

## 5

### Materiais e Métodos

#### 5.1

##### Materiais

##### Reagentes

Dibucaína (Dib), tetracaína (TTC), norfloxacin (NF) e levofloxacin (Lev) foram obtidas de Sigma e utilizadas sem purificação. Os complexos de NF e Lev com ouro (AuNF e AUNor) foram sintetizados no Lab. da Prof. Leticia Teixeira (Lachter et al.).

Foram utilizados os seguintes tampões:

- Tampão universal (borato, citrato, fosfato 0.067 M em Na) foi preparado a partir de uma solução estoque de 100 ml contendo 34.4 ml de Na OH 1N, volumes de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1N e de ácido cítrico 1N padronizados para 10 ml da solução de NaOH 1N e, finalmente, 354 g de ácido bórico (Louro et. al., 1994). O pH do tampão era ajustado adicionando-se alíquotas de HCl 1M à solução estoque previamente diluída.

- Tampão Tris 30 mM, pH 7.4. O pH era ajustado com pequenas quantidades de soluções concentradas de HCl.

Água Milli-Q foi utilizada em todas as preparações. Soluções estoques concentradas dos anestésicos foram preparadas em etanol. Amostras de Dib e TTC para fluorescência foram preparadas no tampão indicado, na concentração de 10 µM. Nos experimentos de associação a membranas foi utilizado tampão tris (pH 7.4) e as amostras de Dib e TTC na concentração de 10 µM foram tituladas com membrana em concentrações crescentes (de 20 a 500 µg/ml).

Soluções estoques concentradas dos antibióticos e seus complexos com ouro foram preparadas em solvente orgânico DMSO. Amostras de NF, AuNF, Lev e AuLev para fluorescência foram preparadas em tampão universal na concentração de 6 e 7 µM.

## **A Proteína Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase**

Membranas contendo Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foram preparadas no Instituto de Bioquímica Médica do laboratório LERPA – estrutura e regulação de proteínas e ATPases - Universidade Federal do Rio de Janeiro, a partir de rim de porco, conforme procedimento descrito em (Cortes et al, 2006, Jorgensen, 1974, Jensen, 1984) e gentilmente cedidas pelo Prof. Carlos Frederico Fontes. A suspensão estoque de membranas com concentração de 10 mg/ml em proteína e atividade aproximada de 4  $\mu\text{M Pi mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , foi separada em alíquotas de 40  $\mu\text{l}$  e armazenada em freezer a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir de alíquotas descongeladas no mesmo dia do experimento, amostras com diferentes concentrações de proteína foram preparadas, adicionadas diretamente em cubetas de quartzo para a realização das medidas.

## **5.2**

### **Equipamentos**

#### **pHmetro**

Para medidas de pH foi utilizado o pHmetro Cole-Parmer Chemcadet 5986-25, com um eletrodo semimicro combinado Ag/AgCl.

#### **Espectrofotômetro**

Espectros de absorção ótica na faixa de 220–800 nm foram obtidos em temperature ambiente ( $25^{\circ}\text{ C}$ ) com um espectrofotômetro de diodo HP 8452A.

#### **Espectrofluorímetro estacionário**

As medidas de fluorescência foram feitas no sistema de Fluorescência PTIQM-1 equipado com controlador de temperatura, operando majoritariamente com todas as fendas em 4 nm e potência de lâmpada de 40 W. A taxa de varredura utilizada foi de 1 nm/seg. Todas as medidas foram realizadas com concentrações e comprimentos de onda de excitação em valores de absorbância menor que 0,1 de modo a evitar os efeitos de filtro interno.

### Fluorímetro resolvido no tempo

A medição da fluorescência resolvida no tempo exige equipamentos sofisticados, pois em geral os tempos de vida de fluorescência são muito curtos, variando na faixa de centenas de picosegundos a nanosegundos. O equipamento modular de fluorescência resolvida no tempo TCSPC 5000 U Horiba – Jobin Ivon – IBH se baseia na técnica de contagem de fóton único correlacionada no tempo (TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting). O equipamento possui um sistema de bombeamento com uma lâmpada pulsada que possibilita medidas de tempos de vida  $< 100\text{ps}$ . Além disso, possui também um conjunto de 11 entre lasers e LED de estado sólido (NanoLEDs) com pulsos de curta duração ( $< 200\text{ps}$ ) e com taxa de repetição de 1 MHz, que cobrem uma larga parte do espectro desde 280 nm até 650 nm. O sistema é controlado por computador através de um software Windows compatível. Abaixo, nas Figs. 5.1 e 5.2, temos a descrição do equipamento com duas visualizações.



Figura 5.1 – 1: Computador, 2: DataStation Hub (Controlador de NanoLEDs, monocromadores, polarizadores, lentes e detector de fótons TBX), 3: Fonte e controle para o detector MCP, 4: Fonte e controle para lâmpada de Xenônio, 5: Fonte e controle para lâmpada NanoFlash.

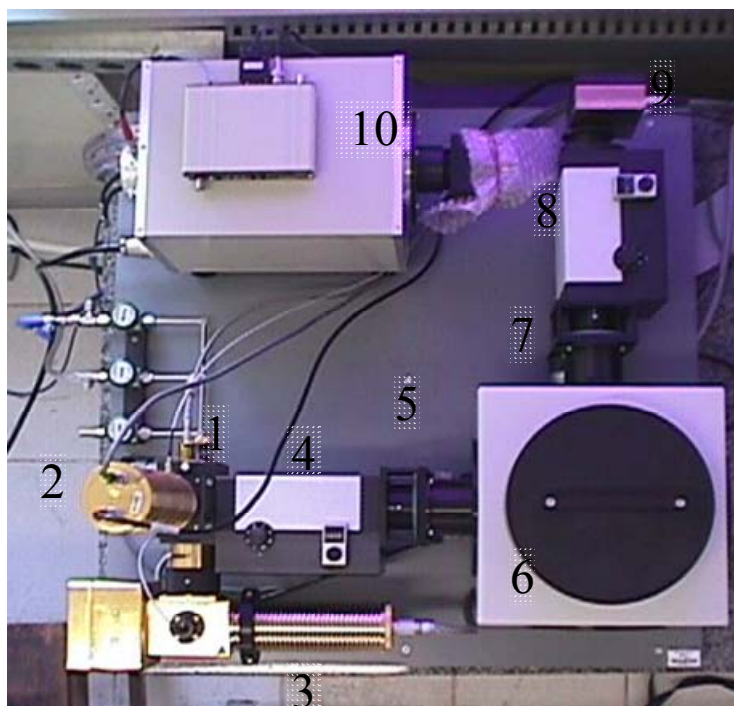


Figura 5.2 – 1: NanoLEDs (283nm; 330nm; 559nm), LASERs (372nm; 405nm; 430nm; 640nm), 2: Lâmpada de Xenônio, 3: Lâmpada NanoFlash de Hidrogênio, 4: Controle da abertura (slit) e monocromador de excitação, 5: Polarizador de excitação, 6: Câmara da amostra com opção de medidas em função da temperatura, 7: Polarizador de emissão, 8: Controle da abertura (slit) e monocromador da emissão, 9: Detector (Picosecond photon detection – TBX-04), 10: Detector MCP-PMT (Microchannel Plate Photomultiplier Tube).

### Análise em fluorescência resolvida no tempo

Para a determinação dos tempos de vida e dos demais parâmetros da fluorescência resolvida no tempo foi utilizado o modelo multi-exponencial dado por:

$$N(t) = A + \sum_i \alpha_i \exp \frac{-t}{\tau_i} \quad (5.1)$$

onde  $A$  é uma constante associada ao ruído,  $\tau_i$  são os tempos de vida das espécies presentes na amostra e  $\alpha_i$  são os fatores pré-exponenciais. Para ajustar as curvas de decaimento medidas utilizamos dois módulos de análise, o individual e o global. Na análise individual, o programa DAS6 - Horiba Jobin Ivon nos permite realizar ajustes com até cinco exponenciais, ou seja, considerando cinco tempos de vida na equação (5.1). A parametrização é realizada através de uma avaliação criteriosa do  $\chi^2$ , da distribuição dos resíduos e do comportamento coerente dos parâmetros para com o nosso modelo teórico. Já na análise global o programa nos

permite realizar ajustes com até quatro exponenciais tendo  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  e  $\tau_4$  únicos para todas as curvas de decaimento. O ajuste é feito de modo iterativo entre as curvas de decaimento de tempo de vida. Abaixo, temos um exemplo de ajuste realizado.

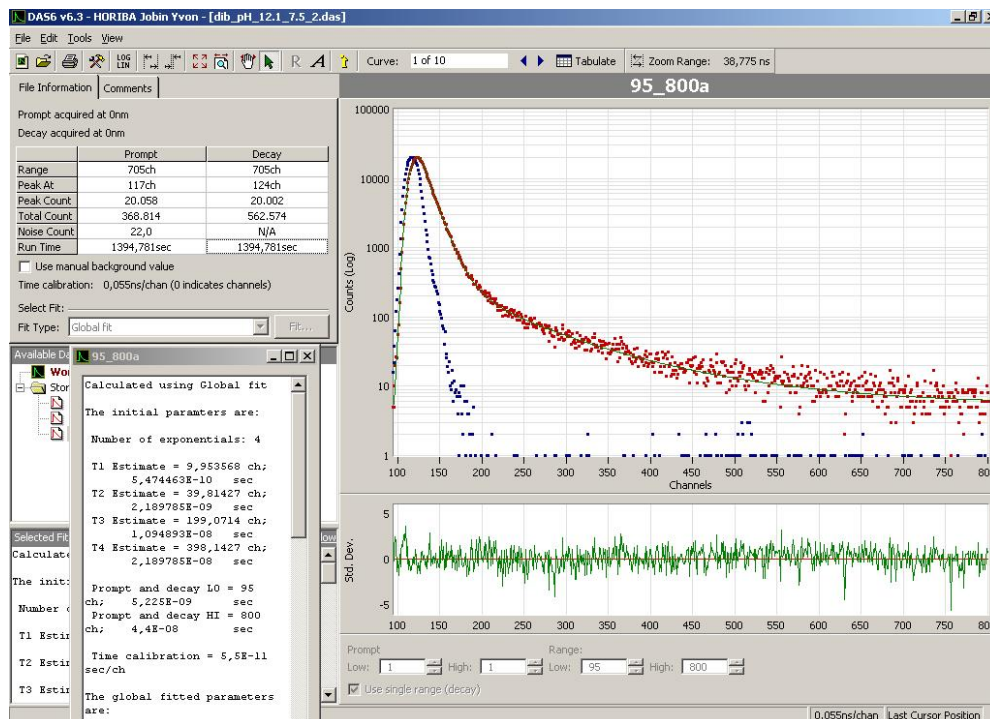


Figura 5.3 – Exemplo de ajuste realizado com o módulo de análise global. No quadro em evidência à esquerda temos os resultados do ajuste. À direita acima temos uma das curvas de decaimento com o ajuste multi-exponencial. À direita abaixo temos a distribuição dos resíduos.

## 5.3

### Métodos

#### 5.3.1

#### Síntese dos complexos de NF e Lev com ouro

Os complexos de Au(III) foram obtidos por (Lachter et al., 2009), dissolvendo-se 0,25 mmol dos ligantes Nor e Lev, em aproximadamente 40 mL de metanol. Após a dissolução completa dos ligantes, 0,25 mmol de HAuCl<sub>4</sub> foram adicionados, os quais foram solubilizados previamente em metanol. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por aproximadamente 24 horas. Os

precipitados formados foram filtrados a vácuo e secos. Por fim, dois complexos foram obtidos:  $[\text{AuCl}_2(\text{Lev})]\text{Cl}$  e  $[\text{AuCl}_2(\text{NF})]\text{Cl}$ . Os complexos foram caracterizados por colaboradores, os quais determinaram seus pontos de fusão, medidas de condutividade, análise elementar e ressonância magnética nuclear (RMN). As Figs. 5.4 e 5.5 representam a reação de obtenção dos complexos. A posição de coordenação do Au foi sugerida por medidas de RMN.

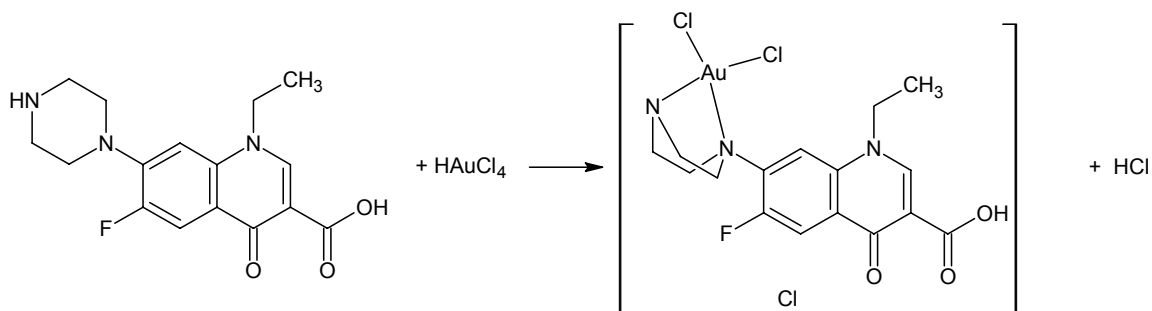


Figura 5.4 – Equação obtenção do complexo de Au(III) da NOR.

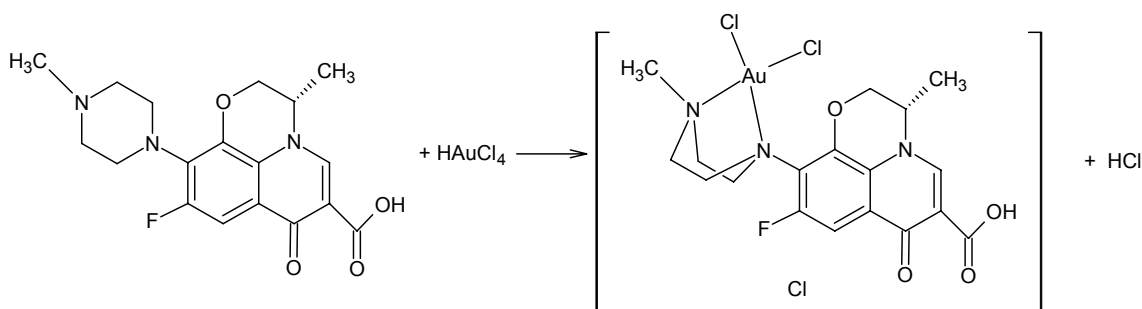


Figura 5.5 – Equação de obtenção do complexo de Au(III) da Lev.

### 5.3.2

#### Correções de espalhamento em fluorescência estacionária

A fluorescência é uma ferramenta analítica poderosa para se estudar estruturas e funções de biomoléculas, em especial para se estudar a ação de proteínas e peptídeos na membrana biológica. A fluorescência de fármacos é comumente utilizada para examinar suas interações com proteínas e lipídeos, tanto em modelos de membrana, como vesículas unilamelares, quanto com membranas naturais. Contudo, na realização destas medidas existe um grande desafio, o alto grau de espalhamento da luz existente nestes sistemas (Lakowicz, 2006).

Quando o campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética interage com os elétrons em uma partícula, um momento de dipolo oscilante se desenvolve com uma magnitude que é proporcional à polarizabilidade da partícula e à intensidade do campo. O espalhamento é dito elástico quando os dipolos oscilantes na partícula irradiam com a mesma frequência que a radiação eletromagnética excitante. Deste modo, o termo elástico refere-se ao fato dos fótons incidentes e espalhados terem a mesma frequência e, conseqüentemente, a mesma energia. Se o meio é perfeitamente homogêneo, como em um cristal perfeito, as ondas espalhadas interferem destrutivamente em todas as direções, exceto na direção de propagação da radiação incidente. Se o meio for fluido ou não homogêneo, como em uma solução de macromoléculas, a radiação também é espalhada em outras direções. O espalhamento da luz por partículas com diâmetros muito menores que o comprimento de onda da radiação incidente é chamado de *Espalhamento Rayleigh*. Tal espalhamento possui algumas propriedades interessantes. Dentre elas temos que a intensidade da luz espalhada é proporcional a  $\lambda^{-4}$ ; de modo que, quanto menor o comprimento de onda,  $\lambda$ , mais intensa será a radiação espalhada; a intensidade da luz espalhada também é proporcional à massa molar da partícula e depende do ângulo de espalhamento. Por outro lado, quando o comprimento de onda da radiação é comparável às dimensões dos centros espalhadores, o espalhamento pode ocorrer em diferentes sítios de uma mesma molécula e a interferência entre os diferentes raios espalhados torna-se relevante. Com isso, temos que a intensidade da luz espalhada se afasta da intensidade característica do *Espalhamento Rayleigh*.

A dificuldade intrínseca das medidas de fluorescência em soluções de membrana é a distorção no espectro da amostra causada pelo espalhamento da luz. Embora seja conhecido que o espalhamento causa artefatos, ou seja, efeitos espúrios nos espectros, raras vezes são realizados procedimentos para corrigi-lo ou eliminá-lo. Contudo, alguns procedimentos para melhorar as condições experimentais e assegurar a correta análise dos dados devem ser aplicados (Ladokhin et al., 2000). O conjunto das contribuições que compõem o espalhamento na amostra é dado por: (1) contribuição direta da luz de excitação, espalhada na direção do detector de emissão; (2) perda de intensidade de fluorescência devido à atenuação da luz de excitação; (3) perda de intensidade de fluorescência devido à atenuação da luz emitida e (4) aparente deslocamento do

espectro de fluorescência para o vermelho devido à forte atenuação da emissão em pequenos comprimentos de onda. Diferentes aplicações da técnica de fluorescência podem requerer alterações na geometria da amostra de modo a assegurar pequenos caminhos de emissão para medidas espectrais e pequenos caminhos de excitação para medidas de intensidade. Existe um grande perigo em se ignorar os efeitos de espalhamento na interpretação das medidas de fluorescência em membranas.

O procedimento de correção comumente utilizado é o de subtrair do espectro da amostra um espectro de espalhamento obtido com amostra composta somente por vesículas ou membranas, chamado de branco. Contudo este procedimento corrige somente a primeira contribuição. Outro método para atenuar, ou mesmo eliminar, o espalhamento é o que utiliza a polarização da luz de excitação e de emissão. A escolha de uma configuração entre os polarizadores de emissão e excitação é muitas vezes necessária. Ao contrário da fluorescência, que em média é emitida depois de um tempo  $\tau$ , a luz espalhada não sofre qualquer atraso em relação à incidente, mantendo assim a polarização original. Portanto, poderá ser totalmente filtrada com a utilização de polarizadores na configuração transversal. Outra configuração muito utilizada é a de ângulo mágico, na qual o polarizador de emissão faz um ângulo de  $54.7^\circ$  com o de excitação. Esta resulta em uma intensidade proporcional à intensidade total da luz e é geralmente usada para eliminar os efeitos de polarização associados com a rotação dos fluoróforos ou variações na eficiência de transmissão e detecção da luz. O uso da configuração de ângulo mágico aprimora a resolução espectral. Embora essencial para alguns estudos de fluorescência, o alinhamento no ângulo mágico pode não ser necessário para a análise espectral da emissão nem para determinação de partição em membrana. Deste modo, outras configurações de orientação dos polarizadores podem ser utilizadas. A configuração transversal é a que fornece a máxima supressão de espalhamento. A escolha adequada da configuração de polarizadores tem o benefício adicional de permitir a correção de certos tipos de distorção espectral causados pela polarização característica da grade de monocromadores, a qual deixa transmissões anômalas da polarização horizontal da luz em algumas regiões do espectro.



### Determinação do espalhamento das amostras com membrana e com Dib em membrana

Espectros de espalhamento de soluções puras de membrana em tampão Tris com concentração crescente foram registrados com o objetivo de se avaliar como a intensidade de espalhamento varia em função da concentração de membrana. Abaixo, nas Figs. 5.6 e 5.7, temos os espectros de espalhamento em pH 7.4 numa titulação com uma suspensão de membranas na faixa de 20  $\mu\text{g/ml}$  a 440  $\mu\text{g/ml}$  e o gráfico da intensidade do espalhamento em 341 nm em função da concentração de membrana.

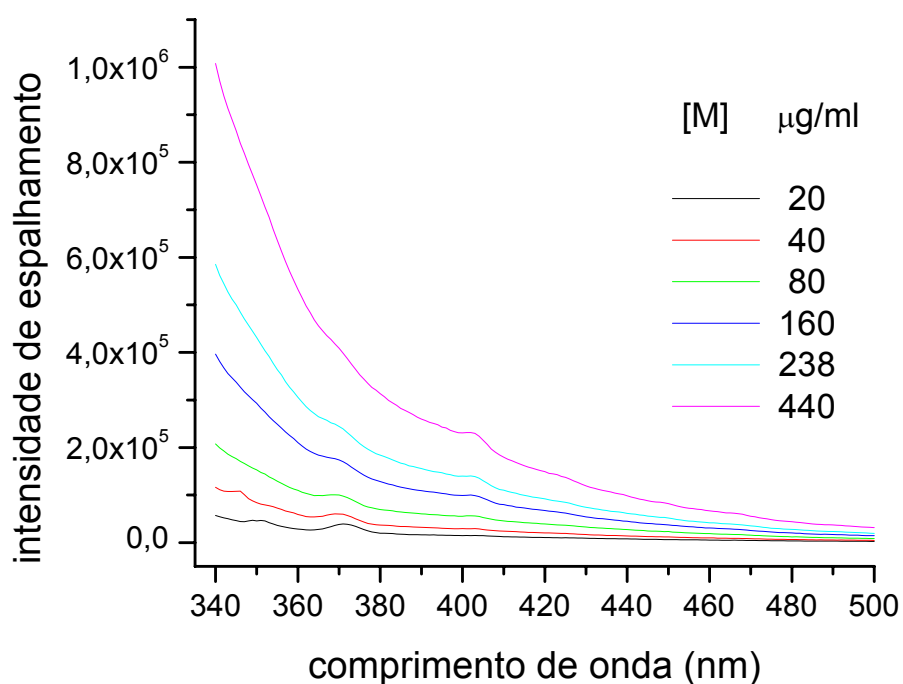


Figura 5.6 - Espectros de espalhamento em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de 20  $\mu\text{g/ml}$  a 440  $\mu\text{g/ml}$ , excitação em 330 nm.

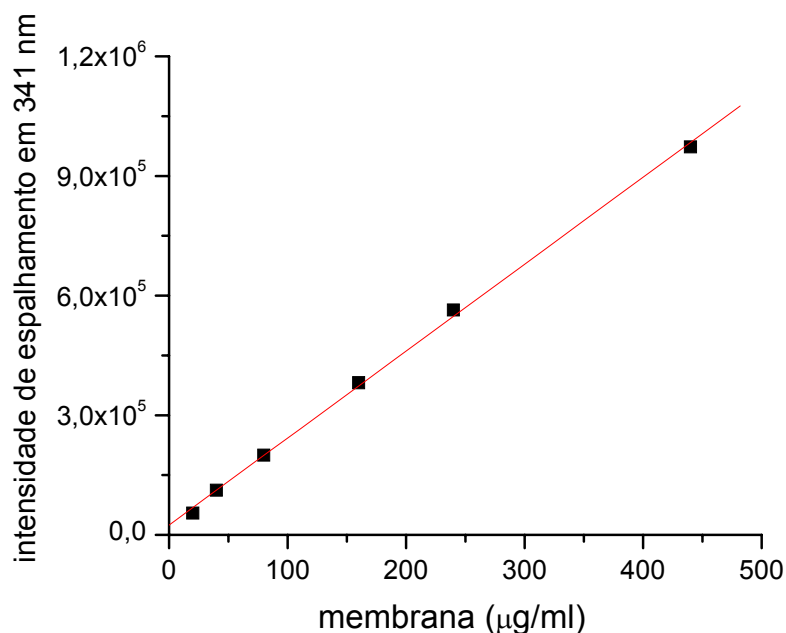


Figura 5.7 – Curva de ajuste do espalhamento em 341 nm em função da concentração de membrana na faixa de 20 µg/ml a 440 µg/ml.

Como podemos observar na Fig. 5.7, o comportamento do espalhamento em função da concentração de membrana na faixa de 20 µg/ml a 440 µg/ml mostrou-se linear. Com o objetivo de corrigir a primeira contribuição do espalhamento - contribuição da luz de excitação espalhada na direção do detector – utilizou-se o seguinte método: obtivemos um espectro de espalhamento puro correspondente à concentração de membrana,  $M_E$ , de 420 µg/ml; subtraímos o Raman causado pela água e; por fim, subtraímos de cada espectro de fluorescência (Capítulo 6, Fig. 6.1) a fração correspondente a este espalhamento, com o uso da equação:

$$I_{1c} = I_m - I_E \cdot \frac{[M]}{[M_E]} \quad (5.2)$$

onde,  $I_{1c}$  é o espectro corrigido – referente à primeira contribuição do espalhamento –,  $I_m$  é o espectro medido,  $I_E$  é o espectro de espalhamento com concentração de membrana  $[M_E] = 420 \mu\text{g/ml}$  e  $[M]$  é a concentração de membrana do espectro medido.

Com o objetivo de corrigir as outras contribuições do espalhamento - perda de intensidade de fluorescência devido à atenuação da luz de excitação; perda de intensidade e aparente deslocamento do pico de fluorescência devido à atenuação da luz emitida - utilizamos a seguinte equação:

$$I_{2c} = I_{1c} \cdot 10^{(\ell_{ex} A_{ex} + \ell_{em} A_{em})[M]/[M_E]} \quad (5.3)$$

onde,  $I_{2c}$  é o espectro corrigido – referente à segunda contribuição do espalhamento,  $I_{1c}$  é o espectro obtido na correção anterior,  $\ell_{ex}$  e  $\ell_{em}$  são os caminhos óticos de excitação e emissão, o qual para a nossa cubeta são iguais, ou seja,  $\ell_{ex} = \ell_{em} = 0.5 \text{ cm}$ ,  $[M_E] = 420 \text{ } \mu\text{g/ml}$  e  $[M]$  é a concentração de membrana do espectro em questão e  $A_{ex}$  e  $A_{em}$  são as medidas de absorbância nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

Espectros de espalhamento de soluções aquosas de leite muito diluídas em pH 7.4 sem polarização e em três configurações de polarização foram registrados. As configurações de polarização analisadas foram a transversal HV: polarizador de excitação na horizontal e de emissão na vertical; e as paralelas VV: polarizador de excitação e emissão na vertical e HH: polarizador de excitação e emissão na horizontal. A configuração VH: polarizador de excitação na vertical e de emissão na horizontal foi *a priori* descartada dada sua acentuada diminuição na intensidade da luz de excitação já observada na medida da configuração VV. Espectros de fluorescência estacionária de dibucaína (10  $\mu\text{M}$ ) em pH 7.4 nas mesmas configurações de polarização também foram registrados. O objetivo destas medidas foi avaliar a melhor configuração de polarizadores que permita minimizar o espalhamento da luz sem que ocorra uma perda muito grande da intensidade de fluorescência. O resultado é apresentado na Fig. 5.8. Os testes apontaram que a melhor configuração de polarizadores foi a transversal HV. Deste modo, esta configuração foi adotada na realização das medidas da interação da Dib e membrana.

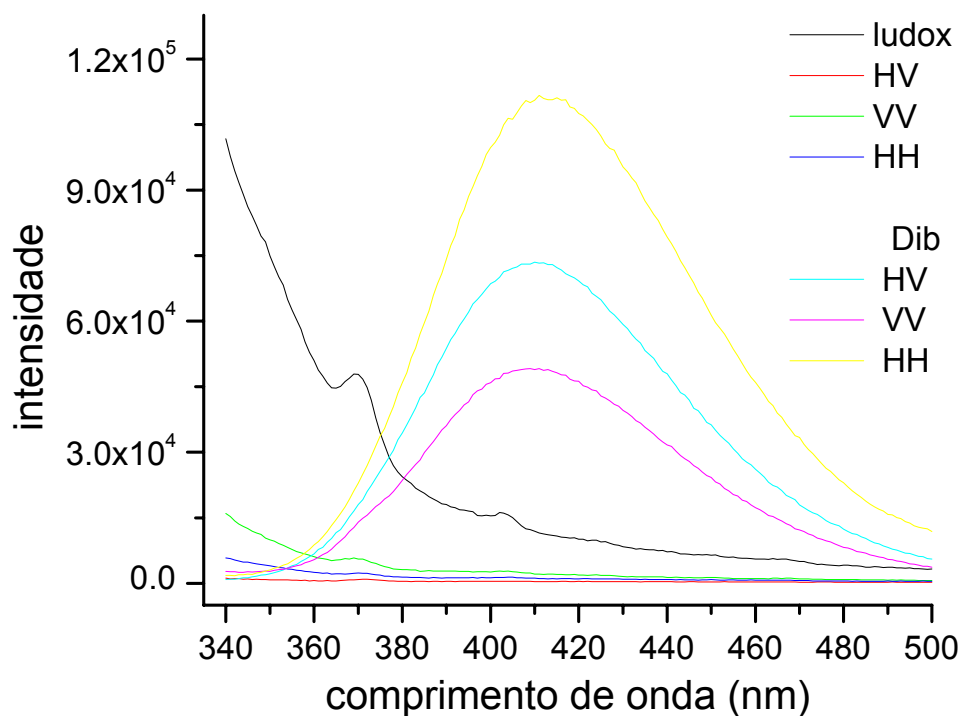


Figura 5.8 - Espectros de espalhamento de ludox sem polarização e com polarização e espectros de fluorescência da Dib ( $10 \mu\text{M}$ ) em pH 7.4 nas configurações de polarização HV, VV e HH.

Espectros de espalhamento de soluções puras de membrana em tampão em concentração crescente e polarização HV foram registrados com o objetivo de se avaliar a intensidade de espalhamento em função da concentração de membrana. Os resultados estão apresentados na Figs. 5.9 e 5.10.

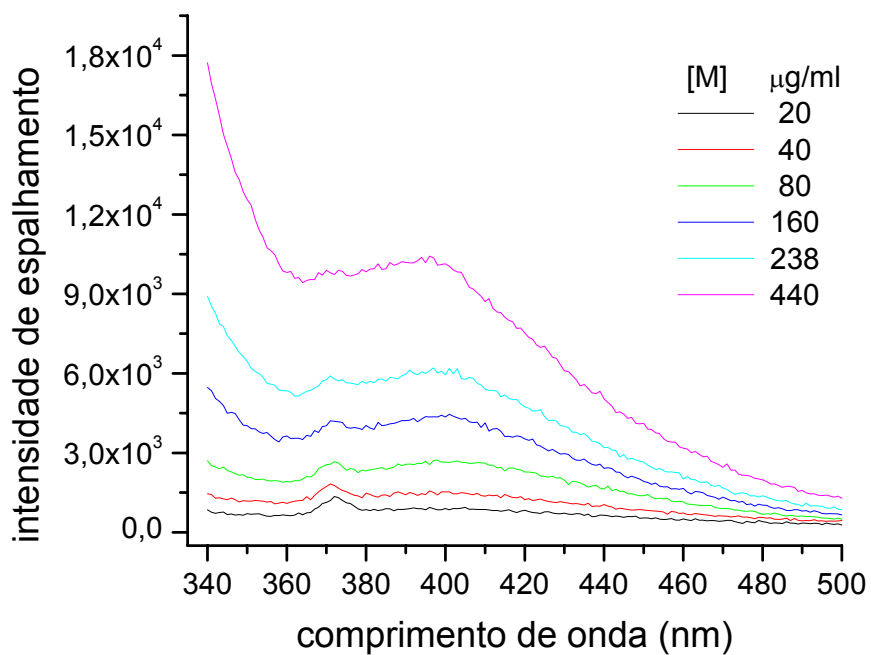


Figura 5.9 - Espectros de espalhamento com polarização HV em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de 20 µg/ml a 440 µg/ml.

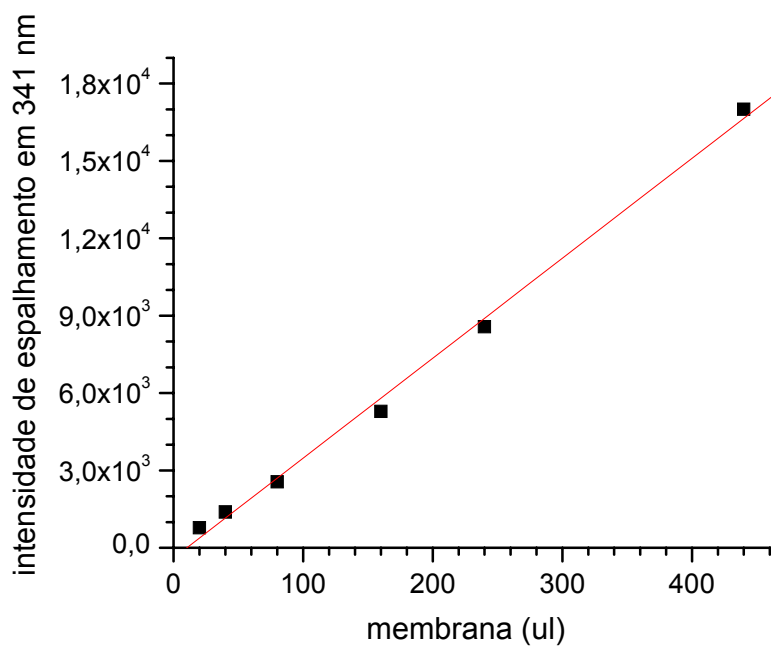


Figura 5.10 - Curva de ajuste do espalhamento em 341 nm com polarização HV em função da concentração de membrana na faixa de 20 µg/ml a 440 µg/ml.

Como podemos observar na Fig. 5.10, o espalhamento em função da concentração de membrana na faixa de  $20 \mu\text{g/ml}$  a  $440 \mu\text{g/ml}$  mostrou-se de menor intensidade e com comportamento linear em 341 nm.

### 5.3.3

#### Efeitos de filtro interno no sistema Dib-triptofano

Efeitos de filtro interno podem provocar uma diminuição na intensidade da luz de excitação ou uma diminuição da fluorescência observada devido à absorção da luz emitida pela amostra. A importância relativa de cada processo depende da densidade ótica da amostra nos comprimentos de onda de excitação e emissão. O efeito de filtro interno devido à absorção da luz pela Dib pode diminuir a intensidade de fluorescência aparente e, portanto, distorcer os dados obtidos. Com o objetivo de corrigir os efeitos de filtro interno nas medidas da Fig. 7.11, fizemos uso da equação:

$$F_c = 10^{(A_{exc} + A_{em})/2} \quad (5.4)$$

onde,  $F_c$  é o espectro corrigido,  $A_{exc}$  é a absorbância no comprimento de onda de excitação e  $A_{em}$  é a absorbância em cada comprimento de onda de emissão. O fator 2 deve-se ao caminho ótico, que na geometria de fluorescência é metade do de absorção. Os resultados serão apresentados no Cap. 7 (Fig. 7.12).

### 5.3.4

#### Determinação da constante de associação através de métodos espectroscópicos

A incorporação de fármacos nas membranas lipídicas pode ser monitorada por muitos procedimentos. A análise mais direta é a determinação da concentração dos fármacos incorporados e fármacos livres em equilíbrio com a membrana lipídica. Um procedimento experimental utilizado é a separação física da membrana do solvente por centrifugação ou filtração. A concentração do fármaco incorporado pode ser obtida da fração encontrada na membrana ou da perda do fármaco do meio de incubação. Um método menos direto, mas mais conveniente quando o fármaco apresenta propriedades óticas, é o de estimar a

concentração de fármacos ligados através da análise das mudanças espectrais que acompanham a ligação. Dois procedimentos são aplicados: (1) titula-se uma solução de fármaco, em concentração constante, com concentrações crescentes de membrana para se obter a mudança ótica até a saturação, ou seja, concentração “infinita” de membrana quando todos os fármacos estariam ligados; (2) titula-se uma solução de membrana, em concentração constante, com concentrações crescentes de fármaco.

Bashford e Smith (apêndice, Bashford et al., 1979) desenvolveram equações para ajustar os resultados obtidos através do procedimento (1) descrito acima. Considerando o caso de uma pequena molécula ligando-se a uma membrana com uma concomitante mudança em algum parâmetro ótico,  $P$ , temos que o aumento,  $\varepsilon$ , do parâmetro que acompanha a ligação é definido pela fração:

$$\varepsilon = \frac{P_{obs}}{P_{ini}} \quad (5.5)$$

onde  $P_{ini}$  é o valor de  $P$  na ausência de membrana e  $P_{obs}$  é o valor de  $P$  na presença de membrana. Se todos os fármacos ligados aos sítios são idênticos, então podemos definir o parâmetro  $\varepsilon_b$  que traduzirá o aumento característico observado para os fármacos ligados, o qual pode ser uma constante para um dado fármaco e sistema de membrana. Deste modo, temos que o aumento do parâmetro sozinho nos permite calcular a fração de fármacos ligados,  $c$ :

$$P_{obs} = P_{ini} (1 - c) + P_{ini} \varepsilon_b c \quad (5.6)$$

Assim, temos

$$\frac{P_{obs}}{P_{ini}} = \varepsilon = (1 - c) + \varepsilon_b c \quad (5.7)$$

Explicitando  $c$  em (5.7), temos:

$$c = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon_b - 1} = \frac{1 - \varepsilon}{1 - \varepsilon_b} \quad (5.8)$$

A determinação experimental de ambos os parâmetros  $\varepsilon$  e  $\varepsilon_b$  permitirão determinar a concentração de fármacos ligados. Por outro lado, o processo de incorporação de um fármaco,  $F$ , na membrana,  $M$ , pode ser representado no equilíbrio por:



onde  $K_d$  é a constante de dissociação definida como

$$K_d = \frac{[F][M]}{[FM]} \quad (5.10)$$

Sendo  $F_t$  a concentração total do fármaco,  $M$  a concentração de sítios de membrana e  $F_b$  a concentração de fármacos ligados, e assumindo que a concentração de sítios de membrana é muito maior que a concentração do fármaco, podemos escrever que a constante de dissociação,  $K_d$ , para a interação será:

$$K_d = (F_t - F_b) \frac{M}{F_b} \quad (5.11)$$

Explicitando  $F_b$ , temos:

$$F_b = F_t - K_d \frac{F_b}{M} \quad (5.12)$$

Sendo a fração do fármaco ligado,  $c$ , dada por  $F_b/F_t$ , podemos escrever (5.12) então como:

$$c = 1 - K_d \frac{c}{M} \quad (5.13)$$

Substituindo a equação (5.13) em (5.11), obtemos:

$$(\varepsilon - 1) = (\varepsilon_b - 1) - K_d \frac{\varepsilon - 1}{M} \quad (5.14)$$

A equação (5.13) prediz que um ajuste de  $(\varepsilon - 1)$  versus  $(\varepsilon - 1)/M$  será uma linha reta de inclinação  $K_d$  com coeficiente linear  $(\varepsilon_b - 1)$ . Nota-se que esta equação é análoga à de *Eadie-Hofstee*, proveniente da cinética enzimática.

### **O coeficiente de partição e sua relação com a constante de associação**

O coeficiente de partição é um parâmetro físico-químico essencial para o estudo da interação de fármacos com membranas e lipídeos. A constante de partição,  $P$ , de um determinado fármaco é a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio quando este fármaco é dissolvido em um sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa. Deste modo temos:

$$P = \frac{[orgânica]}{[aquosa]} \quad (5.15)$$

onde  $[orgânica]$  e  $[aquosa]$  são as concentrações do fármaco na fase orgânica e na fase aquosa, respectivamente. Para o caso de nosso sistema, a fase orgânica é constituída pelos lipídeos da membrana. Podemos expressar a equação (5.15) em



termos do número de mols do fármaco na fase orgânica e na fase aquosa,  $n_M$  e  $n_A$ , e dos volumes totais da fase orgânica e da fase aquosa,  $V_M$  e  $V_A$ , respectivamente, (Katz e Diamond, 1974). Com isso, temos:

$$P = \frac{n_M/V_M}{n_A/V_A} \quad (5.16)$$

A constante de associação,  $K_b$ , é o inverso da constante de dissociação, da equação (5.9), que para o caso de lipídeos pode ser expressa como:

$$K_b = \frac{[F][L]}{[FL]} = \frac{n_M/V_A}{(n_A/V_A)(n_L/V_A)} \quad (5.17)$$

onde  $n_L$  é o número de mols de lipídeo. Assumindo que a membrana esta totalmente dissolvida no volume total da amostra, considerou-se que o volume total é aproximadamente  $V_A$ . Assim, substituindo (5.16) em (5.17) temos:

$$K_b = P \frac{V_L}{n_L} \quad (5.18)$$

Multiplicando o numerador e o denominador pela massa molar,  $M$ , do lipídeo, temos que:

$$K_b = P \frac{M}{\rho_L} \quad (5.19)$$

onde  $\rho_L = n_L (M/V_L)$  é a densidade do lipídeo, que é aproximadamente igual à densidade da água, ou seja,  $1g/ml = 10^3 g/l$ . Considerando que a massa molar média dos lipídeos de membranas é 750 g, temos que a relação entre o coeficiente de partição e a constante de associação é dada por:

$$K_b = 0.75 P \quad (5.20)$$

### 5.3.5

#### Supressão de fluorescência – Acessibilidade do supressor

Para este sistema temos que a fluorescência total na ausência do supressor ( $F_0$ ) é dada por (Lakowicz, 2006):

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \quad (5.21)$$

onde  $a$  e  $b$  se referem aos supressores acessíveis e inacessíveis, respectivamente. Na presença do supressor, a intensidade de fluorescência da fração acessível ( $f_a$ )

vai diminuindo de acordo com a equação de Stern-Volmer, apesar da fração inacessível não ser suprimida. A intensidade observada pode ser dada por:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a [Q]} + F_{0b} \quad (5.22)$$

onde  $K_a$  é a constante de supressão de Stern-Volmer da fração acessível e  $[Q]$  é a concentração de supressor. Subtraindo a equação (5.21) de (5.22), temos:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \left( \frac{K_a [Q]}{1 + K_a [Q]} \right) \quad (5.23)$$

Esta forma modificada da equação de Stern-Volmer nos permite determinar a capacidade de supressão dada por  $K_a$  e as frações dos resíduos de triptofano acessíveis e inacessíveis, dadas por  $f_a$  e  $1 - f_a$ . Basta, para isso, ajustar a curva de  $(F_0 - F)$  em função da concentração de supressor usando a equação (5.23), assumindo que  $f_a = F_{0a}/F_0$ .

A intensidade de fluorescência observada para um fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado,  $[F^*]$ . Sob iluminação contínua, temos que a população de fluoróforos excitados é estabilizada, de modo que,  $d[F^*]/dt = 0$ . Na ausência e na presença do supressor as equações diferenciais que descrevem  $[F^*]$ , são:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0 \quad (5.24)$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q [Q]) [F^*] = 0 \quad (5.25)$$

onde  $f(t)$  é a função de excitação constante, e  $\gamma = \tau_0^{-1}$  é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor. Como vimos no primeiro capítulo, na ausência do supressor a população do estado excitado decai com uma taxa  $\gamma = (\Gamma + k_{nr})$ , onde  $\Gamma$  e  $k_{nr}$  são as taxas de decaimento radiativas e não radiativas, respectivamente. No entanto, na presença do supressor temos uma taxa de decaimento adicional dada por  $k_q[Q]$ . Dividindo (5.24) de (5.25), temos:

$$\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{\gamma + k_q [Q]}{\gamma} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (5.26)$$

A equação de Stern-Volmer pode ser obtida considerando a fração de fluoróforos excitados que decaem por emissão em relação ao total. Essa fração

$F/F_0$ , é dada pela razão da taxa de decaimento na ausência do supressor,  $\gamma$ , pela taxa de decaimento total na presença do supressor  $\gamma + k_q [Q]$ , de modo que:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\gamma}{\gamma + k_q [Q]} = \frac{1}{1 + K_q \tau_0 [Q]} \quad (5.27)$$

A equação (5.27) é justamente a equação de Stern-Volmer. Como a supressão colisional é um processo que diminui a população do estado excitado, podemos expressar os tempos de vida na ausência e na presença do supressor por:

$$\tau^0 = \gamma^{-1} \quad (5.28)$$

$$\tau = (\gamma + k_q [Q])^{-1} \quad (5.29)$$

Assim, temos que os tempos se relacionam através:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (5.30)$$

Uma importante característica da supressão colisional é a equivalência entre a diminuição da intensidade da fluorescência e o tempo de vida, de modo que  $F_0/F = \tau_0/\tau$ . Com esta equivalência podemos perceber com clareza que a supressão da fluorescência ocorre devido a uma taxa adicional de decaimento que diminui a população do estado excitado.