casos onde os números de *spin* são maiores que ½ o sistema se torna mais complexo, assim como o resultado das análises^{51; 52}. Núcleos do mesmo elemento químico apresentam diferentes distribuições de densidade eletrônica e ligações na molécula, onde cada núcleo está sujeito a diferentes ambientes químicos e entrando em ressonância com frequências ligeiramente diferentes. Sendo as frequências de ressonância de cada núcleo diretamente relacionadas com o campo magnético externo, quanto maior for o valor de B_0 , maior será o valor da sua frequência. Como existem espectrômetros de RMN com diferentes campos magnéticos, seria difícil gerar tabelas com os valores característicos das frequências de ressonância para os diversos tipos de núcleos. Por isso, foi criada a escala de deslocamento químico (δ) em partes por milhão (ppm). O deslocamento químico de um núcleo é a diferença entre a frequência de ressonância do núcleo e a frequência de um padrão, geralmente o tetrametilsilano (TMS) usado com os solventes orgânicos e sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-propionico-2,2,3,3-d4 (TSP) ou 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) usados em amostras aquosas. Portanto o deslocamento químico é dado por ppm = $10^6 \text{ x } (v - v_{TMS})/v_{TMS}^{53}$.

Núcleos que tem o mesmo ambiente químico são chamados de equivalentes e os núcleos que tem ambientes químicos diferentes ou diferentes deslocamentos químicos são chamados de não equivalentes. Os núcleos, que estão próximos um do outro, exercem uma influencia no campo magnético efetivo de cada um, desdobrando os seus sinais no espectro de RMN. Este efeito da interação entre o *spin* nuclear de um átomo com o *spin* dos núcleos vizinho através da ligação é chamado de acoplamento *sipn-spin* ou acoplamento escalar (*J*) que pode ser medido em Hz. Os núcleos que são equivalentes têm a constante de acoplamento igual a zero, por isso o sinal é o mesmo para estes núcleos, já os núcleos que não são equivalentes apresentam uma constante de acoplamento diferente de zero. Este acoplamento

faz com que os sinais nos espectros de RMN apresentem multiplicidade. Para núcleos com *spin* igual a $\frac{1}{2}$ (incluindo o ¹H e o ¹³C, os dois mais estudos em RMN), a multiplicidade do sinal segue a regra **n**+**1**, onde **n** corresponde ao número de núcleos vizinhos, que estejam normalmente a duas ou três ligações de distância, com o qual o referido núcleo acopla. Além dessas informações sobre os núcleos, os sinais nos espectros de RMN são quantificáveis, onde a intensidade dos sinais é diretamente proporcional ao número de núcleos que dá origem ao sinal. Portanto, a técnica de RMN fornece informações sobre o tipo de núcleo e o seu ambiente químico, quais são os vizinhos destes núcleos e como eles se interagem, além de informações de quantificação, relaxação e coeficiente de difusão^{51; 52; 53}.

No caso de agregados a técnica de RMN pode fornecer informações importantes sobre os processos de agregação em solução a partir das informações estruturais fornecidas por espectros de RMN de ¹H, medidas de relaxação e espectros pseudo 2D DOSY (*Diffusion Ordered SpectroscopY*), por exemplo^{54; 55; 56; 57}. Com isso é possível observar os efeitos das interações intermoleculares, quando os sinais no espectro de RMN são alterados, devido ao novo ambiente químico que o núcleo de interesse se encontra⁵¹.

1.6.1.1 Comportamento de agregados em espectros de RMN de ¹H

A espectroscopia de RMN também vem sendo usada como uma ferramenta para a obtenção de informações com mais detalhes sobre interações intramoleculares e/ou intermoleculares, como ligações de hidrogênio inter^{58;59} e intra^{60;61}, estudos de interações intermoleculares como, por exemplo, proteína – proteína⁶², proteína – ácido nucléico ⁶³, e proteína – ligante⁶⁴, além de poder fornecer informações sobre o comportamento conformacional dessas substâncias em solução. Na espectroscopia de RMN algumas propriedades particulares caracterizam se as substâncias em estudo estão fazendo algum tipo de interação ou não, como a presença de sinais mais alargados, alteração no deslocamento químico e diminuição da intensidade do sinal quando as substâncias em estudos estão interagindo.Essas características podem ser usadas, para evidenciar a agregação da substância em estudo.

Na área de desenvolvimento de fármacos, compostos que agregam podem dar falsos resultados positivo, como altos rendimentos de atividade inibitória^{65; 66}. A diminuição desses falsos positivos pode ser feita através da observação direta da agregação desses compostos em meio aquoso⁶⁷. Um dos desafios mais importantes no descobrimento de novos fármacos é o

de prever se essa nova substância poderá vir a ser um medicamento e se será seguro para o corpo humano. Porém, muitas destas substâncias são sintetizadas em solventes orgânicos e seu comportamento em solvente orgânico é completamente diferente do observado nomeio aquoso.

Substâncias que agregam, em solução aquosa, adotam um equilíbrio entre os monômeros, os agregados solúveis e as formas sólidas insolúveis, quando esta existirem. Estes estados podem ser identificados e distinguidos em um espectro de RMN de ¹H. Para substâncias que fazem a troca lenta entre os monômeros e os agregados é possível identificar sinais no espectro RMN de ¹H referentes aos monômeros e sinais para os agregados. Já quando esta troca é rápida, somente um sinal fino é observado no valor médio dos deslocamentos químicos entre as duas formas. Para substâncias no estado sólido, nenhum sinal é esperado, quando a análise é feita em solução. Substância solúvel em água é impossível de detectar a olho nu se existem agregados ou não. Porém a dependência da concentração dessas substâncias resulta em características espectrais incomuns (descritas abaixo e na Figura 13) para RMN de¹H, revelando assim sua existência⁶⁷.

Esse conceito de diluição em RMN nos dá uma ideia de como os agregados são sensíveis às variações de concentração. Os espectros de RMN de ¹H podem nos informar como as mudanças estruturais variam de acordo com o novo ambiente químico em que esses agregados se encontram⁶⁷. Os espectros de RMN de ¹H apresentados na Figura 13mostram algumas características espectrais típicas para substâncias que agregam e que não agregam em solução.



Figura 13: Ilustração de como moléculas que agregam e as que não agregam se comportam com a diluição nos espectros de RMN de ¹H. (A) Compostos não agregados. (B) Compostos agregados. Tampão fosfato 50 mM pH 7,4 em 100% D2O. Adaptado de: LaPlante *et al.*, 2013.

Na Figura 13 parte A, é possível observar que com a diluição a intensidade dos sinais do espectro de RMN de ¹H vai diminuindo, porém os deslocamentos químicos permanecem constantes. Isto é o esperado para todas as substâncias que não agregam, pois os sinais dos espectros de RMN de ¹H são proporcionais às quantidades de substância dentro do tubo de RMN. As substâncias que não agregam estão mais distantes uma das outras, pois quando se aproximam são logo afastadas por repulsão que elas têm entre si. Isso faz com que o seu ambiente químico não influencie o ambiente químico do seu vizinho, sendo assim todas as espécies presentes vão sentir o campo magnético (B_0) da mesma forma. Quando diluídos eles aumentam ainda mais a distância entres eles e seu ambiente químico não é afetado pela diluição. Então, apenas as intensidades dos sinais diminuem com a diluição, sem afetar na largura, deslocamento químico ou multiplicidade dos sinais no espectro de RMN de ¹H. Na parte B da Figura 13 é apresentado o comportamento incomum para substâncias que formam agregados. Em concentrações mais elevadas os agregados começam a interagir entre si, influenciando no ambiente químico dos agregados vizinhos. Enquanto que, após a diluição, as substâncias ficam mais distantes e livres. Como resultado, os espectros de RMN de ¹H são incomuns e as mudanças observadas são devido ao novo ambiente químico após a diluição. A primeira mudança mais significativa nos espectros de RMN de ¹H é na quantidade de sinais que esses espectros apresentam. O número de sinais nos espectros pode variar muito devido à diversidade das espécies solúveis na amostra. Se a concentração for alta, um agregado pode até influenciar no ambiente químico de outro agregado e também, dependendo de sua natureza, interagirem entre si. Com a diluição a quantidade de sinais varia, pois os agregados vão se transformando em monômeros e os sinais característicos para os agregados vão desaparecendo do espectro e vão surgindo os sinais referentes aos monômeros. Outra característica incomum nos espectros de agregados é a variação dos deslocamentos químicos (δ) , que também está relacionada com a formação de agregados de diferentes tamanhos e com a possibilidade de interação entre eles, o que afeta o ambiente químico dos hidrogênios dos monômeros e dos agregados. Quando uma molécula passa de monômero para o seu estado agregado, os hidrogênios passam a interagir entre as moléculas vizinhas, numa interação intermolecular. Com isso, os sinais podem ser deslocados no espectro para regiões de maior ou menor frequência. Uma vez que a largura dos sinais está relacionada ao tamanho e a taxa de troca das espécies, espécies grandes, com taxas de troca mais lenta, apresentam sinais mais alargados. Um alargamento maior em altas concentrações evidencia a existências de espécies multiméricas de agregados ou de agregados grandes. Por fim, as intensidades dos sinais

podem se correlacionar com as mudanças na concentração. Porém, as intensidades dos sinais não são representativas da concentração devido ao fato de sua solubilidade ser limitada ao pH do meio. Para concentrações elevadas, acima do limite de solubilidade, formas sólidas começam a surgir e são invisíveis para o espectro de RMN de ¹H⁶⁷.

1.6.1.2 Diffusion Ordered SpectroscopY (DOSY)

O experimento de RMN baseado na sequência de pulso gradiente de pulso spin-echo (PGSE, do inglês *Pulsed Gradient Spin-Echo*) é uma poderosa técnica não invasiva para determinar o coeficiente de difusão (*D*) de moléculas ou agregados em solução. O coeficiente de difusão está relacionado com o raio hidrodinâmico (r_h) através da Equação de Stokes-Eisntein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (1)$$

Onde k_B é a constante de Boltzman, *T* a temperatura absoluta e η é a viscosidade.

Como pode ser observado na equação, o coeficiente de difusão não depende exclusivamente do raio hidrodinâmico dos agregados, mas de outros fatores, como a temperatura e a viscosidade. Estes fatores podem estar relacionados com as interações intermoleculares e fornecer diferentes coeficientes de difusão⁴⁹.

A sequência de pulso de PGSE foi desenvolvida nos meados da década de 60 por Stejskal e Tanner⁶⁸. Isto ocorreu bem antes da modernização da instrumentação em RMN e somente começaram a ser aplicadas na década de 90, após a introdução dos pulsos de gradiente de campo nos espectrômetros de RMN.Toda a parte de processamento do espectro só foi realizada em 1992 com Charles S. Johnson Jr.que formatoua sequência de pulso de PGSE como um experimento pseudo-bidimensional, em que uma dimensão representa o deslocamento químico do hidrogênio e a outra dimensão o coeficiente de difusão (*D*) para cada molécula⁶⁹, de forma separar cada componente presente na amostra. Essa nova técnica ganhou o nome de DOSY ("*Diffusion Ordered SpectroscopY*"). A combinação do espectro de RMN de ¹H com os valores de difusão produziram espectros muito semelhantes aos cromatogramas e com isso a técnica DOSY foi apelidada de "Cromatografia por RMN". Porém moléculas ou agregados que apresentam o coeficiente de difusão muito próximos não podem ser identificados individualmente. A maioria dos experimentos com DOSY de misturas complexas sofrem, em maior ou menor grau, de problemas de sobreposição nos

valores de coeficientes de difusão. A técnica DOSY vem avançando com intuito de melhorar a separação de vários componentes em misturas complexas. Hoje a técnica DOSY associada a outras técnicas geram espectros com maior resolução e menos sinais sobrepostos. A resolução espectral pode ser muito melhorada usando-se 3D DOSY, onde o coeficiente de difusão é adicionado a outra técnica 2D (por exemplo, COSY-DOSY^{70; 71}, 2DJ-DOSY^{72; 73}, HMQC-DOSY^{74; 75; 76} ou pure shift-DOSY⁷⁷). Também, o avanço na parte de processamento e desenvolvimento de novas ferramentas para o processamento dos dados vem sendo muito útil para tonar a técnica mais precisa e com uma melhor resolução^{78; 79; 80; 81; 82; 83}.

1.6.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação do tamanho de partículas ou agregados, através da qual se pode obter o coeficiente de difusão de uma partícula ou agregado em solução, e também seu raio hidrodinâmico, geralmente calculado a partir da difusão. Esta técnica fornece informações sobre a estrutura de agregados em um curto espaço de tempo, com pouco volume (500 μ L) e em uma ampla faixa de concentrações (dependo do limite de detecção do aparelho)⁸⁴.

No DLS, um feixe monocromático (~658 nm), tal como um laser, incide sobre a amostra e essa luz será espalhada em todas as direções por uma partícula presente na amostra, se a partícula tiver uma polarização diferente da solução. A luz espalhada é registrada numa escala de microsegundos. Partículas em solução movem-se ao acaso (movimento Browniano), partículas com tamanhos diferentes movem-se com velocidades diferentes. Partículas maiores movem-se com uma velocidade menor e vice e versa⁸⁵. Desta forma, o coeficiente de difusão (*D*) é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, e pode ser correlacionado com o raio hidrodinâmico (r_h) que é descrito de acordo com a Equação de Stokes-Einsten:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \qquad (1)$$

No DLS, a luz espalhada pelas partículas apresenta o mesmo comprimento de onda, porém, como essas partículas espalham a luz, isso faz com que haja uma diferença entre a luz incidente e a luz espalhada. Em sistemas formados por pequenas partículas, com movimentos maiores, a variação da luz espalhada é maior, devido ao fato de que a partículas menores e com movimentos mais rápidos cruzam a janela mais vezes dentro de um intervalo de tempo (Figura 14).



Luz espalhada que chega ao detector

Figura 14: Representação de como as partículas em movimento espalham a luz e como o aparelho de DLS detecta. Adaptado de: Zetasizer Nanoseries (2004)

Portanto, a variação da intensidade de espalhamento com o tempo é descrita através de uma função de auto-correlação temporal G(t), como mostrada na Equação 2, onde $I(t_0)$ é a intensidade de luz incidente e $I(t_n)$ a intensidade de luz espalhada.

$$G(t) = I(t_0).I(t_n)$$
(2)

Para uma dispersão de partículas pequenas, observa-se um decaimento mais rápido na função de auto-correlação G(t) do que no caso de dispersões contendo partículas grandes⁸⁵. Após um determinado tempo, a intensidade de luz espalhada $I(t_n)$ terá cada vez menor correlação com a intensidade de luz incidente $I(t_0)$ e a função de auto-correlação G(t) tende a zero. Esse decaimento é exponencial e também é em função do tempo.

Para partículas esféricas e monodispersas, G(t) é expresso como:

$$G(t) = e^{-\Gamma t} \quad (3)$$

onde*t* é o tempo de análise e Γ é a razão de decaimento da curva exponencial obtida da função de auto-correlação. Esta razão de decaimento é diretamente proporcional ao coeficiente de difusão translacional *D* e pode ser dada por:

$$\Gamma = D. q^2 \tag{4}$$

onde q é o vetor de onda da luz espalhada, dado por:

$$q = (4\pi\eta/\lambda_0)sen(\theta/2)$$
 (5)

onde $\eta \acute{e}$ o índice de refração do meio, $\lambda_0 \acute{e}$ o comprimento de onda da luz incidente e $\theta \acute{e}$ o ângulo no qual o detector está localizado. Tendo-se o valor de Γ , a partir da equação 5 os valores de *D* são obtidos e, finalmente, o raio hidrodinâmico daspartículas (r_h) através da equação de Stokes-Einstein^{48; 49; 84; 85; 86; 87; 88}.

A maioria dos estudos sobre a SP e a S1P estão relacionados às suas funções biológicas. Não existem muitos trabalhos na literatura sobre o comportamento estrutural da SP e da S1P em solução. Somente foi encontrado o trabalho desenvolvido por Sasaki et al.(2009)⁸⁹ sobre a agregação da SP e da S1P em diferentes valores de pH, forças iônicas e concentrações, usando DLS, titulação e RMN com o objetivo de medir a dependência da CMC devido as mudanças de pH e como a ionização do meio afeta as ligações de hidrogênio da SP. Os resultados revelaram uma complexa dependência da agregação com o pH. Isto é importante porque as células não são compostas por organelas que possuem um pH uniforme. Foi determinado o CMC da SP e da S1P em pH fisiológico (7,4), que foi de 0,99 µM e 14,35 µM respectivamente. A S1P apresentou uma CMC cerca de 14 vezes maior que SP, que pode ser devido ao fato da S1P apresentar um grupo fosfato na posição 1. Para a SP a situação apresentou-se mais complicada, com uma dependência profunda da agregação em relação ao pH. Onde a esfingosina em pH ácido apresentou CMC cerca de 2,4 vezes mais do que em pH básico. Em pH básico, a SP apresentou valores de raio hidrodinâmico que aumentam de tamanho com o aumento da concentração, sem haver um limite. Como os esfingolipídios apresentam doadores e receptores de ligações de hidrogênio, estas substâncias podem fazer tanto interações intramoleculares como intermoleculares. Por isso, esses agregados cada vez maiores em pH básico, podem ser estabilizados por interações de ligações de hidrogênio intermoleculares, visto que a esfingosina estaria na forma neutra. Em pH ácido, a esfingosina na forma protonada seria mais abundante, favorecendo as ligações intramoleculares que estabilizariam agregados menores.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar por RMN, DLS e cálculos teóricos o processo de formação de agregados da esfingosina e esfingosina-1-fosfato em meio aquoso

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Atribuir os deslocamentos químicos de ¹H da SP e S1P em solventes orgânicos e em solução aquosa;
- Investigar por RMN, como as mudanças no pH e na concentração influencia no processo de agregação da SP e da S1P;
- Avaliar a existência de agregados de SP e S1P em concentrações próximas às concentrações fisiológicas;
- Medir os diâmetros dos agregados de SP e S1P por DLS em diversos valores de pH e concentração;
- Identificar por cálculos teóricos os confôrmeros de menor energia e as ligações de hidrogênio formadas nas interações intra e intermoleculares das formas protonada e neutra da SP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nas análises da esfingosina (SP) e da esfingosina-1-fosfato (S1P) foram utilizadas três técnicas para avaliação da formação dos agregados – Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dinamic Light Scattering* - DLS) e Cálculos Teóricos. Os espectros de RMN de ¹H mono e bidimensionais foram adquiridos no Laboratório Multiusuário de Análises por RMN (LAMAR, IPPN, UFRJ) e no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN, IBqM, UFRJ) com a colaboração do Prof. Dr. Fabio C. L. Almeida.As medidas do raio hidrodinâmico (R_h) por DLS foram realizadas no Laboratório de Agregação Protéica e Amiloidogênese (LAPA, IBqM, UFRJ) com a colaboração da Profa. Dra. Susana Frases Carvajal. Os Cálculos Teóricos foram realizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio, FF, UFRJ) com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Mauricio R Sant'ana.

3.1REAGENTES, SOLVENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUES

Esfingosina (SP): D-esfingosina ou (2S,3R,4E)-2-amino-4-octadeceno-1,3-diol. CAS 123-78-4. Marca: Sigma-Aldrich. Fórmula molecular: C₁₈H₃₇NO₂. Peso molecular: 299,49 g/mol, 99% de pureza.

Esfingosina-1-fosfato (S1P): (2S,3R,4E)-2-amino-4-octadeceno-1,3-diol-1-fosfato ou D-eritro-esfingosina-1-fosfato. CAS 26993-30-6. Marca: Sigma-Aldrich. Fórmula molecular: C₁₈H₃₈NO₅P. Peso molecular: 379,47 g/mol, 98% de pureza.

Os solventes utilizados para solubilizar a SP e a S1P foram:

- Água deuterada (D₂O), 99,9% de deuteração, Cambridge Isotope Laboratories Inc USA.
- Clorofórmio deuterado (CDCl₃) 99,8% de deuteração + 0,05% v/v TMS, CAS 865-49-6, Cambridge Isotope Laboratories Inc USA.
- Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6) "100%", 99,96% de deuteração + 0,05% v/v TMS, CAS 2206-27-1, Cambridge Isotope Laboratories Inc USA.
- Metanol deuterado (CD₃OD), 99,8% de deuteração + 0,05% v/v TMS, CAS 811-98-3, Cambridge Isotope Laboratories Inc USA.

Para o preparo da solução estoque de tampão fosfato foram utilizados:

- Fosfato monossódico mono-hidratado, 98% de pureza, CAS 7558-80-7, MERCK.
- Fosfato dissódico hepta-hidratado, 98% de pureza, CAS 7782-85-6, MERCK.

A água utilizada no preparo das soluções, para limpeza dos materiais e dos tubos de RMN foi produzida a partir de um sistema de purificação Mili-Q da empresa Milipore.

3.1.1 Preparo da solução estoque da SP e da S1P

Para o preparo da solução estoque, 2,6 mg da SP foi pesada em uma balança analítica Shimadzu (modelo A4 220, classe I) e solubilizada em 4 mL de água Mili-Q, resultando em uma concentração de 2,17 mM. Para a S1P, foram pesados 2,0 mg e solubilizados em 3,1 mL de água Mili-Q, resultando em uma concentração de 1,7 mM.

3.1.2 Preparo do tampão fosfato

As soluções estoques do tampão fosfato 100 mM foram preparadas em pH 5,0, pH 7,2 e pH 10,0 em água miliQ conforme a Tabela 1. Para todas as soluções o pH foi ajustado em um phmetro Analyser – modelo 300 e as soluções estoques foram armazenadas (em freezer, $a - 20^{\circ}$ C).

nII do colução	fosfato monossódico	fosfato dissódico
pri da solução	mono-hidratado	hepta-hidratado
5,0	1,3614 g	0,036 g
7,2	0,4363 g	0,4852 g
10,0	0,0011 g	2,678 g

Tabela 1: Preparo de 100 mL de solução tampão fosfato 100 mM

Para as análises por RMN as amostras de SP e S1P foram preparadas em diversos solventes e concentrações conforme descrito abaixo.

3.1.3 Solubilização em 90% H₂0 e 10% D₂O

Para o preparo da solução de SP 1 mM em tampão fosfato 10 mM nos três valores de pH a serem analisados (5,0, 7,2 e 10,0). Foram usados 276 μ L da solução estoque de SP, 60 μ L da solução estoque do tampão fosfato de cada pH, 60 μ L de D₂O (para ajuste do *lock*) e mais 214 μ L de água Mili-Q para completar o volume total de 600 μ L.

Para o preparo da solução de S1P 1 mM em tampão fosfato 10 mM, foram usados 353 μ L da solução estoque de S1P,60 μ L da solução estoque do tampão fosfato, 60 μ L de D₂O e mais 127 μ L de água Mili-Q para completar o volume total de 600 μ L. Estas diluições foram feitas para os três valores de pH a serem analisados (5,0, 7,2 e 10,0).

3.1.4 Solubilização em 100% D₂O

Devido ao alto custo da SP e da S1P, as amostras preparadas em água com 10% D_2O , após terem sido analisadas por RMN, foram liofilizadas (liofilizador Liotop L108) e solubilizadas em 100% D_2O , para ser possível de obter um espectro mais limpo sem a presença do sinal da água.

3.1.5 Solubilização em DMSO-d6

0,399 mg da SP foram solubilizadas em 600 µL de DMSO-*d6* resultando uma concentração de 2,17 mM. Foi utilizado o DMSO-*d6* de ampola que não é 100% puro, pois apresenta uma pequena quantidade de TMS (0,05% v/v) e uma mínima quantidade de água residual. Posteriormente, foram adicionados 60 µL de D₂O no tubo para que o processo de agregação começasse a ocorrer. Esta adição resultou em uma mistura de solventes na proporção 90% DMSO-*d6*:10% D₂O, passando a concentração da SP para 1,97 mM. Foram feitas sucessivas adições de D₂O até atingir a proporção 60% DMSO-*d6*:40% D₂O.

0,228 mg da S1P foram solubilizadas em 600 µL de DMSO-*d6* resultando numa concentração de 1,17 mM. De forma semelhante ao procedimento feito com a SP, foram feitas adições de D₂O para a avaliação da agregação.

As concentrações e as proporções dos solventes da SP e da S1P variaram de acordo com a Tabela 2.

S	SP	S1P		
Concentração/mM	Proporção de DMSO <i>-d6</i> e D ₂ O	Concentração/mM	Proporção de DMSO- d6 e D ₂ O	
2,17	100%	1,17	100%	
1,97	90:10	1,06	90:10	
1,81	80:20	0,97	80:20	
1,67	70:30	0,88	70:30	
1,55	60:40	-	-	

Tabela 2: Concentrações e proporção dos solventes para a SP e a S1P.

As concentrações da SP e da S1P não foram exatas, pois a solubilização não foi completa. Com isso, a concentração foi estimada com o peso do material sólido e o volume usado para solubilizar.

3.1.6 Solubilização em CDCl₃

A SP foi solubilizada em CDCl₃ para a confirmação da estrutura, já que em DMSOd6 foram observados mais sinais no espectro de RMN de ¹H do que era esperado. 0,399 mg da SP foram solubilizados em 600 μ L de CDCl₃ para uma concentração final de 2,17 mM (as mesmas condições usadas em DMSO-d6).

3.1.7 Solubilização em CD₃OD

A S1P foi solubilizada em CD₃OD para a confirmação da sua estrutura, uma vez que a S1P não havia sido completamente solúvel em DMSO-*d6*. Porém, em CD₃OD sua solubilização também não foi completa. Assim, foi adicionado D₂O, para aumentar a polaridade e a solubilidade da S1P, resultando numa mistura dos solventes (CD₃OD:D₂O) na proporção 95:5. A massa pesada da S1P foi de 0,401 mg e o volume usado de CD₃OD:D₂O para solubilizar foi de 600 μ L resultando uma concentração final de 2,17 mM.

3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os experimentos de RMN foram feitos no espectrômetro de RMN – VARIAN (Agilent) / VNMRS 500, operando a 499,78 MHz para o ¹H, do Laboratório Multiusuário de

Análises por RMN (LAMAR, IPPN, UFRJ) e no espectrômetro de RMN – Bruker Avance III 800, operando a 800,40 MHz para o ¹H, do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN, IBqM, UFRJ). Todos os espectros foram processados com o programa MestReNova 6.0.2.

3.2.1 Parâmetros para aquisição dos espectros de RMN de ¹H

No espectrômetro de 500 MHz disponível no LAMAR foram adquiridos os espectros para a atribuição dos deslocamentos químicos da SP em DMSO-*d6* e em CDCl₃ e da S1P em CD₃OD e D₂O na proporção 95:5, os espectros com diferentes proporções de DMSO-*d6* e D₂O, os espectros DOSY e os espectros com variação de pH. Estes espectros foram adquiridos com os seguintes parâmetros: número de acumulações (*scans*) variando entre 256 e 512, intervalo de relaxação entre 1 e 2 s, largura espectral de 8012,8 Hz, com tempo de aquisição de 2,0447 s, número de pontos (*complex points*) de 16384 e o ganho do receptor (*receiver gain*) variou entre 0 e 52. Temperatura de 25°C. Os valores específicos para cada espectro estão descritos nas legendas das figuras.

3.2.2 Atribuição dos deslocamentos químicos para SP e S1P

A atribuição dos deslocamentos químicos da SP foi feita a partir da análise dos espectros de RMN de ¹H em DMSO-*d6* e em CDCl₃, ambos com 0,05% TMS (tetrametilsilano) como referência de deslocamento químico zero. Os espectros foram processados no MestRenova e a função de apodização exponencial de 1,5 Hz foi utilizada para melhorar a relação sinal/ruído.

A atribuição dos deslocamentos químicos da S1P foi feita a partir da análise do espectro de RMN de ¹H em CD₃OD com 0,05% TMS. Para suprimir o sinal da água residual presente no solvente foi usada a sequência de pré-saturação. O espectro foi processado no MestRenova com a função de apodização exponencial de 2,0 Hz. Além do espectro de RMN de ¹H foram também adquiridos espectros gCOSY (*COrrelation SpectroscopY*) para a SP em DMSO-*d6* e para a S1P em CD₃OD. Os espectros COSY foram adquiridos com 128 acumulações, 128 incrementos, ganho do receptor em 0, 1202 pontos, tempo de relaxação de 1,0 s. Os núcleos detectados no espectro de gCOSY foram ambos os núcleos de ¹H.

O espectro de gHSQC (*Heteronuclear Single Quantum Cohorence*) da esfingosina em DMSO-*d6*, concentração de 2,17 mM, foi adquirido a temperatura 25°C, com 128

acumulações, ganho do receptor em 0, 1202 pontos, tempo de relaxação de 1,0 s, o valor de J igual a 146 Hz. Os núcleos detectados no espectro de gHSQC foram o ¹H e o ¹³C.

3.2.3 Efeito do solvente na agregação da SP e da S1P

A análise da formação de agregados da SP e da S1P foi feita a partir do espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d6* com sucessivas adições de 10 % v/v de D₂O na amostra. As concentrações da SP e da S1P e as proporções de DMSO-*d6* e D₂O variaram de acordo com a Quadro 1. Para a supressão do sinal da água foi usada a sequência de pulsos WATEGATE *Soft Pulse* e os parâmetros de aquisição foram os mesmos até então utilizados para os outros espectros, somente o ganho de receptor variou de 30 (em 100% DMSO-*d6*) para 0 (quando o D₂O foi adicionado). Os espectros foram processados no MestRenova com a função de apodização exponencial (lb) de 1,5 Hz e o sinal da água foi suprimido no processamento com o método *Convolution* e usado 4 no parâmetro de seletividade.

Para as medidas do coeficiente de difusão dos agregados formados foram adquiridos espectros DOSY. Os espectros DOSY foram adquiridos com a sequência de pulsos Dbppste (*bipolar pulse pairs stimulated echo*), com o *diffusion gradiente length* (δ) em 1,5 ms e *diffusion delay* (Δ) de 100 ms e a força do gradiente variando de 2,15 a 53,85 G cm⁻¹ com 15 incrementos. O processamento dos espectros foi feito no programa DOSY Toolbox,⁷⁹ e o processamento usado foi o LOCODOSY.

3.2.4 Efeito do pH na agregação da SP e da S1P

Para os estudos de agregação da SP e da S1P foram adquiridos espectros de RMN de ¹H das amostras na concentração de1 mM solubilizadas em tampão fosfato 10 mM nos pHs 5,0; 7,2; 10,0. As análises foram feitas para a SP e a S1P em 90% H₂O com 10% D₂O e 100% D₂O (como descrito nos Itens 3.1.3 e 3.1.4). Para estes espectros foram usados de 256 a 512 acumulações (*scans*). Os espectros foram processados com o programa MestReNova com função de apodização exponencial (lb) de 3,00 Hz e o sinal da água foi suprimido no processamento com o método *Convolution* e usado 24 no parâmetro de seletividade.

3.2.5 Efeito da concentração da SP e da S1P na formação dos agregados

As amostras da SP e da S1P ambas 1 mM foram preparadas em tampão fosfato 10 mM, pH 7,2 e em 100% D_2O (com 0,05 % v/v de TSP). Foram feitas diluições da concentração inicial de 1 mM até 12 µM e as diluições foram acompanhados por espectros de RMN de ¹H. Os espectros foram adquiridos no espectrômetro de RMN Bruker de 800 MHz a 25°C com o número de acumulações (*scans*) variando entre 256 (para as amostras mais concentradas) até 3500 (para as amostras menos concentradas), intervalo de relaxação de 1,2s, largura espectral de 12820,5 Hz, número de pontos (*complex points*) de 16384 e ganho do receptor (*receiver gain*) de 16. Os espectros foram processados com o programa MestReNova. A intensidade dos espectros foi ajustada a partir da intensidade do sinal do TSP, por ser o único sinal com a mesma intensidade em todos os espectros. O sinal do TSP foi ajustado para 0 ppm, a linha base corrigida com o método *Whittaker Smoother* e foi feita uma apodização com a exponencial (lb) de 1,4 Hz. Com esse processamento os espectros não tiveram grandes perdas nas intensidades nem nas multiplicidades dos sinais.

3.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

Os diâmetros efetivos da S1P foram medidos em um aparelho de espalhamento de luz *Quase-Elastic Light Scattering* (QELS) com um detector dos tamanhos das partículas a 90Plus/BI-MAS. As medidas foram feitas a 25°C, com o detector a 90° e o comprimento de onda em 658 nm. As distribuições multimodais dos diâmetros das partículas foram geradas pelo algoritmo NNLS (do inglês*Non-Negatively constrained Least Squares*) com base na intensidade de luz dispersa por todas as partículas (*q*). A partir do valor de *q* pode-se calcular a razão de decaimento da curva exponencial obtida da função de auto-correlação (Γ) e a difusão (D). A partir dos valores de difusão o diâmetro das partículas é calculado pela Equação de Stokes-Einsten.

Para o experimento de DLS foram retirados 230 μ L da solução estoque da SP e diluídos em 270 μ L da solução tampão fosfato 10 mM nos pHs 5,0, 7,2 e 10,0, resultando em um volume total de 500 μ L e na concentração de 1 mM para a SP. Após a medida do diâmetro das partículas, foram feitas diluições das amostras para as concentrações de 200 μ M, 25 μ M e 6 μ M com uma leitura sendo feita para cada concentração para os três valores de pH.

3.4 CÁLCULOS TEÓRICOS

Todos os cálculos foram realizados com programa Spartan 08' (WaveFunction Inc.-Licença DQAIR/USB HASP). Os dímeros de SP foram desenhados de acordo com os possíveis pHs do meio experimental. Sendo assim foram desenhados dímeros com o grupo amino neutro e dímeros com o grupo amino protonado. A cadeia carbônica não foi representada por completo para minimizar o número de átomos e assim, o tempo computacional para realização de todos os cálculos. Sendo assim, a cadeia carbônica foi representada até o carbono 7. Os dímeros foram submetidos a uma análise conformacional por mecânica molecular com o campo de força MMFF, empregando o método de Monte Carlo.

Foram geradas centenas de geometrias possíveis dos dímeros da SP. Dentro das 10 primeiras geometrias com menor energia foram analisadas aquelas que apresentaram maior semelhança com a formação de agregados e selecionadas para otimização de energia e posterior comparação com agregados. As geometrias escolhidas foram submetidas a cálculos quânticos semiempíricos utilizando o método PM3 e as entalpias foram analisadas para estudar os dímeros mais estáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A SP e a S1P são esfingolipídios que apresentam natureza anfipática, formando agregados micelares em meio aquoso. No entanto, o processo de formação destes agregados ainda não está bem determinado. Uma vez que a SP e a S1P desempenham funções reguladoras importantes em doenças neurodegenerativas, inflamações e diversas outras^{1; 3; 90; 91; 92} e se encontram em diferentes condições fisiológicas nos organismos, é de grande importância à compreensão do comportamento destes esfingolipídios nestas diferentes condições. As maiores diferenças das condições fisiológicas podem estar nos valores de pH, pois as células são divididas em organelas onde cada uma delas possui um pH característico⁸⁹. Além disso, a SP e a S1P podem ser encontradas dentro e fora das células. Sendo assim, este trabalho tem como intuito uma melhor compreensão do processo de agregação da SP e da S1P em diferentes condições.

4.1 ANÁLISES POR RMN

4.1.1Atribuição dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ¹H

Para que fosse possível avaliar com maior precisão os efeitos das diferentes condições experimentais, como variações de solventes, pHs e concentrações sobre a estrutura da SP e da S1P, este estudo iniciou-se com a atribuição dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ¹H 1D e bidimensionais (2D).

Atribuição dos deslocamentos químicos de ¹H da Esfingosina (SP)

A partir da análise do espectro de RMN de ¹H 1D da SP 2,17 mM em DMSO-*d6* (Figura 15) é observado um sinal na região das metilas em 0,85 ppm (3H, t, J = 6,7 Hz) correspondente a metila da posição 18. O sinal em 1,24 ppm (21H, s) foi atribuído aos hidrogênios da cadeia carbônica (H8 – 17), sendo todos eles quimicamente equivalentes. O sinal em 1,32 ppm (2H, d, J = 5,8 Hz) foi atribuído aos hidrogênios da posição 7. Outro sinal em 1,98 ppm (2H, dd, J = 13,5 e 6,7 Hz) foi atribuído aos hidrogênios na posição 6, esses hidrogênios são do metileno ligado a um carbono SP^2 (alílicos), sendo o metileno mais desblindado no espectro. O sinal em 2,57 ppm (1H, dd, J = 11,4 e 5,7 Hz) foi atribuído ao hidrogênio na posição 2, sendo em parte sobreposto pelo sinal do solvente, a proximidade de

outro átomos mais eletronegativos faz com que seu sinal no espectro esteja mais desblindado. Já o sinal em 3,77 ppm (1H, d, J = 4,3 Hz) foi atribuído ao hidrogênio na posição 3.



Figura 15: Espectro de RMN de ¹H (499,79 MHz) da esfingosina em DMSO-*d6*, concentração de 2,17 mM, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

Os sinais em 5,44 ppm (1H, dd, J = 15,5 e 5,7 Hz) e em 5,54 ppm (1H, m) foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos. Porém, somente com o espectro gCOSY (Figura 16) que foi esclarecido qual era o sinal referente ao H4 e ao H5. Sendo assim, no espectro de gCOSY o sinal em 5,44 ppm foi atribuído ao H4 por haver uma correlação deste hidrogênio com o hidrogênio da posição 3. Duas correlações foram observadas para o H3 com o H4 e com o H2. Para o sinal da hidroxila foi observado uma correlação entre a hidroxila e o H3 sugerindo que essa é a hidroxila na posição 3.

No espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d6* (Figura 15) há sinais mais discretos na região entre 8,6 e 6,6 ppm que sugere serem sinais dos hidrogênios ligados ao nitrogênio. Além disso, há sinais com menores intensidades no espectro inteiro indicando a presença de outras espécies, provavelmente agregados da SP, em DMSO-*d6*. Atribuição completa da estrutura esta representada na Figura 15.



Figura 16: Espectro de RMN de gCOSY ¹H-¹H (499,78 MHz) da esfingosina em DMSO-*d6*, concentração de 2,17 mM, a 25°C, com 128 acumulações, 128 incrementos, ganho do receptor = 0 e 1202 pontos em f2 e 128 pontos em f1.

No espectro de gHSQC (*Heteronuclear Single Quantum Cohorence*), Figura 17, são observados os acoplamentos entre hidrogênios e carbonos diretamente ligados (${}^{1}J_{CH}$). Na sequência de pulsos gHSQC, pode ser feita uma seleção por diferença de fase entre os sinais de CH₂ e dos sinais de CH e CH₃. Os hidrogênios da metila na posição 18 estão ligados diretamente ao carbono em 14,7 ppm. Os hidrogênios da cadeia carbônica (H8 – H17) mostram correlação com carbonos por volta de 20 ppm. O H6 esta ligado ao carbono em 32,5 ppm. O H2 esta ligado ao carbono em 57,4 ppm. Os hidrogênios na posição 1 são diasterotópicos e mostram correlação com carbono em 63,4 ppm. O H3 esta ligado ao carbono em 73,1 ppm. Os hidrogênios H4 e H5 estão ligados aos carbonos em 131,1 ppm e 130,9 ppm, respectivamente.



Figura 17: Espectro de RMN gHSQC (499,78 MHz) da esfingosina em DMSO-*d6*, concentração de 2,17 mM, temperatura 25°C. 128 acumulações; Ganho do receptor = 0; 1202 pontos em f2 e 128 pontos em f1; J = 146 Hz. CH₂ (vermelho), CH e CH₃ (azul).

Espectro de RMN de ¹H da SP também foi adquirido em $CDCl_3$ (Anexo 1) e em D_2O em tampão fosfato pH 7,2 (Anexo 2) e comparado com o espectro em DMSO-*d6* para verificar a variação dos deslocamentos químicos nos diferentes solventes. Os valores dos deslocamentos químicos para cada hidrogênio da SP em DMSO-*d6*, em CDCl₃ e em D_2O foram organizados na Tabela 3 e comparados com a literatura⁹³.

Hidrogênios da SP	δ em DMSO-d6 /ppm	δem CDCl ₃ /ppm	δ D ₂ O /ppm	δ Literatura em CDCl ₃ /ppm ⁹³
H 1a	3,23	3,69	3,64	3,70
H 1b	3,42	3,63	3,55	3,61
H 2	2,57	2,89	3,19	2,88
H 3	3,77	4,05	-	4,04
H 4	5,44	5,48	-	5,47
H 5	5,54	5,77	-	5,76
H 6	1,98	2,06	1,75	2,05
H 7	1,32	1,37	1,17	1,37
H 8 – 17	1,24	1,26	1,16	1,20 - 1,40
H 18	0,85	0,88	0,70	0,88

Tabela 3: Deslocamento químico dos sinais de hidrogênios da esfingosina por RMN de ¹H (499,78 MHz) em CDCl₃, em DMSO-*d* δ e em D₂O a 25 °C, concentração 2,17 mM. Dados da literatura do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃).

Assim os hidrogênios da SP foram atribuídos nos espectros de RMN em diferentes solventes e confirmados com a literatura. A SP foi mais solúvel em CDCl₃ do que DMSO-*d6*. Esta diferença de solubilidade, provavelmente, se deve a presença de água residual no DMSO-*d6* favorecendo a agregação da SP, já que sua CMC é de 0,99 μ M em pH 7,4⁸⁹. Portanto, os sinais extras observados no espectro em DMSO-*d6* estão relacionados a espécies agregadas que são formadas devido à presença da água residual do DMSO-*d6*. Os sinais das hidroxilas só foram observados no espectro em DMSO-*d6*.

Esfingosina-1-fosfato (S1P)

A S1P apresentou baixa solubilidade em DMSO-*d6* e uma melhor solubilidade em CD_3OD e D_2O na proporção 95:5. Sendo que nesta última, a concentração da amostra de S1P não pôde ser definida com precisão, pois ainda apresentava partículas sólidas em suspensão. Assim, a concentração é aproximada, determinada pela quantidade de material pesado e o volume usado para solubilizar. O espectro de RMN de ¹H da S1P (Figura 18) foi adquirido com a concentração de 1,97 mM.



Figura 18: Espectro de RMN de ¹H (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato em $CD_3OD:D_2O$ (95:5), concentração de 1,97 mM, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

O sinal em 0,89 ppm foi atribuido a metila (H18), sua integral foi normalizada para 3 e os outros sinais integrados baseados neste valor.O espectro de RMN de ¹H da S1P apresentou maior número de sinais comparado com o espectro da SP. Isto pode ser atribuído à presença de agregados da S1P já que sua CMC, em água, é de 14,35 μ M⁸⁹. A presença de sinais referentes aos agregados causou dúvidas no assinalamento do espetro de RMN de ¹H da S1P, porém com o auxílio do espectro COSY (Figura 19) foi possível fazer a atribuição dos sinais. As correlações observadas no COSY foram entre H5 - H6, H4 - H3, H4 - H5, H3 - H2,H3 - H4, H2 - H1 e H2 - H3.



Figura 19: Espectro de RMN gCOSY ¹H-¹H (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato em CD₃OD, concentração de 1,97 mM, a 25°C, com 128 acumulações, 128 incrementos, ganho do receptor = 0 e 1202 pontos em f2 e 128 pontos em f1.

Na Tabela 4 são apresentados todos os sinais atribuídos aos hidrogênios da S1P, suas multiplicidades e constantes de acoplamento.
Hidrogênios da Esfingosina-1- fosfato	Deslocamento químico (δ)/ppm	Multiplicidade e Constante de Acoplamento (J)/Hz
H 1a, 1 _b	4,23 - 3,99	m
H 2	3,41	m
Н 3	4,34	t, J = 6,0
H 4	5,51	dd, J = 15,6; 7,1
Н 5	5,91	m
Н б	2,11	dd, J = 13,8; 6,8
H 7	1,33	t, J = 5,0
H 8 – 17	1,28	S
H 18	0,89	t, J = 6,8

Tabela 4: Deslocamento químico dos sinais de hidrogênios da esfingosina-1-fosfato do espectro de RMN de ¹H (499,78 MHz) em CD₃OD e D₂O (95:1), a 25 °C, concentração 1,97 mM.

Os sinais na região de 3,78 – 3,50 ppm são reportados na literatura⁹⁴ como impurezas da Sigma-Aldrich para a S1P. A presença de outros sinais não atribuídos aos monômeros está relacionada a espécies agregadas solúveis que são formadas devido à presença da água adicionada. A atribuição do espectro de RMN de ¹H da S1P foi completa e confirmada através da comparação com a literatura.^{94;95}

Nos espectros em D_2O da SP e da S1P, os sinais sofrem grandes variações nos deslocamentos químicos comparados aos outros solventes. Com isso, a partir dos espectros em DMSO-*d6* foram feitas sucessivas adições de D_2O com o intuito de averiguar melhor essas variações nos espectros.

4.1.2 Formação de agregados da SP e da S1P: efeito do solvente

Devido à complexidade dos espectros de RMN de ¹H da SP e da S1P em água, onde vários sinais não puderam ser identificados, decidimos averiguar o processo de agregação da SP e da S1P em água iniciando a análise a partir dos compostos dissolvidos em solventes orgânicos, onde a forma monomérica seria predominante. Para a SP e a S1P foram adquiridos espectros de RMN de ¹H em DMSO-*d6*. Em seguida, foram feitas adições sucessivas de D₂O até a proporção de DMSO-*d6* e D₂O de 60:40. O processo de agregação foi acompanhado pelos espectros de RMN de ¹H e espectros de DOSY a cada adição de D₂O.

Esfingosina (SP)

A Figura 20 mostra a sobreposição dos espectros de RMN de ¹H para a SP nas diversas proporções dos solventes DMSO-d6 e D₂O. A concentração inicial da SP foi de 2,17

mM. Os sinais dos seus hidrogênios foram assinalados no primeiro espectro (100% DMSO*d6*) para melhor compreensão.



Figura 20: Espectro de RMN de ¹H WATERGATE soft pulse (499,78 MHz) da esfingosina em diferentes proporções de DMSO-*d6* e D₂O, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

Através da análise comparativa dos espectros de 100% a 60% de DMSO-*d6* foi observado o aparecimento de um sinal em 8,4 ppm que é referente aos hidrogênios ligados ao nitrogênio, de um sinal em 1,65 ppm e de sinais em torno de 4 ppm. Também foi observado o desaparecimento dos sinais das hidroxilas em 4,3 ppm e 4,6 ppm e alterações dos deslocamentos químicos em diversos sinais referentes ao monômero.

O sinal do H2 foi desblindado, com seu um deslocamento químico sendo deslocado de 2,57 ppm em 100% de DMSO-*d6* para 2,64 ppm em 60% de DMSO-*d6* (Figura 21). Por outro lado, a adição de D_2O , indo de 100% para 60% de DMSO-*d6*, provocou um aumento da blindagem nos hidrogênios H18 (de 0,85 ppm para 0,78 ppm), no sinal do H7 (de 1,31 ppm para 1,26 ppm) e no H8-17 (de 1,23 ppm para 1,17 ppm). No caso do H6 (1,96 ppm) a variação de deslocamento químico é pouco significativa, mas foi observado um leve alargamento do sinal, com uma diminuição da sua intensidade (Figura 21).



Figura 21: Expansão no espectro de RMN de ¹H WATERGATE soft pulse (499,78 MHz) da esfingosina na região de 2,9 - 0,7 ppm. Em diferentes proporções de DMSO-*d6* e D₂O, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

Esta blindagem dos sinais dos hidrogênios da cadeia carbônica e desblindagem dos sinais dos hidrogênios da cabeça polar são coerentes com o comportamento de agregação de moléculas anfipáticas, que formam micelas. Na formação das micelas a cadeia carbônica localiza-se no interior da micela (menos exposta para o ambiente externo), ficando a cabeça polar em contato com a água (mais exposta). Desta forma, a cabeça polar pode ser solvatada e fazer novas interações intermoleculares, o que explicaria a desblindagem dos hidrogênios da cabeça polar da SP. Além disso, foi observado um sinal em 1,1 ppm que sugere ser um sinal referente ao agregado, pois conforme a água foi adicionada este sinal ficou mais evidente e intenso, sugerindo que com a adição de água há um aumento da concentração das espécies agregadas,sendo o equilíbrio entre agregados e monômeros deslocado para a formação dos agregados.Porém, o surgimento de sinais ou intensificação de sinais antes irrelevantes, como o sinal em 1,65 ppm, são de difícil compreensão e sugere-se que sejam sinais exclusivos para os agregados.

Os hidrogênios olefínicos sofrem efeitos opostos na sua blindagem com a adição de água (Figura 22), sendo o sinal do H4 mais blindado, com seu deslocamento químico variando de 5,44 ppm para 5,35 ppm e o H5 mais desblindado, com seu sinal sendo deslocado de 5,53 ppm para 5,57 ppm.



Figura 22: Expansão no espectro de RMN de ¹H WATERGATE soft pulse (499,78 MHz) da esfingosina na região de 5,7 - 5,2 ppm. Em diferentes proporções de DMSO-*d6* e D₂O, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

Para obter maiores informações sobre o tamanho dos agregados formados com adição de água na amostra de SP em DMSO-*d6*, foram feitos espectros DOSY para cada uma das amostras de 100% a 60% de DMSO-*d6*. Na análise do espectro de DOSY da SP em 100% de DMSO-*d6* (Anexo 3) foi determinado o coeficiente de difusão de 8,2x10⁻¹⁰ m² s⁻¹ para o DMSO-*d6*, o que está condizente com o valor descrito por Holz *et al.* (1996)⁹⁶ e de 2,8 x10⁻¹⁰ m² s⁻¹ para SP que está de acordo com o valor do coeficiente de difusão calculado conforme descrito por Evans *et al.*(2013).⁹⁷ Já em 90%DMSO-*d6*:10%D₂O (Anexo 4) os valores de difusão ficaram próximos de 2x10⁻¹⁰ m² s⁻¹, o que corresponde uma massa molar calculada de 600,1 g.mol⁻¹,⁹⁷ evidenciando a agregação da SP mesmo na presença de pequena quantidade de água.

Em 80% DMSO-*d6*:20% D₂O (Anexo 5) os valores de difusão diminuíram e ficaram entre 0 e 1×10^{-10} m² s⁻¹ o que corresponde a agregados cerca de 60 vezes maiores que os monômeros. Para as proporções de solvente de 70% e 60% de DMSO-*d6* (Anexo 6, 7) os valores de difusão ficaram entre 0,5 e 2 $\times 10^{-10}$ m² s⁻¹. A adição de água faz com que a viscosidade do meio diminua. Com isso, a difusão dos agregados da SP seria maior por causa da baixa viscosidade da mistura de solventes, já que o coeficiente de difusão calculado para a SP (monômero) em D₂O é de 4,54x10m² s⁻¹ é bem maior do que em DMSO-*d6* (2,79x10⁻¹⁰ m² s⁻¹).⁹⁷

As alterações observadas nos espectros da SP mostram sinais de agregados mesmo com pequenas quantidades de água na amostra. Isto sugere que diferentes espécies (agregado e monômero) estão presentes em equilíbrio na solução, sendo o equilíbrio deslocado para a formação dos agregados com a adição de água.

Esfingosina-1-fosfato (S1P)

A análise da formação de agregados com a adição de água para a esfingosina-1fosfato (S1P) em DMSO-*d6* foi feita seguindo o mesmo protocolo descrito para a esfingosina (SP). Os espectros de RMN de ¹H da S1P de 100% a 70% de DMSO-*d6* são apresentados na Figura 23. Devido a pouca solubilidade da S1P, mesmo em 100% de DMSO-*d6*, somente os sinais correspondentes aos hidrogênios H18 (0,83 ppm) e H8 – 17 (1,22 ppm) puderam ser identificados. Foram observados outros sinais que não são atribuídos aos monômeros, o que indica a presença de agregados em 100% de DMSO-*d6*.



Figura 23: Espectro de RMN de ¹H WATERGATE soft pulse (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato em diversas proporções de DMSO-d6 e D2O e diferentes concentrações, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz, supressão do sinal da água foi realizada com o método de supressão de sinal *Convolution* e seletividade de 4.

A expansão do espectro na região de 1,28 - 0,78 ppm, apresentada na Figura 24, mostra que o sinal referente a metila (H18) em 0,83 ppm foi deslocado para região de maior blindagem com a adição de D₂O, com uma variação de 0,06 ppm,assim como o sinal referente aos hidrogênios H8-H17 que deslocam de 1,22 ppm para 1,17 ppm, uma diferença de 0,05 ppm. Foram observados dois dupletos a 1,14 e 1,06 ppm, com um *J* de 6,7 Hz, para os dois sinais. Com a adição de água, o dupleto a 1,06 ppm é deslocado para 1,10 ppm enquanto o dupleto a 1,14 ppm é deslocado para 1,12 ppm sofrendo um alargamento significativo. Estes sinais também foram observados nos espectros da SP (Figura 20) e apresentaram os mesmos valores de deslocamento químico e as mesmas variações.



30 1.28 1.26 1.24 1.22 1.20 1.18 1.16 1.14 1.12 1.10 1.08 1.06 1.04 1.02 1.00 0.98 0.96 0.94 0.92 0.90 0.88 0.86 0.84 0.82 0.80 0.78 f1(ppm)

Figura 24: Expansão no espectro de RMN de ¹H WATERGATE soft pulse (499,78 MHz) da esfingosina-1fosfato na região de 1,28 - 0,78 ppm, em diversas proporções de DMSO-d6 e D2O e diferentes concentrações, a 25° C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz, supressão do sinal da água foi realizada com o método de supressão de sinal *Convolution* e seletividade de 4.

Na região entre 8,50 – 8,00 ppm, Figura 25, podem ser observados os sinais referentes aos hidrogênios lábeis da S1P, provavelmente do NH₂. Com a adição de água estes sinais se aproximam, sugerindo um aumento da velocidade do processo de troca. Em 100% de DMSO-*d6* o processo de troca seria lento, com estes hidrogênios provavelmente formando interações intramoleculares e com a adição de água, poderia haver favorecimento para a formação de interações intermoleculares e a troca com a D_2O adicionada, acelerando o processo de troca.



30 1.28 1.26 1.24 1.22 1.20 1.18 1.16 1.14 1.12 1.10 1.08 1.06 1.04 1.02 1.00 0.98 0.96 0.94 0.92 0.90 0.88 0.86 0.84 0.82 0.80 0.78 12(spm)

Figura 25: Expansão no espectro de RMN de ¹H WATERGATE soft pulse (499,78 MHz) da esfingosina-1fosfato na região de 8,5 - 8,0 ppm, em diversas proporções de DMSO-d6 e D2O e diferentes concentrações, a 25° C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz, supressão do sinal da água foi realizada com o método de supressão de sinal *Convolution* e seletividade de 4.

Foi possível observar nos espectros de RMN de ¹H da S1P a presença de sinais que não são atribuídos aos monômeros, sugerindo serem sinais referentes aos agregados e estes sinais estão presentes mesmo em 100% DMSO-*d6*. Além disso, os sinais que são referentes aos monômeros têm seus deslocamentos químicos alterados com a adição de D_2O , principalmente os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia carbônica, caracterizando o processo de agregação da S1P.

Os sinais dos monômeros sofrem variações nos seus deslocamentos químicos devido a mudança de ambiente químico quando os agregados são formados⁶⁷. Com isso, podemos concluir que as mudanças observadas no espectro de RMN de ¹H da SP e da S1P, à medida que é feita a adição de água, está relacionada com a formação dos agregados micelares. Estas mudanças seriam então provenientes das diferentes interações intermoleculares e intramoleculares, que são alteradas durante os processos de adição de água. É importante ressaltar que com a adição da água não foram observadas partículas sólidas ou turvamento da amostra, o que sugere que nestas condições estariam sendo formados os agregados solúveis.

4.1.3 Formação de agregados da SP e da S1P: efeito do pH

O pKa da SP, obtido através de titulação em micelas de Triton X-100, é 6,1⁸⁹. Este valor parece ser o mais consistente, pois na literatura existem valores discrepantes para o pKa da SP^{98; 99}. López - García *et al.* (1993)⁹⁹ apontam que uma possível explicação para estes valores de pKa conflitantes pode ser na diferença do nível de hidratação e de ligações de hidrogênio na SP, os quais mudam o pKa do grupo amino. Sendo assim, para as análises da SP em solução aquosa foram escolhidos os valores de pH acima e abaixo do pKa da SP. As análises foram feitas em solução tampão fosfato 10 mM nos pHs 5,0; 7,2 e 10,0 para a SP e a S1P e tiveram o intuito de verificar como a protonação do meio influencia a agregação.

Esfingosina (SP)

Os espectros de RMN de ¹H da SP 1 mM nos valores de pH de 5,0; 7,2 e 10,0 em 100% D₂O são apresentados na Figura 26. Devido à baixa solubilidade da SP em água e à agregação, foram observados e identificados poucos sinais. As larguras dos sinais nos espectros de RMN de ¹H são fortemente influenciadas pelos movimentos moleculares. O movimento Browniano mais lento de agregados maiores leva a uma relaxação mais rápida, predominantemente via relaxação do T₂. Com o alargamento das linhas, os sinais desaparecem do espectro. Assim, somente puderam ser identificados nestes espectros os sinais correspondentes ao H8-17 (1,27 ppm), ao H7 (1,31 ppm) e o sinal dos hidrogênios da metila em 0,84 ppm.



Figura 26: Espectro de RMN de ¹H (499,78 MHz) da esfingosina com 1mM, 100% D2O, em diferentes valores de pH no tampão fosfato 10 mM, a de 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

Com o aumento do pH de 5,0 para 7,2 o sinal do H3 é deslocado de 3,65 para 3,55 ppm (expansão na Figura 26). Este efeito de desblindagem provavelmente está relacionado com a protonação do grupo amino em pH ácido (NH_3^+) , sendo desprotonado com o aumento do pH (ocorrendo a transição de NH_3^+ para NH_2), o que influenciaria o sinal referente ao H3, que está próximo ao grupo amino. Devido a desprotonação do grupo amino em pH neutro ou básico, a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos amino e hidroxila poderia estar sendo favorecida. Esta proposta é reforçada pela presença do sinal em 8,45 ppm, que se mostra muito intenso em pH 10,0, aparecendo também em menor intensidade em pH 7,2, mas não é observado em pH 5,0.

A formação de ligações intra e intermoleculares na SP foi proposta em função da existência de grupos doadores e receptores de ligação de hidrogênio na estrutura da SP. De acordo com Merrill *et al*(1989),¹⁰⁰ em pH ácido a protonação do grupo amina (NH₃⁺) favoreceria a formação da ligações de hidrogênio intramoleculares, enquanto em pH básico, com a amina na forma neutra (NH₂) as ligações de hidrogênios intramoleculares reduziriam,

predominando as ligações intermoleculares entre monômeros e, assim, estabilizando agregados cada vez maiores.

Esfingosina-1-fosfato (S1P)

Os espectros de RMN de ¹H da S1P 1 mM nos valores de pHs de 5,0; 7,2 e 10,0 em 100% D_2O são apresentados na Figura 27. Somente puderam ser identificados nestes espectros os sinais correspondentes ao H8-17 (1,29 ppm), ao H7 (1,32 ppm) e o sinal dos hidrogênios da metila em 0,87 ppm. Foi observado um sinal muito intenso em 2,72 ppm nos três valores de pH. Na análise do espectro gCOSY (Anexo 12) esse sinal em 2,72 ppm não apresentou correlação com os outros sinais da amostra, sugerindo que este sinal seja referente à forma agregada.

O sinal em 8,45 ppm é um sinal bem recorrente nos espectros de RMN de ¹H da SP e da S1P e foi observado em diferentes condições experimentais. Os espectros da S1P em diferentes pHs (Figura 27) foram adquiridos com a técnica de WATERGATE Soft Pulse para a supressão do sinal da água, pois com a técnica de pré-saturação este sinal não foi observado no espectro em pH 5,0 (Anexo 11). Como na técnica de pré-saturação é aplicado um pulso de longa duração na frequência da água, isso causa uma diminuição dos sinais dos hidrogênios lábeis, os quais fazem troca com os hidrogênios da água. Esta diminuição no sinal é devido a uma transferência dessa saturação na frequência da água para os hidrogênios lábeis, confirmando que o sinal em 8,45 ppm é referente a hidrogênios lábeis. O sinal em 8,45 ppm apresentou um comportamento diferente na S1P comparado com a SP. Na SP este sinal é mais intenso em pH básico do que em pH neutro e não foi observado em pH ácido. Por outro lado, na S1P este sinal foi observado mais intenso em pH ácido, diminuindo de intensidade com o aumento do pH. Considerando que este sinal corresponde aos hidrogênios NH₂, pode-se propor que esta diferença seja devido a presença do grupo fosfato na S1P. Este grupo irá fazer com que as interações intra e intermoleculares na S1P sejam diferentes da SP, já que na S1P estas interações também poderiam ocorrer com a participação do grupo fosfato, o qual também é suscetível às variações de pH.



Figura 27: Espectro de RMN de ¹H (499,78 MHz) da esfingosina-1-fosfato com 1mM, 100% D2O, em diferentes valores de pH no tampão fosfato 10 mM, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.

Nos espectros da SP (Figura 26) e da S1P (Figura 27) em diferentes valores de pH foi observado que o pH interfere no de agregação. Este efeito certamente está relacionado com a protonação ou desprotonação do grupo amino e do grupo fosfato (no caso da S1P), favorecendo a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares quando o grupo amino esta desprotonado (pH básico) ou ao favorecimento das ligações intramoleculares quando o grupo amino esta protonado (pH ácido).

4.1.4 Formação de agregados da SP e da S1P: efeito da concentração

Para avaliar se haveria dissolução dos agregados com a diminuição da concentração, as amostras da SP e da S1P foram diluídas de 1 mM (ou 1000 μ M) a 12 μ M. Para compensar a perda de intensidade nos espectros de RMN com a diluição, o número de acumulações foi sendo aumentado para cada diluição, variando-se de 256 nas amostras mais concentradas a 3500 nas mais diluídas. Para que tivéssemos espectros com melhor relação sinal:ruído e

resolução, os espectros foram obtidos no espectrômetro de 800 MHz no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN, IBqM, UFRJ).

Esfingosina (SP)

Os espectros de RMN de ¹H da SP de 12 μ M a 1000 μ M em tampão fosfato 10 mM, pH 7,2 em 100% D₂O são apresentados na Figura 28. Devido a complexidade do espectro, em função das diferentes formas de agregados da SP em água, somente puderam ser identificados os sinais dos hidrogênios H6 (1,92 ppm), H8 – 17 (1,29 ppm) e H18 (0,87 ppm).



Figura 28: Espectro de RMN de ¹H (800,40 MHz) da esfingosina em diversas concentrações, em 100% D2O, em tampão fosfato 10 mM em pH 7,2; a 25°C, com acumulações de 256 à 3500 e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,40 Hz.

A princípio, pode ser observado que a quantidade de sinais não varia muito nas diferentes concentrações. Como esperado, há sinais que diminuem de intensidade conforme a concentração diminui. Porém, foram observados sinais que aumentam de intensidade com a diminuição da concentração e sinais que aumentam de intensidade até uma determinada concentração e depois diminuem de intensidade até concentrações mais baixas. Este

comportamento é incomum para a maioria das substâncias, mas já foi relatado para substâncias que agregam⁶⁷.

Na região entre 2,6 – 0,7 ppm (Figura 29), observou-se que o sinal da metila (H18) em 0,87 ppm diminui de intensidade, alarga e se desloca conforme a concentração diminui. O sinal em 1,29 ppm, referente aos hidrogênios da cadeia carbônica (H8 – 17), também tem a sua intensidade diminuída. Porém, um dupleto, que está ao lado esquerdo do sinal dos hidrogênios H8 – 17, aumenta de intensidade conforme a diluição ocorre, esse dupleto acaba superando a intensidade do sinal dos hidrogênios da cadeia carbônica em concentrações mais baixas. Um tripleto em 1,19 ppm foi observado com maior intensidade a partir da concentração de 500 μ M e sua intensidade também aumenta com a diluição. Estes sinais indicam a presença de uma espécie de agregado que é mais favorecido a baixas concentrações.

Alguns sinais entre 2,55 e 2,10 ppm diminuem de intensidade logo na primeira diluição (500 μ M) ao ponto de não serem mais observados nas concentrações mais baixas. Nesta mesma concentração de 500 μ M, o sinal em 2,07 ppm apresenta uma maior intensidade e conforme a diluição ocorre a sua intensidade diminui. O sinal do H6 em 1,91 ppm não sofre nenhuma alteração, como já foi visto nos espectros em diferentes proporções de DMSO-*d6* e D₂O (Figura 20).



Figura 29: Expansão no espectro de RMN de ¹H (800,40 MHz) da esfingosina em diversas concentrações na região de 2,6 - 0,7 ppm, em 100% D2O, em tampão fosfato 10 mM em pH 7,2; a 25°C, com acumulações de 256 à 3500 e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,40 Hz.

Na região do espectro entre 4,0 – 2,2 ppm (Figura 30), foi observado um sinal em 3,08 ppm, que surge a 500 μ M, fica mais intenso a 200 μ M e diminui nas diluições seguintes. O sinal em 3,36 ppm tem um comportamento atípico para a diluição, aumentando de intensidade com as diluições. Na região entre 4,0 – 3,5 ppm são observados vários sinais que diminuem de intensidade com a diluição, mas apresentam variações na multiplicidade e são de difícil interpretação.



Figura 30: Expansão do espectro de RMN de ¹H (800,40 MHz) da esfingosina em diversas concentrações na região de 4,0 - 2,2 ppm, em 100% D2O, em tampão fosfato 10 mM em pH 7,2; a 25°C, com acumulações de 256 à 3500 e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,40 Hz.

Os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos da SP (H4 e H5) somente são observados a 12 μ M (Figura 31). Nesta concentração estão na região entre 6,30 – 5,83 ppm, enquanto no espectro em DMSO-*d6* estes sinais estão na região entre 5,54 – 5,44 ppm, apresentando assim um deslocamento considerável dos seus deslocamentos químicos. Esta variação em termos de deslocamento químico e alargamento dos sinais com o aumento da concentração mostra que estes hidrogênios são altamente influenciados durante o processo de agregação. O sinal em 8,45 ppm praticamente não sofre alterações de intensidade e nem de deslocamento químico, estando presente em todas as concentrações.



Figura 31: Expansão no espectro de RMN de ¹H (800,40 MHz) da esfingosina em diversas concentrações na região de 8,7 - 5,4 ppm, em 100% D2O, em tampão fosfato 10 mM em pH 7,2; a 25°C, com acumulações de 256 à 3500 e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,40 Hz.

Nos espectros de RMN de ¹H normalmente há uma diminuição da intensidade dos sinais com a diluição da amostra. Por isso, sugerimos que os sinais que são referentes aos agregados maiores da SP diminuem de intensidade com diluição. Contudo, foram observados sinais que aumentam de intensidade até uma determinada concentração e depois diminuem em concentrações mais baixas. Isto sugere que estes sinais sejam de agregados formados somente nas concentrações intermediárias, que desapareceriam com a diluição. Os sinais que aumentam de intensidade com a diluição são provavelmente de espécies de agregados menores, formados em baixas concentrações. O fato dos sinais referentes aos hidrogênios olefínicos somente terem sido observados a12 µM indica que há um aumento da concentração dos monômeros nesta concentração.

Esfingosina-1-fosfato (S1P)

Os espetros de RMN de ¹H da S1P em diferentes concentrações em tampão fosfato com 10 mM, pH 7,2 em 100% D₂O são apresentados na Figura 32.As diluições para a S1P foram realizadas nas mesmas condições da SP. Somente os sinais em 0,87 ppm (H18), 1,29 ppm (H8 – H17) e 1,9 ppm (H6) puderam ser identificados. Foi possível observar que alguns sinais diminuem de intensidade em concentrações menores. Porém, alguns sinais apresentaram irregularidades com as suas intensidades não seguindo uma linearidade de aumentar ou diminuir de intensidade conforme a diluição ocorre. Este comportamento é de certa forma incomum, porém também foi observado para alguns sinais da SP.



Figura 32: Espectro de RMN de ¹H (800,40 MHz) da esfingosina-1-fosfato em diversas concentrações, em 100% D2O e a 25°C, com acumulações de 256 à 3500 e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,40 Hz.

Na região entre 4,3 - 0,7 ppm (Figura 33) foi observado que o sinal do H6 (1,91 ppm) é mais intenso que a maioria dos outros sinais no espectro e quase não sofre alterações com a diluição. Os sinais em 1,17, 1,33, 2,07, 3,35, 3,66 e 4,10 ppm (Figura 33) diminuem na diluição de 1000 μ M a 200 μ M, aumentam nas concentrações de 100 e 50 μ M, especialmente na concentração de 100 μ M e nas diluições seguintes voltam a diminuir. O sinal em 2,73 ppm diminui coma diluição.



Figura 33: Expansão no espectro de RMN de 1H (800,40 MHz) da esfingosina em diversas concentrações na região de 4,2 - 0,8 ppm, em 100% D2O e a 25°C, com acumulações de 256 à 3500 e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,40 Hz.

Nos espectros de RMN de ¹H tanto para a SP quanto para S1P foram observados sinais que diminuem de intensidade com a diluição, outros que aumentam com a diluição e sinais que não mostram um padrão linear na variação de intensidade com a concentração. Os sinais que diminuem com a diluição, e que não são atribuídos aos monômeros, foram considerados como sinais referentes aos agregados grandes. Estes agregados grandes seriam mais abundantes nas amostras mais concentradas e menos abundantes com a diluição (Figura 34).

Os sinais que aumentam de intensidade até uma determinada concentração e diminuem nas concentrações mais baixas, foram atribuídos a espécies de agregados de tamanho intermediário. A formação destes agregados seria favorecida nas concentrações intermediárias. Com a diluição a quantidade dos agregados intermediários diminui, levando a uma diminuição da intensidade dos seus sinais (Figura 34).

Os sinais que aumentam de intensidade com a diluição, seriam referentes aos agregados menores e aos monômeros, mais favorecidos nas concentrações mais baixas. Por isso, os sinais referentes a esta espécie de agregados são mais intensos nas concentrações mais baixas. A Figura 34 representa no quadro (A) a presença de agregados grandes em altas concentrações. Após diluição, um aumento na concentração dos agregados de tamanho

intermediário, quadro (B). Em baixas concentrações, quadro (C), os agregados menores e os monômeros seriam os mais abundantes.



Figura 34: Representação dos diferentes tamanhos de agregados formados em diferentes concentrações de SP e S1P. No quadro (A) maior concentração dos agregados grandes, quadro (B) maior concentração de agregados de tamanho intermediário e no quadro (C) maior concentração de agregados pequenos e monômeros.

Apesar dos espectros de RMN de ¹H da SP e da S1P terem sido muito úteis para indicar a formação de agregados de tamanhos diferentes em diversas concentrações, não foi possível ter informações sobre o real tamanho destas partículas. Na tentativa de obter maiores informações sobre os tamanhos dos agregados, foram feitas medidas do diâmetro hidrodinâmico usando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

4.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

As medidas dos diâmetros hidrodinâmicos para a SP foram feitas no aparelho *Quase-Elastic Light Scattering* (QELS) no Laboratório de Agregação Protéica e Amiloidogênese (LAPA, IBqM, UFRJ). Estas medidas foram realizadas para averiguar a variabilidade dos tamanhos dos agregados em diversos valores de pH e em diferentes concentrações. As medidas foram realizadas em tampão fosfato 10 mM nos valores de pH 5,0; 7,2 e 10,0 e nas concentrações de 1 mM, 200 μ M, 25 μ M e 6 μ M (Figura 35).



Figura 35: Medidas dos diâmetros de agregados da esfingosina em tampão fosfato com os valores de pH 5, 7,2 e 10 e nas concentrações de 1000 μ M, 200 μ M, 25 μ M e 6 μ M.

Em pH 5,0, os diâmetros dos agregados são maiores em concentrações mais baixas e diminuem de tamanho em concentrações mais altas. Também foram observados agregados com menores diâmetros em todas as concentrações, mantendo essa regularidade em todas as concentrações. No pH 7,2, os agregados com diâmetros menores mantiveram regularidade em todas as concentrações. Os agregados com diâmetros intermediários foram observados nas concentrações mais baixas, com uma maior distribuição e diâmetros menores a 6 μ M. Os agregados grandes, apesar de terem sido detectados a 25 μ M, são observados em maior proporção na concentração mais alta (1000 μ M). Em pH 10,0, os agregados com diâmetros menores se mantiveram em todas as concentrações, enquanto os agregados de tamanho intermediário estão presentes nas concentrações mais baixas (25 μ M e 6 μ M). Os agregados com diâmetros maiores somente foram observados nas concentrações mais altas (1000 μ M).

Segundo Merrill *et al.*(1989)¹⁰⁰ a maioria dos esfingolipídios tem grupos doadores e receptores de ligações de hidrogênio, como é o caso da SP e da S1P. Assim, existe a possibilidade da formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Porém a protonação do meio em que esses esfingolipídios se encontram faz com que em pH ácido o grupo amino se encontre protonado (NH₃⁺) influenciando as ligações de hidrogênio e fazendo com que prevaleça mais as ligações intramoleculares. Já em pH básico esse grupo amino se encontra desprotonado (NH₂) fazendo com que as ligações de hidrogênios intermoleculares prevaleçam. Com isso, as ligações de hidrogênio intermoleculares estabilizam agregados cada vez maiores, como mostrado na Figura 36. Fato esse que também foi demonstrado por Sasaki *et al.*(2009)⁸⁹. Os valores dos diâmetros dos agregados da SP (Figura 35) são condizentes com as propostas feitas na literatura, confirmando que em pH básico a SP forma agregados maiores, que são estabilizados por ligações de hidrogênio intermoleculares.



Figura 36: Representação da esfingosina formando ligações de hidrogênio. A: Esfingosina protonada, B: Ligações de hidrogênio intramolecular, mais favorecida em pH ácido, C: Ligação de hidrogênio intermolecular, mais favorecida em pH básico,que estabilizam agregados maiores.

Para uma melhor compreensão de como essas ligações de hidrogênio são formadas na SP, foram realizados cálculos teóricos com a SP.

4.3 CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos teóricos foram realizados com dímeros do modelo simplificado da SP, que foram desenhados com a cadeia truncada até o carbono 7, abrangendo toda a cabeça polar e a ligação dupla (Figura 37). Este estudo teve como finalidade investigar como as ligações de hidrogênio envolvidas em interações intermoleculares e interações intramoleculares ocorrem na SP neutra e protonada. Desta forma pode-se correlacionar com os valores de entalpia adquiridos e compreender como o pH pode influenciar cada formação.



Figura 37: Representação dos átomos da esfingosina utilizados nos cálculos teóricos.

Para a SP na forma neutra foi realizada a análise conformacional dos dímeros e foram geradas centenas de geometrias possíveis. Apenas três geometrias dos dímeros foram selecionadas, sendo escolhidas as com maior similaridade às micelas e de menor energia. Estas três geometrias (3, 9 e 10) estão representadas na Figura38. A partir destas 3 representação foi feito o cálculo quântico semiempírico para obtenção das suas respectivas entalpias.

Na Tabela 5 são dados os valores da entalpia de interação (ΔH_{int}), calculada como diferença de entalpia entre os monômeros e os dímeros.

SP	ΔH / Kcal.mol ⁻¹
Geometria 3	-65,61
Geometria 9	-31,69
Geometria 10	-38,43

Tabela 5: Valores da entalpia de interação dos dímeros da SP neutra para as três geometrias com menores energias e com maior similaridade às micelas.

As geometrias mais estáveis são aquelas que apresentam ΔH_{int} mais negativos, o que contribui mais favoravelmente para a energia livre na formação das micelas. A geometria 3 foi a que apresentou menor valor relativo de ΔH_{int} . Esta geometria também foi a que apresentou maior número de interações por ligação de hidrogênio (Figura 38) dentre todas as geometrias, sendo a de maior estabilidade.



Figura 38: Representação das interações por ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular nos geometrias selecionados para análise da SP neutra.

A geometria 3 foi a que apresentou maior número de interações por ligação de hidrogênio. As ligações de hidrogênio intramoleculares ocorreram entre o hidrogênio da hidroxila na posição 1 e o oxigênio da hidroxila na posição 3. As ligações de hidrogênio intermoleculares ocorreram entre o hidrogênio da hidroxila na posição 3 e o nitrogênio, todas com distância de 1,9 Å.

Na geometria 9 somente duas ligações de hidrogênio intermoleculares foram observadas, não apresentando interações intramoleculares. Uma das ligações de hidrogênio intermoleculares ocorreu entre o hidrogênio da hidroxila na posição 1 e o nitrogênio, e a outra ocorreu entre o hidrogênio da hidroxila na posição 1 (do outro monômero) e o oxigênio da hidroxila na posição 3. As duas ligações de hidrogênio têm distância de 1,8 Å.

Na geometria 10 foram observadas três ligações de hidrogênio, sendo duas intramoleculares e uma intermolecular. A ligação de hidrogênio intermolecular ocorreu entre o hidrogênio da hidroxila na posição 3 e o oxigênio na posição 1 do outro monômero. Uma das duas ligações de hidrogênio intramoleculares ocorreu entre as hidroxilas, sendo formada

entre o hidrogênio da hidroxila na posição 1 e o oxigênio da hidroxila na posição 3. A outra ligação de hidrogênio intramolecular ocorre entre o hidrogênio da hidroxila na posição 3 o nitrogênio a uma distância de 2,5 Å. Esta ligação de hidrogênio foi a que apresentou maior distância da ligação.

A SP apresenta grupos doadores e receptores para as ligações de hidrogênio na sua molécula viabilizando muitas possibilidades de interações tanto intramolecular como intermolecular. As ligações de hidrogênio oferecem uma maior estabilidade na formação dos dímeros e, consequentemente, das micelas.

Para a SP protonada foram destacadas duas geometrias de dímeros com maior similaridade a formação de micelas e de menor energia. Estas geometrias foram a 9P e 10P (Figura 39). A geometria 9P apresentou três ligações de hidrogênio intermoleculares e nenhuma intramolecular. As três ligações de hidrogênio intermoleculares ocorrem entre os hidrogênios do grupo amônio e os oxigênios da hidroxila do outro monômero. Duas interações envolvem dois hidrogênios do grupo amônio e os oxigênios do monômero vizinho a uma distância de 1,9 Å e a terceira interaçõe envolve o outro amônio e oxigênio da hidroxila vizinha, a uma distância de 1,8 Å.

A geometria 10P apresentou uma ligação de hidrogênio intramolecular entre as hidroxilas com uma distância de 1,8 Å e uma ligação de hidrogênio intermolecular entre o hidrogênio do grupo amônio e o oxigênio da hidroxila na posição 1, com uma distância de 1,9 Å.



Figura 39: Representação das Ligações de Hidrogênio intermolecular e intramolecular nos confôrmeros mais estáveis da SP protonada. Os dois confôrmeros foram simulados a partir de cálculos teóricos de modelagem molecular.

Na tabela 6 os valores da variação de entalpia ΔH_{int} para as geometrias selecionadas da série protonada são apresentados.

Tabela 6: Valores da entalpia de interação dos dímeros da SP protonada para as três geometrias com menores energias e com maior similaridade às micelas.

SP (protonada)	ΔH / Kcal.mol ⁻¹
Geometria 9P	109,8
Geometria 10P	25,71

A entalpia para os dímeros da SP protonada é maior comparada com a entalpia dos dímeros da SP neutra. Pelos cálculos realizados, os dímeros da SP protonada foram o que apresentaram menor estabilidade o que pode ser correlacionado com o fato de que em valores de pH ácido os raios das micelas são finitos. Já em pH básico ou neutro, a SP na forma neutra é a espécie mais abundante, o que permite a formação de micelas de tamanhos maiores. Estas observações estão de acordo com a descrição de Sasaki e colaboradores,⁸⁹ de que em pH básico a formação das micelas apresentam raio hidrodinâmico infinito e com os dados obtidos por RMN e DLS neste trabalho.

Os cálculos teóricos realizados com os dímeros da SP foram somente o início, devendo ser feito um estudo mais detalhado de dinâmica molecular do agregado completo da SP e da S1P. Apesar de algumas geometrias apresentarem grande estabilidade, as outras geometrias não devem ser descartadas, pois apesar de não apresentarem grande estabilidade como dímeros, podem formar outras interações intermoleculares e terem sua estabilidade aumentada na forma de agregado.

CONCLUSÕES

Na SP e na S1P as interações moleculares são influenciadas fortemente pela protonação do meio em que se encontram. O pH influencia a agregação alterando a protonação do grupo amino, levando ao favorecimento de ligações intramoleculares quando o grupo amino está protonado (pH ácido) e ao favorecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares quando o grupo amino está desprotonado (pH básico). As interações de ligações de hidrogênio intermoleculares estabilizam os agregados cada vez maiores, sendo formados grandes agregados em pH básico.

Através das análises dos espectros de RMN de ¹H da SP e da S1P, em diferentes pHs e concentrações, foi possível identificara formação de agregados de diversos tamanhos em diferentes concentrações,mostrando assim a complexidade e diversidade dos agregados da SP e da S1P.

As análises por DLS para a SP permitiram comprovar a formação de agregados de diferentes tamanhos em uma mesma condição (pH e concentração). Os tamanhos dos agregados de SP formados em solução aquosa depende diretamente do pH e da concentração. Em pH 5,0 os diâmetros dos agregados são maiores em concentrações baixas. Em pH 7,2 os diâmetros dos agregados são maiores em concentrações mais altas e há agregados com diâmetros intermediários em concentrações mais baixas e em pH 10,0os agregados de tamanho intermediário estão presentes nas concentrações mais baixas (25 μ M e 6 μ M) e os agregados com diâmetros maiores somente foram observados nas concentrações mais altas (1000 μ M e 200 μ M). Os agregados pequenos estão presentes em todos os valores e pH e concentração avaliados.

As entalpias calculadas para os dímeros da SP nas formas protonada e neutra indicam que a forma protonada é a de menor estabilidade, corroborando as observações anteriores em pH básico ou neutro, onde ocorre a formação de micelas de SP de tamanhos maiores.

REFERÊNCIAS

- ¹ FURUYA, H.; SHIMIZU, Y.; KAWAMORI, T. Sphingolipids in cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 30, n. 3-4, p. 567-576, 2011.
- ² SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 6, p. 403-415, 2011.
- ³ PYNE, N.; PYNE, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 7, p. 489-503, 2010.
- ⁴ NISHI, T.; KOBAYASHI, N.; HISANO, Y.; KAWAHARA, A.; YAMAGUCHI, A. Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1841, n. 5, p. 759-765, 2014.
- ⁵ CAMERER, E.; REGARD, J.; CORNELISSEN, I.; SRINIVASAN, Y.; DUONG, D.; PALMER, D.; PHAM, T.; WONG, J.; PAPPU, R.; COUGHLIN, S. Sphingosine-1phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 7, p. 1871-1879, 2009.
- ⁶ GUO, Y.; SINGLETON, P.; ROWSHAN, A.; GUCEK, M.; COLE, R.; GRAHAM, D.; VAN EYK, J.; GARCIA, J. Quantitative proteomics analysis of human endothelial cell membrane rafts: evidence of MARCKS and MRP regulation in the sphingosine 1-phosphate-induced barrier enhancement. **Molecular & cellular proteomics**: MCP, v. 6, n. 4, p. 689-696, 2007.
- ⁷ MERRILL, A. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 29, p. 25843-25846, 2002.
- ⁸ LEHNINGER, A. L. Lehninger Principles of Biochestry. 3ed. Nova Iorque: W.H. Freeman and Company, 2002, 1009p.
- ⁹ MARKHAM, J.; LYNCH, D.; NAPIER, J.; DUNN, T.; CAHOON, E. Plant sphingolipids: function follows form. **Current opinion in plant biology**, v.16, n. 3, p. 350-357, 2013.
- ¹⁰ LYNCH, D. V.; DUNN, T. M. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. **New Phytologist**, v. 161, n. 3, p. 677-702, 2004.
- ¹¹ SPIEGEL, S.; MERRILL, A. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. **FASEB journal**: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 10, n. 12, p. 1388-1397, 1996.
- ¹² WARNECKE, D.; HEINZ, E. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. **Cellular and molecular life sciences**: CMLS, v. 60, n. 5, p. 919-941, 2003.

- ¹³ DICKSON, R.; LESTER, R. Sphingolipid functions in Saccharomyces cerevisiae. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1583, n. 1, p. 13-25, 2002.
- ¹⁴ BREATHNACH, C. S. Johann Ludwig Wilhelm Thudichum 1829-1901, bane of the Protagonisers. **History of Psychiatry**, v. 12, 2001.
- ¹⁵ PATA, M.; HANNUN, Y.; NG, C. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. **The New phytologist**, v. 185, n. 3, p. 611-630, 2010.
- ¹⁶ SPASSIEVA, S.; HILLE, J. Plant Sphingolipids Today-Are They Still Enigmatic? **Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 125-136, 2003.
- ¹⁷ CARTER, H. E.; GLICK, F. J.; NORRIS, W. P.; PHILLIPS, G. E. The structure of sphingosine. Journal of Biological Chemistry, v. 142, n. 1, p. 449-450, 1942.
- ¹⁸ CHESTER, M. A. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997. European Journal of Biochemistry, v. 257, 1998.
- ¹⁹ CHEN, D.-Z.; XIONG, H.-B.; TIAN, K.; GUO, J.-M.; HUANG, X.-Z.; JIANG, Z.-Y. Two New Sphingolipids from the Leaves of Piper betle L. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 18, n. 9, p. 11241-11249, 2013.
- ²⁰ STEWART, M.; DOWNING, D. Free sphingosines of human skin include 6hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines. The Journal of investigative dermatology, v. 105, n. 4, p. 613-618, 1995.
- ²¹ _____. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. Journal of lipid research, v. 40, n. 8, p. 1434-1439, 1999.
- SONNINO, S.; CHIGORNO, V. Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures.
 Biochimica et biophysica acta, v. 1469, n. 2, p. 63-77, 2000.
- ²³ PANGANAMALA, R.; GEER, J.; CORNWELL, D. Long-chain bases in the sphingolipids of atherosclerotic human aorta. Journal of lipid research, v. 10, n. 4, p. 445-455, 1969.
- ²⁴ JIONG, C.; HOE-SUP, B.; ROBERT, B. First Asymmetric Synthesis of 6-Hydroxy-4-Sphingenine-Containing Ceramides. Use of Chiral Propargylic Alcohols To Prepare a Lipid Found in Human Skin. The Journal of Organic Chemistry, v. 68, n. 2, p. 348-354, 2003.
- ²⁵ H. KADOWAKI, E. G. B., J. E. EVANS, F. B. JUNGALWALA, AND R. H. MCCLUER. Acetonitrile-hydrochloric acid hydrolysis of gangliosides for high performance liquid chromatographic analysis of their long chain bases. Journal of Lipid Research, v. 24, p. 1389-1397, 1983.

- ²⁶ MORRISON, W. Long-chain bases in the sphingolipids of bovine milk and kidney, rumen bacteria, rumen protozoa, hay and concentrate. **Biochimica et biophysica acta**, v. 316, n. 1, p. 98-107, 1973.
- ²⁷ WIEGANDT, H. Insect glycolipids.**Biochimica et biophysica acta**, v. 1123, p. 117-126, 1992.
- ²⁸ FYRST, H. Characterization of free endogenous C14 and C16 sphingoid bases from Drosophila melanogaster. **The Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 1, p. 54-62, 2003.
- ²⁹ CHITWOOD, D.; LUSBY, W.; THOMPSON, M.; KOCHANSKY, J.; HOWARTH, O. The glycosylceramides of the nematode Caenorhabditis elegans contain an unusual, branched-chain sphingoid base. Lipids, v. 30, n. 6, p. 567-573, 1995.
- ³⁰ GERDT, S.; DENNIS, R.; BORGONIE..., G. Isolation, characterization and immunolocalization of phosphorylcholine-substituted glycolipids in developmental stages of Caenorhabditis elegans. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 3, p. 952-963, 1999.
- ³¹ WUHRER, M.; RICKHOFF, S.; DENNIS, R.; LOCHNIT, G.; SOBOSLAY..., P. Phosphocholine-containing, zwitterionic glycosphingolipids of adult Onchocerca volvulus as highly conserved antigenic structures of parasitic nematodes. **Biochem. J**, v. 348, n. 2, p. 417-423, 2000.
- ³² GÜNTER LOCHNIT, S. N., ROGER D.DENNIS AND RUDOLF GEYER. Structural analysis and immunohistochemical localization of two acidic glycosphingolipids from the porcine, parasitic nematode, Ascaris suum. **Glycobiology**, v. 8, n. 9, p. 891-899, 1998.
- ³³ ASAI, N.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Sex pheromones of the hair crab Erimacrus isenbeckii. II. Synthesis of ceramides. **Journal of natural products**, v. 64, n. 9, p. 1210-1215, 2001.
- ³⁴ SPERLING, P.; HEINZ, E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1632, n. 1-3, p. 1-15, 2003.
- ³⁵ BARRETO-BERGTER, E.; PINTO, M.; RODRIGUES, M. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 1, p. 67-84, 2004.
- ³⁶ QI, J.; OJIKA, M.; SAKAGAMI, Y. Neuritogenic cerebrosides from an edible Chinese mushroom. Part 2: Structures of two additional termitomycesphins and activity enhancement of an inactive. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 9, n. 8, p. 2171-2177, 2001.
- ³⁷ PRUETT, S.; BUSHNEV, A.; HAGEDORN, K.; ADIGA, M.; HAYNES, C.; SULLARDS, M.; LIOTTA, D.; MERRILL, A. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 8, p. 1621-1639, 2008.

- ³⁸ HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Many Ceramides. Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 32, p. 27855-27862, 2011.
- ³⁹ HOLLAND, W.; MILLER, R.; WANG, Z.; SUN, K.; BARTH, B.; BUI, H.; DAVIS, K.; BIKMAN, B.; HALBERG, N.; RUTKOWSKI, J.; WADE, M.; TENORIO, V.; KUO, M.-S.; BROZINICK, J.; ZHANG, B.; BIRNBAUM, M.; SUMMERS, S.; SCHERER, P. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. Nature medicine, v. 17, n. 1, p. 55-63, 2011.
- ⁴⁰ NIXON, G. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 982-993, 2009.
- ⁴¹ HUANG, W.-C.; CHEN, C.-L.; LIN, Y.-S.; LIN, C.-F. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. **Journal of lipids**, v. 2011, p. 565316, 2011.
- ⁴² MODRAK, D.; GOLD, D.; GOLDENBERG, D. Sphingolipid targets in cancer therapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 200-208, 2006.
- ⁴³ LI, X.; BECKER, K.; ZHANG, Y. Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. **Cellular physiology and biochemistry**: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, v. 26, n. 1, p. 41-48, 2010.
- ⁴⁴ STANCEVIC, B.; KOLESNICK, R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. **FEBS letters**, v. 584, n. 9, p. 1728-1740, 2010.
- ⁴⁵ SPERLING, P. A Sphingolipid Desaturase from Higher Plants. IDENTIFICATION OF A NEW CYTOCHROME b5 FUSION PROTEIN. Journal of Biological Chemistry, v. 273, p. 28590-28596, 1998.
- ⁴⁶ CHEN, M.; MARKHAM, J.; DIETRICH, C.; JAWORSKI, J.; CAHOON, E. Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 20, n. 7, p. 1862-1878, 2008.
- ⁴⁷ CHEN, M.; MARKHAM, J.; CAHOON, E. Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. **The Plant journal**: for cell and molecular biology, v. 69, n. 5, p. 769-781, 2012.
- ⁴⁸ ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and Surface Forces. 3ed. United States of America: Elsevier Inc., 2011, 674p
- ⁴⁹ SHAW, D. J. **Colloid & Surface Chemistry**. Oxford:Reed Education and Professional Publishing Ltd, 1992, 306p
- ⁵⁰ PALMER, A. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. **Chemical reviews**, v. 104, n. 8, p. 3623-3640, 2004.

- ⁵¹ PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introduction to Spectroscopy. 3ed. United States of America: Thomsson Learning, 2001, 680p.
- ⁵² BREITMAIER, E. Structure Elucidations by NMR in Oganic Chemistry. 3ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2002, 267p.
- ⁵³ KEELER, J. Understanding NMR Spectroscopy. 1ed. University of Cambridge, Department of Chemistry, 2002, 211p.
- ⁵⁴ ANDRE, J. S. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, n. 13, p. 72-82, 2002.
- ⁵⁵ YORAM, C.; LIAT, A.; LIMOR, F. Diffusion NMR Spectroscopy in Supramolecular and Combinatorial Chemistry: An Old Parameter?New Insights. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 4, p. 520-554, 2005.
- ⁵⁶ IVAN, K.; PAUL, G. W. Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY) of THF Solvated n -Butyllithium Aggregates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, 2000.
- ⁵⁷ WUTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids**.England: John Wiley & Sons INC, 1986. 320p.
- ⁵⁸ ANDO, S.; ANDO, I.; SHOJI, A.; OZAKI, T. Intermolecular hydrogen-bonding effect on carbon-13 NMR chemical shifts of glycine residue carbonyl carbons of peptides in the solid state. Journal of the American Chemical Society, v. 110, n. 11, p. 3380-3386, 1988.
- ⁵⁹ RONG, Z.; WEI, Z.; WEN-RONG, C.; WEN-JUAN, W. Studies on the Structures and Hydrogen-bonding Interactions in Aqueous Glycine Solutions Using All-atom Molecular Dynamics Simulations and NMR Chinese J. Struct. Chem., v. 33, n. 1, p. 7, 2013.
- ⁶⁰ AFONIN, A.; USHAKOV, I.; VASHCHENKO, A.; SIMONENKO, D.; IVANOV, A.; VASIL'TSOV, A.; MIKHALEVA, A. B.; TROFIMOV, B. C-H...N and C-H...O intramolecular hydrogen bonding effects in the 1H, 13C and 15N NMR spectra of the configurational isomers of 1-vinylpyrrole-2-carbaldehyde oxime substantiated by DFT calculations. **Magnetic resonance in chemistry**: MRC, v. 47, n. 2, p. 105-112, 2009.
- ⁶¹ ANDERSON, C. E.; PICKRELL, A. J.; SPERRY, S. L.; THOMAS E. VASQUEZ, J.; CUSTER, T. G.; FIERMAN, M. B.; LAZAR, D. C.; BROWN, Z. W.; ISKENDERIAN, W. S.; HICKSTEIN, D. D.; O'LEARY, D. J. NMR detection of intramolecular OH/OH hydrogen bond networks: an approach using isotopic perturbation and hydrogen bond mediated OH... OH J-coupling. HETEROCYCLES, v. 72, p. 469 - 495, 2007.
- ⁶² NGOUNOU WETIE, A.; SOKOLOWSKA, I.; WOODS, A.; ROY, U.; DEINHARDT, K.; DARIE, C. Protein-protein interactions: switch from classical

methods to proteomics and bioinformatics-based approaches. Cellular and molecular life sciences: CMLS, v. 71, n. 2, p. 205-228, 2014.

- ⁶³ KAPTEIN, R. NMR studies on protein-nucleic acid interaction. Journal of biomolecular NMR, v. 56, n. 1, p. 1-2, 2013.
- ⁶⁴ VIÉVILLE, J.; CHARBONNIER, S.; EBERLING, P.; STARCK, J. P.; DELSUC, M.
 A. A new NMR technique to probe protein-ligand interaction. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 89, p. 18-23, 2014.
- ⁶⁵ MCGOVERN, S.; CASELLI, E.; GRIGORIEFF, N.; SHOICHET, B. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1712-1722, 2002.
- ⁶⁶ FENG, B.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; BABAOGLU, K.; INGLESE, J.; SHOICHET, B.; AUSTIN, C. A high-throughput screen for aggregation-based inhibition in a large compound library. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2385-2390, 2007.
- ⁶⁷ LAPLANTE, S.; CARSON, R.; GILLARD, J.; AUBRY, N.; COULOMBE, R.; BORDELEAU, S.; BONNEAU, P.; LITTLE, M.; O'MEARA, J.; BEAULIEU, P. Compound aggregation in drug discovery: implementing a practical NMR assay for medicinal chemists. Journal of medicinal chemistry, v. 56, n. 12, p. 5142-5150, 2013.
- ⁶⁸ STEJSKAL, E. O.; TANNER, J. E. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. The Journal of Chemical Physics, v. 42, 1965.
- ⁶⁹ KEVIN, F. M.; CHARLES, S. J. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 8, p. 3139-3141, 1992.
- ⁷⁰ DONGHUI, W.; AIDI, C.; CHARLES S. JOHNSON, JR. Three-Dimensional Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy: The Homonuclear COSY–DOSY Experiment. Journal of Magnetic Resonance, Series A, v. 121, n. 1, p. 88-91, 1996.
- ⁷¹ NILSSON, M.; GIL, A.; DELGADILLO, I.; MORRIS, G. Improving pulse sequences for 3D DOSY: COSY-IDOSY. Chemical communications (Cambridge, England), n. 13, p. 1737-1739, 2005.
- ⁷² LUCAS, L.; OTTO, W.; LARIVE, C. The 2D- J-DOSY Experiment: Resolving Diffusion Coefficients in Mixtures. Journal of Magnetic Resonance, v. 156, n. 1, p. 138-145, 2002.
- ⁷³ NILSSON, M.; GIL, A.; DELGADILLO, I.; MORRIS, G. Improving pulse sequences for 3D diffusion-ordered NMR spectroscopy: 2DJ-IDOSY. Analytical chemistry, v. 76, n. 18, p. 5418-5422, 2004.

- ⁷⁴ BARJAT; MORRIS; SWANSON. A three-dimensional DOSY-HMQC experiment for the high-resolution analysis of complex mixtures. Journal of magnetic resonance, v. 131, n. 1, p. 131-138, 1998.
- ⁷⁵ STCHEDROFF, M.; KENWRIGHT, A.; MORRIS, G.; NILSSON, M.; HARRIS, R.
 2D and 3D DOSY methods for studying mixtures of oligomeric dimethylsiloxanes.
 Physical Chemistry, v. 6, p. 3221-3227, 2004.
- ⁷⁶ DONGHUI, W.; AIDI, C.; CHARLES S. JOHNSON, JR. Heteronuclear-Detected Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy through Coherence Transfer. Journal of Magnetic Resonance, Series A, v. 123, n. 2, p. 215-218, 1996.
- ⁷⁷ NILSSON, M.; MORRIS, G. Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered 1H spectra without multiplet structure. Chemical communications (Cambridge, England), n. 9, p. 933-935, 2007.
- ⁷⁸ COLBOURNE, A.; MEIER, S.; MORRIS, G.; NILSSON, M. Unmixing the NMR spectra of similar species vive la différence. **Chemical communications** (Cambridge, England), v. 49, p. 10510-10512, 2013.
- ⁷⁹ NILSSON, M. The DOSY Toolbox: a new tool for processing PFG NMR diffusion data. **Journal of magnetic resonance**, v. 200, n. 2, p. 296-302, 2009.
- ⁸⁰ LI, D.; KERESZTES, I.; HOPSON, R.; WILLIARD, P. Characterization of reactive intermediates by multinuclear diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY). Accounts of chemical research, v. 42, n. 2, p. 270-280, 2009.
- ⁸¹ MACCHIONI, A.; CIANCALEONI, G.; ZUCCACCIA, C.; ZUCCACCIA, D. Determining accurate molecular sizes in solution through NMR diffusion spectroscopy. **Chemical Society reviews**, v. 37, n. 3, p. 479-489, 2008.
- ⁸² PREGOSIN, P. NMR diffusion: an update. Acta crystallographic. Section C, Crystal structure communications, v. 69, n. 12, p. 1433-1436, 2013.
- ⁸³ COLBOURNE, A.; MORRIS, G.; NILSSON, M. Local covariance order diffusionordered spectroscopy: a powerful tool for mixture analysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 20, p. 7640-7643, 2011.
- ⁸⁴ ZETASIZER, N. S. **Zetasizer Nano user manual**. England: Malvern Instruments Ltd 2003, 67p.
- ⁸⁵ PECORA, R. **Dynamic Light Scattering:** Applications of photon correlation spectroscopy. Nova Iorque: Plenum, 1985, 255p.
- ⁸⁶ NOBBMANN, U.; CONNAH, M.; FISH, B.; VARLEY, P.; GEE, C.; MULOT, S.; CHEN, J.; ZHOU, L.; LU, Y.; SHEN, F.; YI, J.; HARDING, S. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 24, p. 117-128, 2007.

- ⁸⁷ SCHURR, J. M. Dynamic Light Scattering studies of biopolymers: Effects of charge, shape and flexibility. **Annual Reviews Physic Chemistry**, v. 37, p. 271 305, 1986.
- ⁸⁸ LIM, J.; YEAP, S.; CHE, H.; LOW, S. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 381, 2013.
- ⁸⁹ SASAKI, H.; ARAI, H.; COCCO, M.; WHITE, S. pH dependence of sphingosine aggregation. **Biophysical journal**, v. 96, n. 7, p. 2727-2733, 2009.
- ⁹⁰ GARCÍA-BARROS, M.; COANT, N.; TRUMAN, J.-P.; SNIDER, A.; HANNUN, Y. Sphingolipids in colon cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1841, n. 5, p. 773-782, 2013.
- ⁹¹ KUNKEL, G.; MACEYKA, M.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 9, p. 688-702, 2013.
- ⁹² RIVERA, J.; PROIA, R.; OLIVERA, A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 10, p. 753-763, 2008.
- ⁹³ MORALES-SERNA, J.; LLAVERIA, J.; DÍAZ, Y.; MATHEU, M.; CASTILLÓN, S. Asymmetric sulfur ylide based enantioselective synthesis of D-erythro-sphingosine. Organic & biomolecular chemistry, v. 6, n. 24, p. 4502-4504, 2008.
- ⁹⁴ FOSSETTA, J.; DENO, G.; GONSIOREK, W.; FAN, X.; LAVEY, B.; DAS, P.; LUNN, C.; ZAVODNY, P.; LUNDELL, D.; HIPKIN, R. Pharmacological characterization of human S1P4 using a novel radioligand, [4,5-3H]dihydrosphingosine-1-phosphate. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 5, p. 851-860, 2004.
- ⁹⁵ LI, S.; WILSON, W. K.; SCHROEPFER, G. J. New methods for determining the enantiomeric purity of erythro-sphingosine. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 4, p. 764-772, 1999.
- ⁹⁶ HOLZ, M.; MAO, X.-A.; SEIFERLING, D.; SACCO, A. Experimental study of dynamic isotope effects in molecular liquids: Detection of translation-rotation coupling. **Chemical Physics**, v. 104, n. 2, p. 669-679, 1996.
- ⁹⁷ EVANS, R.; DENG, Z.; ROGERSON, A.; MCLACHLAN, A.; RICHARDS, J.; NILSSON, M.; MORRIS, G. Quantitative interpretation of diffusion-ordered NMR spectra: can we rationalize small molecule diffusion coefficients? **Angewandte Chemie**, v. 52, n. 11, p. 3199-3202, 2013.
- ⁹⁸ GOÑI, F.; ALONSO, A. Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1758, n. 12, p. 1902-1921, 2006.
- ⁹⁹ LÓPEZ-GARCÍA, F.; MICOL, V.; VILLALAÍN, J.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. Interaction of sphingosine and stearylamine with phosphatidylserine as studied by DSC and NMR. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1153, n. 1, p. 1-8, 1993.
- ¹⁰⁰ MERRILL, A.; NIMKAR, S.; MENALDINO, D.; HANNUN, Y.; LOOMIS, C.; BELL, R.; TYAGI, S.; LAMBETH, J.; STEVENS, V.; HUNTER, R. Structural requirements for long-chain (sphingoid) base inhibition of protein kinase C in vitro and for the cellular effects of these compounds. **Biochemistry**, v. 28, n. 8, p. 3138-3145, 1989.





Anexo 1:Espectro de RMN de ¹H (499,79 MHz) da esfingosina em $CDCl_3$, concentração de 2,17 mM, temperatura 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 1,50 Hz.



Anexo 2:Espectro de RMN de ¹H (499,79 MHz) da esfingosina em D₂O, concentração de 1 mM, tampão fosfato 10 mM pH 7,2, a 25°C, com 256 acumulações e 16384 pontos. Processamento com apodização exponencial (lb) de 2,30 Hz.



Anexo 3: Espectro DOSY da esfingosina 2,17 mM em 100% DMSO-*d6*. Processado no programa DOSYtoolbox com o processamento LOCODOSY.



Anexo 4: Espectro DOSY da esfingosina 1,97 mM em 90% DMSO-d:10% D₂O. Processado no programa DOSYtoolbox com o processamento LOCODOSY.



Anexo 5: Espectro DOSY da esfingosina 1,81 mM em 80% DMSO-d6:20% D₂O. Processado no programa DOSYtoolbox com o processamento LOCODOSY.



Anexo 6: Espectro DOSY da esfingosina 1,67 mM em 70% DMSO-d6:30% D₂O. Processado no programa DOSYtoolbox com o processamento LOCODOSY.



Anexo 7: Espectro DOSY da esfingosina 1,55 mM em60% DMSO-*d6*:40% D₂O. Processado no programa DOSYtoolbox com o processamento LOCODOSY.



Anexo 8:Sobreposição dos espectros de ¹H da esfingosina em pH 5,0; 10% D_2O (roxo) e em 100% D_2O (verde).



Anexo 9:Sobreposição dos espectros de ¹H da esfingosina em pH 7,2; 10% D_2O (roxo) e em 100% D_2O (verde).



8.6 8.4 8.2 8.0 7.8 7.6 7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 4.4 4.2 4.0 3.8 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 0.8 f1 (ppm)

Anexo 10:Sobreposição dos espectros de ¹H da esfingosina em pH 10,0; 10% D_2O (roxo) e em 100% D_2O (verde).



Anexo 11:Sobreposição dos espectros de RMN de¹H da esfingosina-1-fosfato em pH 5,0; 100% D_2O e com a sequência de pulso de pré-saturação (roxo) e *WATERGATE soft pulse* (verde).



Anexo 12: Espectro gCOSY 1 H: 1 H da esfingosina-1-fosfato 2,17 mM em tampão fosfato pH 7,2 e em 100% D₂O. Com 256 acumulações, a 25 °C.