

6

Resultados e Discussão I - Obtenção do pK_a a partir da fluorescência estacionária e resolvida no tempo

6.1

Equilíbrio de ionização

O pH de uma solução é uma medida de sua concentração de H^+ , o qual pode ser definido como:

$$pH = \log_{10} \frac{1}{[H^+]} = -\log_{10}[H^+] \quad (6.1)$$

O equilíbrio de ionização de um ácido fraco A é dado por:



A constante aparente de equilíbrio, K_a , para esta ionização é, por definição:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (6.3)$$

O pK_a de um ácido é definido como:

$$pK_a = -\log K_a = -\log \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = -\log[H^+] - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (6.4)$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (6.5)$$

A inspeção da equação (6.5) mostra que o pK_a de um ácido é o pH no qual ele está com a metade de suas moléculas dissociadas, i.e., quando $[A^-] = [HA]$. O pK_a é o valor de pH onde um determinado grupo ionizável encontra-se 50% em sua forma ionizada e 50% em sua forma não ionizada (Berg et al., 2004).

6.2

Obtenção da constante de ionização a partir de parâmetros espectroscópicos

Como vimos no capítulo III, a estrutura química de muitos fármacos (D) envolve grupos amina ionizáveis. Em pH baixo, o grupo forma complexo com H^+ , tornando-se carregado positivamente. Com isso, temos o seguinte equilíbrio:



Nesse caso, podemos escrever equação (6.5) na forma equivalente como:

$$pK_a = pH - \log \frac{[D^o]}{[HD^+]} \quad (6.7)$$

Na equação (6.7) pode-se observar que para valores acima do pK_a predomina a forma não ionizada - apolar, lipofílica - e abaixo deste valor predomina a forma ionizada - polar, hidrofílica.

Para determinar o valor do pK_a , conhecendo-se as concentrações das espécies neutras e protonadas em função do pH do meio, podemos fazer uso da equação (6.7). Essas concentrações podem ser obtidas através de parâmetros espectroscópicos, desde que sejam diferentes para cada espécie.

Sendo p e $1 - p$ as frações molares das espécies neutra e protonada,

$$p = \frac{[D^o]}{[D^o] + [HD^+]} \quad (6.8)$$

onde $[D^o]$ e $[HD^+]$ são as concentrações molares das formas neutras e protonadas, respectivamente. Com isso, temos:

$$pH = pK_a + \log \frac{p}{1-p} \quad (6.9)$$

Experimentalmente, pode-se encontrar o pK_a se conseguirmos um parâmetro experimental que seja exclusivamente função de p , para cada valor de pH. Qualquer parâmetro espectroscópico que seja proporcional à concentração das espécies neutras e protonadas pode ser utilizado para calcular a fração molar de cada espécie. Seja A um parâmetro espectroscópico experimental. Se A^o e A^+ são os valores do parâmetro A quando todas as espécies estão neutras e protonadas, respectivamente, e p é a fração da espécie neutra, podemos escrever que:

$$A = p A^0 + (1 - p) A^+ \quad (6.10)$$

Como vimos na equação (6.9), podemos relacionar o pH de uma solução com p e $1 - p$ com a equação:

$$pH = pK_a + \log \frac{p}{1 - p} \quad (6.11)$$

Resolvendo a equação (6.10) em termos de p e substituindo na equação (6.11), obtemos:

$$pH = pK_a + \log \frac{A - A^+}{A^0 - A} \quad (6.12)$$

Expressando o parâmetro espectroscópico A como função do pH , obtemos a expressão:

$$A = \frac{A^0 10^{pH} + A^+ 10^{pK_a}}{10^{pH} + 10^{pK_a}} \quad (6.13)$$

Podemos fazer uso do espectro de emissão de fluorescência de uma substância para analisar o equilíbrio de ionização. O parâmetro espectroscópico utilizado pode ser, por exemplo, a intensidade de fluorescência I_λ em um determinado comprimento de onda. Assim, para qualquer λ pode-se escrever que:

$$I_\lambda = \frac{I_\lambda^0 10^{pH} + I_\lambda^+ 10^{pK_a}}{10^{pH} + 10^{pK_a}} \quad (6.14)$$

6.3

Parâmetros espectroscópicos associados ao decaimento da fluorescência e obtenção da constante de ionização

Para o caso da fluorescência resolvida no tempo, queremos encontrar um parâmetro experimental que reflita o equilíbrio das espécies neutra e catiônica. O decaimento da fluorescência, deconvolvido, pode ser ajustado com uma expressão do tipo:

$$I(t) = \alpha^0 \exp(-t/\tau^0) + \alpha^+ \exp(-t/\tau^+) \quad (6.15)$$

sendo a intensidade de decaimento $I(t)$ proporcional ao n° de fótons emitidos por unidade de tempo; os fatores pré exponenciais α^0 e α^+ correspondem ao n° de fótons emitidos por unidade de tempo em $t=0$, para as espécies neutra e carregada, respectivamente; τ^0 é o tempo de vida da espécie neutra e τ^+ é o tempo

de vida da espécie carregada. No tempo zero temos que o número de fótons emitidos por unidade de tempo é dado pela soma das contribuições de cada espécie. Note que fazendo $t = 0$ em (6.16) temos $I(0) = \alpha^0 + \alpha^+$.

Por outro lado, o número de fótons emitidos por unidade de tempo é proporcional ao número de moléculas excitadas e à taxa de decaimento radiativo. Portanto, somando as contribuições de cada espécie:

$$I(t) = N^{0*}(t) k_r^0 + N^{+*}(t) k_r^+ \quad (6.16)$$

onde $N^{0*}(t)$ e $N^{+*}(t)$ são os números de moléculas neutras e carregadas, respectivamente, e k_r^0 e k_r^+ são as taxas de decaimento radiativo dessas mesmas espécies. O número de moléculas de cada espécie no estado excitado decai com o respectivo tempo de vida, conforme as expressões abaixo.

$$N^{0*}(t) = N^{0*}(0) \exp(-t/\tau^0) \quad (6.17)$$

$$N^{+*}(t) = N^{+*}(0) \exp(-t/\tau^+)$$

onde $\tau^0 = 1/(k_r^0 + k_{nr}^0)$ e $\tau^+ = 1/(k_r^+ + k_{nr}^+)$, sendo k_{nr}^0 e k_{nr}^+ as taxas de decaimento não radiativo das espécies. Substituindo (6.17) em (6.16), obtemos então:

$$I(t) = N^{0*}(0) k_r^0 \exp(-t/\tau^0) + N^{+*}(0) k_r^+ \exp(-t/\tau^+) \quad (6.18)$$

Comparando (6.18) com (6.15), observa-se que os fatores pré-exponenciais podem ser dados por:

$$\alpha^0 = N^{0*}(0) k_r^0 \quad \text{e} \quad \alpha^+ = N^{+*}(0) k_r^+ \quad (6.19)$$

Deste modo conclui-se que, no ajuste multiexponencial, o fator pré-exponencial é proporcional ao número de moléculas excitadas da espécie em questão, ponderado por sua taxa de decaimento radiativo.

Por sua vez, o número de moléculas de cada espécie no estado excitado é proporcional tanto à concentração de cada espécie no estado fundamental quanto ao respectivo coeficiente de absorção molar. Contudo, para o caso de fármacos que possuam os mesmos coeficientes de absorção para a espécie neutra e a monocatiônica, temos que o número de moléculas no estado excitado dependerá somente do número de moléculas no estado fundamental, N^0 e N^+ . Assim, podemos reescrever os fatores pré-exponenciais de (6.18) como:

$$\alpha^0 = N^0 k_r^0 \quad \text{e} \quad \alpha^+ = N^+ k_r^+ \quad (6.20)$$

Deseja-se expressar (6.11) em termos de parâmetros da fluorescência resolvida no tempo. Como p é a fração de moléculas neutras, temos que a razão:

$$\frac{p}{1-p} = \frac{N^0}{N^+} \quad (6.21)$$

Utilizando (6.20) em (6.21) temos:

$$\frac{p}{1-p} = \frac{\alpha^0 k_r^+}{k_r^0 \alpha^+} \quad (6.22)$$

Substituindo (6.22) em (6.11) obtemos:

$$pH = pK_a + \log \frac{k_r^+}{k_r^0} + \log \frac{\alpha^0}{\alpha^+} \quad (6.23)$$

A equação (6.23) nos informa que, se utilizarmos os fatores pré-exponenciais como parâmetros espectroscópicos, o pK_a aparecerá deslocado por $\log(k_r^+ / k_r^0)$.

Podemos escrever (6.23) como:

$$pH = pK_a' + \log \frac{\alpha^0}{\alpha^+} \quad (6.24)$$

onde

$$pK_a' = pK_a + \log(k_r^+ / k_r^0) \quad (6.25)$$

Para se obter o deslocamento aparente do pK_a em função dos rendimentos quânticos e dos tempos de vida, podemos expressar as taxas de decaimento como:

$$k_r^0 = Q^0 / \tau^0 \quad \text{e} \quad k_r^+ = Q^+ / \tau^+ \quad (6.26)$$

onde Q^0 e Q^+ são os rendimentos quânticos e τ^0 e τ^+ são os tempos de vida das espécies neutra e protonada, respectivamente. Substituindo (6.26) na (6.25) temos o deslocamento aparente do pK observado ao usarmos os fatores pré-exponenciais como parâmetro espectroscópico:

$$\Delta pK_a' = pK_a' - pK_a = \log \frac{k_r^+}{k_r^0} = \log \frac{Q^+ \tau^0}{Q^0 \tau^+} \quad (6.27)$$

Expressando α^0 como função do pH em (6.24) e lembrando que $\alpha^0 + \alpha^+ = \text{constante}$, obtemos a expressão:

$$\frac{\alpha^0}{(\alpha^0 + \alpha^+)} = \frac{10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_a'}} \quad (6.28)$$

A expressão (6.28) será utilizada na análise de nossos resultados.

Outro parâmetro comumente utilizado em fluorescência resolvida no tempo para determinar a contribuição fracionária f_i de cada tempo de decaimento em um ajuste multiexponencial é a amplitude relativa, dada por:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_j \alpha_j \tau_j} \quad (6.29)$$

onde o produto $\alpha_i \tau_i$, segundo Lakowicz, é proporcional à intensidade de fluorescência estacionária. Fazendo uso de (6.20) em (6.29), temos que a amplitude relativa para f^0 e f^+ pode ser expressa por:

$$f^0 = \frac{N^0 k_r^0 \tau^0}{N^0 k_r^0 \tau^0 + N^+ k_r^+ \tau^+} \quad (6.30)$$

$$f^+ = \frac{N^+ k_r^+ \tau^+}{N^0 k_r^0 \tau^0 + N^+ k_r^+ \tau^+}$$

Substituindo a primeira equação de (6.30) em (6.11), temos:

$$\frac{p}{1-p} = \frac{N^0}{N^+} = \frac{f^0}{f^+} \frac{k_r^+ \tau^+}{k_r^0 \tau^0} \quad (6.31)$$

Com isso, obtemos:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{k_r^+ \tau^+}{k_r^0 \tau^0} \right) + \log \left(\frac{f^0}{f^+} \right) \quad (6.32)$$

A equação (6.32) nos informa que, se utilizarmos as amplitudes relativas como parâmetros espectroscópicos, o pK_a aparecerá deslocado por $\log(k_r^+ \tau^+ / k_r^0 \tau^0)$.

Podemos escrever (6.32) como:

$$pH = pK_a'' + \log \left(\frac{f^0}{f^+} \right) \quad (6.33)$$

onde

$$pK_a'' = pK_a + \log \left(\frac{k_r^+ \tau^+}{k_r^0 \tau^0} \right) \quad (6.34)$$

Substituindo (6.27) na diferença entre pK_a'' e pK_a (6.34) obtém-se o deslocamento do pK para o caso de utilizarmos as amplitudes relativas como parâmetros espectroscópicos:

$$\Delta pK_a'' = pK_a'' - pK_a = \log \frac{k_r^+ \tau^+}{k_r^0 \tau^0} = \log \frac{Q^+}{Q^0} \quad (6.35)$$

Expressando f^0 como função do pH em (6.33) e lembrando que $f^0 + f^+ = 1$, obtemos a expressão:

$$f^0 = \frac{10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_a''}} \quad (6.36)$$

A expressão (6.36) será utilizada na análise de nossos resultados. Contudo, o modelo acima aplica-se para situações onde não há transferência de prótons no estado excitado.