



Elmer Augusto Cueva Guevara

**FOTODEGRADAÇÃO DE FENOTIAZINAS E SEUS
EFEITOS ESTRUTURAIS SOBRE A Na⁺,K⁺-ATPase:
ESTUDO ATRAVÉS DE FLUORESCÊNCIA**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Física pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da PUC-Rio.

Orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro, março de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Elmer Augusto Cueva Guevara

**FOTODEGRADAÇÃO DE FENOTIAZINAS E SEUS
EFEITOS ESTRUTURAIS SOBRE A Na^+, K^+ -ATPase:
ESTUDO ATRAVÉS DE FLUORESCÊNCIA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Física pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Sônia Renaux Wanderley Louro

Orientadora

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Amando Siuiti Ito

Departamento de Física e Matemática – FFCLRP – USP

Prof. Eliane Wajnberg

CBPF

Prof. Marcel Tabak

Instituto de Química de São Carlos – USP

Prof. Pedro Pascutti

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Prof. José Eugênio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação
Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 08 de março de 2010

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

Elmer Augusto Cueva Guevara

Graduou-se em Física na UNPRG (Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque - Perú) em 1998 com ênfase em Biofísica, Física Experimental e Ensino de Física. Terminou o mestrado em Física na PUC-Rio em 2005, na área de Espectroscopia de Biomoléculas.

Ficha Catalográfica

Cueva Guevara, Elmer Augusto

Fotodegradação de fenotiazinas e seus efeitos estruturais sobre a Na⁺, K⁺-ATPase: estudo através de fluorescência / Elmer Augusto Cueva Guevara ; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – 2010.

153 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (Doutorado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. Biofísica. 3. Fluorescência. 4. Fenotiazinas. 5. Fotodegradação. 6. Na,K-ATPase. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

A meus pais e irmãos,
A Claudia Magali por seu amor e paciência,
Ao povo do Brasil.

Agradecimentos

A Deus, por dar-me a oportunidade de chegar até aqui.

A minha orientadora, professora Sônia Renaux Wanderley Louro, graças a seus conhecimentos e ensinamentos neste projeto e por ter acreditado em minha pessoa.

Ao Prof. Carlos Frederico Fontes, do Instituto de Biofísica da UFRJ, por ter gentilmente cedido as membranas de Na^+, K^+ -ATPase, preparadas em seu laboratório.

Ao pessoal do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Às instituições CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Resumo

Guevara, Elmer Augusto Cueva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Fotodegradação de fenotiazinas e seus efeitos estruturais sobre a Na^+, K^+ -ATPase: estudo através de fluorescência.** Rio de Janeiro, 2010. 153p. Tese de Doutorado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Clorpromazina (CPZ), flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP) são derivados de fenotiazinas que, sob irradiação UV, geram fotoprodutos. Observou-se que CPZ desenvolve três fotoprodutos fluorescentes em diferentes condições. A promazina (PZ) se forma da fotólise de CPZ pela quebra da ligação com o cloro. A saída do cloro é um dos principais caminhos para a formação de outros fotoprodutos, sendo também um requisito para formação de dímeros e trímeros de CPZ. O segundo produto fluorescente é a espécie sulfóxida, que se desenvolve em presença de oxigênio somente em meio ácido e tem pico de fluorescência em ~ 370 nm. A terceira espécie, com pico triplo de emissão e máximo em 352 nm, se desenvolve predominantemente em ausência de oxigênio. Observou-se que as taxas de formação dos fotoprodutos fluorescentes são maiores em meio ácido. FPZ e TFP apresentaram o mesmo fotoproduto fluorescente (emissão ~ 410 nm), espécie que se desenvolve em presença de O_2 com as mesmas características da espécie sulfóxida. A fluorescência do fotoproduto da TFP foi testada como sensor de radiação UV e para detecção de pequenas quantidades de oxigênio. Estudando as interações com membranas contendo a enzima Na^+, K^+ -ATPase, mostrou-se que as fenotiazinas alteram a estrutura lipídica da membrana, já que aumentam a anisotropia de fluorescência da sonda de membrana DPH. Os resultados da interação das fenotiazinas com resíduos de triptofano da proteína mostraram supressão de fluorescência de mais da metade dos triptofanos, sem transferência de energia. A estrutura local do sítio de ATP na proteína Na^+, K^+ -ATPase, marcado com a sonda fluorescente FITC, não foi afetada pela interação com as fenotiazinas, sugerindo que a localização do sítio de ligação das fenotiazinas com a enzima fica longe do sítio de ATP.

Palavras-chaves

Biofísica; fenotiazinas; fotodegradação; Na^+, K^+ -ATPase; espectroscopia; fluorescência; clorpromazina; flufenazina; trifluoperazina; triptofano.

Abstract

Guevara, Elmer Augusto Cueva; Louro, Sônia Renaux Wanderley (Advisor). **Fotodegradation of phenothiazines and their structural effects on Na⁺,K⁺-ATPase: a fluorescence study**. Rio de Janeiro, 2010. 153p. Doctoral thesis – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Chlorpromazine (CPZ), fluphenazine (FPZ) and trifluoperazine (TFP) are phenothiazine derivatives, which generate photoproducts under UV irradiation. We observed that CPZ develops three fluorescent photoproducts under different conditions. Promazine (PZ) that forms from the CPZ photolysis. The chlorine loss is one of the main pathways for photoproduct formation and it seems to be a requirement for development of CPZ dimers or trimers. The sulfoxide species with fluorescence peak at ~ 370 nm develops in the presence of oxygen only in acid conditions. Another fluorescent species with structured emission and maximum at 352 nm develops primarily in the absence of oxygen. It was observed that the development rates of all fluorescent photoproduct are greater under acidic conditions. FPZ and TFP presented the same fluorescent photoproduct (emission ~ 410 nm), which develops in the presence of O₂ with the same characteristics as the sulfoxide derivative. The fluorescence of the TFP photoproduct was tested as a UV sensor and a sensor for detection of small amounts of oxygen. Studying the interactions with Na⁺, K⁺-ATPase enriched membranes, phenothiazines were shown to modify the membrane lipid structure since they increased the fluorescence anisotropy of the membrane probe DPH. The results of phenothiazine interaction with tryptophan residues of the enzyme showed fluorescence quenching of ~ 50% of the tryptophan residues, without energy transfer. The local structure of the Na⁺, K⁺-ATPase ATP binding site, labeled with FITC, was not affected by the interaction with the phenothiazines, suggesting that the phenothiazine sites are far from the ATP binding site.

Keywords

Biophysics; antidepressant; antipsychotic; Na,K-ATPase; spectroscopy; fluorescence; chlorpromazine; fluphenazine; trifluoperazine.

Sumário

1 .	Introdução	11
1.1.	Objetivos	13
1.2.	Estrutura dos capítulos	13
2 .	O sistema biológico	15
2.1.	Moléculas Biológicas	15
2.2.	Antipsicóticos derivados de fenotiazina	18
2.2.1.	Clorpromazina (CPZ)	20
2.2.2.	Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)	23
2.3.	Membrana Biológica	25
2.3.1.	Modelo de mosaico fluido	25
2.4.	A Enzima Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	27
2.4.1.	Características Estruturais da Na ⁺ ,K ⁺ - ATPase	28
2.4.2.	Características funcionais	31
2.5.	Sondas fluorescentes	33
3 .	Técnicas Experimentais	37
3.1.	Conceitos básicos de espectroscopia	37
3.2.	Espectroscopia de absorção	39
3.3.	Espectroscopia de fluorescência	41
3.3.1.	Medidas de fluorescência estacionária	43
3.3.2.	Fluorescência resolvida no tempo	45
3.3.3.	Supressão de fluorescência	50
3.3.4.	Anisotropia de fluorescência	53
3.4.	Espectrometria de massa	61
4 .	Materiais e Métodos	65
4.1.	Materiais	65
4.1.1.	Frações de membranas - Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	65
4.1.2.	Reagentes	65
4.1.3.	Sondas fluorescentes	66
4.1.4.	Instrumentação	67
4.2.	Procedimentos Experimentais	68
4.2.1.	Absorção óptica	68

4.2.2. Fluorescência estacionária	68
4.2.3. Fluorescência com resolução temporal	73
5 . Formação de fotoprodutos fluorescentes de fenotiazinas	77
5.1. Absorção e Fluorescência das Fenotiazinas	77
5.2. Fotodegradação das Fenotiazinas.	79
5.2.1. Absorção das fenotiazinas sob fotodegradação	80
5.2.2. Fluorescência dos produtos de fotodegradação das fenotiazinas	84
5.2.3. Espectrometria de massa das fenotiazinas irradiadas.	98
5.2.4. Discussão sobre a fotodegradação de fenotiazinas	106
5.3. Fenotiazinas como sensor óptico de oxigênio e de radiação ultravioleta baseado na fotodegradação	110
5.3.1. Arranjo experimental	111
5.3.2. Resultados da variação da fluorescência com a dose de radiação e com a concentração de oxigênio	112
6 . Interações das fenotiazinas com os fragmentos de membranas Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	115
6.1. Resultados da interação de CPZ com membranas - Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	116
6.1.1. Supressão da intensidade de fluorescência	117
6.1.2. Tempos de vida de fluorescência de DPH	119
6.1.3. Anisotropia - fluorescência estacionária	122
6.2. Interação de TFP com membranas - Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	124
6.2.1. Supressão da intensidade da fluorescência	124
6.2.2. Decaimento de fluorescência	124
6.2.3. Anisotropia - fluorescência estacionária	127
6.3. Decaimento de anisotropia de DPH – cinética e ordem dos lipídios	129
6.3.1. Efeitos das fenotiazinas no decaimento de anisotropia de DPH	130
6.3.2. Anisotropia de fluorescência de DPH em membranas de crustáceo normal e adaptado	133
7 . Efeitos estruturais na Na ⁺ , K ⁺ -ATPase devido às fenotiazinas	135
7.1. Interação da TFP com a Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	136
7.1.1. Irradiação no UVB da TFP em presença da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	140
7.2. Interação da CPZ com a Na ⁺ , K ⁺ -ATPase marcada com FITC	142
8 . Conclusão	145
9 . Referências Bibliográficas	147

Abreviações

AO	antroil-oubaína
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
CPZ	clorpromazina
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
FPZ	flufenazina
FITC	fluoresceína isotiocianato
LDI	ionização por dessorção a laser
Pi	fosfato inorgânico
PZ	promazina
TFP	trifluoperazina
UV	ultravioleta

1. Introdução

As fenotiazinas são drogas usadas em tratamentos de doença mentais. Os mecanismos de ação destas drogas em moléculas biológicas como membranas e proteínas ainda não são totalmente entendidos. Elas são sensíveis à luz ultravioleta, sendo que sob irradiação formam outras espécies como fotoprodutos estáveis ou radicais livres. A ação das fenotiazinas depende muito de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, em particular, de sua solubilidade no ambiente lipídico. Estas drogas, ao fotodegradar-se, vão perdendo suas propriedades farmacológicas reagindo de forma diferente com os sistemas biológicos, por exemplo, causando reações de fototoxicidade. Estes efeitos colaterais dos derivados de fenotiazinas, causados por irradiação UV, são também importantes clinicamente e sua origem é muitas vezes atribuída à formação de fotoprodutos (Chignell et. al., 1985).

Kochevar e Horn (1983) atribuíram o mecanismo de fototoxicidade dos derivados de fenotiazinas à formação de dímeros e polímeros maiores da droga, produzidos por irradiação da CPZ. Outros mecanismos consideram que o dano fotoquímico é produzido por radicais livres. Por isso é importante conhecer as propriedades fotofísicas e fotoquímicas destes fotoprodutos para conhecer melhor o mecanismo de ação dos derivados de fenotiazinas. Já havíamos encontrado certas espécies fluorescentes produzidos por fotodegradação da CPZ sob irradiação UV (Guevara et al., 2007).

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma bomba de cátions responsável pelo transporte ativo de íons Na^+ e K^+ contra o gradiente eletroquímico. A enzima utiliza a energia química da hidrólise da ATP para convertê-la em trabalho mecânico, e por meio de mudanças conformacionais transporta os íons de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática (Jorgensen, 1982; Swedner e Donnet, 2001). Encontramos que um fotoproduto da CPZ liga-se covalentemente na proteína (Guevara et al., 2007). O sítio de ligação da CPZ tem uma mesma estrutura local tanto na conformação E_1 quanto na E_2 , já que a reação foi independente do estado

conformacional da proteína. Usando o marcador fluorescente derivado da ouabaína, a antroilouabaína, avaliamos os efeitos estruturais da CPZ sobre o sítio de ouabaína. A CPZ torna o sítio de ouabaína mais hidrofóbico e o sítio de ligação da CPZ se localiza próximo ao sítio da ouabaína (Guevara et al., 2007).

DPH é uma sonda fluorescente hidrofóbica usada principalmente para estudos de propriedades dinâmicas e estruturais das membranas lipídicas (Kaiser e London, 1998). FITC é uma sonda fluorescente que marca a Na^+ , K^+ -ATPase perto do sítio de ATP. Esta sonda é usada para estudar efeitos estruturais locais no sítio do ATP (Amler et al., 1992; Jorgensen et al., 2003).

Neste trabalho, caracterizamos os fotoprodutos fluorescentes de CPZ, FPZ e TFP criados por irradiação UV, em condições controladas, por meio da técnica de fluorescência. As interações destas fenotiazinas e de seus fotoprodutos (por meio da irradiação UV) com membranas enriquecidas em Na^+ , K^+ -ATPase foram estudadas com o fim de investigar o mecanismo de ação dos derivados de fenotiazinas. A CPZ, devido a seu caráter anfifílico, intercala-se entre os lipídios das bicamadas lipídicas e associa-se preferencialmente a grupos negativos localizados na superfície da membrana (Louro et al., 1998). Para estudar as mudanças nas propriedades dinâmicas e estáticas das membranas lipídicas por efeito dos derivados de fenotiazinas empregou-se a sonda DPH. Para estudar o efeito estrutural local do sítio de ATP foi utilizada a sonda FITC. A localização mais precisa das fenotiazinas nas membranas biológicas pode ser investigada conhecendo as localizações de FITC e de DPH na proteína e na membrana, respectivamente. O comportamento das proteínas de membranas parece ser também modulado indiretamente pela alteração da estrutura, termodinâmica ou propriedades dinâmicas da membrana lipídica (Cantor et al., 1999; Sutherland et al., 1988). Este efeito estrutural indireto sobre a proteína pode ser analisado usando as propriedades de fluorescência dos resíduos de triptofano.

Neste trabalho, aproveitamos também as propriedades físicas e químicas dos fotoprodutos das fenotiazinas em condições aeróbicas e anaeróbicas, para estudar uma possível aplicação dos derivados de fenotiazinas como sensores de oxigênio e de radiação UV.

1.1. Objetivos

Este trabalho tem os seguintes objetivos principais:

- I. Encontrar as propriedades de fluorescência dos fotoprodutos de fenotiazinas.
- II. Avaliar os fotoprodutos de fenotiazinas como sensores de oxigênio e de radiação ultravioleta, com leitura através da técnica de fluorescência.
- III. Estudar os sítios de ação dos derivados de fenotiazinas e os efeitos estruturais sobre as membranas enriquecidas de Na^+ , K^+ -ATPase.

1.2. Estrutura dos capítulos

No capítulo 2 apresenta-se uma descrição das estruturas moleculares e das funções dos sistemas biológicos estudados, como a membrana celular e a proteína Na^+ , K^+ -ATPase, dos fármacos derivados de fenotiazinas: clorpromazina (CPZ), fluofenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP), e dos marcadores fluorescentes DPH e FITC.

No capítulo 3 apresenta-se uma breve descrição dos fundamentos teóricos e experimentais das técnicas de espectroscopia de absorção e de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Também neste capítulo, de forma breve, comenta-se a técnica de espectrometria de massas.

No capítulo 4 identificam-se os materiais e descrevem-se os métodos empregados nas medidas experimentais e na análise dos espectros.

Os resultados e discussões são divididos em três partes:

- o estudo da fotodegradação dos derivados de fenotiazinas é mostrado no capítulo 5;

- as interações das fenotiazinas com as membranas usando DPH são mostradas no capítulo 6;
- as interações dos derivados de fenotiazinas com o sítio de ligação de ATP e com resíduos de triptofano na proteína são mostradas no capítulo 7.

No capítulo 8 apresentam-se as conclusões do trabalho e perspectivas para novas investigações.

2. O sistema biológico

2.1. Moléculas Biológicas

Os organismos vivos são constituídos por entidades químicas, que podem ou não formar estruturas poliméricas. No entanto, é sob a forma de polímeros que o seu papel é mais significativo na dinâmica da vida. Entre os polímeros que caracterizam um organismo salientam-se os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Além destas macromoléculas, encontramos outros compostos, igualmente responsáveis pela construção dos organismos biológicos. Trata-se dos lípidios, por exemplo, os fosfolípidios (Fig. 2.1 A), componentes essenciais das membranas biológicas, e dos nucleotídeos, como o transportador principal da energia química na célula, a adenosina-5'-trifosfato (ATP) (Fig. 2.1 B). (Ricardo e Teixeira, 1983)

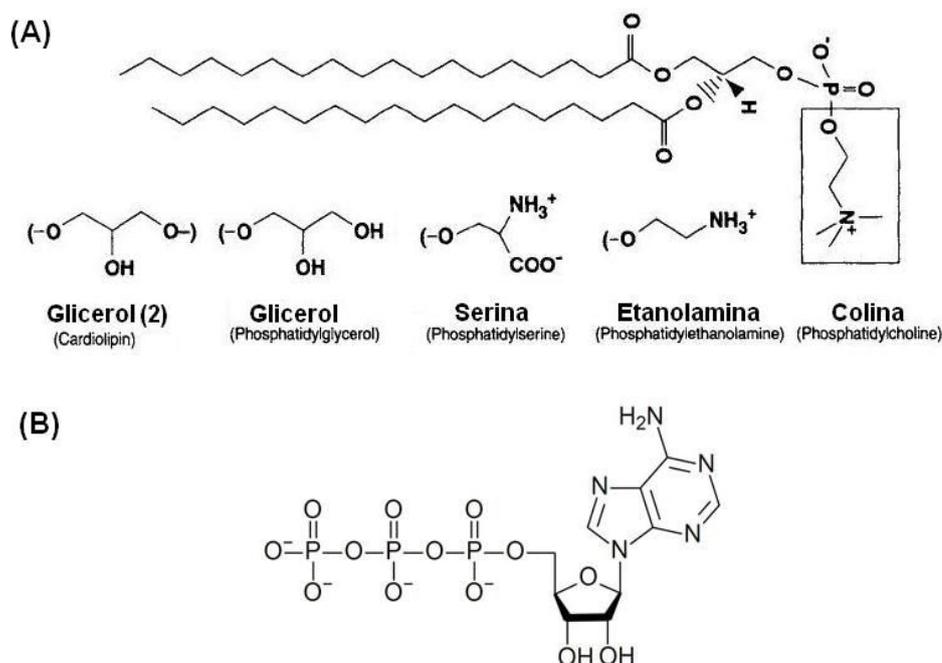


Figura 2.1. Estrutura química de fosfolípidios (A) e da molécula de ATP (B) (modificado de Dowhan et al., 2008).

Os lipídios são moléculas insolúveis ou de reduzida solubilidade em água em virtude da sua natureza não polar, apresentando, no entanto, grande solubilidade nos solventes orgânicos. Os lipídios polares são chamados anfipáticos porque contêm domínios hidrofóbicos, que não interagem com a água, e domínios hidrofílicos, que interagem com a água. Quando misturados com a água, formam espontaneamente agregados lipídicos microscópicos em uma fase separada de sua vizinhança aquosa, agrupando-se com suas porções hidrofóbicas adjacentes e seus grupos hidrofílicos interagindo com o meio aquoso ao redor. Interações hidrofóbicas entre moléculas de lipídios são direcionadoras da formação e a manutenção desses agregados. Dependendo das condições e da natureza dos lipídios, vários tipos de agregados lipídicos podem-se formar, dentre eles, micelas, bicamadas lipídicas e lipossomos (Fig. 2.2). A formação de micelas é favorecida quando a área transversal dos grupos carregados é maior do que a da(s) cadeia(s) de acila(s) lateral(is). A formação da bicamada lipídica ocorre mais facilmente quando as áreas transversais dos grupos cabeça e das cadeias acilas laterais são semelhantes. (Dowhan et al., 2008; Nelson et al., 2002).

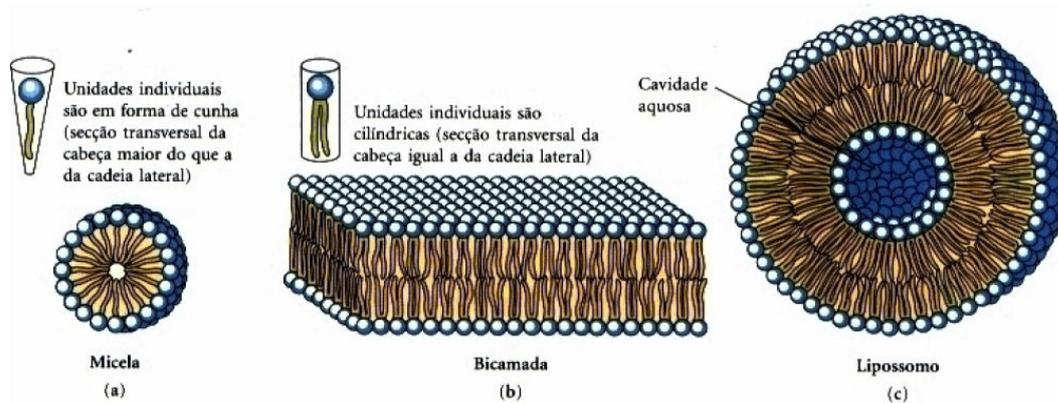


Figura 2.2. Agregados lipídicos anfipáticos que se formam na água (Nelson et al., 2002).

As proteínas desempenham um papel crucial na estrutura e função dos seres vivos. Apesar das suas múltiplas funções, as proteínas apresentam uma estrutura básica comum: são constituídas por longas cadeias poliméricas de subunidades ligadas entre si (aminoácidos). Estes aminoácidos estão associados entre si através de ligações covalentes (ligações peptídicas) entre o grupo carboxila (COOH) de um aminoácido e o grupo amina (NH₂) de outro. A sequência de aminoácidos que constitui uma cadeia polipeptídica tem a designação de **estrutura primária**.

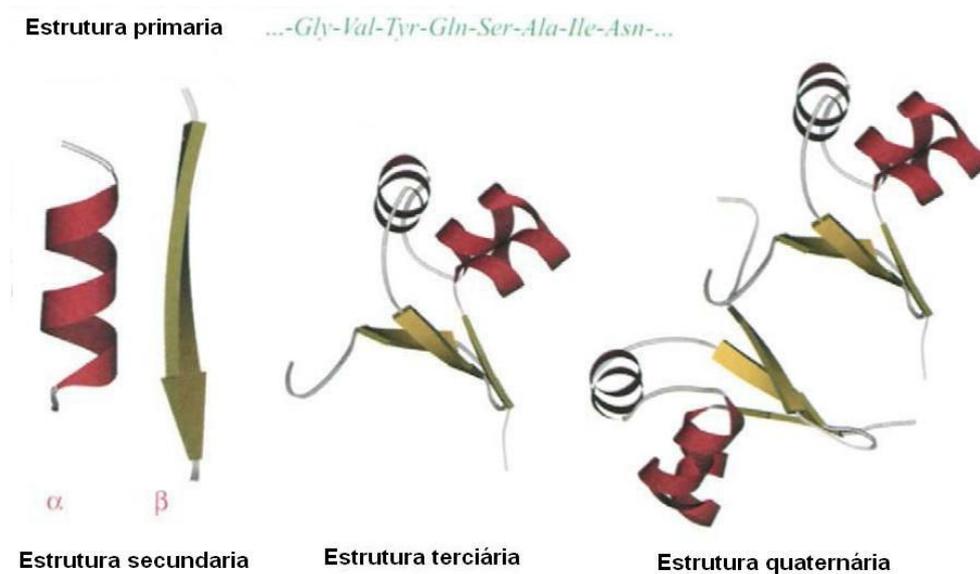


Figura 2.3. Níveis de organização estrutural da proteína: estrutura primária (sequência de aminoácidos), estrutura secundária (hélice- α e folha- β), estrutura terciária de uma proteína globular, e estrutura quaternária de uma proteína oligomérica formada, nesse exemplo, por duas cadeias (modificado de Finkelstein et al., 2002).

A configuração desenovelada das proteínas é pouco comum *in vivo*, sendo as configurações globulares ou alongadas, resultantes de processos de enovelamento ou torção, as mais comuns. Cada um dos radicais dos polipeptídios interage com os radicais vizinhos, formando pontes de hidrogênio. Devido a estas interações, as cadeias polipeptídicas tendem a dobrar-se espontaneamente em forma de folha ou em espiral, originando configurações particularmente estáveis em determinadas regiões da cadeia polipeptídica, formando a **estrutura secundária**.

Uma das características das proteínas é a sua interação com as moléculas de água. A tendência é que as regiões não polares da cadeia polipeptídica se agreguem, minimizando a ruptura das pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Esta agregação provoca uma alteração da estrutura secundária da cadeia polipeptídica, originando configurações complexas e compactas do tipo globular, constituindo o que habitualmente se designa por **estrutura terciária** da proteína.

Frequentemente as proteínas mais complexas são formadas por diferentes subunidades, as quais, associadas, constituem uma unidade funcional com propriedades específicas. Proteínas de maiores dimensões podem ser constituídas por duas ou três subunidades tomando, então, a designação de dímeros ou trímeros. A estas proteínas que apresentam uma estrutura particular, formada por

várias subunidades, convencionou-se designar **estrutura quaternária**. A Fig. 2.3 mostra os quatro níveis de organização estrutural das proteínas.

Dentro do grupo das proteínas encontramos uma classe especial de moléculas, as enzimas, que facilitam certas reações químicas. A energia química necessária para que estas moléculas desenvolvam a sua ação catalítica específica é fornecida através da hidrólise das moléculas de ATP (Finkelstein et al., 2002; Mathews et al., 1990).

2.2. Antipsicóticos derivados de fenotiazina

Antipsicóticos do grupo das fenotiazinas são uma classe de fármacos heterocíclicos derivados de amina que, como muitos outros com essas características, apresentam importante ação contra várias disfunções. Os antipsicóticos ou neurolépticos fenotiazínicos se caracterizam por sua ação psicotrópica, com efeitos sedativos e psicomotores. Além de se constituírem como fármacos preferencialmente usados no tratamento sintomático das psicoses, principalmente a esquizofrenia, também são utilizados em outros distúrbios psíquicos e mesmo como anestésicos. Atualmente existem diferentes derivados de fenotiazina que apresentam atividade neuroléptica.

As fenotiazinas possuem uma estrutura química formada por três anéis onde dois anéis benzênicos estão unidos por um átomo de nitrogênio e um de enxofre como se mostra na Fig. 2.4.

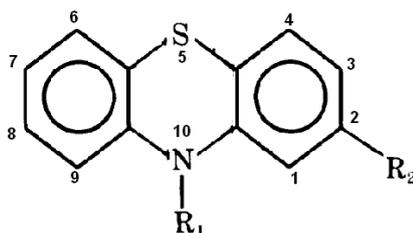


Figura 2.4. Estrutura química de um derivado da fenotiazina.

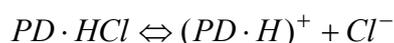
A cadeia lateral R_1 , localizada na posição 10, ligada ao nitrogênio do anel tiazina (médio) e o grupo substituinte na posição 2, R_2 , explicam as variações entre os compostos de fenotiazinas. Em termos da estrutura da cadeia lateral, as fenotiazinas são geralmente sub-classificadas da seguinte forma:

- **compostos aminoalquílicos**, como a clorpromazina;

- *compostos piperazínicos*, como a trifluoperazina e a flufenazina.
- *compostos piperidínicos*, como a tioridazina.

Os derivados de fenotiazinas existem na forma de bases e sais livres. Os sais livres como as fenotiazinas hidrocloradas são substâncias cristalinas de cor branca, que são muito solúveis em água e solventes orgânicos. Esta propriedade depende do tipo de substituintes.

Os derivados de fenotiazinas (PD) dissociam-se em soluções aquosas como segue:



Eles reagem como ácidos muito fracos. Os valores de pK_a para a protonação da fenotiazina no nitrogênio (posição 10, Fig. 2.4) varia de 4.5 a 7.8 dependendo principalmente do substituinte nessa posição. Os grupos aminos terciários em R_1 (Fig. 2.4) têm valores de pK_a acima do pH fisiológico, mas não muito, e conseqüentemente nesse pH há espécies carregadas e não carregadas. Lin et al. (2003) encontraram dois valores de pK_a para CPZ (para N do anel e para a amina de R_1) e três para TFP e FPZ (para N do anel e para os dois Ns da piperazina em R_1), mas a técnica utilizada por eles dá, em geral, valores de pK acima dos encontrados por outros autores.

Os anéis aromáticos são responsáveis pela absorção significativa e, em muitos casos, pelas propriedades de fluorescência que, variando seu estado de protonação e o ambiente local da droga podem ser usados como sondas fluorescentes na interação com membranas. A biodistribuição seletiva de uma droga iônica em tecidos e membranas depende de suas propriedades de agregação e de interações complexas com seu entorno molecular, já que a formação de agregados influencia as propriedades fotofísicas das fenotiazinas (Karpinska et al., 1996; Caetano et al., 2000).

A atividade farmacológica das fenotiazinas é em geral dependente da sua concentração, e os efeitos sobre as propriedades físicas das membranas diferem em concentrações baixas e altas (Welti et al., 1984). Mudanças na estrutura das fenotiazinas não somente mudam sua atividade neuroléptica, mas também mudam o espectro e a intensidade dos efeitos colaterais. A exigência estrutural para a atividade neuroléptica das fenotiazinas inclui uma substituição na posição 2 (R_2 na Fig. 2.4) (Garcia et. al., 2005).

Os derivados de fenotiazinas têm sido foco de estudos biológicos, químicos, físico-químicos e fotoquímicos, devido a suas propriedades farmacêuticas e aplicações. Particularmente, o comportamento fotoquímico de fenotiazinas tem ganhado interesse, já que causa efeitos fotossensíveis em pacientes submetidos a terapia com estas drogas (Rodrigues et. al., 2006). A fotossensibilização pode ser através de fototoxicidade ou fotoalergia. A resposta fototóxica é essencialmente uma reação exagerada à queimadura do sol, enquanto a fotoalergia é uma reação de hipersensibilidade atrasada. Tanto na pele como nos olhos foram encontrados efeitos colaterais fototóxicos e fotoalérgicos nos pacientes que ingeriram estas drogas. Entre as fenotiazinas, a CPZ tem sido amplamente estudada para poder esclarecer os mecanismos associados aos seus efeitos fototóxicos. Além disso, é bem conhecido que a fototoxicidade de uma droga é frequentemente devida à ação simultânea de moléculas intactas, espécies intermediárias reativas e fotoprodutos estáveis formados durante a irradiação; por isso é muito importante avaliar qual é o papel que estas espécies têm na fototoxicidade (Robert, 1984; Miolo et al., 2006; Chignell et al., 1985).

Sob irradiação, as fenotiazinas passam ao primeiro estado excitado singlete S_1 ou a S_n , dependendo da energia de excitação e do solvente. O decaimento dos estados excitados acontece via conversão interna ($S_n \rightarrow S_1$ e $S_1 \rightarrow S_0$ e liberação de calor), fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$ com emissão de luz), e cruzamento intersistema ($S_1 \rightarrow T_1$ ou $S_2 \rightarrow T_2$ e $T_2 \rightarrow T_1$, via conversão interna). O decaimento do primeiro estado tripleto T_1 pode ocorrer com emissão de luz, via fosforescência. Derivados de fenotiazinas mostram valores baixos de rendimento quântico de fluorescência, mas seus rendimentos quânticos de fosforescência são sempre mais altos. Além da fosforescência, dois mecanismos podem desativar o estado tripleto: a transferência de energia para o oxigênio molecular, que conduz à geração de 1O_2 (oxigênio molecular singlete), e os processos de foto-ionização (Rodrigues et al., 2006).

2.2.1. Clorpromazina (CPZ)

A clorpromazina (Fig. 2.5) é principalmente um agente antipsicótico, mas também era usado para evitar vômitos e como anti-hipertensivo quando administrado por meio intravenoso.

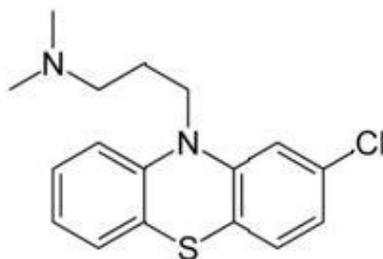


Figura 2.5. Estrutura molecular da clorpromazina (CPZ).

A clorpromazina é um derivado aromático de cadeia lateral alifática. A natureza do radical na posição 10 (N) tem influência na atividade farmacológica do fenotiazínico e a presença de grupos capazes de retirar elétrons na posição 2 aumenta a eficácia do neuroléptico (Silva, 2001). A CPZ em pH fisiológico está protonada no nitrogênio da cadeia lateral, já que possui um pK_a de 9.3 (Lee, 1978).

A clorpromazina é uma molécula que se fotodegrada em outras espécies moleculares quando é irradiada com luz UV. A luz UV rompe ligações na molécula da CPZ permitindo formar diferentes classes de radicais livres. Os radicais livres são espécies com um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron desemparelhado frequentemente dá como resultado espécies altamente instáveis. Estes, por serem muito instáveis, começam a se ligar rapidamente a outras moléculas que se encontram muito perto, para assim alcançar o equilíbrio químico formando novas espécies mais estáveis. Os radicais livres podem ser classificados como redutores (doando um elétron a um aceptor) e oxidantes (aceitando um elétron de um doador) (Buettner et al., 2000).

As reações fotoalérgicas e fototóxicas de CPZ em humanos, assim como sua capacidade de induzir danos cromossômicos em células mamárias que foram irradiadas com luz UV, são atribuídas à formação de radicais livres (Miolo et al., 2006). Na literatura encontra-se que a CPZ se liga fotoquimicamente a proteínas e inibe enzimas fotossensíveis. Irradiação UVB sobre a CPZ em presença da proteína Na^+ , K^+ -ATPase deram como resultado a ligação covalente de CPZ a um sítio perto do sítio principal de inibição da atividade da proteína (Kochevar et al., 1983; Guevara et al., 2007).

A irradiação ultravioleta na CPZ produz uma variedade de radicais, tais como o radical cátion (via foto ionização), o radical promazinil neutro e um átomo

de cloro (Cl^\bullet) (via ruptura homolítica), e um radical peroxil centrado no enxofre. A descloração seguida de fotorredução ou substituição, a última dependente do solvente, é o principal caminho para se obter fotoprodutos de fenotiazinas, no caso de Cl na posição 2 (Miolo et al., 2006).

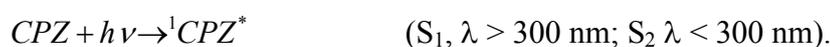
Chignell et al. (1985) descrevem a fissão homolítica da CPZ para obter o radical Cl^\bullet e o radical promazinil (PZ^\bullet), que em presença de água forma a PZ e 2-OH-PZ, como se segue:



O radical promazinil é um provável candidato como espécie fototóxica *in vivo* e *in vitro*. Além disso, esse radical pode reagir covalentemente com proteínas e macromoléculas para produzir antígenos que poderiam ser responsáveis pela resposta fotoalérgica à clorpromazina (Chignell et al, 1985). Esse radical é capaz de reagir com outro radical promazinil ou com a própria CPZ para formar dímeros ou polímeros grandes. Esses produtos têm sido observados, particularmente em soluções mais concentradas (Motten et al., 1985).

O processo de fotoionização para obter o radical cátion foi descrito por Buettner et al. (1989), da seguinte forma:

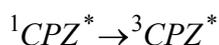
Depois da absorção inicial de um fóton,



Este estado singlete poderia se fotoionizar diretamente (monofotônico),

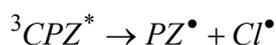


ou, relaxar para um estado tripleto,



O estado tripleto poderia:

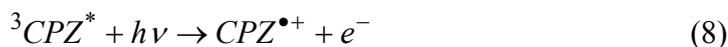
(a) desclorar,



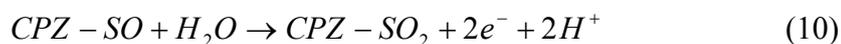
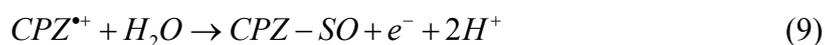
(b) foto ionizar diretamente,



ou, (c) foto ionizar pela absorção de outro fóton (bifotônico),



As fenotiazinas são também sensíveis à oxidação por mecanismos químicos, fotoquímicos e metabólicos. O processo de oxidação na CPZ poderia acontecer assim:



Tem-se reportado que mais da metade de CPZ encontrada no plasma humano está em forma de sulfóxido (Buettner et al., 1986).

2.2.2. Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)

A flufenazina (Fig. 3.6) tem ações antipsicóticas e neurolépticas e é 50-70 vezes mais potente que a CPZ na terapia de esquizofrenia. Sua cadeia lateral piperazínica, responsável pelas ações extrapiramidais, possui dois sítios de protonação, com valores de pK_a 7.2 e 3.4 (Tsakovska, 2003). Então, cerca de 40% das moléculas de TFP encontram-se protonadas na cadeia piperazínica em pH fisiológico (7.4).

Além das propriedades antipsicóticas, a FPZ é dotada de ações citotóxicas (produção de oxigênio singlete) e antimicrobianas (Elisei et al., 2002).

Estudos de fotólise com luz UVA em meio aquoso mostraram que derivados trifluorometil (CF_3), como a FPZ, em soluções irradiadas não formam radicais via fissão na posição 2. No entanto, encontraram-se dois fotoprodutos (F_1 e F_2 na Fig. 2.6) de FPZ formados por ataque nucleofílico ou por oxidação do nitrogênio na cadeia piperazínica (Miolo et al., 2006).

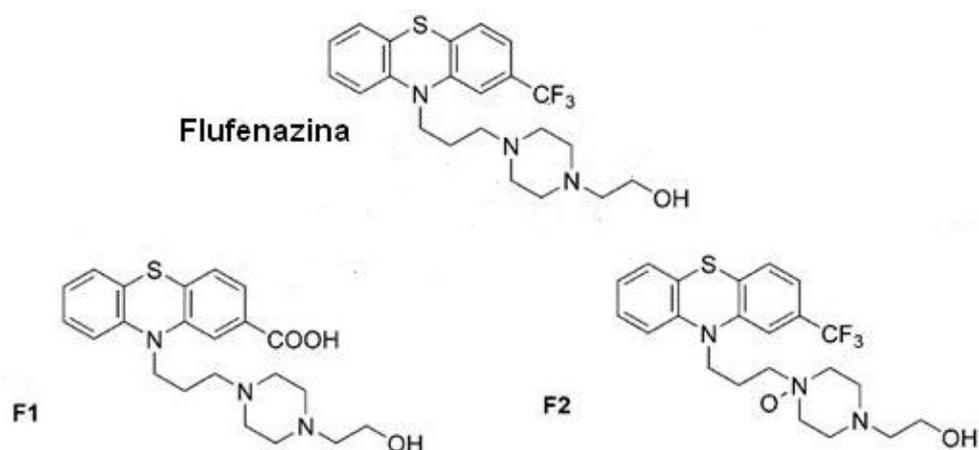


Figura 2.6. Estrutura molecular da flufenazina e dois possíveis foto produtos (F1 e F2) conseguidos sob irradiação UVA em meio aquoso por Miolo et al. (2006).

A TFP (Fig. 2.7) é conhecida por ser uma droga muito potente do ponto de vista terapêutico em psicoses, 20 vezes mais potente que a CPZ no tratamento da esquizofrenia. Foi largamente empregada como antipsicótico por via oral, nas fases aguda e crônica da esquizofrenia. A TFP possui dois valores de pK_a , 8.1 e 4.0, para os dois sítios de protonação na cadeia lateral piperazínica (Malheiros et al., 1998; Post, et al., 1980). Então, cerca de 83% das moléculas de TFP encontram-se protonadas na cadeia piperazínica em pH fisiológico (7.4).

Também para a TFP foram encontrados indícios de formação de fotoprodutos por irradiação UV. Rodrigues et al. (2006) concluíram que estados excitados tripleto de monômeros de TFP e FPZ formam radicais cátions que reagem com o oxigênio molecular, conduzindo à formação de fotoprodutos oxidados de TFP, como os derivados sulfóxidos.

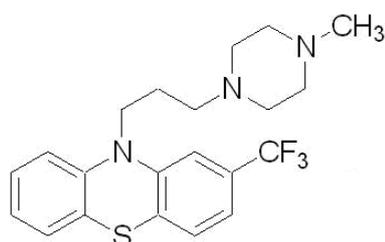


Figura 2.7. Estrutura química de trifluoperazina.

2.3. Membrana Biológica

Toda célula é caracterizada por uma membrana plasmática, que encapsula o citoplasma e cria compartimentos internos. Além de seu papel como barreira física que mantém a integridade da célula, a membrana plasmática fornece funções necessárias para a sobrevivência da célula, incluindo exclusão de substâncias em desuso ou tóxicas, aquisição de nutrientes e fontes de energia, reprodução, locomoção e interações com componentes no ambiente. Tipicamente a membrana biológica contém lipídios, proteína e carboidratos em razões que variam com o tipo de membrana. Quase sempre o carboidrato está covalentemente associado com a proteína (glicoproteína) ou com o lipídio (glicolipídio e lipopolisacarídeos). Assim, a membrana pode ser considerada como uma matriz lipídio - protéica onde as proteínas realizam funções específicas, enquanto que os lipídios são responsáveis pela barreira de permeabilidade e integridade estrutural da membrana.

2.3.1. Modelo de mosaico fluido

O modelo de membrana biológico conhecido como mosaico fluido (mosaico porque incluem proteínas, colesterol e outros tipos de moléculas além dos fosfolipídios) é o aceito atualmente (Fig. 2.8). As bicamadas de lipídios são fluidas, onde fosfolipídios se difundem rapidamente por toda a superfície bidimensional da membrana. Os fosfolipídios podem mover-se lateralmente, numa membrana de célula bacteriana, em uns poucos minutos à temperatura ambiente. Proteínas de membranas se difundem pela membrana da mesma forma, mas em um ritmo mais lento devido a seu grande tamanho (um fosfolipídio pode ter cerca de 650 Da e uma proteína de tamanho médio pode ter cerca de 100.000 Da). De vez em quando um fosfolipídio faz um "flip-flop" atravessando a membrana para o lado oposto, mas isto não é comum. Isto requer que a cabeça hidrofílica do fosfolipídio passe inteiramente através do interior altamente hidrofóbico da membrana e que as caudas hidrofóbicas estejam expostas ao ambiente aquoso.

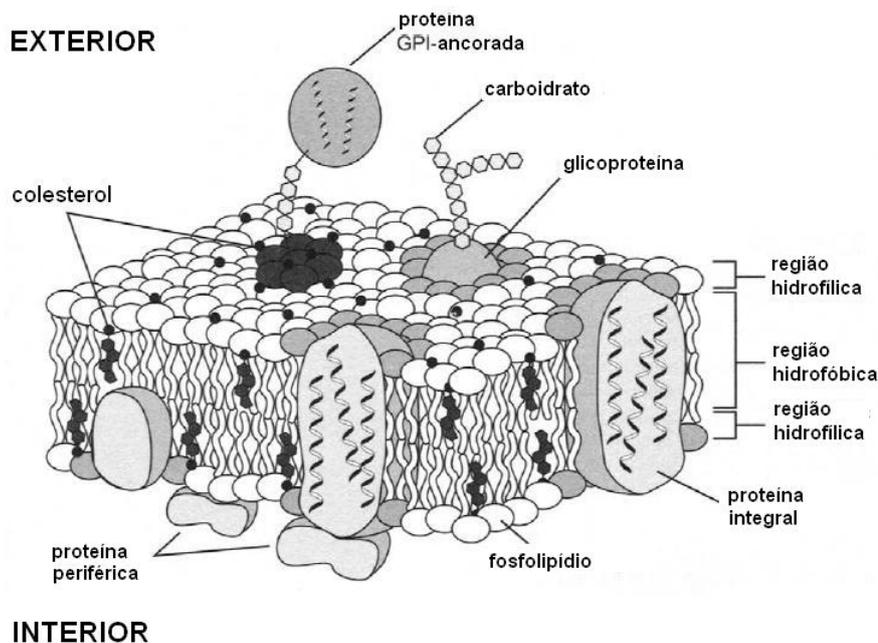


Figura 2.8. Modelo para a estrutura de uma membrana biológica: modelo de mosaico fluido (modificada de Dowhan et al., 2008).

O colesterol é um componente importante das membranas biológicas. O colesterol quebra as interações de Van der Waals e diminui o empacotamento das caudas dos fosfolípidios. Este rompimento torna a membrana mais fluida. Consequentemente, um modo de a célula controlar a fluidez de sua membrana é regulando seu nível de colesterol. Outra maneira para a célula controlar a fluidez de sua membrana é regular o grau de saturação das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolípidios. Os hidrocarbonetos saturados são cadeias estendidas, somente com ligações simples ("saturadas" com hidrogênio), e os hidrocarbonetos insaturados têm uma ou mais ligações duplas (não "saturadas" com hidrogênio). Fosfolípidios com hidrocarbonetos saturados se compactam muito juntos aumentando as interações de Van der Waals, que prendem os fosfolípidios. As cadeias de fosfolípidios insaturados impedem que os fosfolípidios consigam se aproximar muito, diminuindo as interações de Van der Waals.

Nas membranas celulares são encontrados dois tipos gerais de proteínas: as proteínas periféricas e as proteínas integrais.

As **proteínas periféricas** estão inteiramente fora da membrana, mas são ligadas a ela por forças moleculares fracas (ligações iônicas, pontes de hidrogênio ou forças de Van der Waals) e podem ser dissociadas da membrana por agentes que rompem estas ligações (altas concentrações de sais, EDTA ou uréia).

As **proteínas integrais** são encaixadas na bicamada lipídica. Muitas delas estão estendidas dum lado ao outro da membrana e são chamadas proteínas transmembranares. Elas, frequentemente, têm três domínios diferentes, dois hidrofílicos e um hidrofóbico. O domínio hidrofóbico, transmembranar, insere-se na bicamada lipídica porque é feito de aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica. Por causa da interação dos lipídios com estes domínios transmembranares, as proteínas integrais não podem ser isoladas e purificadas sem prévia dissolução com detergentes, que afastam os lipídios (Dowhan et al., 2008).

2.4.

A Enzima Na^+ , K^+ - ATPase

A enzima Na^+ , K^+ - ATPase é uma bomba de cátions de sódio e potássio que pertence à família de enzimas denominadas ATPases tipo P. O estado atual do conhecimento sobre sua estrutura e mecanismos relacionados à sua função aparece bem descrito em alguns artigos de revisão (Jorgensen et al., 2003; Kühlbrandt, 2004) e está descrito também na dissertação de mestrado (Guevara, 2005). As ATPases tipo P são uma grande família de mais de 50 proteínas de membranas, que são responsáveis pelo transporte ativo de uma variedade de cátions através da membrana. A translocação de cátions contra o gradiente de potencial eletroquímico é conseguido por utilizar a energia de hidrólise do ATP (Kühlbrandt et al., 2004).

Todas as ATPases tipo P são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares, com massas moleculares de 70-150 kDa. As enzimas desta classe de família criam e mantêm o potencial de membrana nas células animais e vegetais, resultante das diferentes concentrações iônicas em cada lado da membrana. Este gradiente de concentração iônica é um dos atributos mais indispensáveis das células vivas e aciona o transporte secundário de açúcar e aminoácidos, assim como de outras pequenas moléculas e íons (Kühlbrandt et al., 2004; Jorgensen et al., 1982; Sweadner et al., 2001).

Em um trabalho clássico, a Na^+ , K^+ - ATPase foi descrita por Skou em 1957, onde se estudou uma ATPase que era estimulada pela presença simultânea de Na^+ e K^+ em uma fração de membrana de nervos de pata de caranguejo. Normalmente a enzima é isolada em forma associada à membrana de tecidos ricos nesta proteína, como órgãos de peixe elétrico (Brotherus et al., 1980), rim de

mamíferos (Jorgensen et al., 1971; Kyte, 1981; Kunihiro et al., 1993), como também de glândula salina de tubarão (Esmann et al., 1985).

2.4.1. Características Estruturais da Na^+, K^+ - ATPase

A estrutura oligomérica da enzima consiste de duas subunidades de proteínas α , β ligadas não-covalentemente (Fig. 2.9). Além dessas duas subunidades existe uma pequena subunidade γ (Cornelius et al., 1991; Andersen et al., 1996).

O heterodímero de subunidades protéicas α e β (Fig. 2.8), ligadas não covalentemente, constitui a unidade funcional mínima capaz de hidrolisar ATP e sustentar a transição entre os estados conformacionais E_1 e E_2 que ocorrem durante o ciclo catalítico.

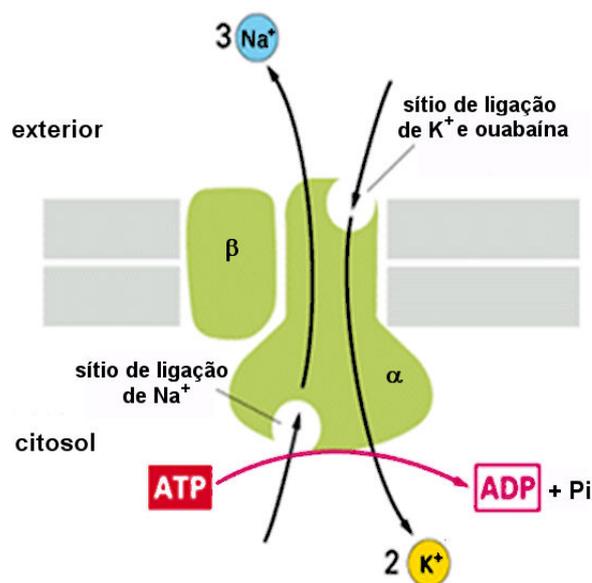


Figura 2. 9 Modelo da estrutura de um heterodímero (α - β) da Na^+, K^+ - ATPase. Modificada de [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail5.htm)

Subunidade α : a subunidade catalítica α é um polipeptídeo grande com uma sequência de aminoácidos conhecida (1020 resíduos) e tem um peso molecular de 110 kDa. Dados bioquímicos e espectroscópicos mostram que as transições entre as principais conformações, E_1 e E_2 , na subunidade α são importantes para as interações entre os domínios citoplasmáticos (A, N e P) e os sítios de cátions no domínio transmembranar (M), mostrados na Fig. 2.10. Esta subunidade contém os

sítios de ligação para um inibidor específico da enzima, a ouabaína (Jorgensen et al., 2003; Keenan et al., 2005).

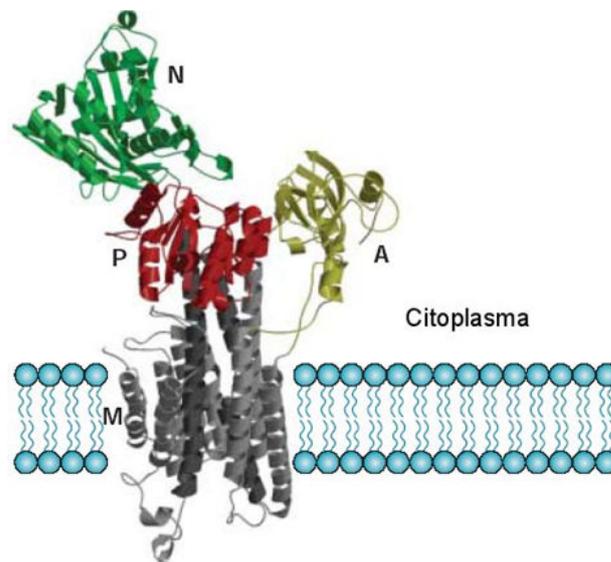


Figura 2. 10 Modelo da subunidade α de ATPase tipo P, mostrando os domínios citoplasmáticos N (de ligação do nucleotídeo), P (de fosforilação) e A (atuador), bem como o domínio membranar (M). (Kühlbrandt, 2004).

Domínios da subunidade " α "

Os quatro domínios bem definidos da subunidade α , mencionados anteriormente como P, N, A e M, são conservados em toda família de ATPases tipo P (Kühlbrandt, 2004). O domínio citoplasmático N contém o sítio de ligação do ATP; no domínio P estão os sítios para o fosfato e Mg^{+} ; o domínio A terminal - amino não contém sítios de ligação, mas sim sítios de ruptura tríptica e o domínio M, com 10 subdomínios transmembranares (hélices - α), contém os sítios dos cátions Na^{+} e K^{+} (Pedersen et al., 1998; Kühlbrandt, 2004).

O **Domínio "P"** é o sítio de fosforilação aproximadamente esférico. A inserção do domínio N expõe o sítio de ligação do Mg^{+2} e o resíduo invariante de aspartato que durante a hidrólise do ATP se torna fosforilado por transferência do fosfato- γ do ATP (Fig. 2.9).

O **Domínio "N"** é o sítio de ligação do nucleotídeo (Fig. 2.9), que contém os sítios de ligação de ATP e se estende desde o sítio de fosforilação Asp369 à dobra do terminal carboxílico 586-DPPR. O sítio de ligação para a base adenina do ATP encontra-se num bolso hidrofóbico de resíduos invariantes.

O Domínio “A”, domínio atuador, é o domínio citoplasmático menor da subunidade “ α ” da Na^+ , K^+ - ATPase, consistindo no segmento terminal-N e o laço entre os segmentos M2 e M3. Na Lys30 encontra-se um sítio de ruptura triptica bem definido. Esta parte do domínio “A” interage com o domínio “N” no estado conformacional $\text{E}_2[\text{K}]$. Apesar de não conter sítios de ligação para íons ou cofatores, há uma sequência invariante que se põe em contato com o sítio de fosforilação na conformação $\text{E}_2\text{-P}$, confirmando seu importante papel no mecanismo molecular (Fig. 2.9).

O Domínio “M”, membranar, consiste de 10 hélices “ α ” transmembranares (M1-M10) ou 5 pares de hélices inseridas do lado citoplasmático (Fig. 2.9), que cercam os sítios de ligação dos íons na membrana, assim como curtos laços conectivos na superfície membranar exterior. A Fig. 2.11 mostra um modelo de homologia (com a Ca^{2+} -ATPase) para essas hélices. As hélices M2, M4, e M5 são estendidas, com várias voltas no lado citoplasmático, onde elas se conectam com os domínios citoplasmáticos.

As regiões transmembranares de ATPases tipo P diferem das de canais iônicos pela ausência dum trajeto óbvio de transporte, na forma de canal aberto preenchido por água. Presumivelmente, isto reflete a diferença entre os mecanismos de transporte ativo e passivo e a necessidade de oclusão dos cátions nas bombas de íons.

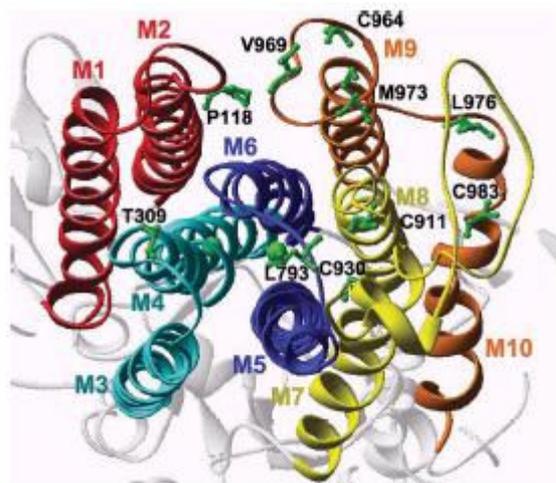


Figura 2. 11 Um modelo de homologia da Na^+ , K^+ - ATPase com hélices transmembranares, visto do lado extracelular. Observam-se os resíduos destacados nos laços extracelulares, particularmente L9/10. (Jorgensen et al., 2003).

Subunidade “ β ”: é uma glicoproteína com peso molecular ~ 35 kDa que, juntamente com os açúcares, pode atingir a ~ 55 kDa. Ela é uma proteína integral que possui um único segmento transmembranar. A subunidade “ β ” é importante na biogênese da enzima, parecendo desempenhar um papel na formação e maturação da holoenzima, na translocação e incorporação à membrana plasmática, na regulação da estabilidade conformacional e na atividade da subunidade “ α ”. Além disso, ela pode estar envolvida na modulação da afinidade da enzima por Na^+ e K^+ (Shan Ping Yu, 2003; Kawakami et al., 1988; Kawakami et al., 1985; Guynn et al, 2002).

Subunidade “ γ ”: forma parte da família de proteínas FXYD, que é uma pequena família de proteínas curtas, com um domínio transmembranar que contém a sequência FXYD (Kühlbrandt, 2004). Algumas proteínas FXYD conhecidas regulam a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase em tecidos como o de coração, músculo esquelético e rim. Esta subunidade é um pequeno polipeptídeo (~ 10 kDa), denominado primeiramente como “componente proteolípídica”, e foi identificada em algumas preparações purificadas da enzima. Esta componente parece não ser essencial para a maturação estrutural ou funcional da Na^+ , K^+ - ATPase (Lowndes et al., 1984; Béguin et al., 1997), mas outras evidências sugerem que pode alterar a afinidade da Na^+ , K^+ - ATPase por Na^+ (Béguin et al., 1997; Therien et al., 1997).

2.4.2. Características funcionais

Destacam-se como importantes funções fisiológicas da enzima a sua influência sobre (Skou, 1988):

- O potencial de membrana: a enzima é responsável pela manutenção do gradiente transmembranar de Na^+ e K^+ que gera o potencial de repouso ou fornece energia para o potencial de ação de células excitáveis;
- A manutenção de altas concentrações de íon K^+ intracelular: altas concentrações de íon K^+ intracelular são de importância para que aconteça um número de reações enzimáticas dentro das células;
- A regulação osmótica: com um potencial de membrana negativo a concentração intracelular de ânions capazes de se difundir é menor que a

extracelular. Isto compensa o efeito osmótico de ânions intracelulares que não podem passar através da membrana;

- O transporte ativo: o gradiente de Na^+ é usado como energia livre para o co-transporte de outras substâncias como açúcares, aminoácidos, e para conter o transporte de Ca^{2+} ou H^+ contra gradiente através da membrana celular.

Múltiplos mecanismos podem regular a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase, influenciando os papéis funcionais da enzima em diferentes condições, tornando a proteína vulnerável a ataques patológicos. Esses mecanismos reguladores também tornam a enzima alvo potencial para tratamentos terapêuticos. Além de sua dependência em ATP, a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase é regulada pelo estado de fosforilação, por substâncias endógenas como a ouabaína, por neurotransmissores como a dopamina (inibidor) e norepinefrina (estimulador), e por hormônios como a insulina (Yu, 2003).

Segundo o mecanismo de reação de Albert-Post para a hidrólise de ATP pela enzima (Fig. 2.12), a proteína de membrana possui dois estados conformacionais E_1 e E_2 durante cada ciclo catalítico.

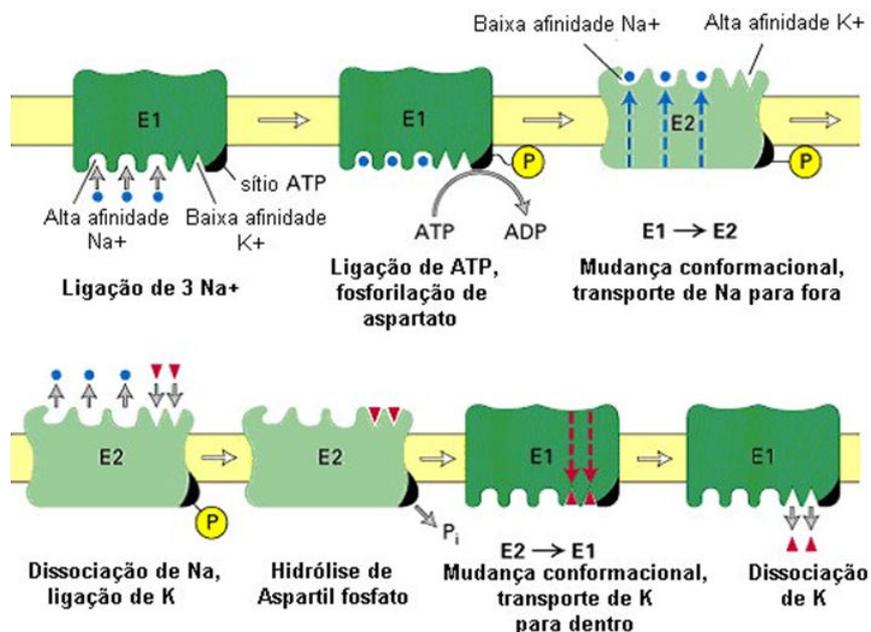
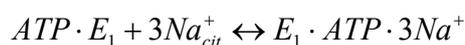


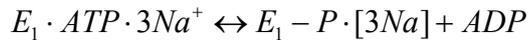
Figura 2. 12 Esquema simplificado de Post-Albers (1969) do ciclo da bomba de sódio. E_1 e E_2 são as conformações da enzima com os sítios de ligação.

Os passos do mecanismo de transporte iônico são (Jorgensen et al. 2003):

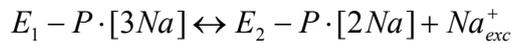
- a. Ligação de três íons Na^+ em sítios orientados para o citoplasma.



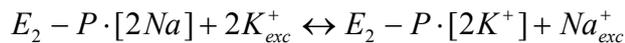
- b. Fosforilação dependente de Na^+ citoplasmático, a partir do ATP, e oclusão de três íons Na^+ .



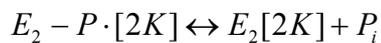
- c. O transporte de três íons Na^+ para a região extracelular, acoplado à transição conformacional $E_1\text{-P} \leftrightarrow E_2\text{-P}$.



- d. Ligação de dois íons de K^+ aos sítios orientados para a região extracelular.



- e. Desfosforilação ativada por K^+ extracelular e oclusão de dois íons K^+ .



- f. ATP agindo com baixa afinidade acelera o transporte para o interior de dois íons K^+ , acoplado à transição conformacional $E_2[2\text{K}] \leftrightarrow E_1$.



Nos esquemas acima, cit e exc referem-se a citoplasma e a região extracelular, respectivamente. A enzima no estado E_1 tem alta afinidade por Na^+ e ATP, porém baixa afinidade por K^+ . Este estado intermediário muda para E_2 , formando $E_2\text{P}$. No estado E_2 a enzima tem alta afinidade para K^+ , mas baixa afinidade para Na^+ e ATP. Desse jeito, as mudanças conformacionais permitem que os íons Na^+ escapem para o meio externo e íons K^+ se liguem à enzima e passem para o interior da célula. Na Na^+ , K^+ - ATPase de rim de porco, o equilíbrio $E_1\text{-P} \leftrightarrow E_2\text{-P}$ é fortemente inclinado a favor da forma $E_2\text{-P}$ (Jorgensen et. al. 2003)

2.5. Sondas fluorescentes

Uma sonda fluorescente é compreendida como um fluoróforo preparado para responder a um estímulo específico ou localizar-se em uma determinada região de uma espécie biológica.

As principais vantagens do emprego de sondas ligadas à técnica de fluorescência são: (a) a **sensibilidade**, pode-se estudar materiais fluorescentes em quantidades de picogramas, (b) **seletividade**, derivada em parte pelos

comprimentos de onda de excitação e de emissão de fluorescência que são característicos de cada composto e, (c) a **variedade de possibilidades** em que as amostras podem ser rapidamente estudadas, ou seja, em soluções diluídas ou concentradas, em suspensões (meio micelar) ou em superfícies de sólidos.

As sondas fluorescentes podem ser divididas dentro de 3 classes: (1) **sondas intrínsecas**, como o triptófano nas proteínas (absorve em torno de 295 nm e emite em 350 nm em água); (2) **sondas extrínsecas ligadas** covalentemente; e (3) **sondas extrínsecas associadas** (Valeur B., 2002).

Antroil-ouabaína e a ouabaína

A ouabaína pertence a uma classe de fármacos, os glicosídeos cardíacos, que são encontrados em certas plantas e animais. A ouabaína, esteróide cardiotônico, é inibidor específico da Na^+ , K^+ - ATPase que, por sua vez, é o único receptor fisiológico conhecido para a ouabaína. Seu sítio de ação está localizado na subunidade “ α ”, do lado extracelular da proteína integral. Fármacos deste tipo possuem ação específica e poderosa sobre o miocárdio, por isso é muito utilizado em tratamentos de insuficiência cardíaca congestiva (Rang H. P. et al., 1993). A ouabaína tem alta afinidade pelo complexo $\text{MgE}_2\text{-P}$ da Na^+ , K^+ - ATPase, portanto é necessário a presença de Mg^{+2} no solvente para iniciar a conversão da conformação $\text{E}_1\text{-P}$ a $\text{E}_2\text{-P}$ (Jorgensen P. L. et al. 2003)

A antroil-ouabaína (AO) é um derivado fluorescente da ouabaína, tendo como fluoróforo o antraceno ligado ao açúcar, para minimizar a perturbação à alta afinidade inibitória, que depende principalmente da parte esteróide do glicosídeo (Fortes P. A., 1977) (Fig. 2.13). Esta sonda fluorescente é usada em vários estudos de Na^+ , K^+ - ATPase, como em cinética de ligação dos glicosídeos cardíacos, em estrutura e mudanças conformacionais (Lee J. A. et al., 1986; Amler et al., 1992; Amler et al., 1996), assim como para detecção de estados intermediários fosforilados da enzima (Fortes P. A. et al., 1984).

A especificidade da AO pela Na^+ , K^+ - ATPase e a sensibilidade da técnica de fluorescência fazem desse marcador uma importante ferramenta para estudo da enzima, permitindo a utilização de concentrações baixas, semelhantes às fisiologicamente relevantes. A especificidade do marcador faz com que a

purificação da enzima não seja um fator primordial para obtenção de resultados confiáveis.

Hellen et al., (1997) mediram as constantes cinéticas de associação e dissociação da AO à Na^+ , K^+ - ATPase fosforilada. A cinética de interação da ouabaína com a Na^+ , K^+ -ATPase é relativamente lenta e a da AO é semelhante. Isso permite que estudos de cinética sejam realizados a partir de fluorescência no estado estacionário.

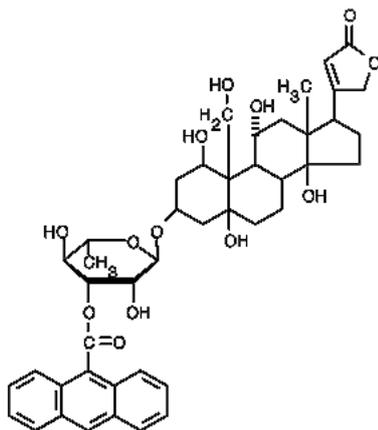


Figura 2. 13 Estrutura química da antrouil-ouabaína.

DPH (1,6 – difenil - 1,3,5 - hexatrieno)

DPH é uma sonda usada frequentemente para estudos de propriedades dinâmicas e estruturais das membranas e também para estimar a fluidez da membrana. Esta sonda fluorescente é ideal para tais experimentos visto que exibe um forte aumento de fluorescência quando em meio lipídico e responde à ordem de orientação dos fosfolipídios, já que sua emissão é muito sensível à anisotropia do ambiente local.

A DPH, mostrada na Fig. 2.14, é considerada uma molécula cilíndrica com seu dipolo de transição aproximadamente alinhado com seu eixo molecular. Conseqüentemente, a polarização de sua fluorescência é alta na ausência de movimento de rotação e é muito sensível à reorientação ao longo do eixo molecular, resultado das interações com os lipídios vizinhos na bicamada. A molécula de DPH dentro da bicamada de lipídios é geralmente orientada paralelamente ao eixo da cadeia do lipídio, mas pode também localizar-se no

centro da bicamada de lipídios paralela à superfície. Essas propriedades têm conduzido a seu uso extensivo para medições de fluidez em membranas.

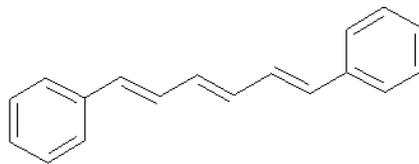


Figura 2. 14 Estrutura química da sonda DPH.

As medições de fluidez são feitas pelo processo despolarização da fluorescência. Quando as moléculas de DPH inseridas na bicamada de lipídios absorvem energia da luz polarizada verticalmente, por exemplo, emitem luz a partir do primeiro estado excitado singlete, depois de um tempo médio caracterizado pelo tempo de vida do estado excitado. Quando as moléculas dos lipídios da membrana estão em repouso, as moléculas de DPH permanecem orientadas verticalmente na bicamada e a luz emitida também é polarizada. Se as moléculas dos lipídios têm mobilidade grande, os eixos moleculares da DPH mudam de direção durante o tempo de vida do estado excitado, e a direção de polarização da luz emitida também muda aleatoriamente. Assim, é possível associar a perda de polarização com a mobilidade dos lipídios.

FITC (fluoresceína isotiocianato – isômero I)

A FITC (Fig. 2.15 B) é a molécula original de fluoresceína (Fig. 2.15 A) acrescida com um grupo funcional isotiocianato ($-N=C=S$). Este derivado de fluoresceína é capaz de unir-se a proteínas, reagindo com os grupos aminas. A Na^+, K^+ - ATPase, na subunidade, α , é covalentemente marcada com a sonda FITC no aminoácido Lis 501(lisina). Este aminoácido está localizado perto do sítio da ATP (ADP) em Lis 480 (Lis 492), e é utilizada para estudar efeitos estruturais locais nesse sítio (Amler et al., 1992; Jorgensen et al., 2003).

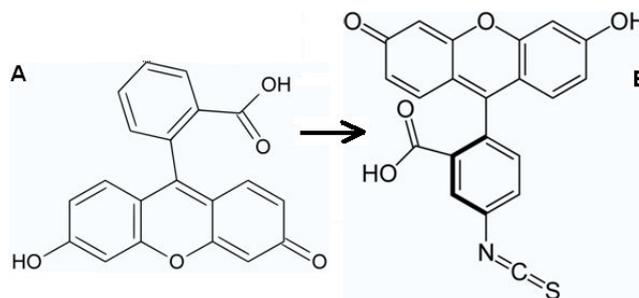


Figura 2. 15 Estrutura química da fluoresceína (A) e FITC (B).

3. Técnicas Experimentais

O presente trabalho experimental foi desenvolvido basicamente pela aplicação de técnicas espectroscópicas, em particular, de espectroscopia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo. A espectroscopia de fluorescência tem sido desde muito tempo uma das técnicas mais utilizadas nos estudos de estrutura e função de moléculas biológicas, em particular proteínas e biomembranas. A fluorescência é um método muito sensível para estudos de mudanças conformacionais, interações e localização de sítios de ação de moléculas de interesse biológico em macromoléculas e biomembranas.

A espectrometria de massas foi também usada em nosso trabalho, sobretudo na identificação das massas moleculares das espécies (ou fotoprodutos) formadas na fotodegradação.

Descrevemos brevemente neste capítulo os princípios físicos em que estão baseadas nossas medidas. As seções referentes a fluorescência foram escritas com base nos excelentes textos escritos por Lakowicz (2006), Valeur (2005).

3.1. Conceitos básicos de espectroscopia

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação com a matéria, consistindo na absorção, emissão ou espalhamento da radiação por átomos ou moléculas. A luz é uma radiação eletromagnética, numa faixa restrita de comprimentos de onda (~ 180 nm, ultravioleta, a ~ 900 nm, infravermelho). As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por uma frequência (ν) e um comprimento de onda (λ), sendo essas grandezas físicas relacionadas pela equação $\lambda\nu = c$, onde c é a velocidade da luz para um determinado meio.

As ondas eletromagnéticas também possuem propriedades de partícula e se comportam como partículas (fótons) com energia bem definida $E=h\nu$, onde h é a

constante de Planck. Portanto, uma radiação eletromagnética de comprimento de onda λ é formada de fótons com energia $E = hc/\lambda$.

Muitos dos processos físico-químicos que acontecem no mundo microscópico das moléculas só são explicados com base na mecânica quântica. Ela nos dá informações sobre os estados de energia que uma molécula pode ocupar e os mecanismos pelos quais uma molécula pode mudar de um estado de energia a outro. O estado de uma molécula ou sistema quântico é descrito por meio de uma função de onda ψ que é, em geral, função das coordenadas espaciais e dos spins dos elétrons e núcleos, e dos campos externos. Esta função de onda nos dá uma distribuição de probabilidade ($|\Psi|^2$ é a densidade de probabilidade).

A mecânica quântica mostra que uma molécula só pode ter energias num conjunto discreto de valores. Estas quantidades são chamadas níveis de energia da molécula. Os níveis principais de energias são determinados pelas possíveis distribuições espaciais dos elétrons e são chamados **níveis eletrônicos de energia**; esses níveis são desdobrados em **níveis vibracionais**, que indicam os vários modos de vibração da molécula. Há ainda subdivisões menores chamadas de **níveis rotacionais**. O nível de mais baixa energia é chamado de estado fundamental e nele as energias eletrônica e dos movimentos internos têm seus valores mínimos. Os outros estados de energia da molécula são chamados de estados excitados.

Geralmente as moléculas se encontram em seu estado fundamental e, ao serem irradiadas, podem ser excitadas até outro nível energético quando a energia da radiação incidente corresponde exatamente à diferença de energia entre os dois níveis. Podemos excitar a molécula submetendo-a a um campo externo, por exemplo, o campo elétrico da radiação incidente, que interage com as partículas carregadas da molécula. O potencial elétrico externo é capaz de ocasionar uma probabilidade de transição entre os estados da molécula. Esta pode ser descrita em função do operador dipolo elétrico da molécula (que descreve a distribuição de carga de uma molécula) e da amplitude do campo elétrico oscilante da luz. A amplitude da probabilidade de transição é o momento de dipolo da transição, descrevendo a habilidade da luz em distorcer uma molécula obrigando-a a fazer uma transição para outro estado (Hollas, 2004).

3.2. Espectroscopia de absorção

Em geral, uma transição eletrônica consiste em promover um elétron de um orbital de uma molécula no estado fundamental para um orbital desocupado por absorção de um fóton. As transições eletrônicas de orbitais mais externos correspondem à espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível. O orbital molecular σ é formado por dois orbitais atômicos s ou de um orbital atômico p e um orbital atômico s . O orbital molecular π se forma por dois orbitais atômicos p . O orbital molecular n consiste de elétrons não ligantes localizados em heteroátomos tais como oxigênio ou nitrogênio. Para ilustrar os níveis de energia de uma molécula e as transições entre os três tipos de orbitais moleculares, a Fig. 3.2 mostra o formaldeído como exemplo.

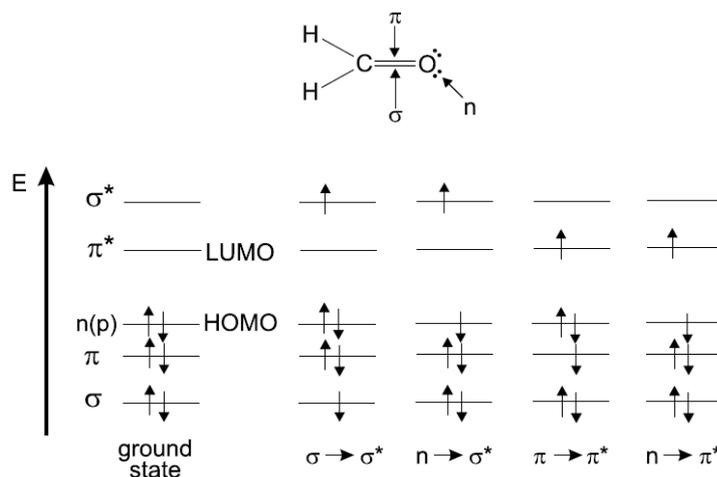


Figura 3.1. Níveis de energia de orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (Valeur, 2001).

Na espectroscopia de absorção e fluorescência de uma molécula, são importantes os seguintes orbitais: o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e o orbital molecular desocupado mais baixa energia (LUMO). Por exemplo, no formaldeído, o HOMO é o orbital n e o LUMO é o orbital π^* .

As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ podem ser observadas em todos os compostos insaturados, em geral aparecendo na faixa do espectro com $\lambda > 220$ nm até o infravermelho próximo. Se não forem proibidas por regras de seleção de spin ou simetria, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ têm altos coeficientes de absorção molar (extinção), aproximadamente $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As transições $n \rightarrow \pi^*$ têm

coeficientes de absorção menores, cerca de $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e, frequentemente, aparecem como “ombro” na faixa de comprimentos de onda maiores nos espectros de absorção. Para medidas em solução, as transições $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ e $\sigma \rightarrow \pi^*$ são geralmente escondidas pela absorção do solvente ($< 190 \text{ nm}$).

Lei de Beer - Lambert

A lei de Beer - Lambert relaciona a quantidade de luz absorvida por uma amostra com sua espessura e concentração, expressa da seguinte forma:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad 3.1$$

onde I é a intensidade da luz transmitida, I_0 é a intensidade de luz incidente, c é a concentração da amostra em mols por litro, l é a espessura da amostra em cm e ε é o coeficiente de absorção molar, que é um parâmetro característico de cada espécie molecular num dado solvente e comprimento de onda observado.

A razão I/I_0 é a fração de luz incidente que é transmitida, e é chamada transmitância (T). A absorbância (A) é dada por

$$A = \log(I_0 / I) \quad 3.2$$

Logo,

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad 3.3$$

Densidade óptica é a absorbância para uma espessura da amostra igual a 1 cm. A falha em obedecer à dependência linear da absorbância com a concentração, segundo a lei de Beer-Lambert, pode ser devida a altas concentrações, à formação de agregados ou à presença de outras espécies absorvedoras.

O princípio de Frank-Condon

Os movimentos dos elétrons são muito mais rápidos do que os do núcleo, muito mais pesado. Assim, quando há uma transição eletrônica para um estado excitado por absorção de um fóton (duração de $\sim 10^{-15} \text{ s}$), que é muito rápida comparada com tempos associados a vibrações moleculares ($10^{-10} - 10^{-12} \text{ s}$), os núcleos não têm tempo de se reacomodar na nova posição de equilíbrio (aproximação de Born-Oppenheimer). Esta observação é a base do princípio de Franck-Condon: uma transição eletrônica em geral ocorre sem mudança nas posições dos núcleos tanto da molécula que absorveu o fóton quanto das

moléculas vizinhas. O estado resultante é chamado estado de Franck-Condon, e a transição é chamada de transição vertical, como se observa na Fig. 3.2, onde as curvas de energia potencial em função da configuração nuclear (ou distância internuclear, no caso de uma molécula diatômica) são apresentadas como potenciais de Morse.

Na Fig. 3.2 são observadas, além da transição eletrônica pura, 0 – 0, outras transições vibrônicas cujas intensidades dependem da posição relativa e da forma das curvas de energia potencial.

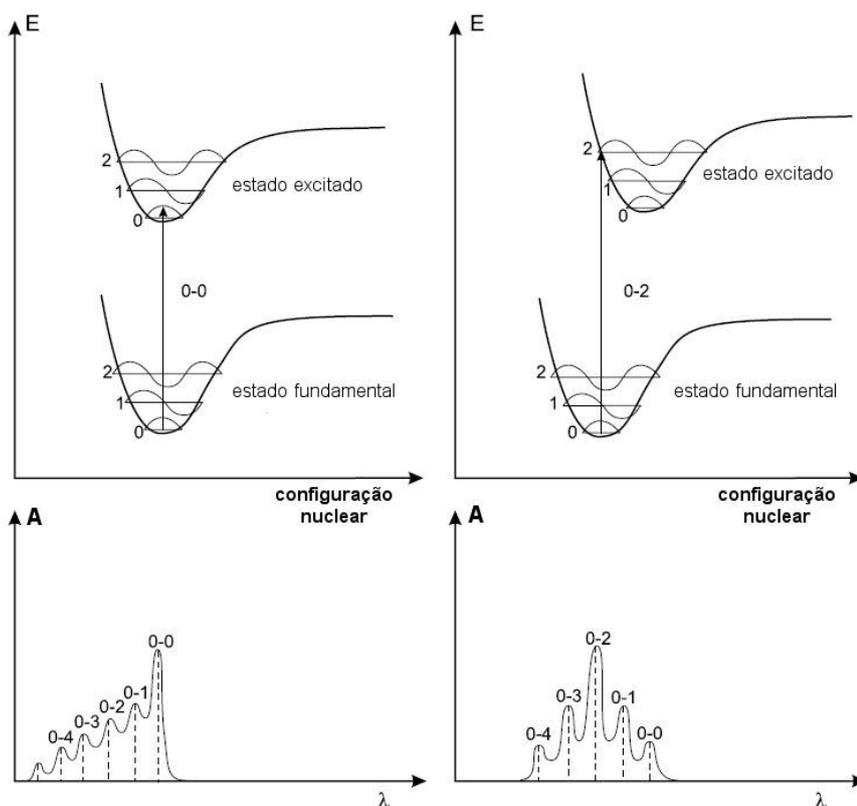


Figura 3.2 Acima: diagrama da energia potencial com transições eletrônicas verticais (princípio de Franck-Condon); abaixo: forma das bandas de absorção (linhas tracejadas, observadas em vapor; linhas contínuas, espectro alargado esperado em solução. (modificado de Valeur, 2001).

3.3. Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é um fenômeno que envolve a perda de energia de uma molécula no estado excitado por emissão de luz. Quando a molécula absorve um

fóton de luz, por exemplo, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Ocorre então, um relaxamento para o nível vibracional fundamental do estado excitado através da conversão interna (processo não radiativo) e, então, o retorno para o estado eletrônico fundamental com emissão de luz. A Fig. 3.3 (Diagrama de Jablonski) mostra, competindo com a emissão, vários outros processos com diferentes constantes de velocidade (k) que contribuem para a perda de energia do estado excitado.

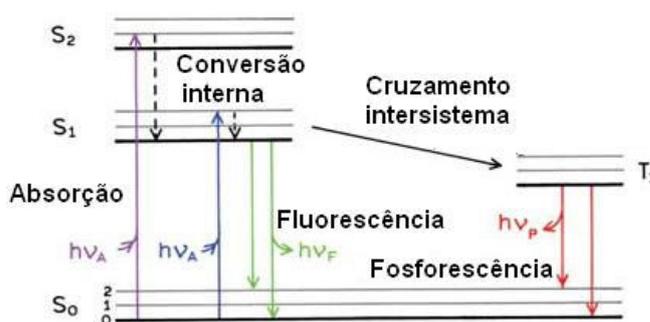


Figura 3. 3 Diagrama de Jablonski (modificado de Lakowicz, 2006).

Os processos não radiativos de relaxamento que competem com a fluorescência (k_F) são: conversão interna (k_{IC}); cruzamento intersistema (k_{IS}) e supressão de vários tipos [$k_q(Q)$]. Portanto a fração que representa a desexcitação através da fluorescência é dada por:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q[Q]} \quad 3.4$$

onde a fração Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência. Podemos observar desta equação que, se todos os processos não radiativos fossem infinitamente desprezíveis então $\Phi_F = 1$, ou seja, o rendimento quântico de fluorescência seria 100%, isto é, o único mecanismo de relaxamento seria a fluorescência.

Uma propriedade importante da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão é geralmente observado, independente do comprimento de onda de excitação. Na excitação, a molécula vai para níveis vibracionais mais altos de um determinado nível eletrônico, o excesso de energia é rapidamente dissipado, levando o fluoróforo para o nível vibracional fundamental do singlete excitado, S₁. Por causa desta relaxação rápida, ao redor de 10^{-12} s, é que o espectro de emissão é independente do comprimento de onda de excitação, e que todos os espectros de fluorescência estarão deslocados para comprimentos de onda maiores

(menor energia) do que os da banda de absorção. A banda de emissão será aproximadamente uma imagem especular da banda de absorção cujo máximo está centrado em comprimentos de onda maiores que o da banda de absorção. Este deslocamento é conhecido como deslocamento de Stokes.

3.3.1. Medidas de fluorescência estacionária

Espectros de excitação: o espectro de excitação representa as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda da luz de excitação, e é obtido mantendo-se o detector num único comprimento de onda, em geral no pico de emissão. No caso de uma solução homogênea de um cromóforo, o espectro de excitação corrigido corresponderá ao espectro de absorção desde que o relaxamento radiativo ocorra do nível vibracional fundamental do estado eletrônico excitado. Este parâmetro irá mudar se a energia potencial relativa entre os estados excitado e fundamental for modificada por alguma perturbação.

Espectros de emissão: o espectro de emissão representa as intensidades da fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, e é obtido fixando-se o comprimento de onda da luz de excitação. Ele representa a transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 .

Rendimento quântico: o rendimento quântico, ϕ_F , é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos. As medidas de ϕ_F nos podem dar idéia da contribuição da fluorescência para reações do estado excitado, enquanto que o espectro de absorção fornece informações principalmente sobre reações do estado fundamental.

Arranjo experimental: a Fig. 3.4 mostra um diagrama esquemático de um espectrofluorímetro para medidas de fluorescência. Da forma como está configurado, o espectrofluorímetro pode ser usado de duas maneiras: se variarmos o monocromador de emissão mantendo-se fixo o monocromador de excitação, temos um espectro de emissão. Por outro lado, podemos ter fixo o monocromador de emissão e o monocromador de excitação variando, para produzir o espectro de excitação.

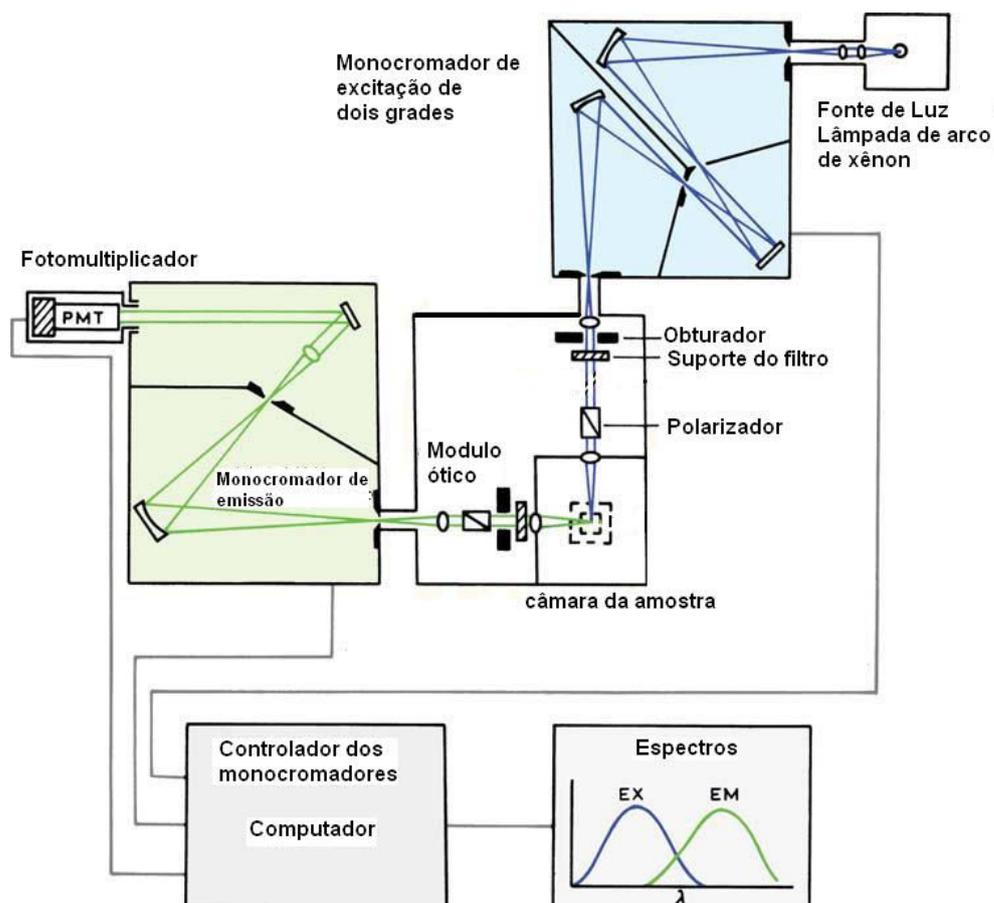


Figura 3. 4 Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro com geometria perpendicular para excitação e emissão (Lakowicz, 2006).

A emissão molecular fluorescente apresenta vantagens como ferramenta analítica quando comparada com outros métodos de espectroscopia, pois possui elevada sensibilidade às vizinhanças da molécula, a gama linear de análise é maior e o erro inerente à medição é praticamente constante ao longo de toda a gama de resposta. A sensibilidade da fluorescência é uma consequência do longo tempo que as moléculas permanecem no estado excitado antes do relaxamento. Na fluorescência, um singlete permanece no estado excitado cerca de 10^{-9} s. Nesse tempo vários tipos de processos podem ocorrer, tais como reações de protonação ou desprotonação, mudanças conformacionais locais de proteínas e interações de diversas drogas com sistemas biológicos.

A principal vantagem da fluorescência, sua dependência de fatores ambientais, resulta muitas vezes em desvantagem. A fluorescência pode ser reduzida (supressão) através dum processo de desativação, resultante da interação entre o composto fluorescente e outra substância presente no sistema, por luz

ultravioleta, por efeito de temperatura, por efeito de filtro interno, oxigênio e impurezas existentes na solução. Além disso, para concentrações elevadas pode ocorrer a formação de compostos constituídos por várias moléculas fluorescentes, dímeros ou polímeros maiores, o que origina a diminuição da eficiência quântica e a alteração dos espectros de absorção e emissão, resultando numa diminuição da intensidade de fluorescência. Podemos ainda nos referir ao fenômeno de fotodecomposição, onde a luz incidente alterando as propriedades químicas da molécula fluorescente a converte numa outra espécie, mudando também o espectro inicial de absorção e emissão.

Em soluções consideravelmente diluídas (absorbâncias muito pequenas), a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de fluoróforo. Para concentrações suficientemente baixas (absorbância < 0.1) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cubeta. À concentração alta, uma parte significativa da luz incidente é absorvida antes de chegar ao ponto onde a luminescência é observada (efeito de filtro interno) e uma parte significativa da luz emitida também é reabsorvida antes de sair da célula (efeito de filtro interno secundário). O efeito de filtro interno vai levar a um aparente decréscimo da intensidade de fluorescência observada por absorção da fluorescência. A intensidade de fluorescência observada vai depender da densidade óptica do fluoróforo no comprimento de onda de excitação e emissão. Consequentemente a intensidade de fluorescência de um composto é proporcional à concentração apenas para uma gama restrita de densidades ópticas. Em algumas situações é necessário aplicar fatores de correção (Lakowicz, 2006).

3.3.2. Fluorescência resolvida no tempo

Tempos de vida do estado excitado

O tempo de vida τ , equivale ao inverso da constante de velocidade ou taxa do processo envolvido numa relaxação eletrônica (k^{-1}). A absorção de um fóton no ultravioleta leva aproximadamente 10^{-15} s, enquanto que o tempo de relaxação de moléculas em solventes orgânicos é aproximadamente de 10^{-11} s. Por outro lado

a fosforescência caracteriza-se por tempos de vida longos que variam desde 10^{-4} s até valores na faixa de segundos.

O estudo de tempos de vida do estado excitado é amplamente usado em espectroscopia de fluorescência e pode oferecer informações sobre reações intermoleculares tais como: formação de dímeros, excímeros, transferência de energia, distâncias moleculares e difusão rotacional. A natureza do decaimento de fluorescência pode revelar detalhes sobre o microambiente do fluoróforo. Por exemplo, múltiplas constantes de decaimento podem ser atribuídas a um fluoróforo em microambientes diferentes ou a processos de estado excitado. O tempo de vida estabelece a janela temporal durante a qual outros processos de estado excitado (difusão rotacional e translacional, transferência de energia, relaxamento dipolar) podem alterar a emissão e serem detectados.

Há dois métodos utilizados para medir o tempo de vida de fluorescência de um dado fluoróforo: o método pulsado e o harmônico ou de modulação de frequência. Neste trabalho o método utilizado foi o pulsado e o detalharemos a seguir.

Método Pulsado: suponhamos que uma amostra contendo um fluoróforo é excitada com um pulso de luz infinitamente curto resultando em uma população inicial N_0 de fluoróforos no primeiro estado excitado singleto. A população no estado excitado decai com uma taxa $k_r + k_{nr}$ de acordo a equação

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr}) \cdot N(t) \quad 3.5$$

onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas no tempo t , k_r é a taxa radiativa (fluorescência ou fosforescência), e k_{nr} é a taxa de decaimento não radiativa. A emissão é um evento aleatório, e cada fluoróforo tem a mesma probabilidade de emitir num dado período de tempo. Integrando a equação 3.5, obtemos um decaimento exponencial da população excitada, da seguinte forma

$$N = N_0 \cdot \exp(-t / \tau) \quad 3.6$$

Como a intensidade radiativa (I) é proporcional a $N(t)$ a podemos expressar também como

$$I = \alpha \cdot \exp(-t / \tau) \quad 3.7$$

sendo $\tau = (k_r + k_{nr})^{-1}$ o tempo de vida e α a intensidade no tempo zero.

O tempo de vida de fluorescência é o tempo necessário para a intensidade decair para 63.2%, ou $(1-1/e)$, de seu valor inicial. Comumente, o tempo de vida é determinado do coeficiente angular do gráfico $\log I(t)$ versus t (Fig. 3.5).

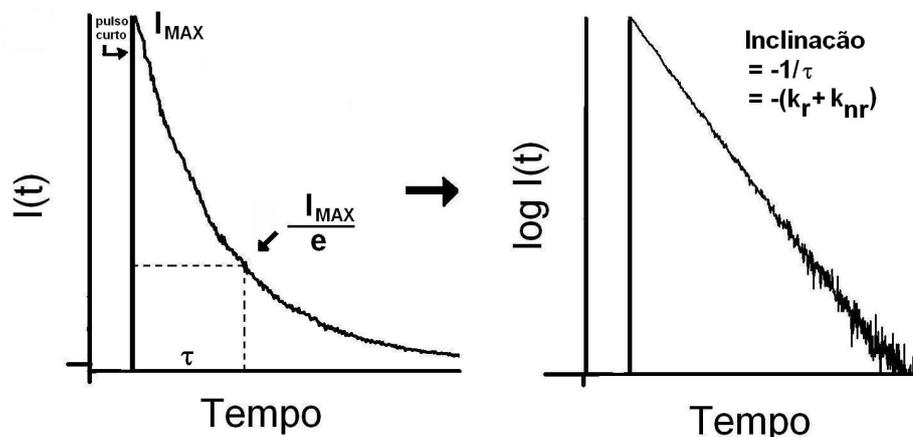


Figura 3.5 Descrição esquemática de uma curva de decaimento de fluorescência utilizando o método de pulsado.

Para um decaimento multiexponencial com n componentes, a $I(t)$ é representada por:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad 3.8$$

A intensidade fracionária da componente i , ou contribuição fracionária da componente i para a intensidade estacionária, é

$$f_i = \frac{\int_0^{\infty} I_i(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} I(t) \cdot dt} = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i} \quad 3.9$$

$$\text{Com } \sum_0^n f_i = 1.$$

No caso de decaimentos de fluorescência multiexponenciais, podemos calcular o tempo de vida médio como

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot I(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} I(t) \cdot dt} \quad 3.10$$

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i} = \sum_{i=1}^n f_i \cdot \tau_i \quad 3.11$$

Nesta definição, cada tempo de decaimento é ponderado pela intensidade fracionária. Esta média é chamada de tempo de decaimento com média nas intensidades.

Outra possibilidade é o uso das amplitudes (fatores pré-exponenciais) como peso:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} = \sum_{i=1}^n a_i \cdot \tau_i \quad 3.12$$

onde a_i são as amplitudes fracionárias

$$a_i = \frac{\alpha_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} \quad 3.13$$

Esta média é chamada de tempo de decaimento com média nas amplitudes.

A definição usada depende do fenômeno estudado. Por exemplo, o tempo de decaimento com média nas intensidades deve de ser usado para calcular uma constante colisional média, enquanto, em experimentos de transferência de energia ressonante, o tempo de decaimento com média nas amplitudes deve de ser usado em cálculos de eficiência de transferência de energia (Lakowicz, 2006).

Arranjo experimental

O equipamento de fluorescência resolvida no tempo empregado nosso trabalho para as medidas de tempo de vida de fluorescência (ou parâmetros de decaimento) foram baseadas no método de contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC - Time Correlated Single Photon Counting). Fig. 3.6 mostra um diagrama de um fluorímetro de contagem de fóton único. O princípio deste método se baseia no fato de que a probabilidade de detectar um fóton único no tempo t depois de um pulso de excitação é proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo. Após a sincronização e gravação de fótons únicos, depois de um grande número de pulsos de excitação, a curva de decaimento da intensidade de fluorescência é reconstruída.

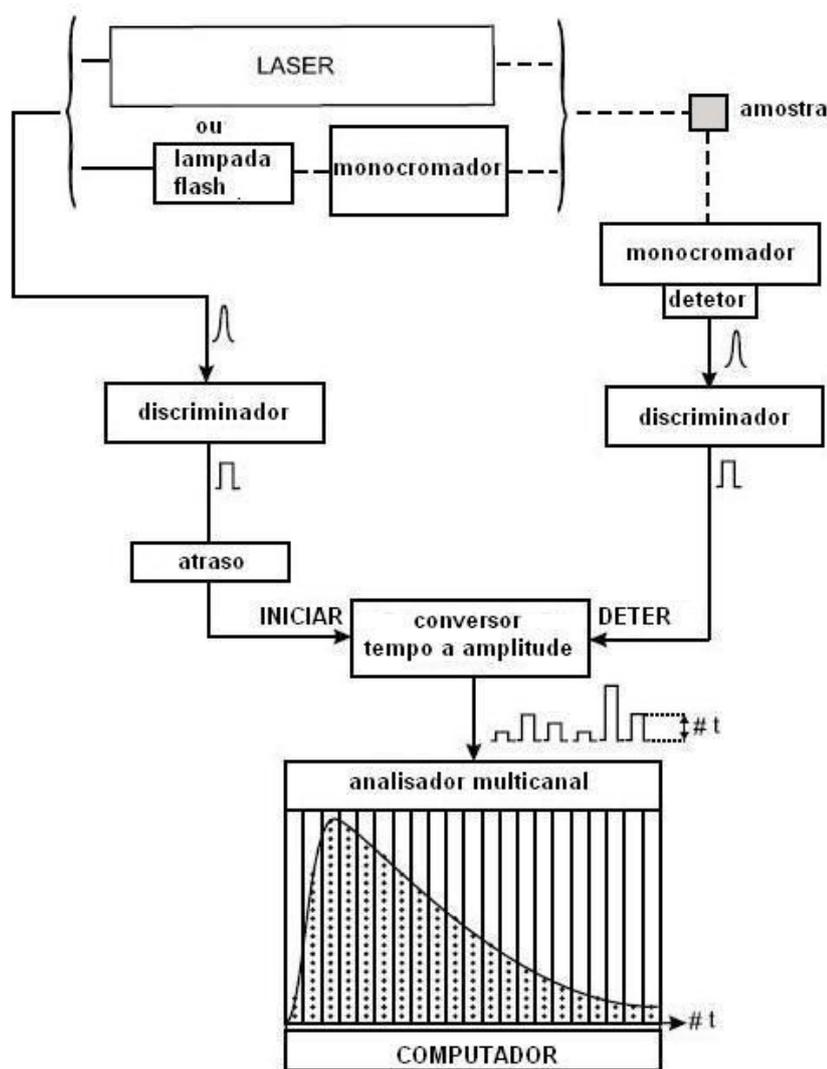


Figura 3.6. Diagrama esquemático de um fluorímetro de contagem de fóton único (Valeur, 2001).

A fonte de excitação pode ser uma lâmpada de flash ou laser. Um pulso elétrico associado com o pulso ótico é gerado e encaminhado – através de um discriminador – para a entrada INICIAR do conversor tempo-amplitude. Por outro lado, a amostra é excitada pelo pulso ótico e emite fluorescência. Os sistemas óticos são ajustados de modo que o fotomultiplicador detecte não mais de um fóton por cada pulso de excitação. O pulso elétrico correspondente é encaminhado – através de um discriminador – para a entrada de DETER do conversor tempo-amplitude. Este último gera um pulso de saída cuja amplitude é diretamente proporcional ao intervalo de tempo entre os pulsos INICIAR e DETER. O intervalo de tempo é convertido a um valor digital por meio de um conversor analógico-digital. O analisador multicanal aumenta de um o conteúdo do canal de

memória correspondendo ao valor digital do pulso detectado. Depois de um grande número de eventos de excitação-deteção, forma-se o histograma dos fótons detectados, que representa a curva de decaimento de fluorescência. Obviamente, quanto maior o número de eventos melhor é a precisão da curva de decaimento.

Geralmente, as fontes luminosas disponíveis fornecem pulsos de diferentes intervalos de duração. Como consequência, o decaimento de fluorescência observado deve de ser corrigido pela largura do pulso da lâmpada. Este procedimento é geralmente denominado de deconvolução espectral. Quando a deconvolução é necessária, o perfil temporal da lâmpada do pulso de excitação é gravado sob as mesmas condições por substituição da amostra por uma solução dispersante. Esta dificuldade causada pela largura (duração) do pulso pode ser minimizada pelo uso de lasers com pulsos de curta duração (picosegundos).

3.3.3. Supressão de fluorescência

Denomina-se supressão de fluorescência, qualquer processo que diminui a intensidade de fluorescência de uma dada espécie. Estes processos podem ser: reações no estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia, formação de complexos (supressão estática) e supressão por colisão (supressão dinâmica). Tanto para a supressão de fluorescência dinâmica quanto estática se requer um contacto entre o fluoróforo e o agente supressor e, conseqüentemente, estes tipos de supressão nos fornecem informações importantes sobre o fluoróforo.

Supressão dinâmica de fluorescência: consiste na desativação da fluorescência do estado excitado por colisão do fluoróforo com o agente supressor durante o tempo de vida do estado excitado. Geralmente, após o contacto entre ambos, o fluoróforo regressa ao estado fundamental sem emissão de fóton e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas. A supressão de fluorescência dinâmica, ou colisional, é descrita pela equação de Stern - Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad 3.14$$

onde F_0 e F representam, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, k_q é a constante bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo vida na ausência do agente supressor e $[Q]$ é a

concentração do agente supressor. A constante de Stern-Volmer, K_{SV} , é dada por $\tau \cdot k_q$ e representa-se também por K_D . A constante bimolecular reflete a eficiência da supressão ou a acessibilidade do fluoróforo ao supressor.

Supressão estática de fluorescência: consiste na formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Quando este complexo absorve luz, ele imediatamente retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad 3.15$$

Note-se que a dependência de F_0/F em relação a $[Q]$ é linear e é idêntica à observada para supressão dinâmica, exceto que a constante de supressão é agora a constante de associação.

Geralmente representa-se graficamente F_0/F em função de $[Q]$ e espera-se que F_0/F varie linearmente com a concentração do supressor. A reta obtida deste gráfico intercepta o eixo das ordenadas em $F_0/F = 1$ e sua inclinação nos fornece a constante K_{SV} . O valor de $1/K_{SV}$ é a concentração do supressor para a qual $F_0/F = 2$, ou seja, 50% da intensidade é suprimida.

Em geral, um gráfico de Stern-Volmer linear indica uma única classe de fluoróforos ou pelo menos todos igualmente acessíveis ao supressor. Se existir mais de uma classe de fluoróforos, cujas acessibilidades ao supressor são distintas, então o gráfico de Stern-Volmer já não será linear.

É importante observar aqui que apenas o gráfico linear de Stern-Volmer não prova a ocorrência de supressão dinâmica ou estática. A medida de tempos de vida é o método mais definitivo para poder distinguir a supressão estática da dinâmica. A supressão estática remove uma fração dos fluoróforos observados. Fluoróforos complexados não são fluorescentes e observa-se apenas a fluorescência dos fluoróforos não complexados. A fração não complexada não é perturbada, e o tempo de vida vai permanecer constante igual a τ_0 . Portanto para uma supressão estática $\tau/\tau_0 = 1$. Em contraste, a supressão dinâmica é um processo que diminui a população do estado excitado pela adição de uma taxa de decaimento não radiativo, implicando no decréscimo do tempo de vida (Fig. 3.7 A). Este decréscimo é equivalente ao da intensidade de fluorescência: $F_0/F = \tau_0/\tau$ para uma supressão dinâmica.

Por outro lado, tomando em conta o coeficiente de difusão das moléculas, a supressão dinâmica pode ser distinguida da estática. A supressão dinâmica

depende da difusão, já que a altas temperaturas os coeficientes de difusão aumentam, e conseqüentemente espera-se que as constantes de supressão bimoleculares também aumentem. Em contraste, ao incrementar a temperatura é provável que aconteça uma diminuição na estabilidade do complexo, e assim os valores das constantes de supressão estática sejam mais baixos (Fig. 3.7 B).

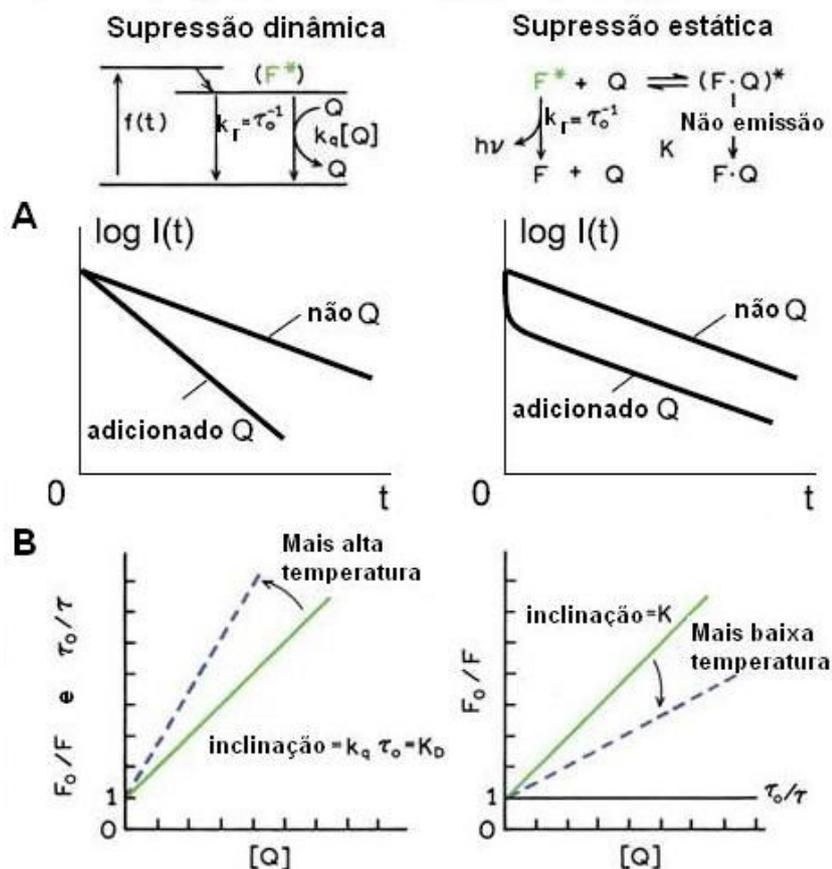


Figura 3.7. Comparação entre supressão dinâmica e estática, mediante medidas de tempo de vida (A) e variações de temperatura (B) (modificado de Lakowicz, 2006).

Outro método adicional para distinguir entre estes dois tipos de supressão de fluorescência envolve a análise dos espectros de absorção das espécies em contato. A supressão de fluorescência dinâmica afeta apenas os estados excitados dos fluoróforos, e assim nenhuma mudança no espectro de absorção é observada, enquanto que na supressão estática a formação do complexo no estado fundamental frequentemente resulta em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo.

3.3.4. Anisotropia de fluorescência

Ao iluminar uma amostra com luz polarizada, geralmente a fluorescência emitida pela amostra é polarizada, podendo ter uma polarização diferente da de excitação. A extensão de polarização de emissão pode ser descrita em função da anisotropia (r_0). A origem deste fenômeno está baseada na existência de momentos de dipolos de transição da absorção e emissão, que estão alinhados ao longo de direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. A Fig. 3.8, mostra dois momentos de dipolo de transição da absorção do antraceno.

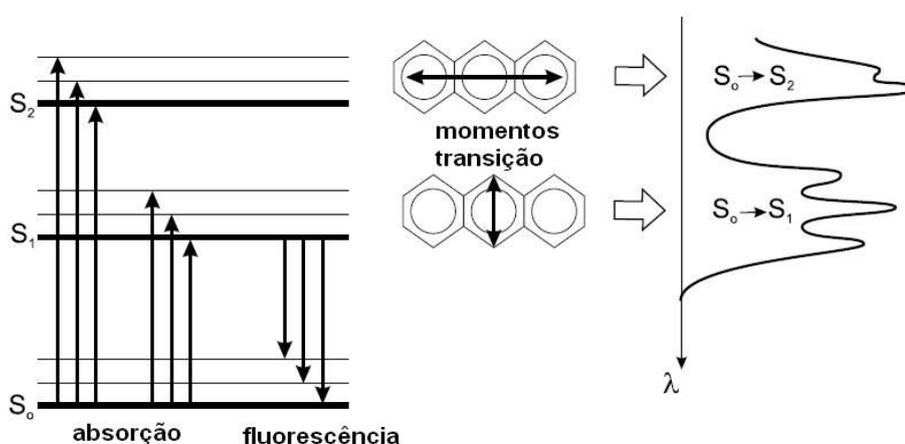


Figura 3.8. Momentos dipolares de transição do antraceno (modificado de Valeur B., 2001).

Em solução homogênea, as moléculas fluorescentes em seu estado fundamental são orientadas aleatoriamente. Quando expostas à luz polarizada, os fluoróforos que têm seus momentos de dipolo de transição orientados numa direção perto da direção do vetor campo elétrico da radiação incidente são preferencialmente excitados. Se a população dos estados excitados não está orientada aleatoriamente, o resultado seria uma emissão polarizada.

Os momentos de dipolo de transição para absorção e para emissão têm orientações fixas em cada fluoróforo e o ângulo entre estes momentos determinam a anisotropia máxima medida (r_0). Porém este valor pode ser diminuído por vários fenômenos cuja importância dependerá da amostra a ser analisada.

A despolarização da fluorescência acontece porque o momento de transição sofre mudanças durante o tempo de vida do estado excitado, causando um decréscimo na anisotropia. A despolarização de fluorescência pode ser causada

por vários fenômenos como a difusão rotacional, que é a causa mais comum na despolarização. Medições de anisotropia revelam o deslocamento médio angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton. Este deslocamento angular depende da velocidade e extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Os movimentos de difusão interna, por sua vez, dependem da viscosidade do solvente, do tamanho e da forma das espécies que sofrem difusão.

Para fluoróforos pequenos em solução de baixa viscosidade, a difusão rotacional é mais rápida que a emissão e, conseqüentemente, ela é despolarizada e a anisotropia é próxima de zero.

A medida de anisotropia de fluorescência esta ilustrada na Fig. 3.9. Neste caso a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente e o vetor campo elétrico de excitação está orientado paralelo ao eixo z. A intensidade da emissão é medida com o auxílio de um polarizador. Quando este está orientado paralelamente (\parallel) à direção da excitação, a intensidade é I_{\parallel} . Por outro lado, quando o polarizador está orientado perpendicularmente (\perp) à excitação, a intensidade medida é chamada de I_{\perp} . A anisotropia de fluorescência é definida por

$$r = \left(\frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \right) \quad 3.16$$

A excitação das moléculas depende do ângulo θ entre o plano da polarização da luz incidente e o momento de dipolo da transição. A probabilidade de ocorrer uma absorção é proporcional ao $\cos^2\theta$. Para a luz completamente polarizada $I_{\perp} = 0$ e $r = 1,0$. Este valor é geralmente encontrado para a luz espalhada (espalhamento de Rayleigh).

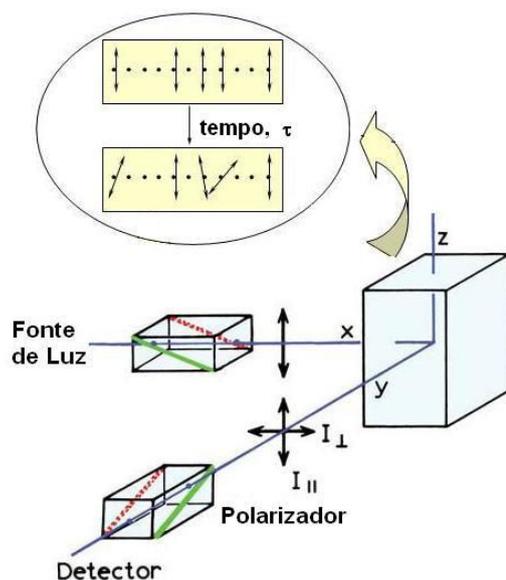


Figura 3.9. Diagrama esquemático para a medida de anisotropia de fluorescência (modificado de Lakowicz, 2006).

Valores de r iguais à unidade, nunca são encontrados para fluoróforos em solução, pois como a amostra não se encontra orientada, a dependência do $\cos^2\theta$ resulta na excitação de um número significativo de moléculas que não têm dipolos de transição alinhados exatamente ao longo do plano de polarização. Essas moléculas não alinhadas, quando emitem, podem ter componentes tanto da luz polarizada paralelamente quanto daquela polarizada perpendicularmente. Portanto r terá sempre um valor menor que a unidade.

Além disto, se os dipolos de absorção e emissão fossem paralelos, estivessem congelados, não houvesse despolarização e a média sobre todos os ângulos θ fosse considerada, a anisotropia teria valores característicos de $r_0 = 0,4$. Geralmente estes dipolos não são paralelos, mas têm um ângulo β um em relação ao outro, reduzindo ainda mais os valores de r_0 . Estes valores são chamados de intrínsecos e são dados por:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad 3.17$$

É interessante notar que o valor de r_0 é zero quando $\beta=54,7^\circ$ e, quando β se torna maior que $54,7^\circ$, a anisotropia se torna negativa, alcançando o valor mínimo de $-0,20$ para $\beta = 90^\circ$.

Na prática, as medidas de anisotropia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo são realizadas, em geral, utilizando-se o método

do formato-L. Neste método os fluorímetros usam um único canal de emissão. A Fig. 3.10 mostra o diagrama esquemático do formato-L. Os comprimentos de excitação e emissão são geralmente selecionados por monocromadores. O monocromador de excitação polariza parcialmente a luz incidente. Como resultado, a rotação do polarizador de excitação para as posições horizontal (H) e vertical (V) dá origem a diferentes intensidades da luz incidente. Similarmente, o monocromador de emissão tem eficiência diferente para transmissão da luz polarizada horizontalmente e verticalmente. Consequentemente, a rotação do polarizador de emissão muda a sensibilidade efetiva do canal de emissão. O objetivo é medir as intensidades I_{\parallel} e I_{\perp} independentemente do sistema de detecção, ou seja, os valores reais de I_{\parallel} e I_{\perp} .

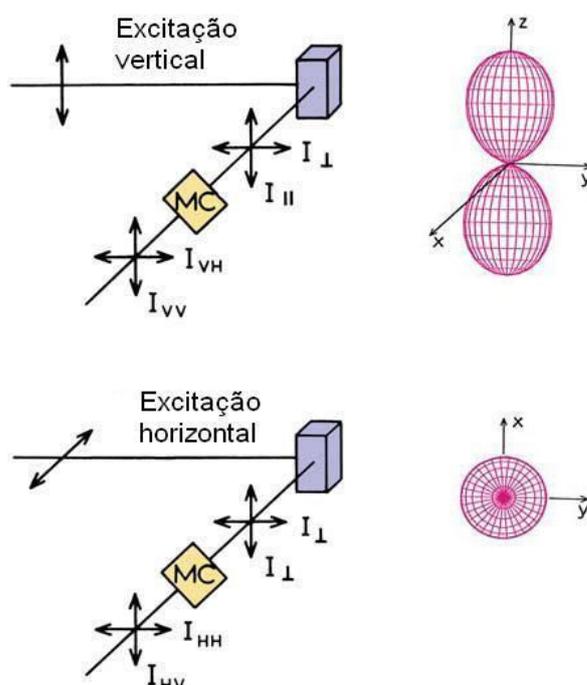


Figura 3.10. Diagrama esquemático para a medida de anisotropia de fluorescência utilizando-se o método de formato-L. MC monocromador. Os gráficos ao lado são as distribuições das populações do estado excitado (modificado de Lakowicz, 2006).

Utilizando as letras H e V para denotar orientação horizontal e vertical, respectivamente, teríamos, por exemplo, a notação I_{HV} correspondente à intensidade da emissão obtida com o monocromador de excitação posicionado horizontalmente e o de emissão posicionado verticalmente. Sendo S_V e S_H a

sensibilidade vertical e horizontal do canal de emissão, respectivamente, para excitação polarizada verticalmente, observamos intensidades polarizadas iguais a:

$$I_{VV} = k S_V I_{\parallel} \quad 3.18$$

$$I_{VH} = k S_H I_{\perp} \quad 3.19$$

Sendo k a constante de proporcionalidade que leva em conta o rendimento quântico do fluoróforo e outros fatores instrumentais. Dividindo-se a equação 3.18 pela equação 3.19 temos:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad 3.20$$

Para calcular a razão entre as intensidades $I_{\parallel} / I_{\perp}$ é preciso calcular G que é a razão entre as sensibilidades S_V e S_H .

Este fator G é facilmente medido utilizando-se a excitação polarizada horizontalmente. Quando isto é feito, ambas componentes polarizadas verticalmente e horizontalmente são proporcionais a I_{\perp} . Isto se deve a que estas orientações são perpendiculares à polarização da excitação ou que o eixo de polarização da excitação é um eixo de simetria. Disto decorre que:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad 3.21$$

Conhecendo G , pode-se calcular I_{\parallel}/I_{\perp} por:

$$\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{1}{G} \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \quad 3.22$$

A anisotropia, então, pode ser calculada por:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad 3.23$$

Decaimento de Anisotropia de Fluorescência

Vamos supor que um fluoróforo é excitado com um pulso curto de luz polarizada verticalmente e que ele tem um único tempo de correlação rotacional. O decaimento de anisotropia é determinado pela medida dos decaimentos das componentes da emissão polarizadas verticalmente (\parallel) e horizontalmente (\perp). Se os momentos de transição de absorção e emissão são colineares, $r_0=0,4$. Assumindo que $r_0>0$, o pulso de excitação polarizado verticalmente, produz uma população de fluoróforos enriquecida na orientação paralela. O decaimento

resultante da diferença entre $I_{\parallel}(t)$ e $I_{\perp}(t)$, quando propriamente normalizado pela intensidade total, é o decaimento de anisotropia.

A interpretação do decaimento de anisotropia é bem entendida em termos das componentes individuais. Os decaimentos das componentes da emissão paralela (\parallel) e perpendicular (\perp) são dados por:

$$I_{\parallel} = \frac{1}{3} I(t) [1 + 2r(t)] \quad 3.24$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{3} I(t) [1 - r(t)] \quad 3.25$$

sendo $r(t)$ o decaimento de anisotropia. Geralmente $r(t)$ pode ser descrito como um decaimento multiexponencial:

$$r(t) = r_0 \sum_j g_j \exp(-t / \tau_{c_j}) = \sum_j r_{0j} \exp(-t / \tau_{c_j}) \quad 3.26$$

sendo $r_0 = \sum_j r_{0j}$ a anisotropia na ausência de difusão rotacional, os τ_{c_j} os tempos de correlação rotacional individuais, e g_j são as amplitudes fracionárias associadas a cada tempo de correlação no decaimento de anisotropia ($1 = \sum_j g_j$).

Similarmente à anisotropia estática, o decaimento de anisotropia é obtido como:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I(t)} \quad 3.27$$

onde $I(t)$ é a intensidade total no tempo t , igual a $I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)$.

Sob iluminação constante, a anisotropia medida é a estacionária r_S . Usando a definição geral para calcular a média de uma quantidade, com a intensidade de fluorescência normalizada, obtemos:

$$r_S = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad 3.28$$

Em medidas de anisotropia realizadas em condições estáticas, o valor de r_S pode ser interpretado em termos da microviscosidade η , aplicando-se a equação de Perrin para decaimentos monoexponenciais:

$$r_S = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\tau_c}} \quad 3.29$$

sendo r_0 o valor máximo da anisotropia de fluorescência em ausência de qualquer movimento de rotação, τ é o tempo de vida da fluorescência e, τ_c o tempo de correlação rotacional do fluoróforo, que é função de η , da temperatura absoluta T e do volume hidrodinâmico da molécula esférica fluorescente V , conforme se mostra na equação de Stokes-Einstein:

$$\tau_c = \eta V / RT \quad 3.30$$

Leis do Decaimento de Anisotropia: dependendo do tamanho e da forma do fluoróforo e do meio em que está disperso, uma grande variedade de tipos de decaimentos de anisotropia pode ser obtida. Não obstante, os decaimentos de anisotropia podem ser mais complexos se os fluoróforos não forem esféricos ou se uma molécula não esférica está localizada em ambiente anisotrópico. Outra origem de decaimentos complexos de anisotropia é a flexibilidade interna de um fluoróforo dentro de uma macromolécula como uma proteína.

Se uma molécula não é esférica, podemos imaginar a rotação da molécula em torno de cada um de seus eixos. Por exemplo, uma molécula tipo perileno, que tem a forma de um disco, deve rodar em seu plano de simetria muito mais rápido do que fora dele. Isto se deve ao fato de que fora do plano a quantidade de moléculas de solvente que o fluoróforo deve deslocar é maior. Moléculas como estas são conhecidas como rotores anisotrópicos (Fig. 3.11).

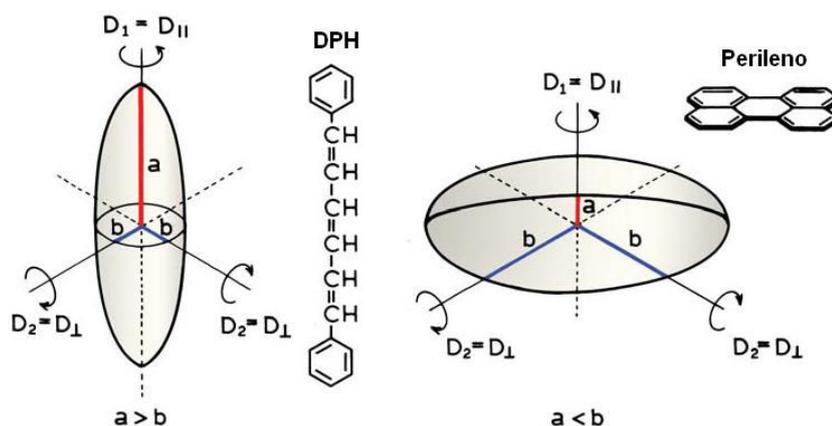


Figura 3.11. Representação geométrica das sondas fluorescentes DPH e perileno, Os coeficientes de difusão rotacional são representados pela letra D (modificado de Lakowicz, 2006).

Decaimentos de anisotropia podem ser complexos mesmo quando o fluoróforo comporta-se como rotor isotrópico, se estas moléculas estão em um

meio anisotrópico. Por exemplo, para o DPH, o dipolo de emissão é orientado aproximadamente ao longo do eixo molecular mais longo. As rotações que decorrem deste dipolo devem ser isotrópicas devido a que a molécula é aproximadamente simétrica em torno deste eixo. Entretanto, quando o DPH está em membrana, usualmente encontra-se um decaimento de anisotropia de fluorescência complexo. Os movimentos rotacionais do DPH são impedidos e sua anisotropia não decai para zero. Devido a este impedimento, a faixa angular do movimento rotacional é limitada. Nestes casos, uma anisotropia limite (r_∞) é observada com tempo longo quando comparado ao tempo de vida de fluorescência. Geralmente, em membranas lipídicas, $r(t)$ pode ser aproximado a uma única exponencial que decai para um valor finito e é descrito como:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \exp(-t/\tau_c) + r_\infty \quad 3.31$$

O termo constante r_∞ é interpretado como o resultado de uma barreira de energia que impede a difusão rotacional do fluoróforo além de certo ângulo. O parâmetro r_∞ serve também para medir a ordem orientacional dos fluoróforos no interior da membrana. A sonda fluorescente DPH é uma molécula conhecida por estar localizada profundamente na bicamada lipídica e orientar-se paralelamente à cadeia do lipídio. Portanto, esta sonda fluorescente detecta a ordem orientacional das cadeias. Identificando o parâmetro de ordem da sonda identificamos o parâmetro de ordem dos lipídios.

A anisotropia estacionária, em membrana lipídica, r_S pode ser expressa em função de dois termos, como mostra a seguinte expressão:

$$r_S = \frac{r_0}{1 + \tau/\tau_c} + r_\infty \quad 3.32$$

O primeiro termo representa a contribuição cinética e o segundo a contribuição estrutural. O parâmetro τ_c nos informa sobre as propriedades cinéticas tais como a viscosidade η . Em membranas lipídicas, usando a equação 3.32, viu-se que a contribuição cinética da r_S de DPH não é maior do que 3 %. Isto significa que a ordem lipídica da membrana pode ser avaliada pela anisotropia estacionária, r_S (Jähnig, 1979).

3.4. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica micro analítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. É uma técnica destrutiva. A espectrometria de massa é capaz de fornecer informação sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular e a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas. O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa. O alcance e a utilidade do método de espectrometria de massa são dependentes do processo de ionização. A forma do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado.

O espectrômetro de massa é um instrumento que utiliza um campo magnético ou elétrico para separar íons que se deslocam mais ou menos rapidamente segundo sua relação massa-carga. A Fig. 3.12 mostra os principais componentes dos espectrômetros de massa.

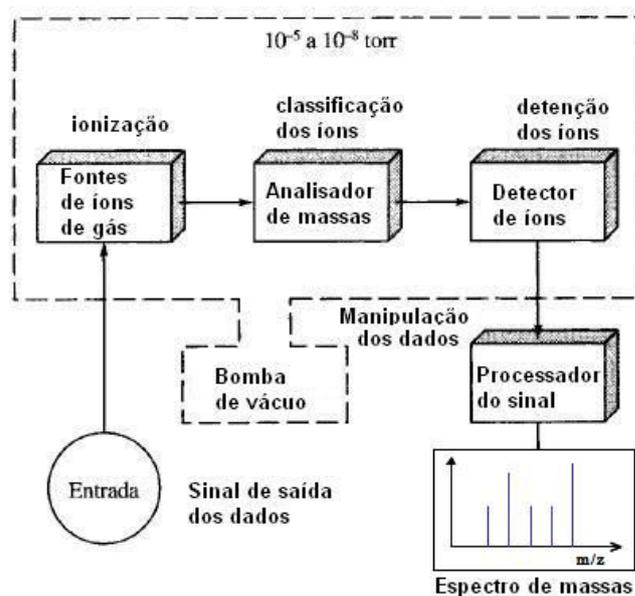


Figura 3.12. Componentes de um espectrômetro de massa (modificado de Skoog et al. 2001).

O objetivo do sistema de entrada é introduzir uma quantidade muito pequena (microgramas) de amostra na fonte de íons, onde os componentes da amostra se convertem em íons gasosos mediante o bombardeio com elétrons, fótons, íons ou moléculas. O sinal de saída da fonte de íons é um fluxo de íons positivos ou negativos gasosos que são acelerados no analisador de massa. A

função do analisador de massa é análoga à de um monocromador de um espectrofotômetro ótico. No primeiro caso, no entanto, a dispersão se realiza em função da relação massa-carga dos íons da amostra, em vez de no comprimento de onda dos fótons. Finalmente o detector recebe os íons, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados num computador. Os espectrômetros de massa requerem um complexo sistema de vácuo para manter uma baixa pressão em todos os componentes, exceto no sistema de processamento do sinal e leitura (Skoog et al, 2001).

Os analisadores não dependem apenas da massa, mas também da aceleração dos íons, por isso os separam de acordo com a relação massa-carga. As três principais características de um analisador são: o limite de massa, a transmissão iônica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais alto de massa que pode ser medido; é geralmente expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária, i.e, $z = 1$. A transmissão é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena (Rodrigues, 2003).

Uma variedade de técnicas de ionização é usada para a espectrometria de massa. A maioria das técnicas de ionização excita a molécula neutra da amostra (M) a qual então libera um elétron para formar um radical cátion (M^+). Outras técnicas de ionização envolvem reações químicas entre íons e moléculas neutras (M) que produzem a adição de H^+ às moléculas neutras (MH^+). Na Fig. 3.14 apresenta-se um resumo geral das técnicas de ionização utilizadas em espectrometria de massa molecular juntamente com algumas características. A tabela da Fig. 3.13 mostra que estas técnicas subdividem-se em dois grupos segundo o estado da amostra: no primeiro caso a amostra já se encontra em fase gasosa e no segundo produz-se dessorção iônica a partir da fase condensada (sólida ou líquida) da amostra.

Tipo Básico	Nome	Agente Ionizante
Fase gasosa	- Impacto de elétrons (EI)	Elétrons energéticos
	- Ionização química (CI)	Íons de um gás reagente
	- Ionização por campo elétrico (FI)	Eletrodo em potencial elétrico alto
	- Luz síncrotron	Fótons
Dessorção	- Dessorção por campo elétrico (FD)	Eletrodo em potencial elétrico alto
	- Ionização por Electrospray (ESI)	Campo elétrico intenso
	- Ionização/dessorção por laser, assistido por uma matriz (MALDI)	Feixe de laser (UV)
	- Dessorção de plasma (PDMS)	Fragmentsos de fissão do ^{252}Cf (MeV)
	- Bombardeamento por átomos rápidos (FAB)	Feixe de átomos energéticos (≈ 5 KeV)
	- Emissão de íons secundários (SIMS)	Feixe de íons energéticos (5-15 KeV)
	- Ionização térmica [thermospray] (TS)	Temperatura alta
	- Impacto de íons pesados (HIMS)	Feixe de íons de aceleradores (MeV)

Figura 3.13. Técnicas de ionização para espectrometria de massa molecular.

Em continuação, se mencionará brevemente o tipo de analisador de massa que se utilizou em nossas medidas de espectrometria de massa, o analisador de massa de tempo de voo.

O analisador de massa de tempo de voo. Nestes instrumentos os íons se produzem periodicamente mediante o bombardeio da amostra com pulsos curtos de elétrons, íons secundários ou fótons gerados por laser. Estes pulsos podem ter frequências de 10 a 50 kHz e um tempo de vida de 0.25 μs . Os íons produzidos dessa maneira são acelerados por um campo elétrico, mediante um pulso de 10^3 a 10^4 V, com a mesma frequência que o pulso de ionização, mas defasado. As partículas aceleradas passam ao tubo analisador de aproximadamente um metro de comprimento e sem campo algum (Fig. 3.14). Devido a que todos os íons que ingressam no tubo têm idealmente a mesma energia cinética, suas velocidades dentro do tubo devem variar inversamente com a raiz quadrada de suas massas, as partículas mais leves chegando ao detector antes do que as mais pesadas. Os tempos de voo habituais são de 1 a 30 μs .

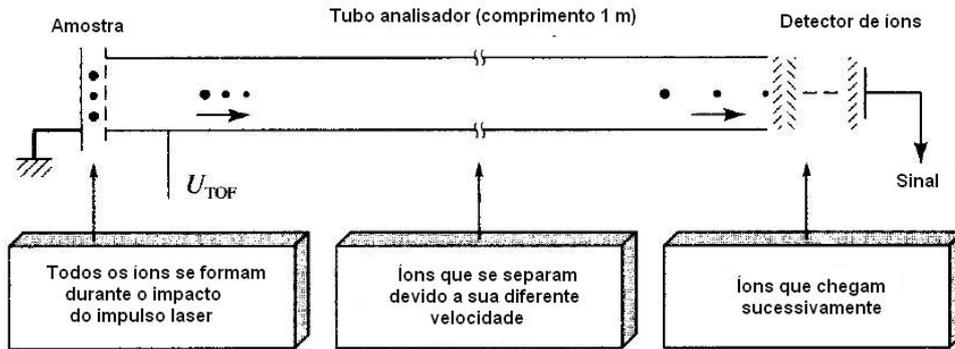


Figura 3.14. Diagrama de um espectrômetro de massa de tempo de voo. Um feixe de íons produzido por um laser é acelerado em direção do tubo analisador, onde se produz a separação (modificado de Skoog et al. 2001).

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Frações de membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase

Para o estudo das membranas e da proteína Na⁺, K⁺-ATPase, foram utilizadas frações de membranas ricas em Na⁺, K⁺ - ATPase obtida de rim de porco (cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Fontes do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ). Esta proteína Na⁺, K⁺-ATPase tem uma massa molecular de aproximadamente 150 kDa. A atividade aproximada das amostras era de 4 unidades / mg⁻¹ (μM Pi / mg⁻¹.min⁻¹). As suspensões de membranas possuíam concentrações de proteína de 4,2 mg/ ml.

Também foram utilizadas frações de membranas ricas em Na⁺, K⁺ - ATPase de crustáceo de água doce (espécie normal) e adaptada em água salgada (espécie adaptada). As suspensões de membranas tinham concentrações de proteína de 0,68 mg/ml para a espécie normal e 0,78 mg/ml para a espécie adaptada.

A relação em massa entre os lipídios e a proteína nas frações de membranas foi considerada como 1.5, conforme determinações feitas em várias membranas purificadas em Na⁺, K⁺ - ATPase. As alíquotas contendo as frações de membranas eram armazenadas a -15°C e descongeladas no mesmo dia do experimento para preparar as amostras.

4.1.2. Reagentes

Os derivados de fenotiazinas clorpromazina, flufenazina e trifluoperazina foram adquiridos da Sigma. Prepararam-se estoques de 5 mM de fenotiazinas em

etanol. As soluções eram cobertas com papel metálico para evitar alguma fotodegradação durante o armazenamento.

Foram utilizados os tampões fosfato pH 7,4 e citrato - fosfato em diferentes valores de pH. Nos experimentos usando a sonda FITC utilizou-se o tampão Tris 50 mM, pH 9,0 no processo de marcação. O tampão Tris 10 mM a pH 7,4 foi utilizado no experimento com DPH. Foi utilizada água milli-Q em todas as preparações.

4.1.3. Sondas fluorescentes

Todas as sondas fluorescentes utilizadas neste trabalho foram adquiridas de Sigma:

- **FITC** (Fluoresceína isotiocianato – isômero I): marcador de proteínas via grupo amina (especialmente lisina). Em Na^+ , K^+ - ATPase marca especialmente a lisina perto do sítio de ligação do ATP, onde se produz a fosforilação. Preparou estoque de 5 mM de FITC (Sigma) em solvente de DMSO e utilizou-se no mesmo dia.

- **DPH** (1,6 – diphenyl - 1,3,5 - hexatriene): muito utilizado como sonda do interior de membranas. A intercalação de DPH em membranas é acompanhada de forte aumento da fluorescência. A polarização da fluorescência é alta na ausência de movimento rotacional e é muito sensível à reorientação, o que permite sua utilização em medidas de fluidez de membranas. Preparou-se estoque de 1 mM de DPH (Sigma) em tetrahidrofurano (THF). Para as medidas de anisotropia da fluorescência estacionária foram utilizadas concentrações da ordem de 2,4 μM a 4,0 μM .

- **1,8-ANS** (1 – anilino-naphthalene – 8 - sulfonic acid): o rendimento quântico de fluorescência do ANS é dependente das vizinhanças e particularmente sensível à presença de água (perto de 0.4 em EtOH, 0.2 em MeOH e 0.004 em água).

4.1.4. Instrumentação

Espectrofotômetro, espectrofluorímetro estacionário e resolvido no tempo

As medidas de absorção óptica foram realizadas na faixa de 200-800 nm à temperatura ambiente no espectrofotômetro com detecção por arranjo de diodos e resolução de 2 nm, modelo HP 8452^a. Os espectros foram medidos utilizando-se um tempo de integração igual a 1 s.

As medidas de fluorescência foram feitas utilizando o sistema de fluorescência no estado estacionário PTI – QMI, sob agitação magnética.

Medidas de tempo de vida e tempo de correlação rotacional (anisotropia de fluorescência) foram realizadas no sistema de fluorescência resolvida no tempo Horiba-Jobin Ivon-IBH, que utiliza o método de contagem de fóton único (Laboratório multiusuário FLiRT, Departamento de Física da PUC–Rio). A fonte de luz usada para a excitação foi um nanoLED N-16, com taxa de repetição máxima de 1 MHz, emitindo em 330 nm com uma duração de pulso nominal de 1,0 ns.

Para as medidas de absorção e fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de seção transversal 10 × 10 mm ou 10 × 4 mm, capacidade volumétrica de 3 ml ou 1 ml, respectivamente.

As medições de pH foram feitas usando o pH metro Cole-Parmer Chemcadet 5986-25 com um eletrodo combinado semimicro Ag/AgCl.

Espectrômetro de massa

Os espectros de massa foram obtidos no modo refletivo de um espectrômetro de massa BRUKER/BIFLEX-III (Departamento de Física, PUC – RIO), equipado com um laser de nitrogênio UV em 337 nm, Laser Science Inc. (FWHM 3 ns, 200 µJ de energia média por pulso). As amostras foram analisadas usando o método de dessorção e ionização por laser (LDI).

4.2. Procedimentos Experimentais

4.2.1. Absorção óptica

As medidas de absorção dos sistemas moleculares em estudo são realizadas medindo-se primeiramente o “branco” que é automaticamente subtraído dos espectros de absorção das amostras. Para obter as concentrações adequadas assim como comprimentos de onda adequados à excitação da fluorescência de uma amostra, analisam-se os comprimentos de onda dos picos de absorção e seus coeficientes de absorção molar. Para evitar efeitos de filtro interno a absorbância no comprimento de onda de excitação não deve ser maior do que 0,1.

4.2.2. Fluorescência estacionária

Os espectros de fluorescência são obtidos depois de selecionar o intervalo de varredura e o comprimento de onda de excitação para certa amostra, os espectros de fluorescência foram registrados com taxa de varredura de 1 nm/s. Procurou-se trabalhar com concentrações e comprimentos de onda de excitação onde o valor da absorbância era menor que 0,1.

Os dados dos espectros obtidos foram analisados com o programa Origin, Microcal. Para obter gráficos de fluorescência, em dado comprimento de onda λ , em função do parâmetro variável, escolhia-se no espectro um pequeno intervalo de comprimentos de onda centrado em λ e tomava-se a média das intensidades de fluorescência nesse intervalo. O tamanho do intervalo escolhido dependia do ruído associado ao espectro e da variação da fluorescência em torno do λ escolhido para análise. A intensidade de fluorescência foi corrigida pela diluição, quando necessário. A correção do filtro interno para a intensidade de fluorescência é feita para absorbâncias maiores do que 0.1 utilizando para o fator de correção f_{fi} a seguinte expressão (Lakowicz, 2006):

$$f_{fi} = 10^{(A_{exc} \ell_{exc} + A_{em} \ell_{em}) / 2}$$

onde A_{exc} , ℓ_{exc} e A_{em} , ℓ_{em} são as absorbâncias e caminhos óticos nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. A intensidade nos espectros de excitação foi corrigida também pela variação da potência da lâmpada nos diferentes comprimentos de onda (Fig. 4.1). Depois de ajustar mediante uma curva teórica, como na região entre 190-400 nm (varredura dos espectros de excitação nas fenotiazinas), o fator de correção foi obtido pela razão $Pot(400\text{ nm})/Pot(190\text{ nm} < \lambda < 400\text{ nm})$.

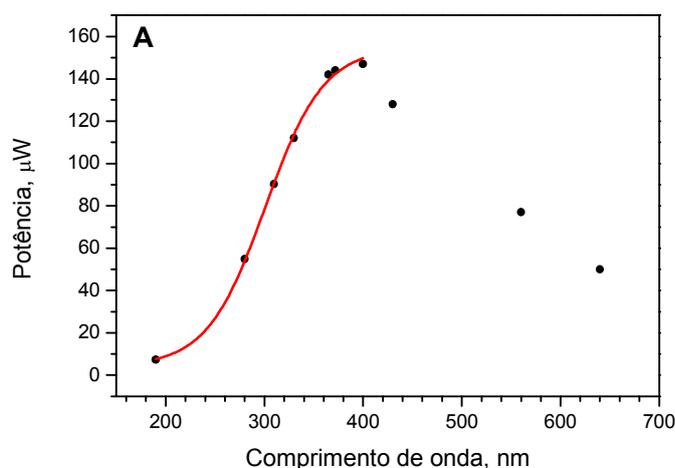


Figura 4.1. Potência da lâmpada de xenônio do espectrofluorímetro para diferentes comprimentos de onda.

Para as medidas de fotodegradação, as amostras de fenotiazinas foram iluminadas com a fonte de luz do espectrofluorímetro (lâmpada de Xe) em 310 nm. Ajustando as larguras das fendas de excitação e os intervalos de tempo (em média 6 min) podemos dosar a energia incidente nas amostras. Teve-se precaução de que as fenotiazinas não fossem iluminadas, a não ser que se estivesse medindo um espectro ou irradiando com a lâmpada. Isto evita um tempo não contabilizado de fotodegradação. Além do mais, todas as amostras foram agitadas magneticamente misturando as regiões irradiadas com as não irradiadas, uniformizando em todo momento a solução aquosa.

A potência de irradiação na posição da amostra é obtida das curvas de calibração da Fig. 4.2, para as excitações em 310 nm e em 365 nm ($P = \alpha f_1 \times f_2$). Por exemplo, se colocamos as fendas de entrada e de saída (f_1 e f_2) do monocromador de excitação a 8 e 10 nm, respectivamente, podemos encontrar a

potência de irradiação em 310 nm. Utilizando $\alpha = 5,66 \mu\text{W}/(\text{nm})^2$, tem-se $P = 0,45 \text{ mW}$.

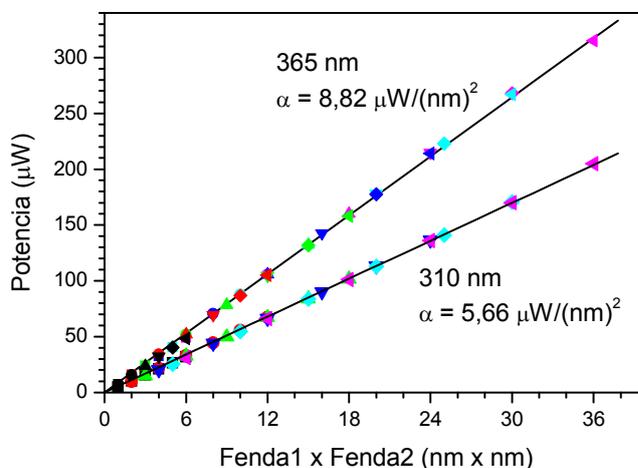


Figura 4.2. Potência de irradiação sobre o porta-amostra do fluorímetro em função do produto das larguras das fendas do monocromador de excitação. Os diferentes símbolos representam medidas realizadas com diferentes larguras de fendas. A fonte de irradiação é uma lâmpada de Xe de 45 W de potência. O parâmetro α representa o coeficiente angular das retas.

A variação dos espectros de absorção e de fluorescência com a irradiação das fenotiazinas é analisada da seguinte maneira: observa-se o deslocamento nos máximos e o aparecimento de picos característicos de alguma espécie de fenotiazina; a formação de pontos isobésticos nos informa se ocorre transição entre duas espécies.

Nas medidas de fluorescência de amostras contendo suspensões de membranas- Na^+ , K^+ -ATPase, em que todas as titulações foram realizadas a concentração constante de membrana, observou-se espalhamento considerável nos espectros. O espectro referência obtido na ausência de fluoróforo era subtraído posteriormente das outras medidas.

Anisotropia de fluorescência estacionária

Membranas- Na^+ , K^+ -ATPase foram marcadas com DPH em condições ambientais, incubadas entre 2 e 3 horas para conseguir que DPH se inserisse completamente entre os lipídios. Medições de anisotropia de fluorescência da DPH foram realizadas em dois tipos diferentes de Na^+ , K^+ -ATPase, de rim porco e

de crustáceo. Manteve-se a relação entre as concentrações de DPH e lipídios a 1/50, que é suficientemente pequena para perturbar pouco a membrana.

Para as medidas de fluorescência, as moléculas de DPH são excitadas em seu pico de absorção em 352 nm. Sabendo que as fenotiazinas absorvem em comprimentos de onda menores de 352 nm, evitamos que estas se fotodegradem.

Polarizadores de excitação e emissão foram usados para medir a anisotropia do DPH. As amostras são excitadas com luz polarizada verticalmente. As intensidades de fluorescência polarizadas verticalmente e horizontalmente são medidas para calcular a anisotropia usando a seguinte equação:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (4.1)$$

onde G é o fator de correção instrumental dado por $G = I_{HV}/I_{HH}$. G foi determinado medindo-se as intensidades de fluorescência I_{HV} e I_{HH} usando luz de excitação polarizada horizontalmente.

Marcação da Na^+ , K^+ - ATPase com FITC

Para estudar as interações das fenotiazinas com o sítio de ligação do ATP da Na^+K^+ -ATPase, marcou-se a enzima com FITC, 120 μl da solução de membranas (~0,5 mg de proteína \approx 3 nmol) em TRIS 50 mM (a pH 9.0) contendo FITC (7,5 nmol). A solução foi agitada por 1h 30min em ambiente escuro. Em seguida, dialisou-se a amostra por um tempo de 12 horas, com a finalidade de separar as moléculas de FITC que não se ligaram à proteína. O meio externo da membrana foi o mesmo tampão TRIS. Todo o sistema foi agitado durante o processo. A Fig. 4.3 mostra esquematicamente o processo de separação ou diálise realizada nesse trabalho.

A Fig. 4.4 mostra a localização da FITC na proteína, que seria o sítio de maior afinidade de ATP na subunidade α e conformação E_1 da proteína (αE_1) (Linnertz et al., 1998). A distância do sítio da AO e da ErITC (eritrosina isotiocianato) para a FITC é de 7,2 nm e 6,5 nm, respectivamente. A ErITC se encontra localizada no sítio de menor afinidade do ATP no estado αE_2 da proteína. As distâncias foram medidas pelo método de transferência de energia de Förster entre estes marcadores fluorescentes.

Depois de finalizada a diálise, a solução contendo a FITC - Na^+ , K^+ -ATPase foi colocada na cubeta de fluorescência, medindo-se os espectros de excitação e

emissão da FITC como controle. Avaliou-se em seguida a fluorescência da FITC - Na^+ , K^+ -ATPase tratada com diferentes alíquotas de fenotazinas.

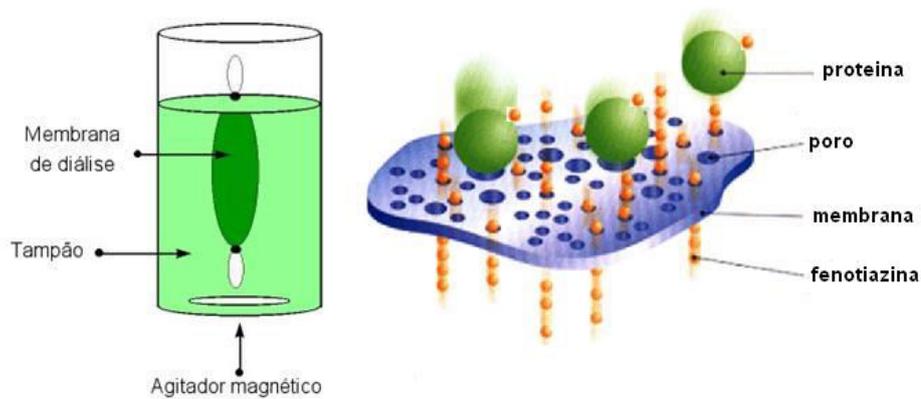


Figura 4.3. Esquema do processo de diálise para separar as moléculas de FITC que não ligaram à Na^+ , K^+ -ATPase.

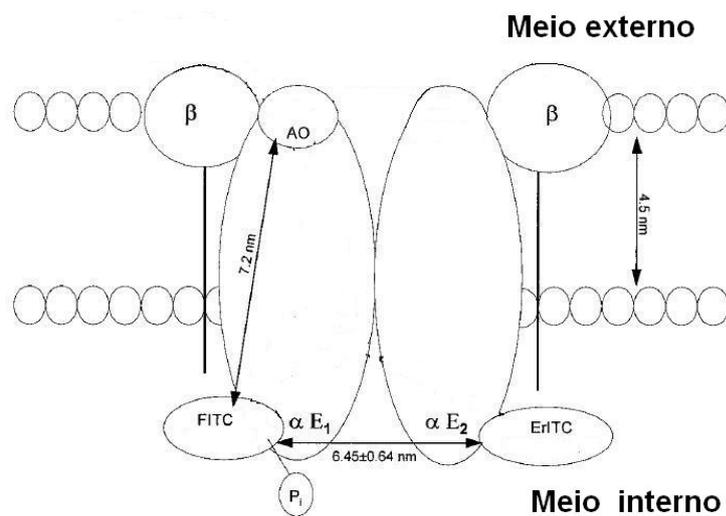


Figura 4.4. Esquema do dímero $(\alpha\beta)_2$ da Na^+ , K^+ -ATPase e localizações dos sítios de alta (conformação αE_1) e baixa afinidade (conformação αE_2) do ATP. As medidas das distâncias relativas dos marcadores fluorescentes (AO, FITC e ErITC) são obtidas por transferência de energia de Föster (Linnertz et al., 1998).

4.2.3. Fluorescência com resolução temporal

Medidas do decaimento da fluorescência e do decaimento da anisotropia foram feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de contagem de fótons únicos correlacionada no tempo: *time-correlated single-photon counting* (TCSPC). O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. TCSPC é uma técnica digital que conta fótons correlacionados temporalmente em relação ao pulso de excitação.

Em cada experimento, os dados foram adquiridos até alcançar um máximo de 10 000 contagens no canal do pico. Para cada curva de decaimento de fluorescência da amostra, um correspondente perfil de lâmpada (LED) usando uma solução espalhadora foi medido. O decaimento da intensidade de fluorescência é representado por uma soma de exponenciais:

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad 4.2$$

onde $I(t)$ é a intensidade de fluorescência, α_i é o fator pre-exponencial, e τ_i é o tempo de vida de fluorescência da componente i . O bom ajuste foi avaliado por χ^2 e resíduos. Para um bom ajuste o valor de χ^2 deve ser perto de 1, mas valores entre 0,8 e 1,2 são considerados adequados. A Fig. 4.6 mostra os resultados de uma medida experimental (pontos) e seu ajuste (curva contínua). A intensidade fracionária ou amplitude relativa, f_i , de cada componente do decaimento foi determinada por $f_i = \alpha_i \tau_i / \sum \alpha_j \tau_j$ e o tempo de vida médio é definido como

$$\langle \tau \rangle = \sum f_i \tau_i .$$

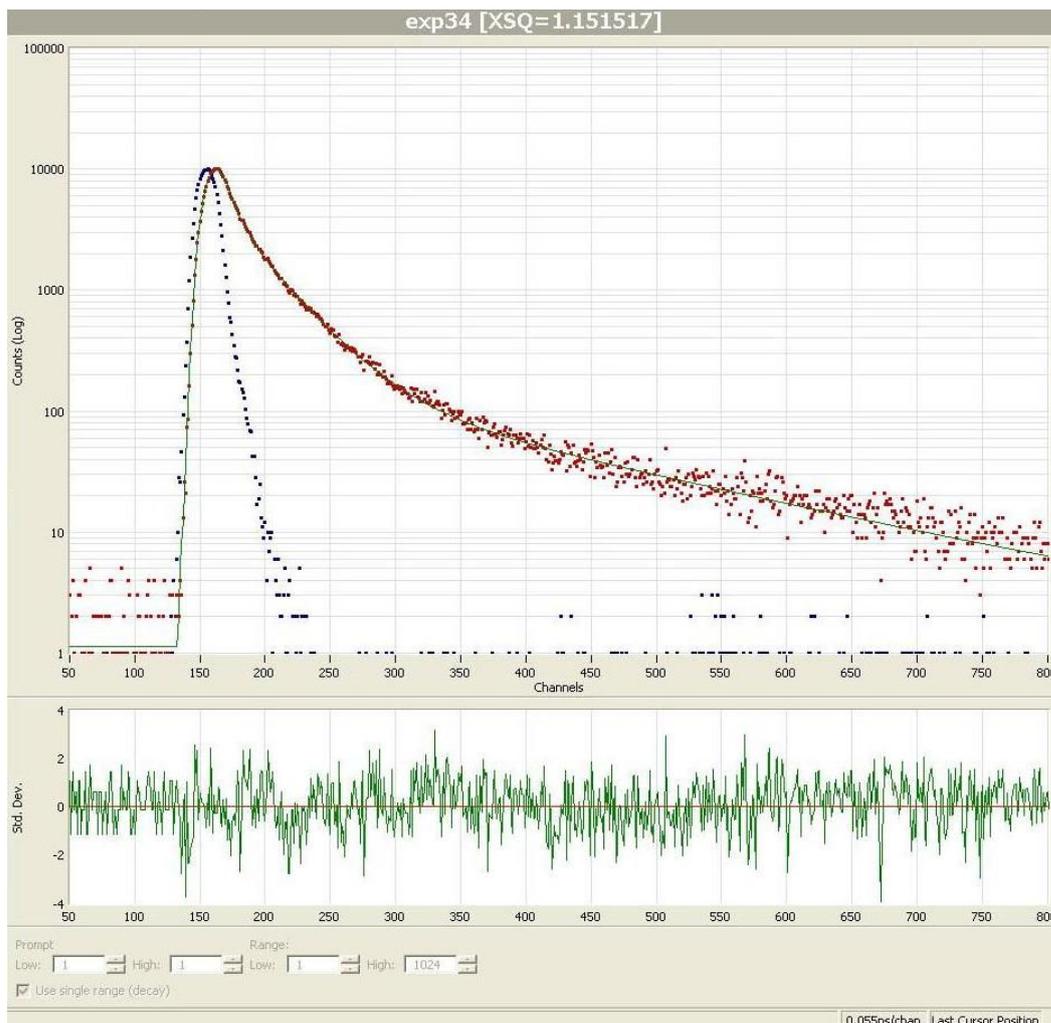


Figura 4.5. Ajuste do decaimento da intensidade da fluorescência de uma medida usando o programa de análise de decaimentos de fluorescência fornecido por HORIBA Jobin Yvon IBH. A parte superior mostra o perfil do LED (pontos não ajustados) e os pontos experimentais ajustados com 3 exponenciais (curva contínua) originando os seguintes tempos: 0,38 ns (41%), 1,8 ns (50%), 9,7 ns (9%). A parte inferior mostra os resíduos do ajuste. A amostra usada foi a CPZ previamente irradiada (excitação em 330 nm e emissão em 450 nm).

Decaimento da Anisotropia

O decaimento de anisotropia de fluorescência foi medido incorporando-se polarizadores nos monocromadores de excitação e emissão. O decaimento da anisotropia foi gerado da medição do decaimento das intensidades de fluorescência I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} e I_{HH} usando a equação 4.1, onde $G = I_{HV}/I_{HH}$. Para analisar os dados a fim de obter os parâmetros de decaimento de anisotropia, utilizaram-se dois métodos: o método direto de análise e o método com

reconvolução. No método direto, os decaimentos são analisados usando um modelo exponencial, em termos de um número de componentes, superposto a uma anisotropia residual (r_∞). Este método é muito popular porque é muito rápido, direto, e dá uma excelente inspeção visual. A Fig. 4.6 mostra uma análise direta de decaimento de anisotropia. No segundo método, a análise (reconvolução) é dividida em duas partes: análise da soma $I_S = (I_{VV} + 2 G I_{VH})$ seguida de análise da diferença $I_D = (I_{VV} - G I_{VH})$. Para obter os parâmetros de decaimento de anisotropia, devemos ajustar I_D com o resultado da reconvolução de I_S . Para a análise de nossas medidas empregamos ambos os métodos.

Para explicar o decaimento da anisotropia nas membranas se utilizou o modelo de movimento dentro de um cone. De acordo com este modelo, o fluoróforo é considerado estar num ambiente limitado e seu movimento orientacional na membrana é descrito como confinado dentro de um cone ao redor da normal à superfície da membrana. O decaimento da anisotropia de fluorescência do fluoróforo na membrana é representado por

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)e^{-t/\tau_c} + r_\infty \quad 4.3$$

onde r_0 é a anisotropia em $t=0$, r_∞ é a anisotropia residual e τ_c é o tempo de correlação rotacional para a difusão do fluoróforo dentro do cone. A relação entre o ângulo do cone, θ_c , e a anisotropia residual é dada por

$$r_0 / r_\infty = \frac{1}{4} [\cos \theta_c (1 + \cos \theta_c)]^2 \quad 4.4$$

A taxa $1/\tau_c$ e a amplitude dos movimentos rotacionais θ_c nos dão informação dinâmica e estática, respectivamente, sobre a sonda.

Quando as moléculas de DPH incrustadas na bicamada de lipídios da membrana absorvem energia de luz polarizada verticalmente, elas retornam ao estado fundamental emitindo também luz polarizada. Quando as moléculas dos lipídios na membrana estão na fase gel, as moléculas de DPH permanecem orientadas e a luz emitida tem uma grande componente paralela à polarização da luz incidente (I_{VV}). Se as cadeias lipídicas movimentam-se, mudando de orientação, os eixos moleculares de DPH também mudam de direção aleatoriamente, e os fótons são emitidos com polarização aleatória. Este processo é chamado de despolarização de fluorescência ou decaimento da anisotropia.

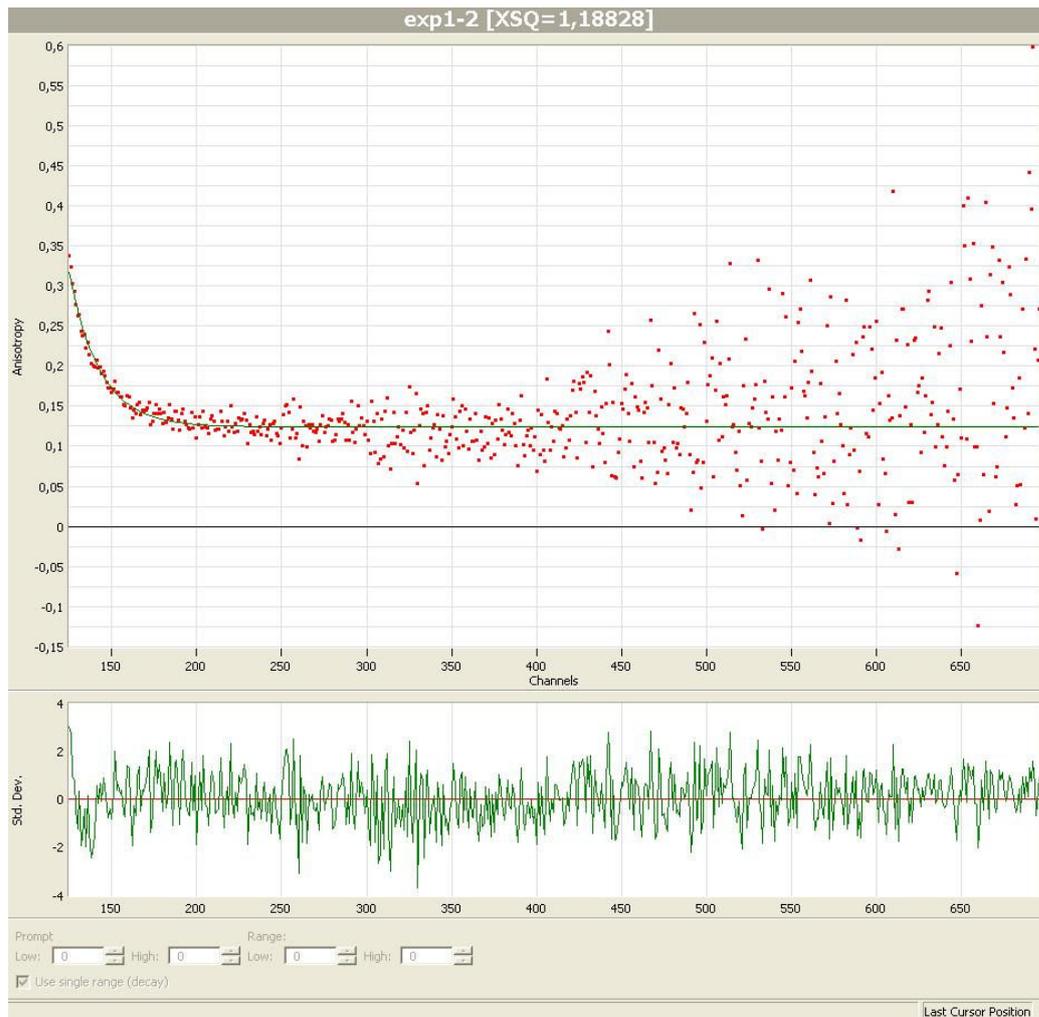


Figura 4.6. Exemplo de análise direta dos dados de decaimento de anisotropia da fluorescência de DPH em frações de membrana enriquecidas de Na^+, K^+ -ATPase, usando o programa de análise de decaimento de fluorescência fornecido por HORIBA-Jobin Yvon-IBH. Os pontos experimentais são ajustados a uma exponencial (curva contínua) originando os seguintes parâmetros: $\tau_c = 1,98$ ns, $r_0 = 0,32$, $r_\infty = 0,13$. A parte inferior mostra os resíduos do ajuste. A excitação em 372 nm e emissão em 427 nm.

5. Formação de fotoprodutos fluorescentes de fenotiazinas

É sabido que fotoprodutos de fenotiazinas ocasionam efeitos colaterais e modificam a estabilidade estrutural e funcional de vários sistemas biológicos, tais como proteínas, membranas, etc. (Maruoka et al., 2008). Os radicais livres de fenotiazinas são as principais espécies criadas por irradiação (fotólise) e consistem em intermediários na formação de produtos mais estáveis. Existe também a possibilidade de que a irradiação induza reações químicas com o solvente aquoso. Por isso é importante caracterizar os fotoprodutos principais das fenotiazinas para poder levá-los em conta em sua interação com as proteínas e membranas.

5.1. Absorção e Fluorescência das Fenotiazinas

Os espectros de absorção ótica dos fenotiazínicos clorpromazina, flufenazina e trifluoperazina em tampão fosfato em pH 7,4 são mostrados na Fig. 5.1. Observa-se um pico de absorção em 254 nm para a CPZ, e em 258 nm para FPZ e TFP. Há também um pico de absorção menor em 306 nm para as três fenotiazinas. Na literatura foram encontrados os seguintes coeficientes de absorção molar: $\epsilon_{255}^{CPZ} = 2,7 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$, $\epsilon_{307}^{CPZ} = 3,5 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$, para a CPZ; $\epsilon_{308}^{TFP} = 3,2 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$, para a TFP (Bhattacharyya e Sen, 1998; Garcia et al., 2005).

Em geral, os espectros de absorção das fenotiazinas apresentam dois picos como os da Fig. 5.1: a absorção em 254 nm é atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e a absorção em 306 nm a uma transição $n \rightarrow \pi^*$. A transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é devida aos elétrons dos orbitais moleculares π nos anéis da fenotiazina e a transição $n \rightarrow \pi^*$ devido aos pares de elétrons não ligantes “n” encontrados no enxofre do anel. (Garcia et al., 2005).

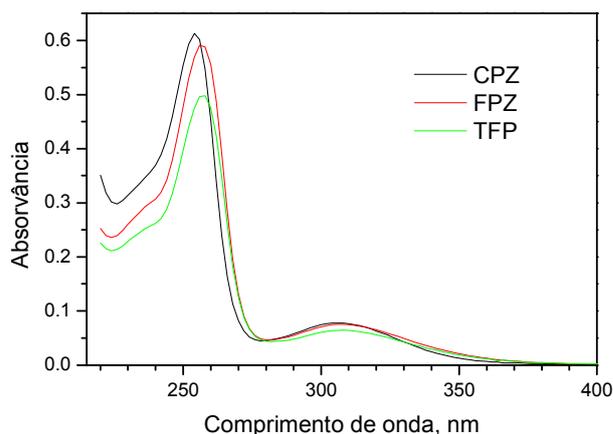


Figura 5.1. Espectros de absorção óptica de clorpromazina (CPZ), flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP) sem fotodegradação em tampão fosfato 20 mM pH 7,4, todas a 20 μ M em ambiente aeróbico.

A estrutura química das fenotiazinas utilizadas neste trabalho faz pequena diferença no espectro de absorção. O grupo na posição 2 do heterociclo (CF_3 para FPZ e TFP e Cl para CPZ) parece ser responsável pela diferença de 4 nm na posição do pico maior, referente a transições $\pi \rightarrow \pi^*$. O pico menor não tem muita variação para as três fenotiazinas, provavelmente porque as transições $n \rightarrow \pi^*$ são localizadas principalmente no enxofre, cujo entorno é semelhante nas três fenotiazinas.

Para os experimentos de fluorescência, que serão descritos no decorrer desse capítulo, escolhemos um comprimento de onda de excitação da fluorescência em 310 nm para todas as fenotiazinas. Observa-se que para concentração de 20 μ M, a absorvância em 310 nm é menor do que 0,1, o que evita a correção do efeito de filtro interno.

A Fig. 5.2 mostra os espectros de fluorescência das três fenotiazinas sem prévia irradiação. Observa-se que a fluorescência da CPZ é mais fraca que a das outras duas fenotiazinas. Seu rendimento quântico é de apenas $3,6 \times 10^{-3}$ (García et al., 2005). Os máximos de emissão para a CPZ, FPZ e TFP estão em 453 nm, 471 nm e 472 nm, respectivamente. Esses espectros são reprodutivos apenas na primeira varredura. Com irradiação contínua começam a aparecer outras espécies fluorescentes, como será visto nas próximas seções.

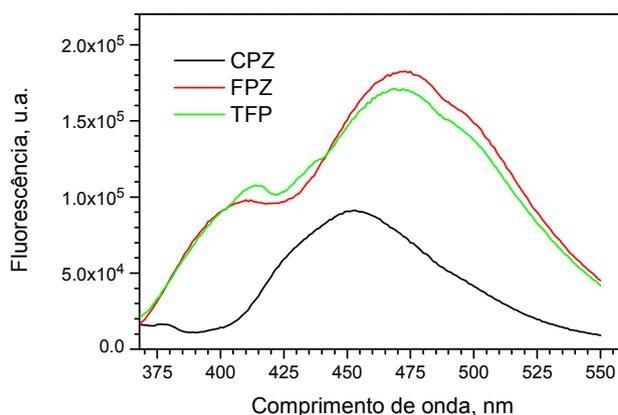


Figura 5.2. Espectros de fluorescência da CPZ, FPZ e a TFP (20 μ M) em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4. Amostras em ambiente aeróbico sem prévia irradiação.

A cadeia lateral (aminoalquílica ou piperazínica) não contribui para as propriedades de emissão das fenotiazinas (García et al., 2005). Isto está de acordo com o fato de que, mesmo apresentando cadeias laterais distintas na posição 10, os espectros de emissão de FPZ e TFP são praticamente iguais. Da mesma maneira que na absorção, é provável que a diferença entre os máximos de emissão esteja relacionada ao substituinte na posição 2 do heterociclo (Karpinska et al., 1996).

5.2. Fotodegradação das Fenotiazinas.

A sensibilidade de várias drogas à luz ambiental, particularmente nas regiões de UVA (320-400 nm) e UVB (290-320 nm), pode constituir um fator de risco em seu uso, visto que a foto-excitação eletrônica pode conduzir à fotodegradação seguida de um decréscimo em sua eficiência farmacêutica e da formação de produtos tóxicos.

As fenotiazinas em estudo sofrem fotodegradação quando são irradiadas com radiação ultravioleta UVB e, em menor intensidade, UVA. Suas propriedades de absorção e fluorescência vão se modificando, indicando modificações na estrutura química dessas fenotiazinas. Os orbitais moleculares (fundamental e excitado) das fenotiazinas são afetados, ligações químicas são quebradas, originando espécies moleculares estáveis e instáveis, e novas ligações químicas vão aparecendo.

A fotorreatividade das fenotiazinas é fortemente dependente da natureza do solvente e da presença de oxigênio. Por exemplo, Davies et al. (1976), ao utilizar como solvente o 2-propanol em condições anaeróbicas, encontraram como fotoprodutos da CPZ os radicais neutros PZ^{\bullet} (promazinil) e o Cl^{\bullet} . Já em presença de oxigênio, nenhuma reação fotoquímica foi observada. Eles argumentaram que o 3O_2 desativa o primeiro estado triplete excitado de CPZ evitando que, por meio desse estado, se forme alguma outra espécie molecular. Em água, os resultados são mais complexos. Em presença de O_2 , são observados radicais livres PZ^{\bullet} e o sulfóxido da fenotiazina como principais fotoprodutos, enquanto que em ausência de O_2 não se detectou esse último produto (Daveloose et al., 1978).

Para observar as espécies fluorescentes resultantes da irradiação das fenotiazinas com UV, assim como o efeito de oxigênio na formação dos fotoprodutos, fizemos medições de absorção e de fluorescência de CPZ, FPZ e TFP em ambiente aeróbico e anaeróbico.

5.2.1.

Absorção das fenotiazinas sob fotodegradação

Os espectros de absorção das fenotiazinas CPZ, FPZ e TFP foram obtidos após vários tempos de irradiação de 0 a 103 min com UV de 310 nm. Apresentamos, abaixo (Fig. 5.3), alguns dos espectros obtidos, assim como uma análise da diferença entre as taxas de degradação em ambiente aeróbico e anaeróbico.

Clorpromazina (CPZ)

A Fig. 5.3 mostra os espectros de absorção da CPZ intacta e modificada pela irradiação em 310 nm em ambiente anaeróbico (A) e aeróbico (B). Observamos que a fotodegradação da CPZ está acontecendo de forma diferente em presença e ausência de oxigênio (a diferença de concentração foi causada pelo fluxo de nitrogênio). Os espectros obtidos em função do tempo de irradiação apresentaram pontos isobésticos tanto em (A) como em (B), mas em posições diferentes, por exemplo, em 268 nm e em 264 nm, respectivamente. Os gráficos inseridos no canto superior direito em A e B mostram os espectros diferença, com relação à primeira medida, para um tempo de irradiação de 90 min.

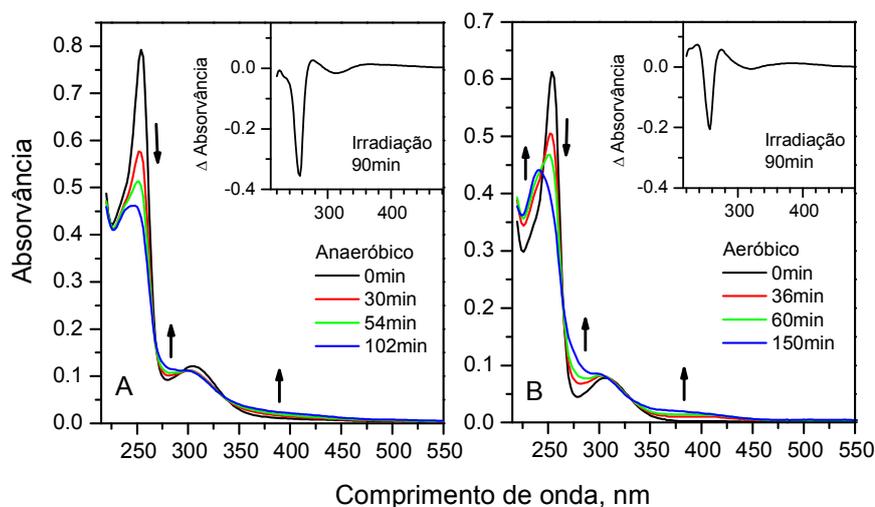


Figura 5.3. Espectros de absorção da CPZ (20 μ M) irradiada em 310 nm (0.23 mW) na condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

A Fig. 5.4 mostra a variação temporal da absorção em três comprimentos de onda em função do tempo de irradiação. A absorção em 256 nm diminui com o tempo de irradiação. Ajustando-se esses dados com o modelo de decaimento exponencial

$$A = A_0 + A_m e^{-t/\tau},$$

foram obtidas as seguintes constantes de tempo: $\tau = 61$ min para a condição aeróbica e $\tau = 34$ min para a anaeróbica (Fig. 5.4). Isso indica que a banda devido a CPZ decai cerca de duas vezes mais rapidamente em ambiente anaeróbico do que em aeróbico.

Em 238 nm aparece um pico de fotoproducto criado apenas em ambiente aeróbico. Este parece estar associado ao crescimento da absorção em 276 nm, conforme indica a Fig. 5.4. Esses picos são atribuídos a clorpromazina sulfóxido (Iwaoka e Kondo, 1974).

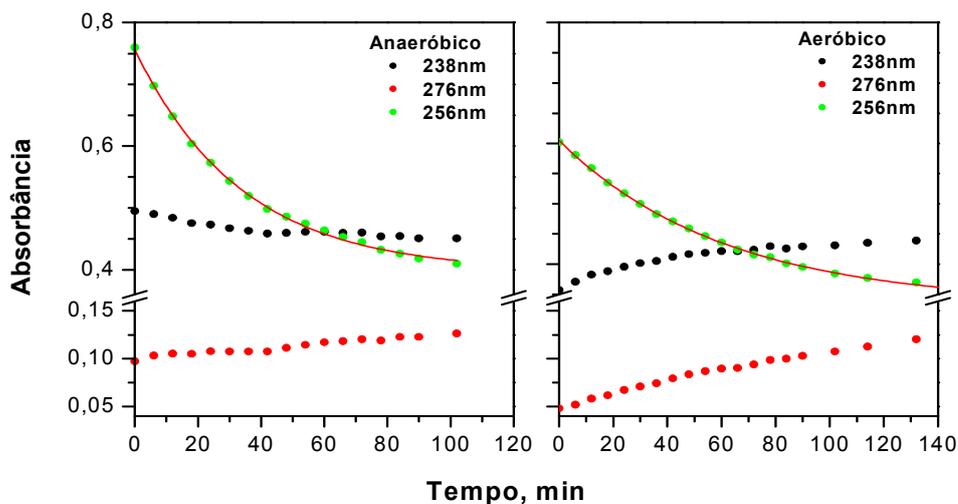


Figura 5.4. Absorbância da CPZ (20 μ M) em função do tempo na condição aeróbica e anaeróbica. Para a absorbância em 238nm tanto em ambiente anaeróbico e aeróbico ajustamos os dados experimentais com o modelo de decaimento exponencial conforme se mostra na curva contínua.

Nossos resultados foram semelhantes aos de Iwaoka e Kondo (1974), embora esses autores tenham feito experimentos em pH 4,7 irradiando CPZ com radiação de 253,7 nm. O espectro formado em condições aeróbicas foi atribuído à clorpromazina sulfóxido.

Flufenazina (FPZ)

A Fig. 5.5 mostra as mudanças nos espectros de absorção da FPZ por efeito da irradiação, em condição anaeróbica (A) e aeróbica (B). Os espectros diferença no canto superior de A e B mostram como na ausência de oxigênio a FPZ fotodegrada mais rapidamente (256nm).

A partir desses espectros observa-se melhor o aparecimento de novos picos de absorção em 236 nm e 274 nm. Além disso, observa-se o aparecimento de um ombro em 352 nm em A e em 358 nm em B. Essas absorbâncias, nas duas condições, parecem estar associadas à mesma espécie. A Fig. 5.6 mostra a variação temporal da absorbância em 236, 260 e 274 nm para a FPZ.

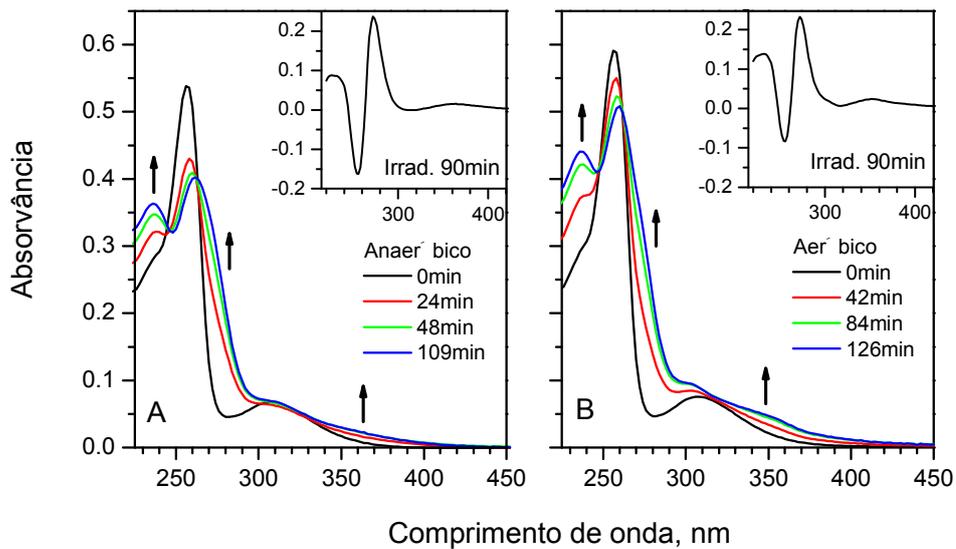


Figura 5.5. Espectros de absorção da Flufenazina (20 μM) irradiada em 310nm (0.23mW) na condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

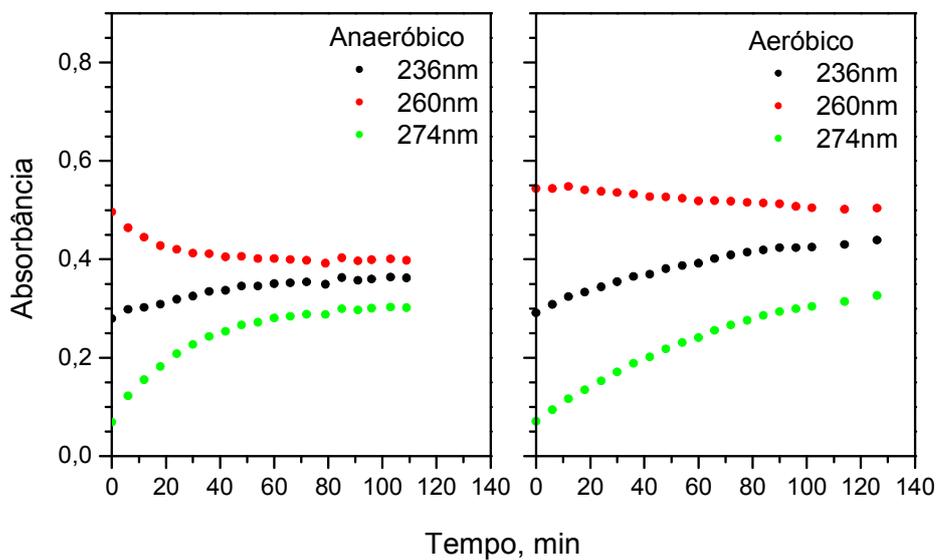


Figura 5.6. Absorbância da FPZ (20 μM) em função do tempo em condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

Trifluoperazina

Como mostram os espectros da Fig. 5.7, a TFP é fotodegradada quase da mesma maneira que a FPZ (Fig. 5.5). Na Fig. 5.7 também vemos que a absorção

em 236 nm e 274 nm parece ser da mesma espécie em ambiente aeróbico e anaeróbico.

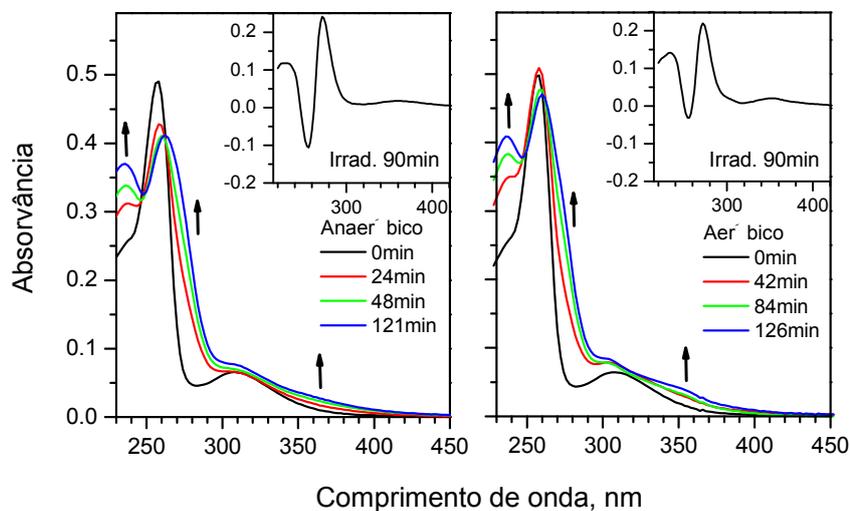


Figura 5.7. Espectros de absorção da Trifluoperazina (20 μ M) irradiada em 310 nm (0,23 mW) na condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

As variações espectrais que aparecem com a fotodegradação da FPZ e da TFP apresentam sinais de formação da espécie sulfóxido, como anteriormente observado por Rodrigues et al. (2006), que encontraram picos em 230, 273, 302 e 348 nm para essa espécie.

De acordo com os espectros de absorção, o oxigênio parece desacelerar a taxa de formação dos fotoprodutos de fenotiazinas, em maior grau na TFP e FPZ. Talvez o O_2 destrua alguns dos radicais livres que continuariam provocando danos que modificariam os espectros de absorção.

5.2.2.

Fluorescência dos produtos de fotodegradação das fenotiazinas

Para estudar as espécies fluorescentes resultantes da fotodegradação, a variação da fluorescência estacionária e resolvida no tempo foi obtida submetendo-se soluções de fenotiazinas, em diferentes valores de pH, a diferentes tempos de irradiação ultravioleta UVB (em torno de 310 nm). Também foram realizadas medidas de fluorescência em condições aeróbicas e anaeróbicas para observar o efeito do oxigênio molecular na fotodegradação.

Clorpromazina

Fluorescência estacionária

A Fig. 5.8 mostra a variação dos espectros de fluorescência em consequência da fotodegradação de CPZ.

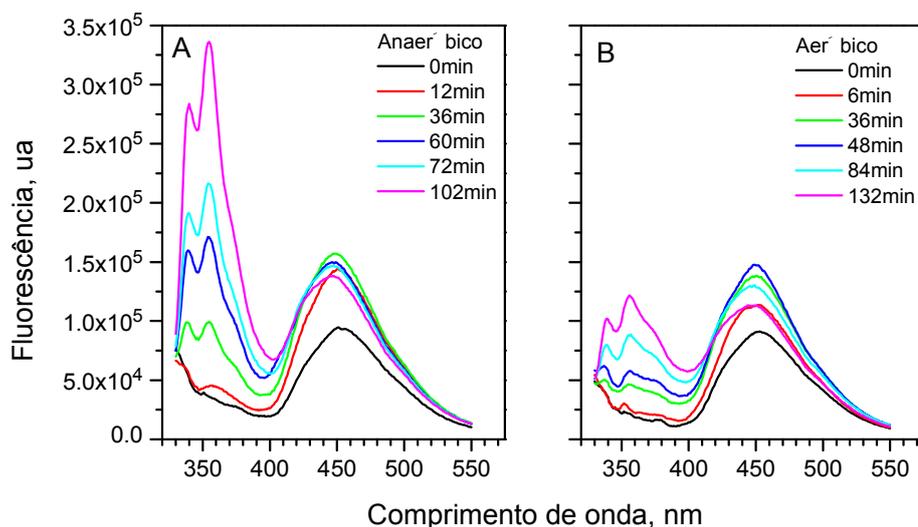


Figura 5.8. Espectros de fluorescência da CPZ (20 µM) irradiada e excitada em 310 nm (0,23 mW) em condição anaeróbica (A) e aeróbica (B). Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

Para a análise dos espectros, consideramos duas etapas:

Na primeira etapa, que consistiu nos primeiros 48 min, a fluorescência do pico inicial da CPZ em 453nm cresce, deslocando-se levemente para o azul (451 nm). Começa a aparecer uma espécie fluorescente com pico triplo de emissão (em 340 e 355 nm, com um ombro em 372 nm). Em ambiente anaeróbico essa espécie cresce muito mais do que na presença de oxigênio. Esse espectro nunca foi descrito antes na literatura.

Na segunda etapa, o pico de fluorescência em 451 nm diminui, enquanto que a intensidade do sinal triplo continua crescendo, especialmente em ambiente anaeróbico. Em vácuo, observamos que o pico de emissão em 450 nm, atribuído ao fotoproduto promazina (PZ), cresce e se estabiliza, sem o posterior decaimento (espectros não mostrados), enquanto que o fotoproduto de pico triplo continuou aumentando. Concluímos que em ausência de oxigênio a PZ é estável.

É muito provável que o crescimento do pico de 453 nm esteja associado à perda de Cl do anel, com formação de PZ, cujo rendimento quântico ($14,3 \times 10^{-3}$) é quatro vezes maior do que o da CPZ ($3,6 \times 10^{-3}$) (García et al., 2005). Isso já havia sido sugerido por Kochevar e Horn (1983) e também está de acordo com o espectro de massa que apresentaremos posteriormente.

Principalmente em ambiente anaeróbico, mas também em aeróbico, em pequena quantidade, se origina a espécie fluorescente com pico triplo. Inicialmente pensamos que essa espécie reagisse com oxigênio para formar um produto não fluorescente. No entanto, ao introduzirmos oxigênio na amostra anaeróbica, verificamos que o sinal fluorescente não decresce consideravelmente (~10%).

A Figura 5.9 mostra os espectros de excitação, não corrigidos, da espécie com emissão em 450 nm (de CPZ ou PZ) e da espécie de pico triplo (emissão em 340, 354 e 372 nm). É importante dizer que esses espectros são muito distorcidos, pois abaixo de 260 nm a absorbância da CPZ é muito grande (ver Fig. 5.3) e o efeito de filtro interno predomina; além disso, a intensidade da luz de excitação é bem mais baixa em comprimentos de onda menores. Mesmo tendo em conta as distorções causadas por esses efeitos, a espécie de pico triplo de emissão apresenta picos de excitação bem definidos em 240, 268, 304 e 333 nm.

A Fig. 5.9 B, obtida com a mesma amostra de A, mas deixando-se entrar oxigênio, mostra que a tendência de aumento da fluorescência da espécie de pico triplo de emissão é interrompida pelo ingresso de oxigênio na cubeta. Isso indica que essa espécie, uma vez formada, não reage rapidamente com O_2 , mas sugere que ela é criada a partir de um radical livre rapidamente aniquilado em presença de O_2 . A fotodecomposição de PZ (pico de fluorescência em 450 nm) não foi observada em ausência de oxigênio (gráfico não mostrado).

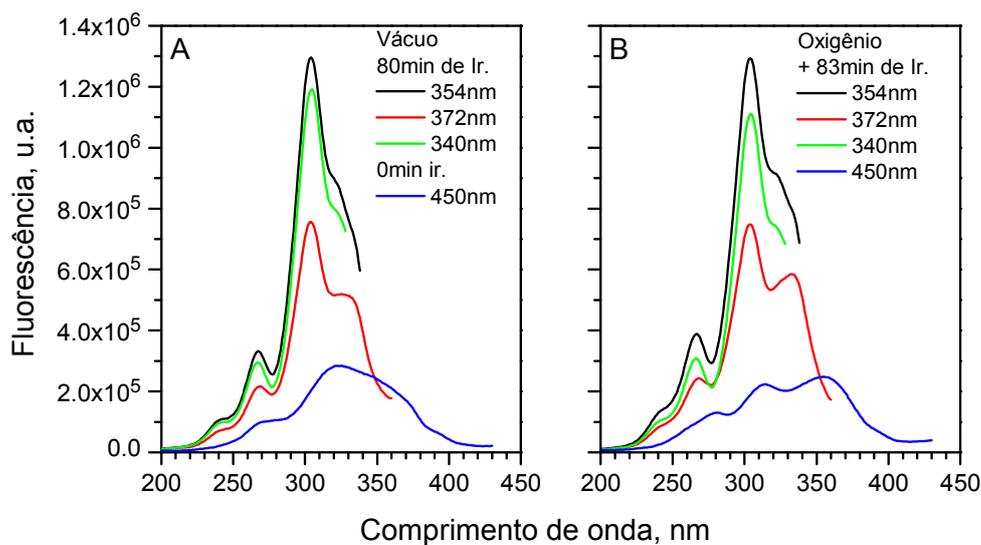


Figura 5.9. Espectros de excitação da CPZ (20 μM) irradiada 80 min em ausência de O_2 e logo depois irradiada 84 min em presença de O_2 . A irradiação foi feita em 310 nm (0.815mW) e as emissões dos espectros de excitação foram em 340, 354, 372 e 450 nm. O tampão utilizado foi em fosfato a pH 7.4 (cubeta de 3 ml).

Fotodegradação de CPZ em função do pH

Experimentos de fotodegradação em ambiente aeróbico foram realizados em tampão citrato-fosfato em diversos valores de pH (Fig. 5.10). Observou-se que o pH do meio é um fator importante na formação dos fotoprodutos da CPZ. Para uma faixa de pH 3,0-4,7, encontramos um fotoproduto que tem picos de absorção como a CPZSO (Fig. 5.10 A), descritos por Iwaoka T. et al., 1974 (244, 274, 294 e 334 nm) e Saldanha et al., 2002 (270, 302 e 336 nm); mas que emite só num pico, 372 nm (Fig. 5.10 B). Já para pH mais alto, entre 5,6-7,0, o resultado foi o mesmo que os apresentados nas Figs. 5.3 e 5.8. Concluimos também dos espectros de absorção e fluorescência (Fig. 5.10 A e B) que o fotoproduto fluorescente é mais abundante em meio mais ácido. Ainda mais, notou-se que uma vez formado o fotoproduto em dado pH, o espectro de fluorescência não variava com nova mudança de pH.

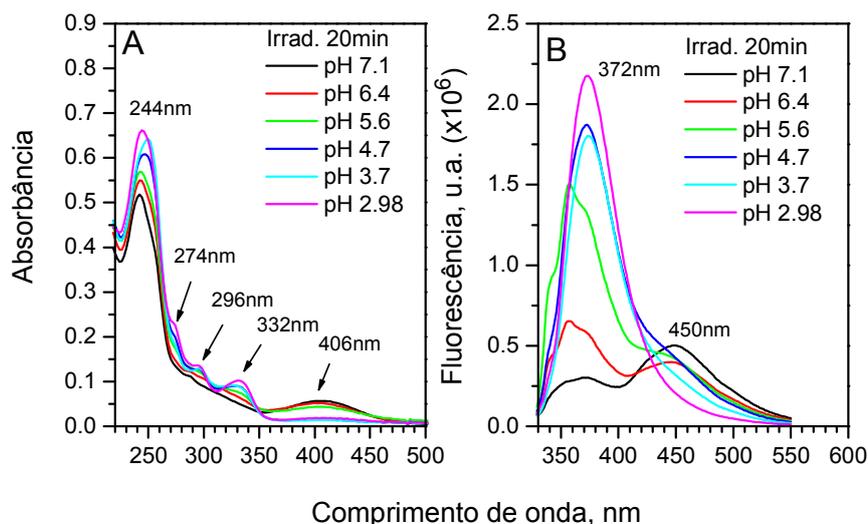


Figura 5.10. Espectros de absorção (A) e fluorescência (B) da CPZ (20 μM) irradiada e excitada em 310 nm (0.57 mW) em condição aeróbica. Tampão citrato-fosfato (cubeta 3 ml).

Experimentos de fotodegradação em diversos valores de pH (tampão citrato-fosfato) também foram realizados em ambiente anaeróbico. Nos espectros de absorção (não mostrados) não apareceram picos característicos da espécie sulfóxida (CPZSO), indicando que a espécie sulfóxida precisa de O_2 para se formar. No entanto, entre pH 6,45-7,26 apareceu um ombro de absorbância em 406 nm, semelhante ao que apareceu em ausência de O_2 em pH 7.1 (Fig. 5.10), conforme incrementávamos o tempo de irradiação.

A Fig. 5.11 mostra os espectros de emissão (A) e de excitação (B) da CPZ em pH 3,1, antes e depois de irradiada por 20 min. Dos espectros de emissão observa-se que a fluorescência em 450 nm aumenta muito, indicando fotólise de Cl. Observa-se também que a espécie de triplo pico aparece com menor intensidade. Já a espécie fluorescente que foi observada em ambiente aeróbico, com pico em 370 nm (Fig. 5.10 B), não se formou na ausência de O_2 , indicando que foi correta a atribuição desse pico à espécie sulfóxida.

Os espectros de excitação da Fig. 5.11 B são muito distorcidos por causa do efeito de filtro interno nos comprimentos de onda de excitação (ver absorção na Fig. 5.3) e pela variação da potência da lâmpada com o comprimento de onda.

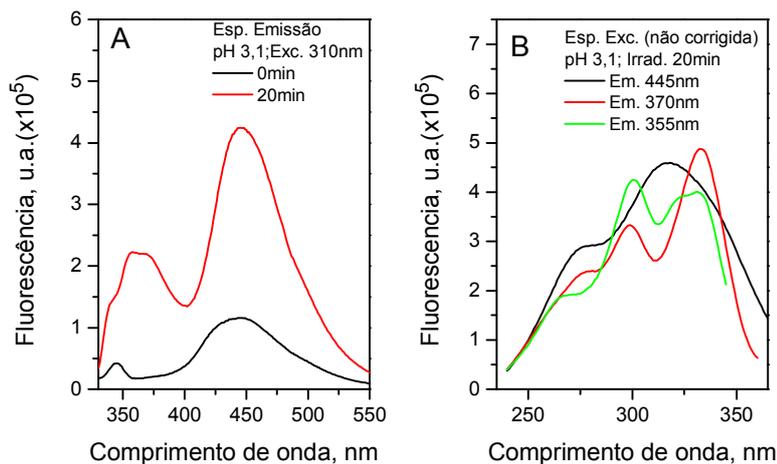


Figura 5.11. (A) Espectro de emissão da CPZ (20 μ M) não irradiada e irradiada 20 min (exc. 310 nm; 0.57 mW). (B) Espectros de excitação da amostra irradiada, não corrigidos, para emissões em 355, 370, 445 nm. Tampão citrato-fosfato, pH 3,1.

A variação da potência, na posição da amostra, em função do comprimento de onda da luz de excitação aparece na Fig. 4.1, cuja curva ajustada aos pontos experimentais foi usada para correção. A correção do filtro interno foi feita usando o espectro de absorção da amostra irradiada, usando o fator $10^{(A(\lambda)/2)}$. Os espectros de emissão corrigidos são mostrados na Fig. 5.12.

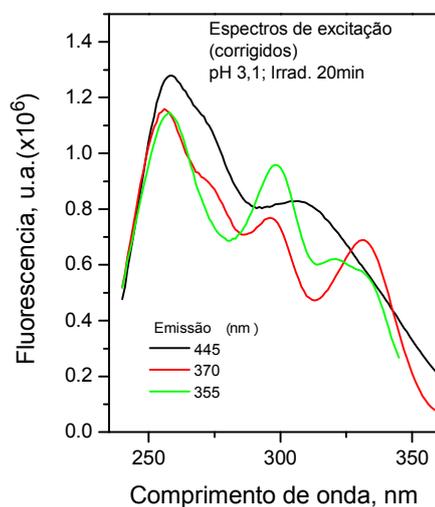


Figura 5.12. Espectros de excitação corrigidos por filtro interno e pela variação da potência da lâmpada (Fig. 4.1), a partir dos espectros da Fig. 4.11 B.

Esta correção é confiável em comprimentos de onda maiores do que a 275 nm, já que a partir daí a absorbância não é muito grande e potência da

lâmpada não é muito baixa. Na região abaixo de 275 nm a correção não é garantida. Observa-se um pico em 256 - 258 nm em todos os espectros de excitação, causado pela correção de filtro interno. Nesta região os espectros originais (Fig. 5.11 B) não mostraram pico algum.

Outra precaução que devemos ter nos espectros de excitação (Fig. 5.12) é verificar a posição do pico de espalhamento Raman da água (banda principal “stretching” em $3,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Assim, a relação entre os comprimentos de onda da luz incidente λ_{exc} e espalhada inelasticamente λ_R é dada por:

$$1/\lambda_R = 1/\lambda_{exc} - 3.4 \times 10^{-4} \quad (\text{para } \lambda_R \text{ e } \lambda_{exc} \text{ em nm})$$

No espectro de emissão da amostra não irradiada (Fig. 5.11 A) observa-se que, para excitação em 310 nm, o Raman aparece em 346 nm. Picos Raman em 445, 370 e 355 nm corresponderiam a excitações em 386, 329 e 317 nm, respectivamente. Observando os espectros de excitação da Fig. 5.12, nota-se apenas o pico Raman em 317 nm (na curva de emissão em 355 nm). Para a curva de emissão em 370 nm o pico Raman aparece superposto a um pico de excitação da própria amostra.

Tendo em conta essas observações no processo de correção dos espectros de excitação, podemos garantir que a espécie em 445 nm tem pico excitação em 306 nm e corresponde a CPZ e PZ. Os picos de emissão em 355 e 370 nm têm ambos, excitação em 298 e em 332 nm. No entanto, os espectros não são iguais para as emissões em 355 e 370 nm, não se podendo garantir que correspondam à mesma espécie.

A Fig. 5.13 apresenta as evoluções temporais da intensidade de fluorescência de CPZ em ambiente anaeróbico em (A) 355, (B) 370 e (C) 445 nm. Notamos que a emissão da espécie de pico triplo aumenta muito com o aumento de acidez do meio (Fig. 5.13 A e B). A presença de O_2 suprime seu crescimento (Fig. 5.8, 5.9). Na Fig. 5.13 C observa-se que a taxa de crescimento da espécie (PZ), que emite em 445 nm com maior rendimento quântico devido à saída do cloro, também é maior em meio mais ácido, mas parece saturar em doses menores de irradiação.

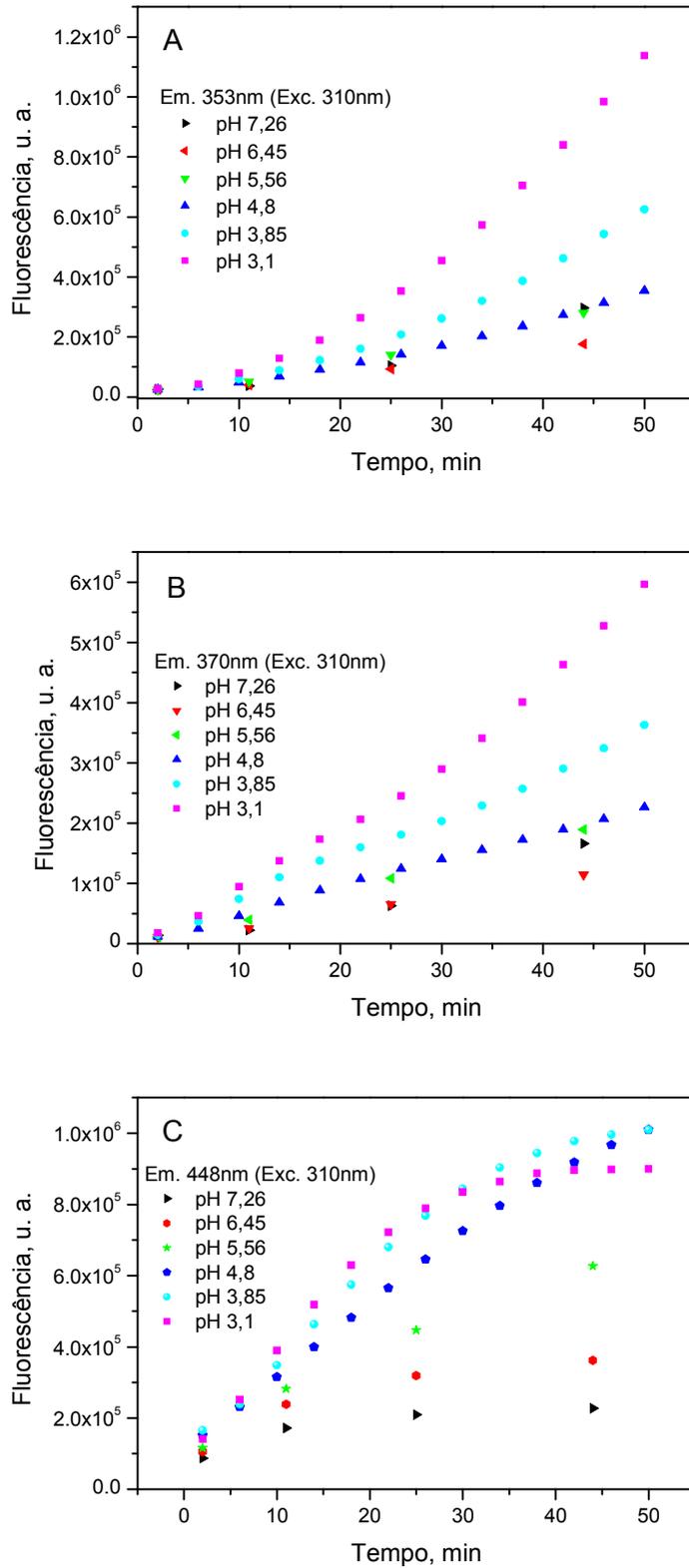


Figura 5.13. Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação em ambiente anaeróbico em diferentes valores de pH. A excitação foi em 310nm, o tampão citrato-fosfato (cubeta 3 ml). Emissão em (A) 355 nm; (B) 370 nm; (C) 445 nm.

Fluorescência resolvida no tempo

Foram realizadas medidas de fluorescência resolvida no tempo para emissão em 450 nm e em 378 nm. Os resultados aparecem na Fig. 5.14. Antes de analisar os tempos de vida associados a esses decaimentos, devemos notar que tempos de vida da CPZ e PZ, para emissão em 452 nm, foram medidos por outros autores (Garcia et al., 2005; Buettner et al, 1989). Os tempos de vida observados para a PZ em tampão fosfato encontraram-se entre 1,7 e 2,1 ns e para a CPZ e outros derivados de 2-cloro ficaram entre 0,35 e 0,50 ns. Atribuiu-se o pequeno valor do tempo de vida da CPZ à presença do Cl, que aumenta o acoplamento spin - órbita nos processos de cruzamento intersistema.

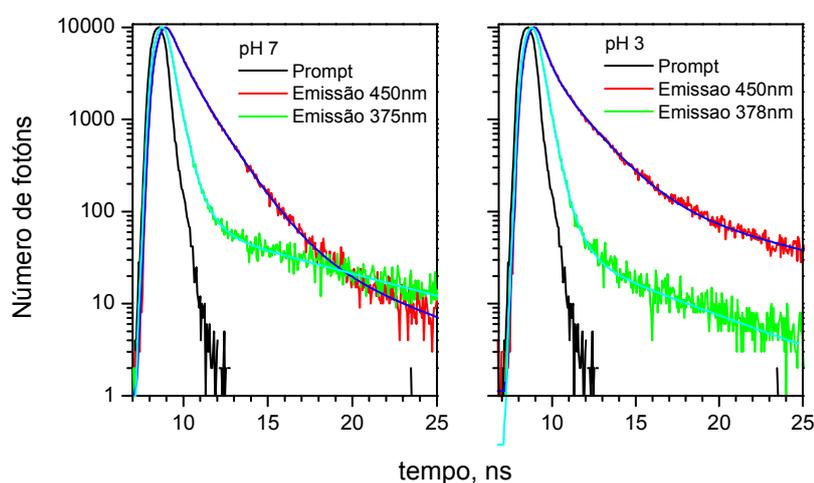


Figura 5.14. Curvas de decaimento da fluorescência de CPZ (20 μ M) irradiada em 310 nm. O tampão utilizado foi fosfato-citrato, pH 7 e pH 3. A curva preta (prompt) corresponde ao LED de excitação (330 nm).

As curvas de decaimento para emissão em 450 nm foram ajustadas com três exponenciais. A Tabela 5.1 apresenta os tempos de vida e suas respectivas contribuições fracionárias (f_1 , f_2 e f_3 , Eq. 3.9). Observa-se que tanto em pH 3,0 quanto em pH 7,0, em 450 nm há contribuição importante de espécie com tempo de vida $\sim 0,4$ ns, provavelmente CPZ intacta, e de espécie com tempo de vida $\sim 1,4$ a 1,7 ns, provavelmente devido a PZ, (de acordo com o tempo de vida da PZ e com os espectros de massa dos fotoprodutos da CPZ). Há ainda contribuição pequena de um tempo de vida mais longo (8,3 ns em pH 3,0 ou 4,4 ns em pH 7,0).

Tabela 5. 1 Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos da Fig. 5.14, para amostra aeróbica de CPZ (20 μ M) irradiada em 310 nm (excitação 330 nm; emissão 450 nm ou 378 nm).

pH	$\lambda_{em}(nm)$	$\tau_1(ns)$	$f_1\%$	$\tau_2(ns)$	$f_2\%$	$\tau_3(ns)$	$f_3\%$	χ^2
3.0	450	0,37	39	1,7	50	8,3	11	1,19
7.0		0,43	26	1,4	68	4,4	6	1,17
3.0	378	0,30	97			4,9	3	1,10
7.0		0,30	94			8,4	6	1,02

Já as curvas de decaimento para emissão em 378 nm foram ajustadas com duas exponenciais. A Tabela 5.1 também mostra os tempos de vida e suas respectivas contribuições relativas (f_1 e f_3) para essa emissão. O tempo de vida longo tem contribuição bem menor. Observa-se que o tempo de vida curto (0,3 ns), dos fotoprodutos com fluorescência em ~ 375 nm, é um pouco menor do que os de CPZ intacta e tem contribuição de mais de 90% tanto em pH 3,0 como em pH 7,0. Nesse comprimento de onda não aparece contribuição de tempos característicos de PZ.

Fizemos também medidas de tempo de vida com emissão em 450 nm para a faixa de concentrações de 5 – 80 μ M de CPZ sem prévia iluminação. Foram preparadas, para isso, cinco amostras de diferentes concentrações.

Tabela 5. 2. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos de fluorescência (não mostrados) de amostras aeróbicas de CPZ em TRIS 50 mM a pH 7,0 sem irradiar (excitação 330 nm; emissão 450 nm).

μ M	$\tau_1(ns)$	$f_1\%$	$\tau_2(ns)$	$f_2\%$	$\tau_3(ns)$	$f_3\%$	χ^2
5	0,44	63	1,9	23	8,2	14	1,19
10	0,39	66	1,7	23	8,2	11	1,31
20	0,41	77	1,7	16	8,2	7	1,18
40	0,40	76	1,6	20	8,2	4	1,23
80	0,39	75	1,5	23	8,2	2	1,20

A Tabela 5.2 apresenta os tempos de vida e suas respectivas contribuições relativas (amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3). Observamos a CPZ intacta ($\sim 0,4$ ns) como a espécie predominante nas soluções e seu fotoproducto PZ ($\sim 1,5$ a $1,9$ ns). Existe também a contribuição de uma componente de tempo de vida longo ($8,2$ ns) cuja contribuição tende a diminuir conforme aumentamos a concentração. Este tempo de vida pode estar associado a alguma impureza, pois nota-se que sua contribuição é maior quando a concentração de CPZ é mais baixa e o tempo de aquisição é grande.

Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)

Fluorescência estacionária

A Fig. 5.15 mostra as mudanças nos espectros de fluorescência da FPZ (A e B) e TFP (C e D) por efeito da irradiação (310 nm) em ambiente anaeróbico e aeróbico. Observa-se que o fotoproducto principal de ambas fluoresce em 410 nm e se forma muito mais em presença de oxigênio. A Fig. 5.16 apresenta os espectros de excitação do fotoproducto com emissão em 410 nm para as duas drogas. Esse espectro não foi corrigido pela intensidade da lâmpada nem pelo efeito de filtro interno e, portanto, está muito distorcido. No entanto, apresenta picos bem definidos em 276 , 304 e 352 nm, que são os picos de absorção do sulfóxido (Saldanha et al., 2002). Portanto, o fotoproducto formado é, muito provavelmente, a espécie sulfóxido.

Medidas do espectro de emissão da FPZ em diferentes valores de pH do meio (menores do que $7,0$) nos informam que o fotoproducto se desenvolve mais num meio ácido (espectros não mostrados).

O espectro de fluorescência da TFP (Fig. 5.15, C e D) muda de forma similar ao da FPZ indicando que ocorre o mesmo caminho de fotodegradação, formando os mesmos transientes.

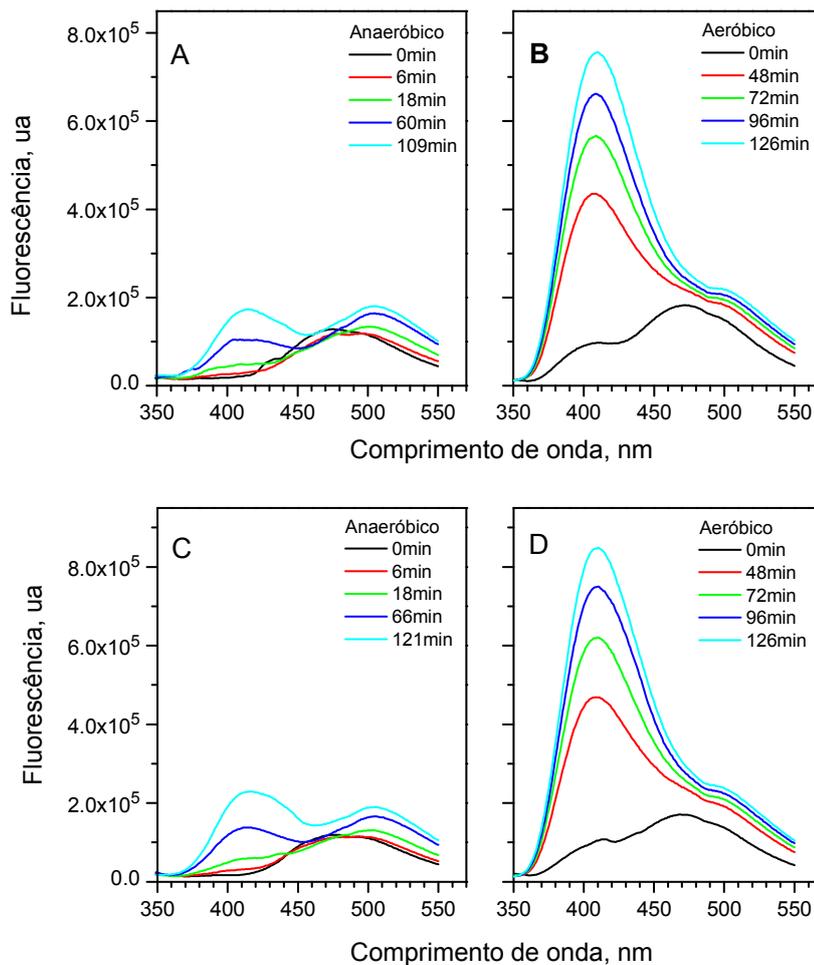


Figura 5.15. Espectros de fluorescência de (A, B) FPZ ($20 \mu\text{M}$) e (C, D) TFP ($20 \mu\text{M}$) irradiadas e excitadas em 310nm (0,23 mW) em condição anaeróbica (A, C) e aeróbica (B, D). Tampão fosfato pH 7,4 (cubeta 3 ml).

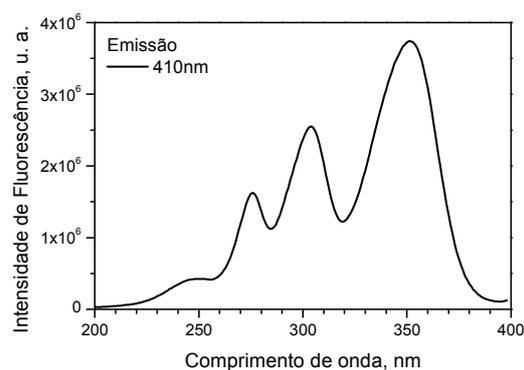


Figura 5.16. Espectro de excitação da FPZ ($20 \mu\text{M}$) irradiada 30 min em presença de O_2 . A irradiação foi feita em 310 nm (0.815 mW) e a emissão em 410 nm. O tampão utilizado foi fosfato pH 7.4, 20 mM em cubeta de 3 ml.

Fluorescência resolvida no tempo

As curvas de decaimento de fluorescência em pH 7 e pH 3 foram obtidas fixando-se a emissão em 505 ou 470 nm, para observar a FPZ intacta, e fixando-se a emissão em 410 nm para seu fotoproduto. Os decaimentos em 470 nm e 410 nm aparecem na Fig. 5.17.

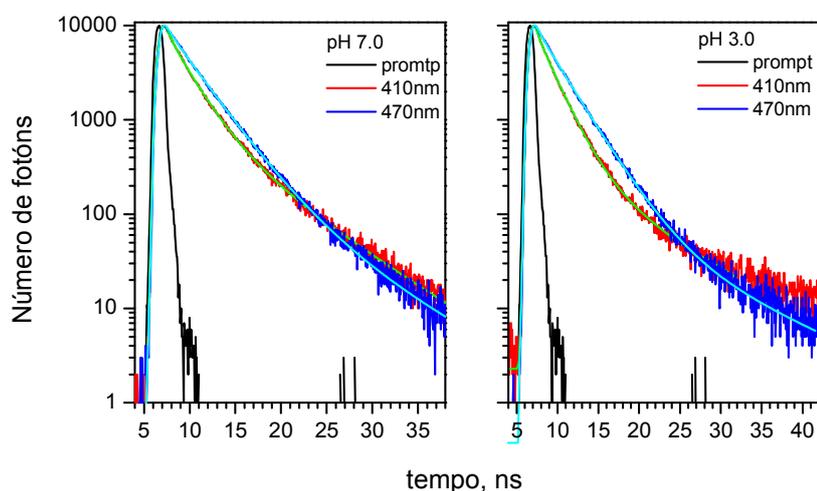


Figura 5.17. Curvas de decaimento de fluorescência da FPZ irradiada em 310nm em ambiente aeróbico. O tampão utilizado foi fosfato-citrato a pH 7 e pH 3. A curva mais estreita corresponde ao perfil da lâmpada (LED de 330 nm).

A análise das curvas de decaimento foi feita com um modelo de três exponenciais. Os tempos de vida e suas contribuições relativas (f_i) são apresentados na Tabela 5.3. Analisando a contribuição principal (f_1), encontramos que a FPZ intacta (emissão em 470 nm) tem um tempo de vida de 3,0 - 3,2 ns e que seu fotoproduto (em. em 410 nm) decai com tempo de vida de 2,1 - 2,4 ns.

Tabela 5.3 Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos da fluorescência, para amostra aeróbica de FPZ irradiada em 310nm (excitação 330 nm).

pH	$\lambda_{em}(nm)$	$\tau_1 (ns)$	$f_1 \%$	$\tau_2 (ns)$	$f_2 \%$	$\tau_3 (ns)$	$f_3 \%$	χ^2
3.0	505	3,0	91	8,1	5	0,2	4	1,16
3.0	470	3,0	91	10,3	4	0,5	5	1,15
3.0	410	2,1	76	7,5	13	0,2	11	1,21
7.0	505	3,2	90	7,2	7	0,2	3	1,17
7.0	470	3,1	87	7,3	9	0,5	4	1,10
7.0	410	2,4	68	6,6	23	0,5	9	1,03

De forma análoga ao procedimento com FPZ, as curvas de decaimento de fluorescência em pH 7 e pH 3 foram obtidas fixando-se a emissão em 505 ou 470 nm para observar a TFP e fixando-se a emissão em 410 nm para observar seu fotoproduto. Os decaimentos em 470 nm e 410 nm são apresentados na Fig. 5.18. A análise das curvas de decaimento também foi feita com o modelo de três exponenciais. Os tempos de vida e suas contribuições relativas (f_i) são apresentados na Tabela 5.4.

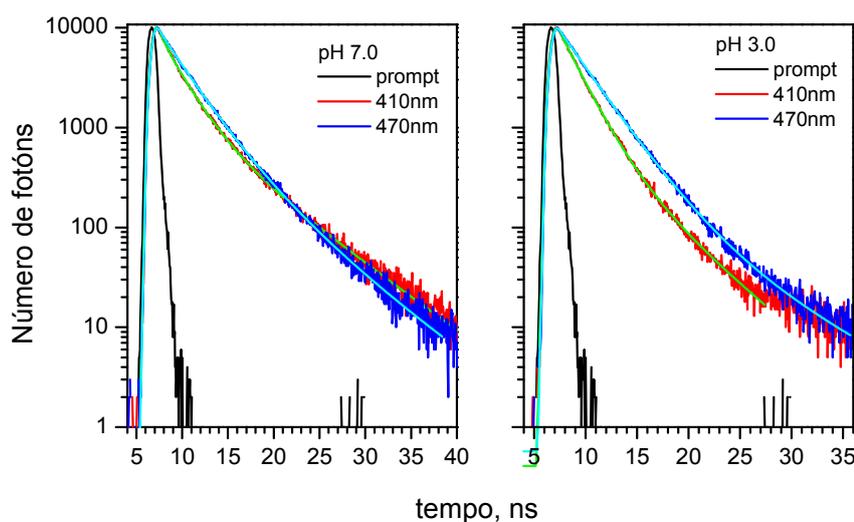


Figura 5.18. Curvas de decaimento da TFP irradiada em 310nm. O tampão utilizado foi fosfato-citrato a pH 7 e pH 3. A curva preta corresponde ao perfil da lâmpada (led de 330 nm).

Tabela 5.4. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos da fluorescência, para amostra aeróbica de TFP irradiada em 310nm (excitação 330 nm).

pH	λ_e (nm)	τ_1 (ns)	f_1 %	τ_2 (ns)	f_2 %	τ_3 (ns)	f_3 %	χ^2
3,0	505	3,0	88	7,1	5	0,04	7	1,04
3,0	470	2,9	88	7,1	8	0,2	4	1,14
3,0	410	1,9	77	4,9	18	0,2	5	1,03
7,0	505	3,1	74	5,3	18	0,04	8	1,16
7,0	470	2,9	74	6,0	22	0,2	4	1,08
7,0	410	2,3	62	6,3	31	0,4	7	1,17

Tem-se como resultado um tempo de vida para a TFP intacta entre 2.9-3.1 ns. Seu fotoproduto principal, que emite em 410 nm, decai com tempos entre 1.9-2.3 ns. Observamos também a contribuição de componentes com tempos de vida longos de 5,0-7,1 ns para pH 3,0 e de 5,3-6,3 ns para pH 7,0, que, como no caso da FPZ.

5.2.3.

Espectrometria de massa das fenotiazinas irradiadas.

Foram realizadas medidas de espectrometria de massa por dessorção a laser (LDI) em fenotiazinas nativas e fotodegradadas. Foram feitas medidas de amostras concentradas de fenotiazinas diluídas em etanol e depositadas diretamente no porta-amostra. Nesse caso a possível fotodegradação é causada em ambiente anaeróbico pelo feixe do laser (337 nm). Foram também utilizadas amostras em solução aquosa (40 μ M em tampão fosfato pH 7.4) tanto não iluminadas quanto previamente fotodegradadas com lâmpada de xenônio do espectrofluorímetro em condições aeróbicas. As amostras fotodegradadas foram iluminadas durante 45 min com luz ultravioleta (310 nm) (1,45 mW).

Nos espectros de massa, a região de menor massa é geralmente dominada por íons atômicos, íons de fragmentos não específicos e íons da substância na qual se deposita ou se dilui a amostra. Em geral, omite-se essa região. Na região de maior massa o espectro nos fornece íons de fragmentos e moléculas com informação estrutural.

Clorpromazina

As Figs. 5.19 e 5.20 apresentam os espectros de massa da amostra de CPZ depositada diretamente no porta-amostra a partir da solução em etanol. A Fig. 5.19 mostra o espectro completo de cátions, onde são observados picos em massas tanto menores como maiores do que a de CPZ⁺ (318 Da).

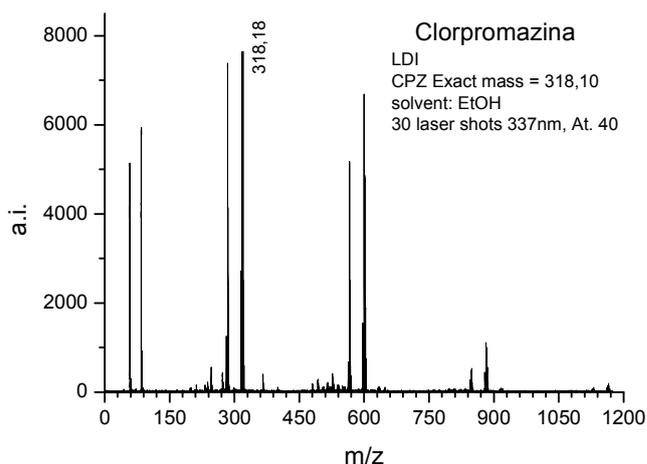


Figura 5.19. Espectrometria de massa da CPZ na faixa de 0 - 1200 Da. A CPZ não foi previamente diluída em PB nem irradiada pelo espectrofluorímetro.

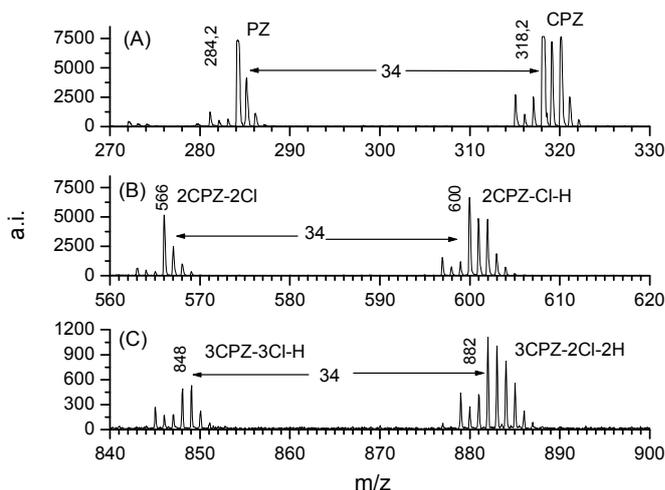


Figura 5.20. Espectrometria de massa da CPZ na faixa de 270 – 900 Da. A CPZ não foi previamente diluída em PB nem irradiada pelo espectrofluorímetro.

A faixa de 270-330 Da (Fig. 5.20 A) mostra o pico de CPZ^+ e de seu fotoproduto PZ^+ (284 Da). Na região de maiores massas são observados cátions de dímeros (Fig. 5.20 B) e trímeros (Fig. 5.20 C). O cloro tem dois isótopos com massas de 35 e 37 cujas abundâncias são de 75,8 e 24,2 %, respectivamente. É fácil, portanto, identificar a presença e a perda de átomos de Cl num espectro de massa. As atribuições dos picos da Fig. 5.20 foram feitas com base na presença ou ausência desses isótopos. Observa-se que os dímeros e trímeros se formam pela saída do cloro de pelo menos uma das moléculas de CPZ. Este resultado foi observado por Motten et al. (1985), que comentaram que o radical promazinil

pode reagir com outro radical promazinil ou com a CPZ para formar dímeros e polímeros maiores, e que esses fotoprodutos são observados principalmente em soluções mais concentradas.

A Fig. 5.21 mostra uma comparação entre os espectros de massa de cátions da CPZ obtidos a partir de amostra em tampão fosfato pH 7,4 sem prévia irradiação (A) e irradiada em ambiente aeróbico (B). As intensidades dos picos foram menores que na Fig. 5.19, devido à menor concentração de CPZ. Não foram detectadas massas moleculares na região de dímeros e polímeros, possivelmente a concentração utilizada não foi suficiente para formá-los. Na faixa de 260 – 340 Da (Fig. 5.22 A) amostra não irradiada, também são observados os picos relativos à CPZ^+ e PZ^+ . Esses picos quase desaparecem na amostra irradiada (Fig. 5.22 B). O espectro dessa última mostra um pico em 300,3 Da, que pode pertencer tanto a $PZOH^+$ como a $PZSO^+$, cujas fórmulas estruturais são mostradas na Fig. 5.23. Apareceu também um pico em 268,3 Da, que não se conseguiu identificar.

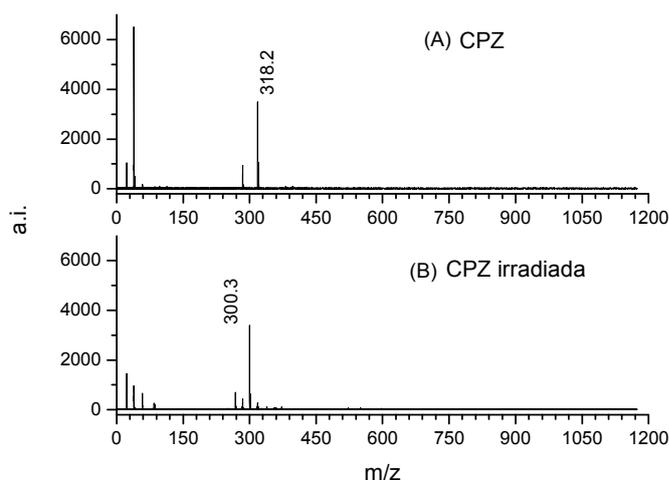


Figura 5.21. Espectro de massa de cátions da CPZ na faixa de 0 - 1200 Da. A CPZ foi previamente diluída em tampão fosfato (pH 7.4) em ambiente aeróbico. (A) CPZ não irradiada e (B) CPZ previamente irradiada no espectrofluorímetro em 310 nm.

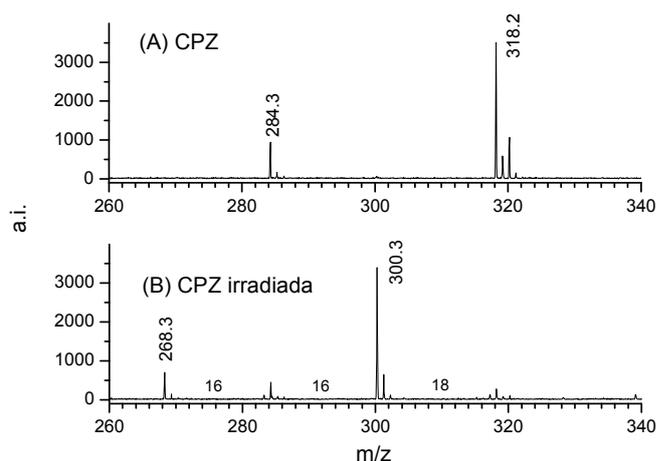


Figura 5.22. Faixa de 260 – 340 Da dos espectros de massa completos da Fig. 5.19. (A) CPZ não irradiada e (B) CPZ previamente irradiada.

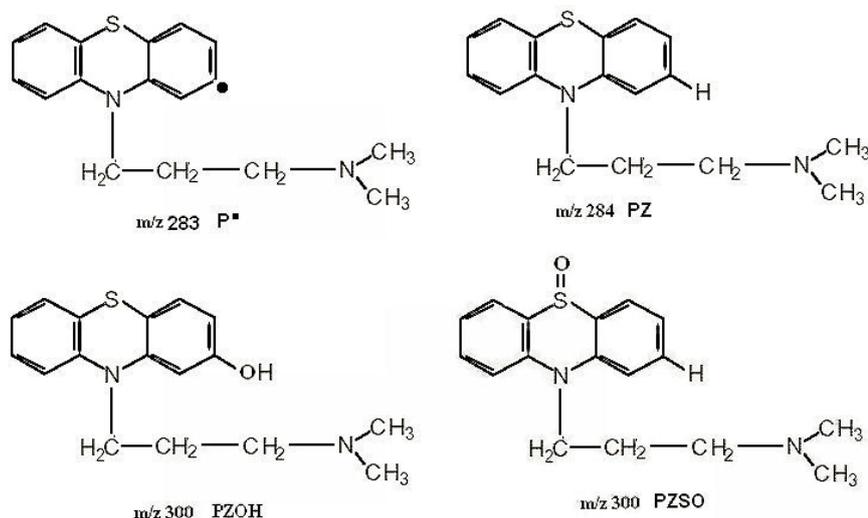


Figura 5.23. Estrutura química do radical neutro promazinil (PZ•), promazina (PZH), promazina hidroxilado (PZOH) e da promazina sulfóxido (PZSO).

Kochevar et al. (1983) acharam que, na ausência de oxigênio, a irradiação da CPZ em solução aquosa produz PZ, PZOH, produtos diméricos e poliméricos. Sugeriram que o estado excitado tripleto T_1 da CPZ produz o radical neutro PZ• e um átomo de cloro $Cl^•$, via fissão homolítica (decloração da CPZ). Essa espécie instável, PZ•, reagiria com a água para formar a PZ e PZOH (Buettner G. R, et al., 1986). Motten A. et al.(1985), irradiando em 330 nm, também concluíram que o cloro sai da CPZ para formar o radical PZ•, que seria capaz de pegar um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila do solvente para formar PZ e PZOH. Existe também

a possibilidade de que o radical PZ^* possa reagir com o oxigênio molecular para transformar-se num intermediário peroxi e formar a PZOH.

De nossos resultados de espectrometria de massa parece que a PZ, PZOH e PZSO são os possíveis fotoprodutos, formados em solução aquosa. Parece que a dechlorinação da CPZ é necessária tanto para a formação dos fotoprodutos (Fig. 5.22) como para a formação dos dímeros e trímeros (Fig. 5.20). Disto pode-se afirmar que a dechlorinação é um dos caminhos predominantes de fotodegradação da CPZ.

Segundo Van Den Broeke et al. (1994), irradiando CPZ com UVA-B em PBS (0,1 M, pH 7,4), produz-se a PZOH (65-90%) em maior quantidade que a PZ (5-7%) e que CPZSO (0-2%) e que PZOH sofre fotodecomposição. De fato, a CPZSO (334 Da) não foi observada em nossos espectros de massa e a massa molecular de 268 Da (Fig. 5.22 B) poderia ser uma consequência da fotodecomposição da PZOH. Já os espectros de excitação de fluorescência (Fig. 5.8) sugerem que o fotoproduto fluorescente produzido em maior quantidade que os outros fotoprodutos é PZSO e não PZOH, como sugerido em (Van Den Broeke et al., 1994).

Flufenazina

A Fig. 5.24 mostra o espectro de massa de flufenazina, obtido por LDI com amostra previamente diluída em etanol, sem prévia iluminação. A Fig. 5.24 A, apresenta o espectro completo, mostrando o pico relativo da FPZ^+ , em 437,12 Da. Ao contrário do ocorrido com CPZ, não foram detectadas massas moleculares maiores, referidas a dímeros ou polímeros (Fig. 5.24 B). Isso sugere que a quebra da ligação com cloro na posição 2 é importante para a formação de polímeros. São formados produtos de menores massas moleculares, causados pelo laser do espectrômetro de massa. Um desses picos (421,3 Da) parece estar relacionado com a saída de um oxigênio na FPZ. Não aparecem fragmentos associados à perda de CF_3 (69 Da), o que explica a ausência de dímeros ou trímeros.

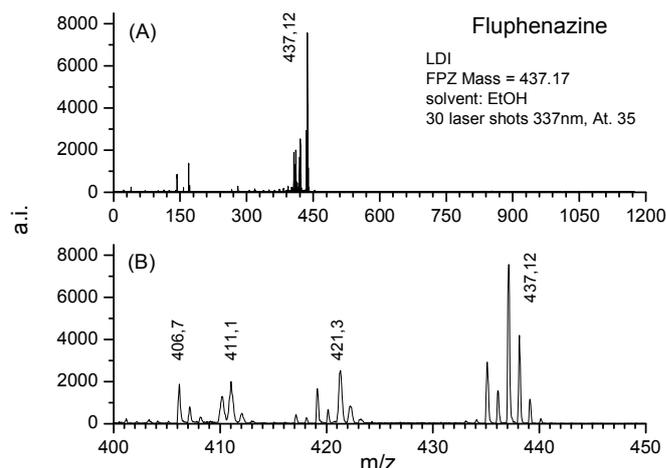


Figura 5.24. Espectrometria de massa FPZ na faixa de 0 - 1200 Da. A FPZ foi previamente diluída em etanol e não foi previamente irradiada.

A Fig. 5.25 mostra os espectros completos de massa da FPZ em tampão fosfato, antes (A) e depois de uma prévia irradiação em condições aeróbicas (B). Aqui também não foram detectados picos relativos a dímeros e polímeros. Na faixa de 380 - 450 Da (Fig. 5.26) a amostra previamente irradiada apresenta mais fotoprodutos com massas moleculares menores (382.3 Da e 387.3 Da). Não apareceu pico algum que indicaria a adição de um átomo de oxigênio, mas apareceu um pico extra em 413.2 Da.

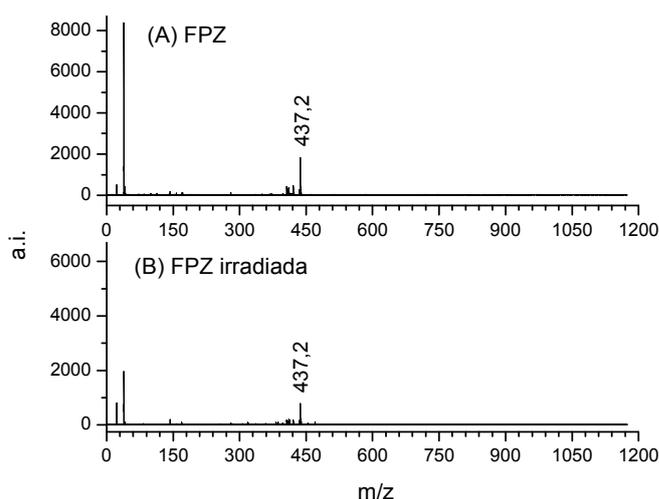


Figura 5.25. Espectros de massa da FPZ na faixa de 0 - 1200 Da. As amostras aeróbicas foram de 40 μ M de FPZ em PB a pH 7. A seção (A) é a FPZ não irradiada e a (B) a FPZ irradiada pelo espectrofluorímetro em 310nm.

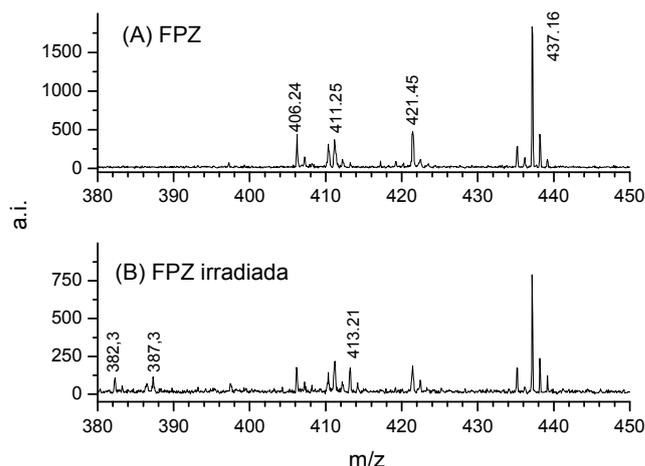


Figura 5.26. Faixa de 380 – 450 Da dos espectros de massa completos da Fig. 5.24. (A) FPZ não irradiada e (B) FPZ irradiada em ambiente aeróbico.

É importante notar que Miolo G. et al. (2006), depois de irradiarem flufenazina (10^{-2} M) com luz de 365 nm em metanol-água (1:1), encontraram dois fotoprodutos principais. Um dos fotoprodutos, com massa molecular de 413,2 Da, apresentou um deslocamento para o vermelho de 3 nm no maior pico de absorção, assim como um novo pico em 233 nm. Utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear (NMR) concluíram que o grupo $-CF_3$ é substituído pelo $-COOH$ (Fig. 5.27), que estaria associado ao pico de 413,2 Da.

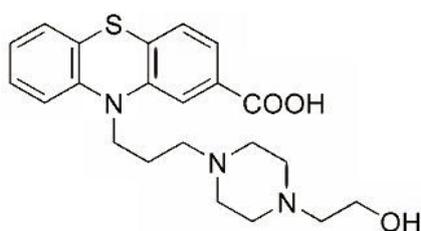


Figura 5.27. Estrutura química do fotoproduto da FPZ de peso molecular 413 Da.

Trifluoperazina

A Fig. 5.28 mostra o espectro de massa da TFP previamente diluída em etanol, sem previa iluminação. O espectro A, completo, mostra o pico relativo à TFP^+ em 407,2 Da. Mostra também que a irradiação do laser provoca a formação de menos fragmentos do que na FPZ e na CPZ. Ao contrário da FPZ, só apareceu um pico de massa molecular menor que a TFP (B).

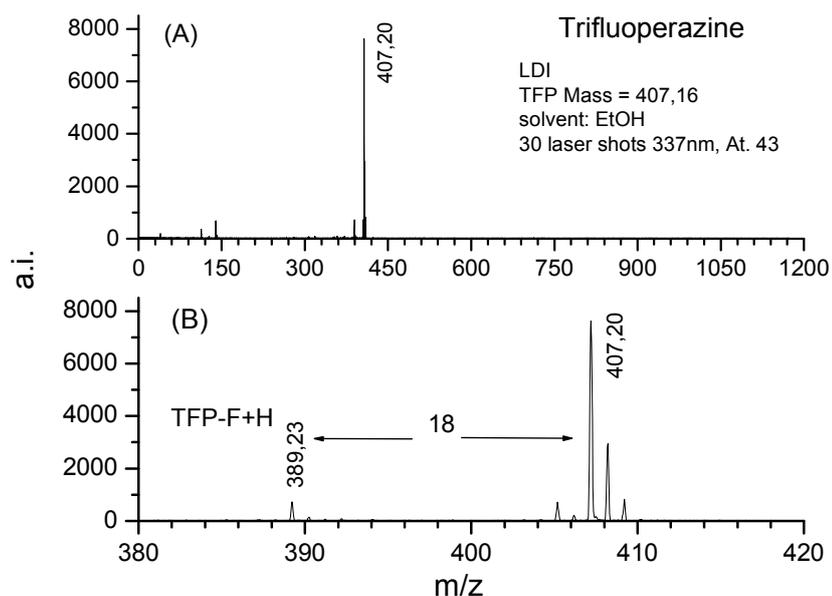


Figura 5.28. (A) espectrometria de massa TFP na faixa de 0 - 1200 Da. (B) faixa de 380 - 420 Da. A TFP foi previamente diluída em etanol e não foi previamente irradiada.

A Fig. 5.29 mostra os espectros completo de massa da TFP em tampão PB, antes (A) e depois da irradiação em condições aeróbicas (B). A amostra irradiada apresentou espectro de massa bastante diferente da não irradiada, ao contrário do que se obteve para a FPZ. Observamos também que não se formaram dímeros ou polímeros, mas se formam produtos com massas maiores que a TFP.

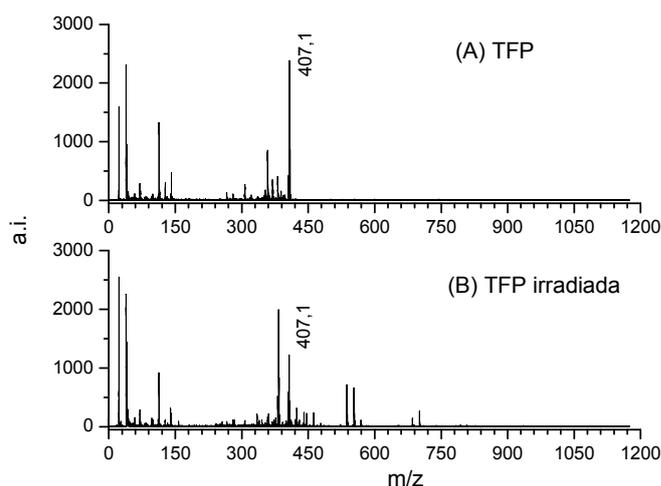


Figura 5.29. Espectros de massa da TFP na faixa de 0 - 1200 Da. (A) TFP não irradiada e (B) a TFP irradiada pelo espectrofluorímetro em 310nm. As amostras aeróbicas foram de 40 μ M de TFP em PB a pH 7.

A Fig. 5.30 mostra com mais detalhe algumas regiões. A Fig. 5.30 C mostra que, depois da irradiação, aparecem dois picos que indicam a adição de oxigênio à TFP: o pico em 424 Da seria a adição de um OH (17 Da), ou de um oxigênio e um hidrogênio em posições diferentes da molécula, e o pico em 440 Da à adição de mais um átomo de oxigênio. Os outros picos de massas maiores possivelmente consistem da agregação de fragmentos pequenos com a TFP. Com relação à menor massa molecular 383 Da, parece também que seu grupo trifluorometil sofre substituição por COOH, em quantidades maiores do que FPZ.

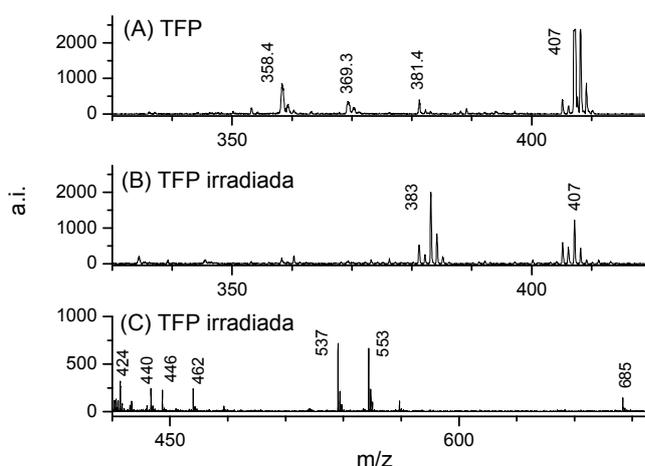


Figura 5.30. Espectros de massa da TFP sem irradiar na faixa de 330 – 420 Da (A) e irradiada na faixa de 320 – 700 Da (B e C).

Os fotoprodutos de TFP formados principalmente pela irradiação do laser na câmara de vácuo do espectrômetro de massa, segundo a Fig. 5.28 (ambiente anaeróbico), foram diferentes dos fotoprodutos criados por prévia irradiação aeróbica em tampão fosfato mostrada na Fig. 5.29 B (condição aeróbica).

5.2.4. Discussão sobre a fotodegradação de fenotiazinas

Neste trabalho observamos que as propriedades de absorção e fluorescência das fenotiazinas são dependentes do tipo de substituinte ou grupo radical localizado na posição 2 no heterocíclico (Fig. 5.31). Por outro lado, dependem pouco do substituinte na posição 10, como mostra a similaridade na absorção e emissão observada em TFP e FPZ intactas.

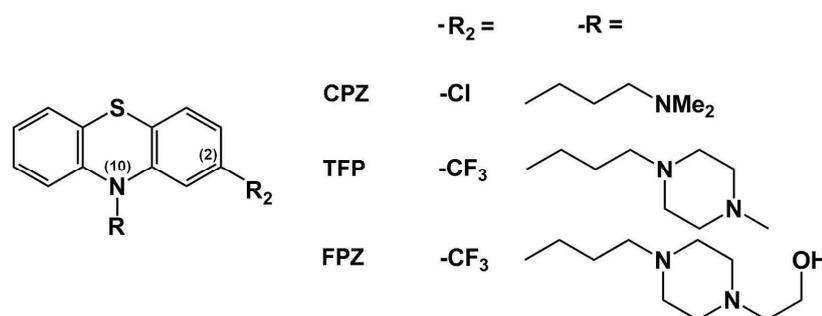


Figura 5.31. Estrutura química da CPZ, TFP e FPZ intactas.

As três fenotiazinas utilizadas neste trabalho fotodegradam tanto em ambiente anaeróbico como aeróbico. Os espectros de absorção tomados a diferentes tempos de irradiação das fenotiazinas sugerem que a fenotiazina 5-SO é uma das espécies formadas (Iwaoka T. et al., 1974; Rodrigues et al., 2006, Joshi R. et al., 2008). Os espectros de excitação dos fotoprodutos complementaram os resultados de absorção, mostrando que a espécie fluorescente possui picos de excitação nas mesmas posições que as espécies sulfóxidas (Fig. 5.9 e 5.16).

Nas três fenotiazinas, os espectros de emissão medidos a diferentes tempos de iluminação mostraram a formação de fotoprodutos fluorescentes com deslocamento Stokes bem menores do que os das fenotiazinas intactas.

Os produtos fluorescentes de TFP e FPZ desenvolvidos em presença de oxigênio foram identificados como as espécies sulfóxidas, com único pico de emissão em 410nm. Para CPZ, a espécie sulfóxida só aparece em pH ácido em presença de O_2 (Fig. 5.10). Em pH neutro e ácido, por outro lado, desenvolve-se em ambiente anaeróbico um fotoproduto com espectro de fluorescência ainda não descrito na literatura (Fig. 5.8 A, 11 e 13 A-B). Esta espécie fluorescente de triplo pico de emissão não pode ser uma espécie hidroxilada da CPZ já que se desenvolve em maior quantidade em meio ácido.

Medidas de fluorescência da CPZ sob irradiação em condições anaeróbicas mostraram que a PZ (com pico em 450 nm) fica estável em ausência de O_2 em pH neutro e ácido (Fig. 5.13 C). Por outro lado, a espécie de pico triplo continua incrementando sua intensidade. Isto nos quer dizer que esta última espécie não pode ser originada de PZ. Também se viu que esta espécie depende do pH, desenvolvendo-se em maior quantidade em meio ácido.

Medidas de tempo de vida das fenotiazinas em meio ácido (pH 3.0) e neutro (pH 7.0), mostraram tempos de vida maiores para derivados de 2- CF_3 de

fenotiazinas, TFP e FPZ, do que para o derivado 2-Cl, CPZ. O pequeno tempo de vida da CPZ (0,37-0,43 ns) é causado pela presença do cloro, que ocasiona outros caminhos de desativação da fluorescência. O tempo de vida da PZ (fotoproduto da CPZ) entre 1,37-1,71 ns, muito maior que o de CPZ, é atribuído à saída do cloro na CPZ. O fotoproduto fluorescente da CPZ (emissão em 378 nm na Tabela 5.1) parece ainda conter o cloro em sua estrutura, já que seu tempo de vida é muito curto e parecido ao da CPZ (0,3 ns).

A FPZ e TFP intactas, com tempos de vida parecidos (~ 3 ns), apresentaram fotoprodutos fluorescentes com tempo de vida menores (~ 2 ns) (Tabelas 5.3 e 5.4). Componentes com tempos de vida mais longos também foram observados em pequenas proporções nas três fenotiazinas irradiadas.

Karpinska et al. (1996) notaram que o substituinte na posição 10 do anel fenotiazínico não tem influência na fluorescência destes derivados, ao contrário do substituinte na posição 2. De fato, TFP e FPZ, que possuem o mesmo substituinte na posição 2, -CF₃, mostraram os mesmos resultados de fluorescência estacionária e resolvida no tempo, tanto na forma intacta quanto em relação aos fotoprodutos. Já a CPZ, com substituinte diferente na posição 2, Cl, apresentou comportamento bem diferente.

Medidas de espectrometria de massa por dessorção a laser (LDI) foram feitas com fenotiazinas não previamente irradiadas e também fotodegradadas em solução aquosa a pH 7,4. Para amostras sem previa irradiação, mais concentradas e depositadas no porta-amostras a partir de uma solução em etanol, encontrou-se que somente a CPZ forma dímeros (Fig. 5.20 B) e trímeros (5.20 C), com perda do Cl na posição 2 do anel. Isso indica que em TFP e FPZ o grupo CF₃ não sofre fotólise. Já para amostras previamente fotodegradadas, irradiando-se soluções aquosas da ordem de 40 µM, os resultados de espectrometria de massa mostraram a ausência de dímeros ou polímeros maiores também para CPZ, (Fig. 5.19), provavelmente pela pequena concentração.

A PZ (284,3 Da) é um fotoproduto conhecido da CPZ e está presente em todos os resultados de espectrometria de massa da CPZ (Fig. 5.20 A e 5.22). Para formar esta espécie é preciso que o átomo de cloro saia da CPZ, formando o radical PZ[•], que em ambiente aquoso pode reagir com um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila para formar a PZ ou PZOH (300 Da). Também se observou que a saída do cloro traz como consequência a formação de dímeros e trímeros de CPZ

(Fig. 5.20). A dechlorinação parece ser um dos principais caminhos para a fotodegradação da CPZ (Buettner et al., 1986; Motten et al., 1985).

A massa molecular de 300 Da na Fig. 5.22, formada pela irradiação em ambiente aeróbico pode estar associada a PZSO ou a PZOH (Fig. 5.23). A ausência do pico de massa 300 Da no espectro de massa obtido sem prévia irradiação, em ambiente anaeróbico (Fig. 5.20), seria devido à ausência de O₂ ou de água durante a irradiação com o laser.

Iwaoka T. et al. (1974), irradiando a CPZ em água ou etanol em condições aeróbicas e anaeróbicas (pH 4.7), sugeriram que o oxigênio molecular é indispensável tanto para formação do radical cátion da CPZ (CPZ^{•+}) como para a formação da CPZSO, e que o átomo de oxigênio no sulfóxido se origina do oxigênio atmosférico e não da água. Nossos resultados também mostraram que a espécie sulfóxida encontrada para a CPZ (Fig. 5.10) somente se desenvolve em meio ácido em presença de O₂. No entanto, o crescimento do fotoproduto de triplo pico de emissão é favorecido em ausência de O₂, em presença de água (em etanol não cresce) e em meio ácido.

A FPZ e TFP mostraram resultados distintos nas medidas de espectrometria de massa, apesar de resultados de fluorescência similares. Em amostras previamente irradiadas, os espectros de massa da TFP mostraram picos de massa de pouca intensidade que indicam a adição de átomos de oxigênio (Fig. 5.30). Isso não foi observado nos espectros da FPZ. Os espectros de excitação similares em ambas as fenotiazinas (Fig. 5.13) mostram picos similares aos das espécies sulfóxidas encontrados na literatura (Mellinger et al., 1963; Ragland et al., 1964). Com esses resultados podemos concluir que as espécies sulfóxidas de TFP e FPZ são as espécies fluorescentes criadas em nosso trabalho. Também observamos que os fotoprodutos de TFP e FPZ (Fig. 5.12 e 5.15) são similares (emissão em 410 nm), mas possuem características de fluorescência bem diferentes das do fotoproduto de CPZ (emissão 340 nm, 352 nm e 372 nm). Seus crescimentos dependem da presença de O₂ de maneira inversa.

5.3.

Fenotiazinas como sensor óptico de oxigênio e de radiação ultravioleta baseado na fotodegradação

A radiação ultravioleta (UV) é uma pequena parte da radiação solar (10 %). Algumas regiões da radiação UV recebem denominação especial: UVA para 320 - 400nm (é quase toda absorvida pelo ozônio), UVB para 280 - 320nm (boa parte é absorvida pelo ozônio) e UVC para 200 - 280nm (não é absorvida pelo ozônio).

A radiação UV é não ionizante, excita os elétrons de uma molécula ou átomo para um nível energético superior, deixando-os em estado ativado (excitado). A radiação UV interage com muitas moléculas biológicas como o DNA (ácido desoxirribonucléico), que absorve no UVC e parte de UVB provocando quebras em suas cadeias e com isso alterações genéticas. A interação com a radiação UV também é benéfica e mesmo essencial à sobrevivência, como na síntese da vitamina D. Esta molécula ajuda na absorção do cálcio e do fosfato pelo aparelho digestivo e, portanto, contribui para o crescimento normal e para o desenvolvimento do esqueleto.

O ar é uma mistura gasosa constituída por 21% de O₂. O oxigênio além de ser um gás de muita importância para os seres vivos, também está envolvido em muitas reações bioquímicas seja como um reagente ou produto.

Um sensor é um dispositivo capaz de detectar algo através da medida de alguma grandeza física associada à sua presença. Os sensores óticos e eletroquímicos formam dois grandes grupos entre a imensa variedade de sensores existentes no mercado. Os sensores óticos são principalmente baseados na detecção de mudanças na absorbância, refletância, fluorescência, quimioluminescência, polarização de luz, etc. (Woflbeis, 1993)

Na atualidade, sensores óticos baseados na fluorescência são os mais desenvolvidos, já que a espectroscopia de fluorescência é uma técnica de alta sensibilidade, especificidade e versatilidade comparada com a espectroscopia de absorção. A fluorescência é uma técnica inerentemente mais seletiva que a absorção porque se podem medir pelo menos cinco variáveis independentes que caracterizam uma componente fluorescente numa amostra: a intensidade de emissão como função do comprimento de excitação (espectro de excitação), a intensidade de excitação como função do comprimento de emissão (espectro de emissão), o rendimento quântico, o tempo de vida do estado excitado e a

polarização da emissão. Os princípios de operação dos sensores óticos são muitas vezes baseados na supressão da intensidade de fluorescência de uma molécula conhecida. Na supressão dinâmica e estática, a intensidade de fluorescência medida está relacionada com a concentração do supressor; como exemplo, menciona-se o oxigênio que é um conhecido supressor colisional de fluoróforos (supressão dinâmica).

Nesta seção proporemos outro método de detecção da radiação UV ou da concentração de oxigênio, que sirva de base para construir sensores de UV ou de oxigênio. O princípio é baseado no fenômeno da fotodegradação das fenotiazinas trifluoperazina (TFP) e flufenazina (FPZ) estudado nas seções anteriores. Estas drogas fotodegradam-se num fotoproduto fluorescente estável em presença de oxigênio. A intensidade de fluorescência do fotoproduto, espécie sulfóxida, é dependente da concentração de oxigênio molecular presente no ambiente e das doses de irradiação UVB. Descrevemos, a seguir, os procedimentos realizados com TFP para obter a dependência da fluorescência do fotoproduto com a dose de irradiação UV e com a concentração de oxigênio. Os resultados com FPZ são semelhantes.

5.3.1. Arranjo experimental

Para determinar o aumento de fluorescência sob irradiação, devido à produção de TFPSO, como função da concentração de oxigênio, nós preparamos soluções de TFP sob atmosfera controlada. Em presença de oxigênio molecular dissolvido na solução aquosa contida na cubeta forma-se o fotoproduto fluorescente de TFP.

Na Fig. 5.32, mostra-se o diagrama dos passos experimentais executados para a calibração de oxigênio. A cubeta anaeróbica (C) possui uma válvula que permite abrir e fechar a entrada de misturas de gases. A cubeta (C) contém TFP diluída em tampão (2,4 ml). Para preparar a seringa (B) com uma quantidade conhecida de oxigênio primeiro a preenchemos com certa quantidade de nitrogênio e, rapidamente a completamos com ar (0, 2, 4 ... ml).

No passo (1) o oxigênio é bombeado para fora da célula (C). No passo (2), a célula é preenchida com a mistura N_2 /ar, ao se conectar a seringa. A solução é submetida a agitação magnética por cerca de 15 min, a fim de se estabelecer o

equilíbrio. Então a seringa é desconectada, deixando-se a pressão interna total da célula igual à pressão atmosférica.

O terceiro passo (3) consiste em submeter a amostra à irradiação contínua (em 310 nm) e medir a intensidade de fluorescência em 410 nm em função do tempo para cada pressão parcial de O₂ (% atm). A irradiação em 310 nm induz o aparecimento do fotoproduto fluorescente e também excita a fluorescência.

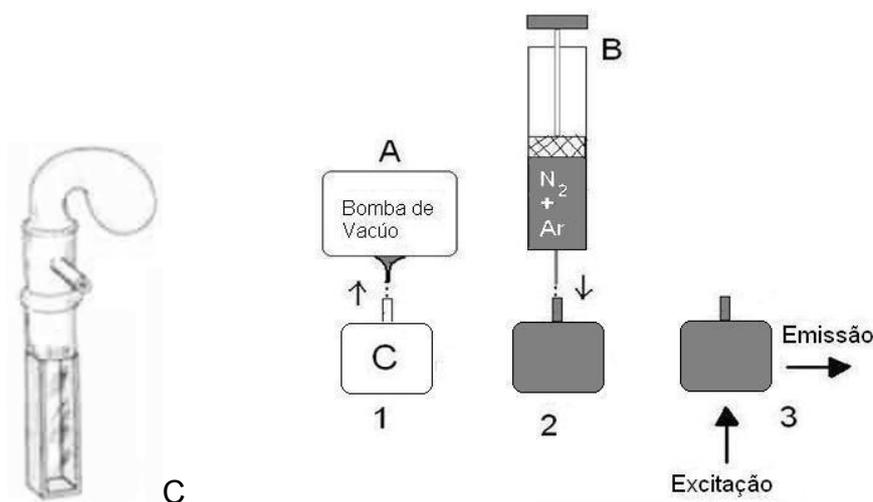


Figura 5.32. Cubeta anaeróbica e diagrama dos passos experimentais seguidos para a calibração de O₂.

5.3.2.

Resultados da variação da fluorescência com a dose de radiação e com a concentração de oxigênio

A Fig. 5.33 mostra o espectro de emissão (excitação em 310 nm, 0,45mW) e de excitação (emissão em 410 nm) de TFP depois de sofrer irradiação por um tempo de 3 horas. Lembramos que o fotoproduto de TFP, que se forma numa solução aquosa em ambiente aeróbico, apresenta as seguintes propriedades: emite em 410 nm com uma intensidade muito maior que na ausência de oxigênio; de seu espectro de excitação achamos que pode ser excitado em 276 nm, 306 nm e 353 nm. Seu máximo de emissão se desloca para o azul (aprox. 5 nm) em pH mais ácido e é um pouco mais intenso num meio mais básico. Esta espécie fluorescente possui um tempo de vida entre 1.9-2.3 ns, que é menor do que TFP intacta (~ 2.9 ns).

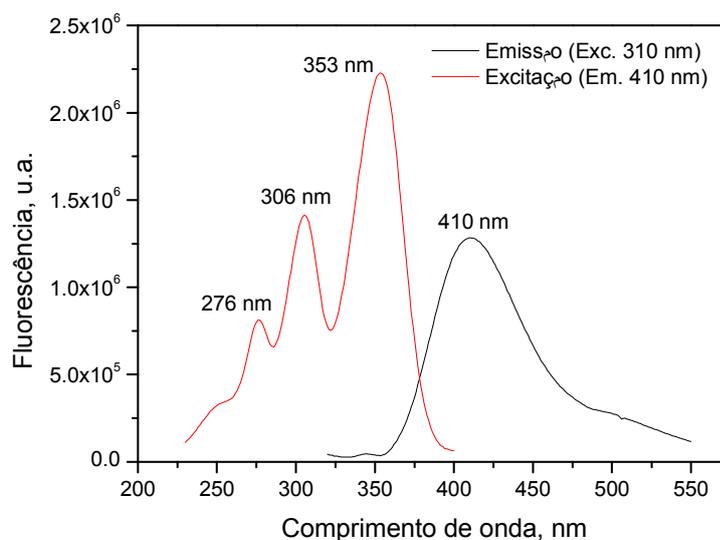


Figura 5.33. Espectro de emissão (exc. 310 nm) e excitação (em. 410 nm) da TFP (30 μ M) depois de 3 horas de irradiação (0, 453 mW) em condição aeróbica. Tampão utilizado foi fosfato em pH 7.4.

A Fig. 5.34 mostra a intensidade de fluorescência da TFPSO (emissão 410 nm) em função da energia total de irradiação (potência \times tempo de irradiação) para diferentes concentrações de O_2 . Para os valores utilizados nas fendas do monocromador de excitação fixamos a potência de irradiação em 0,45 mW. Estes resultados mostram que a TFP pode ser calibrada como sensor de O_2 (a constante irradiação UV) e como sensor UV (a solução saturada de O_2).

Observa-se também da Fig. 5.34 que o fotoproduto de TFP possui uma cinética de formação lenta, tornando ampla a faixa de energia de irradiação na calibração como de sensor UV. As curvas experimentais foram analisadas usando a equação de associação de um exponencial: $F = F_0 + F_1[1 - \exp(-E / \varepsilon)]$. Para 0% e 21%, encontrou-se para a energia característica, ε , os valores de 0,95 J (\sim 35 min de irradiação) e 0,58 J (\sim 21 min de irradiação), respectivamente. Isto indica que a cinética de formação da TFPSO é mais rápida em presença de O_2 , precisando-se para isso de menos energia de irradiação. Para baixas energias de irradiação, menores de 0,27 J (aprox. 10 min de irradiação), observam-se as curvas experimentais comportando-se quase linearmente.

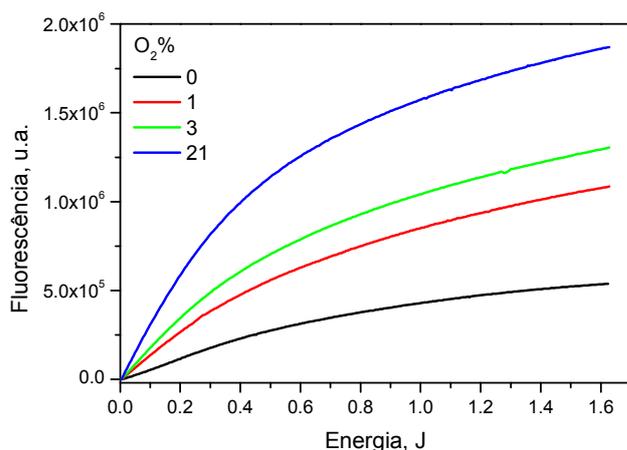


Figura 5.34. (A) Intensidade de fluorescência corrigida da TFPSO (emissão 410 nm) em função de energia de irradiação a diferentes concentrações de O₂. A TFP foi excitada em 310 nm em tampão fosfato pH 7.4.

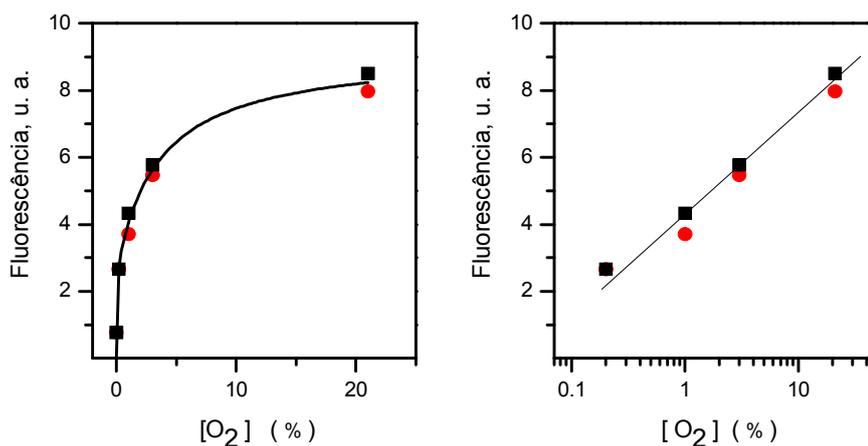


Figura 5.35. Intensidade de fluorescência corrigida da TFPSO em função da %O₂ (à esquerda, escala linear e à direita, escala logarítmica). Os dois símbolos correspondem a duas séries de medidas.

A Fig. 5.35 mostra a fluorescência do fotoproduto (TFPSO) como função do O₂% para um tempo de irradiação UV de 60 min (1,6 J). Daqui vemos que o método é particularmente sensível para concentrações baixas de O₂, menos de 3%. Concluimos então que também a TFP por meio da fluorescência de seu fotoproduto TFPSO pode ser calibrada como sensor de O₂.

6.

Interações das fenotiazinas com os fragmentos de membranas Na^+ , K^+ - ATPase

Os detalhes dos mecanismos moleculares da ação dos anestésicos estão longe de ser completamente compreendidos. Segundo a regra de Meyer e Overton, segundo a qual a potência da droga se correlaciona fortemente com sua solubilidade no ambiente lipídico, assume-se que os lipídios de membranas são o alvo dos compostos anestésicos. Outros trabalhos têm sugerido que as drogas se ligam diretamente a proteínas, cuja conformação subsequentemente alterada determina a ação dos anestésicos (Ioffe et al., 2007).

Tem-se observado que a atividade de muitas proteínas periféricas e intrínsecas (integrais) de membranas depende da composição dos lipídios vizinhos e do estado físico geral em que se encontram os lipídios nas membranas. Por exemplo, a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase tem sido diretamente relacionada com a fluidez da membrana. Durante as últimas décadas tem-se chegado geralmente a aceitar uma ação indireta das drogas sobre as proteínas via perturbações da bicamada de lipídios. As perturbações incluem separação de fase, mudança no parâmetro de ordem, curvatura, pressão lateral, etc. (Ioffe et al., 2007; Cantor, 1997; Urban, 2002; Eckenhoff, 1998).

Hendrich et al. (2003), através de cálculos teóricos dos coeficientes de partição octanol / água, acharam que a hidrofobicidade das fenotiazinas depende do grupo substituinte na posição 2 do anel heterocíclico, sendo que a hidrofobicidade cresce na seguinte ordem $\text{H}^- < \text{Cl}^- < \text{CF}_3^-$. De acordo com os cálculos dos coeficientes de partição os fenotiazínicos devem se intercalar entre os lipídios das bicamadas. Isso está de acordo com resultados experimentais de fluorescência, calorimetria, spins marcadores, NMR. Por exemplo, existe evidência de que a fenotiazina anfifílica, CPZ, encaixa-se na região lipídica causando assim mudanças na fluidez e permeabilidade da membrana (Hueck et al, 2000; Ioffe et al, 2007).

Neste trabalho estudamos os efeitos estruturais das fenotiazinas nas frações de membranas enriquecidas em Na^+ , K^+ - ATPase (membrana - Na^+ , K^+ - ATPase) utilizando para isso as sondas fluorescentes de membrana DPH e ANS, e a sonda fluorescente de proteína FITC.

6.1.

Resultados da interação de CPZ com membranas - Na^+ , K^+ - ATPase

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência de DPH em etanol são mostrados na Fig. 6.1. O comprimento de onda de 352 nm corresponde ao máximo de emissão; esse comprimento de onda foi utilizado para excitar a fluorescência do DPH em todo o trabalho.

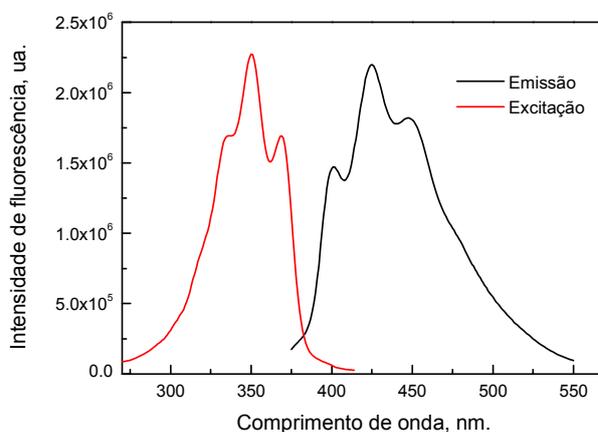


Figura 6.1. Espectros de emissão (excitação em 352 nm) e excitação (emissão 425 nm) de DPH (1,3 μM) em metanol (cubeta 3 ml).

Estudos anteriores mostraram que a fluorescência das moléculas de DPH em meio aquoso é suprimida facilmente pelas moléculas adjacentes de água. Mas quando o DPH é incubado com frações de membranas se observou um aumento de sua intensidade de fluorescência em função do tempo até chegar à saturação (tempo de difusão às regiões hidrofóbicas da membrana). Por isso, para realizar as medidas de fluorescência de DPH em membranas, espera-se um tempo de incubação de 3 horas.

6.1.1. Supressão da intensidade de fluorescência

A supressão de fluorescência pode ser dinâmica ou estática. Se a distância entre a sonda fluorescente e o supressor é constante, a supressão é estática. A supressão dinâmica (ou colisional) depende da difusão. Para analisar a supressão empregam-se curvas de Stern – Volmer, dependência de F_0/F (razão entre fluorescência na ausência e na presença do supressor), em função da concentração do supressor (CPZ, no caso).

O espectro de emissão de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase (Fig. 6.2 A) sofre um decréscimo, sem deslocar-se, causado pelo tratamento com CPZ. Não foi observado recobrimento espectral entre o espectro de emissão da CPZ e o espectro de absorção de DPH, indicando que a supressão não é devida à transferência ressonante de energia. A Fig. 6.2 B mostra o gráfico de Stern-Volmer para supressão da fluorescência de DPH por CPZ à temperatura ambiente de 25°C. A reta representa o ajuste por mínimos quadrados usando a equação de Stern-Volmer, cuja constante aparente de supressão, K_{SV} , apresentou o valor de $3,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

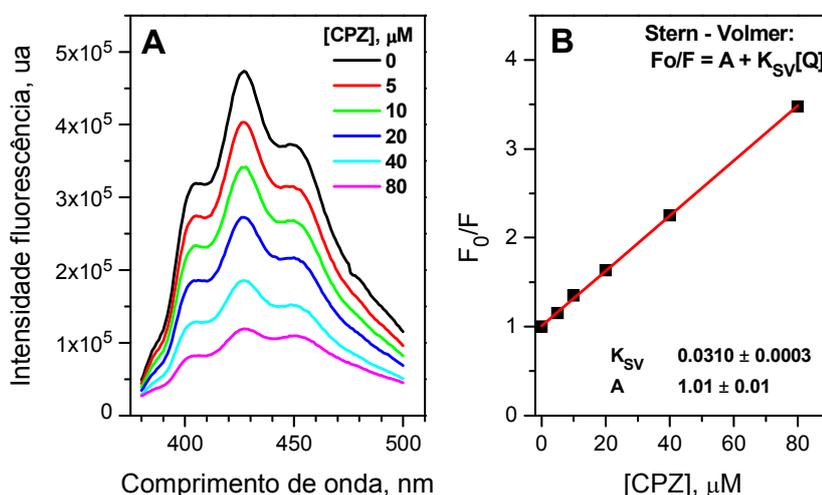


Figura 6.2. (A) Espectros de emissão da DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase a diferentes concentrações de CPZ. (B) Gráfico de Stern - Volmer para a supressão da fluorescência de DPH. A análise da supressão foi feita no pico de emissão em 426 nm (excitação em 352 nm). A concentração de DPH é de 2,4 μM.

O gráfico linear de Stern - Volmer nos indica que as moléculas de DPH são igualmente acessíveis ao supressor. A supressão de fluorescência de DPH por CPZ pode resultar da formação de complexo não fluorescente (supressão estática) ou/e por colisões diretas (supressão dinâmica). É possível distinguir entre os dois processos através da medida do tempo de vida na ausência e na presença do supressor, como será mostrado na seção 6.1.2.

Para interpretar a supressão observada é necessário levar em conta a concentração de CPZ na membrana e na fase aquosa, considerando o coeficiente de partição (Lakowicz, 2006). O coeficiente de partição é dado pela seguinte expressão:

$$P = \frac{[CPZ]_m}{[CPZ]_w} \quad 6.1$$

onde $[CPZ]_m$ é a concentração de CPZ na membrana e $[CPZ]_w$ a concentração de CPZ na água.

A concentração total de CPZ ($[CPZ]_T$) é dada por:

$$[CPZ]_T V_T = [CPZ]_m V_m + [CPZ]_w V_w \quad 6.2$$

onde V_m e V_w representam o volume das fases membrana e aquosa, respectivamente. Definindo a fração de volume da fase membrana como:

$$\alpha_m = \frac{V_m}{V_T} \quad 6.3$$

Obtém-se a concentração de CPZ na fase membrana a partir das equações 6.1, 6.2 e 6.3:

$$[CPZ]_m = \frac{P[CPZ]_T}{P\alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad 6.4$$

O volume da suspensão de membrana usada nesta experiência foi de 18,0 μ l, com concentração de 4 mg/ml, o que corresponde a um volume de membrana de $7,2 \times 10^{-2}$ μ l, se considerarmos que a densidade da membrana é aproximadamente igual à da água. O volume total de água foi 1,25 ml. Isto nos dá $\alpha_m = 5,8 \times 10^{-5}$. O valor do coeficiente de partição da CPZ em vesículas de DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina) é $8,0 \times 10^4$ segundo Parry et al. (2007). Conhecendo α_m e P, podemos obter a $[CPZ]_m$ para cada concentração total de CPZ, da equação 6.4, $[CPZ]_m = 1,4 \times 10^4 [CPZ]_T$. Isto indica que a CPZ fica bem mais concentrada dentro fase lipídica.

Para corrigir a equação de Stern-Volmer, a $[CPZ]_T$ é substituída pela concentração de CPZ na fase membranar $[CPZ]_m$, ficando esta equação como:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{K_{SV} \cdot P \cdot [CPZ]_T}{P \cdot \alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad 6.5$$

ou:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + 1,4 \times 10^4 \cdot K_{SV} \cdot [CPZ]_T \quad 6.6$$

Disto podemos ver que a constante aparente de Stern-Volmer é da ordem de $10^4 K_{SV}$. Então a K_{SV} corrigida por efeito do particionamento da CPZ entre a fase membranar e aquosa, ficaria com um valor bem menor, da ordem de M^{-1} .

6.1.2. Tempos de vida de fluorescência de DPH

Com a finalidade de determinar a natureza da supressão (estática ou dinâmica) de fluorescência da DPH por CPZ, realizamos medidas de decaimento de fluorescência em diferentes concentrações de CPZ (Fig. 6.3).

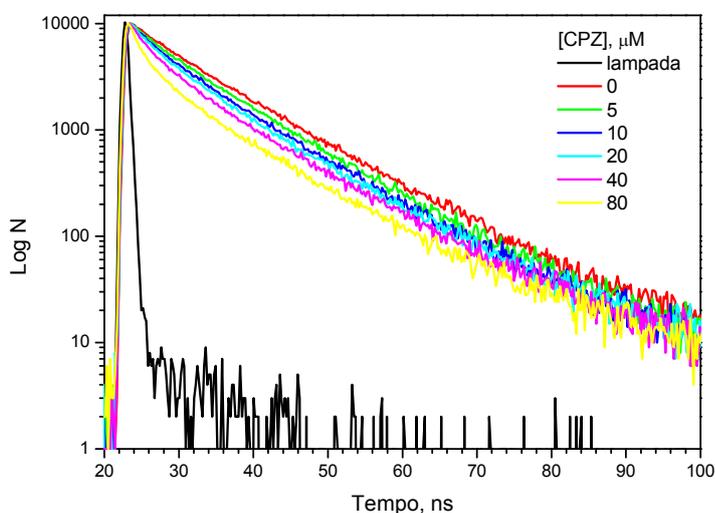


Figura 6.3. Curvas de decaimento da intensidade de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase a diferentes concentrações de CPZ. [DPH] = 2,4 μM, concentração de proteína na membrana 60 μ/ml. A curva preta é o perfil de emissão do LED de 372 nm. Emissão em 427 nm.

Na Fig. 6.3 observa-se que o decaimento da fluorescência de DPH é modificado pela CPZ. À primeira vista, em tempos mais longos, as curvas de

decaimento mantêm a mesma inclinação. Isto indica a existência de uma componente com tempo de vida quase igual em todas as concentrações de CPZ.

A análise dos decaimentos foi feita utilizando o modelo de múltiplas exponenciais. A fração de fótons associados a um determinado tempo de vida τ_i (determinada espécie) é representada por f_i . Para três exponenciais, os valores de χ^2 foram adequados ($0.8 < \chi^2 < 1.2$), mas observou-se que apenas dois tempos de vida tinham contribuições relevantes. O menor tempo de vida ($\tau \sim 0,5 - 0,8$ ns) correspondeu à menor fração de fótons ($\sim 1,8 - 14$ %) e pode ser uma contribuição das moléculas de CPZ na fase aquosa (CPZ em solução aquosa possui tempo de vida nessa mesma faixa de tempo). Os decaimentos foram então analisados com duas exponenciais, sem levar em conta o perfil da lâmpada de excitação, considerando tempos a partir dos quais a contribuição da lâmpada era menor do que dez fótons. Os resultados são mostrados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos dos ajustes bi-exponenciais dos decaimentos de fluorescência de DPH – membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com diferentes concentrações de CPZ. Tempo médio de decaimento,

$$\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$$

[CPZ] μM	$\tau_1(\text{ns})$	f_1 %	$\tau_2(\text{ns})$	f_2 %	$\langle \tau \rangle (\text{ns})$	χ^2
0	5,4	12	11,5	88	10,8	1,10
5	5,4	15	11,1	85	10,3	1,14
10	5,4	19	11,1	81	10,0	1,06
20	4,8	21	11,1	79	9,8	1,16
40	4,1	18	11,0	82	9,8	1,05
80	3,2	14	10,8	85	9,7	1,12

Konopasek et al. (1998) também encontraram decaimentos bi-exponenciais para DPH em bicamadas lipídicas em pH 7 (com tempos de vida ~ 8.5 e 2.3 ns) Eles associaram a componente com menor tempo de vida à população de DPH localizada na interface membrana-água e a de maior tempo de vida à população em região mais hidrofóbica. Isso estava de acordo com resultados de transferência de energia e resultados prévios de difração de nêutrons. Sugerimos então que as frações f_1 e f_2 da Tabela 6.1 estejam relacionadas a duas populações de moléculas de DPH localizadas em diferentes regiões da membrana: na interface lipídio-água

e no interior, respectivamente. É razoável esperar que a maior população de DPH (molécula hidrofóbica) procure regiões de menor polaridade, como o núcleo da membrana, o que está de acordo com a maior fração associada ao tempo de vida mais longo (Tabela 6.1). Observa-se que a adição de CPZ à solução não ocasiona mudanças significativas no tempo de vida da componente, f_2 , em comparação com a componente, f_1 , que foi a mais alterada.

Gratton et al. (1995), encontraram que o tempo de vida de DPH muda ao modificar-se o ambiente de membrana. Valores típicos de tempo de vida na fase gel da bicamada estão na faixa de 10 - 11 ns e no estado líquido cristalino, na faixa 6 - 9 ns. A Tabela 6.1, também mostra o tempo de vida médio para cada concentração de CPZ, que não muda de forma significativa, de 10,8 a 9,7 ns. O valor do tempo de vida, em ausência de CPZ está mais próximo do tempo de vida achado por Gratton et al. para a fase gel da bicamada lipídica, e está de acordo com Sutherland et al. (1988) para membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de duas espécies, 8,5 e 9,8 ns.

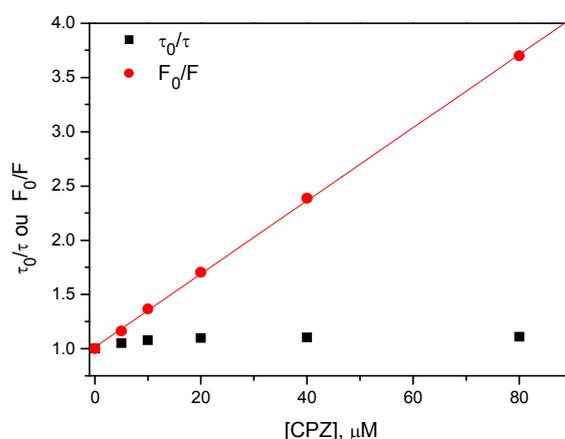


Figura 6.4. Decréscimo da intensidade fluorescência e o tempo médio de decaimento da DPH - membrana - Na^+ , K^+ - ATPase causado pela supressão da CPZ.

A Fig. 6.4 mostra gráficos de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência (F_0/F) e para o tempo de vida (τ_0/τ) de DPH em membrana tratada com CPZ. Numa supressão dinâmica, a intensidade de fluorescência e o tempo de vida diminuem na mesma proporção. Esta equivalência não foi observada em nossas medidas, como mostra a Fig. 6.4. Pode-se dizer que a CPZ suprime a fluorescência de DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase ($K_{SV} = 3,38 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)

sem modificar significativamente o tempo de vida médio, indicando supressão estática.

Sabemos (Konopasek et al., 1998) que em solventes orgânicos os dois tempos de vida de DPH são maiores quanto menor for a constante dielétrica do solvente. Sabendo que o valor da constante dielétrica decai de $\epsilon = 70$ na superfície a $\epsilon = 5$ no núcleo da membrana pode-se dizer que a diminuição do tempo de vida de DPH superficial pode ser ocasionada pelo efeito estrutural que a CPZ faz na membrana, induzindo mais microambientes polares possivelmente perto da superfície. Isto aumentaria ainda mais a permissividade dielétrica relativa na região de membrana perto da superfície e aumentaria um pouco mais a população de moléculas perto da superfície em condições polares e com tempo de vida curto.

6.1.3. Anisotropia - fluorescência estacionária

DPH é uma molécula assimétrica que sofre rotação anisotrópica dentro de uma membrana e se encontra principalmente no núcleo da bicamada lipídica. A anisotropia de fluorescência no estado estacionário de DPH tem sido amplamente usada na literatura para avaliar a fluidez da membrana. O conceito de fluidez obtido mediante anisotropia estacionária de DPH é expresso em termos de ordem orientacional das cadeias lipídicas da membrana. Por exemplo, quanto maior o valor da anisotropia estacionária maior seria a ordem na membrana, associada a um menor movimento médio dos lipídios na bicamada como consequência do aumento na rigidez da membrana.

Na Fig. 6.5 A, mostra-se a anisotropia estacionária de DPH em membrana, em função do comprimento de onda. Observa-se que em menores comprimentos de onda (perto da luz de excitação) os valores de anisotropia são maiores, ocasionados principalmente pelo espalhamento devido aos fragmentos de membrana. De fato, amostras biológicas como as suspensões de membranas são frequentemente turvas, o que ocasiona espalhamento da luz incidente e dos fótons emitidos. A luz incidente espalhada pode vir a ser detectada como fluorescência. A luz espalhada vai ser altamente polarizada quando a luz incidente é polarizada, chegando a aumentar o valor da anisotropia. Em menor grau, a formação de agregados de CPZ em concentração alta possivelmente contribui ao espalhamento.

A Fig. 6.5 B, mostra a variação da anisotropia em função da concentração de CPZ (a análise foi feita em 426 nm, pico de DPH e pouca influência do espalhamento). O aumento de 26 % na anisotropia indica decréscimo na mobilidade dos lipídios (aumento na ordem da membrana), ou seja, aumento da rigidez na membrana. Ioffe et al. (2007), utilizando DPH para estudar o efeito da CPZ no estado estrutural de membranas lipídicas (lipossomas), encontraram também um aumento na anisotropia de DPH. Eles argumentaram que o resultado é um efeito de condensação da droga na parte hidrofóbica da bicamada lipídica. Uma possível explicação desse efeito é que os anéis da molécula de CPZ (parte tricíclica), localizados na parte hidrofóbica da membrana, fazem ficar mais rígidas as caudas das moléculas lipídicas. Isto causaria uma redução na mobilidade aumentando o empacotamento dos lipídios. Essa alteração na propriedade da membrana traz como consequência restrições na rotação de DPH dentro da membrana.

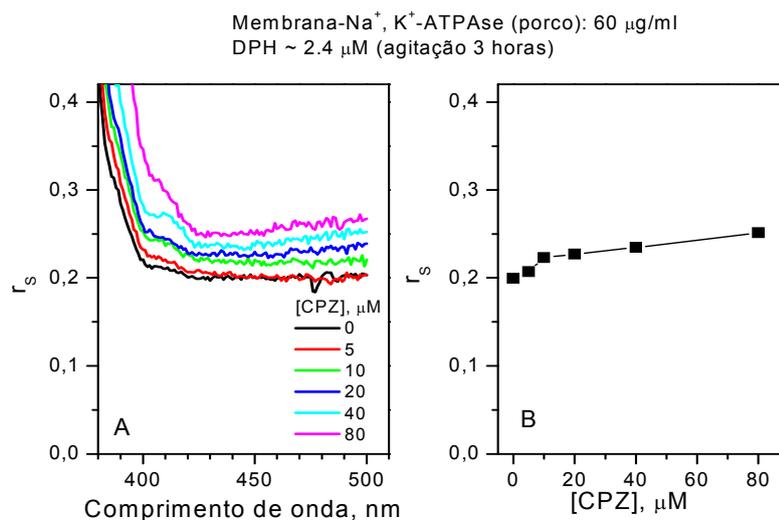


Figura 6.5. Anisotropia de Fluorescência estacionária da DPH - membrana - Na^+ , K^+ - ATPase ([DPH] = 2,4 μM) em função do comprimento de onda (A) e a diferentes concentrações de CPZ (B). O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml) e a excitação é em 352 nm.

6.2.

Interação de TFP com membranas - Na^+ , K^+ - ATPase

6.2.1.

Supressão da intensidade da fluorescência

A Fig. 6.7 mostra o gráfico de Stern–Volmer para a supressão de fluorescência de DPH em membrana – Na^+ , K^+ -ATPase por TFP. Da curva ajustada (curva vermelha) obteve-se para K_{SV} o valor de $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, constante de supressão aparente maior que a de CPZ. Parece que a TFP ingressa mais facilmente que a CPZ na região hidrofóbica da membrana.

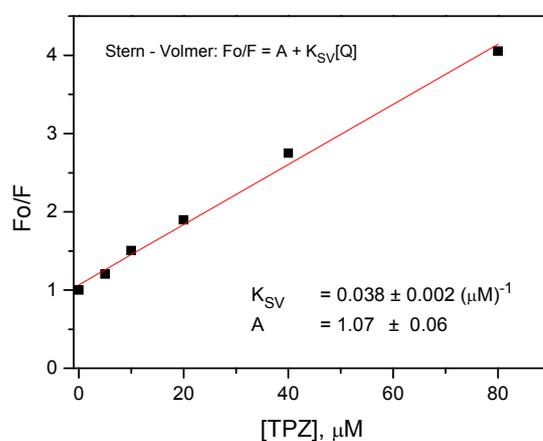


Figura 6.6. Supressão de fluorescência da DPH - membrana - Na^+ , K^+ -ATPase pela TFP. O análises de supressão foi feita no pico de emissão 424 nm e a excitação das amostras em 352 nm.

6.2.2.

Decaimento de fluorescência

A Fig. 6.8 mostra o decaimento da fluorescência de DPH intercalada nos lipídios de membrana - Na^+ , K^+ - ATPase para diferentes concentrações de TFP. Em tempos maiores, como aconteceu com CPZ, são observados decaimentos com a mesma inclinação, ou seja, com um mesmo tempo de vida. Vimos na seção anterior que TFP tem constante de supressão aparente maior que a CPZ. Esse efeito parece se refletir no decaimento da fluorescência de DPH, que foi mais alterado que com CPZ.

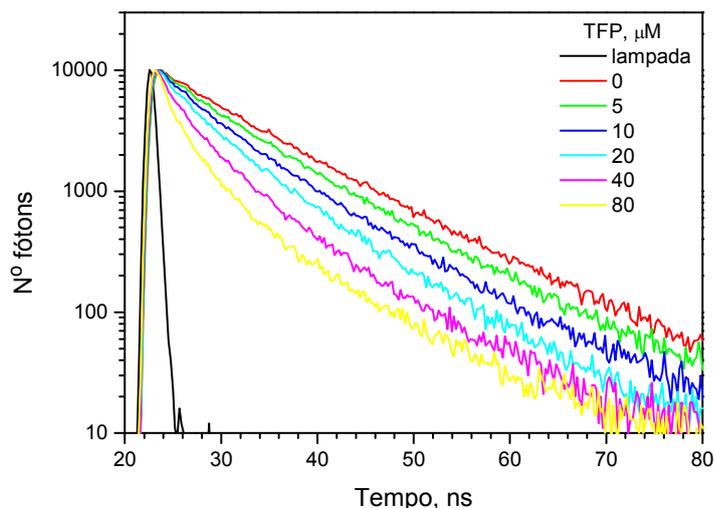


Figura 6.7. Curvas de decaimento da intensidade de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺-ATPase a diferentes concentrações de TFP. A curva preta é o perfil da lâmpada de diodo led de 372 nm. Concentração de proteína = 60 μg/ml. A emissão foi medida em 427 nm.

A Tabela 6.2 mostra o resultado de análises dos decaimentos da Fig. 6.7 usando o modelo de duas exponenciais, sem levar em conta o perfil da lâmpada de excitação, como com CPZ, considerando tempos a partir dos quais a contribuição da lâmpada era menor do que dez fótons. Vemos, dos resultados da Tabela 6.2, que os fragmentos de membrana utilizados na TFP têm características estruturais diferentes que as membranas utilizadas nos experimentos com CPZ, conforme mostram as diferentes contribuições de tempos de vida DPH. Aqui, a contribuição de moléculas de DPH localizadas perto da interface membrana – água (menor componente) praticamente dobrou em relação ao resultado da Tabela 6.1. No entanto, na presença de TFP, obteve-se o mesmo comportamento que com CPZ, com a maior componente, que tende a ser mais estável que a menor componente; no entanto, parece que a TFP altera mais o tempo de decaimento da menor componente.

A Tabela 6.2 também mostra o tempo de vida médio de DPH. Em média, o tempo de vida da DPH na bicamada lipídica é igual, dentro do erro, para os fragmentos de membrana usados no experimento com CPZ (10,8 ns) e com TFP (10,5 ns), embora as populações das duas componentes de DPH sejam diferentes na membrana. Isto nos diz que DPH tem um entorno lipídico médio nos fragmentos de membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com tempo de vida da ordem de

11 ns. Observamos também que esse tempo de vida decai mais com TFP do que com CPZ, tendendo logo à estabilidade.

Tabela 6.2. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste bi-exponencial dos decaimentos de fluorescência de DPH – membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com diferentes concentrações de TFP. Tempo médio de decaimento, $\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$.

[TFP] μM	τ ₁ (ns)	f ₁ %	τ ₂ (ns)	f ₂ %	<τ>(ns)	χ ²
0	7,6	38	12,1	62	10,5	1,22
5	6,4	32	11,2	68	9,7	1,14
10	4,9	27	9,8	73	8,5	0,92
20	4,5	35	9,5	65	7,7	1,13
40	3,8	38	9,4	62	7,3	1,13
80	3,2	35	10,0	65	7,6	1,10

A Fig. 6.8 mostra gráficos de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência (F_0/F) e para os tempos de vida (τ_0/τ) de DPH em membrana tratada com TFP. Assim como com CPZ, tampouco com TFP foi vista equivalência na razão de decrescimento.

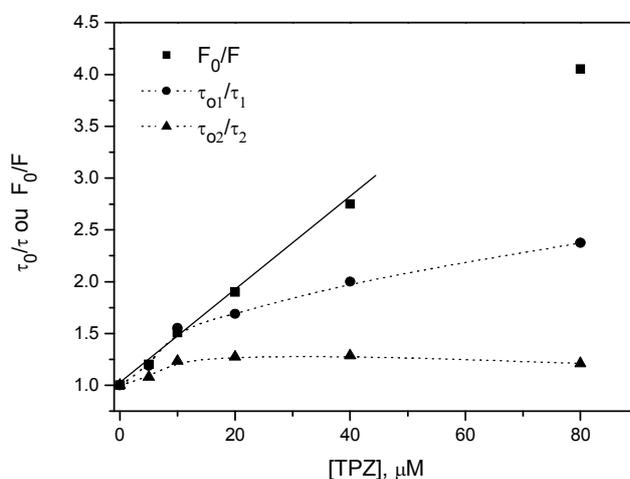


Figura 6.8. Decréscimo da intensidade fluorescência e do tempo médio de vida da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase causado por supressão por TFP.

A quase estabilidade do tempo de vida τ_2 da DPH, vista também com a CPZ, nos diz que a interação das fenotiazinas com DPH dentro das membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase são principalmente produzidas por supressão estática. No entanto, esse tipo de supressão está associado principalmente à componente 2,

mais abundante. O tempo de vida da componente 1 é mais afetado, indicando possivelmente supressão tanto estática como dinâmica. Já que esta menor componente é representada por moléculas localizadas perto da superfície, é propícia a supressão colisional com as moléculas da fase aquosa.

Hendrich et al. (2003), estudando a supressão de fluorescência de N - fenil - 1 - naftilamina (NPN) e de DPH por fenotiazinas em lipossomas de fosfatidilserina, acharam que fenotiazinas com grupo CF_3 – na posição 2 suprimem mais do que as que possuem Cl – nessa posição. Observaram que este efeito é menos pronunciado em DPH. Esses resultados estão em concordância com o diferente grau de supressão entre TFP e CPZ encontrado em nosso trabalho, onde TFP suprimiu um pouco mais que CPZ (Figs. 6.2 e 6.7). Parece então que TFP (e, conseqüentemente, FPZ) tem maior lipofilicidade que CPZ, perturbando mais a estrutura da membrana.

A NPN é uma sonda fluorescente que se localiza perto da interface apolar-polar da bicamada lipídica e é por isso que tem sua fluorescência suprimida e deslocada para o vermelho pelas fenotiazinas, resultado este que indica também aumento na polaridade de seu microambiente (Hendrich et al., 2003). A mesma localização na membrana foi encontrada para a componente de DPH com menor tempo de vida (Van der Heide et al., 1996; Konopasek et al., 1998). Dos resultados de decaimento, a TFP altera mais do que a CPZ o tempo de vida da menor componente, causando maior perda de estrutura da bicamada e trazendo, como consequência, maior intercalação de moléculas polares da fase aquosa na membrana. Isto aumentaria a polaridade no microambiente superficial da membrana causando diminuição no tempo de vida da menor componente (Konopasek et al., 1998).

6.2.3.

Anisotropia - fluorescência estacionária

A Fig. 6.9 apresenta a anisotropia de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase em função da concentração de TFP. A anisotropia de DPH em membranas lipídicas é um pouco aumentada com TFP, indicando diminuição no movimento médio dos lipídios da bicamada. A anisotropia de DPH foi pouco aumentada por TFP (no máximo 17 %, em menor grau que por CPZ, 26 %).

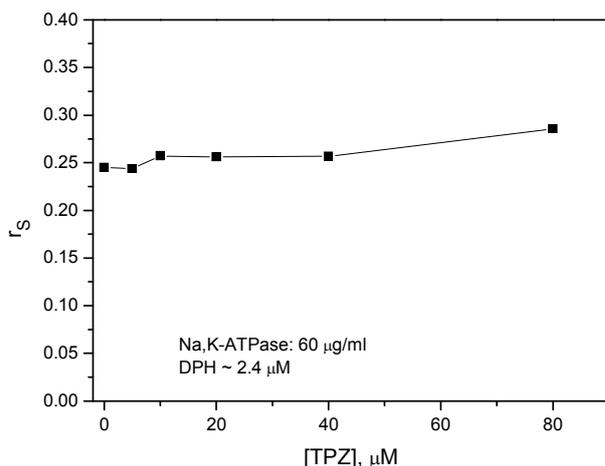


Figura 6.9. Anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 µM) com diferentes concentrações de TFP. O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml) e a excitação foi em 352 nm.

Wesolowska et al. (2004) encontraram também que derivados de fenotiazinas que possuem o grupo CF₃- na posição 2 aumentam a anisotropia de DPH no interior de lipossomas de fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC).

A alta afinidade de CPZ por fosfolípidios carregados negativamente faz com que a PS seja um receptor adicional para CPZ na superfície de membranas celulares. Tem-se mostrado também que CPZ se liga não só à superfície, mas também que se intercala no interior da membrana entre as cadeias lipídicas (Parry et al., 2007). TFP e FPZ parecem ter o mesmo mecanismo de interação com membranas que CPZ, já que possuem resultados similares para interação com DPH. Mas o maior grau de supressão de TFP (e FPZ) indica maior alcance às moléculas de DPH localizadas no núcleo da membrana. Estes resultados de TFP (e FPZ), em grau distinto à CPZ, parece envolver o substituinte na posição 2.

Os dois anéis benzênicos presentes nas fenotiazinas conferem suficiente solubilidade lipídica às drogas para penetrar na membrana. No entanto, o substituinte na posição 2 também contribui à lipoficidade da molécula. Grupos de trifluorometil contribuem mais à hidrofobicidade que o grupo -Cl. É também possível que a cadeia lateral das fenotiazinas se incline para o anel devido a interações de Van der Waals entre a cadeia lateral e o subsequente na posição 2. Estas interações são mais favoráveis para fenotiazinas de grupo -CF₃/piperazina (TFP) que para as de grupo Cl/alkilamino (CPZ) (Albini and Fasani, 1998;

Hendrich et al., 2003). Esta disposição geométrica da estrutura da TFP poderia desestruturar mais os lipídios na membrana.

Em pH fisiológico, CPZ e TFP podem estar em duas formas, protonada e não protonada, presentes em diferentes porcentagens. Isto afeta o coeficiente de partição das moléculas e a formação de agregados. Caetano e Tabak (2000) estudaram as características de ligação da CPZ e TFP em micelas de SDS (aniônicas) usando espectroscopia de absorção e fluorescência. O ambiente lipídico da membrana pode alterar o estado de protonação das moléculas. Além do mais, as moléculas neutras penetram mais na membrana do que as carregadas. Como o pK da CPZ é 9,3 e o da TFP é 7,0, em pH 7,0 há mais moléculas neutras de TFP do que de CPZ. Isso concorda com nossos resultados de supressão da fluorescência de DPH, que indicaram maior grau de supressão para TFP do que para CPZ.

Dos resultados de anisotropia estacionária, Caetano e Tabak (2000) também encontraram que CPZ e TFP tornam mais rígidas as micelas de SDS e que a CPZ se localiza em regiões mais polares que a TFP. Isso também concorda com nossos resultados de supressão. Parece que a CPZ, em pH 7,0, se localiza prioritariamente mais perto da interface lipídio-água que do núcleo da membrana. Sua forma protonada, em maior quantidade, favoreceria esta localização, já que a cadeia lateral carregada positivamente se posicionaria na vizinhança das cabeças polares dos fosfolipídios. Enquanto a TFP apresenta a forma predominante neutra, o que facilita o ingresso no núcleo da membrana.

6.3.

Decaimento de anisotropia de DPH – cinética e ordem dos lipídios

O decaimento da anisotropia de fluorescência em membranas lipídicas pode ser descrito como a soma de duas componentes, uma de decaimento rápido e um termo constante:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \exp(-t / \tau_c) + r_\infty \quad 6.7$$

onde r_0 é a anisotropia inicial, τ_c é o tempo de correlação rotacional e r_∞ é o valor assintótico de $r(t)$ para um tempo muito longo (Jahnig et al., 1979).

Em membranas lipídicas com ou sem colesterol e em membranas celulares, o decréscimo de $r(t)$ para um valor r_∞ , diferente de zero, dá a entender que a

distribuição final de dipolos emissores deve ser anisotrópica. Assim r_∞ fornece informação sobre a ordem estrutural nas membranas. A sonda DPH dentro da membrana, ao orientar-se paralelamente às cadeias dos lipídios, detecta a ordem. Então, podemos identificar a ordem da sonda com a ordem dos lipídios. Para o caso do momento de dipolo de absorção e emissão localizados ao longo do eixo do fluoróforo, r_∞ pode ser escrito em função do quadrado do parâmetro de ordem da sonda fluorescente ou parâmetro de ordem dos lipídios. Então pelas medidas de decaimento de anisotropia de fluorescência de DPH nós podemos por meio r_∞ analisar o efeito estrutural das fenotiazinas em membranas.

Em meios anisotrópicos como a membrana lipídica, a anisotropia estacionária, r_S , pode ser escrita em função de τ_c , τ e r_∞ da seguinte maneira:

$$r_S = \frac{r_0 - r_\infty}{1 + \tau/\tau_c} + r_\infty \quad 6.8$$

Na equação 6.8 o primeiro termo representa a contribuição cinética e o segundo a estrutural. A equação de Perrin (Eq. 3.29) é obtida se a parte estrutural r_∞ é desprezível. Kawato et al. (1978), estudando as propriedades de fluorescência de DPH em certas membranas, encontraram uma relação entre r_S e r_∞ , assumindo como valor médio $\tau / \tau_c = 8$ para DPH na fase lipídica e $r_0 = 0,39$ (Lackowicz, 2006):

$$r_\infty = \frac{9}{8}r_S - \frac{1}{20} \quad 6.9$$

A equação 6.9 mostra que a ordem dos lipídios em membranas pode ser analisada com boa aproximação das medidas de anisotropia de fluorescência estacionária.

6.3.1.

Efeitos das fenotiazinas no decaimento de anisotropia de DPH

A Fig. 6.10 apresenta os dados experimentais (símbolos pretos) de decaimento da anisotropia de fluorescência de DPH em membrana - Na^+, K^+ - ATPase. A curva ajustada mostra claramente que a sonda sofre um movimento restrito nas membranas.

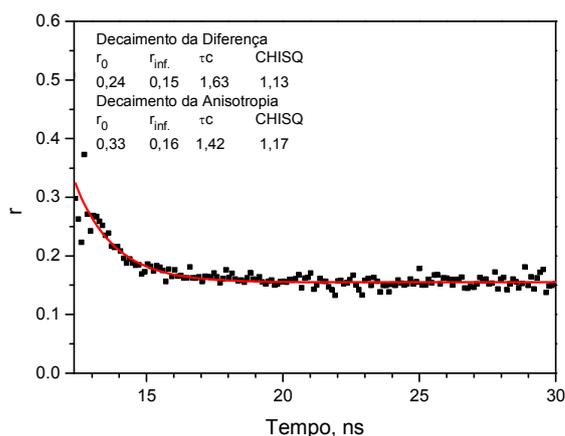


Figura 6.10. Curva decaimento da anisotropia de fluorescência de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase. A curva representa o ajuste exponencial. Excitação em 372 nm e emissão em 427 nm (Tampão Tris 10 mM pH 7,4; 1,8 mg/ml proteína; [DPH] 80 μM ; cubeta de 1 mm de espessura).

Da curva ajustada na Fig. 6.10 obtém-se $r_\infty = 0,16$ e $\tau_c = 1,4$ ns. Estes parâmetros são muito parecidos com os encontrados por Koyama et al. (1990), que acharam para a anisotropia de DPH em fragmentos de membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de rã os valores 0,14 e 1,5 ns para r_∞ e τ_c , respectivamente.

A seguir mostraremos os resultados de medidas de $r(t)$ na presença de fenotiazinas. Os efeitos cinéticos e estruturais são relacionados com os parâmetros τ_c e r_∞ , respectivamente. A Figura 6.11, mostra $r(t)$ de DPH em membranas - Na^+ , K^+ - ATPase tratadas com CPZ. Os valores de τ_c e r_∞ foram 1,0 ns e 0,20, respectivamente. A anisotropia limite, r_∞ , fica maior que a encontrada em ausência de CPZ, indicando aumento na ordem orientacional dos lipídios. Já o tempo de correlação rotacional τ_c teve seu valor diminuído, sugerindo maior mobilidade dos lipídios.

A Figura 6.12, mostra o decaimento de anisotropia de fluorescência de DPH paramembranas tratadas com TFP 20 μM . Os valores para τ_c e r_∞ foram 0,68 ns e 0,26, respectivamente. Os parâmetros são alterados na mesma forma que a CPZ, mas em maior grau.

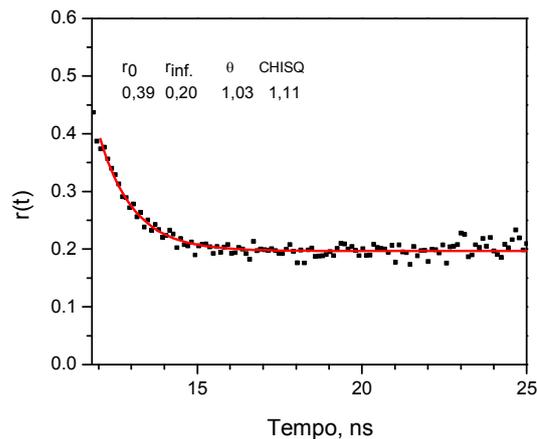


Figura 6.11. Anisotropia resolvida no tempo de DPH em membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 μ M) tratada com CPZ 20 μ M. Tampão Tris 10 mM pH 7.4 (cubeta 1 ml). Excitação em 352 nm e emissão em 426 nm.

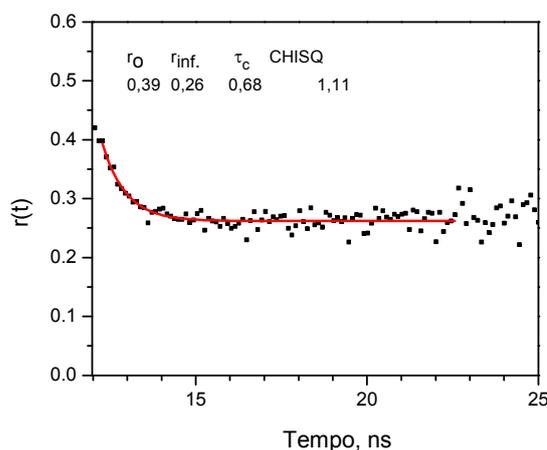


Figura 6.12. Anisotropia resolvida no tempo da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 mM) para 20 μ M de concentração de TFP. O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml). Excitação em 352 nm e emissão em 426 nm.

Os efeitos das fenotiazinas na ordem dos lipídios da membrana, deduzidos a partir das medições de anisotropia estacionária, coincidiram com os resultados para a anisotropia limite, obtidos das medições resolvidas no tempo (Figs. 6.5 e 6.11; 6.9 e 6.12). Isto quer dizer que r_S serve para analisar com boa aproximação os efeitos estruturais das fenotiazinas (Jahnig et al., 1979).

Os parâmetros r_S e r_∞ aumentaram de valor em presença das fenotiazinas. Nas medidas de decaimento de anisotropia a TFP afetou mais a ordem dos lipídios do que a CPZ, já que aumentou mais o valor de r_∞ .

Em tempos da ordem 10^{-8} s, moléculas de lipídios podem também mover-se por difusão lateral em distâncias da ordem de angstroms. A anisotropia de fluorescência, que envolve processos dentro desse tempo curto, detecta parâmetros de ordem local devido a essa difusão lateral. Os parâmetros de ordem local representam a ordem orientacional relativa a um eixo médio local que em geral não coincide com a normal à membrana. O parâmetro de ordem medido pela anisotropia de fluorescência seria a média de todos esses parâmetros de ordem locais. Um aumento na ordem dos lipídios obtido pela anisotropia de fluorescência demanda um aumento na ordem dos lipídios ao redor dos eixos locais (Jahnig et al., 1979).

CPZ e TFP causam aumento no r_{∞} indicando um incremento na ordem dos lipídios. Por outro lado, observou-se diminuição no tempo de correlação rotacional. O decrescimento de τ_c indicaria diminuição da microviscosidade. O grau de diminuição de τ_c depende da forma como interagem as fenotiazinas com a bicamada lipídica. Da supressão de fluorescência de DPH e tempos de vida associados ao interior ou à superfície da membrana, a CPZ parece não afetar o núcleo da membrana, enquanto a TFP parece afetar tanto o núcleo quanto a superfície. O mecanismo exato de interação das fenotiazinas com os lipídios, ou com a estrutura lipídica, ainda é incerto. Na superfície tanto a CPZ como a TFP podem interagir por atração elétrica com grupos das cabeças polares dos lipídios, e seus anéis hidrofóbicos podem se intercalar entre os lipídios de tal forma que alterem o estado estrutural dos lipídios. Por outro lado, o grau de protonação das fenotiazinas CPZ e TFP dentro das membranas pode ser diferente para cada uma (Caetano e Tabak, 2000).

6.3.2.

Anisotropia de fluorescência de DPH em membranas de crustáceo normal e adaptado

As propriedades físicas dos lipídios em membranas biológicas são sensíveis às mudanças ambientais como consequência da adaptação das espécies. Foram utilizados membranas de crustáceo enriquecidas em Na^+ , K^+ - ATPase para investigar (em nível molecular) as propriedades dessas membranas, quando o crustáceo muda de um ambiente menos salino (normal de rio de água - doce) a outro mais salino e mais frio (adaptada em mar).

Anisotropia - fluorescência estacionária

A Fig. 6.13 mostra a anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana de crustáceo normal e adaptado, e de rim de porco.

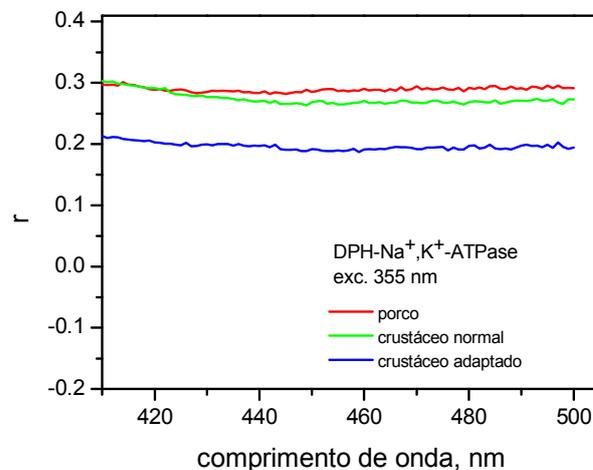


Figura 6.13. Anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase de crustáceo normal (verde) e adaptado (azul). Excitação em 355 nm. A análise foi feita utilizando a máxima emissão em 427 nm. A curva vermelha é de membrana de rim de porco.

Observa-se uma diferença significativa no valor da anisotropia para a espécie normal e adaptada do crustáceo. A anisotropia estacionária no crustáceo adaptado diminui 30 % em relação ao crustáceo normal. Este resultado indica que a bicamada lipídica do crustáceo normal tem menor mobilidade/mais ordem do que a de crustáceos adaptados. Parece que o crustáceo adaptado teve que aumentar a fluidez de sua membrana celular para se adaptar a um ambiente mais salino e frio.

Parece uma coincidência que as membranas de crustáceo normal e de rim de porco tenham o mesmo valor de anisotropia.

Medidas de anisotropia de fluorescência estacionária em membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de hepatócitos de peixe dourado *Sparus auratus L.* aclimatados a 17° C (Hernandez et al., 2002) resultaram em aumento de ordem ou diminuição de fluidez dos componentes lipídicos quando se baixa a temperatura de aclimação em água até ~7° C. Esta compensação para preservar suas propriedades físicas, de fluidez, ordem ou outras, frente a distúrbios térmicos foi denominada adaptação homeoviscosa (Logue et al., 1995). Parece que o crustáceo para adaptar-se no mar teve que baixar a ordem/aumentar a mobilidade dos lipídios na membrana celular.

7.

Efeitos estruturais na Na⁺, K⁺-ATPase devido às fenotiazinas

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral que tem como função principal transportar íons de sódio e potássio contra um gradiente eletroquímico. O mecanismo de bombeamento é baseado na mudança conformacional principalmente de sua subunidade α . O transporte destes íons está associado com a oscilação da proteína entre seus dois principais estados conformacionais (E_1 e E_2), os quais têm diferentes afinidades por ATP. Os efeitos estruturais gerais e locais em certos sítios de importância funcional numa proteína podem ser estudados usando sondas fluorescentes extrínsecas, como a FITC, ou intrínsecas, como os resíduos triptófanos da própria proteína. A FITC é um marcador fluorescente da subunidade α da Na⁺, K⁺-ATPase que inibe a atividade desta proteína, bloqueando o sítio de alta afinidade de ATP, no aminoácido lisina 501, na conformação E_2 (Ward D. et al., 1998; Linnertz H. et al., 1998).

A fluorescência intrínseca de uma proteína deve-se aos três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. A alta sensibilidade do triptofano ao seu entorno local pode ser uma vantagem para estudos de transições conformacionais, desnaturação, etc. Para proteínas com um ou poucos triptofanos é mais fácil interpretar os dados espectrais. Geralmente as proteínas contêm vários resíduos de triptofanos expostos em ambientes distintos, mostrando espectros de emissão mais complexos.

Mudanças no estado conformacional de uma proteína conduzem também a mudanças na acessibilidade relativa dos triptofanos, e as podemos ver refletidas nas características de supressão. Por exemplo, aparecem deslocamentos nos espectros de emissão e os gráficos de Stern - Volmer são complexos. Isto é devido à supressão seletiva dos triptofanos expostos ao supressor e aqueles internos à proteína. O estado estrutural tridimensional de uma proteína ligada a membrana e sua inserção na bicamada lipídica também são fatores determinantes na acessibilidade de moléculas supressoras aos resíduos de triptofanos.

Neste capítulo, empregando as frações de membranas - Na⁺,K⁺ - ATPase daremos ênfase ao estudo dos efeitos estruturais na proteína Na⁺,K⁺ - ATPase provocados pelas fenotiazinas, sem deixar de lado os possíveis efeitos colaterais que a bicamada lipídica possa ocasionar por efeito também das interações das fenotiazinas com as membranas.

7.1. Interação da TFP com a Na⁺, K⁺-ATPase

A Fig. 7.1 (A) mostra os espectros de emissão da proteína em diferentes concentrações de TFP. As medidas foram feitas em meio anaeróbico para evitar que a TFP fotodegrade no tempo de iluminação da medida. Os resíduos de triptofanos da Na⁺, K⁺ - ATPase excitados em 284 nm, produzem emissão em 330 nm. A emissão em 474 nm corresponde às moléculas de TFP, que possuem absorvância significativa em 284 nm.

Observa-se que, para a faixa concentrações pequenas de TFP, a diminuição de fluorescência dos triptofanos é maior. Nota-se também da Fig. 7.1 (A), que tanto o máximo de emissão dos triptofanos (330 nm) como da TFP (474 nm) não estão sofrendo deslocamento. Pode estar havendo transferência de energia dos resíduos de triptofano para a TFP, já que há superposição do espectro de emissão dos triptofanos com o de absorção da TFP (Fig. 5.1).

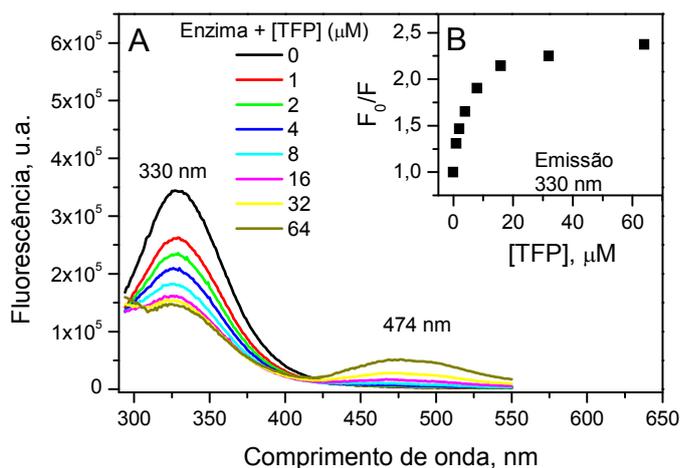


Figura 7.1. (A). Espectros de emissão da Na⁺,K⁺-ATPase (corrigidos para efeito de filtro interno) para diferentes concentrações de TFP, excitação em 284 nm. (B) Gráfico de Stern – Volmer em 330 nm (emissão do triptofano). Tampão TRIS 30 mM, Tris-fosfato 5 mM, EDTA 0,2 mM, e MgCl₂ 5 mM a pH 7,4 (para estabilizar a conformação E₂).

A Fig. 7.1 (B) mostra o gráfico de Stern-Volmer, onde observamos um efeito não linear para concentrações de TFP maiores que $8 \mu\text{M}$, indicando que nem todos os resíduos de triptofano são acessíveis à TFP.

Medidas de fluorescência da TFP (excitada também em 284 nm) foram realizadas paralelamente em ausência e em presença da proteína. A Fig. 7.2 mostra os resultados dessas medidas, em presença da membrana - Na^+ , K^+ - ATPase (A) e na ausência (B). Observa-se que o pico de emissão da TFP não se desloca em presença da proteína, porém sua intensidade fica maior.

A Fig. 7.3 mostra a intensidade de fluorescência da TFP nos casos (A) e (B) em função da concentração. Depois de ajustar os dados a uma reta achamos, por meio do coeficiente angular, que a fluorescência em (A) é quase 2,4 vezes maior que em (B), já considerando o fator de correção de filtro interno devido ao espalhamento, que foi de 1,53. Mesmo considerando que este pode estar superestimado, concluímos que a intensidade de fluorescência da TFP em membrana é maior do que em tampão por um fator f tal que $1,7 < f < 2,4$.

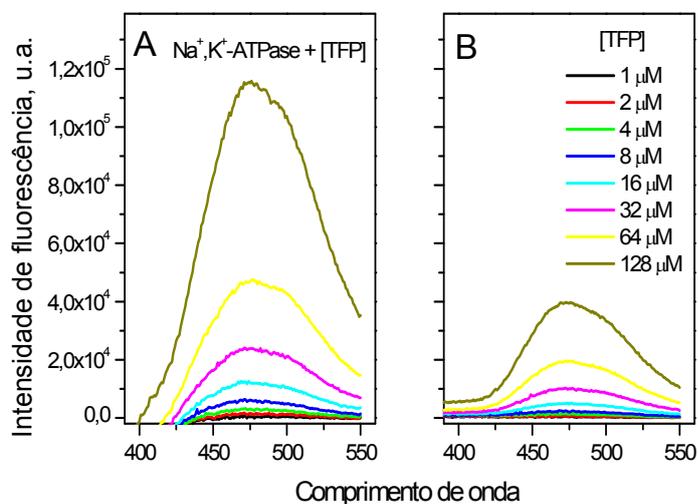


Figura 7.2. Espectros de emissão da TFP, excitada em 284 nm (corrigidos para efeito de filtro interno) em concentrações crescentes de TFP: (A) na presença e (B) ausência de membranas ricas em Na^+ , K^+ -ATPase. Em (A) subtraiu-se o espalhamento devido à membrana.

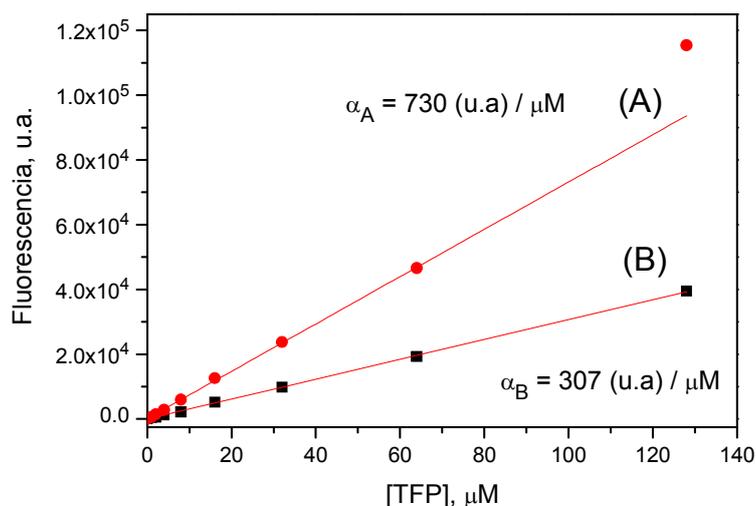


Figura 7.3. Emissão de fluorescência da TFP (A) na presença da Na⁺,K⁺-ATPase e (B) em sua ausência. A emissão foi em 474 nm e a excitação em 284 nm. Os valores de α_A e α_B representam os coeficientes angulares das retas.

A Fig. 7.4 apresenta o gráfico de Stern - Volmer modificado considerando duas populações de resíduos de triptofano, uma acessível à TFP e a outra inacessível ou embutida na proteína, sendo K_a a constante de supressão de Stern-Volmer da população acessível.

Observamos que o grau de acessibilidade depende da faixa de concentração da TFP. A concentrações menores do que 8 μM a fração de resíduos de triptofano f_a e a constante de supressão K_a foram 53% e $8,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. E para concentrações maiores f_a e K_a foram 60 % e $4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. O parâmetro f_a indica que nem toda a fluorescência de triptofano é suprimida por TFP, em média suprime-se cerca de 56%. Conforme se vai aumentando a concentração de TFP (maior de 8 μM), a população que era antes inacessível parece tornar-se parcialmente acessível, modificando as características de supressão.

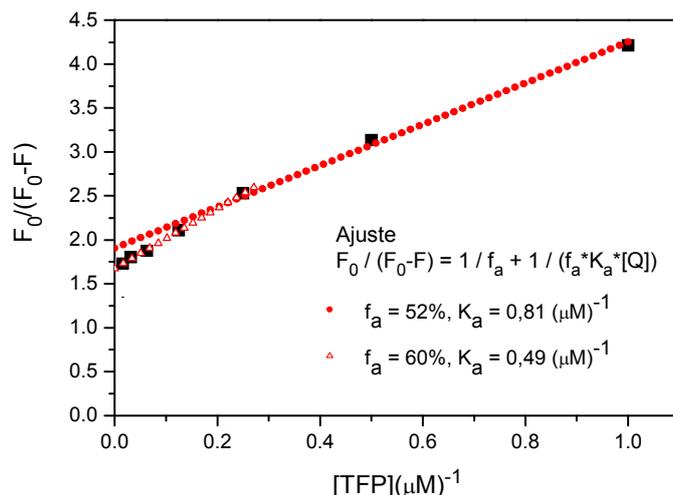


Figura 7.4. Gráfico de Stern - Volmer modificado da Na⁺,K⁺-ATPase (excitação 284 nm). f_a é a fração acessível do total de triptofano e K_a é a constante de Stern – Volmer de supressão para os resíduos de triptofano acessíveis.

A fluorescência dos resíduos de triptofanos da Na⁺, K⁺ - ATPase não é completamente suprimida, aparentemente a metade dos triptofanos parece ser afetada pela TFP (Fig. 7.1). Adhikary et al. (1994) encontraram que a CPZ suprime a fluorescência da Na⁺, K⁺ - ATPase, com $f_a = 68\%$ em presença de K⁺ e $f_a = 33\%$ em presença de Mg²⁺. Nossos resultados de supressão pela TFP foram parecidos (60%).

Os resíduos de triptofano de uma proteína podem ser agrupados em quatro tipos de resíduos, com relação a sua emissão (Lakowicz, 2006): resíduos que são completamente expostos ao solvente ($\lambda_{MAX} \approx 350$ nm), resíduos parcialmente expostos, na superfície de uma proteína ($\lambda_{MAX} \approx 340$ nm), resíduos embutidos dentro da proteína, mas interagindo com grupos polares ($\lambda_{MAX} \approx 315$ nm a 330 nm), e resíduos embutidos completamente num núcleo apolar ($\lambda_{MAX} \approx 308$ nm). O máximo de emissão e o rendimento quântico do triptofano podem variar grandemente entre as proteínas. As moléculas de TFP parecem suprimir os triptofanos mais superficiais. Podemos comentar que a população de triptofano acessível à supressão está distribuída superficialmente ou é mais acessível ao solvente aquoso.

Em maior concentração de TFP, as características de supressão são alteradas (Fig. 7.4). Resíduos de triptofano podem ser encontrados dentro da bicamada lipídica perto da interface membrana e solvente (Yudouski G. et al., 2003). Ao

aumentar a concentração de TFP, a droga pode provocar mudanças conformacionais na proteína que deixem outros triptofanos mais acessíveis.

7.1.1.

Irradiação no UVB da TFP em presença da Na^+ , K^+ -ATPase

Irradiou-se em 310 nm a TFP em presença da membrana - Na^+ , K^+ - ATPase, em conformação E_2 . A Fig. 7.5 A mostra os espectros de emissão da TFP, com excitação em 310 nm, para diferentes tempos de irradiação. O espectro de emissão da proteína foi subtraído das demais medidas de emissão. Como vimos anteriormente, irradiando-se a TFP, esta começa a se fotodegradar criando outras espécies, como a espécie fluorescente em 410 nm. Aqui, também observamos que, conforme irradiamos a amostra, todo o espectro de emissão aumenta com o tempo. A Fig. 7.5 B mostra os espectros de emissão da TFP da Fig. 7.5 A subtraindo o espectro da TFP intacta em presença da proteína. Observamos facilmente que surge o fotoproduto em 410 nm e outra espécie em 502 nm.

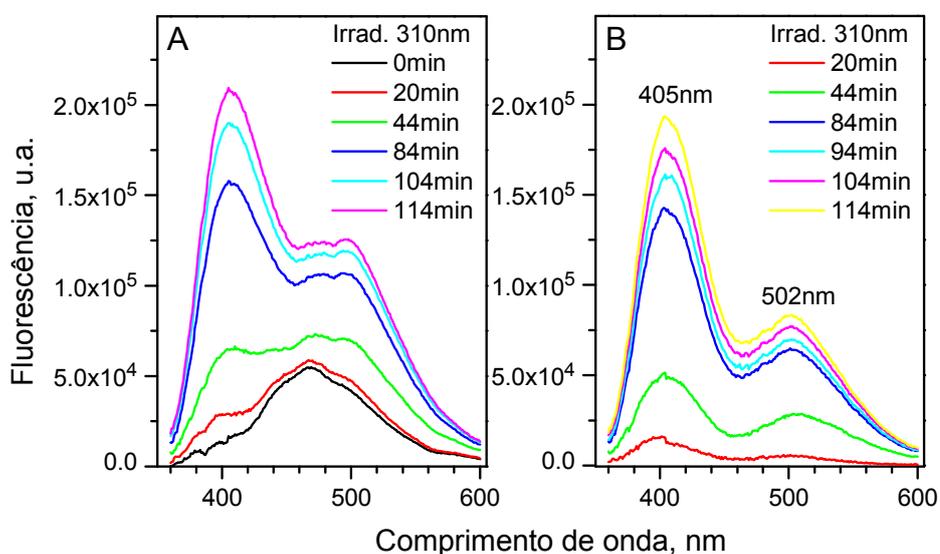


Figura 7.5. (A) Espectros de emissão da TFP (20 μM) excitada e irradiada em 310 nm (0,36 mW), subtrauiu-se o espectro da Na^+ , K^+ -ATPase (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (B) Subtraindo-se o espectro sem irradiar (0 min) dos espectros de emissão da parte A. O tampão usado foi TRIS 30 mM, Trisfosfato 5 mM, EDTA 0,2 mM, e MgCl_2 5 mM a pH 7,4 para estabilizar a conformação E_2 da proteína, também se empregou ATP a 0,5 mM.

A Fig. 7.6 mostra a variação da intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 470, 495 e 410 nm em função do tempo. Observamos que as espécies que fluorescem em 502nm e 470nm parecem ser da mesma espécie já que evoluem da mesma forma no tempo. As espécies fluorescentes formadas por irradiação não saturam no período observado.

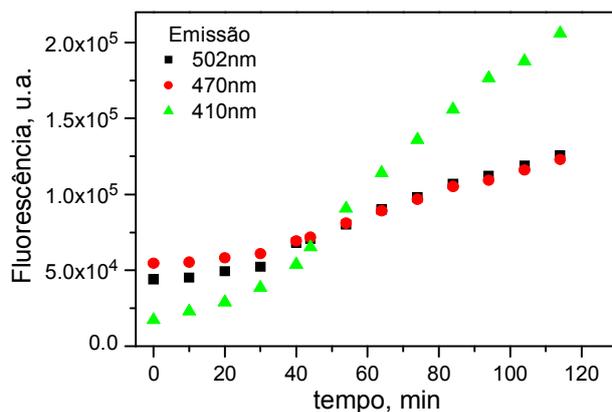


Figura 7.6. Variação da fluorescência da TFP em presença da proteína em função do tempo.

Foi feita a diálise da amostra previamente irradiada, para investigar se houve foto-associação de TFP com a proteína através de ligações covalentes. A Fig. 7.7 mostra os espectros de emissão das medidas de fluorescência estacionária da amostra depois da diálise. A espécie com pico em 494 nm permanece na amostra dialisada e parece ligar covalente a proteína (não se fotodegrada). O fotoproduto fluorescente em 410 nm também é observado em menores quantidades. Parece que a espécie fluorescente em 410 nm não se liga à Na^+ , K^+ - ATPase pois apenas uma pequena fração dessa espécie permaneceu na amostra após a diálise.

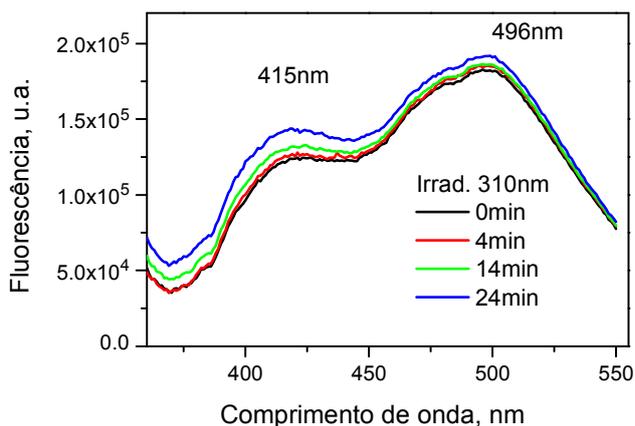


Figura 7.7. Fluorescência da amostra de TFP e Na^+ , K^+ -ATPase irradiada a 114 min e dializada. A amostra foi submetida a novos tempos de irradiação em 310 nm.

7.2. Interação da CPZ com a Na^+ , K^+ -ATPase marcada com FITC

A Fig. 7.8 apresenta o espectro de emissão e excitação da sonda fluorescente FITC depois de dialisar a amostra. Os espectros pertencem às moléculas de FITC ligadas à proteína. Seu espectro de excitação mostra dois picos de excitação em 470 nm e 494 nm. Os espectros de fluorescência da FITC são obtidos excitando-o em sua máxima excitação.

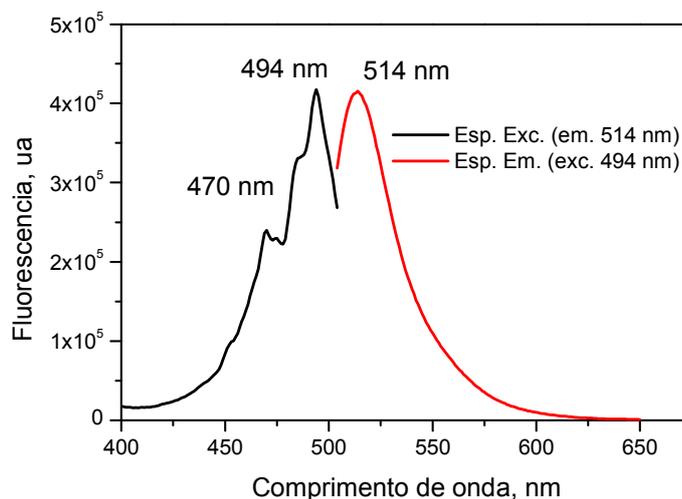


Figura 7.8. Espectros de emissão (curva vermelha) e excitação (curva preta) da FITC ligada à Na^+ , K^+ -ATPase.

Depois do processo de marcação da proteína com a FITC, a proteína foi titulada com CPZ. A Fig. 7.9 A, mostra o espectro de emissão de FITC- Na⁺, K⁺-ATPase para diferentes concentrações de fenotiazina. Observamos que a CPZ não causa nenhuma alteração na intensidade da FITC, sugerindo que a CPZ não altera a estrutura do sítio de ligação da FITC. Resultados obtidos com a sonda fluorescente antroil ouabaína (AO), mostraram que a CPZ liga-se à Na⁺, K⁺-ATPase perto do sítio de ouabaína (Guevara et al., 2007). O sítio de ouabaína (lado extracelular) se encontra longe do sítio de ATP (lado citoplasmático), a uma distância aproximada de 7,2 nm (Linnertz H. et al., 1998). Portanto é razoável que, nesse sítio, o fármaco não altere diretamente o sítio de ATP. No entanto, poderia haver outros sítios de ligação para a CPZ na proteína. Nosso resultado mostra que a CPZ não se liga a sítios próximos de FITC.

A Fig. 7.9 B mostra a fluorescência de FITC-Na⁺, K⁺-ATPase tratada com CPZ para diferentes tempos de irradiação.

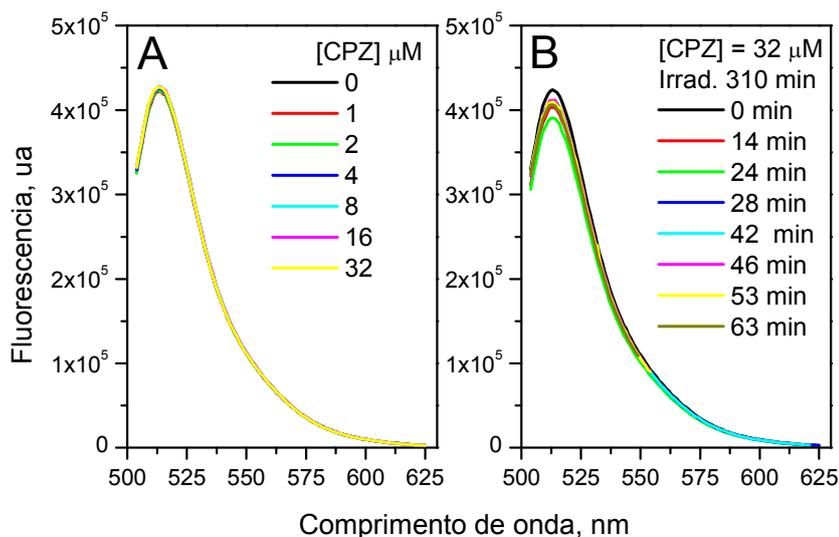


Figura 7.9. Espectro de fluorescência do marcador de fluorescência FITC da Na⁺, K⁺-ATPase a diferentes concentrações de CPZ (A) e a distintos tempos de irradiação da CPZ em 310 nm (B).

O resultado encontrado em Guevara et al. (2007) mostrou que a irradiação da amostra em 310 nm provoca a foto-associação de CPZ à proteína. Usando a AO, como sonda fluorescente da proteína, foi encontrado que o radical criado pela irradiação da CPZ (radical promazinil) liga-se à enzima perto do sítio da ouabaína.

Observamos da Fig. 7.9 B que a CPZ, mesmo irradiada, não altera significativamente a intensidade da FITC ligada à proteína. Então parece que os fotoprodutos da CPZ também não afetam significativamente a FITC.

8. Conclusão

As principais conclusões desse trabalho encontram-se a seguir.

Fotodegradação dos derivados de fenotiazinas

CPZ, FPZ e TFP foram usadas para estudar as propriedades fotofísicas (e fotoquímicas) dos derivados de fenotiazinas. Observou-se que, livre de iluminação, as propriedades de fluorescência das fenotiazinas dependem principalmente do grupo substituinte na posição 2 da estrutura eletrônica π das fenotiazinas e das propriedades do solvente. As emissões são mais fracas em água (mais polar) que em etanol (menos polar). Sob iluminação, estas drogas se fotodegradam em fotoprodutos fluorescentes cujos desenvolvimentos dependem da energia de irradiação, da natureza do solvente (água ou etanol), do pH do meio e da presença de oxigênio molecular.

CPZ irradiada com radiação UV, na faixa de transição UVA/UVB, desenvolve três fotoprodutos, com maior eficiência em meios ácidos. A promazina (emissão $\sim 450\text{nm}$), independente da presença de O_2 , parece formar-se por causa da fotólise da CPZ que ocasiona a saída de cloro, favorecendo o ingresso do átomo de hidrogênio. A decloração da CPZ é também importante para a formação de dímeros e trímeros em altas concentrações de CPZ. Sua espécie sulfóxida (emissão $\sim 370\text{ nm}$) se desenvolve em ambiente aeróbico. Uma espécie cujo espectro de fluorescência ainda não havia sido descrito na literatura (emissão de pico triplo, com máximo $\sim 352\text{ nm}$) forma-se em ausência de O_2 .

TFP e FPZ iluminadas com UVB produziram fotoprodutos fluorescentes similares (emissão $\sim 410\text{ nm}$) em ambientes aeróbicos, identificados como espécies sulfóxidas. Este fotoproduto fluorescente da TFP foi estudado como sensor de oxigênio, para concentrações pequenas, e como sensor de radiação UV.

As espécies sulfóxidas dos derivados de fenotiazinas precisaram de oxigênio molecular dissolvido no solvente aquoso.

Efeitos estruturais dos derivados de fenotiazinas nas membranas enriquecidas em Na^+, K^+ -ATPase.

As estratégias desenvolvidas nos trabalhos de membranas permitiram caracterizar os efeitos das fenotiazinas nas frações de membranas enriquecidas de Na^+, K^+ -ATPase, permitindo-nos obter informações dos efeitos estruturais destas drogas em regiões específicas das membranas lipídicas. Das medidas de fluorescência estacionária encontramos que DPH comportou-se adequadamente como sonda fluorescente de membrana, localizando-se em pequenas quantidades na região superficial (componente de menor tempo de vida) e em sua maioria na região hidrofóbica (componente de maior tempo de vida).

Os derivados de fenotiazinas se localizaram tanto na região lipídica das membranas como nas proteínas. Pela anisotropia de fluorescência estacionária de DPH, verificamos que as fenotiazinas afetam a estrutura da bicamada lipídica, alterando a ordem dos lipídios. Encontrou-se que as fenotiazinas diminuem a fluorescência da DPH por supressão estática. A CPZ parece afetar menos o núcleo da membrana do que TFP, já que ela suprimiu menos a fluorescência de DPH, principalmente das moléculas superficiais de DPH, de menor tempo de vida. Já a TFP parece afetar toda a membrana, isto porque esta fenotiazina suprimiu mais a fluorescência de DPH e chegou a alterar os tempos de vida das componentes de DPH. Pelo decaimento da anisotropia, encontramos que a ordem dos lipídios aumenta por efeito das fenotiazinas, mas a taxa de decaimento da anisotropia também aumenta.

A sonda fluorescente de membrana DPH também foi usada para investigar as mudanças físicas dos lipídios de membrana devido à adaptação de uma espécie a um novo habitat. Encontramos para Na^+, K^+ -ATPase do crustáceo diminuição da ordem lipídica de membrana para adaptar-se a um ambiente marinho.

Usamos como sonda intrínseca os resíduos de triptofano da Na^+, K^+ -ATPase para investigar efeitos estruturais e o tipo de supressão de fluorescência que as fenotiazinas possam causar à proteína. Encontrou-se que a fluorescência dos resíduos de triptofano foi suprimida parcialmente pela TFP, onde cerca de 60% dos triptofanos sofreram supressão. Não se encontrou indício de transferência de energia entre TFP e os resíduos de triptofano da proteína.

9. Referências Bibliográficas

Adhikary G., Chandra S., Sikdar R., Sen Parimal C. **The amphiphilic drug - induced tryptophan fluorescence change of ion -transporting ATPases.** *Biochim. Biophys. Acta* **1188**: 220 – 226 (1994).

Amler E., Abbott A., Ball W. J. **Structural dynamics and oligomeric interactions of Na⁺,K⁺-ATPase as monitored using fluorescence energy transfer.** *Biophys. J.* **61**: 553 – 568 (1992).

Amler E., Abbott A., Malak H., Lakowicz J., Ball W. J. **The carbohydrate moieties of the beta-subunit of Na⁺,K⁺-ATPase: their lateral motions and proximity to the cardiac glycoside site.** *Biophys. J.* **70**: 182 – 193 (1996).

Andersen J. P., Vilsen B. **Primary ion pumps: chapter 1.** Principles of medical biology, volume 4. Cell chemistry and physiology: part III, pages 1 - 66. JAI Press Inc. (1996).

Béguin P., Wang X, Firsov D., Puoti A., Clayes D., Geering, K. **The subunit is a specific component of the Na⁺, K⁺-ATPase and modulates its transport function.** *EMBO J.* **16**: 4250 – 4260 (1997).

Bhattacharyya J., Bhattacharyya M., Chakraborti A. S., Chaudhuri U., Poddar R. K. **Structural organizations of hemoglobin and myoglobin influence their binding behaviour with phenothiazines.** *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 11-18 (1998).

Brotherus J. R., Jost P. C., Griffith O. H., Keana J. F. W., Hokin L. E. **Charge selectivity at the lipid-protein interface of membranes Na, K-ATPase.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 272 – 2723 (1980).

Buettner G. R., Hall R. D., Chignell C. F, Motten A. G. **The stepwise biphotonic photoionization of chlorpromazine as seen by laser flash photolysis.** *J. Photochem. Photobiol.* **49**: 249 – 256 (1989).

Buettner G. R.; Schafer F. Q. **Free radicals, oxidants, e antioxidants.** *Teratology.* **62**, 234 (2000).

Buettner G. R., Motten A. G., Hall R. D., Chignell C. F. **Free radical production by chlorpromazine sulfoxide, an ESR spin-trapping and flash photolysis study.** *J. Photochem. Photobiol.* **44**: 5 – 10 (1986).

Cantor R. S. **Lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anaesthesia.** *J. Biochem.* **36**: 2339 – 2344 (1997).

Caetano W., Tabak M. **Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles: electronic absorption and fluorescence studies.** *J. Coll. Interf. Sci.* **225**: 69 – 81 (2000).

- Chignell, C. F., Motten, A. G., Buettner, G. R. **Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines: relationship to phenothiazine-induced photosensitization.** *Environ. Health Perspect.* **64**: 103 – 110 (1985).
- Cornelius F. **Functional reconstitution of the sodium pump. kinetics of exchange reactions performed by reconstituted (Na-K)-ATPase.** *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 19 – 66 (1991).
- Daveloose D., Leterrier F. **Photochemical interactions between nitroxide free radicals and phenothiazines in solution.** *J. Photochem. Photobiol.* **28**: 23-31 (1978).
- Davies A. K., Navartnam S., Phillips, G. O. **Photochemistry of chlorpromazine [2-chloro-N-(3-dimethylaminopropyl)] phenothiazine in propan-2-ol solution.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2**: 25-29 (1976).
- Dowhan W., Bogdanov M., Mileykovskaya E. **Functional roles of lipids in membranes.** Chapter I. D. E. Vance and J. E. Vance (Eds) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th edition. Elsevier B. V. (2008).
- Eckenhoff, R. G. **Do specific or nonspecific interactions with proteins underlie inhalational anesthetic action?** *J. Mol. Pharmac.* **54**: 610 – 615 (1998).
- Elisei F., Latterini L., Gaetano G., Mazzucato U., Viola G., Miolo G., Vedaldi D., Dall'Acqua F. **Excited-state properties and in vitro phototoxicity studies of three phenothiazine derivatives.** *J. Photochem. Photobiol.* **75**: 11 – 21 (2002).
- Esmann M., Watts A., Marsh D. **Spin-label studies of lipid-protein interactions of the (Na⁺,K⁺)-ATPase membranes from rectal glands of *Squalus Acanthias*.** *J. Biochem.* **24**: 1386 – 1393 (1985).
- Fortes P. A. **Anthrolyouabain: a specific fluorescent probe for the cardiac glycoside receptor of the Na,K-ATPase.** *J. Biochem.* **16**: 531 – 540 (1977).
- Fortes P. A., Lee, J. A. **Steady-state levels of phosphorylated intermediates of (Na,K)-ATPase monitored with oligomycin and anthrolyouabain.** *J. Biol. Chem.* **259**: 11176 – 11179 (1984).
- Freifelder D. **Physical biochemistry. Applications to Biochemistry and Molecular Biology.** 2nd edition (1982).
- Finkelstein A., Ptitsyn O. **Protein physics: a course of lectures.** Academic Press Inc (2002).
- Garcia C., Oyola R., Piñero L., Arce R., Silva J., Sánchez V. **Substitution and solvent effects on the photophysics properties of several series of 10-alkylated phenothiazines derivatives.** *J. Phys. Chem.* **109**: 3360 – 3371 (2005).
- Gratton E., Parasassi T. **Fluorescence lifetime distributions in membrane systems.** *J. Fluores.* **5**: 51 – 57 (1995).
- Guevara E. A. C., Barriviera L., Hassón-Voloch A., Louro S. R. W. **Chlorpromazine Binding to Na⁺, K⁺-ATPase and Photolabeling: Involvement of the ouabain site monitored by fluorescence.** *J. Photochem. Photobiol.* **83**: 914 – 919 (2007).
- Guevara E. A. C. **Efeitos de um antipsicótico e um antidepressivo tricíclico sobre a bomba sódio e potássio, Na⁺,K⁺ - ATPase: estudo através de**

fluorescência. Tese de mestrado em Física. Dep. de Física, Centro Técnico - Científico, Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro (2005).

Guynn S. R., Scofield M. A., Petzel D. H. **Identification of mRNA and protein expression of the Na/K-ATPase α_1 -, α_2 - and α_3 -subunit isoforms in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes.** J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **273**: 15 – 32 (2002).

Hendrich A. B., Wesolowska O., Motohashi N., Molnar J., Michalak K. **New phenothiazine-type multidrug resistance modifiers: anti-MDR activity versus membrane perturbing potency.** Biochem. Biophys. Res. Commun. **304**: 260 – 265 (2003).

Hellen E. H., Pratap P. R. **Nucleotide binding to IAF-labelled Na^+ , K^+ -ATPase measured by steady state fluorescence quenching by TNP-ADP.** J. Biophys. Chem. **69**: 107 - 124 (1997).

Hollas J. M. **Modern Spectroscopy.** John Wiley and Sons Ltd. 4th edition (2004).

Hernández A., Companyó M., Morros A., Tort L. **Cambios en la fluidez de la membrana en hepatocitos de dorada *Sparus auratus* L., 1758 asociados al descenso térmico.** Bol. Inst. Esp. Oceanogr. **18 (1-4)**: 389-392 (2002).

Horisberger J. D, Lemas V., Kraehenbuhl J. P., Rossier B. C. **Structure-function relationship of Na,K-ATPase.** Ann. Rev. Physiol. **53**: 565 – 584 (1991).

Hueck I. S., Hollweg H. G., Schmid-Schonbein G. W., Artmann G. M. **Chlorpromazine modulates the morphological macro and microstructure of endothelial cells.** Am. J. Physiol. Cell Physiol. **278**: 873-878 (2000).

Iwaoka T., Kondo M. **Mechanistic studies on the photooxidation of chlorpromazine in water and ethanol.** Bull. Chem. Soc. Jpn. **47**: 980 – 986 (1974).

Ioffe V. M., Gorbenko G. P., Zakharenko O. K., Yudintsev A. V. **Chlorpromazine-membrane interactions as revealed by pKa and fluorescent probes.** J. Biol. Phys. Chem. **7**: 51 – 57 (2007).

Jahnig F. **Structural order of lipids and proteins in membranes: evaluation of fluorescence anisotropy data.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 6361 – 6365 (1979).

Jorgensen P. L. **Mechanism of the Na^+ - K^+ Pump protein structure and conformation of the pure (Na-K)-ATPase.** Biochim. Biophys. Acta **694**: 27 – 68 (1982).

Jorgensen P. L. Skou J. C., Solonomson L. P. **Purification and characterization of (Na^+ , K^+)-ATPase. II. Preparation of zonal centrifugation of highly active (Na^+ , K^+)-ATPase from the outer medulla of rabbit kidneys.** Biochim. Biophys. Acta **233**: 381 – 394 (1971).

Jorgensen P. L., Håkansson K. O., Karlsh S. J. D. **Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions.** Ann. Rev. Physiol. **65**: 817 – 849 (2003).

Joshi R., Ghanty T. K., Mukherjee T. **Reactions and structural investigation of chlorpromazine radical cation.** J. Mol. Struct. **888**: 401 - 408 (2008).

- Karpinska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H. **Analytical properties of 2-and 10-disubstituted phenothiazine derivatives.** *Analytical Sciences* **12**: 161-170 (1996).
- Kaiser R. D., London E. **Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives with membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth.** *Biochemistry* **37**: 8180 - 8190 (1998).
- Karlish S. J. D., Yates D. W. **Tryptophan fluorescence of (Na⁺ + K⁺)-ATPase as a tool for study of the enzyme mechanism.** *Biochim. Biophys. Acta* **527**: 115 – 130 (1978).
- Kawakami K., Noguchi S., Noda M., Takahashi H., Ohta T., Kawamura M., Nojima H., Nagano K., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S. **Primary structure of the α -subunit of *Torpedo californica* (Na⁺-K⁺) ATPase deduced from cDNA sequence.** *Nature* **316**: 733 – 736 (1985).
- Kawakami K., Nagano K. **The transmembrane segment of the human Na,K-ATPase β -subunit acts as the membrane incorporation signal.** *J. Biochem.* **103**: 54 - 60, (1988).
- Kawato S., Kinoshita K. Jr., Ikegami A. **Effect of cholesterol on the molecular motion in the hydrocarbon region of lecithin bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques.** *Biochemistry* **17**: 5026-5031(1978)
- Keenan S. M., DeLisle R. K., Welsh W. J., Paula S., Ball W.J. Jr. **Elucidation of the Na⁺,K⁺-ATPase digitalis binding site.** *J. Mol. Graph. Model.* **23**: 465 - 475 (2005).
- Kochevar E. I., Horn J. **Photoproducts of chlorpromazine which cause red blood cell lysis.** *J. Photochem. Photobiol.* **37**: 163 – 168 (1983).
- Konopasek I, Kvasnicka P, Herman P, Linnertz H, Obsil T, Vecer J, Svobodova J, Strzalka K, Mazzanti L, Amler E. **The origin of the diphenylhexatriene short lifetime component in membranes and solvents.** *Chem. Phys. Letters* **293**: 429–435 (1998).
- Koyama T., Zhu M. Y., Araiso T., Kinjo M., Kitagawa H., Sugimura M. **Dynamic microstructure of plasma and mitochondrial membranes from bullfrog myocardium-A nanosecond time-resolved fluorometric study.** *Japanese J. Physiol.* **40**: 65-78 (1990).
- Kühlbrandt W. **Biology, structure and mechanism of P-type ATPases.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 282 – 295 (2004).
- Kyte J. **Purification of the sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla.** *J. Biol. Chem.* **246**: 4157 – 4165 (1981).
- Lakowicz J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 3rd Edition. Springer Science + Business Media (2006).
- Lee J. A., Fortes P. A. **Spatial relationship and conformational changes between the cardiac glycosides site and beta-subunit oligosaccharides in sodium plus potassium activated adenosinetriphosphatase.** *J. Biochem.* **25**: 8133 – 8141 (1986).

- A.G. Lee **Effects of charged drugs on the phase transition temperatures of phospholipid bilayers.** *Biochim. Biophys. Acta* **514** (1978) 95-104.
- Lin C.-E., Liao W.-S., Chen K.-H., Lin W.-Y. **Influence of pH on electrophoretic behavior of phenothiazines and determination of pK_a values by capillary zone electrophoresis.** *Electrophoresis* **24**: 3154–3159 (2003).
- Linnertz H., Urbanova P., Obsil T., Hermani P., Amler E., and Schoner W. **Molecular distance measurements reveal an $(\alpha\beta)_2$ dimeric structure of Na^+ , K^+ -ATPase.** *J. Biol. Chem.* **273**: 28813 - 28821 (1998).
- Louro S. R. W., Anteneodo C., Wajnberg E. **Carboxyl groups at the membrane interface as molecular targets for local anesthetics.** *Biophys. Chem.* **74**: 35 – 43 (1998).
- Logue J., Tiku P., Cossins A. R. **Heat injury and resistance adaptation in fish.** *J. Therm. Biol.* **20** (1/2): 191-197 (1995).
- Lowndes J. M., Hokin-Neaverson M., Ruoho R. J. **Photoaffinity labeling of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ with (^{125}I) iodoazidocymarin.** *J. Biol. Chem.* **259**: 10533 – 38 (1984).
- Malheiros S.V.P., de Paula E., Meirelles N.C. **Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis.** *Biochim. Biophys. Acta* **1373** (1998) 332-340.
- Maruoka N., Murata T., Omata N., Takashima Y., Fujibayashi Y., Wada Y. **Effect the vitamin E supplementation on plasma membrane permeabilization and fluidization induced for chlorpromazine in the rat brain.** *J. Psychopharm.* **22**: 119 – 127 (2008).
- Mathews C. K., Van Holde, K. E. J. **Biochemistry.** The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. (ed.), Menlo Park (California) (1990).
- Mellinger T., Keeler C. **Spectrofluorometric identification of phenothiazine drugs.** *J. Anal. Chem.* **35**: 554 – 558 (1963).
- Miolo G., Levoroto L., Gallochio F., Caffieri S., Bastianon C., Zanoni R., Reddi E. **In vitro phototoxicity of phenothiazines: involvement of stable UVA photolysis products formed in aqueous medium.** *Chem. Res. Toxicol.* **19**: 156 – 163 (2006).
- Motten A. G., Buettner G. R., Chignell C. F. **Spectroscopic studies cutaneous photosensitizing agents –VII. a spin-trapping study of light induced free radicals from chlorpromazine and promazine.** *J. Photochem. Photobiol.* **42**: 9 – 15 (1985).
- Nelson D.L., Cox M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 3rd edition, Worth Publishers (2002).
- Parry M. J., Jutila A., Kinnunen P. K. J., Alakoskela J. M. **A versatile method for determining the molar ligand-membrane partition coefficient.** *J. Fluores.* **17**: 97 – 103 (2007).
- Pedersen P. A., Nielsen J. M., Rasmussen J. H., Jorgensen P. L. **Contribution to Ti^+ , K^+ , and Na^+ binding of Asn^{776} , Ser^{775} , Thr^{774} , Thr^{772} , and Tyr^{771} in cytoplasmic part of fifth transmembrane segment in α -subunit of renal Na, K -ATPase.** *J. Biochem.* **37**: 17818-17827 (1998).

Post A., Warren R. J., Zarembo J.E., em **Analytical Profiles of Drug Substances**, vol. 9, editor K. Florey, Academic Press, NY, 1980, pp. 543–581.

Rang H. P., Dale M. M. **Farmacologia**. Editora Guabanara Koogan AS 2ª edição 202 – 205 (1993).

Ragland J. B., Kinross-Wright V. J. **Spectrofluorometric measurement of phenothiazines drugs**. Anal. Chem. **36**: 1356 – 1359 (1964).

Ricardo, C. P., Teixeira, A. N. **Moléculas biológicas - estrutura e propriedades**. Didáctica (Ed.) Lisboa 3ª edition (1983).

Rodrigues T., dos Santos G., Riposati A., Barbosa L. R. S., Mascio P.D., Itri R., Baptista M. S., Nascimento O. R., Nantes I. L. **Photochemically generated stable cation radical of phenothiazine aggregates in mildly acid buffered solutions**. J. Phys. Chem. **110**: 12257 – 12265 (2006).

Rodrigues R. M.: **Estudo da emissão de Ions Estáveis e Metaestáveis (LiF)nLi⁺ induzida por fragmentos de fissão do ²⁵²Cf, 2003**. Tese de mestrado em Física. Dep. de Física, Centro Técnico-Científico, Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro.

Robert J. E. **The photodynamics effect of chlorpromazine, promazine, and hematoporphyrin on lens protein**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci **25** (1984).

Saldanha R. J. D., Ananda S., V. B. M., Made G. N. M. **Oxidation of psychotropic drugs by Chloramine – T in acid medium: a kinetic study using spectrophotometry**. J. Molec. Struct. 606 (2002) 147 - 154.

Silva, D. **Estudo da interação da clorpromazina e da hemina com albumina sérica através da espectroscopia de fluorescência**. Teses de Mestrado em Biologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2001).

Skoog D. R., Holler J. F., Nieman T. A. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, São Paulo, 2002.

Skou J. C. **The identification of the sodium pump**. Bioscience Reports **18** No. 14 (1998).

Somló C. and Hasson-Voloch A. **Effect of Li⁺ and Ba⁺ on the electrocyte membrane-bound (Na⁺+K⁺) ATPase**. Cell Tiss. Res. **19/1**: 17-21 (1987).

Sweadner K. J., Donnet C. **Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺ - ATPase of-the sarcoplasmic reticulum**. J. Biochem. **356**: 685 – 704 (2001).

Sutherland E., Dixon B. S., Leffert H. L., Skally H., Zaccaro L., Simon F. R. **Biochemical localization of hepatic surface-membrane Na⁺,K⁺-ATPase activity depends on membrane lipid fluidity**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 8673 – 8677 (1988).

Tsakovska I. **QSAR and 3D QSAR of phenothiazine type multidrug resistance modulators in P388/ADR cells**. Bioorg. Med. Chem. **11**:2889-2899 (2003).

Therien A. G. Goldshleger R., Karlsh S.J., Blostein R. **Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase**. J. Biol. Chem. **272**: 32628 – 32634 (1997).

- Urban, B. W. **Current assessment of targets and theories of anaesthesia.** Br. J. Anaesth. **89**: 167–183 (2002).
- Valeur B. **Molecular Fluorescence. Principles and Applications.** Wiley - VCH Verlag GmbH (2002).
- Van Den Broeke L. T., Ouijja E. H., Bokarski J. Beyersbergen Van Henegouwen G.M.J. **In vitro Photodegradation of Chlorpromazine.** J. Photochem. Photobiol. **59**: 140 – 144 (1994).
- Van der Heide U. A., Van Ginkel G., Levine Y. K. **DPH is localised in two distinct populations in lipid vesicles.** Chem. Phys. Lett. **253**: 118-122 (1996).
- Ward D., Cavieres J. **Photoactivation of fluorescein isothiocyanate modified Na, K-ATPase by 2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)8-azidoadenosine 5'-Diphosphate.** J. Biol. Chem. **273**: 1477-14284 (1998).
- Wesolowska O., Hendrich A. B., Motohashi N., Kawase M., Dobryszyccki P., Ozyhar A., Michalak K. **Presence of anionic phospholipids rules the membrane localization of phenothiazine type multidrug resistance modulator.** Biophys. Chem. **109**: 399 – 412 (2004).
- Welti R., Mullikin L. J., Yoshimura T., Hlemkamp G. M. **Partition of amphiphilic molecules into phospholipid vesicles and human erythrocyte ghosts: measurements by ultraviolet difference spectroscopy.** J. Biochem. **23**: 6086 – 6091 (1984).
- Wolfbeis O.S. **Fluorescence spectroscopy new methods and applications.** Springer –Verlag Berlin Heidelberg (1993).
- Yu S. P. **Na⁺, K⁺-ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death.** J. Biochem. Pharm. **66**: 1601 – 1609 (2003).
- Yudowski G. A., Shimon M. B., Tal D. M., González-Lebrero R. M., Rossi R. C., Garrahan P. J., Beaugé L. A., Karlisch S. J. D. **Evidence for tryptophan residues in the cation transport path of the Na⁺,K⁺-ATPase.** Biochemistry. **42**: 10212-10222 (2003).

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](#)