

**INTERAÇÃO DA PORFIRINA ANIÔNICA MESO-TETRAKIS (4-FENILSULFONATO) (TPPS<sub>4</sub>) COM MICELAS CATIÔNICAS E INVESTIGADA PELAS TÉCNICAS DE RPE E SAXS**

**DIÓGENES DE SOUSA NETO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

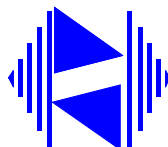
**São Carlos – São Paulo**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE DIÓGENES DE SOUSA NETO, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 15 DE FEVEREIRO DE 2007.**

**COMISSÃO JULGADORA**

---

Prof. Dr. Marcel Tabak

---

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho

---

Prof. Dr. Antônio Alonso

Aos meus pais, que durante boa parte de suas vidas se dedicaram com amor e paciência à minha formação acadêmica e moral.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela família, pelas vitórias alcançadas bem como pelos cuidados e sabedoria com que tem conduzido a minha vida.

Aos meus pais Luiz e Ana, pelos bons conselhos, pelo carinho e apoio emocional que me proporcionaram a conquista de mais um sonho.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Marcel Tabak, pelos ensinamentos, disposição e confiança a mim depositada para a realização deste trabalho. Pelo exemplo de dedicação e inesgotável entusiasmo com a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho, pelos conselhos e por ceder gentilmente o Laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos para a realização das medidas de RPE.

À estudante Patrícia Santiago, pelas análises da curva de SAXS.

Ao técnico Ézer Biazin, pela enorme ajuda com a preparação das amostras.

Ao meu amigo André Pimentel, pela ajuda emocional nas horas difíceis.

Às secretárias Vanessa e Cláudia do Instituto de Química de São Carlos, Wladerez e Ester do Instituto de Física de São Carlos, pela enorme paciência e apoio com os trâmites burocráticos da universidade.

Por último, sou extremamente grato à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que acreditou no desenvolvimento deste projeto com a concessão da bolsa de mestrado bem como auxílios financeiros adicionais.

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |
|------------|--|
| Figura 1.1 | Estrutura básica das porfirinas.....3  |
| Figura 1.2 | Estrutura da porfirina meso-tetrakis (4-fenilsulfonato).....6  |
| Figura 1.3 | Estrutura de um monômero do surfactante catiônico CTAC.....9   |
| Figura 1.4 | Área da superfície por cadeias hidrocarbônicas como uma função do tamanho e forma da micela. [19].....15   |
| Figura 1.5 | Estrutura cristalográfica da HSA complexada com ácido esteárico [25]...18  |
| Figura 2.1 | Níveis de energia da interação Zeeman para os estados $m_s = +1/2$ e $m_s = -1/2$ .....26  |
| Figura 2.2 | Esquema de um radical nitróxido com as orientações dos eixos principais dos tensores de segunda ordem $\vec{g}$ e $\vec{A}$ .....29  |
| Figura 2.3 | (a) Níveis de energia e transições permitidas para um radical nitróxido em um campo magnético constante num meio isotrópico. Em (b) está representado seu espectro de RPE correspondente à derivada da absorção.....35 |
| Figura 2.4 | Modelo de espalhamento de raios-X de uma partícula esférica homogênea [31].....36  |
| Figura 2.5 | Modelo de curvas de SAXS para partículas de tamanhos diferentes em função do ângulo de espalhamento, onde $R_{g1} < R_{g3} < R_{g2}$ [31].....38   |
| Figura 2.6 | Exemplos de funções de distribuição de distâncias $p(r)$ para partículas com distribuição de densidade eletrônica homogênea e não homogênea [31]...41  |
| Figura 2.7 | Função distribuição de densidade eletrônica $\rho(r)$ de uma partícula esférica, composta por dois níveis de densidades diferentes $\rho_1$ e $\rho_2$ em relação ao meio $\rho_0$ [35].....43                         |

|            |  |
|------------|--|
| Figura 2.8 | Representação esquemática de um elipsóide prolato de revolução com dois níveis de densidade eletrônica diferentes $\rho_1$ e $\rho_2$ em relação ao meio $\rho_0$ ...44  |
| Figura 4.1 | Espectros de RPE experimentais (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos vazios) à 24°C dos marcadores de spin (A) 5-DSA e (B) 16-DSA incorporado a 100 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM (pH 4.0) para diferentes concentrações da porfirina TPPS <sub>4</sub> .....62  |
| Figura 4.2 | (A) Curvas de SAXS experimentais (símbolos) e ajustadas (linhas sólidas) para 100 mM CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM no pH 4.0 em função da concentração de TPPS <sub>4</sub> . Em (B) está apresentada a funções de interferência interpartículas $S(q)$ e a função de forma da partícula $P(q)$ para os ajustes obtidos em (A).....69  |
| Figura 4.3 | (A) Curvas teóricas de SAXS obtidas na simulação pela variação da anisometria ( $\nu$ ). Os outros parâmetros foram fixados nos seguintes valores: $R_{par} = 22 \text{ \AA}$ , $\sigma_{pol} = 4,0 \text{ \AA}$ , $\rho_{pol} = 0,4 \text{ e/ \AA}^3$ e $\alpha = 0,04$ . (B) Inseto da região de valores de $q$ entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ .....72   |
| Figura 4.4 | (A) Curvas teóricas de SAXS obtidas na simulação pela variação da densidade eletrônica polar ( $\rho_{pol}$ ). Os outros parâmetros foram fixados nos seguintes valores: $R_{par} = 22 \text{ \AA}$ , $\sigma_{pol} = 4,0 \text{ \AA}$ , $\alpha = 0,04$ e $\nu = 3.0$ . (B) Inseto da região de valores de $q$ entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ .....73   |
| Figura 4.5 | (A) Curvas teóricas de SAXS obtidas na simulação pela variação do raio parafínico ( $R_{par}$ ). Os outros parâmetros foram fixados nos seguintes valores: $\sigma_{pol} = 4,0 \text{ \AA}$ , $\rho_{pol} = 0,4 \text{ e/ \AA}^3$ , $\alpha = 0,04$ e $\nu = 3.0$ . (B) Inseto da região de valores de $q$ entre $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ .....74  |
| Figura 4.6 | Figura 4.6. (A) Espectro de RPE experimental (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos vazios) a 24°C do marcador de spin 5-DSA ligado a BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença de CTAC. (B) Espectros simulados para a BSA contendo 20 mM de CTAC usando um modelo de duas componentes (espectro superior, Chi-red = 35.35) e de uma componente (espectros inferior, Chi-red = 24.40).....79 |
| Figura 4.7 | (A) Espectro de RPE experimental (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos vazios) a 24°C do marcador de spin 16-DSA ligado a BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença de CTAC. (B) Espectros simulados para a BSA contendo 7 mM de CTAC com suas   |

|  |  |
|--|--|
|  | respectivas componentes isoladas pelo programa NLSL. A fração porcentual de cada componente também está apresentada.....82 |
|--|--|



## LISTA DE TABELAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1.1 | Números máximos de agregação para micelas esféricas e elipsoidais <sup>a,b</sup> [18].....  | 13 |
| Tabela 4.1 | Tempo de correlação rotacional, $\tau$ , e desdobramento hiperfino isotrópico, $a_o$ , obtidos das simulações dos espectros de RPE (24°C) do marcador de spin 5-DSA incorporado à 100 mM de CTAC na ausência e na presença de TPPS <sub>4</sub> em pH 4.0 e 9.0.....  | 63 |
| Tabela 4.2 | Tempo de correlação rotacional, $\tau$ , e desdobramento hiperfino isotrópico, $a_o$ , obtidos das simulações dos espectros de RPE (24°C) do marcador de spin 16-DSA incorporado à 100 mM de CTAC na ausência e na presença de TPPS <sub>4</sub> em pH 4.0 e 9.0..... | 65 |
| Tabela 4.3 | Valores dos parâmetros obtidos dos ajustes das curvas de SAXS para as amostras contendo 100 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato pH 4.0 e 9.0 na presença e ausência da porfirina TPPS <sub>4</sub> .....  | 70 |
| Tabela 4.4 | Parâmetros dinâmicos e magnéticos obtidos da simulação dos espectros de RPE (24°C) para o marcador de spin 5-DSA ligado à BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença das concentrações de CTAC indicadas.....                                  | 79 |
| Tabela 4.5 | Parâmetros dinâmicos e magnéticos obtidos da simulação dos espectros de RPE (24°C) para o marcador de spin 16-DSA ligado à BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença das concentrações de CTAC indicadas.....                                 | 83 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| RPE               | Ressonância Paramagnética Eletrônica.  |
| SAXS              | Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo, (do ingles, “small-angle X-ray scattering”).                                     |
| SANS              | Espalhamento de Nêutrons a Baixo Ângulo, (do ingles, “small-angle neutron scattering”).                                  |
| CTAC              | Cloreto de Cetiltrimetilamônio, (do inglês, cationic cethyltrimethylammonium chloride).                                  |
| SDS               | Dodecil Sulfato de Sódio, (do inglês, “sodium dodecyl sulfate”).   |
| HPS               | N-hexadecil-N,Ndimetil-3-amônio-1-propano fosfato, (do inglês, “N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate”). |
| TPPS <sub>4</sub> | Meso-tetrakis (4-fenilsulfonato), (do inglês, meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl)).  |
| TMPyP             | Meso-tetrakis (4-metil-N-piridil), (do inglês, meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl)).                                 |
| BSA               | Albumina de Soro Bovino, (do inglês, “bovine serum albumin”)   |
| HSA               | Albumina de Soro Humano, (do inglês, “human serum albumin”).   |
| PDT               | Terapia Fotodinâmica, (do inglês, “photodynamic therapy”).   |
| DSA               | Doxil ácido esteárico, (do inglês, “doxyl stearic acid”).  |

## RESUMO

A interação da porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) (TPPS<sub>4</sub>) com modelos simples de membrana biológica foi investigada utilizando as técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês small-angle X-ray scattering). Os modelos biomiméticos empregados no presente trabalho são constituídos de micelas catiônicas formadas a partir do surfactante catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC). Os experimentos de RPE e SAXS foram realizados a temperatura ambiente e nos pHs 4,0 e 9,0 a fim de verificar se o estado de protonação das porfirinas altera a natureza das interações com os sistemas micelares. As análises de RPE mostraram um comportamento similar para os marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA; ou seja, a adição de porfirina às micelas catiônicas é seguida por uma redução da mobilidade de ambos os marcadores, principalmente para concentrações maiores de porfirina. Este comportamento foi atribuído ao efeito de empacotamento das micelas para o qual os resultados obtidos dos dados de SAXS parecem sustentar esta interpretação. Entretanto, a polaridade monitorada pelo marcador de spin 5-DSA mostrou ser praticamente a mesma para todas as concentrações de porfirina e em ambos os valores de pH, sugerindo que o estado de protonação da TPPS<sub>4</sub> não altera a natureza das interações envolvidas com a região das cabeças polares das micelas. Por outro lado, o marcador de spin 16-DSA mostrou uma pequena redução de polaridade para maiores concentrações de porfirina, principalmente em pH 4.0. Isso indica que a interação da porfirina também ocorre nas regiões hidrofóbicas das micelas. De fato, os ajustes dos dados de SAXS permitiram concluir que as distorções na forma de linha das curvas em função da concentração de porfirina estão associadas basicamente a uma redução do raio parafínico da micela de CTAC (parâmetro  $R_{par}$ ). Contudo, nenhuma mudança significativa na espessura da camada polar (parâmetro  $\sigma_{pol}$ ) ou na sua densidade (parâmetro  $\rho_{pol}$ ) foi observada. As curvas de SAXS de melhor ajuste foram obtidas assumindo as micelas de CTAC como elipsóides prolatos, onde a razão axial (parâmetro  $\nu$ ) não mostrou mudanças significativas para a faixa de 2-10 mM de TPPS<sub>4</sub> e para os valores de pH estudados.

A técnica de RPE também foi utilizada para monitorar a interação da albumina de soro bovino (BSA, do inglês “bovine serum albumin”) com o surfactante catiônico CTAC em pH 7,0. Marcadores de spin derivados do ácido esteárico (5-DSA e 16-DSA) ligados aos sítios de ligação de alta afinidade da BSA revelaram que na presença de

surfactante os espectros de RPE são compostos de duas populações. Análises espectrais foram realizadas através do programa de simulação NLSL (do inglês, “nonlinear least-squares”), o qual permitiu obter a difusão rotacional e a contribuição de cada componente nos espectros de RPE assim como avaliar a polaridade do ambiente onde os radicais nitróxidos estão dissolvidos. Os valores do tempo de correlação rotacional,  $\tau$ , indicaram que a componente 1 apresenta um estado de mobilidade mais restrito devido aos marcadores de spin estarem em contato com a proteína; a componente 2 menos imobilizada surge dos marcadores de spin localizados nas estruturas micelares. Para o 5-DSA, uma significativa imobilização deste marcador permanece mesmo para altas concentrações de surfactante, o qual é consistente com sua maior constante de ligação quando comparado ao 16-DSA. O aumento da concentração de surfactante conduz a um aumento nos níveis de movimento da componente 1 seguido por uma redução da fração de marcadores de spin associado à esta componente.

## ABSTRACT

Electron paramagnetic resonance (EPR) and small angle X-ray scattering (SAXS) were used to investigate the interaction of the meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS<sub>4</sub>) with simple biological membrane models. In the present work, cationic cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) micelles were used as mimetic models. RPE and SAXS experiments were performed at room temperature and at pHs 4.0 and 9.0 in order to evaluate whether the protonation state of the TPPS<sub>4</sub> affects its interaction with the cationic micelle. EPR analysis showed a similar behavior for both spin labels 5-DSA and 16-DSA, i.e., the addition of porphyrin to the cationic micelles is followed by a reduction of mobility state for both spin labels, mainly at higher porphyrin concentrations. This behavior has been associated to the micellar packing effect, which seems to be supported by SAXS data. The polarity monitored by the spin label 5-DSA was practically the same in the whole porphyrin concentration range and pH values, suggesting that the protonation state of porphyrin did not contribute significantly for its interaction with cationic micelles. On the other hand, the spin label 16-DSA senses a slightly more hydrophobic environment as a function of porphyrin concentration, especially at pH 4.0. These findings indicate that the interaction of porphyrin also occurs at the hydrophobic core of cationic micelles. Indeed, the data obtained from the best fittings for SAXS curves allowed to conclude that the incorporation of porphyrin by the micelles is associated essentially to a shrinking of the paraffinic shortest semi-axis ( $R_{par}$  parameter). Nevertheless, the polar shell thickness ( $\sigma_{pol}$ ) and the electron density ( $\rho_{pol}$ ) parameters were practically unaltered in the whole porphyrin concentration range. The best-fit SAXS curves were achieved assuming for CTAC micelles a prolate ellipsoidal shape, where the axial ratio ( $\square$  value) did not exhibit significant changes over the range 2-10 mM of TPPS<sub>4</sub> and studied pH values.

EPR technique was also used to monitor the interaction of bovine serum albumin (BSA) with cationic cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) at pH 7.0. Spin-labeled derivatives of stearic acids (5-DSA and 16-DSA) bound to high-affinity binding sites of BSA revealed that in the presence of surfactant the EPR spectra are composed of two label populations. Spectral analysis was performed using the nonlinear least-squares (NLSL) simulation program, which allows one to obtain the rotational diffusion rate and the contribution of each component in the EPR spectra as well as to evaluate

environment polarity where the nitroxides are localized. The values of rotational correlation time,  $\tau$ , indicated that component 1 displays a more restricted mobility behavior due to spin labels contacting the protein; the less immobilized component 2 arises from label localization in the bulk of micelles. For 5-DSA, a significant immobilization of probes remains even at higher surfactant concentrations, which is consistent with its higher binding constant as compared to 16-DSA. The increase of surfactant concentration leads to the increase in motional levels of component 1 followed by a reduction of this fraction of spin labels.

## CONTEÚDO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>i</b>    |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | <b>iv</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>  | <b>v</b>    |
| <b>RESUMO</b>   | <b>vi</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>viii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>01</b>   |
| <b>1.1. Porfirinas e Seus Derivados</b>                               | <b>03</b>   |
| <i>1.1.1. Propriedade das Porfirinas</i>                              | <b>05</b>   |
| <b>1.2. Modelos Simples de Membrana Biológica</b>                     | <b>08</b>   |
| <i>1.2.1. Geometria das Micelas</i>                                   | <b>10</b>   |
| <i>1.2.1.1. Micelas Globulares</i>                                    | <b>12</b>   |
| <b>1.3. Albuminas</b>   | <b>16</b>   |
| <i>1.3.1. Sítios de Ligação para Ácidos Graxos</i>                    | <b>17</b>   |
| <b>2. ASPÉCTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS EMPREGADAS</b>                   | <b>21</b>   |
| <b>2.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)</b>                | <b>22</b>   |
| <i>2.1.1. Interação Zeeman</i>  | <b>23</b>   |
| <i>2.1.2. Fator <math>g</math></i>                                    | <b>27</b>   |
| <i>2.1.3. Acoplamento Hiperfino</i>                                   | <b>29</b>   |
| <b>2.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)</b>             | <b>36</b>   |
| <i>2.2.1. A função de distribuição de distância <math>p(r)</math></i> | <b>40</b>   |
| <i>2.1.2. O fator de forma <math>P(q)</math></i>                      | <b>42</b>   |
| <i>2.1.3. Fator de Estrutura <math>S(q)</math></i>                    | <b>45</b>   |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>46</b>   |
| <b>3.1. Preparação das Amostras</b>                                   | <b>47</b>   |
| <i>3.1.1. Preparação das Amostras de CTAC-TPPS<sub>4</sub></i>        | <b>47</b>   |
| <i>3.1.2. Preparação das Amostras de BSA-CTAC</i>                     | <b>48</b>   |
| <b>3.2. MÉTODOS</b>   | <b>48</b>   |
| <b>3.2.1. Experimentos de RPE</b>                                     | <b>48</b>   |
| <b>3.2.2. Análise dos Espectros de RPE</b>                            | <b>49</b>   |
| <i>3.2.2.1. Tensores Magnéticos e Largura de Linha</i>                | <b>51</b>   |
| <i>3.2.2.2. Sistemas de Coordenadas</i>                               | <b>54</b>   |
| <i>3.2.2.3. Modelos de Difusão</i>                                    | <b>55</b>   |
| <b>3.2.3. Experimento de SAXS</b>                                     | <b>58</b>   |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.2.3. Análise das Curvas de SAXS</b>                                | <b>58</b> |
| <b>4. RESULTADO E DISCUSSÃO</b>   | <b>60</b> |
| <b>4.1. Interação da Porfirina TPPS<sub>4</sub> com Micelas de CTAC</b> | <b>61</b> |
| <i>4.1.1. Análise dos Espectros de RPE</i>                              | <b>61</b> |
| <i>4.1.2. Análise das Curvas de SAXS</i>                                | <b>68</b> |
| <b>4.2. Interação do Surfactante CTAC com a Proteína BSA</b>            | <b>76</b> |
| <i>4.2.1. Análise dos Espectros de RPE</i>                              | <b>77</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>   | <b>86</b> |
| <b>5.1. Interação da Porfirina TPPS<sub>4</sub> com Micelas de CTAC</b> | <b>87</b> |
| <b>5.2. Interação do Surfactante CTAC com a Proteína BSA</b>            | <b>88</b> |
| <b>6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS</b>                                 | <b>90</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                    | <b>92</b> |



# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução**

Este trabalho engloba os dois principais temas de pesquisa que abrangem a área de biofísica molecular: as membranas e as proteínas. A interação de porfirinas com sistemas modelos simples de membrana biológica tem sido um dos principais alvos de estudos do Laboratório de Biofísica do Instituto de Química de São Carlos. O primeiro trabalho envolvendo a interação da porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) (TPPS<sub>4</sub>) com diferentes sistemas micelares foi realizado pela doutora Shirley de Cássia Monte Gandini [1]. A fim de avaliar a influência dos grupos substituintes das porfirinas no mecanismo de interação com as estruturas micelares, a porfirina catiônica meso-tetrakis (4-metil-N-piridil) (TMPyP) foi investigada pela estudante de mestrado Patrícia Soares Santiago [2]. Alguns dos principais resultados obtidos pelos estudos mencionados acima bem como as técnicas espectroscópicas utilizadas serão abordados nas seções seguintes. Assim, o presente trabalho é uma continuação destes estudos utilizando duas novas ferramentas, a ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Estas técnicas permitiram avaliar tanto as mudanças de fluidez quanto de estrutura das micelas catiônicas de cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) em função da concentração de porfirina.

Um outro sistema bastante estudado no Laboratório de Biofísica diz respeito à interação de surfactantes com as proteínas albumina de soro bovino (BSA, do inglês “bovine serum albumin”) e albumina de soro humano (HSA, do inglês “human serum albumin”). Nos últimos anos, diferentes técnicas espectroscópicas foram utilizadas para avaliar as mudanças nas regiões dos resíduos de triptofanos, na suas estruturas secundárias e mesmo no raio de giro destas proteínas em função da concentração de surfactante. Estes estudos encontram-se reunidos com uma diversidade de informações na dissertação de

doutorado do pesquisador Emerson Luiz Gelamo, no Instituto de Química de São Carlos [3].

### 1.1. Porfirinas e Seus Derivados

As porfirinas e seus derivados abrangem uma classe muito importante de moléculas por desempenhar um papel fundamental em diferentes processos biológicos. A Fe-porfirina, por exemplo, constitui o sítio ativo das hemoproteínas, sendo responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio na hemoglobina e mioglobina, respectivamente [4]. Esta porfirina também compõe o grupo prostético do citocromo, uma hemoproteína responsável pela transferência de elétrons na cadeia respiratória, bem como em enzimas como a catalase e peroxidase [5]. Na clorofila, organela citoplasmática presente de células vegetais, também encontramos um derivado de porfirina, a Mg-porfirina, a qual está associada ao processo de fotossíntese [6]. Estes dois exemplos demonstram claramente a importância das porfirinas para a manutenção, em nível fisiológico, de todas as formas de vida existentes no planeta (animal e vegetal), contribuindo decisivamente nos processos bioquímicos envolvidos.

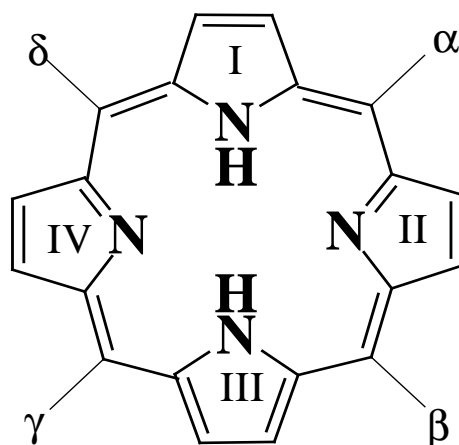


Figura 1.1. Estrutura básica das porfirinas.

As porfirinas são derivadas do núcleo porfina, uma estrutura macrocíclica formada por quatro anéis pirrólicos unidos através dos átomos de carbono, constituindo um sistema eletrônico altamente conjugado. Assim, as porfirinas se diferem pela disposição dos substituintes, conferindo-lhes certas propriedades individuais. A figura 1.1 representa a estrutura básica da porfirina bem como as notações mais comumente utilizadas para as suas posições [7]. Os quatro anéis pirrólicos são numerados empregando-se algarismos romanos de I a IV e os outros quatro carbonos das metinas, também denominadas de posições meso, são identificados pelas letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Note também na figura 1.1 que o núcleo porfina possui dois átomos de nitrogênio capazes de aceitar prótons e dois grupos NH capazes de perder prótons. Assim, quando o anel porfirínico é estabilizado por dois prótons de hidrogênio, o composto é chamado de porfirina base livre. Porém, quando é feita a remoção dos prótons do nitrogênio dos anéis (II e IV) e pela coordenação de diferentes íons de metais com os quatro átomos de nitrogênio, dá-se origem a uma grande variedade de metaloporfirinas.

Além da sua importância em processos biológicos vitais, as porfirinas e seus derivados têm atraído o interesse de muitos cientistas devido à sua utilização como drogas terapêuticas e agentes alvos. Algumas propriedades físico-químicas interessantes das porfirinas, tais como, alta afinidade por tecidos tumorais, atividade fotodinâmica, intensa absorção na região espectral onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes ( $\geq 600$  nm), alta fotoestabilidade e paramagnetismo (dependendo da porfirina), têm permitido a sua aplicação no tratamento e diagnóstico de diferentes tipos de doenças. Porfirinas têm sido aplicadas, por exemplo, como agentes de contraste em tomografia de fluorescência [8]; em imagem radiológica [9] e por ressonância magnética nuclear [10,11]; na detecção de

câncer e como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica (PDT, do inglês Photodynamic therapy) de câncer [12,13]. Além disso, estudos recentes sugerem que as porfirinas apresentam um grande potencial para aplicações em PDT no tratamento de psoríases, ateromas, infecções bacterianas e virais incluindo as causadas pelo HIV [14].

### *1.1.1. Propriedade das Porphirinas*

Para melhor compreender o mecanismo de interação de porfirinas com modelos biomiméticos, é necessário conhecer previamente algumas propriedades desta molécula em solução aquosa. Sabe-se que as porfirinas são um típico exemplo de cromóforos que exibem uma grande tendência em formar agregados com propriedades espectroscópicas particulares. A formação e a natureza dos agregados de porfirinas em solução aquosa podem ser afetadas pela estrutura dos seus respectivos substituintes, força iônica, temperatura, pH, dentre outros fatores. Uma vez que as porfirinas podem apresentar diferentes substituintes periféricos, isso permite a preparação de derivados de porfirinas com diferentes cargas, tamanhos e hidrofobicidade, gerando agregados porfirínicos com diferentes características.

O interesse em estudar porfirinas que exibem substituintes hidrofílicos, lipofílicos ou substituintes hidrofóbicos é compreender como estes grupos contribuem para o transporte das porfirinas nas membranas biológicas e como favorecem ou desfavorecem a formação de agregados em solução aquosa. Estudos anteriores têm demonstrado que a formação destes agregados altera seus espectros de absorção e emissão [15,16], rendimento quântico, tempo de vida do estado singlete e tripleto, bem como a produção de oxigênio singlete molecular [17,18], solubilidades em água e outras características. Estes agregados

podem ser originados tanto pela auto-agregação das porfirinas em solução aquosa bem como da interação de porfirinas com estruturas biológicas.

A figura 1.2 representa a estrutura da porfirina TPPS<sub>4</sub>, alvo de investigação do presente trabalho. Note que as posições meso do anel porfirínico são caracterizadas pela ligação de quatro grupos fenilsulfonato negativamente carregados, conferindo um caráter hidrofílico à porfirina. Fazendo uso das técnicas de absorção ótica, fluorescência, espalhamento de luz e ressonância magnética nuclear, estudos anteriores permitiram obter valiosas informações acerca do mecanismo de interação da TPPS<sub>4</sub> com as micelas catiônicas de cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) [1].

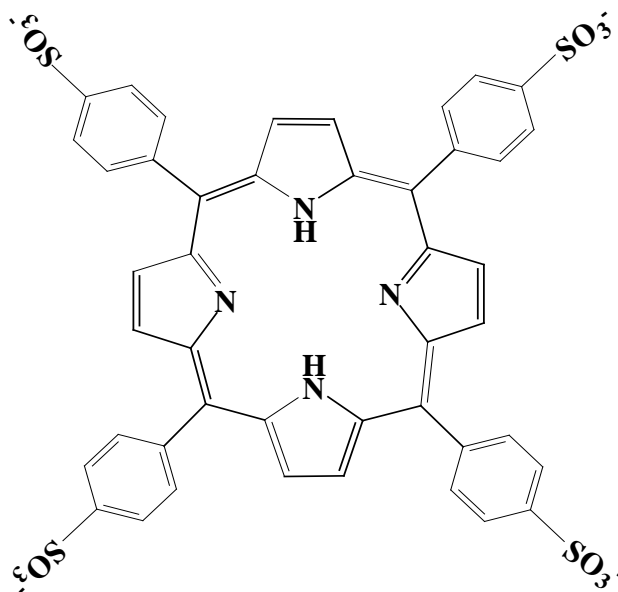


Figura 1.2. Estrutura da porfirina meso-tetrakis (4-fenilsulfonato)

Estes estudos revelaram, por exemplo, a presença de três espécies de TPPS<sub>4</sub> para concentrações crescentes de CTAC: monômeros de porfirina livre, monômeros de porfirina ligados às micelas e agregados TPPS<sub>4</sub>-CTAC. Neste trabalho, somente a segunda espécie será investigada. Um outro resultado interessante mostrou que a solubilização desta porfirina nas regiões do núcleo hidrocarbônico destas micelas é determinada em geral por interações hidrofóbicas não específicas, porém modulada por interações eletrostáticas.

Ainda em relação à porfirina TPPS<sub>4</sub>, a análise dos resultados de SAXS mostrou a formação de uma mistura de J e H-agregados em uma solução aquosa ácida (pH 4,0). Nestas condições os átomos de nitrogênio do núcleo porfirina estão protonados, criando sítios carregados positivamente no macrociclo do anel e, assim, promovendo uma atração eletrostática pela carga negativa dos grupos sulfonatos, facilitando a agregação [1]. Estes agregados são estruturas altamente organizadas, e são classificados de acordo com a orientação do dipolo de transição induzido no monômero constituinte. Os momentos de dipolo de transição dos monômeros agrupados em H-agregados são perpendiculares à linha que conecta os seus centros, ou seja, estão sobrepostos uns aos outros, produzindo um deslocamento para o azul no espectro de absorção do UV-Vis. Por outro lado, os momentos de dipolo de transição dos monômeros formando J-agregados são paralelos à linha que conecta os seu centro, formando um arranjo lado-a-lado e deslocando o espectro para vermelho em relação ao espectro de absorção do monômero [1]. A origem deste deslocamento da banda é explicada pela formação de um estado excitado pelo acoplamento eletrônico de moléculas altamente empacotadas.

Devido à sua alta afinidade por células cancerígenas, a porfirina TPPS<sub>4</sub> tem sido reconhecida como uma molécula promissora para o uso em PDT [12,13]. Complexos

metálicos radioativos derivados da TPPS<sub>4</sub> já têm sido utilizados como agentes de contraste em imagem radiológica e agente de contraste em tomografia de fluorescência. O contraste de células cancerígenas é claramente demonstrado por imagem de ressonância magnética nuclear (IRMN), usando a porfirina TPPS<sub>4</sub> complexada com Mn(III) e Fe(III) [10,11]. Além disso, estudos recentes sugerem a sua utilização no tratamento de psoríasis, ateromas e infecções bacterianas [15]. Portanto, estudos nesta área de pesquisa têm sido fundamentais para compreender as propriedades envolvidas na interação desta porfirina com membranas biológicas. Entretanto, como veremos a seguir, modelos mais simples de membrana biológica serão empregados, uma vez que os sistemas biológicos exibem uma grande complexidade seja em composição ou organização.

## **1.2. Modelos Simples de Membrana Biológica**

A complexidade das composições lipídica e protéica bem como a organização destas moléculas nas membranas biológicas restringe de forma significativa as investigações de fenômenos em nível molecular nestes sistemas através das técnicas espectroscópicas convencionais. Uma alternativa atrativa tem sido a utilização de sistemas biomiméticos que reproduzem certas propriedades das membranas biológicas e que exibem uma menor complexidade tanto em sua organização como em composição. No presente trabalho, agregados moleculares conhecidos por micelas foram utilizados como modelos simples de membrana biológica. Estas estruturas são formadas pelo equilíbrio termodinâmico de lipídios anfifílicos em solução, onde seu processo de agregação depende tanto das características das espécies envolvidas quanto das condições do sistema onde estão dissolvidas.



As forças repulsivas entre os grupos químicos que compõe a parte hidrofílica destes lipídios, os quais podem conferir um caráter neutro, catiônico, aniônico ou zwitteriônicos à molécula, combinadas às forças atrativas entre as cadeias hidrocarbônicas, representam alguns dos fatores que contribuem decisivamente no processo de micelização bem como no crescimento da micela. Este processo é favorecido quando a área transversal dos grupos das cabeças polares é maior do que a cadeia acila lateral. Para tanto, é necessário que um número mínimo de anfífilicos (usualmente conhecidos como monômeros de surfactantes) estejam associados uns aos outros logo que uma efetiva eliminação da interface água-cadeia hidrocarbônica seja alcançada. Entretanto, duas ou três moléculas de surfactantes não podem formar uma micela estável, independentemente se o núcleo hidrocarbônico está numa fase líquida ou ordenada. Portanto, o processo de micelização necessita ser cooperativo, requerendo a participação simultânea de muitas moléculas anfífilicas. Quando a quantidade de monômeros de surfactante em solução alcança uma concentração tal que ocorre a formação de agregados micelares, esta concentração é denominada de concentração micelar crítica (cmc). A cmc é um parâmetro característico de cada tipo de surfactante e define o balanço de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Os surfactantes com longas cadeias acila geralmente possuem uma cmc baixa, da ordem de  $10^{-3}$  M.

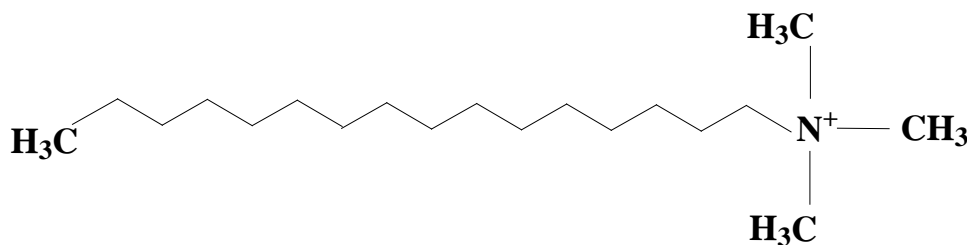


Figura 1.3. Estrutura de um monômero do surfactante catiônico CTAC.

A figura 1.3 representa a estrutura de um monômero do surfactante CTAC. Note que a região da cabeça polar da molécula anfifílica é constituída por um grupo amônio carregado positivamente e que sua cadeia acila apresenta 16 átomos de carbono. Os agregados micelares formados a partir dos monômeros de CTAC são caracterizadas por duas regiões bastante singulares: a região da camada de Stern, que compreende a região dos grupos das cabeças polares dos surfactantes, e um núcleo hidrocarbônico, formado pela cadeia acila destas moléculas. Esta é uma característica de micelas formadas por moléculas anfifílicas de apenas uma cadeia hidrocarbônica ligada ao grupo da cabeça polar. A seguir, algumas propriedades estruturais das micelas serão discutidas, abordando principalmente as formas geométricas que podem assumir.

### *1.2.1. Geometria das Micelas*

As micelas podem assumir formas de pequenas esferas, elipsóides, cilindros longos ou ainda de bicamadas. Neste último caso, as bicamadas formadas pelos monômeros de surfactante podem formar vesículas com uma cavidade interior preenchida ou não com solvente, dependendo da natureza hidrofílica ou hidrofóbica das moléculas envolvidas [19]. A seguir, serão apresentados alguns aspectos básicos relacionados às formas micelares. Entretanto, a discussão será restringida para o caso de moléculas anfifílicas com apenas uma cadeia hidrocarbônica. Para tanto, as seguintes suposições devem ser feitas [19]:

1. As micelas contem um núcleo hidrofóbico consistindo completamente pelas porções das cadeias hidrocarbônicas. É assumido que os grupos  $\text{CH}_3$  terminal estão sempre contidos

neste núcleo, entretanto, um ou mais grupos metilênicos próximos aos grupos das cabeças polares dos monômeros de surfactante podem não estar. É admitido também que nenhum solvente pode entrar no núcleo. As propriedades físicas do núcleo assemelham-se àquelas de uma pequena gota de um líquido hidrocarbônico, significando que o seu volume é calculável. Para uma micela contendo  $m'$  cadeias hidrocarbônicas, o volume do núcleo em angstroms ao cubo ( $\text{Å}^3$ ) é dado pela equação

$$V = (27.4 + 26.9n'_C)m' \quad (1.1)$$

onde  $n'_C$  representa o número de átomos de carbono da cadeia hidrocarbônica que está embebido no núcleo hidrocarbônico, podendo ser menor que  $n_C$ , o número total de átomos de carbono na cadeia. Essencialmente, a mesma relação pode ser obtida com base nas densidades dos líquidos hidrocarbônicos [19].

2. Uma vez que nenhum buraco pode existir no centro da micela, uma dimensão é sempre limitada pela extensão máxima possível da cadeia hidrocarbônica. Esta distância é obtida das distâncias de  $2.53 \text{ Å}$  entre átomos de carbono alternados de uma cadeia completamente estendida, com a adição do raio de van der Waals do grupo  $\text{CH}_3$  terminal ( $2.1 \text{ Å}$ ) e metade do comprimento do primeiro átomo não contido dentro do núcleo hidrocarbônico ( $\cong 0.6 \text{ Å}$ ). Portanto, o comprimento máximo  $l_{\text{max}}$  para uma cadeia com  $n'_C$  átomos de carbono embebidos, em angstroms ( $\text{Å}$ ), é

$$l_{\text{max}} = 1.5 + 1.265n'_C \quad (1.2)$$

3. A área de superfície por grupo cabeça dos monômeros de surfactante ( $S/m$ ) é um parâmetro crítico na termodinâmica de formação da micela no sentido que é uma medida da

separação entre os grupos cabeça adjacentes. O balanceamento das forças ditará um melhor valor para este parâmetro. A repulsão entre os grupos cabeças tende a aumentar  $S/m$ , mas isso não será importante quando  $S/m$  tornar-se suficientemente grande. Quando isso acontecer, haverá necessariamente um contato entre as moléculas de água e a superfície do núcleo, e a existência de uma pressão conseqüentemente reduzirá  $S/m$  [19]. O melhor valor de  $S/m$  será determinado por balanços adequados entre estes fatores. Um fator termodinâmico adicional é a concentração total de moléculas anfifílicas: um aumento na concentração representa uma pressão para o aumento no tamanho da micela, mesmo que ainda deste modo, requeira alguma diminuição em  $S/m$  [19].

#### 1.2.1.1. Micelas Globulares

Como foi mencionado anteriormente, o raio do núcleo hidrofóbico de uma micela esférica não pode exceder  $l_{\max}$  e o número máximo de cadeias hidrocarbônicas por micelas é então determinado, para cada valor de  $n'_c$ , pela combinação das equações (1.1) e (1.2). Para moléculas anfifílicas com uma simples cadeia hidrocarbônica, isso equivale ao valor máximo do número de agregação ( $m$ ). A tabela 1.1 mostra os valores calculados para vários valores de  $n'_c$ , onde a comparação destes valores com os números de agregação obtidos experimentalmente mostra que muitas micelas pequenas e compactas não podem ser verdadeiramente esféricas na sua forma. Por exemplo, o número de agregação médio ( $\bar{m}_w$ ) das micelas formadas pelo surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) varia de 62, na ausência de sal, para 126 na presença de 0.5 M de NaCl [19]. O valor máximo do número de agregação para uma micela esférica depende da escolha do valor de  $n'_c$ . Contudo, vemos

que mesmo para  $n'_C = n_C = 12$  o valor máximo de  $m$  é somente de 56. Com uma escolha mais realística, o valor máximo é reduzido; por exemplo, com  $n'_C = 10$  tem-se que  $m = 40$ .

Tabela 1. Números máximos de agregação para micelas esféricas e elipsoidais <sup>a,b</sup> [19]

|                                       | $n'_C =$ | 6  | 10  | 12  | 15  | 20  |
|---------------------------------------|----------|----|-----|-----|-----|-----|
| Esfera, <sup>c</sup> $r_0 = l_{\max}$ |          | 17 | 40  | 56  | 84  | 143 |
| Elipsóides, $b_o = l_{\max}$          |          |    |     |     |     |     |
| Prolato, $a_o / b_o = 1.25$           |          | 21 | 50  | 70  | 105 | 178 |
| $a_o / b_o = 1.5$                     |          | 25 | 60  | 84  | 126 | 214 |
| $a_o / b_o = 1.75$                    |          | 29 | 70  | 97  | 146 | 250 |
| $a_o / b_o = 2.0$                     |          | 33 | 80  | 111 | 167 | 285 |
| Oblato, $a_o / b_o = 1.25$            |          | 26 | 63  | 87  | 131 | 223 |
| $a_o / b_o = 1.5$                     |          | 38 | 90  | 125 | 188 | 321 |
| $a_o / b_o = 1.75$                    |          | 51 | 123 | 171 | 256 | 437 |
| $a_o / b_o = 2.0$                     |          | 67 | 160 | 223 | 335 | 570 |

<sup>a</sup>  $n'_C$  representa o número de átomos de carbono na porção da cadeia alquila que está embebida no núcleo hidrocarbônico. Este número geralmente será menor que o comprimento total da cadeia hidrocarbônica

<sup>b</sup> Os valores tabulados são o número de cadeias hidrocarbônicas por micela. Isto é igual ao número de agregação  $m$  por molécula de anfifílico com uma simples cadeia hidrocarbônica.

<sup>c</sup> Na verdade é fisicamente impossível formar uma micela esférica com  $r_0 = l_{\max}$  e os números máximos de agregação para pequenas esferas fisicamente possíveis são portanto muito menores que os valores tabulados.

Para incorporar um grande número de cadeias hidrocarbônicas em uma micela, é necessário haver distorções estruturais. As possibilidades mais simples são os elipsóides de

revolução, onde o menor semi-eixo ( $b_0$ ) de um dado elipsóide não pode exceder o valor de  $l_{\max}$ , enquanto o semi-eixo maior ( $a_0$ ) não é limitado, possibilitando assim um aumento do volume. A tabela 1.1 mostra os cálculos relacionados para os valores selecionados de  $n'_c$  e para os elipsóides prolato e oblato. Como pode ser observado, pequenos valores da razão dos eixos elipsoidais ( $a_0/b_0$ ) são suficientes para induzir um ganho substancial no número de agregação micelar, os quais podem ser obtidos experimentalmente.

A formação de um elipsóide ( $b_0 = l_{\max}$ ) a partir de uma esfera ( $r_0 = l_{\max}$ ) é acompanhada por uma diminuição na área de superfície por cadeia hidrocarbônica ( $S/m'$ ) e, como conseqüência, existe uma diminuição da separação entre os grupos cabeça das moléculas anfifílicas. Uma vez que os grupos cabeça se estendem para fora da superfície do núcleo hidrocarbônico, geralmente se faz necessário conhecer o valor de  $S/m'$  à uma distância  $d$  fora desta superfície, isto é, para a superfície de uma esfera com um raio  $r = r_0 + d$  ou para a superfície de um elipsóide definido pelos semi-eixos  $a = a_0 + d$  e  $b = b_0 + d$ .

A figura 1.4 representa um exemplo típico da dependência de  $S/m'$  com  $m'$ , onde o aumento de  $m'$  requer a formação de um elipsóide com uma maior razão axial. Estes cálculos foram realizados para  $n'_c = 12$  e  $d = 2 \text{ \AA}$ . Os valores de  $m'$  são aqueles apresentados na tabela 1.1 para esferas e elipsóides com  $r_0$  ou  $b_0 = l_{\max}$ . Dados adicionais têm sido gerados fazendo cálculos para micelas globulares com núcleos hidrofóbicos muito menores que o tamanho máximo, isto é, esferas com  $r_0 < l_{\max}$  e elipsóides com  $b_0 < l_{\max}$ . A

figura 1.4 também ilustra os cálculos da área de superfície para cilindros e bicamadas planares.

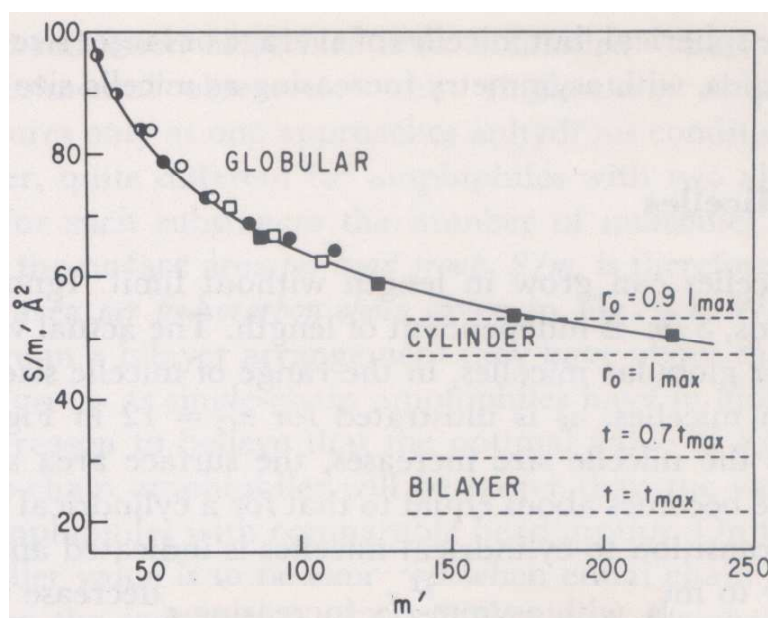


Figura 1.4. Área da superfície por cadeia hidrocarbônica como uma função do tamanho e forma da micela. Os cálculos são realizados para  $n'_c = 12$  e representam áreas a uma distância de  $2\text{Å}$  fora do núcleo hidrocarbônico. Os símbolos referem-se aos cálculos para as formas esféricas e de elipsóides, ambos com  $r_0$  ou  $b_0$  igual à  $l_{\max}$  (tabela 1.1). Os quadrados preenchidos referem-se aos elipsóides oblatos, enquanto os círculos preenchidos aos elipsóides prolatos e para a esfera com  $b_0 = l_{\max}$ . Os outros símbolos referem-se a outros cálculos para  $r_0$  e  $b_0$  menores que  $l_{\max}$  [19].

Para moléculas anfífilas com uma cadeia hidrocarbônica simples, a figura 1.4 mostra um gráfico da área de superfície do grupo cabeça ( $S/m$ ) em função do número de agregação  $m$ . Quando todas as moléculas anfífilas formam micelas globulares, temos que o número de agregação médio é da ordem de 100, onde a figura 1.4 mostra que para micelas nesta faixa de tamanho,  $S/m$  está próximo de ser uma função simples de  $m$  para

um dado valor de  $n_c$ , o qual é minimamente afetado pela forma real da micela. Analisando esta situação, está evidente que micelas esféricas e elipsoidais representam uma família de conformações dentro do qual o número de agregação é continuamente variável, com uma variação paralela em  $S/m$ . Qualquer sistema real formado de micelas globulares consistirá sem dúvida alguma de uma distribuição de tamanhos e formas acerca do melhor valor de  $S/m$ , valor este onde um maior número de micelas para um dado número de agregação é observado. As micelas menores podem ser esféricas, enquanto que micelas maiores ou de tamanho intermediário serão elipsóides prolatos ou oblatos, onde a assimetria crescerá com o aumento do tamanho da micela.

### 1.3. Albuminas

As albuminas séricas correspondem às proteínas mais abundantes no sistema circulatório e constituem cerca de 60 % do total das proteínas séricas [20,21]. A albumina é sintetizada pelo fígado numa forma não-glicosilada e está presente no plasma sanguíneo a uma concentração de  $40 \text{ mg.ml}^{-1}$  ( $\sim 0,6 \text{ mM}$ ), possuindo uma vida média de aproximadamente 19 dias [20,22-24]. Além disso, as albuminas séricas são responsáveis por cerca de 80 % da pressão osmótica do sangue [20]. Sua principal função é transportar ácidos graxos não-esterificados bem como uma variedade de metabólitos e drogas tais como anti-coagulantes, tranqüilizantes e anestésicos em geral [25]. As albuminas séricas têm sido uma das proteínas mais estudadas nos últimos 40 anos em virtude de terem sua estrutura primária bastante conhecida. A estrutura das albuminas séricas é constituída por cerca de 580 aminoácidos. Além disso, é caracterizada por uma pequena quantidade de triptofanos e uma grande variedade de cisteínas e aminoácidos carregados como ácido



aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina [21,22]. A estrutura secundária da HSA é constituída por 67 % de estruturas  $\alpha$ -hélice e um largo número de pontes dissulfeto (17 no total) [21,25]. Somente há poucos anos, a estrutura da albumina de soro humana (HSA, do inglês “human serum albumin”) complexada com ácido mirístico foi determinada através de cristalografia de raios-X [25]. Estes estudos revelaram que sua estrutura terciária é composta de três domínios, usualmente conhecidos por domínio I, II e III, cada um deles constituído por dois subdomínios formados por 3  $\alpha$ -hélices unidas por pontes dissulfeto. Estes subdomínios são geralmente referidos como IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB.

### *1.3.1. Sítios de Ligação para Ácidos Graxos*

A figura 1.5 representa a estrutura cristalográfica da HSA complexada com o ácido esteárico [25]. Este estudo tem revelado a existência de sete sítios de ligação para ácidos graxos com uma cadeia metilênica variando entre 16 e 18 átomos de carbono, um número superior àqueles reportados em trabalhos anteriores, onde um total de apenas cinco sítios foi encontrado. Por outro lado, para ácidos graxos com 10 à 14 átomos de carbono na cadeia alquila, os dados indicaram a presença de novos sítios, alcançando um total de 11 sítios de ligação. Estes resultados demonstram claramente a dependência do comprimento da cadeia hidrocarbônica com a ocupação dos sítios na HSA. Um outro aspecto notável destes resultados, diz respeito à distribuição assimétrica destes sítios de ligação, um resultado já descrito por inúmeros estudos bioquímicos.

O sítio 1 está localizado no subdomínio IB e é considerado ser relativamente aberto e mais acessível ao solvente quando comparado aos outros bolsões da HSA. Localizado entre os subdomínios IA e IIA, o sítio 2 é um dos mais estreitos para a ligação de ácidos graxos

na proteína, uma vez que o grupo carboxilato do ligante está fortemente protegido do solvente. No subdomínio IIA, ambos os sítios 3 e 4 estão ocupados pelo ácido esteárico. No caso do sítio 3, o grupo metilênico assume uma conformação dobrada em forma de U, uma vez que a dimensão deste sítio acomoda somente cerca de 12-14 grupos metilênicos. O sítio 4 é o mais longo e mais estreito que o sítio 3, onde o ácido esteárico se liga em uma conformação estendida ao longo da dimensão do canal. O grupo metilênico deste ácido esteárico atravessa todo o subdomínio, onde o grupo metilênico deste ácido esteárico emerge dentro do solvente na superfície oposta do canal. Além disso, os dados cristalográficos sugerem que o ácido esteárico pode se ligar no sítio 4 em uma configuração invertida.

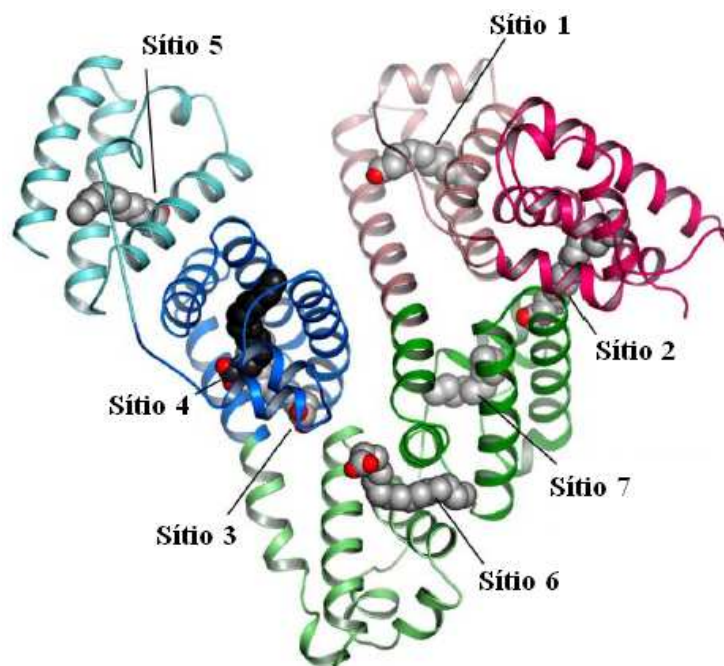


Figura 1.5. Estrutura cristalográfica da HSA complexada com ácido esteárico [25].

Formado por um canal hidrofóbico que abrange todo o comprimento do subdomínio IIB, o sítio 5 é ocupado por um simples ácido esteárico com uma conformação completamente estendida. De forma similar ao sítio 4, o grupo metilênico do ácido esteárico se projeta na superfície oposta do canal, ficando exposto ao solvente. Entretanto, não existem evidências para a inversão desta molécula no sítio 5. Além disso, um sexto ácido esteárico pode ser encontrado em uma região não muito profunda na superfície da proteína, na interface entre os subdomínios IIA e IIB. Este sítio difere significativamente dos sítios 1-5 uma vez que este não apresenta aminoácidos que coordenam a ligação do ácido graxo por meio do grupo carboxilato. Por fim, um sétimo ácido esteárico foi identificado dentro de uma cavidade hidrofóbica no subdomínio IIA. Embora a posição deste sítio seja análoga a cavidade no subdomínio IIA (que contém os sítios 3 e 4), este sítio é consideravelmente menor.

A notável habilidade das albuminas para ligar ácidos graxos tem motivado nosso grupo a utilizar marcadores de spin derivados do ácido esteárico para monitorar as mudanças conformacionais na vizinhança dos sítios de alta afinidade em resposta à adição de surfactantes. Apesar dos numerosos estudos por RPE envolvendo a albumina de soro bovino (BSA), a orientação dos marcadores de spin nestes sítios de ligação da proteína permanece ainda não esclarecida. Estudos de RMN usando fragmentos de BSA marcados com o  $^{13}\text{COOH}$ -oleato têm evidenciado a existência de dois sítios de alta afinidade para a ligação de ácidos graxos no domínio II [26]; onde os autores [27] assumiram a existência de pelo menos um canal hidrofóbico na proteína. De fato, estudos cristalográficos da proteína HSA revelaram a existência de sítios de ligação no subdomínio IIB desta proteína na forma de canal [25]. Entretanto, não foi observada a ligação do ácido mirístico neste

canal. Comparações envolvendo os sítios de ligação da BSA e HSA podem ser realizadas devido à alta identidade seqüencial entre estas proteínas, o qual é estimada ser de aproximadamente 76 %. Em função desta alta identidade seqüencial, trabalhos anteriores envolvendo modelagem molecular revelaram que as moléculas de surfactantes ligam-se a BSA a uma razão molar de 5:1, independentemente do tipo de surfactante [28].

# **CAPÍTULO 2**

## **Aspectos Teóricos das Técnicas Empregadas**

Nesta seção serão apresentados alguns aspectos teóricos importantes associados às técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês *small-angle X-ray scattering*). Estes conhecimentos são de fundamental importância para uma melhor compreensão dos fenômenos biofísicos observados a partir das análises dos resultados. Na primeira parte, serão apresentados alguns fundamentos importantes da mecânica quântica relacionados à técnica de RPE [29,30]. Entretanto, devido à vasta quantidade de informações contidas nesta teoria, esta seção abordará somente a natureza de algumas das principais interações magnéticas que compõe o hamiltoniano do sistema. Em seguida, uma abordagem clássica será empregada para descrever o fenômeno de espalhamento produzido por um conjunto de partículas monodispersas em solução [31].

### **2.1. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)**

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) tem sido largamente utilizada no estudo não somente de espécies intrinsecamente paramagnéticas tais como metaloproteínas e metaloporfirinas, mas também de radicais livres intermediários formados em reações bioquímicas. Entretanto, grande parte dos sistemas biológicos de interesse não apresenta centros paramagnéticos, tornando-se necessária a utilização de sondas específicas, usualmente conhecidas como marcadores de spin. Estas moléculas são amplamente empregadas como sondas devido à grande sensibilidade do espectro de RPE à sua mobilidade bem como à extraordinária estabilidade química do fragmento paramagnético (radical nitróxido), mesmo quando submetido a condições extremas de pH e temperatura. Ambos os fatores explicam porque os radicais nitróxidos, desde o seu

desenvolvimento há mais de 35 anos, tem sido uma importante ferramenta em muitos estudos de Biofísica, especialmente de membranas e proteínas [32]. Apesar de existir uma diversidade de estruturas químicas, todos os radicais nitróxidos são constituídos por um grupo N-O contendo um elétron desemparelhado. Algumas das interações magnéticas deste elétron com um campo magnético externo e com a sua vizinhança (núcleo de nitrogênio) serão abordadas nas seções seguintes.

### 2.1.1. Interação Zeeman

Um resultado bastante conhecido na mecânica quântica é a quantização do momento angular de spin do elétron, indicando que esta quantidade pode assumir somente certos valores discretos. Representando o momento angular de spin do elétron pelo operador  $\hat{S}$ , podemos escrever as seguintes relações

$$\hat{S}^2 |s, m_s\rangle = \hbar^2 s(s+1) |s, m_s\rangle \quad (2.1)$$

$$\hat{S}_z |s, m_s\rangle = m_s \hbar |s, m_s\rangle \quad (2.2)$$

onde  $m_s = -s, -s+1, \dots, s-1, s$ . O número quântico  $s$  é chamado spin da partícula e evidências experimentais mostram que o valor de  $s$  para um único elétron é  $s = 1/2$ . Note que as equações (2.1) e (2.2) parecem ser verdadeiras, uma vez que  $\hbar$  tem a mesma dimensão do momento angular e, portanto, os autovalores de  $\hat{S}_z$  e  $\hat{S}$  são múltiplos de  $\hbar$ . O operador  $\hat{S}_z$  representa a componente z do operador momento angular de spin  $\hat{S}$  e  $\hat{S}^2 = (\hat{S}_x + \hat{S}_y + \hat{S}_z)^2$ . Além disso, temos que  $|s, m_s\rangle$  representa um conjunto completo de

autofunções comuns aos operadores  $\hat{S}_z$  e  $\hat{S}^2$ , uma vez que o comutador  $[\hat{S}, \hat{S}_z]$  é igual à zero.

Com  $s = 1/2$ , a magnitude do momento angular de spin de um elétron é dado pela raiz quadrada

$$[s(s+1)\hbar]^2 = [1/2(3/2)\hbar^2]^2 = \frac{\sqrt{3}}{2}\hbar \quad (2.3)$$

Além disso, para  $s = 1/2$ , a equação (2.2) mostra que os possíveis autovalores de  $\hat{S}_z$  para um elétron são  $+1/2\hbar$  e  $-1/2\hbar$ . As autofunções de spin eletrônico correspondentes a estes autovalores são denotadas por  $|\alpha\rangle$  e  $|\beta\rangle$ , respectivamente. Assim,

$$\hat{S}_z|\alpha\rangle = +1/2\hbar|\alpha\rangle \quad (2.4)$$

$$\hat{S}_z|\beta\rangle = -1/2\hbar|\beta\rangle \quad (2.5)$$

Sabemos ainda que uma partícula apresenta um momento de dipolo magnético quando o seu momento angular é diferente de zero. Assim, para o momento angular de spin  $\vec{S}$  (notação vetorial), podemos escrever

$$\vec{\mu} = -g_e\beta_e\vec{S} \quad (2.6)$$

onde  $g_e$  é o fator giromagnético para o elétron livre e vale 2,0023.  $\beta_e$  é o magneton de Bohr, o qual pode ser calculado classicamente pela razão  $eh/4\pi m_e c = 9,2732 \times 10^{-21}$  erg.gauss<sup>-1</sup>. Quando um elétron experimenta um campo magnético estático  $\vec{B}$ , teremos que a interação do momento de dipolo magnético  $\vec{\mu}$  com este campo é dado pelo hamiltoniano

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (2.7)$$



Adotando um sistema de referência tal que a direção z coincida com a direção do campo estático  $\vec{B}$ , isto é,  $\vec{B} = B_0 \hat{z}$ , teremos

$$H = -\mu_z \cdot B_0 \quad (2.8)$$

Utilizando a notação de operadores, podemos reescrever a equação (2.8) como sendo

$$\hat{H} = g_e \beta_e B_0 \hat{S}_z \quad (2.9)$$

Uma vez que o operador hamiltoniano acima comuta com o operador  $\hat{S}_z$ , temos que  $|\alpha\rangle$  e  $|\beta\rangle$  também são autofunções deste operador. Para encontrarmos a energia do sistema, basta aplicarmos o operador hamiltoniano sobre estes dois estados de spin, assim

$$\hat{H}|\alpha\rangle = g_e \beta_e B_0 \hat{S}_z |\alpha\rangle \quad (2.10)$$

$$\hat{H}|\beta\rangle = g_e \beta_e B_0 \hat{S}_z |\beta\rangle \quad (2.11)$$

Fazendo uso das equações (2.4) e (2.5), encontramos que

$$\hat{H}|\alpha\rangle = \frac{g_e \beta_e B_0}{2} |\alpha\rangle \quad (2.12)$$

$$\hat{H}|\beta\rangle = -\frac{g_e \beta_e B_0}{2} |\beta\rangle \quad (2.13)$$

onde podemos inferir das equações acima que as energias correspondentes a estes dois estados são dadas por

$$W_\alpha = \frac{g_e \beta_e B_0 \hbar}{2} \quad (2.14)$$

$$W_\beta = -\frac{g_e \beta_e B_0 \hbar}{2} \quad (2.15)$$

Assim, vemos que a degenerescência de um sistema formado por um elétron livre é levantada em  $2S + 1$  níveis de energia pela interação do momento de dipolo magnético  $\vec{\mu}$  com um campo magnético estático  $\vec{B}$ , sendo esta energia geralmente referida como interação Zeeman. Este fenômeno ocorrerá somente quando a condição de ressonância

$$\Delta W = W_\alpha - W_\beta = g_e \beta_e B_0 \hbar = h\nu \quad (2.16)$$

for satisfeita. A figura 2.1 representa um esquema no qual estão apresentados os dois níveis de energia para o elétron.

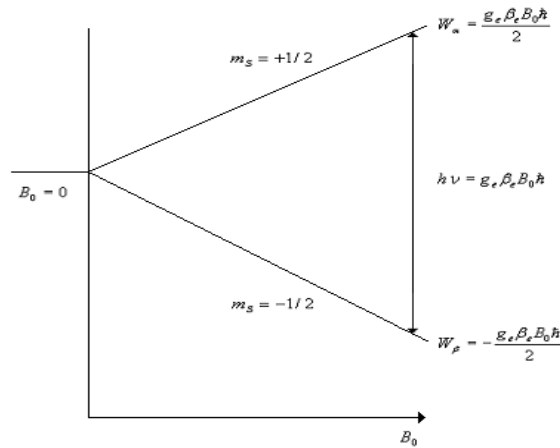


Figura 2.1. Níveis de energia da interação Zeeman para os estados  $m_s = +1/2$  e  $m_s = -1/2$ .

Em termos clássicos, o nível de energia associado a  $m_s = +1/2$  corresponde ao alinhamento do momento magnético paralelamente ao campo, enquanto que para  $m_s = -1/2$ , corresponde ao alinhamento antiparalelo do momento magnético. No entanto, é importante mencionar que o momento magnético não é estático e, ao invés disso, apresenta um movimento de precessão em torno do campo magnético  $\vec{B}$ .

### 2.1.2. Fator $g$

Toda a discussão feita anteriormente diz respeito a um sistema composto de um único elétron isolado. Vamos considerar agora o caso clássico de um elétron sob a influência de um campo elétrico esfericamente simétrico gerado pelos núcleos atômicos e por outros elétrons na sua vizinhança. Esta situação pode ser hipoteticamente estendida ao caso do elétron desemparelhado presente no grupo N-O dos radicais nitróxidos. Nesta situação é possível mostrar que, caso o elétron se mova com certa velocidade, teremos então que ele experimenta um campo magnético local. Assim, a interação do momento magnético do elétron com o campo magnético produzido pela sua vizinhança é conhecida como interação spin-órbita. Neste trabalho, não entraremos nos detalhes das equações que envolvem esta situação. Invés disso, somente uma análise qualitativa deste fenômeno será realizado.

Em uma situação onde a degenerescência foi levantada, o efeito do acoplamento spin-órbita é causar a mistura de orbitais com idênticas dependências radiais, mas diferentes dependências angulares. O efeito desta mistura de orbitais é que as propriedades magnéticas serão descritas em termos de um momento magnético associado a um spin efetivo de modo que  $(2S + 1)$  é o número de níveis de energia em um campo magnético aplicado. O spin efetivo obedece às mesmas equações de autovalores análogas aquelas para o spin verdadeiro do elétron. Entretanto, o momento magnético não é exatamente antiparalelo ao spin efetivo, e sua magnitude não está simplesmente relacionada àquela para um elétron livre, mas depende da orientação do campo magnético aplicado relativo ao sistema. O momento magnético está relacionado ao spin efetivo através da operação de um tensor de segunda ordem, o qual é conhecido como tensor  $\vec{g}$ . Portanto, a equação (2.6) é reescrita como

$$\hat{\mu} = -\beta_e \vec{g} \hat{S} \quad (2.17)$$

onde o hamiltoniano Zeeman geral é,

$$\hat{H} = \beta_e \vec{B} \cdot \vec{g} \cdot \hat{S} \quad (2.18)$$

Note que estamos utilizando a mesma notação para o spin efetivo e spin verdadeiro do elétron. No entanto, nas discussões seguintes é importante ter em mente que esta grandeza  $\vec{S}$  representa o spin efetivo do elétron.

Devido à anisotropia de  $\vec{g}$ , o campo ressonante para uma dada frequência de microonda dependerá da orientação da amostra no campo. A invariância do traço do tensor  $\vec{g}$  sob uma rotação dos eixos da molécula paramagnética significa que caso ela esteja em uma solução altamente fluida, onde o seu movimento é rápido e aleatório, a posição da ressonância é determinada pela média dos elementos da diagonal do tensor  $\vec{g}$ , o qual é chamado fator  $g$ , isotrópico. Assim, podemos reescrever a equação (2.18) como sendo

$$H = g \beta_e \vec{B} \cdot \vec{S} \quad (2.19)$$

onde

$$g = (1/3) \text{Traço}(\vec{g}) \quad (2.20)$$

Assumindo um sistema de referência cartesiano tal que o eixo  $x$  coincide com a ligação N-O do radical nitróxido (figura 2.2), o eixo  $z$  se encontra ao longo do orbital  $2p_z$  do átomo de nitrogênio e o eixo  $y$  é perpendicular aos eixos  $x$  e  $z$  simultaneamente, podemos reescrever a equação (2.20) anterior como sendo,

$$g = (1/3)[g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}] \quad (2.21)$$

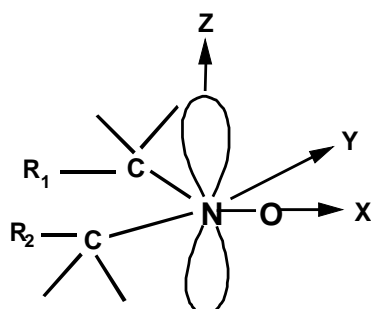


Figura 2.2. Esquema de um radical nitróxido com as orientações dos eixos principais dos tensores de segunda ordem  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$ .

Para transições  $\Delta M_s = 1$  entre as autofunções deste hamiltoniano, podemos obter a condição de ressonância

$$H_{res} = \frac{h\nu}{g\beta} \quad (2.22)$$

O requerimento para que a ressonância acima seja observada para o valor correspondente ao fator g isotrópico é que o movimento da molécula em solução seja suficientemente rápido e aleatório.

### 1.2.3. Acoplamento Hiperfino

Análogo aos elétrons, os átomos apresentam um momento magnético associado ao momento angular do spin nuclear. Estas duas grandezas vetoriais são colineares e podem ser combinadas pela equação,

$$\vec{\mu}_N = \gamma_N \vec{I}_N = g_N \beta_N \vec{I}_N \quad (2.23)$$

onde  $\gamma_N$  e  $g_N$  são a razão nuclear giromagnética e o fator g nuclear, os quais são características individuais de cada tipo de núcleos;  $\beta_N$  é o magneton nuclear, que é equivalente ao magneton de Bohr para um próton, ou seja,  $\beta_N = e\hbar / 2M_p c$ .

Se nós considerarmos uma molécula paramagnética, como um radical orgânico livre contendo um núcleo magnético, o elétron desemparelhado experimentará um campo magnético local devido a este núcleo. Esta situação pode ser estendida ao caso dos radicais nitróxidos, onde a probabilidade de encontrarmos o elétron é maior próximo ao núcleo de nitrogênio do grupo N-O. No entanto, a magnitude do campo local experimentado pelo elétron é determinada pelos detalhes da estrutura eletrônica total deste radical, pelo momento magnético do núcleo e pela orientação do spin nuclear em relação ao campo externo aplicado. Portanto, a ressonância eletrônica ocorre quando o campo total, levando-se em conta as contribuições dos campos aplicados pelo espectrômetro e o campo local, tem um valor dado pela condição de ressonância (2.22). O valor do campo aplicado requerido para causar a ressonância em um dado radical orgânico dependerá, portanto, dos estados de spin dos núcleos magnéticos naquele radical. Assim, quando o campo magnético for varrido pelo espectrômetro para registrar um espectro, a quantidade de linhas de absorção será igual ao número de estados de spin dos núcleos magnéticos, isto é, o espectro conterá  $(2I + 1)$  linhas. Além disso, estas linhas terão a mesma intensidade caso os estados de spin nuclear estejam igualmente populados.

A interação clássica entre dois momentos magnéticos pode ser derivada considerando a energia de um momento magnético interagindo com o campo magnético do outro. Temos

que o potencial escalar em um ponto definido pelo vetor  $\vec{r}$  devido ao momento magnético  $\vec{\mu}_1$  situado na origem é dado por

$$\Phi = -\vec{\mu}_1 \cdot \text{grad}(1/r) \quad (2.24)$$

O campo magnético derivado deste potencial é

$$\vec{B} = -\text{grad}(\Phi) \quad (2.25)$$

portanto, através de cálculos diretos, encontramos que

$$\vec{B} = \frac{3(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})\vec{r}}{r^5} - \frac{\vec{\mu}_1}{r^3} \quad (2.26)$$

A energia do segundo momento magnético neste campo é

$$E = -\vec{\mu}_2 \cdot \vec{B} = -\frac{3(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} + \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} \quad (2.27)$$

Podemos obter o hamiltoniano para a interação magnética de um núcleo e um spin eletrônico pela substituição de  $\vec{\mu}_1$  e  $\vec{\mu}_2$  pelos seus respectivos operadores. Esta interação hiperfina é usualmente denominada de interação anisotrópica ou dipolar. Se nós tomarmos o caso de um núcleo com uma razão giromagnética positiva situada na origem, podemos substituir

$$\vec{\mu}_1 = g_N \beta_N \vec{I}_N \text{ e } \vec{\mu}_2 = -g_e \beta_e \vec{S} \quad (2.28)$$

e assim obter

$$H = g_N \beta_N g_e \beta_e \left\{ \frac{3(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{(\vec{I} \cdot \vec{S})}{r^3} \right\} \quad (2.29)$$

Expandindo o produto escalar da equação acima em um sistema de coordenadas cartesianas, encontramos que

$$H = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\{ \frac{(3x^2 - r^2)}{r^5} I_x s_x + \frac{(3y^2 - r^2)}{r^5} I_y s_y + \frac{(3z^2 - r^2)}{r^5} I_z s_z \right\} + g_e \beta_e g_N \beta_N \left\{ \frac{3xy}{r^5} (I_x s_y + I_y s_x) + \frac{3yz}{r^5} (I_y s_z + I_z s_y) + \frac{3xz}{r^5} (I_x s_z + I_z s_x) \right\} \quad (2.30)$$

onde  $r = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}$ . Analisando esta equação, podemos concluir que o hamiltoniano de spin para o acoplamento dipolar pode ser escrito na forma tensorial

$$H = \vec{I} \cdot \vec{A}^0 \cdot \vec{S} \quad (2.31)$$

onde o tensor de acoplamento  $\vec{A}^0$  é simétrico, já que existem somente seis diferentes coeficientes do operador de spin na equação (2.30). Os elementos da diagonal principal deste tensor podem ser escritos como

$$A_{ii}^0 = g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3i^2 - r^2}{r^5} \right\rangle, \quad i = x, y, z \quad (2.32)$$

onde a parte dentro do braket denota o valor esperado sobre toda as autofunções eletrônicas

$$\langle A \rangle = \iiint \psi^*(x, y, z) A \psi(x, y, z) dx dy dz \quad (2.33)$$

Existe ainda um segundo tipo de interação hiperfina que surge da probabilidade finita de se encontrar o elétron na posição do núcleo. Esta interação é isotrópica e é chamada de interação de contato ou de Fermi [29]. O hamiltoniano que descreve esta interação é dado por



$$H = g_e \beta_e g_N \beta_N \frac{8\pi(\vec{I} \cdot \vec{S})\delta(\vec{r})}{3} \quad (2.34)$$

onde  $\delta(\vec{r})$  é a função delta de Dirac. Este hamiltoniano pode também ser escrito da seguinte forma,

$$H = a\vec{I} \cdot \vec{S} \quad (2.35)$$

onde  $a$  é a constante de acoplamento isotrópico, dado por

$$a = \left(\frac{8\pi}{3}\right) g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \quad (2.36)$$

Note que esta constante depende do quadrado do módulo da função de onda eletrônica na posição do núcleo ( $|\psi(0)|^2$ ), isto é, da probabilidade de se encontrar o elétron no núcleo.

Assim, o hamiltoniano de interação hiperfina pode ser escrito como a soma desses dois tipos de interação, dipolar e de contato:

$$H = \vec{I} \cdot \vec{A}^0 \cdot \vec{S} + a\vec{I} \cdot \vec{S} = \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} \quad (2.37)$$

onde  $\vec{A}$  está relacionado com  $\vec{A}_0$  pela a adição de  $a$  em cada elemento da diagonal. Recordando o que foi dito anteriormente para o tensor  $\vec{g}$ , podemos observar que a magnitude da interação hiperfina também depende da orientação da molécula em relação à direção do campo magnético aplicado. Entretanto, para o caso de um radical nitróxido em um fluido isotrópico, temos que o traço do tensor do tensor  $\vec{A}$  é invariante sob uma rotação dos eixos da molécula. Assim, temos que a constante de interação hiperfina  $A_0$  (também referido como desdobramento hiperfino isotrópico) é dada por

$$A_0 = (1/3)[A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}] \quad (2.38)$$

É importante mencionar que alguns comportamentos espectrais importantes podem ser observados quando aplicamos o campo magnético em diferentes direções em relação aos eixos moleculares do radical nitróxido. Estas mudanças estão associadas ao fato das interações ao longo da direção destes eixos serem geralmente diferentes, como uma consequência da perda de simetria do orbital atômico do átomo de nitrogênio quando presente na molécula de radical nitróxido. Caso o campo magnético externo seja aplicado ao longo do eixo  $z$  desta molécula, onde está localizado cerca de 80% da densidade eletrônica, temos um maior desdobramento da constante de acoplamento hiperfino isotrópico (maior  $A_{zz}$ ). Por outro lado, a constante hiperfina é menor quando o campo é aplicado ao longo das direções  $x$  e  $y$ . A mudança da direção do campo magnético também acarreta mudanças no fator  $g$ . A componente  $g_{zz}$  geralmente possui o menor valor porque é a que mais se aproxima do elétron livre, ao passo que  $g_{xx}$  é a componente que tem o valor com a maior diferença em relação ao elétron livre.

Adicionando o hamiltoniano hiperfino (2.37) ao hamiltoniano da interação Zeeman (2.19) para um sistema isotrópico, temos que

$$H = g\beta\vec{B}\cdot\vec{S} + A_0\vec{S}\cdot\vec{I} \quad (2.39)$$

Assim, a energia do sistema é obtida operando o hamiltoniano acima nos estados de spin. Vimos anteriormente que os autovalores de  $\hat{S}_z$  estão relacionados com os números quânticos  $m_s = \pm 1/2$ . Para o átomo de nitrogênio, temos que o spin nuclear do átomo de nitrogênio é igual a 1 e, portanto, os autovalores do momento angular do spin nuclear  $\hat{I}_z$  são dados em termos de  $m_I = -1, 0$  e  $1$ . Assim, temos seis possíveis estados de spin, os

quais são comumente representados por  $|m_s, m_l\rangle$ . Aplicando o hamiltoniano (2.39) sob cada um destes estados, encontramos as seguintes energias

$$W_{1/2,1} = (1/2)g\beta_e B_0 \hbar + (1/2)A_0$$

$$W_{-1/2,-1} = (-1/2)g\beta_e B_0 \hbar + (1/2)A_0$$

$$W_{1/2,0} = (1/2)g\beta_e B_0 \hbar$$

$$W_{-1/2,0} = (-1/2)g\beta_e B_0 \hbar$$

$$W_{1/2,-1} = (1/2)g\beta_e B_0 \hbar - (1/2)A_0$$

$$W_{-1/2,1} = (-1/2)g\beta_e B_0 \hbar - (1/2)A_0$$

Entretanto, em virtude das regras de seleção  $\Delta m_s = \pm 1$  e  $\Delta m_l = 0$ , existem somente três possíveis transições permitidas. Estas transições estão representadas na figura 2.3, onde um típico espectro de RPE (derivada da absorção) também está apresentado.

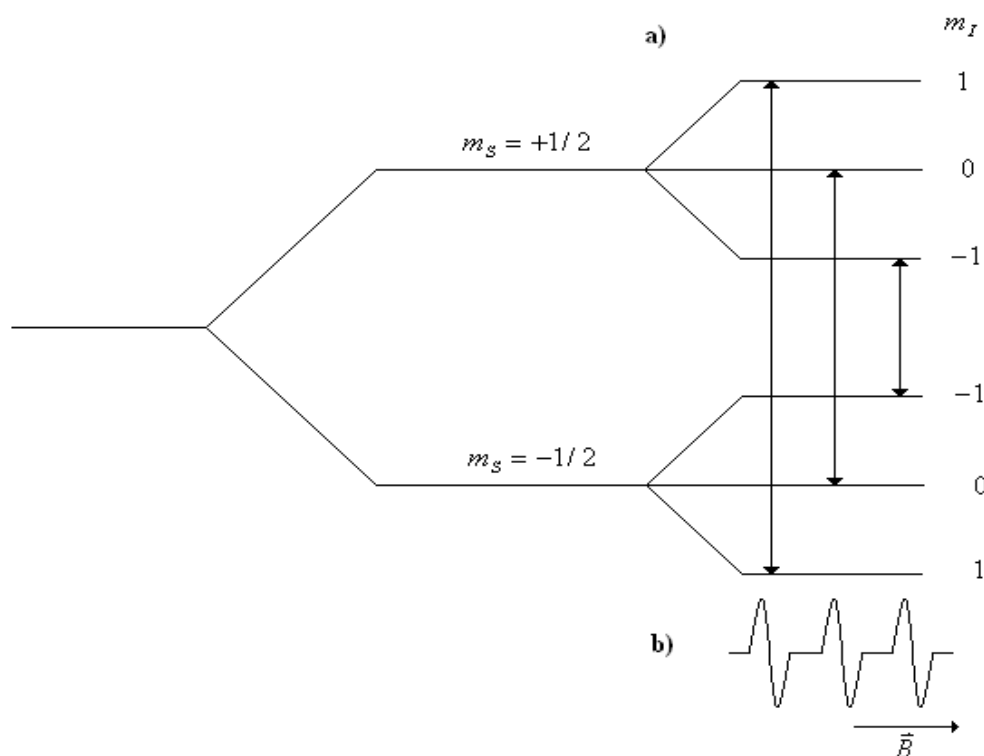


Figura 2.3. (a) Níveis de energia e transições permitidas para um radical nítróxido em um campo magnético constante num meio isotrópico. Em (b) está representado seu espectro de RPE correspondente à derivada da absorção.

## 2.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Uma outra ferramenta bastante eficiente para investigar o mecanismo de interação da porfirina TPPS<sub>4</sub> com as micelas de CTAC é o espalhamento de raio-X a baixo ângulo. Esta técnica tem demonstrado ser bastante útil na determinação de características estruturais de partículas cujas dimensões variam de dezenas a centenas de ângstrons (Å). O processo de espalhamento envolve uma relação inversa entre tamanho de partícula e ângulo de espalhamento, o qual pode ser visualizado da seguinte maneira: os elétrons de um sistema ressoam com a frequência dos raios-X que passa por este sistema e emitem ondas secundárias coerentes, que interferem entre si. Supondo uma partícula esférica, pode-se assumir que a onda espalhada por um ângulo  $2\theta$  possui uma diferença de caminho de  $\lambda$  (figura 2.4) [31]. Sendo assim, se considerarmos o espalhamento de todos os elétrons, a superposição das ondas com todas as fases possíveis conduzirá a um espalhamento na direção  $2\theta$  produzindo uma interferência. Se considerarmos ângulos de espalhamento menores, as diferenças de fase tornam-se menores e as ondas sobrepõem-se umas as outras.

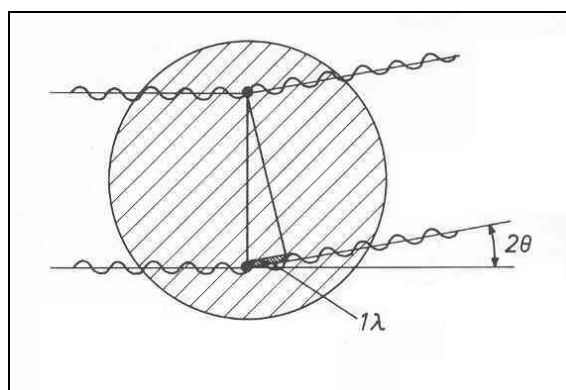


Figura 2.4. Modelo de espalhamento de raios-X de uma partícula esférica homogênea [31].

Esta técnica baseia-se no fato de que em uma solução isotrópica de partículas esféricas ou esferóides de baixa anisometria (razão entre o eixo maior e menor do esferóide) a intensidade do espalhamento de raios-X a baixo ângulo é dada por [31]:

$$I(q) = nP(q)S(q) \quad (2.40)$$

onde  $q$  é o vetor de espalhamento definido como sendo  $q = 4\pi / \lambda \sin 2\theta$  e  $n$  é um fator que depende da densidade de partículas e de efeitos do instrumento. A função  $P(q)$  é conhecida como fator de forma, a qual está relacionada com a geometria da partícula e com a distribuição de densidades  $\rho(r)$  no seu interior. No caso do espalhamento de raios-X a baixo ângulo,  $\rho(r)$  refere-se à distribuição de densidade eletrônica [34]. Pode-se deduzir expressões mais simples para a função  $P(q)$  no caso de partículas com uma simetria bem definida. Neste trabalho, discutiremos os fatores de forma para esferas e elipsóides.

A função  $S(q)$  é conhecida como função de interferência interpartículas. Para o caso de partículas que não interagem entre si, temos que  $S(q) \approx 1$ , e a intensidade de espalhamento  $I(q)$  é simplesmente proporcional a  $P(q)$ . Neste caso, esta intensidade é expressa pela equação de Guinier [35],

$$I(q) = n.P(q) = e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad (2.41)$$

onde  $R_g$  é o raio de giro da partícula. Esta expressão é conhecida como lei de Guinier e é válida na região de  $q$  que satisfaz a condição  $q.R_g \leq 1,0$ . Numa curva de espalhamento, a região para valores baixos de  $q$  ( $q \rightarrow 0$ ), conhecida como região de Guinier, podemos obter o

raio de giro da partícula através do gráfico de Guinier ( $\ln I$  vs  $q^2$ ) diretamente do coeficiente angular da reta obtida nesta região [35].

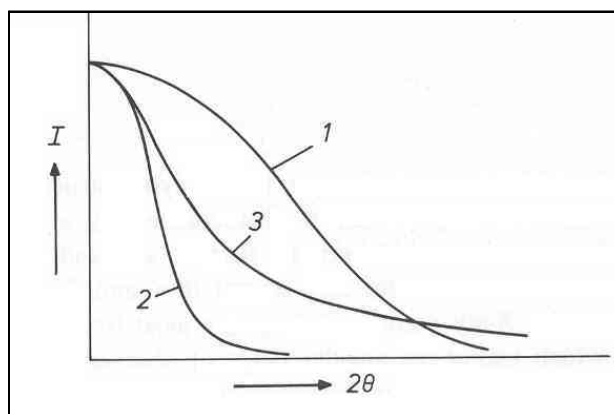


Figura 2.5. Modelo de curvas de SAXS para partículas de tamanhos diferentes em função do ângulo de espalhamento, onde  $R_{g1} < R_{g3} < R_{g2}$  [31].

A figura 2.5 apresenta três modelos de curvas de SAXS obtidos para partículas com tamanhos diferentes. Os cálculos dos raios de giro obtidos da região de Guinier mostram que a partícula 1 é menor que a partícula 3, que por sua vez é menor que a partícula 2. Portanto, quanto mais deslocada for a curva para as regiões de ângulos menores, maior é o raio de giro da partícula [31].

Podemos obter uma outra informação a partir deste gráfico. A faixa que compreende valores de  $q$  maiores, também conhecida como região de Porod, onde a intensidade de espalhamento é independente da forma da partícula e é dominada pelo

espalhamento da superfície das partículas. Neste região a intensidade de espalhamento  $I(q)$  é dada por,

$$I(q)_{q \rightarrow \infty} = nP(q) = 2\pi(\Delta\rho)^2 S / q^4 \quad (2.42)$$

com

$$\pi \frac{\lim_{q \rightarrow \infty} q^4 I(q)}{\int_0^{\infty} q^2 I(q) dq} = \frac{S}{V} \quad (2.43)$$

onde  $S$  é a superfície total e  $S/V$  a superfície específica da partícula [36]

A lei de Porod pode ser generalizada para superfícies fractais do mesmo modo que pode ser modificada se a interface não é abrupta ou se a densidade de espalhamento no interior da partícula não é homogênea [37]. Uma generalização desta lei pode ser feita para o estudo de SAXS de micelas [38]:

$$\lim_{q \rightarrow \infty} \frac{q^4 I(q)}{c_e} = 2\pi \left( \frac{S}{V} \right)_{par} \frac{A}{\rho_{par}} [(\rho_{pol} - \rho_{par})^2 + (\rho_{pol} - \rho_0)^2 Y^n] \quad (2.44)$$

onde

$$Y = 1 + \frac{[(1-A)(1 - \rho_0 V_{pol})]}{A} (\rho_{pol} - \rho_0) \quad (2.45)$$

Nas equações (2.44) e (2.45), temos que  $A$  é o número de elétrons da cadeia parafínica em relação ao número de elétrons da molécula total,  $S/V$  é a superfície específica da parte parafínica,  $\rho_{pol}$  é a densidade eletrônica da região polar,  $\rho_{par}$  é a densidade eletrônica da região parafínica,  $\rho_0$  é a densidade eletrônica do solvente,  $V_{pol}$  é o volume específico

parcial da região polar,  $c_e$  é a concentração eletrônica e  $n = 0$  para lamela,  $1/2$  para cilindro e  $2/3$  para esfera.

### 2.2.1. A função distribuição de distâncias $p(r)$

Como mencionamos anteriormente, para sistemas suficientemente diluídos de objetos monodispersos, a intensidade  $I(q)$  está relacionada com a forma e com o tamanho do objeto, o qual pode ser representado por uma transformada de Fourier da função distribuição das distâncias  $p(r)$  [35],

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (2.46)$$

ou

$$p(r) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{\infty} I(q) (qr)^2 \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dq \quad (2.47)$$

onde  $D_{\max}$  corresponde à dimensão máxima do objeto espalhador de tal forma que  $p(r)$  é igual a zero para  $r \geq D_{\max}$ .

A função  $p(r)$  contém informações sobre a forma da partícula espalhadora e do contraste de densidade entre o seu interior e o meio circundante [31]. Uma classificação qualitativa da forma e estrutura interna desta partícula pode ser obtida diretamente de  $p(r)$ , como mostra a figura 2.6. A dimensão máxima da partícula é obtida das curvas, uma vez que  $p(r)$  se anula para  $r \geq D_{\max}$ . No caso de esferas,  $p(r)$  tem um máximo em torno de  $D_{\max}/2$ . Por outro lado, para objetos anisométricos,  $p(r)$  decai linearmente com a distância



entre o tamanho da seção transversal do objeto e sua dimensão máxima [31]. Para objetos de seção transversal constante e de forma arbitrária, o ponto de inflexão entre o máximo e a região de decaimento fornece uma estimativa do tamanho da seção transversal [31].

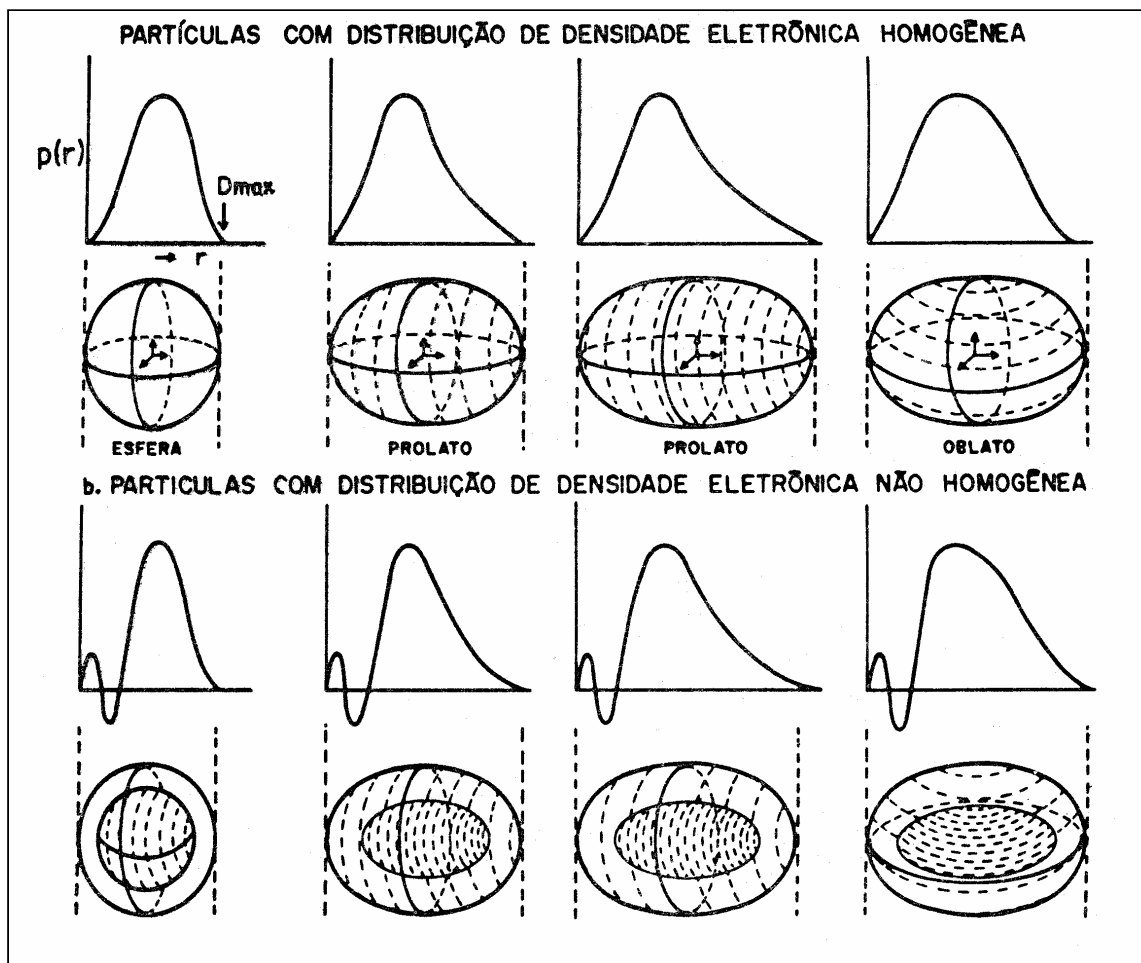


Figura 2.6. Exemplos de funções de distribuição de distâncias  $p(r)$  para partículas com distribuição de densidade eletrônica homogênea e não homogênea [31].

### 2.2.2. O fator de forma $P(q)$

As três formas mais importantes relevantes para este trabalho correspondem à esfera, elipsóide prolato de revolução e o cilindro. Podemos deduzir expressões simples para fatores de forma de partículas com simetria definida.

#### Esfera

Dada uma esfera de raio  $R$  e considerando  $\Delta\rho$  constante, a amplitude de espalhamento é expressa pela equação

$$P_{esf}(q) = 4\pi\Delta\rho \int_0^R r^2 \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (2.48)$$

Resolvendo a integral acima, encontramos que

$$P_{esf}(q) = \Delta\rho V \varphi(u) \quad (2.49)$$

sendo,

$$\varphi(u) = 3[\text{sen}(u) - u \cos(u)]/u^3 \quad (2.50)$$

onde  $u = qR$  e  $V$  é o volume da esfera.

Supondo que as esferas sejam constituídas por duas camadas de diferentes densidades eletrônicas,  $\rho_1$  e  $\rho_2$ , em relação ao meio  $\rho_0$  (ver a figura 2.7), o fator de forma pode ser descrito como[35]

$$P(q) = F_{esf}^2(q) = [(\rho_1 - \rho_0)V_1 \varphi(qR_1) + (\rho_2 - \rho_0)V_2 \varphi(qR_2)]^2 \quad (2.51)$$

onde  $V_1$  e  $V_2$  correspondem aos volumes das regiões  $R_1$  e  $R_2$  (figura 2.8), respectivamente.

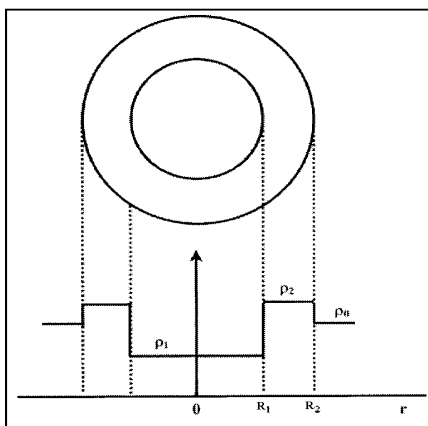


Figura 2.7. Função distribuição de densidade eletrônica  $\rho(r)$  de uma partícula esférica, composta por dois níveis de densidades diferentes  $\rho_1$  e  $\rho_2$  em relação ao meio  $\rho_0$  [35].

### Elipsóide de Revolução

Seja um elipsóide com  $\Delta\rho$  constante e semi-eixos  $R$  e  $\nu R$  ( $\nu$  = razão axial, também chamado de anisometria), que pode ser transformado em uma esfera de volume equivalente cujo raio efetivo  $R_{ef}$  é dado por

$$R_{ef} = R [\cos^2 \psi + \nu^2 \sin^2 \psi]^{\frac{1}{2}} \quad (2.52)$$

sendo  $\psi$  o ângulo formado entre o eixo longo do elipsóide e a direção do vetor de espalhamento.

Para qualquer orientação de um elipsóide, a amplitude será a mesma de uma esfera com um determinado raio efetivo  $R_{ef}$  (equação 2.52). Se o elipsóide não tem orientação preferencial, podemos obter o fator de forma através da média de todos os possíveis valores de  $\psi$ .

$$P(q) = \int_0^{\pi} \{ \Delta \rho V \varphi [qR\Theta_1(\psi)] \}^2 \cos(\psi) d\psi \quad (2.53)$$

onde

$$\Theta_1(\psi) = (\cos^2 \psi + v^2 \text{sen}^2 \psi)^{1/2} \quad (2.54)$$

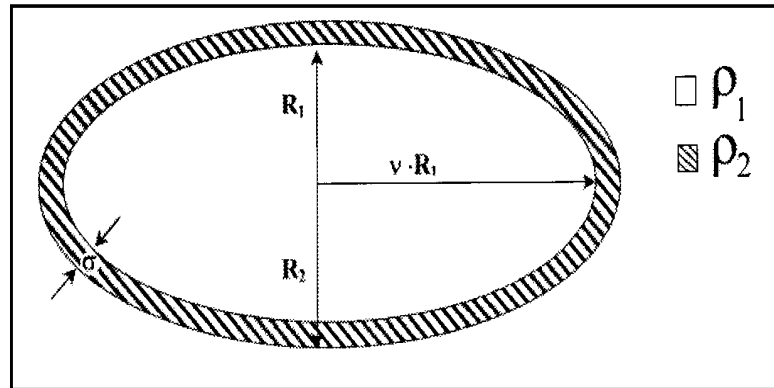


Figura 2.8. Representação esquemática de um elipsóide prolato de revolução com dois níveis de densidade eletrônica diferentes  $\rho_1$  e  $\rho_2$  em relação ao meio  $\rho_0$  [35].

Utilizando o modelo de duas camadas [35] indicado na figura 2.8, analogamente ao caso de esferas teremos que

$$P(q) = \int_0^{\pi} [(\rho_1 - \rho_2)V_1\varphi(qR_1\Theta_1(\psi)) + (\rho_2 - \rho_0)V_2\varphi(qR_2\Theta_2(\psi))]^2 \cos(\psi) d\psi \quad (2.55)$$

onde

$$\Theta_1(\psi) = (\cos^2 \psi + v^2 \text{sen}^2 \psi)^{\frac{1}{2}} \quad (2.56)$$

$$\Theta_2(\psi) = (\cos^2 \psi + v_{tot}^2 \text{sen}^2 \psi)^{\frac{1}{2}}$$

sendo  $v_{tot} = (vR_1 + \sigma) / R_2$  a razão axial da partícula inteira e  $R_2 = R_1 + \sigma$ , onde  $\sigma$  é a espessura da segunda camada de densidade eletrônica  $\rho_2$ .

### 2.2.3. Fator de estrutura $S(q)$

O fator de interferência ou função de interferência  $S(q)$  entre as partículas coloidais em um meio depende do potencial de interação entre as partículas e de suas posições relativas via a função de distribuição radial  $g(r)$

$$\bar{S}(q) = 1 + 4\pi n_p \frac{\langle F(q) \rangle^2}{\langle F^2(q) \rangle} \int_0^\infty [g(r) - 1] r^2 \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (2.57)$$

onde  $g(r)$  representa a probabilidade de se encontrar uma partícula a uma distância  $r$  do centro da partícula de referência. Como duas partículas não podem se interpenetrar, nenhum vizinho pode ser encontrado mais próximo que a distância máxima de aproximação  $D$  (diâmetro da partícula), tal que  $g(r < D) = 0$ . No outro extremo, a densidade de partículas longe da partícula de referência é indistinguível da densidade média e, portanto,  $g(r \rightarrow \infty) = 1$ .

# **CAPÍTULO 3**

## **Materiais e Métodos**

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Preparação das Amostras de CTAC-TPPS<sub>4</sub>

A porfirina aniônica meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) (TPPS<sub>4</sub>) foi adquirida da Midcentury Chemicals e utilizada sem tratamento prévio. Uma pequena quantidade da porfirina TPPS<sub>4</sub> foi dissolvida em água Mili-Q para preparar uma solução estoque concentrada. A concentração final do estoque foi determinada através do espectro de absorção UV-VIS da porfirina, o qual foi obtido em um espectrômetro Hitachi U-3501 (Laboratório de Biofísica, Instituto de Química de São Carlos) com uma varredura espectral de 300-750 nm. O valor da absorbância foi então registrado em 414 nm, onde tem-se que o coeficiente de extinção molar é de  $\epsilon_{414} = 5.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Como o espectro de absorção ótica da TPPS<sub>4</sub> é caracterizado por uma forte absorção nestes comprimentos de onda (banda de Soret), uma cubeta de quartzo com caminho ótico 0.5 cm foi empregada.

As amostras utilizadas para os experimentos de RPE e SAXS foram preparadas em um tampão salino contendo 30 mM de acetato-fosfato-borato (concentrações equimolares), o qual foi obtido pela mistura destes sais (Mallinkrodt) em água Mili-Q. O tampão foi então ajustado para o pH 4,0 e 9,0 pela adição de uma solução concentrada de HCL e NaOH e medida usando um pHmetro (Digimed). Uma segunda solução estoque contendo o surfactante catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) adquirido da Acros Organics (New Jersey, USA) foi preparada medindo-se uma massa apropriada e dissolvendo-a no tampão apropriado de forma a se obter uma concentração final de 100 mM de CTAC. Assim, uma faixa de 2-10 mM de TPPS<sub>4</sub> foi alcançada pela diluição da solução estoque de porfirina diretamente na solução tamponada contendo CTAC.

### 3.1.2. Preparação das Amostras de BSA-CTAC

As amostras de BSA (St. Louis, MO, USA) foram preparadas em 20 mM de tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0) de modo a se obter uma concentração final de 0,15 mM. O mesmo tampão foi utilizado na preparação de 30 mM de micelas puras de CTAC. Uma pequena alíquota de uma solução concentrada de marcador de spin dissolvido em etanol foi depositada em um tubo de eppendorf, onde o solvente foi evaporado sob um fluxo contínuo de gás nitrogênio. Uma faixa de concentração variando de 2-50 mM de surfactante foi obtida pela diluição de uma solução estoque concentrada na solução tampão contendo a BSA. As amostras contendo 0,15 mM de BSA juntamente com a quantidade apropriada de surfactante foram adicionadas diretamente sobre o filme de marcador de spin formado no tubo de eppendorf. A concentração final de marcador de spin na solução foi de  $10^{-4}$  M. Após uma leve agitação, as amostras foram introduzidas em tubos capilares para as medidas de RPE.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Experimento de RPE

Os marcadores de spin derivados do ácido esteárico 5-DSA e 16-DSA (DSA, do inglês “doxyl stearic acid”) foram adquiridos da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI, USA). Estes marcadores de spin apresentam o grupo paramagnético ligado às posições C-5 e C-16 da cadeia hidrocarbônica, respectivamente. Uma pequena alíquota de uma solução de marcadores de spin dissolvidos em etanol (10 mM) foi depositado em um tubo de eppendorf e o solvente evaporado sob um fluxo contínuo de gás nitrogênio. Assim, as



amostras contendo 100 mM de CTAC e a concentração específica de porfirina foram adicionadas ao fino filme de marcador de spin formado no interior do tubo de eppendorf, onde a concentração final de marcador foi estimada ser de  $10^{-4}$  M. Após uma moderada agitação, as amostras foram introduzidas dentro de tubos capilares para as medidas de RPE.

Os espectros de RPE foram registrados em um espectrômetro Varian E-109 (Laboratório de Biofísica Molecular Sérgio Marcarenhas, Instituto de Física de São Carlos) operando em banda X e equipado com uma cavidade de microondas retangular padrão. As amostras dentro de capilares foram colocadas em um tubo de quartzo de RPE e centralizadas na cavidade de ressonância. Os parâmetros de operação do equipamento foram: potência da microonda, 20 mW; frequência de modulação, 100 KHz; amplitude de modulação, 1,0 G e varredura do campo magnético, 100 G.

### 3.2.2. *Análise dos Espectros de RPE*

Os espectros de RPE foram simulados através do programa NLSL (do inglês, Nonlinear Least-Squares). Somente há pouco mais de uma década este programa tem sido empregado nas análises de espectros de RPE no regime de movimento lento [39,40,41], que compreende situações em que os marcadores de spin apresentam tempos de correlação rotacional no intervalo entre  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  s. Esta faixa engloba sistemas em que os radicais nitróxidos estão presentes em fluidos de fase ordenada tais como cristais líquidos e membranas biológicas ou mesmo quando ligados a macromoléculas.

Este programa gera um espectro teórico a partir da solução da equação estocástica de Liouville (SLE, do inglês “Stochastic Liouville Equation”) utilizando os valores de

entrada dos parâmetros definidos pelo usuário. A SLE é uma equação matricial construída em um conjunto de bases que consiste de produtos de funções de spin, que representam propriedades da ressonância magnética, e das funções envolvendo os harmônicos esféricos generalizados, que representam a difusão rotacional da sonda paramagnética. Como as variáveis destas duas funções estão correlacionadas e a equação não pode ser resolvida analiticamente, o programa NLSL utiliza cálculos numéricos para encontrar a solução da SLE. Em seguida, o programa ajusta o espectro teórico ao experimental através de um algoritmo de minimização envolvendo o método de mínimos quadrados não lineares. Este método é empregado pelo fato do resíduo da diferença quadrática de ambos os espectros, que constitui a função objetiva a ser minimizada, ser formada por uma soma de funções quadráticas não lineares. Dentro deste método existem ainda diferentes modelos de minimização, tais como Gauss-Newton, quase-Newton (do inglês, “quasi-Newton”) dentre outros, os quais são modificados do algoritmo padrão de minimização Levenberg-Marquardt. No caso do programa NLSL, o modelo utilizado é o quase-Newton, também conhecido como modelo da região de confiança. Assim, o procedimento de minimização da função objetiva é repetido até se atingir o grau de convergência pré-definido no programa.

A eficiência deste procedimento pode ser aumentada através do método de separação de variáveis. Neste método, as variáveis que possuem uma relação não linear (por exemplo, os tensores magnéticos) são separadas daquelas que apresentam uma dependência linear com a forma do espectro (por exemplo, as amplitudes relativas de duas espécies no mesmo espectro). Os valores otimizados neste segundo tipo de variáveis são calculados utilizando um algoritmo de fatorização QR que consiste em decompor a matriz de coeficientes incógnitas em uma multiplicação envolvendo uma matriz ortonormal  $Q$  e

uma triangular superior R. Em relação às variáveis não lineares, o programa utiliza o modelo da região de confiança, limitando o tamanho do passo da variável a ser otimizada. O método de separação de variáveis também é bastante útil para espectros de RPE com multicomponentes, o qual possibilita obter a população relativa de cada componente. Outra vantagem encontrada no programa NLSL diz respeito à interface gráfica, permitindo acompanhar o processo de otimização com a concomitante ilustração do espectro calculado.

### *3.2.2.1. Tensores Magnéticos e Larguras de Linha*

O programa modela a reorientação de um sistema composto por um único elétron e um único núcleo (tipicamente um nitróxido) descrito por três tipos de interações: (a) Zeeman do spin eletrônico, com fator giromagnético (fator g) anisotrópico (dependente da orientação), (b) hiperfina elétron-núcleo e (c) Zeeman isotrópica do spin nuclear. Para tanto, o programa NLSL utiliza diferentes tipos de sistemas de coordenadas, os quais serão abordados mais adiante. Como resultado da simulação, os tensores magnéticos  $\vec{g}$  (do fator g) e  $\vec{A}$  (da interação hiperfina) são determinados. Estes tensores representam uma anisotropia espectral e suas componentes podem ser determinadas a partir do espectro de amostras monocristalinas ou em sistemas onde o marcador apresenta movimentos rápidos, sendo que neste último caso são encontrados apenas seus valores médios. Por outro lado, quando a sonda paramagnética apresenta uma dinâmica intermediária, os valores destes tensores não podem ser obtidos de uma simples observação direta do espectro experimental.

Os valores das componentes dos tensores  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$  podem ser obtidos de um espectro onde o movimento do radical nitróxido é bastante restrito, correspondente ao marcador imobilizado. No caso dos radicais nitróxidos, os valores mais comuns dos tensores magnéticos estão nos seguintes intervalos:  $g_{xx} = 2,007$  a  $2,010$  G,  $g_{yy} = 2,004$  a  $2,008$  G,  $g_{zz} = 2,002$  a  $2,003$  G,  $A_{xx} = 5$  a  $8$  G,  $A_{yy} = 4$  a  $6$  G,  $A_{zz} = 32$  a  $36$  G [12]. Na simulação é conveniente fazer uma estimativa inicial adequada dos tensores a partir das posições das linhas e, logo durante o processo de refinamento, variar um parâmetro de cada vez, já que podem estar fortemente correlacionados. Uma outra aproximação é fixá-los, e variar somente os parâmetros dinâmicos e de ordenamento (no caso de sistemas com ordenamento microscópico) durante o procedimento de ajuste. Na realidade, na nossa experiência observamos que, para formas de linha com movimento lento, o programa pode também ser utilizado eficientemente para obter os parâmetros magnéticos do espectro num limite rígido efetuando cálculos no limite das várias pequenas taxas de difusão rotacional.

Os tensores  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$  neste programa de simulação podem ser representados de três formas equivalentes: cartesiana (por exemplo, para  $g$ :  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$ ,  $g_{zz}$ ); axial, que pressupõe essa simetria ( $g_{pll}$ ,  $g_{prp}$ ) e esférica modificada ( $g_1$ ,  $g_2$ ,  $g_3$ ). Neste trabalho, por conveniência de interpretação, é usada a forma cartesiana.

A largura de linha dos espectros de RPE está relacionada com o tempo de correlação rotacional do marcador de spin: quanto maior a largura de linha, maior o tempo de correlação, isto é, menor a mobilidade da sonda. Estes tempos são caracterizados pelo tensor de difusão rotacional ( $\vec{D}$ ), que será abordado com mais detalhe na próxima seção. Adicionalmente, existem vários parâmetros na simulação que complementam a largura das

linhas. Estes parâmetros representam não homogeneidades locais tanto do campo magnético interno da amostra quanto do campo externo gerado pelo equipamento. Dois parâmetros são isotrópicos, isto é, afetam igualmente todas as orientações, e outros dois são anisotrópicos. O coeficiente  $lb$  (expresso em Gauss) representa uma largura de linha lorentziana isotrópica adicional (portanto maior que zero), sendo que seu uso é mais apropriado quando as linhas têm forma de derivadas de lorentziana, isto é, com variação mais suave nas bordas. De forma similar, o coeficiente  $gib0$  (em Gauss) é mais conveniente quando as linhas têm uma forma mais aproximada a derivada de gaussiana, ou seja, mais abrupta nas bordas. Este coeficiente também possui significado físico unicamente para valores maiores que zero. Analogamente, existe uma matriz de largura de linha lorentziana adicional anisotrópica,  $W$  (em Gauss). Esta matriz pode alargar seletivamente a linha do espectro de RPE correspondente a cada componente ( $W_{xx}$ ,  $W_{yy}$  e  $W_{zz}$ ). Por exemplo,  $W_{zz}$  alarga as linhas extremas (a de campo mais baixo e de campo mais alto) que correspondem a  $g_{zz}$  e  $A_{zz}$  (no caso de nitróxidos) bem como a linha central.  $W$  também pode ser representada de três formas diferentes. Por último, o coeficiente  $gib2$  (em Gauss) representa uma largura de linha gaussiana adicional dependente da orientação, onde  $gib = gib0 - gib2 \cdot \cos^2 \psi$ , onde  $\psi$  é o ângulo formado entre o eixo diretor e o campo magnético externo (ver a seção *Sistemas de Coordenada*). Ele faz sentido unicamente quando temos medidas com diferentes orientações em relação ao eixo do campo externo ou no modelo *MOMD* (do inglês, “Microscopic Order with Macroscopic Disorder”), o qual não será abordado neste trabalho. O coeficiente pode ser associado à não homogeneidade do campo magnético externo. A diferença  $gib0 - gib2$  deve ser positiva.

### 3.2.2.2. Sistemas de Coordenadas

Na representação completa do problema são definidos cinco sistemas de coordenadas associados a diferentes grandezas tensoriais. Três destes sistemas estão fixados na molécula (marcador de spin), ou seja, giram em relação ao meio onde a sonda está localizada e, evidentemente, ao laboratório. Os outros dois estão ligados ao laboratório. As transformações entre os diferentes sistemas são expressas por três rotações sucessivas utilizando os ângulos de Euler  $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ <sup>13</sup> (i) uma rotação em torno do eixo  $z$  através de um ângulo  $\gamma$ ; (ii) uma rotação em torno do eixo  $y$  através de um ângulo  $\beta$  e (iii) uma rotação em torno do eixo  $z$  através de um ângulo  $\alpha$ . Desta forma  $\beta$  é o ângulo formado entre os eixos longitudinais ( $z$  e  $z'$ ) do sistema original e do transformado, ao passo que  $\alpha$  e  $\gamma$  estão relacionados com os eixos transversos. Os sistemas fixos nos eixos moleculares são:

- Sistema de coordenadas da interação hiperfina ( $x_a, y_a, z_a$ ) que contém o tensor  $\vec{A}$ .
- Sistema de coordenadas magnético ( $x_m, y_m, z_m$ ) que contém o tensor do fator  $\vec{g}$ .
- Sistema de coordenadas de difusão rotacional ( $x_r, y_r, z_r$ ) que contém o tensor de difusão rotacional  $\vec{R}$ .

Por convenção, para os marcadores do tipo nitróxido, o sistema magnético de coordenadas ( $x_m, y_m, z_m$ ) é assumido como segue: o eixo  $x$  ao longo da ligação N-O, o eixo  $z$  ao longo do orbital  $2p\pi$  do nitrogênio e o eixo  $y$  perpendicular a ambos os eixos (figura 2.2) [42,43]. Para levar o sistema de interação hiperfina para o sistema magnético são

definidos os ângulos  $\Omega_m = (\alpha_m, \beta_m, \gamma_m)$ . Geralmente, ambos os sistemas são considerados colineares e, assim, esses ângulos são nulos. Para levar o sistema de difusão rotacional para o magnético são definidos os ângulos  $\Omega_d = (\alpha_d, \beta_d, \gamma_d)$ . Nota-se que no caso de simetria axial para alguns dos tensores envolvidos em dada transformação, o ângulo  $\alpha_d$ , que gira no plano  $XY$ , é arbitrário.

Os outros dois sistemas de coordenadas estão relacionados ao laboratório, isto é, são fixos em relação ao espectrômetro:

- Sistema diretor de coordenadas  $(x_d, y_d, z_d)$ , que pode ser escolhido de forma arbitrária. Para facilitar as análises, o sistema diretor normalmente coincide com um sistema que representa a anisotropia do meio. É em relação a este sistema que a molécula se reorienta em fluidos anisotrópicos.
- Sistema de coordenadas do laboratório  $(x_l, y_l, z_l)$ , onde o eixo  $z_l$  coincide com a direção do campo magnético estático gerado pelo espectrômetro.

A única relação entre estes sistemas de coordenadas é através do ângulo  $\Omega = (0, \psi, 0)$ , pois o sistema de laboratório possui uma única direção longitudinal definida por  $z_l$ .

### 3.2.2.3. Modelos de Difusão

Os modelos de difusão presentes no programa NLSL [4] estabelecem como o marcador de spin irá se reorientar em relação aos eixos moleculares de rotação  $(x_r, y_r, z_r)$ , isto é, o movimento desses eixos. Os quatro modelos de difusão utilizados pelo programa são:

difusão rotacional browniana, não-browniana, difusão rotacional por saltos discretos e difusão anisotrópica, onde o uso de cada modelo é definido pelo valor da variável inteira *ipdf*. O modelo de difusão rotacional browniana é o mais apropriado para marcadores de spin com tamanhos intermediários e para macromoléculas marcadas, sendo, portanto, o modelo mais largamente utilizado. Neste trabalho, todos os ajustes espectrais foram realizados fazendo uso deste modelo de difusão. Portanto, somente este modelo será abordado a seguir.

Difusão rotacional browniana (*ipdf=0*): Seqüência de reorientações infinitesimais dadas pelo tensor de difusão rotacional ( $\vec{D}$ ). Isto é, cada eixo molecular pode possuir um tempo de correlação característico diferente. No programa, o tensor  $\vec{D}$  é dado em termos da variável  $\vec{R}$  pela expressão  $\vec{R} = \log_{10}(\vec{D})$ . Ao longo deste trabalho, o símbolo log refere-se a  $\log_{10}$ .

Assim como os outros tensores, o tensor  $\vec{R}$  pode ter sua anisotropia representada nas três formas já mencionadas: cartesiana ( $r_x, r_y, r_z$ ), axial ( $r_{pll}, r_{prp}$ , assumindo uma simetria axial) e mais uma envolvendo o valor médio ( $r_{bar}, N, N_{xy}$ ). Nesta última forma, que corresponde a mais utilizada na prática, a anisotropia é expressa pelos fatores:

- $$N = \log\left(\frac{D_z}{\sqrt{D_x \cdot D_y}}\right) = r_z - \frac{(r_x + r_y)}{2} \quad (3.1)$$
 ou na simetria axial

$$N = \log\left(\frac{D_{pll}}{D_{prp}}\right) = r_{pll} - r_{prp} \quad (3.2)$$



- $N_{xy} = \log\left(\frac{D_x}{D_y}\right) = r_x - r_y$  (3.3)

Para o valor médio do coeficiente de difusão rotacional, temos que:

- $r_{bar} = \sqrt[3]{r_x \cdot r_y \cdot r_z}$  ou na simetria axial  $r_{bar} = \sqrt{r_{pll} \cdot r_{prp}}$  (3.4)

Assim, podemos estimar o valor do tempo de correlação rotacional para um marcador de spin em um fluido isotrópico e com movimento um modelo de difusão Browniano pela equação,

$$\tau = (6\vec{R})^{-1} \quad (3.5)$$

Uma forma de estimar os valores iniciais do tempo de correlação médio bem como da anisotropia é a partir de um espectro de RPE a uma temperatura tal que a dinâmica do marcador de spin seja rápida e a forma de linha deste espectro seja caracterizada aproximadamente por três linhas finas bem definidas. Nesse espectro, a diferença de intensidades entre as linhas do campo central e baixo permite medir a anisotropia ( $N$  no caso de simetria axial), onde não se leva em consideração a linha para campo alto. Quanto maior for a diferença de intensidade entre a linha do campo central e baixo, maior será a anisotropia do movimento do marcador de spin. Já o valor médio do tempo de correlação rotacional depende da diferença de intensidades entre as linhas de campo central e alto, sendo diretamente proporcional à largura da linha central. Desta forma, quanto maior for a largura da linha central bem como da razão entre as intensidades de linha central e da de campo alto, mais imobilizado estará o marcador de spin e maior será o tempo de correlação rotacional.

### 3.2.3. Experimento de SAXS

Para as medidas de SAXS, as amostras contendo 100 mM de CTAC sob as mesmas condições descritas anteriormente foram mantidas em equilíbrio por pelo menos 48 h, onde o volume final de cada amostra foi de 0,6 ml. Os experimentos de SAXS foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas, São Paulo), usando uma distância amostra-detector de 930 mm. A amplitude do vetor de espalhamento  $q$  é definida como  $q = (4\pi \sin \theta) / \lambda$ , sendo  $2\theta$  o ângulo de espalhamento e  $\lambda$  o comprimento de onda de raios-X de 1,608 Å. As intensidades experimentais foram corrigidas pela amostra padrão, contribuição do tampão, atenuação da amostra e pela homogeneidade do detector.

### 3.2.4 Análise das Curvas de SAXS

Como vimos anteriormente, a intensidade de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para partículas monodispersas com diferentes tamanhos e formas e distribuídas aleatoriamente em uma solução coloidal pode ser modelada pela equação [31]

$$I(q) = kn_p P(q)S(q) \quad (3.6)$$

onde  $n_p$  corresponde a densidade do número de partículas,  $k$  é uma constante de normalização relacionada a montagem experimental,  $P(q)$  é o fator de forma, refletindo o tamanho e a forma da micela e  $S(q)$  é o fator de estrutura interpartícula. A determinação da constante  $k$  foi realizada através da intensidade de espalhamento das micelas formadas pelo surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), uma vez que as funções  $P(q)$  e  $S(q)$  são bem conhecidas neste sistema [44].

Neste trabalho, as formas das micelas de CTAC foram consideradas como elipsóides prolatos [20,21] com um semi-eixo menor dado pelo comprimento da cadeia parafínica  $R_{par}$  (primeiro parâmetro livre nos ajustes) e com o semi-eixo maior sendo  $\nu R_{par}$ , onde  $\nu$  (segundo parâmetro livre) representa a razão axial. As micelas são constituídas de duas camadas com diferentes densidades eletrônicas: um núcleo parafínico com densidade eletrônica  $\rho_{par} = 0,275 \text{ e}/\text{Å}^3$  e uma camada externa de espessura  $\sigma_{pol}$  (terceiro parâmetro) constituída pelos grupos cabeça dos monômeros do surfactante e pela água de hidratação, o qual apresenta uma densidade eletrônica dada por  $\rho_{pol}$  (quarto parâmetro) em relação ao meio aquoso. Neste trabalho, a densidade eletrônica da solução tampão é assumida ser similar à da água,  $\rho_w = 0,327 \text{ e}/\text{Å}^3$ .

Como mencionado anteriormente, a função  $S(q)$  na equação (3.6) é o fator de estrutura interpartícula. É importante mencionar que o programa de ajuste utiliza um método de aproximação bastante conhecido chamado de média esférica (MAS, do inglês Mean Spherical Approximation) [45,46]. Neste método, as partículas espalhadoras são consideradas como esferas carregadas com coeficiente de ionização  $\alpha = z/n$  (onde  $z$  e  $n$  são a carga da micela e o número de agregação, respectivamente) interagindo por meio de um potencial de Coulomb.

# **CAPÍTULO 4**

## **Resultados e Discussão**

#### 4.1. Interação da Porfirina TPPS<sub>4</sub> com Micelas de CTAC

Antes de iniciarmos a discussão dos resultados, é importante fazer alguns comentários com relação ao modelo de ajuste utilizado na simulação dos espectros de RPE. Como vimos no capítulo anterior, o programa NLSL permite realizar ajustes espectrais empregando diferentes modelos de movimento. Os ajustes dos espectros de RPE para os marcadores de spin derivados do ácido esteárico (5-DSA e 16-DSA) presentes nas micelas de CTAC foram realizados assumindo um modelo de difusão Browniano, onde uma anisotropia  $N \equiv R_{//} / R_{\perp} = 10$  também foi considerada. Além disso, os ajustes dos espectros de RPE referentes ao marcador de spin 16-DSA foram realizados utilizando um parâmetro adicional, a largura de linha Gaussiana não-homogênea. Por outro lado, uma vez que as formas de linha dos espectros de RPE do marcador 5-DSA são mais suaves nas bordas, uma largura de linha Lorentziana não-homogênea foi escolhida.

##### 4.1.1. Análise dos Espectros de RPE

As figuras 4.1A e 4.1B mostram os espectros de RPE experimentais (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos abertos) dos marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA, respectivamente, incorporados às micelas formadas por 100 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM (pH 4,0), para as concentrações indicadas da porfirina TPPS<sub>4</sub> [47]. Estes ajustes foram realizados através do programa NLSL considerando a presença de uma única componente espectral, ou seja, a existência de apenas uma população de radical nítróxido. Esta consideração parece ser sustentada pela qualidade dos ajustes, como indicado pelos pequenos valores de  $\chi^2$  fornecidos pelo programa NLSL (Tabelas 1 e 2).

Além disso, as componentes cartesianas do tensor  $g$  foram fixadas durante o procedimento de ajuste. Estes valores foram  $g_{xx} = 2,0086$ ,  $g_{yy} = 2,0062$  e  $g_{zz} = 2,0032$  G para o marcador de spin 5-DSA, e  $g_{xx} = 2,0087$ ,  $g_{yy} = 2,0067$  e  $g_{zz} = 2,0030$  G para o 16-DSA.

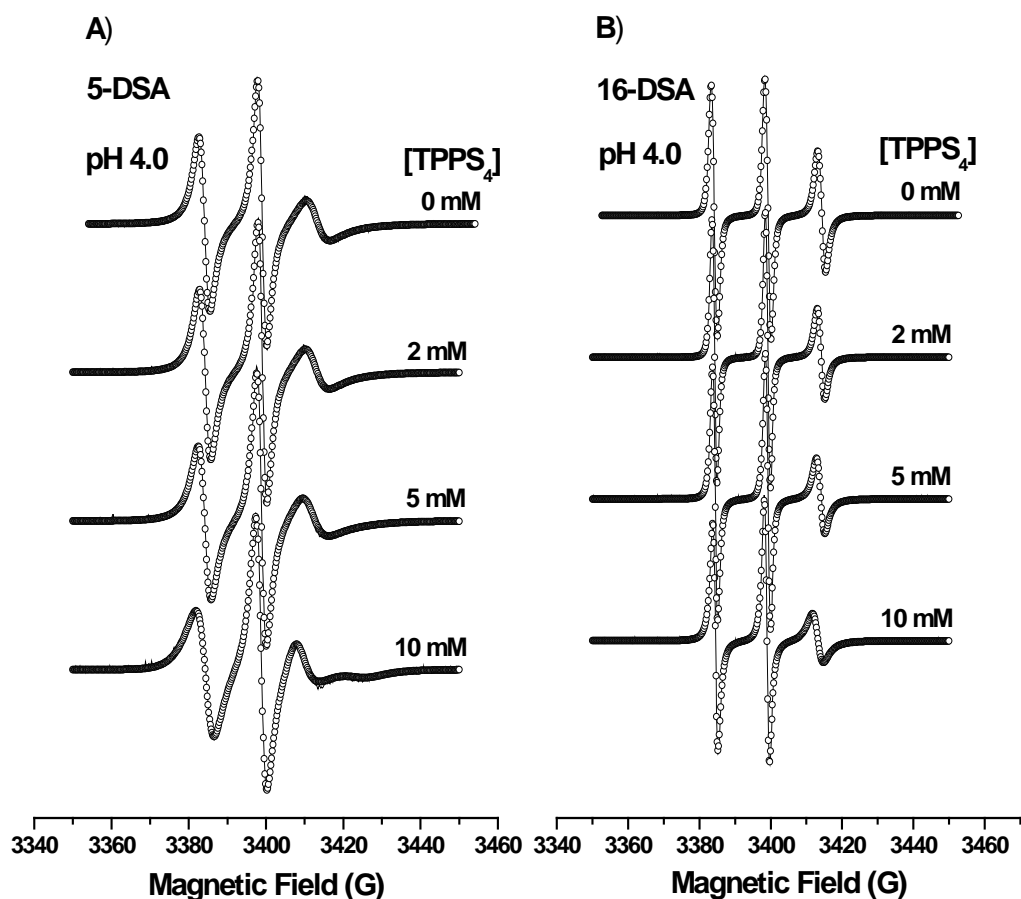


Figura 4.1. Espectros de RPE experimentais (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos vazios) à 24°C dos marcadores de spin (A) 5-DSA e (B) 16-DSA incorporados a 100 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM (pH 4,0) para diferentes concentrações da porfirina TPPS<sub>4</sub>.

Os valores dos parâmetros de melhor ajuste obtidos da simulação espectral estão apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2 para ambos os valores de pHs estudados. É interessante mencionar que os valores do tempo de correlação rotacional,  $\tau$ , bem como das componentes cartesianas do tensor hiperfino  $\vec{A}$  para um dado marcador de spin praticamente não alteraram para uma faixa de 2-100 mM de CTAC puro (dados não apresentados). Este resultado sugere que o ambiente monitorado pelos marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA não sofrem alterações para concentrações do surfactante acima da concentração micelar crítica (cmc). Neste trabalho, considerando as condições de preparação das amostras, o valor da cmc foi de aproximadamente 1 mM. Um outro resultado curioso em relação às micelas puras de CTAC diz respeito ao pH da solução. Para o 5-DSA, a tabela 4.1 mostra que os valores de  $\tau$  e da média aritmética das componentes do tensor  $\vec{A}$  (parâmetro  $A_0$ ) foram de 1,03 ns e 15,14 G, respectivamente, no pH 4,0. Estes valores são muito próximos daqueles observados no pH 9,0, sugerindo que a conformação dos grupos das cabeças polares (camada de Stern) das micelas de CTAC é similar para ambos os valores de pHs estudados. Um comportamento similar também pôde ser observado para o 16-DSA.

Para efeitos de comparação, vale a pena mencionar os resultados obtidos da simulação dos espectros de RPE para as micelas puras formadas de 30 mM do surfactante zwitteriônico N-hexadecil-N,Ndimetil-3-amônio-1-1propano fosfato (HPS) nos pHs 4,0 e 9,0 [48]. Em relação ao 5-DSA, os valores de  $\tau$  foram 0,91 e 2,46 ns, respectivamente. Este resultado denota que a região da cabeça dos grupos polares do surfactante zwitteriônico é afetada pelo valor do pH, uma vez que a mobilidade do marcador foi um fator 2,7 menor no meio alcalino. Além disso, as componentes do tensor hiperfino  $\vec{A}$  foram  $A_{xx} = 6,30$ ,  $A_{yy} =$

5,86 e  $A_{zz} = 33,00$  G para o pH 4,0, e  $A_{xx} = 7,36$ ,  $A_{yy} = 7,50$ , e  $A_{zz} = 29,82$  G para o pH 9,0. Estas mudanças sugerem que o fragmento paramagnético do 5-DSA em pH alcalino está orientado de modo que a contribuição da densidade eletrônica nas direções  $x$  e  $y$  é aumentada enquanto que na direção  $z$  é reduzida.

Tabela 4.1. Tempo de correlação rotacional,  $\tau$ , e desdobramento hiperfino isotrópico,  $A_0$ , obtidos das simulações dos espectros de RPE (24°C) do marcador de spin 5-DSA incorporado à 100 mM de CTAC na ausência e na presença de TPPS<sub>4</sub> em pH 4,0 e 9,0.

| <b>5-DSA</b>                   |                               |                           |                           |                           |                          |                            |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>pH 4,0</b>                  |                               |                           |                           |                           |                          |                            |
| <b>[TPPS<sub>4</sub>] (mM)</b> | <b><math>\tau</math> (ns)</b> | <b>A<sub>xx</sub> (1)</b> | <b>A<sub>yy</sub> (1)</b> | <b>A<sub>zz</sub> (1)</b> | <b>A<sub>0</sub> (1)</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
| <b>0</b>                       | 1,03                          | 6,57                      | 5,99                      | 32,86                     | 15,14                    | 2,29                       |
| <b>2</b>                       | 1,10                          | 6,47                      | 5,98                      | 32,65                     | 15,03                    | 10,99                      |
| <b>5</b>                       | 1,23                          | 6,51                      | 5,95                      | 32,52                     | 14,99                    | 7,17                       |
| <b>10</b>                      | 2,41                          | 9,30                      | 5,80                      | 29,50                     | 14,87                    | 3,37                       |
| <b>pH 9,0</b>                  |                               |                           |                           |                           |                          |                            |
| <b>[TPPS<sub>4</sub>] (mM)</b> | <b><math>\tau</math> (ns)</b> | <b>A<sub>xx</sub> (1)</b> | <b>A<sub>yy</sub> (1)</b> | <b>A<sub>zz</sub> (1)</b> | <b>A<sub>0</sub> (1)</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
| <b>0</b>                       | 1,05                          | 6,43                      | 6,01                      | 33,01                     | 15,15                    | 3,16                       |
| <b>2</b>                       | 1,12                          | 6,49                      | 6,01                      | 32,71                     | 15,07                    | 5,49                       |
| <b>5</b>                       | 1,21                          | 6,62                      | 6,02                      | 32,51                     | 15,05                    | 13,59                      |
| <b>10</b>                      | 3,23                          | 9,83                      | 6,06                      | 28,70                     | 14,86                    | 6,11                       |

Pode-se notar nas tabelas 4.1 e 4.2 que ambos os marcadores de spin exibiram diferentes estados de mobilidades. No pH 4,0, por exemplo, os valores de  $\tau$  foram de 1,03 e 0,20 ns para o 5-DSA e 16-DSA, respectivamente. Isso significa que o marcador de spin 5-DSA apresenta uma mobilidade cerca de 5 vezes menor quando comparado ao 16-DSA, o



qual é atribuído à proximidade do seu fragmento paramagnético à região da camada de Stern. Esta região confere uma maior restrição à mobilidade do marcador de spin quando comparado à região do núcleo hidrocarbônico da micela (monitorada pelo 16-DSA) devido à uma menor flexibilidade da cabeça polar dos monômeros de surfactante. No entanto, este comportamento poderia estar associado a um gradiente de flexibilidade do marcador, ou seja, uma vez que o fragmento paramagnético do marcador 16-DSA está localizado próximo ao grupo CH<sub>3</sub> da cadeia hidrocarbônica, seria esperado uma maior mobilidade do fragmento paramagnético em função da grande flexibilidade desta porção da molécula do marcador de spin. Entretanto, quando ambos os marcadores de spin estão dissolvidos em tampão, tem-se que os valores de  $\tau$  são 0,74 e 0,23 ns para o 5-DSA e 16-DSA, respectivamente. Isso indica que, apesar de realmente existir um gradiente, a mobilidade do marcador de spin 5-DSA é apenas cerca de 3 vezes maior quando comparado ao 16-DSA em solução tampão.

Além disso, os valores de  $A_0$  para este mesmo pH indicam que ambos os marcadores de spin monitoram um ambiente muito similar em termos de polaridade. Este resultado é bastante curioso, uma vez que seria esperada uma menor polaridade (menor valor de  $A_0$ ) no núcleo hidrocarbônico da micela em relação à região da camada de Stern. Assim, duas hipóteses podem ser sugeridas: (1) ou as moléculas de água penetrariam no interior do centro hidrocarbônico das micelas ou (2) os marcadores de spin assumiriam uma conformação tal que seus fragmentos paramagnéticos estariam localizados a distâncias similares dos grupos das cabeças polares. É importante mencionar que os valores de  $A_0$  para os marcadores presentes nas micelas de CTAC são menores quando comparados àqueles observados para aos marcadores dissolvidos em tampão, onde o valor de  $A_0$  é de

aproximadamente 15,86 G para ambos marcadores. Isso ocorre devido a uma maior acessibilidade do solvente ao marcador, provocando um deslocando da densidade de elétron desemparelhado no grupo N-O do fragmento paramagnético e, conseqüentemente, um aumento do valor do desdobramento hiperfino isotrópico ( $A_0$ ).

Tabela 4.2. Tempo de correlação rotacional,  $\tau$ , e desdobramento hiperfino isotrópico,  $A_0$ , obtidos das simulações dos espectros de RPE (24°C) do marcador de spin 16-DSA incorporado à 100 mM de CTAC na ausência e na presença de TPPS<sub>4</sub> em pH 4,0 e 9,0.

| <b>16-DSA</b>                  |                               |                |                |                |                          |                            |
|--------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>pH 4,0</b>                  |                               |                |                |                |                          |                            |
| <b>[TPPS<sub>4</sub>] (mM)</b> | <b><math>\tau</math> (ns)</b> | <b>Axx (1)</b> | <b>Ayy (1)</b> | <b>Azz (1)</b> | <b>A<sub>0</sub> (1)</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
| <b>0</b>                       | 0,20                          | 6,27           | 5,82           | 33,08          | 15,06                    | 33,30                      |
| <b>2</b>                       | 0,25                          | 6,24           | 5,83           | 32,75          | 14,94                    | 5,04                       |
| <b>5</b>                       | 0,33                          | 6,24           | 5,83           | 32,38          | 14,82                    | 7,13                       |
| <b>10</b>                      | 0,55                          | 6,28           | 5,78           | 31,30          | 14,45                    | 15,10                      |
| <b>pH 9.0</b>                  |                               |                |                |                |                          |                            |
| <b>[TPPS<sub>4</sub>] (mM)</b> | <b><math>\tau</math> (ns)</b> | <b>Axx (1)</b> | <b>Ayy (1)</b> | <b>Azz (1)</b> | <b>A<sub>0</sub> (1)</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
| <b>0</b>                       | 0,16                          | 6,40           | 5,80           | 33,14          | 15,11                    | 38,84                      |
| <b>2</b>                       | 0,23                          | 6,40           | 5,79           | 32,89          | 15,03                    | 7,62                       |
| <b>5</b>                       | 0,24                          | 6,40           | 5,79           | 32,81          | 15,00                    | 9,15                       |
| <b>10</b>                      | 0,48                          | 6,38           | 5,78           | 31,94          | 14,70                    | 5,89                       |

A figura 4.1.A mostra que a adição de porfirina é caracterizada por pequenas distorções na forma de linha dos espectros de RPE, provavelmente associadas a mudanças de mobilidade do radical nitróxido. De fato, os valores do tempo de correlação rotacional,  $\tau$ , na tabela 4.1 demonstram uma restrição de movimento do marcador de spin 5-DSA em função da concentração de TPPS<sub>4</sub> para ambos os valores de pH, principalmente para altas

concentrações de porfirina. Para 10 mM de TPPS<sub>4</sub>, os valores de  $\tau$  foram 2,41 e 3,23 ns para os pHs 4.0 e 9.0, respectivamente. Estes valores são cerca de 2 e 3 vezes maiores, respectivamente, quando comparados àqueles observados para micelas puras de CTAC. Este resultado indica claramente que a adição de porfirina reduz a fluidez da micela, o qual pode ser sido interpretado como devido ao efeito de empacotamento, onde a presença de porfirinas na região da interface das micelas de CTAC possivelmente induz à formação de uma estrutura micelar mais compacta. Além disso, a tabela 4.1 mostra que, no caso do 5-DSA, o valor da componente  $A_{xx}$  do tensor hiperfino aumentou de 6,57 para 9,30 G na presença de 10 mM de TPPS<sub>4</sub> (pH 4.0). Por outro lado, um comportamento oposto foi observado para a componente  $A_{zz}$ , o qual reduziu de 32,86 para 29,50 G. Entretanto, tomando-se a média aritmética das componentes  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  e  $A_{zz}$  é possível afirmar que a adição de porfirina não altera significativamente a polaridade da região dos grupos das cabeças polares. Um comportamento similar também é observado no pH alcalino. Deve-se salientar que uma deficiência do programa NLSL é o fato de que a polaridade do ambiente medida pelo  $A_0$  só pode ser estimado através da média dos valores do tensor  $\vec{A}$ .

Os espectros de RPE do 16-DSA também mostraram ser sensíveis à presença de porfirina (figura 4.1B). De fato, a tabela 4.2 mostra um aumento do valor de  $\tau$  em função da concentração de porfirina, indicando que o núcleo hidrocarbônico confere uma maior restrição ao grupo nitróxido do 16-DSA na presença de porfirina. Isso é consistente com um aumento no empacotamento do núcleo micelar. Este efeito também mostrou ser mais significativo para concentrações mais alta de porfirina, onde para 10 mM é visto que o valor de  $\tau$  para o marcador de spin 16-DSA em ambos pHs foi um fator cerca de 2,9 maior quando comparado a micela pura. Um comportamento similar também foi observado para

este mesmo marcador em 30 mM de HPS [48], onde uma imobilização do marcador foi observada para concentrações crescentes de porfirina. A tabela 4.2 mostra que a adição de porfirina é seguida por uma redução da componente  $A_{zz}$  do tensor hiperfino, ao passo que as componentes  $A_{xx}$  e  $A_{yy}$  permaneceram praticamente inalteradas para toda a faixa de concentração de porfirina. Assim, um ambiente levemente mais hidrofóbico é observado para altas concentrações de porfirina, onde este efeito parece ser mais evidente para o pH 4.0. Como veremos adiante, estes dados estão de acordo com os resultados de SAXS, onde uma redução do semi-eixo menor do raio parafínico ( $R_{par}$ ) foi interpretado como devido ao efeito de empacotamento no núcleo hidrocarbônico da micela.

#### 4.1.2. Análise das Curvas de SAXS

A figura 4.2A mostra os dados de SAXS (símbolos) para micelas contendo 100 mM de CTAC (pH 4,0) na ausência e na presença da porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub>. Inicialmente, as medidas de SAXS foram realizadas para concentrações inferiores à 100 mM de CTAC. Entretanto, as intensidades de espalhamento não foram suficientes para realizar ajustes adequados. As curvas de melhor ajuste (linhas sólidas) foram obtidas assumindo as micelas de CTAC como elipsóides prolatos, onde a razão axial ( $\nu$ ) entre o semi-eixo maior e menor não exibiu mudanças significativas para a faixa de concentração 2-10 mM de TPPS<sub>4</sub> (tabela 4.3). Este resultado será discutido posteriormente com mais detalhes. Observe que a curva de SAXS para uma solução micelar pura de 100 mM de CTAC (figura 4.2A) apresenta um pico bem definido em  $q = 0,06 \text{ \AA}^{-1}$ , em concordância com os resultados obtidos em trabalhos anteriores [49,50]. Este pico é referido como uma impressão digital da função de

interferência interpartículas  $S(q)$ , a qual está associada com a interação entre as superfícies carregadas das micelas. Em trabalhos prévios foi observado um comportamento semelhante para as curvas de SAXS de amostras contendo 40 mM de SDS puro em pH 4,0, onde este pico estava localizado em  $q = 0,004 \text{ \AA}^{-1}$  [44].

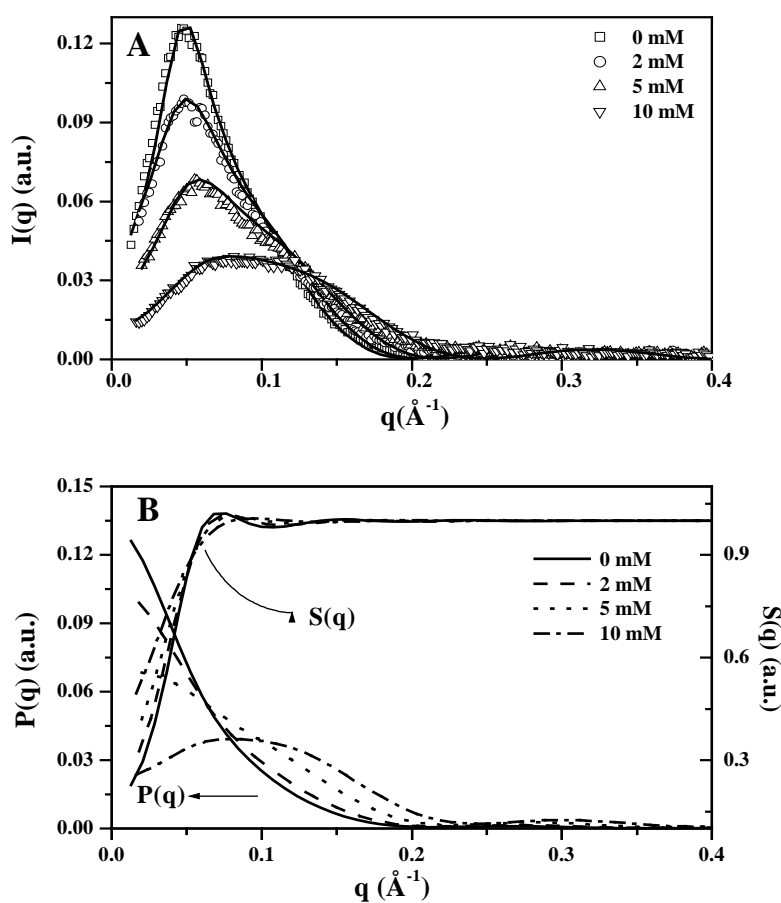


Figura 4.2. (A) Curvas de SAXS experimentais (símbolos) e ajustadas (linhas sólidas) para 100 mM CTAC em tampão acetato-fosfato-borato 30 mM no pH 4.0 em função da concentração de TPPS<sub>4</sub>. Em (B) estão apresentados as funções de interferência interpartículas  $S(q)$  e a função de forma da partícula  $P(q)$  para os ajustes obtidos em (A).

Por outro lado, ambos os surfactantes aniônico SDS e zwitteriônico HPS exibiram um segundo pico bem definido com uma intensidade máxima em  $q = 0,17$  e  $0,12 \text{ \AA}^{-1}$ , respectivamente, o qual é característico do fator de forma intramicelar  $P(q)$ . No caso das micelas puras de CTAC, este segundo pico não é claramente observado nas curvas de SAXS da figura 4.2. Entretanto, a adição de TPPS<sub>4</sub> parece induzir seu aparecimento para concentrações maiores de porfirina, quando este pico é deslocado na direção de valores maiores de  $q$ . Estes achados fornecem a primeira evidência de que o núcleo hidrocarbônico das micelas de CTAC é afetado pela incorporação de porfirina. A seguir voltaremos a esta discussão.

A figura 4.2B mostra a função de interferência intermicelar  $S(q)$  e o fator de forma intramicelar  $P(q)$  associados às curvas de SAXS apresentadas na Figura 4.2A, onde foram modeladas para os valores dos parâmetros listados na tabela 4.3. Note que nenhuma mudança significativa na função  $S(q)$  foi observada para concentrações crescentes de porfirina. De fato, os ajustes revelaram que, embora o coeficiente de ionização  $\alpha$  seja pequeno (tabela 4.3), existe uma interação repulsiva entre os agregados micelares.

Este resultado é surpreendente e igualmente inesperado, uma vez que era previsto que a interação dos grupos sulfatos negativamente carregados da porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> com os grupos amina dos monômeros de CTAC neutralizasse as cargas positivas na superfície da micela, conseqüentemente, reduzindo a função de interferência intermicelar  $S(q)$ . Entretanto, trabalhos anteriores têm demonstrado que a maior contribuição para a constante de associação da TPPS<sub>4</sub> pelas micelas catiônicas de CTAC é devido às interações hidrofóbicas [1]. Por outro lado, a função  $P(q)$  exibiu consideráveis mudanças em função da concentração de porfirina (figura 4.2B).

Tabela 4.3. Valores dos parâmetros obtidos dos ajustes das curvas de SAXS para as amostras contendo 100 mM de CTAC em tampão acetato-fosfato-borato pH 4,0 e 9,0 na presença e ausência da porfirina TPPS<sub>4</sub>.

| pH 4.0                    |          |               |                    |                                  |        |                       |     |
|---------------------------|----------|---------------|--------------------|----------------------------------|--------|-----------------------|-----|
| [TPPS <sub>4</sub> ] (mM) | $\alpha$ | $R_{par}$ (Å) | $\sigma_{pol}$ (Å) | $\rho_{pol}$ (e/Å <sup>3</sup> ) | $\nu$  | $V$ (Å <sup>3</sup> ) | $n$ |
| 0                         | 0,045(5) | 23,0(4)       | 3,9(3)             | 0,38(1)                          | 3,1(1) | 158037                | 344 |
| 2                         | 0,040(3) | 23,0(5)       | 3,9(3)             | 0,39(1)                          | 3,0(2) | 152939                | 333 |
| 5                         | 0,038(3) | 21,5(5)       | 4,0(3)             | 0,39(1)                          | 3,0(2) | 124925                | 272 |
| 10                        | 0,038(3) | 20,0(5)       | 4,0(2)             | 0,40(1)                          | 3,0(1) | 100560                | 219 |
| pH 9.0                    |          |               |                    |                                  |        |                       |     |
| [TPPS <sub>4</sub> ] (mM) | $\alpha$ | $R_{par}$ (Å) | $\sigma_{pol}$ (Å) | $\rho_{pol}$ (e/Å <sup>3</sup> ) | $\nu$  | $V$ (Å <sup>3</sup> ) | $n$ |
| 0                         | 0,045(5) | 23,0(3)       | 3,6(2)             | 0,39(1)                          | 3,0(2) | 152939                | 333 |
| 2                         | 0,043(3) | 22,5(5)       | 3,8(3)             | 0,39(1)                          | 3,0(2) | 143180                | 312 |
| 5                         | 0,040(3) | 21,5(5)       | 3,9(2)             | 0,402(3)                         | 3,1(2) | 129089                | 281 |
| 10                        | 0,040(3) | 20,0(5)       | 3,9(1)             | 0,405(2)                         | 3,1(2) | 103912                | 226 |

Legenda:  $\alpha$  = coeficiente de ionização;  $R_{par}$  = eixo menor parafínico;  $\sigma_{pol}$  = espessura polar;  $\rho_{pol}$  = densidade eletrônica;  $\nu$  = razão axial entre os eixos parafínicos;  $V$  = volume da micela e  $n$  = número de agregação.

As curvas de SAXS mostraram ser bastante semelhantes para os dois valores de pH estudados (curvas não mostradas para o pH 9,0). Esta observação é sustentada pelos valores muito próximos dos parâmetros mostrados na tabela 4.3, indicando que o efeito da porfirina sobre as micelas de CTAC não depende do seu estado de protonação. A fim de demonstrar que as mudanças na função  $P(q)$  (figura 4.2B) estão associadas essencialmente a uma redução do raio parafínico (parâmetro  $R_{par}$ ), uma série de análises foi realizada variando

independentemente cada um dos parâmetros ajustáveis no modelo; enquanto um parâmetro foi variado, os outros eram mantidos fixos.

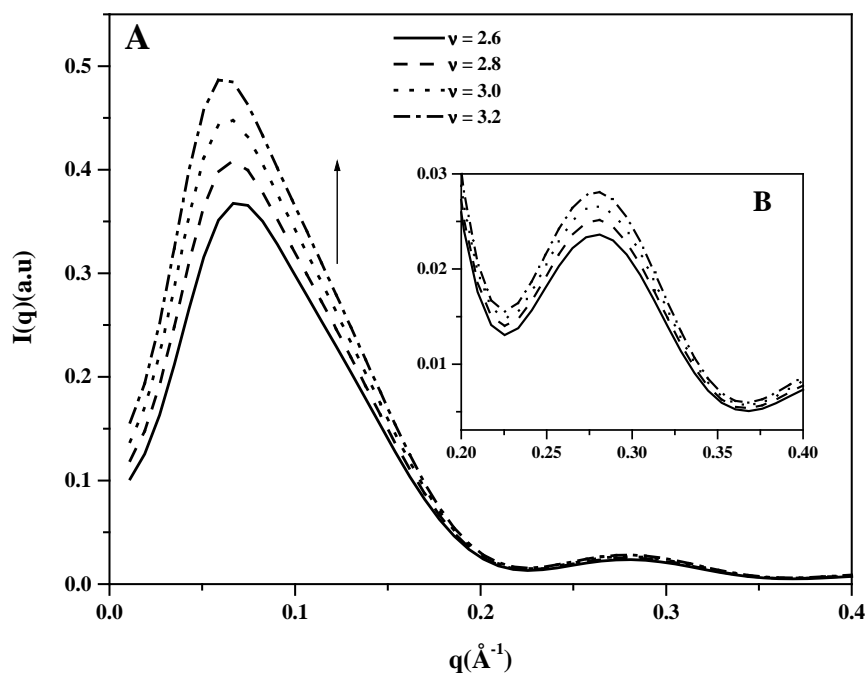


Figura 4.3. (A) Curvas teóricas de SAXS obtidas na simulação pela variação da anisometria ( $\nu$ ). Os outros parâmetros foram fixos nos seguintes valores:  $R_{par} = 22 \text{ \AA}$ ,  $\sigma_{pol} = 4,0 \text{ \AA}$ ,  $\rho_{pol} = 0,4 \text{ e/ \AA}^3$  e  $\alpha = 0,04$ . (B) Inseto da região de valores de  $q$  na faixa de  $0.2 - 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ .

Variações da razão axial (parâmetro  $\nu$ ) mostraram uma redução da intensidade de espalhamento, enquanto que a forma da curva de SAXS permaneceu praticamente inalterada para uma faixa de  $\nu = 2,6$  a  $3,2$  (figura 4.3). Além disso, variações da densidade eletrônica da camada polar (parâmetro  $\rho_{pol}$ ) produziram alterações na forma das curvas de SAXS (figura 4.4), principalmente alterações associadas a uma redução da intensidade de espalhamento. Baseado nestas análises, foi possível concluir que variações em ambos os



parâmetros  $\nu$  e  $\rho_{pol}$  não reproduziram satisfatoriamente as curvas experimentais de SAXS.

Por outro lado, a figura 4.5 mostra que variações do parâmetro  $R_{par}$  resultaram em bons ajustes, reproduzindo bem os dados experimentais.

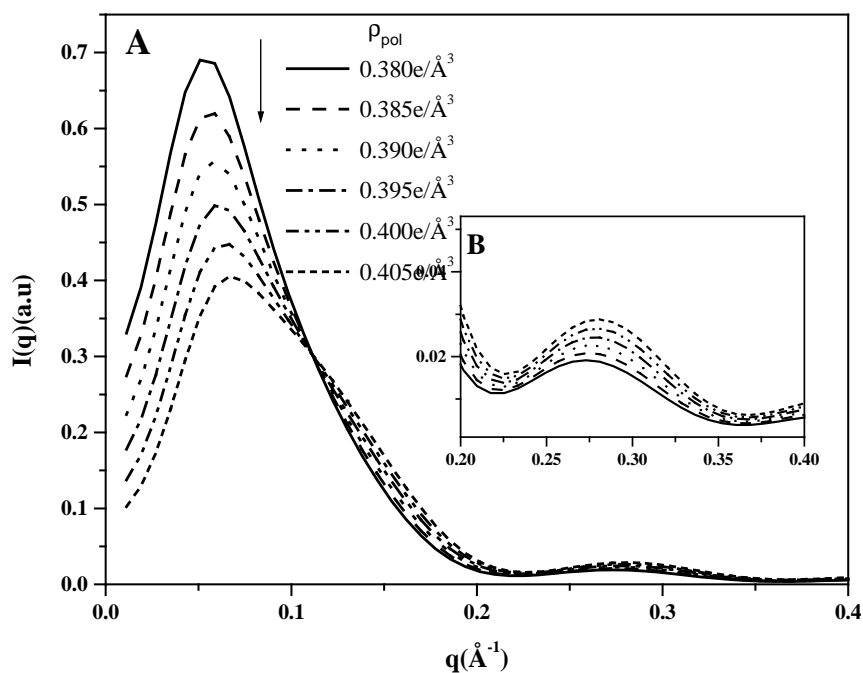


Figura 4.4. (A) Curvas teóricas de SAXS obtidas na simulação pela variação da densidade eletrônica polar ( $\rho_{pol}$ ). Os outros parâmetros foram fixos nos seguintes valores:  $R_{par} = 22 \text{ \AA}$ ,  $\sigma_{pol} = 4,0 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 0,04$  e  $\nu = 3,0$ . (B) Inseto da região de valores de  $q$  na faixa de  $0,2 - 0,4 \text{ \AA}^{-1}$ .

Como foi mencionado anteriormente, nenhuma mudança significativa foi observada em relação aos pHs, como poder ser visto comparando os parâmetros intramicelares apresentados na tabela 4.3. Com o intuito de simplificar a discussão, os resultados de SAXS abaixo serão analisados somente com base nos dados para o pH 4.0. Uma leitura rápida dos

dados evidencia que o semi-eixo menor do raio parafínico na ausência de porfirina ( $R_{par} = 23,0 \pm 0,4 \text{ \AA}$ ) está em concordância com valores encontrados previamente [49-51] e com o comprimento esperado para a cadeia acila estendida de acordo com a equação (1.2) apresentada na introdução deste trabalho.

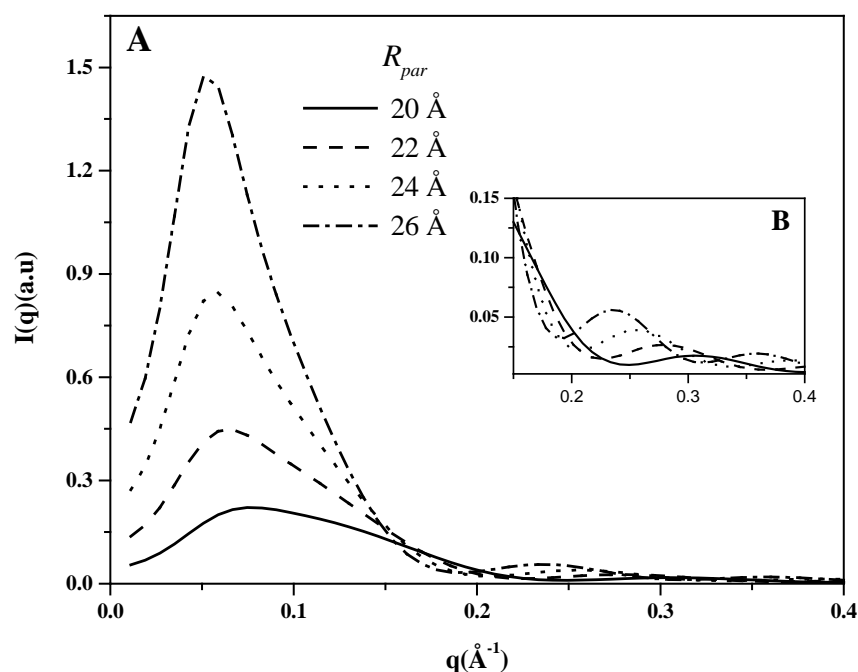


Figura 4.5. (A) Curvas teóricas de SAXS obtidas na simulação pela variação do raio parafínico ( $R_{par}$ ). Os outros parâmetros foram fixados nos seguintes valores:  $\sigma_{pol} = 4,0 \text{ \AA}$ ,  $\rho_{pol} = 0,4 \text{ e/ \AA}^3$ ,  $\alpha = 0,04$  e  $\nu = 3,0$ . (B) Inseto da região de valores de  $q$  na faixa de  $0,2 - 0,4 \text{ \AA}^{-1}$ .

Como observado da inspeção das curvas de SAXS, a adição de porfirina induziu rearranjos no núcleo hidrocarbônico das micelas catiônicas. Este efeito é visto ser maior para altas concentrações de porfirina, onde o parâmetro  $R_{par}$  é reduzido para  $20,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$ , indicando

um núcleo hidrofóbico que está mais empacotado quando comparado à micela pura de CTAC. Entretanto, os parâmetros relacionados à espessura da camada polar  $\sigma_{pol} \approx 3,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$  bem como a densidade eletrônica  $\rho_{pol} \approx 3,8 \pm 0,1 \text{ e/\AA}^3$  praticamente não alteraram para toda a faixa de concentração de porfirina. Além disso, a anisometria da partícula  $\nu$  não se alterou com a adição de TPPS<sub>4</sub>, sugerindo que o efeito de empacotamento não altera a forma da micela de CTAC.

Um estudo de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS, do inglês “small-angle neutron scattering”) mostrou a influência dos contra-íons no tamanho das micelas de SDS e CTAC [50]. As curvas de SANS obtidas para 100 mM de CTAC em solução aquosa foram modeladas assumindo as micelas catiônicas como tendo a forma de um elipsóide prolato com razão axial  $\nu = 1,61$ , onde um número de agregação de 120 foi também obtido [50]. Por outro lado, para micelas catiônicas em uma solução contendo 100 mM de KBr, foram encontrados uma anisometria de  $\nu = 3,05$  e número de agregação igual a 227 [50]. Portanto, as observações acima mostram claramente que a presença de contra-íons na solução tem uma grande influência sobre o tamanho da micela. É interessante mencionar que a curva de SANS obtida para as micelas compostas de 100 mM de CTAC apresenta uma forma similar às curvas de SAXS apresentadas na Figura 4.2A em 30 mM de tampão acetato-fosfato-borato (pH 4,0). Contudo, um número de agregação igual a 333 foi encontrado neste trabalho, correspondendo a um fator cerca de 1,5 maior quando comparado ao valor em solução de KBr. Uma provável explicação para este fenômeno é devido às diferenças entre os contra-íons presentes na solução.

A adição de 2, 5 e 10 mM de TPPS<sub>4</sub> na micela de CTAC favoreceu a diminuição do número de agregação da micela de CTAC para 333, 272 e 219, respectivamente. Estes

achados suportam a idéia de que a incorporação de porfirina pelas micelas de CTAC induz a formação de micelas menores, com um núcleo hidrocarbônico mais empacotado quando comparado às micelas catiônicas puras. A redução do tamanho da micela em função da adição de TPPS<sub>4</sub> poderia ser explicada pela aproximação desta porfirina aniônica aos grupos carregados positivamente das micelas catiônicas, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre os monômeros de surfactante e, conseqüentemente, o número de agregação. Entretanto, como foi discutido anteriormente, as interações de natureza hidrofóbica contribuem mais significativamente para a interação da porfirina com as micelas de CTAC, o que explica a alta constante de associação da TPPS<sub>4</sub> às micelas neutras e zwitteriônicas. A constante de associação desta porfirina com as micelas de CTAC foi de  $10^4 \text{ M}^{-1}$  em pH 3,0 e  $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  em pH 7.5 [1]. Estes valores são da mesma ordem de grandeza que aqueles registrados para os surfactantes HPS (zwitteriônico). No caso do TX-100 (neutro), a constante de associação é um pouco menor. Estes dados indicam um caráter bastante hidrofóbico da TPPS<sub>4</sub>, provavelmente associado ao anel porfirínico.

#### **4.2. Interação do Surfactante CTAC com a Proteína BSA**

A técnica de RPE com radicais nitróxidos tem sido previamente aplicada nos estudos envolvendo a interação de surfactantes com a albumina de soro bovino (BSA) e com a albumina de soro humano (HSA). Nestes estudos, as análises espectrais foram realizadas através das relações de intensidade entre os picos e suas distâncias relativas como uma medida indireta da mobilidade e da polaridade observada pelos marcadores de spin, respectivamente. Avanços na simulação dos espectros de RPE [39-41] têm permitido monitorar em detalhes as mudanças que ocorrem nas propriedades de movimento dos

radicais nitróxidos, os quais não são acessíveis por outras técnicas espectroscópicas. Os resultados a seguir foram obtidos através de análises cuidadosas dos espectros de RPE dos marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA ligados a um sítio de alta afinidade da proteína BSA através do programa NLSL. Este programa permitiu obter os parâmetros de difusão rotacional e as contribuições de cada componente no espectro composto de RPE assim como avaliar a polaridade dos ambientes onde os marcadores de spin estavam dissolvidos.

Durante o procedimento de ajuste dos espectros de RPE, estamos assumindo que o modelo de difusão rotacional dos marcadores de spin é do tipo Browniano, sendo este modelo largamente empregado nos casos em que os marcadores de spin apresentam tamanhos intermediários e no caso de macromoléculas marcadas. Uma anisotropia de movimento igual à  $N \equiv R_{//} / R_{\perp} = 10$  foi também admitida, onde o critério empregado na escolha do valor de  $N$  está relacionado à qualidade do ajuste (valor de  $\chi_{red}^2$ ) fornecido pelo programa NLSL. Parâmetros adicionais relacionados à largura das linhas de RPE foram também empregados, onde o critério utilizado para descrever uma largura de linha como Lorentziana ou Gaussiana foi através de observações diretas dos espectros de RPE bem como através da qualidade dos ajustes.

#### 4.2.1. Análise dos espectros de RPE

A figura 4.6A mostra os espectros de RPE experimentais (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos abertos) do marcador de spin 5-DSA incorporado a proteína BSA em tampão fosfato 20 mM (pH 7,0) na ausência e na presença de diferentes concentrações de CTAC [52]. Note que o espectro de RPE referente à BSA pura é formado pela existência de

apenas uma componente espectral, onde a forma de linha deste espectro é típica de um marcador de spin fortemente imobilizado. De fato, o maior valor do tempo de correlação rotacional,  $\tau_1$ , na tabela 4.4 indica que a cadeia polipeptídica da proteína BSA confere uma considerável restrição de movimento ao 5-DSA. É importante mencionar que o programa NLSL não oferece a possibilidade de ajustar parâmetros associados diretamente a mudanças de polaridade do ambiente monitorado pelos nitróxidos. Assim, os dados de polaridade apresentados na tabela 4.4 (valores de  $A_0$ ) foram extraídos da média das componentes do tensor hiperfino  $\vec{A}$ . Além disso, os valores otimizados das componentes do tensor  $\vec{g}$  obtidos no procedimento de ajuste foram  $g_{xx} = 2,0086$ ,  $g_{yy} = 2,0064$  e  $g_{zz} = 2,0025$  para ambos os marcadores de spin, estando estes valores consistentes com àqueles obtidos em trabalhos anteriores [53-55].

Estudos com marcadores de spin derivados do ácido esteárico têm demonstrado que a interação de surfactantes com a proteína BSA é geralmente caracterizada pela coexistência de duas componentes no espectro de RPE, onde as populações de radicais nitróxidos de cada uma destas componentes apresentam diferentes estados de mobilidade. A componente 1, mais fortemente imobilizada, tem sido interpretada devido ao contato dos marcadores de spin com a cadeia polipeptídica da BSA, enquanto que a componente 2 representa os marcadores localizados nas estruturas micelares presentes tanto na estrutura da proteína assim como livres em solução [55]. Neste caso, um modelo de uma ou duas componentes deve ser usado no procedimento de ajuste. Contudo, análises cuidadosas da forma de linha revelaram que estas componentes não são observadas simultaneamente nos espectros de RPE da figura 4.6A para todas as concentrações de CTAC. Em vez disso, a tabela 4.4

mostra uma abrupta transição para 50 mM de surfactante, quando uma completa transferência dos marcadores de spin da componente 1 para a componente 2 é observada.

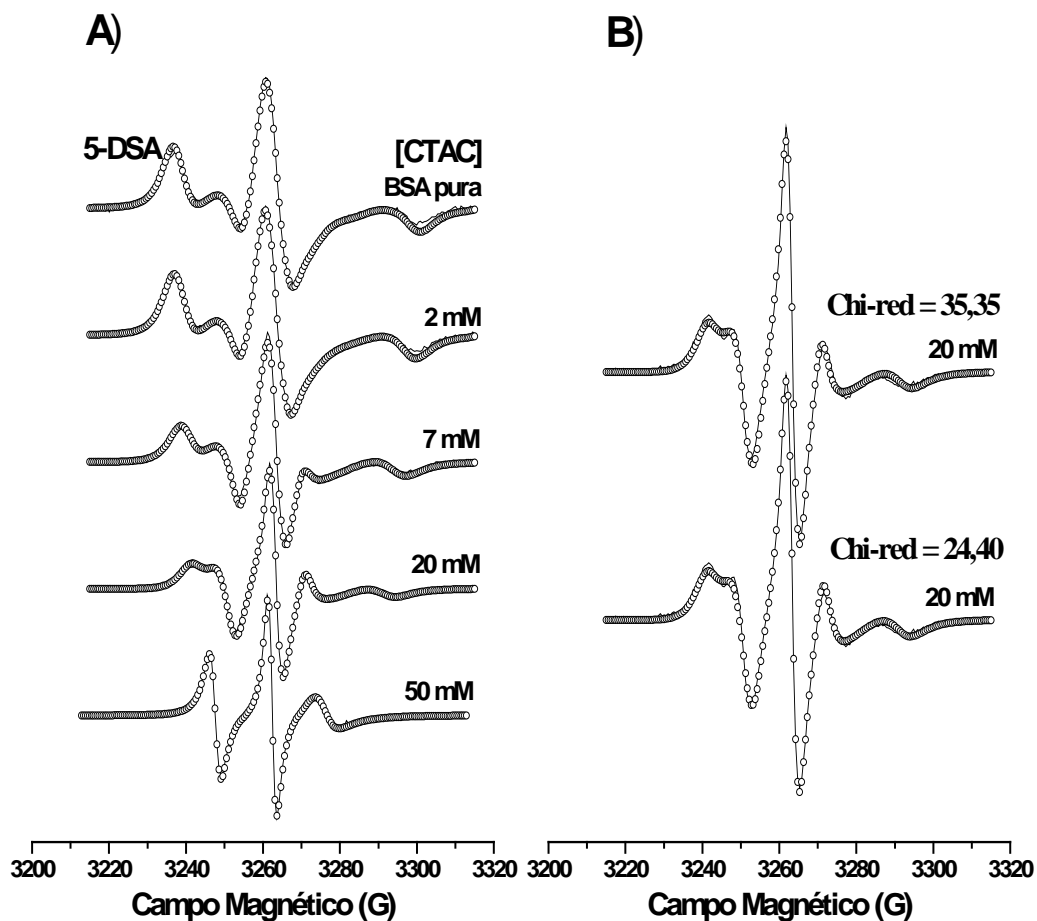


Figura 4.6. A) Espectro de RPE experimental (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos vazios) a 24°C do marcador de spin 5-DSA ligado a BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença de CTAC. B) Espectros simulados para a BSA contendo 20 mM de CTAC usando um modelo de duas componentes (espectro superior, Chi-red = 35,35) e de uma componente (espectros inferior, Chi-red = 24,40).

Nos estados iniciais da simulação espectral, um modelo de duas componentes foi utilizado para realizar os ajustes espectrais para concentrações mais baixas do surfactante

catiônico. A figura 4.6B exibe dois espectros de RPE para a proteína BSA com 20 mM de CTAC, os quais foram ajustados fazendo uso de um modelo com uma (espectro superior) e duas (espectro inferior) componentes. Embora a forma de linha dos ajustes seja similar, a qualidade dos ajustes fornecidos pelo programa NLSL (valor de  $\chi_{red}^2$ ) sugere que o modelo com uma componente foi melhor quando comparado ao outro modelo. Assim, para escolhermos o modelo correto, utilizamos uma regra prática empregada em ajustes multiparamétricos (como é o caso do NLSL): se dois modelos fornecem ajustes com qualidades similares, o modelo com menor número de parâmetros é escolhido, uma vez que estes parâmetros são suficientes para descrever o espectro de RPE.

Tabela 4.4. Parâmetros dinâmicos e magnéticos obtidos da simulação dos espectros de RPE (24°C) para o marcador de spin 5-DSA ligado à BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença das concentrações de CTAC indicadas.

| 5-DSA          |               |              |           |               |              |           |
|----------------|---------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|
| [CTAC]<br>(mM) | Componente 1  |              |           | Componente 2  |              |           |
|                | $\tau_1$ (ns) | $A_{01}$ (G) | $N_1$ (%) | $\tau_2$ (ns) | $A_{02}$ (G) | $N_2$ (%) |
| <b>0</b>       | 16,29         | 15,33        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>2</b>       | 11,32         | 15,05        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>4</b>       | 6,19          | 15,00        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>7</b>       | 4,44          | 15,05        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>10</b>      | 3,73          | 15,09        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>20*</b>     | 3,48          | 14,95        | 95,3      | 1,35          | 15,03        | 4,7       |
| <b>20</b>      | 3,56          | 15,15        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>40</b>      | 3,46          | 15,09        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>50</b>      | -             | -            | -         | 1,11          | 15,03        | 100,0     |
| <b>70</b>      | -             | -            | -         | 1,08          | 15,07        | 100,0     |
| <b>micela</b>  |               |              |           | 0,96          | 15,12        | 100,0     |



Note na tabela 4.4 que os valores de  $\tau_1$  diminuem para concentrações superiores do surfactante CTAC. Este resultado indica que a adição deste surfactante à proteína BSA é caracterizada por uma mudança estrutural, como indicado pelo aumento considerável da mobilidade da cadeia polipeptídica na vizinhança do sítio de ligação do marcador de spin 5-DSA. Para ilustrar este comportamento, temos que o valor de  $\tau_1$  para 40 mM de CTAC é de 3,46 ns, um valor cerca de 4,7 menor quando comparado a BSA pura. Por outro lado, nenhuma mudança significativa de polaridade (valores de  $A_{01}$ ) foi observada para toda a faixa de concentração de surfactante. Com relação a componente 2, é interessante observar que os valores de  $\tau_2$  são relativamente próximos àquele observado para as micelas puras de CTAC, sugerindo que as regiões dos grupos das cabeça polares monitoradas pelo fragmento paramagnético do 5-DSA destas micelas correspondem a ambientes bastante similares quanto à mobilidade. De fato, os valores muito próximos de  $A_{02}$  suportam esta interpretação.

Uma série de espectros de RPE para o marcador de spin 16-DSA ligado à proteína BSA com diferentes concentrações de CTAC também foram simulados e estão apresentados na figura 4.7A. Nestes espectros é possível observar a coexistência das componentes 1 e 2 sobrepostas nos espectros de RPE para 7 e 10 mM do surfactante catiônico, onde um modelo de duas componentes foi utilizado no procedimento de ajuste. Os valores de entrada dos tensores magnéticos referentes à componente 1 foram obtidos dos espectros para concentrações inferiores de surfactante contendo apenas esta componente. Assim, para obter os valores de entrada dos parâmetros referentes à componente 2, foi necessário ajustar previamente um espectro formado exclusivamente por esta componente. Para o ajuste dos espectros com 7 e 10 mM de CTAC, os parâmetros de

movimento e magnéticos (valores de entrada) foram obtidos da simulação espectral da amostra de BSA contendo 40 mM de surfactante.

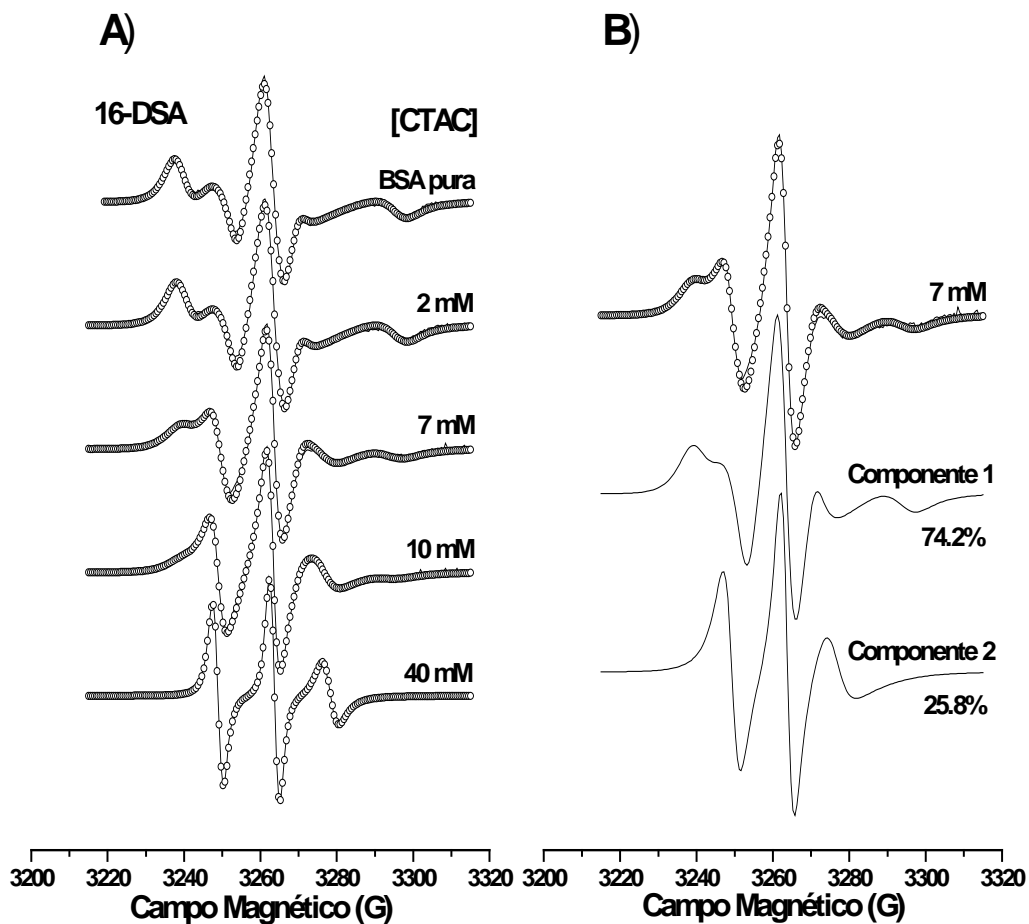


Figura 4.7. A) Espectro de RPE experimental (linhas sólidas) e de melhor ajuste (círculos vazios) a 24°C do marcador de spin 16-DSA ligado a BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença de CTAC. B) Espectros simulados para a BSA contendo 7 mM de CTAC com suas respectivas componentes isoladas pelo programa NLSL. A fração porcentual de cada componente também está apresentada.

O programa NLSL permitiu separar as componentes sobrepostas nos espectros experimentais bem como estimar a fração das populações de marcadores de spin em cada uma delas (tabela 4.5). A figura 4.7B mostra o espectro de RPE experimental e de melhor ajuste para 7 mM de CTAC assim como suas respectivas componentes. Note que os valores de  $\tau_2$  referentes à componente 2 são sempre maiores quando comparados àqueles observados para as micelas puras de CTAC (tabela 4.5). Este resultado está em concordância com a interpretação feita anteriormente acerca da origem da componente 2, isto é, esta componente provavelmente corresponde a uma situação envolvendo um equilíbrio de radicais nitróxidos entre as estruturas micelares ancoradas na proteínas e as micelas de CTAC livres em solução. Além disso, estudos de fluorescência têm sugerido que o número de agregação das micelas ancoradas à BSA é muito menor quando comparado aos valores observados para as micelas puras em solução [56]. Micelas menores implicariam em um núcleo hidrofóbico mais empacotado e, como consequência, um movimento mais restrito dos radicais nitróxidos nestas micelas. Para 20 mM de CTAC, vemos que todos os marcadores 16-DSA foram deslocados para o ambiente micelar, uma vez que nenhum sinal fortemente imobilizado (associado a componente 1) é observado.

Diferenças nos valores de  $\tau_1$  nas tabelas 4.4 e 4.5 sugere que as cadeias polipeptídicas da BSA conferem uma maior restrição a mobilidade do grupo nitróxido do 5-DSA quando comparado ao 16-DSA. Esta diferença tem sido interpretada por outros trabalhos assumindo que estes marcadores de spin estão ligados a um sítio da BSA de tal forma que a sua cadeia hidrocarbônica está localizada dentro de um canal da proteína. Entretanto, os valores de  $A_{01}$  mostram que a ambos nitróxidos monitoram um ambiente muito similar em termos de polaridade, contrariando a idéia fornecida pelos autores. Caso a cadeia

hidrocarbônica dos marcadores de spin estivesse dentro de um canal da proteína, seria esperado uma menor polaridade para o 16-DSA (menor  $A_{01}$ ). Além disso, análises dos espectros de RPE dos radicais nitróxidos derivados do ácido esteárico ligados a BSA e interagindo com íons ferrocianeto revelaram que o grupo nitróxido do 5-DSA é facilmente acessado por este íon paramagnético, provocando uma redução do sinal de RPE. Estes estudos também mostraram que o grupo nitróxido do 16-DSA parece ser de alguma forma alcançado por este íon, sugerindo que o solvente é acessível em ambos os casos [57].

Tabela 4.5. Parâmetros dinâmicos e magnéticos obtidos da simulação dos espectros de RPE (24°C) para o marcador de spin 16-DSA ligado à BSA em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) na ausência e na presença das concentrações de CTAC indicadas.

| 16-DSA         |               |              |           |               |              |           |
|----------------|---------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|
| [CTAC]<br>(mM) | Componente 1  |              |           | Componente 2  |              |           |
|                | $\tau_1$ (ns) | $A_{01}$ (G) | $N_1$ (%) | $\tau_2$ (ns) | $A_{02}$ (G) | $N_2$ (%) |
| <b>0</b>       | 7,56          | 15,46        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>2</b>       | 5,39          | 15,43        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>4</b>       | 4,27          | 15,66        | 100       | -             | -            | -         |
| <b>7</b>       | 3,32          | 15,71        | 74,2      | 1,29          | 14,85        | 25,8      |
| <b>10</b>      | 2,76          | 15,71        | 48,8      | 1,18          | 14,85        | 51,2      |
| <b>20</b>      | -             | -            | -         | 1,00          | 14,85        | 100,0     |
| <b>40</b>      | -             | -            | -         | 0,62          | 14,86        | 100,0     |
| <b>micela</b>  |               |              |           | 0,17          | 15,08        | 100,0     |

Um outro resultado bastante curioso diz respeito ao comportamento das componentes 1 e 2 nos espectros de RPE das figuras 4.6A e 4.7A. Para 20 mM de CTAC, temos que todos os marcadores de spin 16-DSA estão localizados nas estruturas micelares, enquanto que o mesmo efeito só é observado para 50 mM do surfactante em relação ao marcador 5-DSA. Esta diferença pode ser explicada em termos da constante de afinidade destes marcadores pelo sítio da proteína. Um estudo de RPE tem demonstrado que os ácidos esteáricos com os fragmentos paramagnéticos nas posições C-5, C-12 e C-16 da cadeia acila e ligados à proteína HSA apresentam uma constante de afinidade tal que  $5\text{-DSA} > 10\text{-DSA} > 12\text{-DSA}$ . Este efeito pode ser associado a um maior impedimento estérico daqueles marcadores de spin com o anel do radical nitróxido localizado próximo ao grupo metila da cadeia hidrocarbônica, sugerindo que estes marcadores (derivados do ácido esteárico) não são hábeis para entrar no canal da proteína.

# **CAPÍTULO 5**

## **Conclusões**

### 5.1 Interação de Porfirinas com Micelas de CTAC

As simulações dos espectros de RPE através do programa de ajuste NLSL forneceram valiosas informações acerca da fluidez e polaridade das regiões correspondentes a camada de Stern e ao núcleo hidrocarbônico monitoradas pelo fragmento paramagnético dos marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA, respectivamente. O tempo de correlação rotacional,  $\tau$ , indicou que a adição de porfirina é caracterizada por uma diminuição da fluidez micelar, o qual tem sido atribuído ao efeito de empacotamento deste sistema. Este efeito mostrou ser mais significativo para altas concentrações de porfirina. Para micelas de CTAC formadas por 10 mM de TPPS<sub>4</sub> em pH 4.0, por exemplo, os valores de  $\tau$  foram iguais a 2,41 e 0,55 ns para o 5-DSA e 16-DSA, respectivamente. Estes valores são cerca de 2,5 maiores quando comparados àqueles observados para a micela pura. Por outro lado, os resultados mostraram que somente pequenas variações de polaridade foram registradas no núcleo hidrocarbônico devido à adição de porfirina.

Os ajustes das curvas de SAXS também mostraram ser essenciais para compreender o mecanismo de interação da porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> com as micelas de CTAC. As curvas de SAXS foram bem ajustadas considerando estas micelas como elipsóides prolatos, como descrito previamente pelos estudos de SANS [50]. As curvas de SAXS exibiram a presença da função de interferência intermicelar  $S(q)$  na ausência e na presença de porfirina, ao passo que um deslocamento do pico característico do fator de forma  $P(q)$  na direção de valores maiores de  $q$  foi observado em função da concentração de porfirina. Assim como nos resultados de RPE, os dados de SAXS não exibiram mudanças significativas no núcleo hidrocarbônico nem mesmo na densidade ou espessura das camadas polares das micelas de CTAC. O semi-eixo menor do raio

parafínico reduziu de  $23,4 \pm 0,4$  para  $20,0 \pm 0,5$  Å na presença de 10 mM de porfirina, mostrando que a região do núcleo hidrofóbico foi afetada pela incorporação do anel porfirínico. Estes achados sustentam a interpretação feita anteriormente para a redução da fluidez, mostrado pelos resultados de RPE, o qual foi atribuída ao efeito de empacotamento da micela. Por outro lado, a espessura da camada polar,  $\sigma_{pol}$ , bem como a densidade da camada polar,  $\rho_{pol}$ , não mudaram em função da concentração de porfirina. Além disso, a razão axial  $\nu$  indicou que a forma da micela não altera para altas concentrações de porfirina.

## 5.2. Interação do Surfactante CTAC com a BSA

As simulações dos espectros de RPE das amostras de BSA com diferentes concentrações do surfactante CTAC também permitiu observar características importantes em relação a estes sistemas. Um resultado bastante informativo diz respeito ao aumento da mobilidade da cadeia polipeptídica em função da concentração do surfactante, o qual está relacionado com mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína. Notou-se também que os marcadores de spin 5-DSA e 16-DSA apresentaram diferentes comportamentos frente à adição de CTAC, onde foi necessário uma maior concentração de surfactante para deslocar completamente o 5-DSA da proteína (componente 1) para as regiões micelares (componente 2). Uma interpretação para este comportamento foi fornecida, onde sugerimos que este efeito pode estar associado a uma maior constante de afinidade do 5-DSA pela proteína em relação ao 16-DSA. Além disso, foi possível mostrar que a componente 2 surge de um equilíbrio entre dois meios micelares: estruturas micelares ancoradas na proteína e micelas livres em solução.



A idéia de que os marcadores de spin estão inseridos dentro de um canal da proteína também foi discutido, onde nossos resultados mostram não sustentar esta interpretação. Se realmente os marcadores de spin estivessem em um canal, os ajustes seriam sensíveis à anisotropia de movimento (valor de  $N$ ) e a polaridade observada para o 16-DSA seria menor quando comparada ao 5-DSA. Isso não foi observado neste trabalho, onde a polaridade dos dois marcadores foi relativamente próxima. Além disso, um estudo anterior mostrou que ambos marcadores foram igualmente acessados por um íon paramagnético.

# **CAPÍTULO 6**

## **Proposta para Trabalhos**

### **Futuros**

Como foi dito no início deste trabalho, a porfirina meso-tetrakis (4-fenilsulfonato) (TPPS<sub>4</sub>) tem sido reconhecida como uma molécula promissora para o uso em PDT. Além disso, estudos recentes têm sugerido sua utilização no tratamento de psoríasis e outras doenças de pele. Assim, o próximo passo deste trabalho será investigar o mecanismo de interação das porfirinas aniônica TPPS<sub>4</sub> e catiônica meso-tetrakis (4-methylpyridyl) (TMPyP) na forma de base livre e complexada com os metais Fe<sup>3+</sup> e Zn<sup>2+</sup> com as membranas do estrato córneo (EC). O EC é a camada mais superficial da pele e, com cerca de 15 µm de espessura, controla a passagem de substâncias em ambas direções através da pele. Estes estudos realizados utilizando as técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), fluorescência, absorção UV-Vis e de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês Fourier transform infrared). Estas investigações são indispensáveis para um melhor entendimento em nível molecular do mecanismo de interação das porfirinas com as regiões dos domínios lipídicos das membranas de EC. Além disso, fornecem subsídios para o desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas ao tratamento de doenças a nível tópico.

Além dos estudos de interação de porfirinas com o EC, serão utilizados sistemas modelos mais simples formados pela mistura dos lipídios mais abundantes encontrados no EC. Estudos têm demonstrado que misturas apropriadas de ceramidas, ácidos graxos e colesterol mimetizam a região dos domínios lipídicos do EC, o qual é responsável pela principal rota de permeação através da pele. Vesículas de fosfolipídios também serão empregadas como modelos simples de membrana biológica.

# **CAPÍTULO 7**

## **Referências Bibliográficas**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)