UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

ANA LÚCIA CARNEIRO FERNANDES SOUTO

MICELAS REVERSAS E A INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS MELANOTRÓPICOS

SBI-IFUSP
305M810T3076

Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Física.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ex. 1
SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
3076
INSTITUTO DE FÍSICA

Prof. Sylvio Canuto
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

São Paulo
1999

D 728m
D
ex. 1

MICELAS RESERVAS

SBI/IFUSP 305M8103076

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Souto, Ana Lúcia Carneiro Fernandes

Micelas Reversas e a Interação de Peptídeos Melanotrópicos. São Paulo, 1999.

Tese (Doutoramento) - Universidade de São Paulo. Instituto de Física - Departamento de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Área de Concentração: Física do Estado Sólido - Biofísica

Unitermos: 1. Micelas Reversas;
2. Hormônios Melanotrópicos; 3. Fluorescência;
4. Ressonância Paramagnética Eletrônica.

USP/IF/SBI-041/99

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

ANA LÚCIA CARNEIRO FERNANDES SOUTO

MICELAS REVERSAS E A INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS MELANOTRÓPICOS

Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Física.

Área de concentração: Biofísica, Física do Estado Sólido.

Banca examinadora:
Prof.Dr. Amando Siuiti Ito - *IFUSP*
Prof.Dr. Antônio Alonso - *UFG*
Prof.Dr.Francisco B.T.Pessime - *UNICAMP*
Profa. Dra. Lia Q. do Amaral - *IFUSP*
Prof.Dr. Márcio F. Colombo - *UNESP*

São Paulo
1999

Aos meus dois Jorges

AGRADECIMENTOS

Ao Amando pela orientação onde mostrou, por tantas vezes, confiança em mim e na minha capacidade por mais "esquisitos" que fossem os resultados e/ou idéias. Também por ter compartilhado comigo seus infindos conhecimentos e sabedoria. Uma luz a me guiar pelo vasto universo do conhecimento.

À Carmem Lúcia e Rosângela Itri por terem me iniciado com tanta boa vontade no instigante universo das micelas reversas ... o início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcel Tabak pelo uso de seu espectrofluorímetro e por me acompanhar por horas a fio durante as medidas e, por todas as frutíferas discussões que o tempo nos proporcionou.

À Maria Teresa e Carla pela disponibilidade para a leitura e discussão deste trabalho.

Ao Said, um agradecimento todo especial por nos mostrar sempre uma saída quando pensamos que tudo está perdido, pelo estímulo e por seu enorme poder tranquilizador.

Ao pessoal do grupo de Biofísica e Física Médica pelas tantas trocas de experiência e conhecimentos ao longo de todos estes anos e, também pelo suporte técnico.

À Dirce , Ivone e Julinho pelo apoio imprescindível.

À secretaria da CPG, especialmente à Cláudia e à Gina.

Ao pessoal da biblioteca da Física; especialmente ao Zezinho merecedor da mais alta admiração pela prontidão e qualidade de seu trabalho.

Ao pessoal da Shirley e ao Sartorelli e cia pelo convívio tão agradável e pelas trocas de idéias.

Ao César do audiovisual pelo estímulo e amizade,

Ao CNPq pelo suporte financeiro,

Ao pessoal da escola Waldorf: especialmente à Virgínia e Wânia por compartilharem comigo um novo universo e infinitas experiências. Aos meus alunos por manterem viva em mim a chama da busca pelo conhecimento, pelo simples e enorme prazer de poder compartilhar com eles as descobertas,

Aqueles que de tão especiais e caros não existem palavras suficientes para agradecer: Márcia, Taninha, Belinha, Rosenda, Dalva, Ana Célia, Zélia, Dani, os Bottis, Américo, Tomeh, Andréa, Cau, Claudinha, Leca, Fernando, Gian, Pegepa, Renatinho, Cristiano, Kaline ... E aos da família: pai, mãe, Gilva, Evandro, Cris, Mona, Celso, Luiza, Paula, Pedro e aos MacSbampatos. E também ao Alphie, Sophia, Phelipe e o eterno "Jorge Amado",

Ao Jorge Henrique pelo amor e pelo caminhar juntos,

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram da minha formação em física iniciada nos idos de 1985 ... - Carmem, Pontuscka, Fuad, Hamburguer, entre tantos - ... Especialmente aqueles que me ensinaram muito mais do que a simples física: Marília Caldas, João Zanethic, Manoel e Cecil Robilotta, Elizabeth Yoshimura, Emico Okuno, Marilia Teixeira, Maria Regina Kawamura, Vera Henriques, Edilson Crema, Nelson Carlim e Otaciro,

Ao Wanderley por ter me impedido de desistir deste doutorado logo no seu começo. Um agradecimento especial aquele que de certa forma é meio pai deste trabalho. E, vamos a ele....

RESUMO

Sabe-se que em sistemas biológicos, as funções de proteínas e de hormônios estão relacionadas com suas conformações espaciais e que suas estruturas e funções são freqüentemente influenciadas pela interação com os lipídeos das membranas plasmáticas e/ou intracelulares. Devido à importância das interações entre as proteínas e hormônios com as membranas, vários estudos têm sido realizados empregando modelos que simulam as membranas, pois as biológicas são estruturas bastante complexas. Entre esses modelos está o de micelas reversas que pode ser considerado atualmente como o que melhor reproduz as condições existentes *in vivo,* pois a água presente nesse sistema é uma ótima representação para a água presente em sistemas biológicos em torno dos receptores de membrana.

Visando estudar a interação do hormônio melanócito estimulante (α- MSH) e do peptídeo sintético melanotrópico análogo (MSH1) com um modelo de membrana, na tentativa de compreensão de seu papel biológico, usamos micelas reversas preparadas com o anfifílico bis-(2-etilhexil)sulfosucinato de sódio, abreviado AOT. É sabido que o α- MSH é importante na regulação da pigmentação da pele, além de estar relacionado a vários processos fisiológicos e neurológicos. Mais recentemente, foram encontradas evidências de que ele atua também como neurotransmissor ou neuromodulador na aprendizagem, memória e capacidade de concentração. Clinicamente, os peptídeos melanotrópicos podem eventualmente ser utilizados no tratamento de alterações pigmentares e na detecção e erradicação de melanomas.

Realizamos medidas de ressonância paramagnética eletrônica e de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo para estudar a dinâmica interna dos peptídeos melanotrópicos na interação com micelas reversas de AOT. Monitoramos a fluorescência do resíduo Triptofano localizado na nona posição da seqüência de aminoácidos dos peptídeos melanotrópicos. A supressão da fluorescência do resíduo triptofano por acrilamida (que fica no meio micelar) também foi medida para auxiliar na tentativa de localizar a posição do fluoróforo nas micelas reversas.

Dos espectros de EPR obtidos com o marcador de spin 5-SASL observamos que, com o aumento do tamanho das micelas reversas pelo aumento da quantidade de água, a região das cabeças polares tende a ficar flexível enquanto que, em oposição, aumenta a rigidez, a polaridade e a ordem da região das cadeias. Os resultados obtidos para o acréscimo de solução tampão fosfato e para soluções contendo Trp, LTL, α-MSH e MSH1 são similares mostrando que essa técnica fornece informações sobre as micelas, independente da interação das mesmas com os peptídeos.

Dos resultados obtidos com a fluorescência para o grau de anisotropia, tempo de vida e comprimento de onda de máxima emissão observamos que os fluoróforos utilizados (Trp, LTL, α-MSH e MSH1) experimentam uma região menos polar e mais rígida do que a água. Vimos também que com o aumento da quantidade de água nas micelas reversas os peptídeos e o aminoácido tendem a assumir determinadas localizações na interface, sendo

que o Triptofano fica no meio mais hidratado que não é a água *bulk*. Os espectros de decaimentos associados mostram a ocorrência de conformações com diferentes graus de exposição do Triptofano ao ambiente aquoso. Assim, pudemos perceber que o Trp é o mais exposto à água tendendo a localizar-se na região de água estruturada. O LTL fica ancorado na região da interface e os peptídeos melanotrópicos inserem-se na região das cadeias hidrocarbônicas, sendo que o α-MSH insere-se mais profundamente. Observamos também dos espectros de decaimentos associados diferenças das distribuições conformacionais para os hormônios melanotrópicos, especialmente para as micelas reversas maiores que simulam a situação biológica, o que pode estar relacionado com as diferentes atividades biológicas dos mesmos.

ABSTRACT

The biological function of proteins and hormones is related to their conformations and both structure and function are frequently dependent on the interactions with lipids of plasmatic and intracelular membranes. Due to the complexity of biological membranes, many studies about these interactions employ model membranes. The reverse micelle is a good model, for it offers an adequate representation of the structured water that is present in biological systems around the membrane receptors.

We report here studies of the interaction of α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) and one synthetic analogue (MSH1) with reverse micelles prepared from the amphyphylic sodium bis-(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) in isooctane. The α-MSH is important in the regulation of skin pigmentation and is also involved with other physiological process. It was recently found evidences of its action as a neurotransmitter or neuromodulator in learning, memory and attention. It is claimed that potent analogues of melanotropin hormones could be used in the therapy of pigmentary disorders and detection and treatment of melanome.

Electron paramagnetic resonance (EPR), steady state fluorescence and time-resolved fluorescence were employed to study the internal dynamics of the melanotropins in interaction with reverse micelles of AOT. We monitored the fluorescence of the residue tryptophan located in the 9 position of the aminoacids sequence of α-MSH and MSH-1. The tripeptide lysil-tryptophyl-lysine (LTL) and the isolated aminoacid tryptophan were also investigated as simpler molecules interacting with the reverse micelles. It was also measured the fluorescence quenching by acrylamide, to obtain more information about the peptide location in reverse micelles.

We monitored the EPR spectra of the spin label 5-doxyl stearate acid (5-SASL) at increasing values of w_o that is the ratio between the number of water molecules and the number of AOT molecules. The region of the polar head gains flexibility when the size of the reverse micelles increases (due to increase in water content) and, opposite to this, the region of the hydrophobic tail becomes more rigid, showing higher order and polarity. Similar effects were observed upon addition of solutions containing either tryptophan, or LTL, or α-MSH and MSH-1, indicating that the EPR measurements gave information about the changes in the micelles promoted by water molecules, independent of the interactions with the peptides.

Monitoration of fluorescence parameters like spectral position of emission band, anisotropy and lifetime demonstrated that the environment around the fluorophore, in all compounds, is less polar and more rigid than bulk water. Those parameters reflect the location of the compounds in the heterogeneous isooctane/AOT/water medium and are sensitive to the changes induced in the micelles by the increasing the amount of water. However, in large micelles having w_o above 10, the modifications detected by fluorescence are small and the addition of water no more affects the location of the fluorophores. Quenching measurements gave additional support to the data indicating that the different compounds occupy different positions in the large reverse micelles, but in

any case they are in the interface region, without dispersing into the bulk water. Decay associated spectra allowed the identification of conformations with various degree of exposition to polar and non polar media. The conformation related to the long lifetime is more exposed to water while that associated to the intermediate lifetime is preferentially stabilised in non polar media. The native hormone α-MSH in the large micelles shows predominance of the conformation sensing a non polar environment, with similar results presented by the analogue MSH-1. Those melanotropins are in the region of the hydrocarbon chain, with slightly deep location for the native hormone. The tripeptide LTL is anchored in the interface region, probably stabilised by electrostatic interaction between the charged groups in the peptide and the negative charge in AOT. Finally, the tryptophan is most exposed to water, probably interacting with structural water near to the interface.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS iv

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1) Lipídeos e seus agregados 001
2) Membranas Biológicas 003
3) Proteínas e interação proteína-membrana 005
4) Micelas reversas 006
5) Melaninas e Hormônios Melanotrópicos 012
OBJETIVOS 016

CAPÍTULO II - TEORIA: PRINCÍPIOS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS UTILIZADAS. FLUORESCÊNCIA ESTÁTICA E RESOLVIDA NO TEMPO E RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

I) FLUORESCÊNCIA 020
I.1 Supressão de Fluorescência 025
I.1.a. Modelo da Supressão Dinâmica ou por Colisão 026
I.1.b. Modelo da Supressão Estática 028
I.1.c. Combinação de Supressões Estática e Dinâmica 030
I.1.d. Outros Modelos 031
I.2. Anisotropia de Fluorescência de Estado Estacionário 033
I.3. Fluorescência Resolvida no Tempo - Decaimento 034
II) RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA 035
II.1. Teoria de Ressonância Paramagnética Eletrônica 036
II.1.a. Termo Zeeman 037
II.1.b. Termo de Acoplamento Hiperfino 039

II.2. EPR com Marcador de Spin 041
II.3. Espectroscopia de EPR 043
II.3.a. Desdobramento Hiperfino 043
II.3.b. Anisotropia 044
II.3.c. Parâmetro de Ordem (S) e Mobilidade 046
II.3.d. Polaridade 050
II.4. Relaxação do Spin - Tempos de Correlação Rotacional 051

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Materiais Utilizados 055
a) Isooctano 055
b) AOT 056
c) Triptofano 058
d) Lisil-triptofil-lisina 060
e) Peptídeos Melanotrópicos: α-MSH e MSH 1 062
f) 5-SASL 065
III.2. Preparação de Amostras 066
a) Soluções estoque de fluoróforos 10^{-3}M em tampão fosfato 50mM 066
b) Preparação das Micelas Reversas de AOT 066
c) Variação do valor de w_0 nas micelas utilizadas 067
d) Preparação das amostras de micelas reversas com o 5-SASL 068
III.3. Equipamentos Utilizados 069
III.4. Medidas Preliminares de Absorção Ótica 071

CAPÍTULO IV - MEDIDAS DE RPE EM MICELAS REVERSAS DE AOT 50mM OBTIDAS COM O 5-SASL - RESULTADOS OBTIDOS, ANÁLISES E DISCUSSÕES

1) 5-SASL e a adição da interface de AOT 074
2) Variação do espectro de 5-SASL com a variação da quantidade de água presente nas micelas reversas de AOT 077

3) A adição de peptídeos ao sistema de micelas reversas de AOT 088

CAPÍTULO V - MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE ESTADO ESTACIONÁRIO E RESOLVIDA NO TEMPO - RESULTADOS OBTIDOS E ANÁLISE

1) Posição Espectral 098
2) Anisotropia de Estado Estacionário 103
3) Rendimento Quântico 108
4) Supressão da Fluorescência do Triptofano por Acrilamida 112
5) Tempo de Vida do Decaimento Fluorescente 122
6) Espectro de Decaimento Associado 128
   6a) EDA para o Trp 129
   6b) EDA para o LTL 131
   6c) EDA para o α-MSH 134
   6d) EDA para o MSH 1 136

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES

1) Micelas Reversas 142
2) Os peptídeos e as micelas reversas 143
3) Propostas de Trabalhos Futuros 145

CAPÍTULO VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 147

LISTA DE ABREVIATURAS

w_o	Razão molar entre o número de moléculas de água por cabeça de anfifílico
AOT	Bis-(2-etilhexil)sulfosucinato de sódio, aerosol-OT
α-MSH	Hormônio estimulante do melanócito
MSH 1	[Nle ^{4} , Dphe ^{7}] - α-MSH
LTL	Lisil-triptofil-lisina
Trp	Triptofano
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
k_f	Taxa de decaimento do sinal fluorescente
k_{ic}	Taxa de decaimento do sinal fluorescente por conversão interna
k_{is}	Taxa de decaimento do sinal fluorescente por cruzamento entre sistemas
$k_q[Q]$	Taxa de supressão da emissão fluorescente
[Q]	Concentração do supressor de fluorescência
ϕ_f	Eficiência ou rendimento quântico
τ_o	Tempo de vida de fluorescência na ausência de supressor
τ	Tempo de vida de fluorescência na presença de supressor
$K_{sv} = k_d$	Constante de supressão de Stern-Volmer (supressão dinâmica ou por colisão)
$I_o = F_o$	Intensidade de emissão fluorescente na ausência de supressor
$I = F$	Intensidade de emissão fluorescente na presença de supressor
k_s	Constante de supressão estática da emissão fluorescente
V	Constante de supressão da emissão fluorescente (esfera de ação em torno do supressor)
A	Anisotropia
$I_{//}$	Intensidade de emissão fluorescente paralela à luz polarizada incidente
$I_{\perp}$	Intensidade de emissão fluorescente perpendicular à luz polarizada incidente
5-SASL	Ácido 5-doxil estearato (marcador de spin)
$\tau_{//}$	Tempo de correlação rotacional paralelo do marcador de spin
$\tau_{\perp}$	Tempo de correlação rotacional perpendicular ao eixo de simetria do marcador de spin

r_H	Raio hidrodinâmico das micelas reversas
h_{+1}	Intensidade do pico de campo baixo nos espectros de EPR
h_0	Intensidade do pico de campo central nos espectros de EPR
h_{-1}	Intensidade do pico de campo alto nos espectros de EPR
$A_{máx}$	Desdobramento hiperfino máximo (externo)
A_{min}	Desdobramento hiperfino mínimo (interno)
a_N	Constante de desdobramento hiperfino
S	Parâmetro de ordem
S^{ef}	Parâmetro de ordem efetivo
$\lambda_{máx}$	Comprimento de onda da máxima intensidade de emissão fluorescente
A_o	Área sob o espectro de emissão fluorescente na ausência de supressor
A	Área sob o espectro de emissão fluorescente na presença de supressor
Acr	Acrilamida
EDA	Espectro de decaimento associado

INTRODUÇÃO

1) Lipídeos e seus agregados

Lipídeos são substâncias sintéticas ou de origem biológica passíveis de solubilização em solventes orgânicos, como por exemplo clorofórmio e metanol mas pouco solúveis em água. Compreendem os ácidos graxos (que possuem longas cadeias de carbono), os triglicerídeos (que são não polares e, portanto, insolúveis em água), os glicerofosfolipídeos (moléculas anfifílicas pois possuem uma região hidrofílica, a da cabeça polar, e outra região hidrofóbica ou não polar, normalmente a região das cadeias hidrocarbônicas) e, por fim, os esfingolipídeos (também anfifílicos) (Israelachvili, 1992). Esses dois últimos tipos de lipídeos, os glicerofosfolipídeos e os esfingolipídeos, são os únicos anfifílicos e, também, os principais constituintes das membranas biológicas; sendo assim é importante saber como eles se agregam formando estruturas mais complexas – a membrana biológica.

Os anfifílicos, ou as moléculas que possuem uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica, associam-se em várias estruturas diferentes quando em soluções aquosas, podendo formar micelas esféricas, micelas cilíndricas, vesículas e bicamadas flexíveis, bicamadas planares e micelas reversas (Figura I-1) dependendo de fatores como: área da cabeça polar, grau de empacotamento das cadeias hidrocarbônicas, temperatura e mistura e concentração e tipo de moléculas utilizadas.

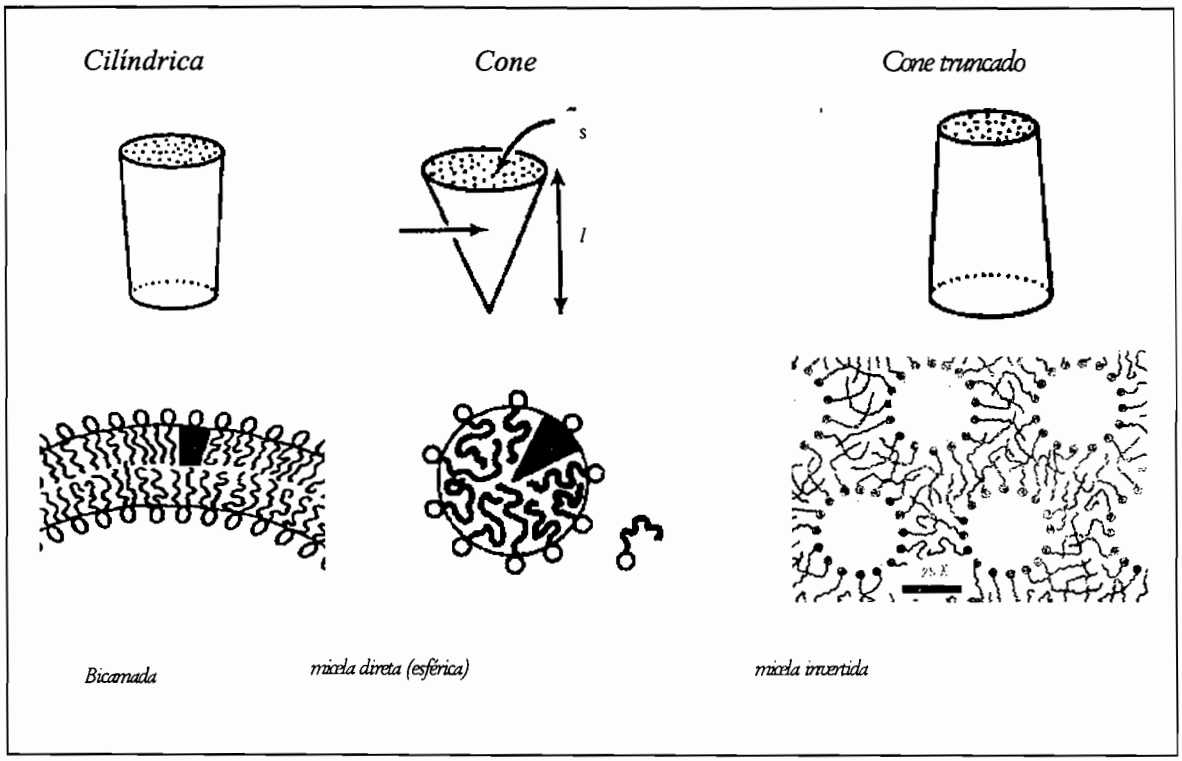


Figura I-1: Os vários tipos possíveis de agregação de anfifílicos e sua relação com a forma das moléculas.

Estas estruturas podem se transformar entre si quando as condições das soluções são alteradas como, por exemplo, o pH ou a concentração de eletrólitos.

Como os anfifílicos são os principais constituintes das membranas biológicas, seus agregados podem ser considerados modelos simplificados das membranas biológicas e desta forma utilizados para a investigação da interação destas, sendo chamadas neste caso de membranas modelo. Estas podem ser utilizadas para estudar a própria estrutura da membrana e/ou a interação com proteínas e outras substâncias.

2) Membranas biológicas

As membranas biológicas são as estruturas celulares mais comuns estando envolvidas em quase todos os aspectos da atividade celular, desde simples funções mecânicas como mobilidade e transporte de nutrientes até processos altamente específicos como transdução de energia, reconhecimento imunológico, condução nervosa e biosíntese (Israelachvili, 1992).

As membranas biológicas são formadas por proteínas, glico-proteínas e oligo e polisacarídeos associados com uma matriz de lipídeos. São estruturas muito complexas possuindo normalmente cinquenta ou mais proteínas diferentes e uma quantidade enorme de fosfolipídeos e glicolipídeos com os mais variados grupos polares, número e comprimento de cadeias hidrocarbônicas, e graus de insaturação, além de esteróides e outras moléculas anfifílicas. Muitas das funções membranares estão associadas com a ligação de substratos (proteínas, hormônios, etc.) em sua superfície; neste processo as proteínas funcionam como receptores de membranas recebendo sinais químicos que visam regular a atividade celular.

O modelo mais aceito para as membranas é o de mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson em 1972 que considera a membrana como uma matriz bimolecular lipídica onde são encaixadas as proteínas conforme apresentado na Figura I-2.

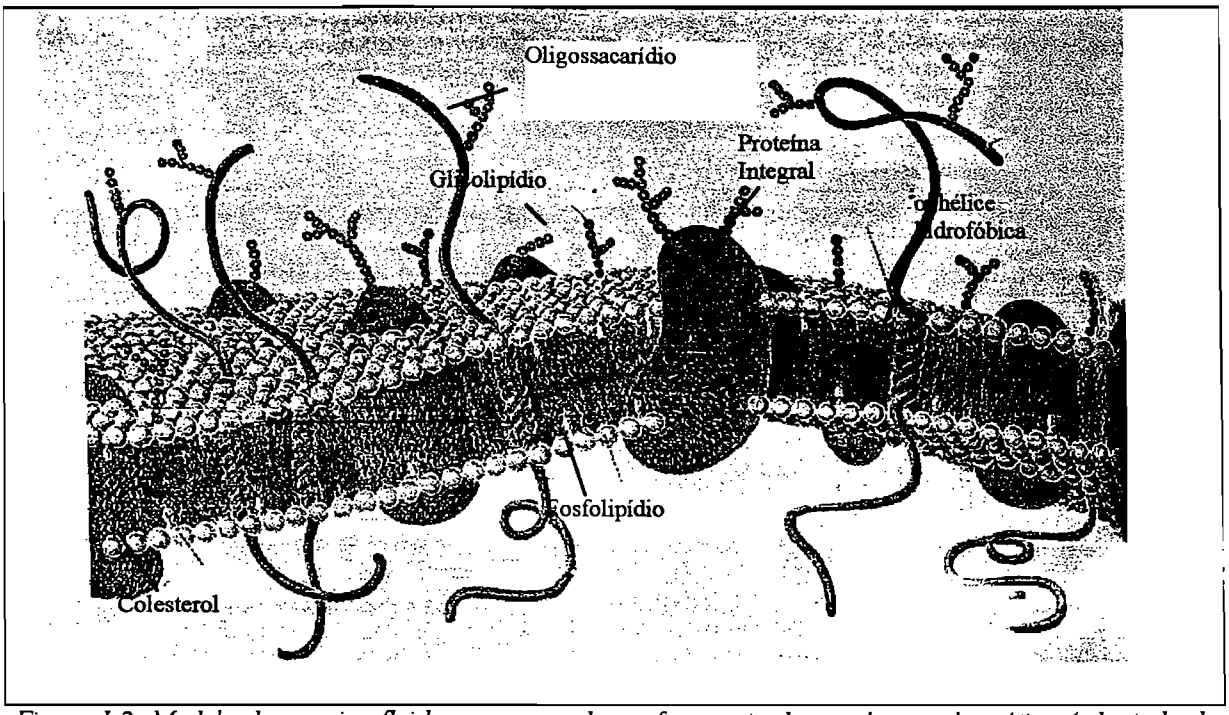


Figura I-2: Modelo de mosaico fluido – esquema de um fragmento da membrana plasmática (adaptado de Voet and Voet, 1995)

As membranas biológicas são estruturas dinâmicas, principalmente porque não existem ligações químicas entre os lipídeos, possuindo movimentos laterais randômicos paralelos à superfície da mesma o que lhe confere um caráter fluido. Assim, tanto os lipídeos quanto as proteínas das membranas movem-se no plano da superfície das mesmas (Singer, 1972). Entretanto, podem ser formados domínios heterogêneos e agregados locais de lipídeos e de proteínas que são importantes para o funcionamento normal da membrana como um todo e de seus constituintes.

Apesar dos movimentos presentes, as membranas são estruturas estáveis, mantendo sua integridade estrutural talvez como resultado da mistura heterogênea de lipídeos que devem ser capazes de se auto-arranjarem em bicamadas.

3) Proteínas e interação proteína-membrana

As proteínas compreendem tanto longas cadeias poliméricas formadas por peptídeos quanto simplesmente uma seqüência de aminoácidos; que possuem funções dependentes da conformação espacial. A conformação espacial depende em primeira instância da seqüência de aminoácidos ou estrutura primária, sendo então completamente descrita pelas interações covalentes. Já o arranjo espacial dos resíduos aminoácidos que estão próximos na seqüência linear define a estrutura secundária. Alguns desses arranjos possuem regularidades originando estruturas periódicas, como por exemplo as hélices α e as dobras β, que denominamos estrutura terciária. Assim, a estrutura terciária das proteínas refere-se ao arranjo espacial dos resíduos aminoácidos que estão distantes uns dos outros na cadeia linear.

Proteínas que contém mais de uma cadeia polipeptídica possuem um nível adicional de organização estrutural – a estrutura quaternária que se refere ao arranjo espacial das cadeias e a natureza das interações entre as mesmas. Além desses níveis podemos ter também associações ou formações de agregados de estruturas secundárias, quando a proteína for grande suficiente para possuir mais do que um tipo de estrutura secundária, por exemplo, duas dobras β separadas por uma hélice α. Algumas cadeias polipeptídicas podem ainda possuir regiões mais compactas que outras formando domínios.

Existem proteínas solúveis e insolúveis em água dependendo da conformação espacial que pode expor as regiões hidrofílicas ou hidrofóbicas. As solúveis em água possuem a superfície hidrofílica enquanto que as insolúveis expõem sua região hidrofóbica.

Em sistemas biológicos, a estrutura e a função das proteínas presentes são freqüentemente influenciadas pela interação com os lipídeos das membranas plasmáticas (as que separam as células do meio exterior) e/ou das membranas intracelulares (que recobrem cada um dos elementos celulares). Mais ainda, as próprias membranas têm suas funções determinadas pelas proteínas ali presentes (Chapman et al., 1979). Assim, vários modelos que consideram a interação das proteínas com as membranas têm sido propostos

na tentativa de explicar a atuação das mesmas nos sistemas biológicos, estendendo-se desde estudos das interações internas das próprias proteínas e hormônios até estudos envolvendo modelos de membranas.

Vários desses estudos conseguiram responder questões sobre aspectos estruturais e topológicos das próprias membranas. Mas só recentemente foi proposto por Sargent e Schwyzer (1986) um modelo mais completo pois considera também as interações existentes entre os lipídeos e as proteínas (como no caso da interação de hormônios ligados a receptores de membranas). Este modelo introduz vários passos ou processos na interação entre o ligante (proteína e/ou hormônio) e o receptor, a saber:

1) o acúmulo dos ligantes (proteínas e/ou hormônios) na superfície da membrana,
2) a formação de uma conformação ou de uma orientação favorável à interação com o receptor e como resultado de interações lipídeo - ligante ,
3) a ligação com o receptor da membrana.

Assim, as interações existentes entre as proteínas e/ou hormônios com as membranas são consideradas como reguladas pela constante de associação dos ligantes, heterogeneidade dos receptores de membrana (normalmente específicos para os ligantes) e características de ligação das membranas celulares.

4) Micelas reversas

O uso de moléculas anfifílicas que formam sistemas microestruturais, especialmente o de micelas reversas, para estudar as interações inter e intramoleculares existentes entre estas moléculas e proteínas tem crescido ultimamente principalmente quando é desejável reproduzir *in vitro* condições biológicas (Fendler, 1982). Segundo Lissi et al. (1990) as micelas reversas podem ser consideradas como um modelo primitivo de sistemas

biológicos, devido à sua simplicidade. Porém, apesar de ser um modelo deveras simples é considerado por alguns (Martinek et al., 1986; Luisi et al., 1986) como o que melhor reproduz as condições existentes *in vivo* pois a água altamente estruturada nas micelas reversas é uma ótima representação para a água presente em sistemas biológicos, especialmente a água presente em torno dos receptores de membranas, além de simular a natureza anfipática das membranas biológicas (Sarkar et al., 1996). Ainda, soluções micelares são sistemas modelos amplamente utilizadas com o intuito de investigar ambientes restritos (Pileni,1989 e Luisi,1987) que são conhecidos como facilitadores de processos físicos e químicos (Riter et al., 1998; Stryer, 1995 e Zuber, 1993).

Normalmente esses sistemas microestruturais são usados para tratar os seguintes problemas: sob quais condições ocorrem as interações entre anfifílicos e proteínas ? Qual é a natureza desta interação ? Em que grau a estrutura e função das proteínas são alteradas nesta ligação ?

Micelas reversas são estruturas auto-organizadas de anfifílicos, termodinamicamente estáveis em solventes orgânicos (Eicke, 1980) e compostas por um solvente polar separado pela interface de surfactante de um solvente não polar; ou seja, um sistema terciário formado por água, detergente e um solvente orgânico. Para micelas reversas, as interações entre as cabeças polares do surfactante com o solvente polar formam um *pool* de solvente interno (normalmente água) bem definido. Esses *pools* internos podem ser vistos como microambientes onde algumas reações ocorrem e onde não apenas a concentração do reagente é controlada (Barzykin,1996) mas também a reatividade é determinada pela estrutura e microambiente das micelas reversas (Kalyanasundaram, 1987 ; Mukhopadhyay, 1997 e Mukherjee, 1995; Fendler,1980). As micelas reversas são entidades dinâmicas que trocam entre si e com o solvente *bulk* suas interfaces de surfactantes e o conteúdo de seus *pools* aquosos. Suas características estruturais como: formato, tamanho e conteúdo do *pool*, podem ser alteradas por substâncias solúveis que introduzem modificações no equilíbrio molecular na interface de surfactante e no *pool* aquoso.

O parâmetro estrutural das micelas reversas é a razão molar entre a água e o anfifílico, ou w_o = [água]/[anfifílico] , ou a quantidade de moléculas de água por cabeça de anfifílico; fator determinante tanto do tamanho dos agregados quanto das propriedades físico-químicas da água interna. Elas são formadas através da simples dissolução de moléculas de detergente em óleo, visto a presença de uma quantidade mínima residual de água nas moléculas de AOT. Isto, porque as moléculas de detergente são anfifílicas e adotam naturalmente uma estrutura onde a água fica escondida em um *pool* aquoso. As micelas reversas permitem, então, a investigação das propriedades da água que fica compartimentalizada dentro destas estruturas porque suas propriedades são fortemente influenciadas pela ligação de moléculas polares (água) em sua região hidrofílica ou nas cabeças polares do detergente.

Na literatura têm sido mostrado que as propriedades da água presente nas micelas reversas são diferentes das encontradas para a água *bulk* (Martinek et al., 1986 e Luisi et al., 1986). O *poo*l aquoso foi caracterizado através de Ressonância Magnética Nuclear (Frank et al., 1973 e 1968), espectroscopia de infravermelho (Ekwall et al., 1969), volume específico (Mathews et al., 1953) e solubilidade de eletrólitos (Aebi et al., 1959). Todos os parâmetros obtidos com estes experimentos para a água presente em micelas reversas foram diferentes daquelas para a água *bulk* indicando que existe uma forte interação entre os dipolos da água com a interface de anfifílicos. Conclusões similares foram obtidas por ressonância paramagnética eletrônica (Menger et al., 1975) e por estudos da cinética da hidrólise de ésteres no *pool* aquoso (Menger et al., 1973).

Em micelas reversas são encontradas diferentes espécies de água dependendo de sua localização no sistema: as águas isoladas que se encontram aprisionadas na região das cadeias hidrocarbônicas, as águas presas e praticamente imobilizadas na região das cabeças polares do anfifílico formando a interface anfifílico - água e, as moléculas de água *bulk* no interior do pool aquoso, sendo que existe uma troca entre as populações destas espécies (Lenz et al., 1995; Ikushima et al. 1997). As moléculas de água próximas às cabeças polares do anfifílico, ou as de água estruturada, possuem polaridade menor do que a da água *bulk* (Menger et al., 1973). Quando comparamos o modelo de micelas reversas com

outros modelos existentes para as membranas observamos que o primeiro é vantajoso pois sua microestrutura simples permite um estudo detalhado das interações de solubilizados (ou moléculas hóspedes) com a monocamada de anfifílicos na interface água/anfifílico variando o estado de solvatação das cabeças polares (Nicot et al., 1985). Nestes casos as propriedades da água dependem criticamente da razão molar entre a água e o detergente, ou seja, do valor de w_o.

O anfifílico bis-(2-etilhexil)sulfosucinato de sódio (AOT ou aerosol-OT) é um surfactante aniônico complexado com um contra-íon, usualmente o sódio, muito usado em estudos envolvendo micelas reversas (De and Maitra,1995), devido à sua capacidade de solubilizar água em quantidades relativamente grandes em vários líquidos hidrofóbicos (solventes apolares) (Higashi et al., 1962; Frank et al., 1973 e Frank et al., 1967). Além disso, as pesquisas realizadas com micelas reversas de AOT são bastante atrativas pois, do ponto de vista do interesse industrial, são usadas no processo de limpeza a seco e, do ponto de vista científico, a água adicionada neste sistema produz uma organização molecular similar à água presente em bioagregados, por exemplo: biomembranas, mitocrondrias, etc.

Microemulsões de AOT formam uma grande gama de estruturas variando desde discretas gotas de água até complexos agregados micelares. A estrutura de AOT mais investigada é a de micelas reversas esféricas monodispersivas. Os tamanhos destas micelas estão diretamente relacionados à razão entre quantidade de moléculas de água por cabeça polar de surfactante (w_o). As moléculas de água que ficam no interior dessas micelas reversas estão ou livres ou ligadas à interface de AOT, podendo interagir com várias regiões do surfactante. Estas interações incluem ligações de hidrogênio da água com o oxigênio do sulfonato ou do sucinato do AOT, interações íon - dipolo com a cabeça polar aniônica do surfactante e interações dipolo-dipolo com o grupo sucinato.

Várias características das micelas reversas de AOT tem sido investigadas (De e Maitra, 1995). Em estudos espectroscópicos de estado estacionário, Wong et al. (1976 e 1977) observaram que a polaridade da água do *pool* aumenta com o aumento do raio micelar, atribuindo este aumento ao aumento do número de moléculas de água livre no *pool*

e sugerindo que a interação entre a água e o Na^+ provoca uma rigidez na estrutura da água em micelas reversas com w_o=1,5. Belletête (1990) observou que a constante dielétrica efetiva na interface água/surfactante aumenta com o aumento de w_o , saturando por volta de w_o=12. Ele atribuiu este resultado à ligação da água às cabeças polares dos surfactantes. Correa et al.(1996 a e b) estudando a micropolaridade da água em micelas reversas de AOT, observaram um aumento na polaridade com o aumento da quantidade de água para w_o maior do que 10.

Vários pesquisadores têm estudado a dinâmica da água nas micelas reversas de AOT. Zhang et al. (1991) estudaram a reorganização da água no interior das micelas reversas de AOT na escala de tempo de nanosegundos usando espectroscopia de fluorescência do ácido 1,8-anilino-8-naftalenosulfônico (ANS). Para w_o menor do que 2,5, eles encontraram dois processos de relaxação que atribuíram à reorganização da água livre e da água ligada. Para w_o maior do que 2,5 foi obtido um único processo de reorganização. De maneira geral, eles observaram que as constantes de decaimento diminuem com o aumento de w_o . Cho et al. (1995) também investigaram o interior das micelas reversas de AOT usando a técnica de fluorescência resolvida no tempo; e sugeriram que as moléculas de água próximas à interface comportam-se da mesma maneira que as moléculas de água do gelo, possuindo fortes interações com a superfície das cabeças polares. Sarkar et al. (1996) medindo a fluorescência resolvida no tempo da Coumarina 480 em soluções micelares observaram modificações nos processos de relaxação das moléculas de água em vários ambientes do *pool* aquoso.

Estudos da dinâmica de resposta da água dentro de micelas reversas através de experimentos de dinâmica de solvatação polar têm mostrado dois tipos diferentes de movimentação do solvente: um componente ultra-rápido (menor do que 100fs) atribuído à uma resposta inercial do solvente e um componente mais vagaroso (de centenas de fentosegundos a picosegundos) devido à difusão (Stratt et al., 1996).

Como nas micelas reversas é muito simples de se encontrar a razão de água por surfactante, elas formam um sistema onde a população de água pode ser variada de

totalmente ligada até água livre (*bulk*). Pode-se assumir que a água ligada neste sistema é bem similar à água interfacial associada com membranas biológicas *in vivo*, especialmente com a água próxima a receptores de membranas. Este efeito tem estimulado vários estudos utilizando as micelas reversas como modelos para a interação de proteínas e hormônios com receptores de membranas para posteriores aplicações em sistemas químicos e biológicos.

5) Melaninas e Hormônios melanotrópicos

O sistema pigmentar, constituído principalmente por melanócitos (células especializadas produtoras de melanina) é um fator de proteção dos mais importantes que os seres humanos possuem. Contudo, apesar de sua importância, este sistema é também um dos menos conhecidos dada a enorme dificuldade de investigá-lo. Isto é enfatizado quando constatamos que a melanina, substância fundamental deste sistema, apesar de ser objeto de vários estudos possui sua estrutura química parcialmente desconhecida. Este quadro agrava-se quando abordamos temas tais como: vitiligo, melanose actínica, melanoma maligno e outros.

A melanina é um heteropolímero sintetizado nos melanócitos (células que apresentam o núcleo arredondado, com cromatina fina e nucléolo proeminente e, além das organelas subcelulares habituais ainda apresentam melanossomos, microtúbulos e filamentos), mais precisamente dentro dos melanossomos, através da conversão da tirosina pela ação da tirosinase.

A radiação ultravioleta (UV) é o maior estímulo para o aumento da produção de melanina pelos melanócitos (Ishikawa et al.,1984). Mas, além deste estímulo, certos hormônios, chamados hormônios melanotrópicos ou melanotropinas, podem também atuar no sentido de provocar aumento na pigmentação.

Situações patológicas podem causar a hiperpigmentação (melanomas) ou hipopigmentação (vitiligo) e alguns agentes físicos podem provocar mudanças no grau de pigmentação, como o bronzeamento solar (Souto,1993; Biaggi et al., 1993). Assim, é importante compreender o papel biológico dos hormônios que estimulam os melanócitos nas células, como o hormônio melanócito estimulante (MSH) que leva ao escurecimento da epiderme, ou o hormônio concentrador de melanina (MCH) que provoca o clareamento da epiderme (Castrucci et al, 1989). Clinicamente falando os peptídeos melanotrópicos podem eventualmente ser utilizados no tratamento de alterações pigmentares e na detecção e erradicação de melanomas (Hruby et al.,1984)

O α- MSH é um tridecapeptídeo cuja seqüência de aminoácidos é: Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH2. Cada um dos peptídeos melanotrópicos compartilha uma seqüência central comum, Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, da qual a seqüência His-Phe-Arg-Trp é reconhecida como a seqüência mínima essencial para que o hormônio apresente atividade biológica (Hadley et al.,1989).

O α- MSH é sintetizado e secretado pela *pars intermedia* da glândula pituitária (hipófise). É derivado de uma grande proteína precursora, pro-opiomelanocortina. É o principal hormônio que atua na regulação da pigmentação da maioria dos vertebrados (Castrucci et al., 1989). O α- MSH interage com receptores de membrana para ativar a enzima adenilato ciclase, que produz um aumento nos níveis intracelulares de AMP (adenina 3', 5' monofosfato) cíclico. Este último é o mensageiro intracelular que regula a melanogênese e movimenta o melanossoma no interior dos melanócitos normais. O α-MSH aumenta os níveis de AMP cíclico intracelulares em melanócitos transformados, células de melanoma, e essa resposta é seguida pelo aumento de produção de melanina a partir do substrato, tirosina, devido à ação da enzima, tirosinase (Pawelwk, 1976; Fuller & Viscochil, 1979).

É sabido há muito tempo que o α- MSH é importante na regulação da pigmentação da pele (Sawyer et al., 1980; Al-Obeidi et al., 1989a e 1989b), além de estar relacionado a vários processos fisiológicos e neurológicos. Mais recentemente foram encontradas

evidências que ele atua também como neurotransmissor ou neuromodulador na aprendizagem, memória e capacidade de concentração (Jegou et al., 1993).

Têm sido realizados estudos que relacionam a estrutura química do α-MSH com sua atividade biológica, na procura por hormônios com funções análogas mas que sejam mais potentes e com atividades prolongadas (Sawyer et al., 1980; Hruby et al., 1983; Al-Obeidi et al., 1989a e 1989b). Foi observado que a seqüência central formada por His-Phe-Arg-Trp é essencial para a ativação desse hormônio como agente pigmentário, ou seja, como ativador do processo de melanização (Hruby et al., 1984). A exploração das características dessa seqüência central fez com que fosse desenvolvido um hormônio análogo ao α-MSH o [Nle^4, D-Phe^7] α-MSH, conhecido como MSH 1. Em bioensaios com pele de sapo o MSH 1 apresentou um aumento da potência e uma atividade mais prolongada quando comparado com o obtido com o α-MSH (Sawyer et al., 1980). Sua super-atividade foi atribuída à presença de uma dobra β estabilizada pelo resíduo D-Phe^7 e por uma possível ponte salina entre Glu^5 - Arg^8 ou Glu^5 - Lys^{11} (Sugg et al., 1988; Al-Obeidi et al., 1989c; Hruby et al., 1988 e 1993). A importância dessa dobra β na atividade biológica das melanotropinas foi verificada em análogos cíclicos do α-MSH contendo pontes dissulfeto (S-S) e lactâmicas (Hruby et al., 1993). A estrutura das cadeias laterais da seqüência central também deve ser importante para a atividade biológica. Foi sugerido que a alta atividade biológica pode ser observada nos análogos ao α-MSH que contém em uma extremidade os resíduos His, Phe e Trp e na outra extremidade o resíduo Arg (Sugg et al., 1988 e Hruby et al., 1993).

Ensaios de atividade biológica mostraram que a seqüência mínima para a ação biológica é His^6-Phe^7-Arg^8-Trp^9, a qual inclui o Triptofano, cujas propriedades fluorescentes permitem seu uso como uma sonda intrínseca, de onde se obtem informações sobre estes peptídeos.

Os receptores de membrana para o α-MSH têm sido clonados e identificados como pertencentes à família do receptor da proteína G (Mountjoy et al., 1992; Chhajlani et al., 1992 e Grantz et al., 1996). Por outro lado, existem vários artigos indicando que o α-MSH e alguns análogos potentes apresentam afinidades por membranas lipídicas (Ito et al., 1993;

Biaggi et al., 1996 e 1997 e Macedo et al., 1996). Existe uma correlação entre o aumento da atividade de pigmentação e a força de interação com membranas modelo e, em particular, resultados de espectroscopia de fluorescência (Ito et al., 1993) e de dicroísmo circular (Biaggi et al., 1997) sugerem diferenças estruturais para os peptídeos em água e na fase lipídica de vesículas com a estabilização da dobra β na região central do peptídeo. Este fato deve ser consistente com a hipótese da importante participação da fase lipídica na interação entre o hormônio e seu receptor na membrana biológica.

Tanto o α-MSH como seus análogos sintéticos têm sido estudados dentro do grupo de Biofísica e Física Médica do IFUSP. Biaggi et al. (1993), analisando a interação do α-MSH e do MSH-I com membranas modelos, por Ressonância Paramagnética Eletrônica, verificaram mudanças na ordem/mobilidade das bicamadas quando em presença destes hormônios. Ito et al. (1993) observaram mudanças no espectro de fluorescência de estado estacionário e variações no tempo de vida fluorescente do resíduo Trp, para os hormônios α-MSH , MSH-I e MSH-II , em presença de vesículas unilamelares. Estes trabalhos forneceram os primeiros indícios sobre a inserção dos hormônios melanotrópicos na fase lipídica das bicamadas, possivelmente acompanhada de uma mudança conformacional dos hormônios após esta interação. Mais tarde, estas observações foram confirmadas e, determinou-se a profundidade de penetração do α-MSH em vesículas de dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG), através de experimentos de supressão de fluorescência. Pascutti (1996, 1997 e 1999) em trabalhos de modelagem molecular mostrou que o α-MSH penetra no interior de uma membrana modelo sofrendo mudanças conformacionais nesta inserção.

Da mesma maneira que os anteriores, o pequeno tripeptídeo lisil-triptofil-lisina (LTL) , pode ser estudado por fluorescência com o intuito de se estabelecer critérios de comparação para avaliar os comportamentos conformacionais dos hormônios melanotrópicos usados (α-MSH e MSH 1). O LTL possui um triptofano e resíduos lisina carregados positivamente sendo possível, então, um estudo com micelas carregadas negativamente, pois há interação deste com a membrana-modelo similar aos peptídeos maiores.

Estes três peptídeos foram colocados em contato com o sistema de micelas reversas para análise de suas interações com os anfifílicos formadores da superfície das micelas e com a água presente no interior das mesmas, uma vez que ainda não se explica a especificidade de determinado receptor por algumas moléculas por simples interação entre ambos. E, acredita-se que a interação dos hormônios com a parte lipídica das membranas tenha uma significativa importância na seletividade destas moléculas (Schwyzer,1986).

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é estudar a interação do hormônio melanócito estimulante (α- MSH), do peptídeo sintético melanotrópico análogo , melanotan-I (MSH-I), do aminoácido triptofano (Trp) e do tripeptídeo lisil-triptofil-lisina (LTL) com um modelo de membrana. Neste estudo o modelo de membrana escolhido foi o sistema de micelas reversas que, conforme discutido anteriormente, é um modelo adequado para simular a água presente nas membranas biológicas em torno dos receptores uma vez que a água apresenta-se estruturada da mesma forma. Mais precisamente, usaremos como modelo de membrana o sistema formado por micelas reversas de bis-(2-etilhexil) sulfosucinato de sódio (AOT) em isooctano.

Um outro objetivo é observar o papel da água nesta interação. Daí a importância da utilização das micelas reversas visto que nestas podemos variar as propriedades da mesma. Observaremos, então, o sistema contendo desde água estruturada (que é a forma encontrada em sistemas biológicos) até a água denominada *bulk*.

Também será estabelecido um paralelo entre os comportamentos dos peptídeos α-MSH, MSH-I (que é mais ativo biologicamente) e lisil-triptofil-lisina (que possui tamanho bem menor do que os demais). Desta forma, pretende-se verificar a penetração dos

peptídeos nas membranas-modelo e, também, mudanças conformacionais. A importância do estudo do aminoácido triptofano provém do fato dele ser a sonda fluorescente presente em todos os peptídeos.

Para tanto realizamos medidas de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo para estudar a dinâmica interna dos peptídeos melanotrópicos α-MSH e MSH-1 em presença de membranas modelo de micelas reversas. Esse estudo foi baseado na monitoração do único resíduo triptofano que eles possuem tanto em solução aquosa (tampão fosfato) quanto em micelas reversas de AOT, como função da quantidade de água presente no sistema (ou seja, o valor de w_o). Isso porque as técnicas espectroscópicas tais como fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo podem ser utilizadas para nos informar sobre a distribuição do triptofano nestes meios. A supressão da fluorescência do resíduo triptofano por acrilamida (que fica no meio micelar) também foi medida para auxiliar na tentativa de localizar a posição do fluoróforo nas micelas reversas.

Usamos também a técnica de EPR tanto para estudar a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos quanto na investigação de processos dinâmicos. Os dados obtidos por EPR, que caracterizam as interações em materiais paramagnéticos, podem levar ao entendimento da estrutura atômica e molecular de sítios magnéticos. A alta sensibilidade e a capacidade de investigar amostras na forma de soluções são as vantagens da técnica de EPR.

Com isso esperamos que mais um passo seja dado na direção do esclarecimento dos processos de interação entre peptídeos melanotrópicos e a membrana dos melanócitos em sistemas biológicos, especialmente no que relaciona-se com as diferentes atividades biológicas dos hormônios investigados.

PRINCÍPIOS DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS UTILIZADAS : FLUORESCÊNCIA ESTÁTICA E RESOLVIDA NO TEMPO E RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Não existe uma maneira simples de explicar a interação da radiação com a matéria, pois a radiação é um campo eletromagnético que oscila rapidamente e a matéria é composta por uma quantidade enorme de moléculas ou átomos, sendo que estas últimas contém distribuições de cargas e spins possuindo propriedades eletromagnéticas. Estas distribuições são alteradas quando a molécula é exposta à radiação, sendo que apenas alguns determinados comprimentos de onda provocam mudanças no estado molecular. Sabemos que um fóton só é absorvido se a sua energia for exatamente igual à diferença de energia entre o estado fundamental e um auto-estado excitado da molécula. Esta transição não ocorre para um auto-estado qualquer de maior energia mas segue determinadas regras de seleção que indicam quais transições são as mais prováveis. Assim as mudanças de níveis energéticos de moléculas fornecem informações sobre a natureza das mesmas. Essas informações podem ser obtidas a partir do que chamamos de espectros moleculares, que são curvas que relacionam a intensidade de radiação absorvida (espectro de absorção) ou emitida (espectro de emissão) em função dos comprimentos de onda das radiações incidentes. Como existem três tipos de transições (rotacional, vibracional e eletrônico) existirão também três tipos de espectros moleculares; ou seja, espectros vibracionais, rotacionais e eletrônicos.

As transições rotacionais dizem respeito às rotações de átomos ou moléculas inteiras e envolvem energias muito pequenas pois estes níveis são muito próximos entre si. Assim, na temperatura ambiente (27° C ou 300 K) as moléculas apresentam-se distribuídas ocupando vários níveis rotacionais existentes, sendo que uma simples colisão entre duas delas pode provocar uma mudança entre estes níveis.

Os fótons absorvidos ou emitidos nas transições rotacionais correspondem a comprimentos de onda próximos à 10^6 nm, correspondentes à região da microonda.

Ao contrário do que acontece com os níveis rotacionais, apenas os níveis vibracionais de menor energia estão populados à temperatura ambiente (27° C ou 300 K). Os fótons absorvidos e/ou emitidos nas transições vibracionais possuem comprimentos de onda compreendidos entre 10^4 e 10^5 nm, correspondentes à região do infravermelho. Logo, os níveis rotacional e vibracional apresentam-se acoplados. Assim, quando um fóton com energia suficiente para provocar uma transição vibracional for absorvido, teremos duas transições: uma rotacional e outra vibracional.

Os espectros de absorção vibracional-rotacional envolvem os movimentos relativos de átomos ou grupos de átomos e podem ser utilizados para identificar as ligações presentes e determinar as quantidades relativas de alguns compostos presentes na amostra.

Já os espaçamentos dos níveis energéticos eletrônicos são ainda maiores. Os fótons que provocam transições entre estes níveis pertencem à região do visível ou do ultravioleta. Assim, as transições entre os níveis eletrônicos de moléculas levam a absorções e emissões nas regiões do visível e do ultravioleta do espectro eletromagnético. No equilíbrio, praticamente apenas o nível eletrônico de menor energia está ocupado, o estado fundamental. A espectroscopia eletrônica é basicamente o estudo das excitações dos elétrons do estado fundamental para estados de energias mais elevadas pela absorção de luz, normalmente o primeiro estado excitado. Normalmente o espectro eletrônico apresenta várias bandas pois a excitação eletrônica é acompanhada por modificações nos níveis vibracional e rotacional das moléculas em questão que acabam por complicar o espectro eletrônico mas, como as energias associadas à estas transições possuem ordens de grandeza diferentes existem, então, técnicas instrumentais diferentes para resolução destas diferentes transições. Quando estas linhas são bem resolvidas o espectro eletrônico torna-se uma fonte muito rica de informações sobre as propriedades moleculares sendo, assim, uma ferramenta apropriada para a investigação dos níveis eletrônicos excitados que normalmente estão envolvidos com as reações fotoquímicas. A análise do espectro eletrônico carrega ainda

informações a respeito das energias de dissociação, energias potenciais e das forças intermoleculares. Quando trabalhamos com soluções as colisões entre as moléculas produzem um espectro contínuo.

Discutiremos agora, em linhas gerais, o que acontece quando uma molécula que está nos estados fundamentais eletrônico e vibracional absorve luz. Neste estado fundamental as distâncias internucleares mais prováveis são as de equilíbrio. Em geral, no estado eletrônico excitado as distâncias internucleares de equilíbrio não são mantidas. Franck e Condon (in Lakowicz, 1983) perceberam que as transições eletrônicas ocorrem com maior velocidade quando o núcleo pode se ajustar à nova posição de equilíbrio sendo que a posição mais provável para o núcleo ainda é a de estado fundamental. Assim, uma transição eletrônica pode ser representada aproximadamente por uma linha vertical. Tal fato faz com que a probabilidade de absorção seja maior quando ocorre para o estado vibracional do estado eletrônico excitado que está diretamente acima da distância internuclear de equilíbrio.

I) FLUORESCÊNCIA

As discussões e conceitos foram baseados no livro de Cantor e Schimmel e no Lakowicz.

Quando irradiamos uma substância estamos promovendo suas moléculas do estado fundamental para estados excitados. Mais ainda, quando uma amostra é irradiada continuamente seu coeficiente de absorção ótica permanece constante na ausência de reações químicas, indicando que as moléculas excitadas estão continuamente decaindo para o estado fundamental. A volta do sistema excitado ao estado fundamental implica em perda ou relaxação da energia inicialmente absorvida seja por processos radiativos (fluorescência ou fosforescência; dependendo das diferenças entre as multiplicidades dos spins nos estados fundamental e excitado) seja por processos não radiativos (conversão interna, cruzamento entre sistemas ou por supressão) , como ilustra o esquema mostrado na Figura II-1. A energia de excitação pode ainda ser simplesmente degradada na forma de energia térmica em colisões moleculares ou podem, também, estar presentes reações químicas que

modificam a composição e a absorção da amostra.

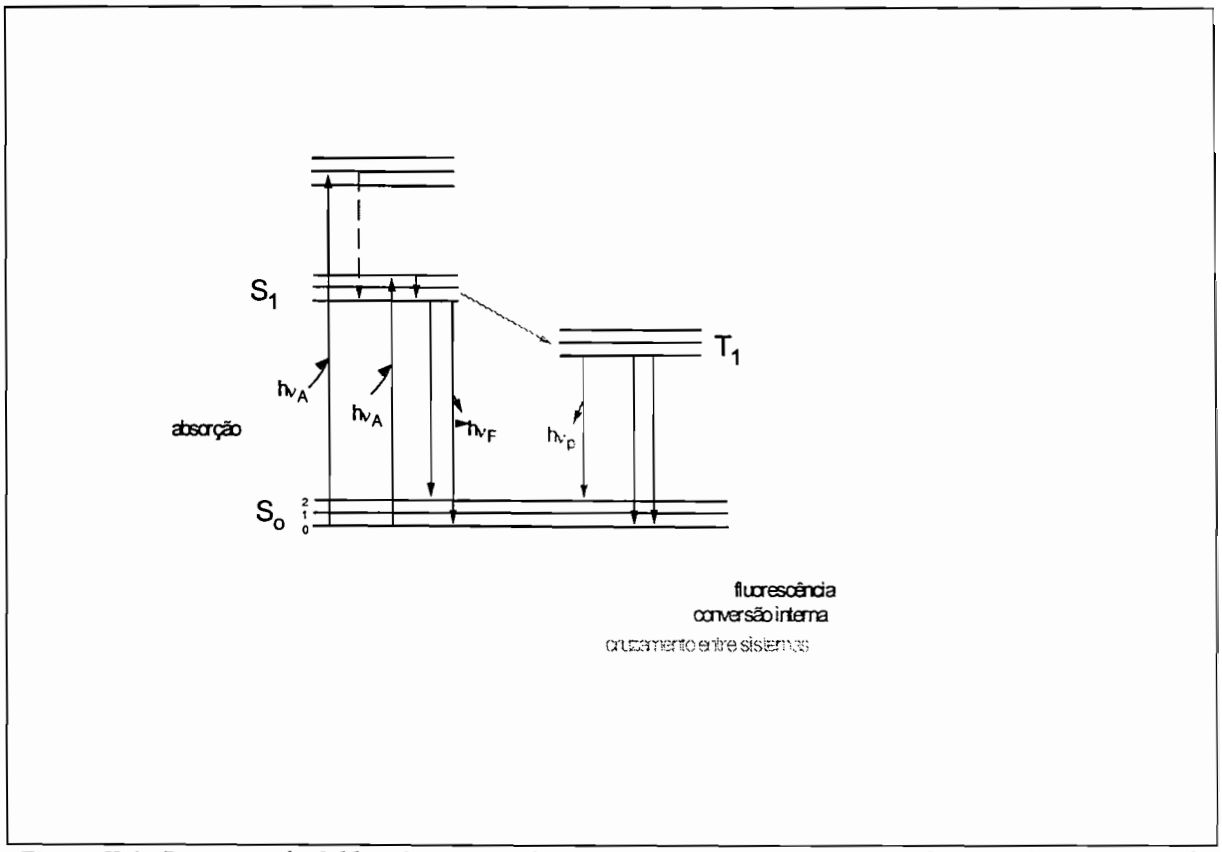


Figura II-1: Diagrama de Jablowsky mostrando os decaimentos do primeiro estado excitado para o estado fundamental.

A FLUORESCÊNCIA é o decaimento do primeiro estado singleto excitado para o estado fundamental com emissão de fótons com taxa de decaimento denominada k_f . O estado singleto é caracterizado por possuir tempo de vida curto, sendo que o decaimento por fluorescência ocorre entre 10^{-8} e 10^{-9} segundos porque os elétrons do estado de singleto excitado e do estado fundamental possuem spins anti-paralelos, sendo a transição permitida.

No processo de conversão interna, que ocorre na taxa k_{ic} , a energia de excitação é dissipada através de colisões com as moléculas do solvente ou através da relaxação para os modos vibracional-rotacional mais baixos. A taxa de decaimento por conversão interna aumenta com o aumento da temperatura. Estas desexcitações ocorrem em tempos da ordem

de 10^{-12} e 10^{-14} segundos.

Um outro método de desexcitação é o cruzamento entre sistemas, que ocorre na taxa denominada k_{is} , pelo qual o estado de singleto excitado decai para um estado de tripleto excitado mas de menor energia. O estado tripleto é caracterizado pelo fato de possuir elétrons com spins paralelos aos do estado fundamental. Assim, para que se dê a transição entre o estado tripleto e o fundamental faz-se necessária uma reorientação dos spins dos elétrons. O estado tripleto pode decair pelos modos não radiativos descritos acima ou, por emissão de fótons em um processo que denominamos Fosforescência, envolvendo intervalos de tempo da ordem de 10^{-4} segundos ou maiores.

O decaimento por fosforescência ocorre em comprimentos de onda maiores do que os de emissão fluorescente pois a diferença de energia entre os estados tripleto e fundamental é menor do que a existente entre os estados singleto e fundamental. Lembrando que os tempo de vida dos estados tripleto e singleto são bem diferentes, concluímos que os decaimentos por fluorescência e por fosforescência são distinguíveis entre si.

Um outro processo que compete com a emissão fluorescente é o de supressão que resulta das colisões ou da formação de complexos com as moléculas do soluto que são capazes de suprimir a emissão fluorescente e, deste modo, são denominadas supressoras. A supressão ocorre na taxa representada por $k_q[Q]$ que é limitada somente pelo coeficiente de difusão e que depende da concentração do supressor no sistema. Ela é aparentemente de primeira ordem pois o supressor está sempre em maior quantidade quando comparado com o fluoróforo. O valor desta taxa de decaimento pode ser determinado variando a concentração do supressor e observando sua influência sobre a intensidade da emissão fluorescente (ou sobre o rendimento quântico do qual falamos um pouco mais adiante).

Se compararmos os tempos de decaimento dos vários métodos descritos acima observaremos que a desexcitação pelos modos não radioativos ocorrem em tempos menores do que a fosforescência ou a fluorescência, donde concluímos que os decaimentos pelos

modos radioativos acontecem sempre entre o nível excitado de menor energia e o estado fundamental. Desta maneira o espectro de emissão dos fluoróforo deveria ser independente do comprimento de onda de excitação.

Então, quando ocorre o decaimento fluorescente parte da energia absorvida foi dissipada pela desexcitação não-radiativa através do processo denominado relaxação vibracional; logo o fóton emitido possui energia menor do que a energia do fóton absorvido e, portanto, comprimento de onda maior do que o comprimento de onda da radiação absorvida. Isto explica o deslocamento do espectro de emissão fluorescente para comprimentos de onda maiores do que o de absorção, chamado deslocamento de Stokes.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito efetiva para determinar as energias de interação e mudanças conformacionais por ser muito sensível ao meio-ambiente, muito mais do que a espectroscopia de absorção de luz. Assim, a fluorescência é uma das melhores técnicas para estudarmos mudanças conformacionais. Esta sensibilidade provém do tempo relativamente longo que a molécula permanece no estado de singleto (entre 10^{-9} e 10^{-8} segundos) antes de decair ao estado fundamental; sendo que neste intervalo de tempo podem ocorrer reações de protonações e desprotonações, relaxação do solvente, mudanças locais de conformação e qualquer processo de translação ou rotação. Além disso, uma grande quantidade de fluoróforos possuem uma característica muito conveniente que é a de ter sua emissão fluorescente fortemente suprimida quando encontra-se em soluções aquosas (o que pode fornecer informações sobre as interações existentes entre as diferentes moléculas, supressor e fluoróforo) mas, ao contrário, experimenta um aumento de sua emissão fluorescente quando se encontra em um ambiente não polar ou bastante rígido. Assim, se o fluoróforo poder se ligar a uma proteína ou interface seu espectro médio será dominado pela espécie ligada que fluoresce mais intensamente.

Chamamos de **eficiência quântica de fluorescência**, ϕ_f , a razão entre a energia emitida por fluorescência e a energia total absorvida. Esta grandeza leva em conta todos os modos de decaimentos do estado excitado, sendo definida como:

$$\phi_f = k_f / [\, k_f + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)] \qquad \text{(II-1)}$$

onde k_f é a constante de decaimento fluorescente definida como sendo o inverso do tempo de vida radiativo τ_R (ou $k_f = 1/\tau_R$), k_{is} a constante de decaimento por cruzamento entre sistemas, k_{ic} a constante de decaimento por conversão interna e $k_q(Q)$ é a constante de decaimento por supressão da emissão fluorescente.

Definimos como τ_f o tempo de vida do estado observado nas medidas de decaimento fluorescente ou resolvida no tempo,

$$\tau_f = [\, k_f + k_{ic} + k_{is} + k_q(Q)]^{-1} \qquad \text{(II-2)}$$

E, combinando as definições de τ_f, τ_R e ϕ_f ficamos com:

$$\phi_f = \tau_f / \tau_R \qquad \text{(II-3)}$$

Podemos determinar os valores dos rendimentos quânticos relativos a um fluoróforo bem conhecido que possui este valor bem determinado, tal como o NATA ou o Trp.

Na espectroscopia de fluorescência estática medimos as intensidades de radiações emitidas em vários comprimentos de onda, ou seja, para uma região do espectro escolhida, após a excitação no comprimento de onda de absorção característico das moléculas da amostra.

I.1 SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A supressão refere-se a qualquer processo que contribua para a despopulação do estado excitado quando estão presentes na amostra dois tipos de moléculas diferentes, excluindo-se os decaimentos radiativos e os decaimentos pelos modos vibracionais-rotacionais. Entre esses processos destacamos: colisões entre moléculas (10^{-12} segundos),

formação de complexos, transferência de energia e outros.

Na supressão por colisão, o doador ou fluoróforo perde energia para o supressor durante o tempo de vida do estado excitado; ou seja, colide com o doador em seu estado excitado. Pela colisão o doador volta a seu estado fundamental sem emitir fotons.

Na formação de complexos, o doador e o supressor se unem formando um complexo não fluorescente; esta união pode ocorrer tanto no estado fundamental quanto no estado excitado.

Observamos que estes dois processos requerem proximidade entre as moléculas do doador e do supressor de fluorescência. Então, deste processo podemos retirar informações a respeito da afinidade dos doadores aos supressores, da difusão dos supressores (quando o solvente for muito viscoso a difusão é baixa e a supressão diminuída) e da localização dos grupos doadores, quando estão ligados à proteínas ou membranas (se o fluoróforo estiver no interior da macromolécula e a membrana for impermeável ao supressor não observaremos nenhuma supressão, estática ou dinâmica). Variando os supressores podemos verificar a quais substâncias a macromolécula ou membrana é permeável.

Várias substâncias podem agir como supressoras de fluorescência: moléculas de Oxigênio, Aminas Aromáticas e Alifáticas, Oleofinas, Hidrocarbonetos e outras. Mas, esta propriedade depende exclusivamente do par doador/supressor que está sendo analisado; ou seja, existe uma relação específica para cada interação que pode originar ou não uma supressão de fluorescência. A supressão de fluorescência é observada nos espectros através da diminuição das intensidades de radiação emitida e, em alguns casos, pelo deslocamento do pico de emissão fluorescente máxima para comprimentos de onda maiores.

A eficiência quântica para sistemas que apresentam supressão de fluorescência, além de todos os processos citados anteriormente, é expressa como:

$$\phi_f = k_f / (k_f + k_{ic} + k_{is} + k_q.[Q]) \qquad \text{(II-4)}$$

onde k_q é a constante de supressão e [Q] é a concentração do supressor presente na amostra.

Existem vários modelos propostos para a supressão de fluorescência estática: supressão dinâmica ou por colisão, supressão estática ou por formação de complexos, supressões dinâmica e estática combinadas e outros que serão apresentados ao longo deste capítulo.

I.1.a. MODELO DA SUPRESSÃO DINÂMICA OU POR COLISÃO

Este modelo supõe que toda a supressão da fluorescência do doador é devida à colisões desses com o supressor.

Seja F* a população do estado excitado. Sob iluminação contínua a população do estado excitado torna-se constante mas, em condição de equilíbrio dinâmico. Logo :

$$d F^* / dt = 0 \quad \text{(II-5)}$$

As equações diferenciais são :

$$\text{ausência de supressor :} \quad dF^* / dt = f(t) - \Gamma.(F^*)o \quad \text{(II-6)}$$

$$\text{presença de supressor :} \quad dF^* / dt = f(t) - (\Gamma + k_q.[Q]).F^* \quad \text{(II-7)}$$

onde : k_q é a constante de supressão, f (t) é a função de excitação constante, $\Gamma = 1 / \tau_o$ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência de supressor e [Q] é a concentração do supressor.

Igualando as equações obtemos :

$$f(t) - (\Gamma + k_q.[Q]).F^* = f(t) - \Gamma . (F^*)_o$$

$$(\Gamma + k_q.[Q]).F^* = \Gamma .(F^*)_o$$

$$F^* / (F^*)_o = \Gamma / (\Gamma + k_q.[Q])$$

$$F^* / (F^*)_o = \Gamma / [\Gamma (1 + k_q.[Q] / \Gamma)] = 1 / (1 + k_d.[Q])$$

Escrevemos :

$$F_o / F = 1 + k_d.[Q] \qquad \text{(II-8)}$$

onde $k_d = k_q.\tau_o$ é a constante de supressão de Stern-Volmer e $\Gamma = 1 / \tau_o$.

Fazemos então o gráfico de F_o / F em função de [Q], porque assim obtemos uma reta cujo coeficiente angular nos dá o valor da constante de supressão de Stern-Volmer, k_d .

Desde que a supressão de fluorescência é um processo que despopula o estado excitado, o tempo de vida na ausência do supressor $\tau_o = 1 / \Gamma$ é modificado pela presença do supressor para :

$$\tau = (\Gamma + k_q.[Q])^{-1} \qquad \text{(II-9)}$$

Desta forma, temos :

$$\tau_o / \tau = (\Gamma + k_q.[Q]) / \Gamma = 1 + k_q.[Q] / \Gamma = 1 + k_q.\tau_o [Q]$$

Concluímos que :

$$F_o / F = \tau_o / \tau \qquad \text{(II-10)}$$

A diminuição da emissão fluorescente e do tempo de vida do estado excitado ocorrem porque a supressão despopula o estado excitado não via processo fluorescente, mas sim por colisão que pode acontecer em qualquer instante.

I.1.b. MODELO DA SUPRESSÃO ESTÁTICA

A supressão estática é provocada pela formação de um complexo no estado fundamental que possui o estado excitado não fluorescente ou pela formação de um complexo excitado que não decai por emissão fluorescente, ou seja que decai por um modo não radioativo.

Definimos a constante para formação de complexo :

$$K_s = [\ F\text{-}Q\ ] / [F].[Q] \qquad \text{(II-11)}$$

onde [F-Q] é a concentração do complexo, [F] é a concentração do fluoróforo livre ou seja, não complexado e [Q] é a concentração do supressor não complexado.

Se o complexo for não fluorescente, a fração de fluorescência que poderá ser observada (F/F_o) será devida apenas à fração do fluoróforo que não foi complexada, (f) , ou seja :

$$f = F / F_o$$

Lembrando que neste caso a concentração do fluoróforo $[F]_o$ é :

$$[F]_o = [F] + [F\text{-}Q]$$

temos :

$$k_s = (\ [F]_o - [F]\ ) / [F].[Q] = [F]_o / [F].[Q] \ - \ 1 / [Q]$$

$$[Q].k_s = (\ [F]_o / [F]\ ) - 1$$

$$[F]_o / [F] = 1 + k_s.[Q] \qquad \text{(II-12)}$$

Note que as dependências das supressões dinâmica e por formação de complexos são dadas respectivamente por :

$$F_o / F = 1 + k_d.[Q] \qquad \text{(II-13)}$$

$$F_o / F = 1 + k_s.[Q] \qquad \text{(II-14)}$$

só diferindo nas constantes de supressão. Como distinguir estes dois processos?

Podemos utilizar a dependência com a viscosidade e com a temperatura, sendo que, a supressão dinâmica depende diretamente da temperatura e inversamente da viscosidade, enquanto que a supressão por formação de complexos ou estática depende inversamente da temperatura e diretamente da viscosidade. Mas a melhor maneira de distingui-los é através da medida dos tempos de vida do estado excitado obtidos a partir da espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. A supressão estática remove uma fração dos fluoróforos pela formação de complexos mas não modifica em nada a fluorescência dos fluoróforos livres presentes na solução; assim o tempo de vida do estado excitado na presença ou ausência de supressor permanece o mesmo (τ_o). Em contraste, na supressão dinâmica ou por colisão, o supressor interfere diretamente no tempo de vida do estado excitado, diminuindo este, já que uma colisão entre estas moléculas provoca o decaimento do fluoróforo sem a emissão de fotons e esta colisão pode acontecer em qualquer instante durante a existência do estado excitado, até mesmo, imediatamente após a excitação ; assim o tempo de vida do estado excitado é modificado para $\tau = \tau_o.F / F_o$.

Além disso, a supressão dinâmica depende da taxa de difusão do supressor na solução que, possui grandes coeficientes de difusão para altas temperaturas, o que provoca um aumento na supressão da fluorescência, ou uma grande diminuição na intensidade da emissão fluorescente. Logo, a constante de supressão dinâmica aumenta com o aumento da temperatura.

Em contraste, altas temperaturas provocam uma diminuição na estabilidade dos complexos. Logo em altas temperaturas teremos um número menor de complexos formados

o que leva a uma diminuição na supressão estática e, consequentemente uma diminuição no valor da constante de supressão estática.

I.1.c. COMBINAÇÃO DE SUPRESSÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

A emissão fluorescente pode ser diminuída simultaneamente pelos dois tipos de supressão estática e dinâmica. Aqui, a taxa de emissão fluorescente restante F/F_o é obtida pelo produto da fração de fluoróforo que não foi complexado f , com a fração de fluoróforo não complexado que não sofreu colisão com o supressor (supressão dinâmica), ou seja :

$$F / F_o = f.\Gamma / (\Gamma - k_q.[Q]) = f / (1 + k_d.[Q]) \quad \text{(II-15)}$$

Lembrando que :

$$1 / f = 1 + k_s.[Q]$$

temos :

$$f = 1 / (1 + k_s.[Q])$$

$$F / Fo = \Gamma / \{ (1 + k_s.[Q]).(\Gamma + k_q.[Q]) \}$$

$$F_o / F = (1 + k_s.[Q]).(1 + k_d.[Q]) \quad \text{(II-16)}$$

Observamos que esta relação depende de $[Q]^2$, o que leva à curvas parabólicas.

Podemos também determinar a supressão dinâmica pela medida do tempo de vida. Temos :

$$\tau_o / \tau = 1 + k_d.[Q] \quad \text{(II-17)}$$

Se não for possível determinar o tempo de vida, devemos rescrever a equação de F_o/F na forma :

$$F_o / F = 1 + (k_d + k_s).[Q] + k_d.k_s.[Q]^2 = 1 + k_{app}$$
$$k_{app} = (k_d + k_s) + k_d.k_s.[Q] = F_o / F - 1$$

A constante de supressão aparente , k_{app}, é calculada para cada concentração do supressor. Um gráfico de k_{app} por [Q] dá uma reta que intercepta o eixo y em $(k_s + k_d)$ e possui inclinação igual à $(k_s.k_d)$.

Podemos calcular as constantes para supressões individuais pelas equações :

$$\tau_o./ \tau = 1 + k_d.[Q] \qquad \text{(II-18)}$$
$$k_s^2 - k_s.(k_d + k_s) + k_d.k_s = 0 \qquad \text{(II-19)}$$

I.1.d. OUTROS MODELOS

Os resultados experimentais da razão I_o / I contudo, nem sempre apresentam-se lineares ou quadráticos em relação à concentração do supressor adaptando-se à estas equações de Stern-Volmer mas possuem desvios positivos ou negativos em relação à essas, principalmente quando estão ocorrendo outros tipos de interações e/ou fenômenos que também resultam em transferência de energia, além daqueles levados em consideração por Stern-Volmer (colisões e formação de complexos).

Foram então propostos modelos que visam explicar esses desvios em relação à supressão de Stern-Volmer. Entre eles temos o modelo de Eftink e Ghiron (1976) que leva à equação modificada de Stern-Volmer , a saber :

$$I_o = I (1 + k_{sv} [Q]) \exp (V [Q]) \qquad \text{(II-20)}$$

onde k_{sv} é a constante de Stern-Volmer para supressão dinâmica ou por colisão, [Q] é a concentração do supressor e V é a chamada constante de supressão.

A constante de supressão V pode assumir vários significados, entre eles :

a) a probabilidade de ocorrerem reações rápidas, ou seja, imediatamente após a excitação,

b) o volume de uma esfera de ação em torno da molécula do supressor dentro da qual a probabilidade de haver supressão é um para qualquer molécula que se encontre dentro desta região (Frank e Vavilov, 1931),

c) uma constante de associação que considera qualquer interação específica ou particular que ocorra entre as duas moléculas em questão (o fluoróforo e o supressor) podendo ser movimento Browniano ou interação de dipolo ou outros. (Eftink e Ghiron, 1976).

A construção e adaptação de modelos depende de cada situação específica, de cada par fluoróforo/supressor em estudo.

Esses modelos fornecem subsídios para a análise dos resultados obtidos na espectroscopia fluorescente quando ocorre a supressão.

I.2. ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ESTADO ESTACIONÁRIO

Quando realizamos medidas de fluorescência polarizada obtemos informações sobre os tamanhos, formatos e flexibilidades das macromoléculas fluorescentes.

Para explicar a fluorescência polarizada, precisamos determinar a probabilidade de excitar fluoróforos que estão com orientações especiais. Depois precisamos determinar a probabilidade destes fluoróforos excitados emitirem em uma dada orientação. Mas, na prática, medimos as intensidades das emissões paralela e perpendicular ao feixe de luz polarizada incidente na amostra e determinamos o grau da anisotropia que é definida pela seguinte expressão matemática:

$$A = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + 2 I_{\perp}) \qquad \text{(II-21)}$$

onde o denominador é a intensidade total de luz que poderia ser observada caso não utilizássemos nenhum polarizador.

Para um sistema totalmente rígido – seja uma amostra de solução congelada ou um fluoróforo inserido em uma macromolécula que de tão grande possui seus movimentos praticamente parados para a escala de tempo das medidas de fluorescência – a anisotropia terá o valor máximo de 0,4. E caso os fluoróforos estejam sem nenhuma restrição aos movimentos a anisotropia será igual a zero.

Geralmente as macromoléculas ficam entre estes dois extremos pois seus movimentos de rotação não são desprezíveis na escala de tempo da fluorescência mas também não são suficientemente rápidos para que o fluoróforo possa ser considerado com movimento livre e aleatório. Para determinar o grau de anisotropia nestes casos devemos analisar tanto as taxas relativas de emissão quanto o movimento rotacional da macromolécula.

I.3. FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO - DECAIMENTO

Um modo de monitorar a emissão fluorescente seria a determinação do rendimento quântico. Mas, vimos pela equação II-3 que precisamos determinar o tempo de vida de fluorescência ou tempo de decaimento do estado excitado. Uma maneira de fazê-lo é excitar os fluoróforos com pequenos pulsos de luz e medir a intensidade de emissão fluorescente em função do tempo. A intensidade de emissão fluorescente no tempo, I(t), será proporcional à taxa de decaimento do estado excitado emitindo fluorescência. Temos:

$$I(t) = k_f .S_b(0).\exp(-t / \tau_f) \qquad \text{(II-22)}$$

onde $S_b(0)$ é a concentração das espécies excitadas no tempo zero. Observe que o decaimento é monoexponencial.

Agora, caso estejam presentes na amostra dois ou mais fluoróforos diferentes ou um único tipo de fluoróforo em micro-ambientes diferentes (por exemplo: parte em água e parte associado a uma interface), o espectro de emissão fluorescente não será mono-exponencial mas, será uma soma de exponenciais – cada uma relacionada com um tipo de fluoróforo ou um micro-ambiente específico. Por exemplo, no caso de termos na amostra dois tipos de fluoróforos a intensidade de emissão fluorescente em função do tempo será dada por:

$$I(t) = A_1.\exp(-t/\tau_{1f}) + A_2.\exp(-t/\tau_{2f}) \qquad \text{(II-23)}$$

onde A_1 e A_2 são os pesos relacionados à concentração de cada fluoróforo na amostra. Note que, neste caso, os tempos de vida de fluorescência de cada fluoróforo independe da concentração do mesmo na amostra; apenas para a determinação da intensidade total de emissão fluorescente é que fazemos uma ponderação dos fluoróforos. Atualmente, os equipamentos de fluorescência resolvida no tempo vêem com um programa de ajuste exponencial da intensidade de emissão fluorescente resolvida no tempo. Estes ajustes são bastantes versáteis pois podemos utilizar desde uma única exponencial até a combinação de quatro; sendo que o melhor ajuste é determinado pelo teste do χ^2 que deve ficar o mais próximo possível da unidade.

II) RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é o nome dado ao processo de absorção ressonante de microondas por íons ou moléculas paramagnéticos, com pelo menos

um elétron com spin desemparelhado, na presença de um campo magnético estático.

A técnica de EPR, desde a sua descoberta em 1944, tem sido largamente utilizada em química, física, biologia e medicina tanto para estudar a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos quanto na investigação de processos dinâmicos.

Os dados obtidos por EPR, que caracterizam as interações em materiais paramagnéticos, podem levar ao entendimento da estrutura molecular de sítios magnéticos. A alta sensibilidade e a capacidade de investigar amostras na forma de pó, polímeros e soluções são as vantagens da técnica de EPR.

Quando usamos alta freqüência (95GHz) podemos estudar amostras muito pequenas com alto poder de resolução, que permite até mesmo a distinção entre espécies similares. Espécies de radicais podem mostrar sensibilidades características ao movimento em alta freqüência. Esta espectroscopia é particularmente útil para o estudo do movimentos muito rápidos (da ordem de nanosegundos) e muito vagarosos, por exemplo com sondas de nitróxido. É possível identificar e distinguir vários produtos de marcadores de spin através da grande resolução em altos campos magnéticos. Também é possível detectar a partição de moléculas paramagnéticas como os nitróxidos entre diferentes solventes ou ambientes (como soluções aquosas ou lipídeos).

II.1 TEORIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Antes de mais nada é importante ressaltar que os conceitos aqui apresentados bem como a discussão foram baseados principalmente no livro de Atherton N.M. (1993).

A ressonância paramagnética eletrônica baseia-se na aplicação de um campo magnético externo, **B**, sobre uma amostra que contenha elétrons desemparelhados. Este campo atua aumentando a energia entre os níveis energéticos do momento magnético de

spin do elétron desemparelhado. O espectro de EPR é interpretado como as transições permitidas entre os autovalores da Hamiltoniana de Spin sendo, portanto, importante o conhecimento da mesma. A Hamiltoniana de spin contém termos que refletem a interação do spin do elétron e do spin do núcleo com o campo **B**, o chamado Termo Zeeman e a interação entre os spins do elétron desemparelhado e do núcleo, chamada Interação Hiperfina. Estas interações são expressas em termos de operadores representando os spins com vários coeficientes de acoplamentos diferentes. A análise do espectro de EPR permite identificar quais interações estão envolvidas e também determinar quantitativamente os coeficientes de acoplamento.

A Hamiltoniana de spin que descreve a interação dos spins do elétron e do núcleo com o campo **B** e locais é dada pela soma do termo Zeeman e do termo de interação hiperfina, conforme mencionado. Assim:

$$H_{spin} = \mu_B.\mathbf{B.g.S} + \mathbf{I.A.S} \qquad \text{(II-24)}$$

onde μ_B é o magneton eletrônico de Bohr dado por:

$$\mu_B. = (e.h/2\pi) / (2m_e.c) \qquad \text{(II-25)}$$

onde e é a carga do elétron, $h/2\pi$ a constante de Planck, c a velocidade da luz e m_e a massa do elétron; assim o magneton de Bohr é igual a 9,27408. 10^{-28} JG^{-1}; **B** é o campo magnético externo, **S** é o spin eletrônico, **I** é o spin nuclear, **A** é o tensor de acoplamento hiperfino e **g** não tem um nome específico sendo chamado de matriz ou tensor-g sendo específico de cada amostra (na visão clássica g seria um fator de correção empregado pois o momento angular obtido experimentalmente é sempre menor do que o valor esperado, determinado pela teoria).

Quando temos apenas um único elétron desemparelhado na espécie a Hamiltoniana reduz-se à:

$$H_{spin} = \mu_B.g_e\ \mathbf{B.S} + \mathbf{I.A.S} \qquad \text{(II-26)}$$

onde, neste caso, g_e é o fator g de correção, específico para cada amostra. Para o elétron livre este fator vale 2,0023.

II.1.a. TERMO ZEEMAN

Supondo que o campo magnético externo **B** está na direção z, ou **B** = Bo**z** a Hamiltoniana, para um único elétron, relacionada à interação do spin do elétron com o campo magnético externo, com seus respectivos auto-valores, é dada por:

$$H\Psi = \mu_B.g_e\ S_z.B_o\ \Psi \qquad \text{(II-27)}$$

$$E\ \Psi = \mu_B.g_e\ B_o.M_s\ \Psi \qquad \text{(II-28)}$$

onde $M_s = \pm\ ½$, ou seja, são os dois estados degenerados para o spin do elétron com S = ½ quando na ausência de um campo magnético externo. Aplicando um campo magnético externo quebramos esta degenerescência gerando um estado de menor energia – o estado de spin anti-paralelo ao campo Ms = - ½, e um estado de maior energia com spin paralelo ao campo magnético externo, Ms = + ½. A energia de transição, ΔE, entre estes dois estados é dado por:

$$\Delta E = \mu_B.g_e\ B_o. \qquad \text{(II-29)}$$

ou seja, depende do valor do campo magnético externo aplicado, conforme pode ser observado na Figura II-2.

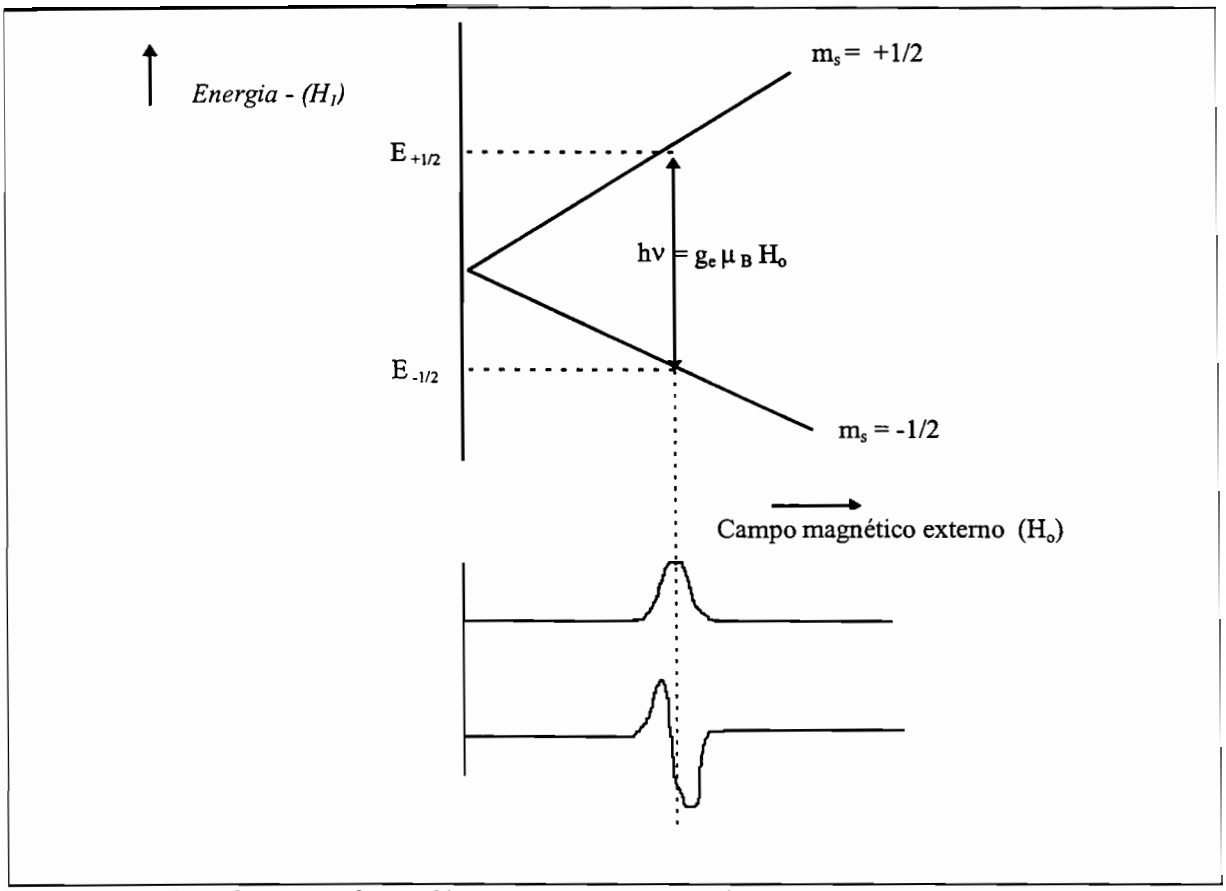


Figura II-2: níveis de energia de um elétron em um campo magnético B.

II.1.b. TERMO DE ACOPLAMENTO HIPERFINO

Uma das principais características da técnica de EPR é o desdobramento hiperfino das linhas do espectro. Ele resulta da interação magnética entre o spin do elétron e os spins dos núcleos vizinhos.

Os núcleos que possuem spin I diferentes de zero, próximos ou vizinhos ao elétron produzem um campo magnético local, $\mathbf{B}_{local}$, que também deve ser considerado juntamente com o campo magnético externo ($\mathbf{B}_o$) para satisfazer a condição de transição entre os níveis de spin eletrônicos:

$$h\nu = \mu_B . g_e (B_o . + B_{local}) \qquad \text{(II-30)}$$

Assim, o campo $\mathbf{B}_o$ aplicado para promover a transição é modificado pelo campo local, $\mathbf{B}_{local}$, produzido pelos núcleos. Porém o spin nuclear experimenta o campo magnético externo e também um campo local produzido pelos elétrons; neste caso, os spins nucleares podem estar em (2I + 1) estados de spin diferentes. Mas, cada um desses estados de spin nuclear produz um campo local diferente e, desta forma, o espectro de EPR será separado em (2I + 1) linhas, uma para cada estado de spin nuclear, mas todas com intensidades iguais porque todos os estados de spin nucleares são igualmente populados no estado macroscópico de equilíbrio térmico.

Esta interação é descrita pela Hamiltoniana:

$$H = (\mu_o /4\pi)\ (\mu_B.g_e\ \gamma.\{ - \mathbf{I.S} / r^3 + 3(\mathbf{I.r}).(\mathbf{S.r})/ r^5 + (8\pi/3).(\mathbf{I.S}).\delta(r)\} \qquad \text{(II-31)}$$

onde μ_B. é o magneton de Bohr, g_e é o fator-g de correção, $\mu_o /4\pi$ é um fator do sistema de unidade usado, γ é a razão giromagnética, r é a distância entre o elétron considerado e os núcleos vizinhos com I diferente de zero e $\delta(r)$ é a função delta de Dirac.

O primeiro e o segundo termos descrevem a interação dipolar entre o elétron e os núcleos. O terceiro termo surge da interação de contato de Fermi e é obtido no tratamento quântico da interação.

Os dois primeiros termos podem ser resumidos na forma que considera o tensor de acoplamento hiperfino dos dois vetores de momento angular – o do elétron e o dos núcleos, dado por:

$$\mathbf{I.A^o.S} \qquad \text{(II-32)}$$

onde **I** e **S** são respectivamente os vetores de spin do núcleo e do elétron, e $\mathbf{A^o}$ é o tensor de acoplamento hiperfino dipolar, ou uma matriz com elementos, $A_{\alpha\beta}$, dados por:

$$A_{\alpha\beta} = (\mu o /4\pi)\ (\mu_B.g_e\ \gamma.\langle 3\alpha\beta/\ r^5\rangle \qquad \text{(II-33)}$$

onde os *brackets* significam que existe uma integração sobre toda a distribuição eletrônica.

Este acoplamento dipolar é anisotrópico, ou seja, depende da orientação relativa entre os spins do elétron, do núcleo e do campo magnético externo; assim, este termo é denominado parte anisotrópica da Hamiltoniana:

$$H_{anisotrópica} = \mathbf{I.A^o.S} \qquad \text{(II-34)}$$

Estas interações não contribuem para as posições das linhas do espectro de EPR de soluções quando a taxa de difusão rotacional for suficientemente rápida de maneira que todas as posições sejam visitadas durante uma medida. Mas, estas interações anisotrópicas interferem nas larguras das linhas do espectro.

O terceiro termo da Hamiltoniana é específico para o caso do elétron no orbital s e, é conhecida como interação hiperfina isotrópica, devido à simetria deste orbital.

O elétron do orbital s é um caso especial pois, devido à simetria esférica deste orbital, ele não deveria participar de interações dipolares mas, isso não é o que acontece, pois no espectro de EPR observa-se uma componente isotrópica na interação hiperfina. A Hamiltoniana que descreve esta interação é dada por:

$$H = a.\mathbf{S.I} \qquad \text{(II-35)}$$

onde a é a constante de acoplamento dada por:

$$a = (2\mu_o / 3)\ \mu_B.g_e\ \gamma.\ |\psi(0)|^2 \qquad \text{(II-36)}$$

onde $|\psi(0)|^2$ é a probabilidade de encontrar o elétron no orbital s, por isso esta interação também é denominada de interação de contato. Para orbitais outros que não o orbital s esta contribuição não está presente porque para estes outros orbitais (p, d, f, etc.) esta

probabilidade torna-se igual a zero. Assim, se o elétron desemparelhado estiver em um orbital p , por exemplo, ele não se aproximará do núcleo. Portanto, a interação deste elétron com o núcleo é do tipo dipolo-dipolo.

II.2 EPR COM MARCADOR DE SPIN

Pela teoria de EPR apresentada no item anterior ficou claro que para obtermos um espectro de EPR precisamos necessariamente possuir uma molécula paramagnética na amostra, ou seja, um radical livre e estável. Quando a amostra em estudo não possui elétrons desemparelhados podemos introduzir uma molécula com esta característica para podermos analisar a amostra com esta técnica. Neste caso, esta molécula paramagnética introduzida é denominada sonda ou marcador de spin. Assim, o método do marcador de spin consiste no emprego de uma sonda paramagnética eletrônica incorporada à amostra (que podem ser proteínas, membranas, modelos de membranas, entre outros) que, através do seu espectro de EPR, fornece informações estruturais e dinâmicas sobre o sistema macromolecular estudado. Essa sonda pode ser ligada covalentemente ao sistema ou pode estar apenas intercalada entre as moléculas constituintes do mesmo.

Esta técnica foi empregada pela primeira vez por Ohnistri e McConnell em 1965 e hoje vem sendo usada para fornecer informações valiosas sobre as propriedades estruturais e funcionais de vários sistemas macromoleculares diferentes (Berliner in Biaggi, 1998). Por exemplo, foi através desta técnica que foram observados pela primeira vez os movimentos dos lipídeos nas superfícies das membranas.

As sondas paramagnéticas ou marcadores de spins devem ser estáveis nas condições de pH e temperatura que se pretende investigar a amostra; além disso, seu espectro deve ser sensível às modificações do sistema e sua incorporação não deve provocar muitas pertubações no mesmo.

O marcador de spin usado neste trabalho, o 5-SASL que pertence à classe dos ácidos n-doxilesteáricos, e que por ser de natureza lipídica intercala-se entre as moléculas anfifílicas constituintes da interface de micelas reversas de AOT. Este marcador possui um radical nitróxido que preenche todas as exigências para poder ser usado como sonda no sistema de micelas reversas. Este método foi utilizado para investigar as modificações sofridas pelo sistema de micelas reversas, mais precisamente que a região das cadeias hidrocarbônicas do AOT na região do quinto carbono sofrem pela inserção de peptídeos melanotrópicos.

As sondas mais empregadas são os radicais nitróxidos, devido à sua estabilidade em soluções neutras e temperatura ambiente. A partir do espectro de EPR dos nitróxidos orientados em diversas direções em relação ao campo magnético, é possível obter-se o valor do desdobramento hiperfino na direção dos seus eixos moleculares. O nitrogênio 14 possui número de spin (I=1); consequentemente m_I assume três valores distintos possíveis. Assim, o espectro de elétrons desemparelhados centrados no nitrogênio 14 desdobra-se em três linhas. Neste caso, o elétron desemparelhado não se encontrapredominantemente no orbital p puro do N, mas também, no orbital s.

II.3 ESPECTROSCOPIA DE EPR

Neste item mostramos como analisar o espectro de EPR relacionando-o com os termos da Hamiltoniana que descreve as interações presentes no sistema.

II.3.a DESDOBRAMENTO HIPERFINO

Nos radicais nitróxido temos maior concentração de densidade eletrônica em torno do átomo de nitrogênio. O isótopo mais abundante – da ordem de 99% - é o nitrogênio 14

que possui spin nuclear I = 1; desta maneira, seu momento de spin nuclear pode apresentar três valores: m_I = -1, 0, 1 quando em presença de um campo magnético. Este spin nuclear provoca o desdobramento de cada nível do spin eletrônico em três novos níveis como mostrado na Figura II-3. Podemos ter então três transições entre estes níveis, as transições permitidas com $\Delta m_I = 0$. A separação entre as linhas do espectro de EPR, ou a primeira derivada da absorbância, é o desdobramento hiperfino.

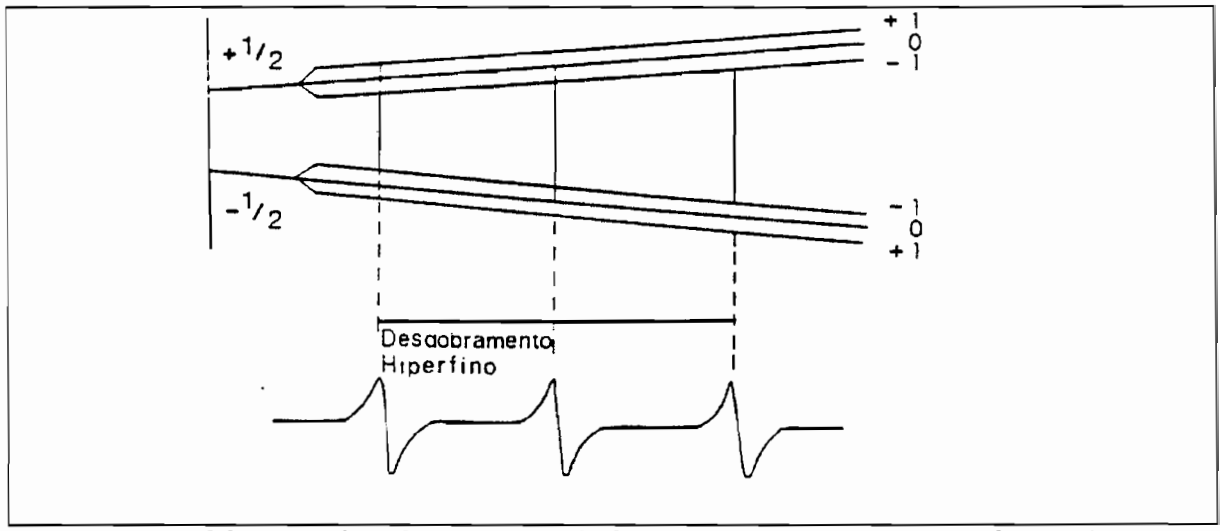


Figura II-3: desdobramento hiperfino para o nitróxido e sua relação com o espectro de EPR (a primeira derivada da absorbância)

II.3.b ANISOTROPIA

Uma das características do espectro de EPR é que o mesmo depende do ângulo formado entre o campo magnético e os eixos moleculares do radical livre ou do marcador de spin, ou seja, o espectro é anisotrópico quando o marcador apresentar anisotropia.

Observando a estrutura do marcador 5-SASL na Figura II-4 é possível perceber os três eixos moleculares: um eixo longo (eixo x) correspondendo às cadeias hidrocarbônicas; o eixo z que é o eixo do orbital $2p\pi$ do nitróxido, que contém a maior parte da densidade eletrônica do elétron desemparelhado e o eixo y perpendicular aos outros dois.

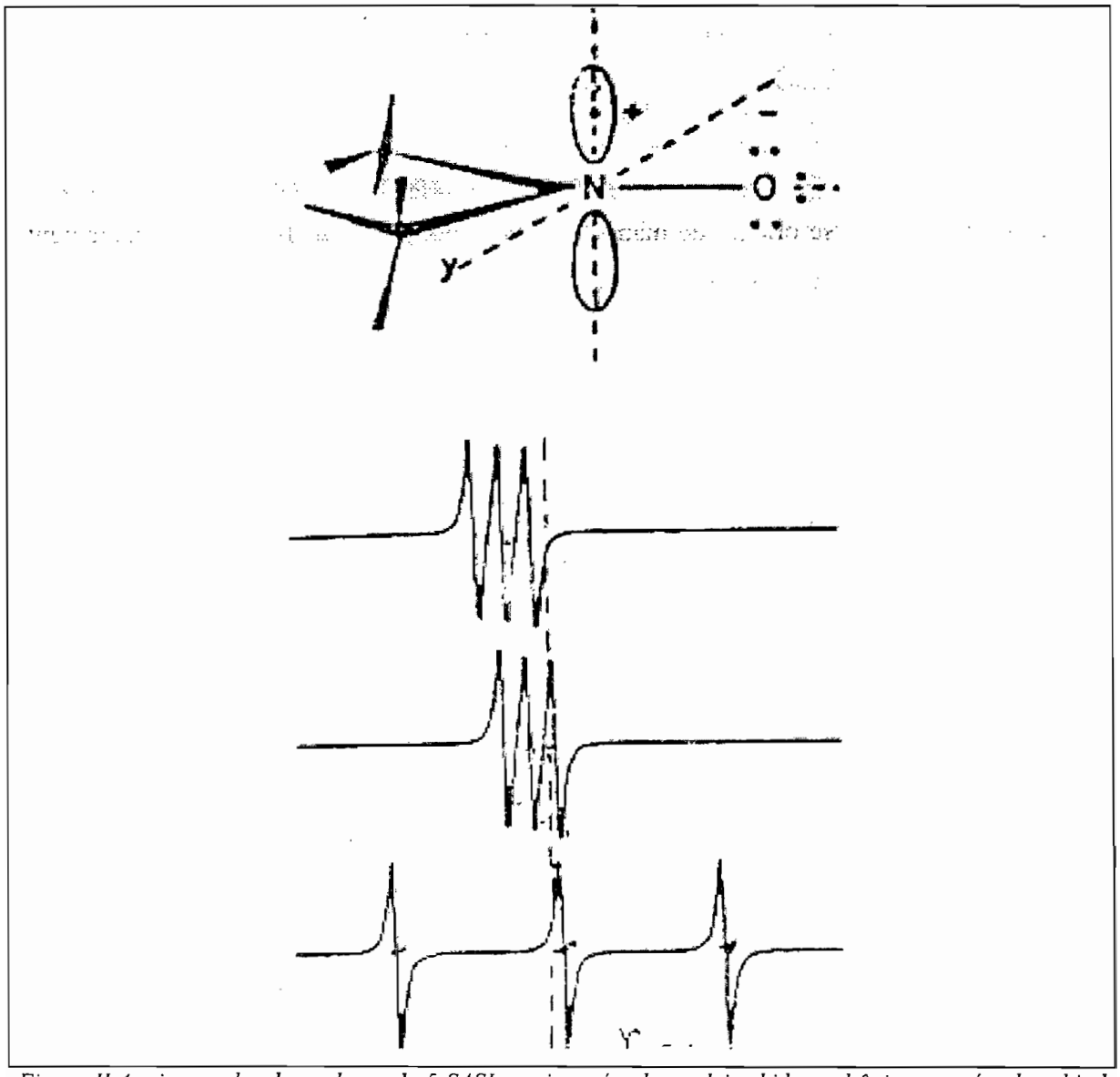


Figura II-4: eixos moleculares da sonda 5-SASL; o eixo x é o das cadeias hidrocarbônicas, o z é o do orbital eletrônico e o eixo y é perpendicular aos outros dois.

O espectro de EPR depende da orientação do campo magnético em relação aos eixos da molécula, conforme falado anteriormente. Assim, a forma do espectro varia se o campo magnético externo for paralelo ao eixo x, y ou z da sonda, conforme pode ser observado também na Figura II-4.

Os valores dos componentes principais do tensor de acoplamento hiperfino podem ser determinados experimentalmente através da introdução dos radicais nitróxido em mono-

cristais diamagnéticos e fazendo o campo magnético incidir na direção de cada um dos três eixos moleculares da sonda (Gaffney et al., 1974). Para o 5-SASL temos: Axx = 6,3G ; Ayy = 5,8G e Azz = 33,6G.

Quando o 5-SASL é introduzido numa interface como por exemplo água e óleo das micelas reversas, ele se orienta de maneira a que seu eixo longo fique aproximadamente paralelo à direção das cadeias hidrocarbônicas dos lipídeos ou anfifílicos que constituem a interface, ou seja, perpendicular ao plano da superfície da interface.

II.3.c PARÂMETRO DE ORDEM (S) E MOBILIDADE

Considere o 5-SASL movimentando-se rapidamente quando inserido na interface das micelas reversas. Conforme dito anteriormente, seu eixo longo fica preferencialmente paralelo à direção das cadeias hidrocarbônicas do AOT, que é considerada eixo Z paralelo (//). Os eixos da superfície da interface são denominados eixos perpendiculares, ⊥. O movimento deste marcador é anisotrópico em relação a este eixo Z. As orientações dos eixos moleculares principais (x, y e z) do nitróxido em relação a este eixo são dadas por θ_1 , θ_2 e θ_3 conforme mostrado na Figura II-5 onde consideramos uma bicamada.

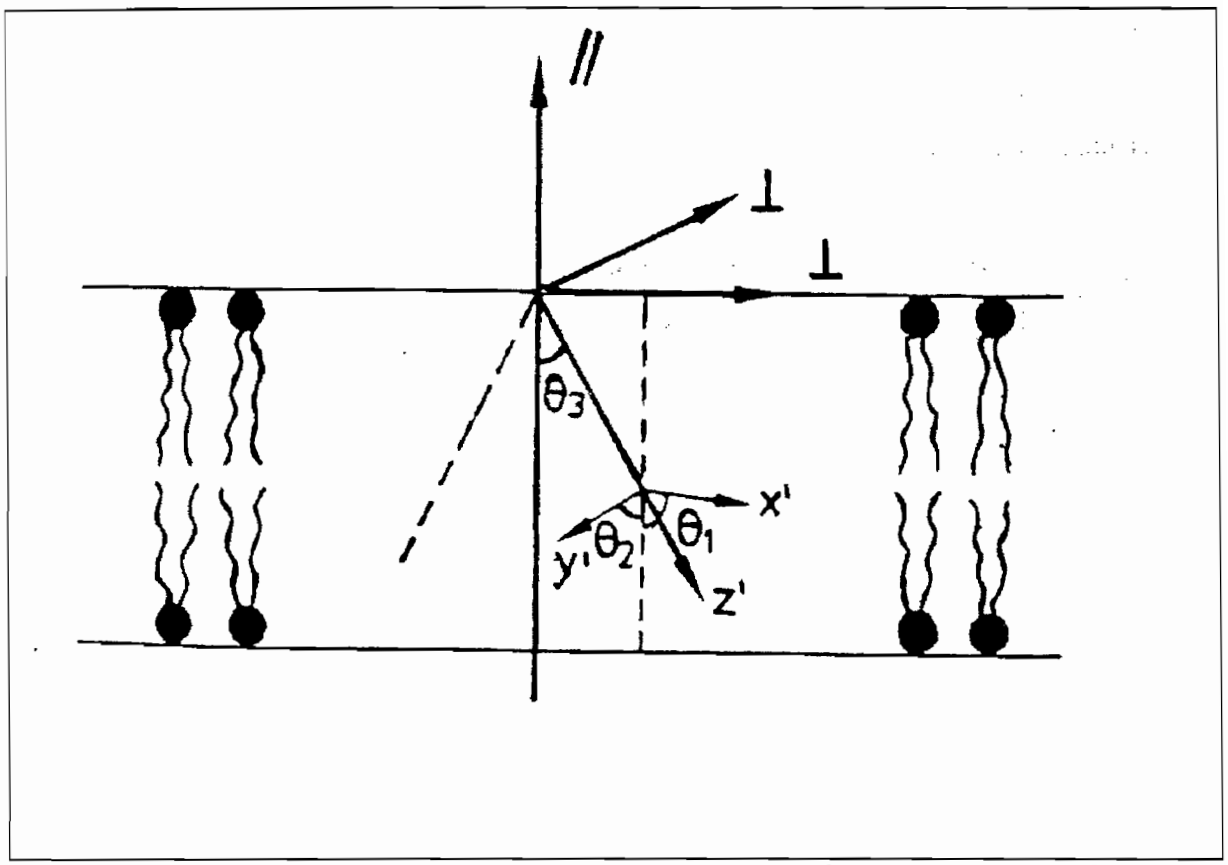


Figura II-5: orientação instantânea dos eixos do nitróxido (x, y e z) em relação aos eixos da interface (// e ⊥). (figura adaptada do trabalho de Biaggi, 1998).

Estas orientações dos eixos x, y e z do nitróxido sofrem flutuações na amostra pois o marcador encontra-se em constante movimentação. Definimos os parâmetros de ordem S_{ii} para representar estas flutuações por:

$$S_{ii} = \frac{1}{2} (3 < \cos^2 \theta i > - 1) \qquad \text{(II-37)}$$

com i = 1, 2 e 3 sendo 1 o eixo x do nitróxido, 2 o eixo y e 3 o eixo z.

Seria suficiente definir a amplitude do movimento do eixo longo da molécula, z. Neste caso temos:

$$S_{33} = \frac{1}{2} (3 < \cos^2 \theta_3 > - 1) \qquad \text{(II-38)}$$

que pode ser relacionado com as componentes do tensor acoplamento hiperfino desde que estes últimos sejam escritos no sistema de eixos da superfície de anfifílicos (X,Y e Z ou // e ⊥ às cadeias hidrocarbônicas). Temos:

$$A_{\perp} = \frac{1}{2} (1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle). (A_{zz} - A_{xx}) + A_{xx} \qquad \text{(II-39)}$$

$$A_{//} = \langle \cos^2 \theta_3 \rangle . (A_{zz} - A_{xx}) + A_{xx} \qquad \text{(II-40)}$$

onde A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são os componentes do acoplamento hiperfino. Assim, S_{33} fica:

$$S_{33} = (A_{//} - A_{\perp}) / (A_{zz} - A_{xx}) \qquad \text{(II-41)}$$

Quando o movimento for isotrópico, ou seja, quando não apresentar uma direção preferencial de movimentação, os espectros não variarão com a orientação do campo magnético e, neste caso, o valor do desdobramento hiperfino será a média dos valores do eixo principal, ou:

$$A_{\perp} = A_{//} = a_o \text{ (cristal)} = 1/3 (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \qquad \text{(II-42)}$$

onde a_o (cristal) é o desdobramento hiperfino isotrópico no cristal.

Normalmente devemos corrigir este desdobramento obtido no cristal para a polaridade do meio onde a sonda se encontra. Esta correção é feita considerando um desdobramento hiperfino isotrópico na interface estudada, dado por:

$$a_{o\,(interface)} = 1/3 (2A_{\perp} + A_{//}) \qquad \text{(II-43)}$$

e o parâmetro de ordem corrigido para o caso específico do marcador de spin que possui o eixo z do nitróxido paralelo ao eixo longo das cadeias hidrocarbônicas dos lipídeos ou anfifílicos que compõem a interface e que se movimenta rapidamente é dado por:

$$S = \{(A_{//} - A_{\perp})/(A_{zz} - \tfrac{1}{2} (A_{xx} + A_{yy})\} . \{a_{o\,(cristal)} / a_{o\,(interface)}\} \qquad \text{(II-44)}$$

Quando na amostra, temos também os movimentos das micelas reversas e das sondas inseridas nas mesmas. Isso faz com que o espectro de EPR obtido represente a soma de todas as orientações possíveis entre o eixo longo da molécula e o campo magnético externo aplicado. Mesmo que macroscopicamente a amostra seja isotrópica, os espectros refletem a orientação de cada molécula e desta forma apresenta-se anisotrópico. Hubbell e McConnell (1971) apresentaram pontos específicos do espectro, mostrados na Figura II-6, dos quais é possível extrair os valores de $A_{//}$ e $A_{\perp}$ e, assim, calcular o parâmetro de ordem.

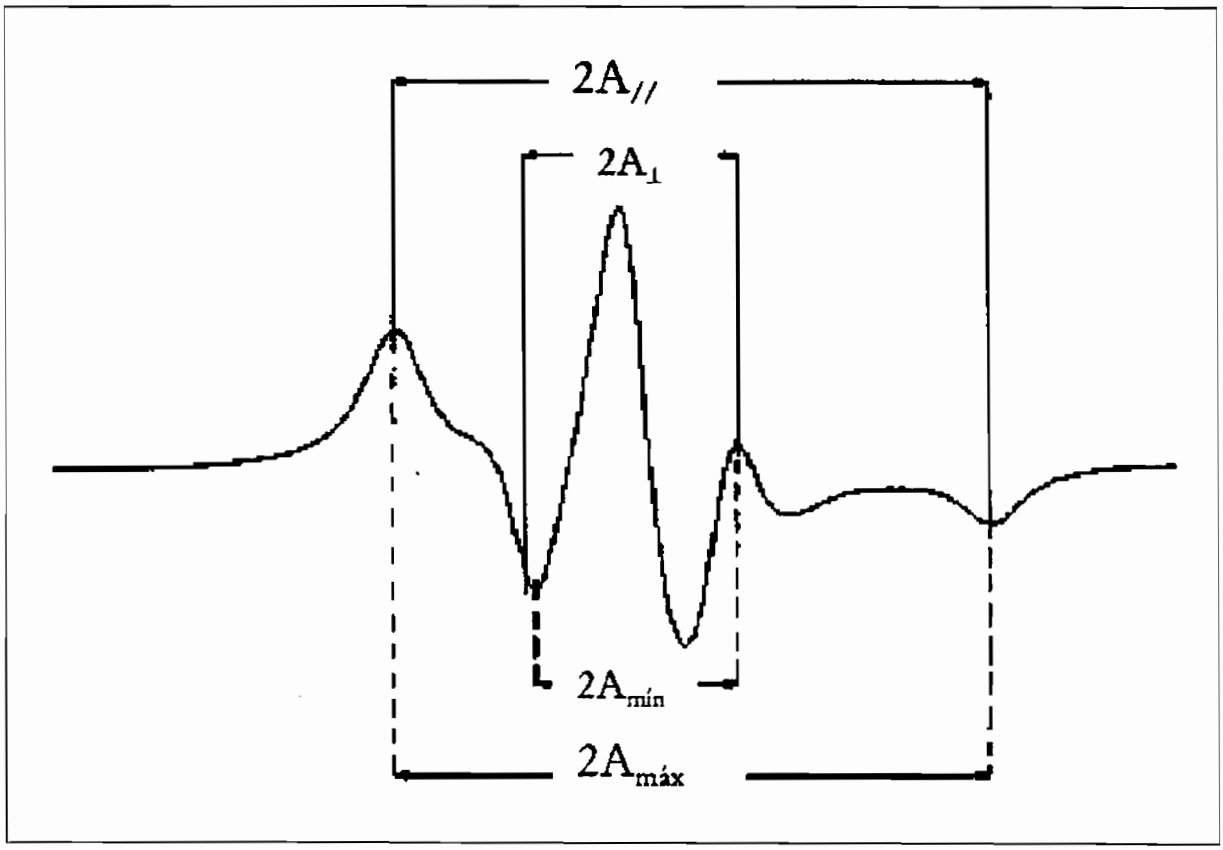


Figura II-6: espectro mostrando os pontos a partir dos quais devem ser medidos os parâmetros $2A_{//}$ e $2A_{\perp}$ e, os valores de máximo e mínimo desdobramentos hiperfinos, $2A_{máx}$ e $2A_{min}$.

Podemos observar neste espectro que o desdobramento hiperfino máximo, $2A_{máx}$, é uma boa medida para o desdobramento hiperfino efetivo externo (2 $A_{//}$); porém, o mesmo não ocorre entre os desdobramentos hiperfinos mínimo, $2A_{mín}$, e efetivo interno, $2A_{\perp}$. Uma boa forma para resolver esta discrepância foi proposta por Gaffney (1976) e Griffith e Jost (1976) que considera:

$$A_{//} = A_{\perp} \qquad \text{(II-45)}$$

$$A_{\perp} = A_{mín} + 1{,}4\,(1 - S_{ap}) \qquad \text{(II-46)}$$

$$S_{ap} = (A_{máx} - A_{mín}) / \{A_{zz} - \tfrac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})\} \qquad \text{(II-47)}$$

E, desta forma, chegamos ao parâmetro de ordem efetivo dado por:

$$S^{ef} = \{(A_{//} - A_{\perp})/(A_{zz} - \tfrac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy}))\}.\{a_{o\,(cristal)} / a_{o\,(interface)}\} \qquad \text{(II-48)}$$

Quando não conseguimos medir o desdobramento hiperfino interno, ou o valor de $A_{mín}$ o valor do desdobramento hiperfino externo, $A_{máx}$, é usado como parâmetro empírico proporcional a S^{ef}, quando a polaridade permanece constante na amostra. Um outro parâmetro que também pode ser usado para quantificar a ordem do sistema é a relação entre as alturas de campo baixo (h_{+1}) e campo central (h_0) do espectro, h_{+1}/ h_0.

Agora, é importante ter em mente que este tratamento para o parâmetro de ordem vale para movimentos rápidos da sonda. Quando os movimentos são lentos não conseguimos distinguir exatamente a ordem do sistema, mas temos no espectro uma mistura da mobilidade da sonda com a ordem do sistema.

II.3.d POLARIDADE

Existe uma dependência do desdobramento hiperfino isotrópico, a_o, com a polaridade do meio. Isto porque esta interação depende da densidade de elétrons desemparelhados no átomo de nitrogênio e esta varia com a polaridade do meio. Temos duas estruturas eletrônicas do radical nitróxido mostradas na Figura II-7, onde a estrutura (a) representa o elétron desemparelhado do radical no átomo de oxigênio e a estrutura (b) no átomo de nitrogênio. Quando o meio for muito polar ocorre um aumento na densidade de spins desemparelhados no átomo de nitrogênio favorecendo a estrutura (b), isto provoca

um aumento na constante de desdobramento hiperfino, a_o.

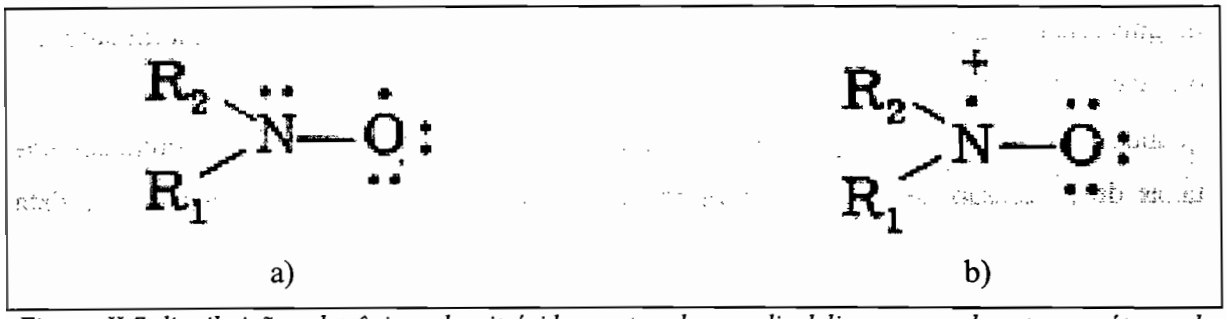


Figura II-7:distribuições eletrônicas do nitróxido mostrando o radical livre que pode estar no átomo de oxigênio ou no átomo de nitrogênio dependendo da polaridade do meio ambiente – no caso de alta polaridade do meio o radical fica no átomo de nitrogênio (estrutura b).

II.4 RELAXAÇÃO DO SPIN – TEMPOS DE CORRELAÇÃO ROTACIONAL

Considere uma população de spins eletrônicos em um campo magnético externo aplicado no eixo z, ou, **B** = Bo.**z**. Do ponto de vista clássico os spins precessam em torno do campo externo gerando uma magnetização líquida no eixo z. O equilíbrio térmico deste sistema é determinado a nível microscópico pelas energias dos níveis eletrônicos e estas são resultantes da interação com o campo externo e da distribuição de Boltzmann dos spins nos vários níveis. Assim, mudanças no valor do equilíbrio térmico para **B** constante são devidas à mudanças populacionais dos estados permitidos e, estas resultam de transições entre os níveis permitidos. A taxa de troca entre as populações dos níveis de spins é exponencial e caracterizada por T_1 , o tempo de relaxação longitudinal ou spin-rede. Para cada spin, em separado, precessando existe uma componente do momento magnético girando no plano xy perpendicularmente ao campo magnético aplicado. Entretanto, não existe uma coerência de fase entre os movimentos dos spins no plano xy , de modo a magnetização em x e em y são nulas. Se impusermos uma coerência de fase na movimentação dos spins no plano xy, pela introdução de uma perturbação (normalmente a aplicação de uma microonda), teremos

então uma magnetização resultante precessando no plano xy, M_x e M_y . Depois que esta perturbação for desligada o sistema naturalmente perde a coerência de fase e a magnetização em xy decai para zero. Este decaimento é exponencial e é denominado T_2, ou, tempo de relaxação transversal ou spin-spin. A escolha do nome torna-se evidente quando percebemos que a perda da coerência de fase é conseqüência das flutuações nas taxas de precessão de cada spin individualmente devido às suas interações locais. Esta perda de coerência não envolve transições dos spins entre níveis permitidos e, deste modo, T_1 e T_2 são normalmente diferentes.

Quando o movimento da sonda paramagnética for isotrópico, ou seja, não apresentar uma direção preferencial de movimentação e for muito rápido em relação à escala de tempo de uma medida de EPR, os espectros serão insensíveis à essa velocidade e, o tensor de acoplamento hiperfino, A, será a média de seus componentes.

Agora, quando o movimento do marcador for da ordem do tempo de medida do EPR, os espectros serão modificados pois a largura da linha do espectro será determinada pela velocidade de movimentação da sonda. Quanto maior a velocidade menor serão as larguras das linhas, ou seja, são grandezas inversamente proporcionais. Porém, na situação em que o marcador ficar muito lento (com tempos de correlação rotacionais da ordem de 3.10^{-7} segundos) o espectro refletirá uma distribuição aleatória das orientações dos eixos moleculares. Neste caso, cada marcador contribuirá com um espectro particular referente à sua orientação relativa ao campo magnético externo e o espectro resultante será a soma de todas as possíveis orientações em relação ao campo externo.

Na situação intermediária entre esses dois extremos, ou seja, quando o tempo de correlação estiver entre 5.10^{-11} e 1.10^{-8} segundos, a forma das linhas do espectro será Lorentziana. Neste caso, a largura da linha poderá ser relacionada com o tempo de relaxação rotacional transversal ou spin-spin T_2. Mais precisamente, a largura da linha a meia altura será igual a $2/T_2$. Devemos, neste caso, tratar o alargamento diferencial das linhas do espectro usando o método desenvolvido por Redfield (1965) baseado na teoria de perturbação dependente do tempo.

A largura da linha Lorentziana do espectro relaciona-se com o número quântico de spin nuclear do nitrogênio do radical nitróxido através da equação:

$$\Delta H^{L}_{mI} = A + B\, m_I + C\, m_I^2 \qquad \text{(II-49)}$$

onde m_I = -1, 0, 1 para o nitrogênio. O termo A é responsável pelo alargamento uniforme das três linhas, o termo B introduz um alargamento diferencial das três linhas e o termo C causa um alargamento simétrico em torno da linha de campo central. B e C podem ser determinados separadamente através das diferentes larguras das três linhas Lorentzianas.

$$B = \tfrac{1}{2}\, \Delta H_o.[(h_o/h_{+1})^{1/2} - (h_o/h_{-1})^{1/2}] \qquad \text{(II-50)}$$

$$C = \tfrac{1}{2}\, \Delta H_o.[(h_o/h_{+1})^{1/2} + (h_o/h_{-1})^{1/2} - 2] \qquad \text{(II-51)}$$

onde ΔH_o é a largura de linha pico a pico do campo central, h_o é a amplitude da linha de campo central (correspondente a $m_I = 0$), h_{+1} é a amplitude da linha de campo baixo (m_I = +1) e h_{-1} é a amplitude da linha de campo alto (m_I = -1). Porém, as larguras de linha não são apenas Lorentzianas, possuindo também Gaussianas. Neste caso, estes valores de B e C devem ser corrigidos com:

$$B_{cor} = S(\chi_o)\,.\,B$$

$$C_{cor} = S(\chi_o)\,.\,C$$

$$S(\chi_o) = (\,1 + 1{,}78.\chi_o + 1{,}85.\,\chi_o^{\,2}) \,/\, (1 + 2{,}08.\chi_o) \qquad \text{(II-52)}$$

$$\chi_o = \langle \Delta H_o^{G} \rangle \,/\, \Delta H_o^{L} \qquad \text{(II-53)}$$

onde ΔH_o^{G} é a largura de linha pico a pico do campo central com forma Gaussiana e ΔH_o^{L} é a largura de linha pico a pico do campo central com forma Lorentziana.

Com os valores de B e C corrigidos podemos determinar os tempos de correlação rotacionais segundo Marsh (1989):

$$\tau_{20} = c_1.(\,C_{corr} + c_2\, B_{corr}) \qquad \text{(II-54)}$$

$$\tau_{22} = b_1.(B_{corr} + b_2 C_{corr}) \qquad \text{(II-55)}$$

c_1, c_2 , b_1 e b_2 são parâmetros empíricos que dependem do eixo preferencial de rotação do marcador de spin. Para o nitróxido que possui rotação preferencial em torno do eixo z, temos: c_1 = 1,16ns; c_2 = - 0,0316ns; b_1 = - 0,335 e b_2 = 1,13ns.

Costumamos definir dois tempos de correlação rotacional para os marcadores de spin que possuem um eixo de rotação preferencial, como no caso do nitróxido; assim usamos os tempos de correlação rotacionais paralelo, $\tau_{//}$, e perpendicular, $\tau_{\perp}$, em relação ao eixo de simetria do marcador. No caso do nitróxido, $\tau_{//}$ está na direção do eixo z e $\tau_{\perp}$ está perpendicular. Neste caso, as expressões após todas as correções para determinar estes tempos são dadas por (Yushmanov et al., 1997):

$$\tau_{//} = 6{,}51.10^{-10}.\ \Delta H_o.[(h_o/h_{-1})^{1/2} - (h_o/h_{+1})^{1/2}] \qquad \text{(II-56)}$$

$$\tau_{\perp} = 6{,}51.10^{-10}.\ \Delta H_o.[(h_o/h_{-1})^{1/2} + (h_o/h_{+1})^{1/2} - 2] \qquad \text{(II-57)}$$

MATERIAIS E MÉTODOS

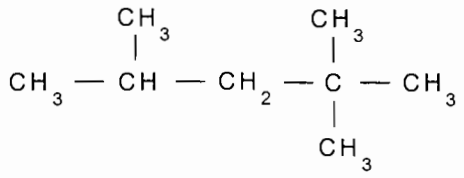
Neste capítulo apresentamos os materiais utilizados bem como o método utilizado para a preparação das amostras. Além disso apresentamos as medidas preliminares essenciais, tais como o teste de pureza do AOT utilizado e as medidas de absorbância das micelas reversas.

Falamos também rapidamente sobre os equipamentos utilizados neste trabalho.

III.1 MATERIAIS UTILIZADOS

a) Isooctano ($(CH_3)_2$ CH CH_2 C $(CH_3)_3$)

Como solvente orgânico utilizamos o 2,2,4 – trimetilpentano, ou isooctano, para medidas espectroscópicas (HPLC) adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich e utilizado sem posterior purificação. A fórmula estrutural do isooctano é mostrada na Figura III-1. Seu peso molecular é de 114,23; densidade 0,692mg/ml e viscosidade em torno de 0,70cp a 20°C.



Isooctano

Figura III-1: fórmula estrutural do isooctano (solvente orgânico utilizado na preparação das micelas reversas de AOT).

b) AOT

Para a preparação das micelas reversas utilizamos o anfifílico ou surfactante bis-(2–etilhexil) sulfosucinato de sódio, abreviado AOT ou aerosol-OT gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mário Politi do Instituto de Bioquímica da USP.

É sabido que os surfactantes são moléculas anfifílicas possuindo, então, uma região polar e outra não-polar. O termo surfactante na verdade é uma contração de agente ativo de superfície, enfatizando a tendência dessas moléculas anfifílicas de se agruparem em superfícies e interfaces (ar/água, água/óleo, etc.). Como resultado desta associação hidrofóbica, estas moléculas formam uma variedade enorme de estruturas incluindo micelas, micro-emulsões e estruturas lamelares ou bicamadas. O AOT é um anfifílico pois possui uma região hidrofóbica constituída pela dupla cadeia ramificada de sete carbonos e uma região hidrofílica, a região de sua cabeça carregada negativamente; sua estrutura é mostrada na Figura III-2. Assim falamos que o AOT é um surfactante aniônico ligado a um íon Na^+ . Sua massa molecular é de 444,5g/mol.

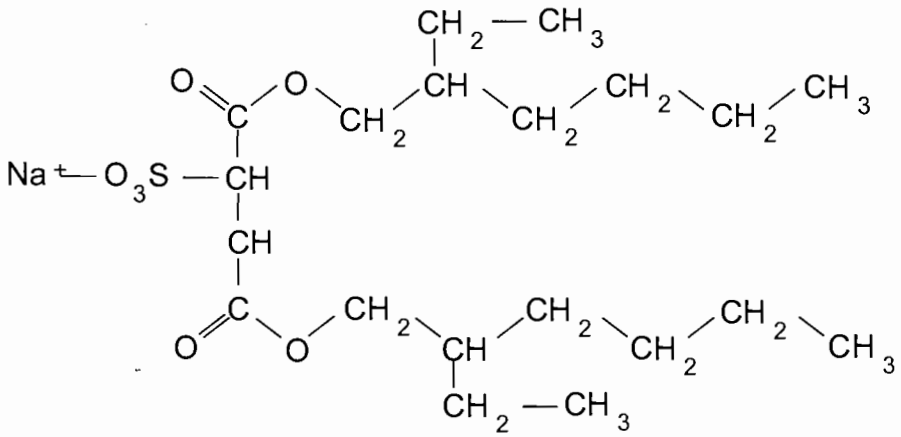


Figura III-2: fórmula estrutural do AOT

Um dos primeiros cuidados tomados neste trabalho foi garantir a pureza do AOT utilizado, procedimento normal nos estudos espectroscópicos envolvendo micelas reversas (Luisi, 1986). Assim, a primeira medida realizada foi o teste de pureza do AOT utilizado. Este teste baseia-se no espectro de absorção na região de 250 a 450 nm de uma solução de AOT 50mM em isooctano na temperatura de 20°C. Mostramos na Figura III-3 o espectro obtido que é similar ao espectro apresentado por Luisi et al. (1986). Observamos que nosso AOT possui alguma impureza visto uma pequena absorbância (0,010) próximo a 290nm . Como essa impureza não é fluorescente e como nossas análises são basicamente comparativas optamos por utilizar o anfifílico sem qualquer purificação anterior.

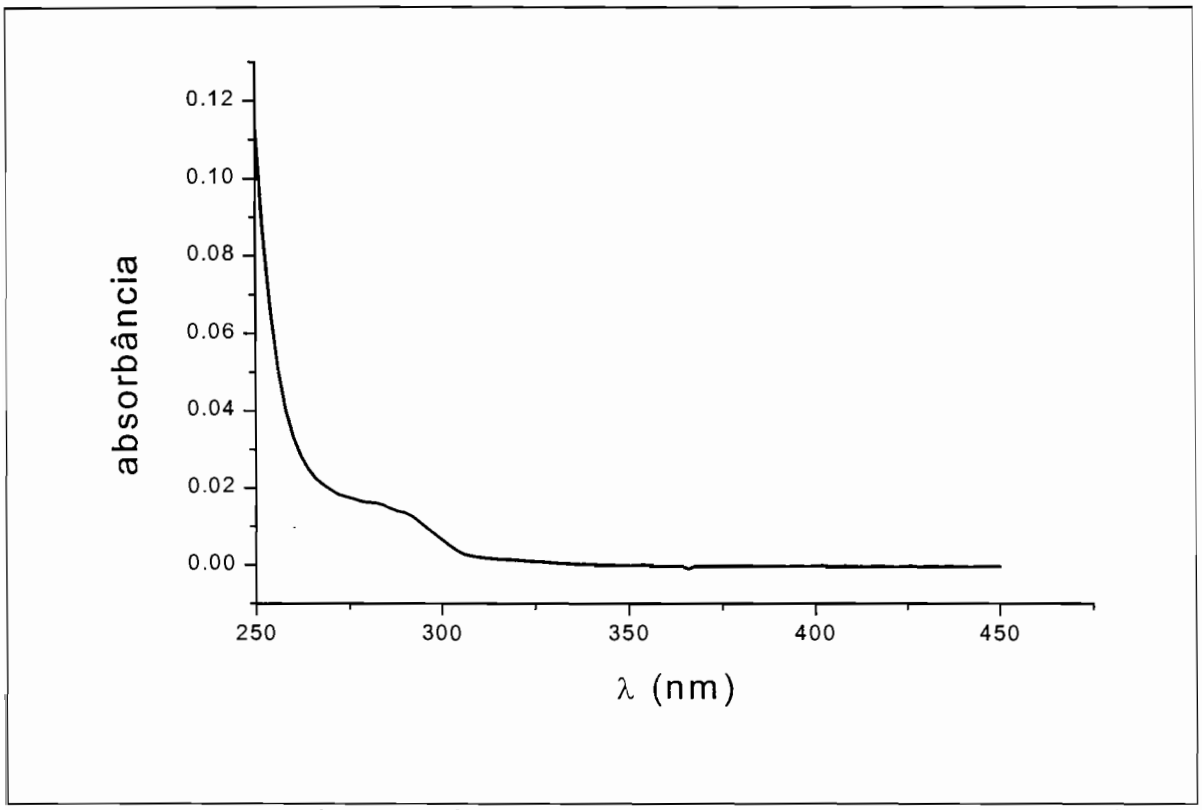


Figura III-3: espectro de absorbância da solução de AOT 50mM em isooctano a 20°C, para a verificação da presença de impurezas.

c) Triptofano

Utilizamos o DL - Triptofano ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) de peso molecular 204,23 adquirido comercialmente da Merck, lote: 1949031, que possui fórmula estrutural apresentada na Figura III-4.

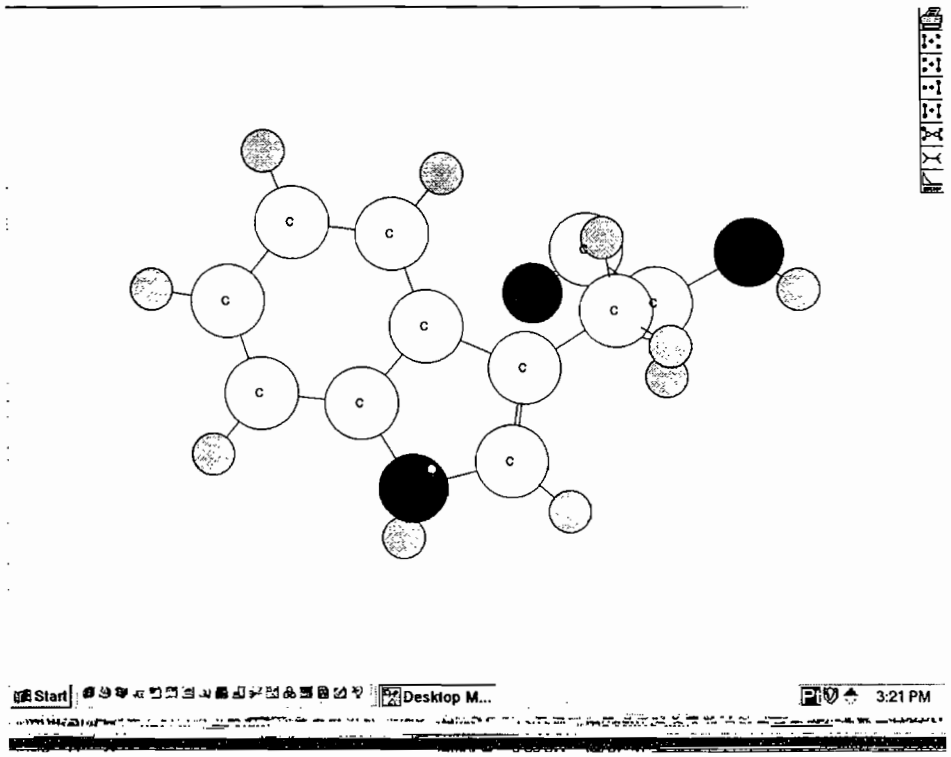


Figura III-4: representação gráfica do DL- triptofano fornecida pelo programa de modelagem molecular "Desktop Molecular Modeller".

Este aminoácido possui radical não polar, é hidrofóbico e fluorescente devido à presença do anel aromático, apresentando emissão máxima em torno de 345 e 355nm em solução aquosa quando excitado entre 280 e 290nm. A fluorescência do triptofano depende essencialmente do pH e da polaridade do meio. A eficiência quântica da emissão do triptofano em água e pH 7 alcança valores próximos a 0,14 (Szabo & Rayner, 1980).

Agora, quando o triptofano está inserido em proteínas ou peptídeos suas características são alteradas – normalmente o comprimento de onda de máxima emissão

fluorescente é deslocado para outros valores e o rendimento quântico é modificado; isso depende do local onde se encontra o resíduo triptofano, se muito exposto ao ambiente exterior ou não quando na molécula; ou seja, dependendo da conformação da macromolécula em questão. Logo, estudos sobre fluorescência de proteínas e peptídeos que possuem resíduo(s) triptofano(s) levam à importantes informações sobre suas propriedades conformacionais e sobre interações com outras moléculas ou íons.

d) LTL

Utilizamos o lisil-triptofil-lisina ($C_{23}H_{36}N_6O_4$) adquirido comercialmente da Sigma (L5384 – lote 41H0868), sem purificações adicionais. Sua massa molecular é 406,6 g/mol. Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura III-5a e seu perfil de hidrofobicidade segundo Voet & Voet (1995) é mostrado na Figura III-5b.

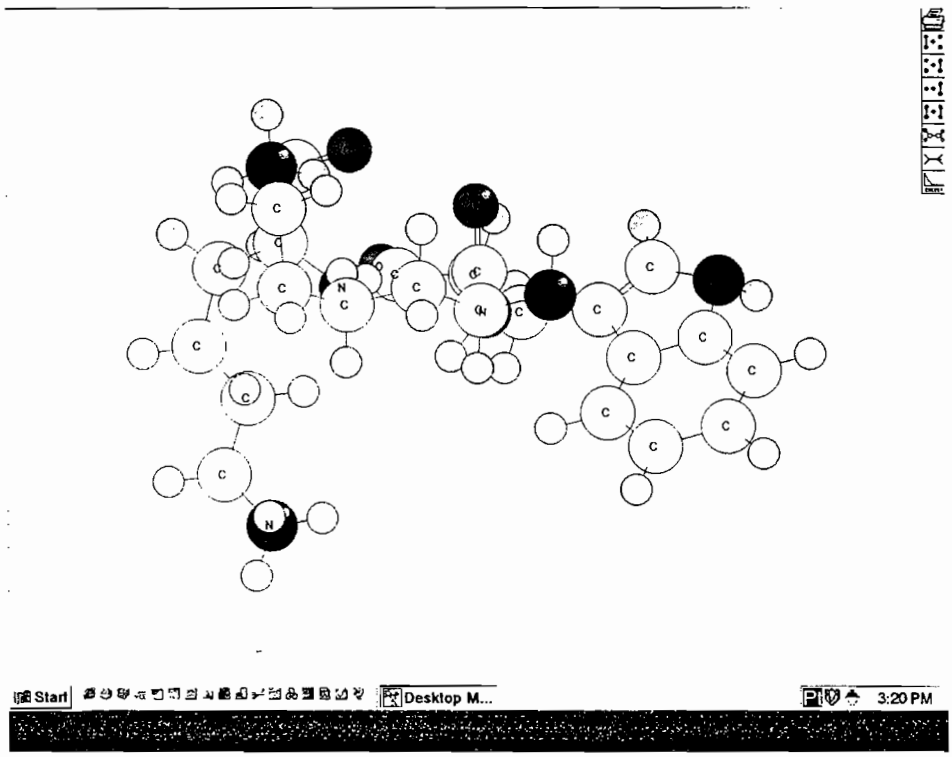


Figura III-5a: fórmula estrutiral do LTL

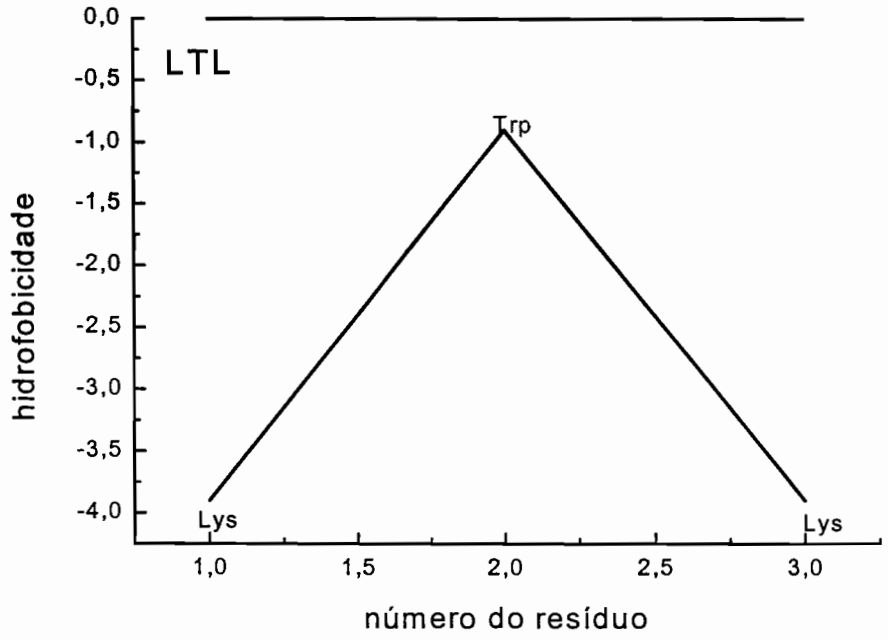


Figura III-5b: perfil de hidrofobicidade do LTL.

O lisil-triptofil-lisina é um tripeptídeo formado por um triptofano e duas lisinas carregadas positivamente. Assim, os dois extremos deste tripeptídeo são hidrofílicos enquanto que no centro temos o triptofano com seu caráter hidrofóbico. A importância da utilização do LTL neste trabalho provém de suas interações elétricas com a interface de AOT.

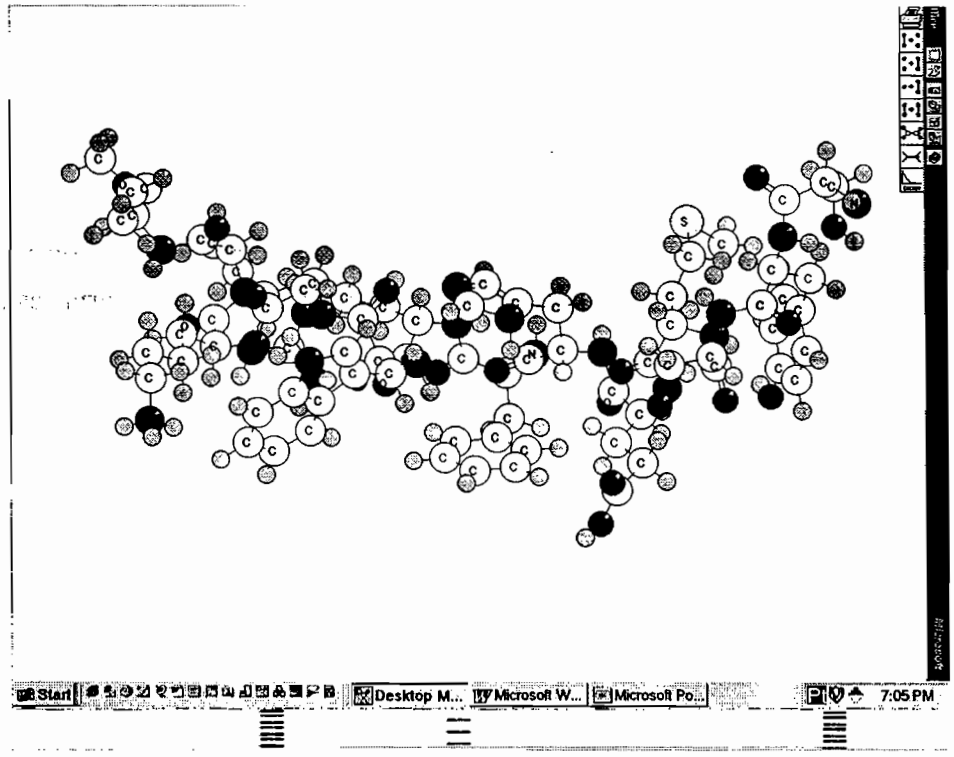
e) Peptídeos Melanotrópicos

- **α-MSH**

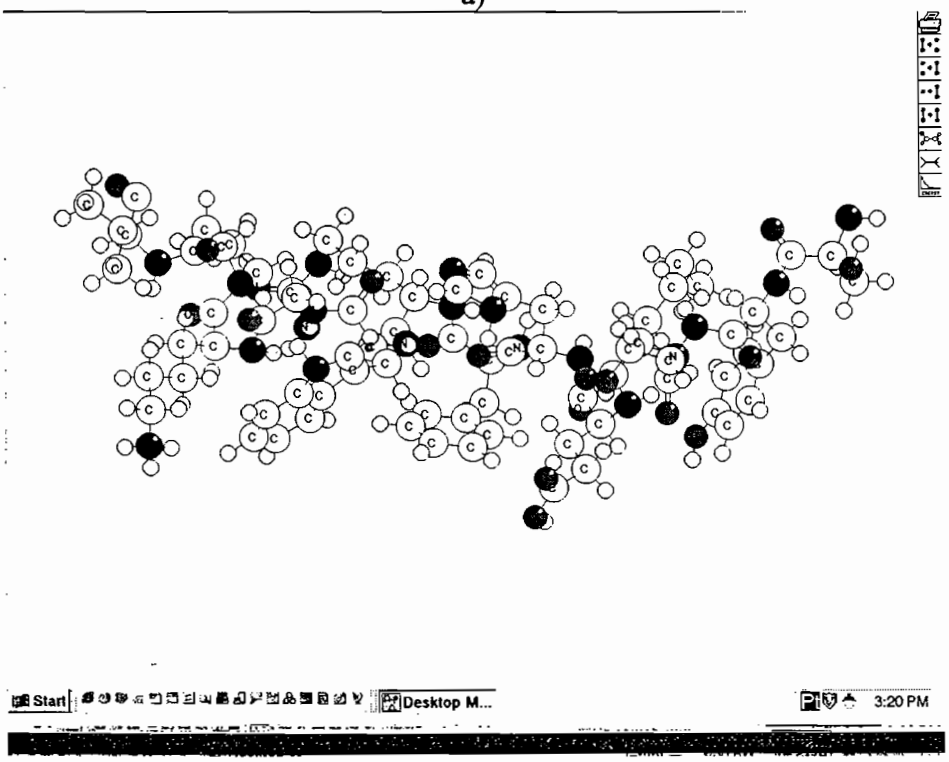
Foi utilizado o hormônio estimulante do melanócito adquirido comercialmente da Sigma Chemical Co. Sua estrutura primária está mostrada na Figura III-6a e seu perfil de hidrofobicidade segundo Voet & Voet (1995) está dado na Figura III-7a. Sua massa molecular é de 1664,9g/mol.

- **MSH1**

Foi utilizado o análogo ao hormônio estimulante do melanócito, MSH 1 ou [Nle^4,D-Phe^7]-α-Melanocyte Stimulating Hormone, adquirido comercialmente da Sigma Chemical Co (lote: 101H58302). Sua estrutura primária está mostrada na Figura III-6b. Seu perfil de hidrofobicidade segundo Voet & Voet (1995) está na Figura III-7b junto com o do α-MSH a título de comparação.



a)



b)

Figura III-6: fórmulas estruturais dos peptídeos melanotrópicos - α-MSH (a) e o análogo MSH1 (b).

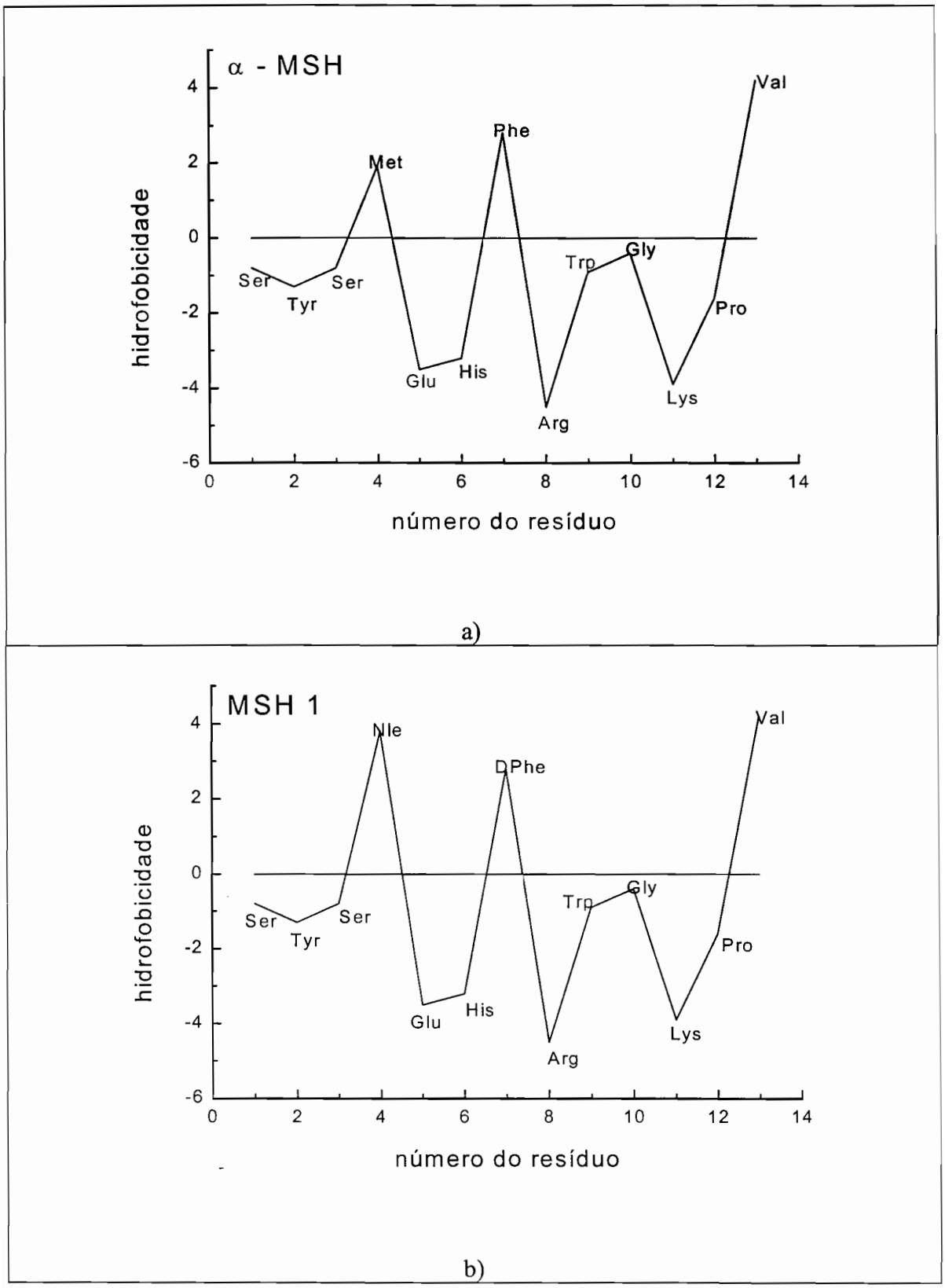


Figura III-7: perfis de hidrofobicidade do α-MSH (a) e do MSH1 (b) segundo Voet & Voet (1995).

f) 5-SASL

Utilizamos o 5-SASL ou ácido 5-(4,4-dimetil-3-oxil-2-oxazolidinil)-esteárico ($C_{22}H_{42}NO_4$) adquirido comercialmente da Sigma (D5273) com massa molecular de 384,6g/mol como sonda paramagnética para as medidas de RPE. O 5-SASL é uma sonda da família dos ácidos esteáricos (*Stearic acid spin label*), possuindo uma cadeia hidrocarbônica com 18 carbonos, sendo que o grupo nitróxido encontra-se inserido no quinto carbono da cadeia. Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura III-8.

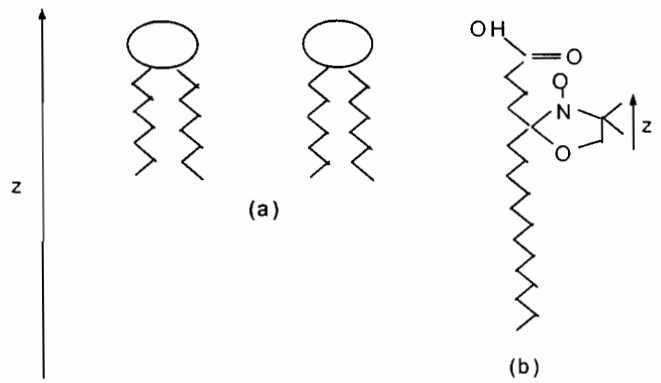


Figura III-8: fórmula estrutural da sonda paramagnética eletrônica 5-SASL em um esquema representativo (sem escala) da posição da sonda em relação ao eixo z da interface de AOT (em vermelho). Em azul é mostrado o eixo do Nitróxido da sonda que é perpendicular ao eixo z da interface. (a) AOT e (b) 5-SASL.

III.2. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Na preparação das amostras foram utilizados as soluções de tampão fosfato 50mM, pH 7,4 e citrato 50mM, pH 4,4.

Foram preparados basicamente dois tipos de solução de micelas reversas; uma para medidas no aparelho de ressonância paramagnética eletrônica e outra para as medidas de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo.

a) Soluções estoque 10^{-3}M dos fluoróforos em tampão fosfato 50mM (pH 7,4).

Soluções estoque (10^{-3}M) de Trp, de LTL, de α-MSH e MSH 1 foram preparadas em solução tampão fosfato e guardadas no freezer.

b) Preparação das micelas reversas de AOT

As micelas reversas foram preparadas pela simples diluição, seguida de intensa agitação, do AOT em pó à quantidade necessária de isooctano para que obtivéssemos uma solução de AOT 50mM. Como a massa molar de AOT é de 444,5g/mol a relação é de 22,225mg de AOT para cada mililitro de isooctano. Como o isooctano é muito volátil estas amostras não foram estocadas, mas preparadas a cada vez que uma medida seria realizada.

Foram realizadas medidas de absorbância das amostras de micelas reversas de AOT para controle do sistema. Dessas amostras observamos um fato bastante interessante; as micelas reversas de AOT demoram um certo tempo para estabelecer seu equilíbrio dinâmico. Isso foi observado através de uma experiência muito simples que foi a medida da absorbância em função do tempo. Os resultados obtidos mostraram que as absorbâncias aumentavam com o tempo, cuja contagem foi iniciada logo após o término

da preparação da amostra. Assim, para que as amostras de micelas reversas utilizadas possuíssem um valor fixo para as absorbâncias (dentro das flutuações aceitáveis) elas eram preparadas no dia anterior às medidas e estocadas no freezer para diminuir a evaporação do isooctano.

c) Variação do valor de w_o nas micelas utilizadas.

A variação da quantidade de água presente nas micelas reversas, ou do valor de w_o, era feita através da adição de pequenas alíquotas (1 ou 2 μl) de soluções tampão ou Trp, ou LTL, ou α-MSH ou MSH 10^{-3} M.

Um resultado interessante é mostrado na Figura III-9, na qual damos o gráfico da turbidez em 228nm das amostras de micelas reversas 50mM em isooctano com alíquotas crescentes de tampão fosfato a 20°C. É interessante notar que, aparentemente, temos uma transição no sistema para w_o próximo a 20, visto o salto nos valores de turbidez, indicando que nestas condições as micelas reversas podem estar sofrendo mudança estrutural (talvez a formação de *clusters* ou de fases hexagonais). Este resultado fez com que escolhêssemos estudar a região de w_o compreendida entre zero e aproximadamente vinte.

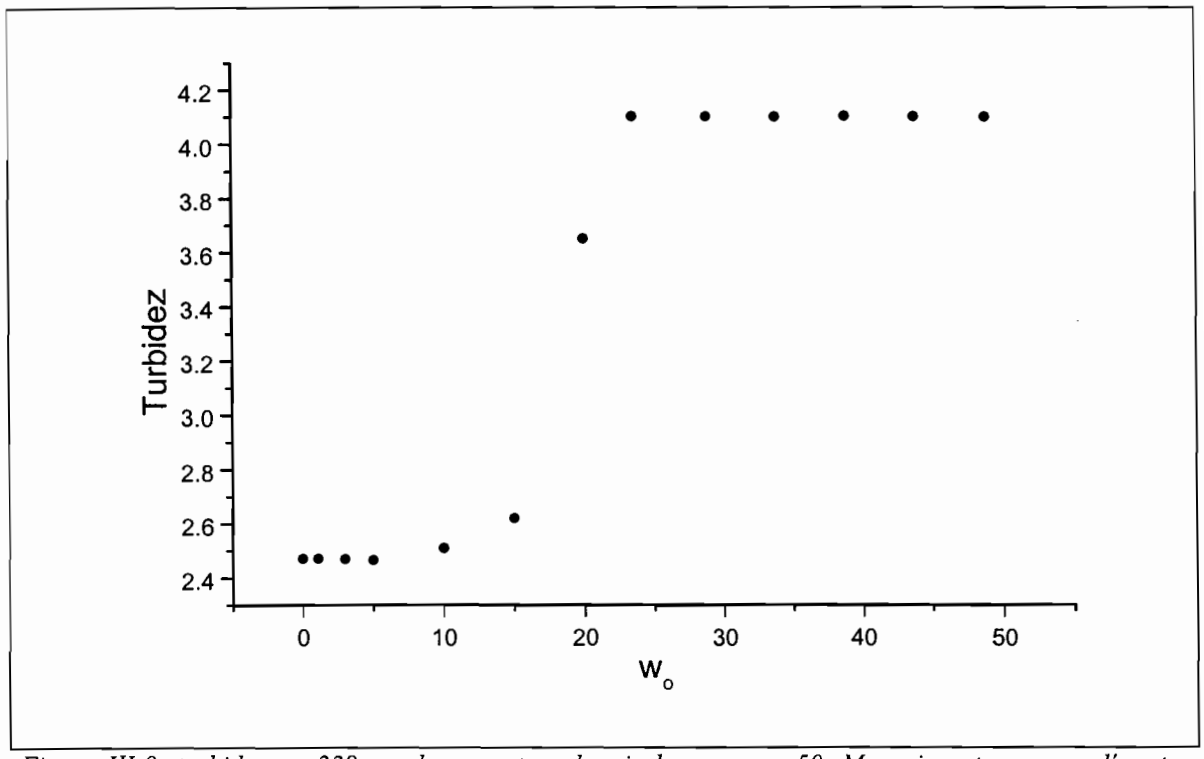


Figura III-9: turbidez em 228nm das amostras de micelas reversas 50mM em isooctano com alíquotas crescentes de tampão fosfato a 20°C em função do valor de w_o.

d) Preparação das amostras de micelas reversas com o 5-SASL.

As amostras utilizadas nas medidas de ressonância paramagnética eletrônica necessitaram a introdução de uma sonda paramagnética (5-SASL) na interface de micelas reversas. Para tanto fizemos um filme do 5-SASL da seguinte maneira: foi preparada uma solução de 5-SASL em clorofórmio dissolvendo o 5-SASL. Desta solução tomamos o volume necessário para que no final da preparação ficássemos com 0,1mM de 5-SASL em um volume total de 1ml de isooctano. Depois de coletado o volume necessário, o clorofórmio foi evaporado com fluxo de Nitrogênio e o tubo de ensaio foi deixado em vácuo durante um período de cinco horas para a evaporação total do clorofórmio residual. Neste mesmo tubo de ensaio foi acrescentado o AOT na forma de pó e o isooctano como solvente; esta mistura foi submetida à agitação intensa de forma que o filme de 5-SASL soltasse completamente das paredes do tubo e se incorporasse na interface de AOT. O 5-

SASL foi usado na proporção de 0,2% em relação ao AOT; ou seja 0,1mM de 5-SASL numa solução de AOT 50mM em 1mililitro de isooctano.

Variamos também os valores de w_o destas micelas reversas de AOT com 5-SASL, através do acréscimo de pequenas alíquotas de solução tampão fosfato ou Trp, ou LTL, ou α-MSH ou MSH 1.

III.3. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

a) As medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram realizadas no espectrometro da Bruker EMX, variando o valor de w_o, com o campo centrado em 3355G, varredura 100G. A microonda tinha potência de 5,078 mW e freqüência de modulação 100kHz com amplitude 1,30G. Todas as medidas foram feitas a 20° C.

b) As medidas de fluorescência de estado estacionário foram realizadas no espectrofluorímetro Fluorolog-3 Modelo FL3-11 da ISA – Jobin Yvon – SPEX conectado a um banho termostático CH/P Forma Scientific Modelo 2006, com o qual mantivemos a temperatura em torno de 24°C. O comprimento de onda de excitação foi 295nm e a emissão foi varrida de 300 a 450nm. As fendas utilizadas tanto na emissão quanto na excitação foram 1 e 1mm para solução tampão e 2 e 2mm para as soluções micelares.

c) As medidas de fluorescência resolvida no tempo foram realizadas no mesmo espectrofluorímetro, que permite a obtenção de espectros de excitação e de emissão, além de medidas de anisotropia de fluorescência. A deteção nesse equipamento baseia-se no método de correlação temporal de fótons. Um pulso de luz excita a amostra que, por sua vez, emite um pulso de luz. Uma fotomultiplicadora de partida detecta o pulso de excitação enquanto o pulso de luz emitido pela amostra fluorescente é detectado por uma fotomultiplicadora de parada. Os sinais das fotomultipicadoras são correlacionados

temporalmente em um conversor tempo-amplitude (TAC), que determina o tempo transcorrido entre a excitação e a emissão. O evento é registrado em um analisador multi-canal, o TAC é zerado, e o processo repete-se após um novo pulso de excitação. Ao final de um número estatisticamente significativo de eventos (10^5 contagens, tipicamente) obtém-se um histograma descrevendo o decaimento temporal da fluorescência. Para tanto o sistema é formado por um laser de Argônio (modelo 2060-10SA da Spectra Physics), um laser de Titânio-safira (modelo 3950 da Spectra Physics), um selecionador de pulsos (3980-2S da Spectra Physics), um gerador de terceiros harmônicos (GWN-23PL da Spectra Physics), uma placa microcanal para detecção (R3809U da Hamamatsu) e, por fim, um analisador multi-canal que gera o perfil de decaimento (bancada ótica OB900 da Edimburgh Instruments).

O sistema de análise de dados desse equipamento possui uma particularidade em relação à largura temporal do pulso de excitação, que também deve ser medido experimentalmente. Como a largura é finita, o decaimento experimental está convoluido com a excitação, e a extração da curva real de decaimento é feita através de ajustes dos pontos experimentais com uma função tentativa. A convolução da função tentativa com o perfil de excitação é comparada com a curva experimental por meio de métodos de mínimos quadrados, e critérios estatísticos são empregados para se avaliar a qualidade do ajuste. Também faz parte do equipamento um *software* apropriado para ajustes do perfil de decaimento a processos físicos de ocorrências mais comuns, como por exemplo ajustes a decaimentos mono- e multi-exponenciais, distribuições de tempos de vida, análise global, espectros de emissão resolvidos no tempo, decaimento da anisotropia e casos simples de supressão de fluorescência. O *software* para análise de dados foi adquirido da Edimburgh Instruments.

III.4. MEDIDAS PRELIMINARES DE ABSORÇÃO ÓTICA

As medidas de absorção ótica foram realizadas com o intuito de controlarmos o espalhamento e absorbância das amostras usadas, antes de medirmos as intensidades de emissão fluorescente principalmente quando estamos lidando com a supressão da mesma pela introdução da Acrilamida. Isso porque os valores das intensidades de emissão fluorescente devem ser corrigidos separando o efeito de supressão de fluorescência do "efeito filtro" provocado pelas moléculas presentes na solução que absorvem parte da radiação de excitação (fazendo com que uma quantidade menor de fluoróforo seja excitado) ou de emissão (fazendo com que uma quantidade menor de radiação alcance os detetores) e, diminuindo assim a intensidade do pico de emissão fluorescente. É fundamental verificar se existe realmente supressão da fluorescência dos fluoróforos pela acrilamida pois os experimentos de supressão podem dar informações a respeito das posições relativas do fluoróforo nas micelas reversas.

Normalmente o grande interesse no espectro de absorção é a medida do coeficiente de extinção, ε , que carrega a dependência da intensidade de absorção com o comprimento de onda da luz incidente na amostra. Quando este coeficiente de extinção é calculado no comprimento de onda de máxima absorção, ou seja, no ápice da banda de absorção é denominado coeficiente de extinção máximo, $\varepsilon_{máx}$. Medimos então, no espectro de absorção, o valor da intensidade máxima de absorção $A_{máx}$, que se relaciona com $\varepsilon_{máx}$ da seguinte maneira:

$$A_{max} = \varepsilon_{máx}.Cd$$

onde d é o caminho ótico, que depende das cubetas utilizadas e C é a concentração da amostra. Ficamos com:

$$\varepsilon_{máx} = \frac{A_{max}}{Cd}$$

Quando trabalhamos com micelas reversas os coeficientes de extinção dependem do valor de w_o, ou seja, da quantidade de água presente no sistema, porque fazemos o gráfico de absorbância *versus* w_o, temos:

$$tg\alpha = \frac{A_{max}}{w_o}$$

$$tg\alpha = \frac{\varepsilon_{max}.C.d}{w_o}$$

onde, neste caso, C = [fluoróforo] . Então:

$$\varepsilon_{max} = \frac{tg\alpha.w_o}{[fluoróforo].d} \quad (M.cm)^{-1}$$

Lembrando que w_o é definido como o número de moléculas de água por cabeça de AOT, e que, neste caso, junto com a água temos os fluoróforos, w_o fica igual a:

$$w_o = \frac{[fluróforo]}{[AOT]} \quad \text{e, consequentemente}$$

$$\varepsilon_{max} = \frac{\tan\alpha}{[AOT].d} \quad (M.cm)^{-1} \quad \text{com } [AOT] = 50mM \text{ e } d = 0{,}5cm$$

Na Figura III-10 mostramos os gráficos de absorbância em função de w_o para todas as amostras com micelas reversas de AOT e na Tabela III-1 apresentamos os coeficientes de extinção. As absorbâncias das amostras de micelas reversas de AOT são sempre maiores do que as absorbâncias das amostras em tampão fosfato (dados não mostrados), devido à absorção da própria micela reversa. As absorbâncias destas amostras, apesar de maiores do que as das amostras com solução tampão fosfato ainda se mantém menores do que 0,1 para valores de w_o menores que aproximadamente 14.

Assim, não será necessária a correção das intensidades de emissão fluorescente para o espalhamento.

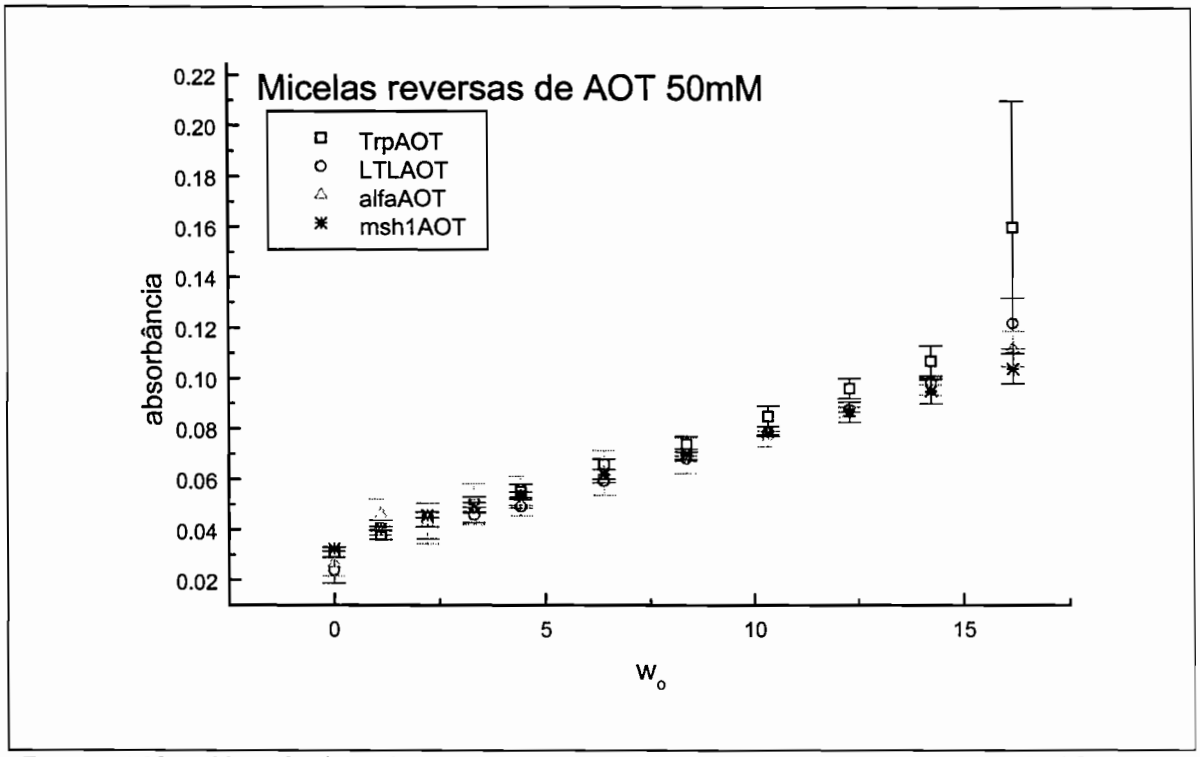


Figura III-10: gráficos de absorbância em função do w_o para amostras de micelas reversas de AOT 50mM. Medidas feitas em 296nm e a 20°C.

Das curvas apresentadas no gráfico da Figura III-10 obtivemos os valores dos coeficientes mostrados na Tabela III-1.

Amostra	$\varepsilon_{máx}$ (M.cm)$^{-1}$
Trp em AOT	0,2092 ± 0,0002
LTL em AOT	0,1969 ± 0,0003
α-MSH em AOT	0,1760 ± 0,0004
MSH 1 em AOT	0,1732 ± 0,0009

Tabela III-1: coeficientes de extinção para amostras de micelas reversas de AOT 50mM.

MEDIDAS DE RPE EM MICELAS REVERSAS DE AOT 50mM OBTIDAS COM 5-SASL - RESULTADOS OBTIDOS, ANÁLISES E DISCUSSÕES

Decidimos trabalhar com a sonda 5-SASL porque segundo Kommareddi et al. (1993) as sondas localizadas na região das cadeias hidrocarbônicas do AOT em micelas reversas são as que experimentam o maior grau de restrição ao movimento com a variação de w_o, ou mais precisamente com o aumento do valor de w_o, especialmente o 5-SASL.

1) 5-SASL E A ADIÇÃO DA INTERFACE DE AOT

Nesta primeira análise observamos a forma das curvas componentes dos espectros do 5-SASL em tampão fosfato, em isooctano e na presença da interface de AOT mostrados na Figura IV-1 e comparamos os valores dos tempos de correlação rotacionais paralelo e perpendicular ao eixo principal da sonda , ou seja, ao eixo da cadeia hidrocarbônica do 5-SASL (para maiores detalhes veja o capítulo de materiais e métodos) mostrados na Tabela IV-1.

O espectro do 5-SASL em tampão fosfato é característico de tombamento rápido - quando a sonda se encontra praticamente livre na solução. Pode-se constatar pelas formas das linhas do espectro da Figura IV-1 que ele é, então, praticamente isotrópico (o pequeno grau de anisotropia deve-se à própria estrutura molecular da sonda que possui um eixo principal de rotação). O mesmo efeito pode ser constatado pelos valores dos tempos de correlação rotacional paralelo e perpendicular ao eixo principal da sonda na Tabela IV-1 que são muito próximos entre si.

O espectro do 5-SASL em isooctano mostrado na Figura IV-1 apresenta uma certa anisotropia em parte causada pela estrutura molecular da própria sonda e em parte pela viscosidade deste meio (a viscosidade do isooctano é de 0,7cp a 20° C). O alargamento observado pode ser devido a trocas entre o 5-SASL e o oxigênio presente no isooctano que,

segundo Gurahay et al. (1996) pode facilmente penetrar nas micelas reversas especialmente para pequenos valores de w_o . A pequena anisotropia também pode ser observada pela diferença entre os valores dos tempos de correlação rotacionais apresentados na Tabela IV-1, sendo que, quanto maior a diferença entre os valores dos tempos de correlação rotacional maior será a anisotropia experimentada pela sonda.

Quando a interface de AOT é introduzida no sistema observamos que o espectro torna-se mais anisotrópico do que quando em tampão ou em isooctano (Figura IV-1) apresentando menos movimento por parte da sonda (a sonda está mais imóvel), com um grande alargamento das três linhas. Observamos portanto um aumento nos valores dos tempos de correlação rotacional tanto em relação ao valor obtido para o tampão quanto ao do isooctano sendo, porém, que o valor de $\tau_\perp$ varia muito mais do que $\tau_{//}$. Esse aumento diferente nos valores dos tempos de correlação rotacional bem como a mudança nas formas da linha são indicativos que a sonda incorpora-se à interface da micela reversa com $w_o = 1$, quando a micela está praticamente sem água. Essa incorporação é responsável pelo aumento da restrição à movimentação da sonda, principalmente na direção perpendicular ao eixo longo da molécula 5-SASL.

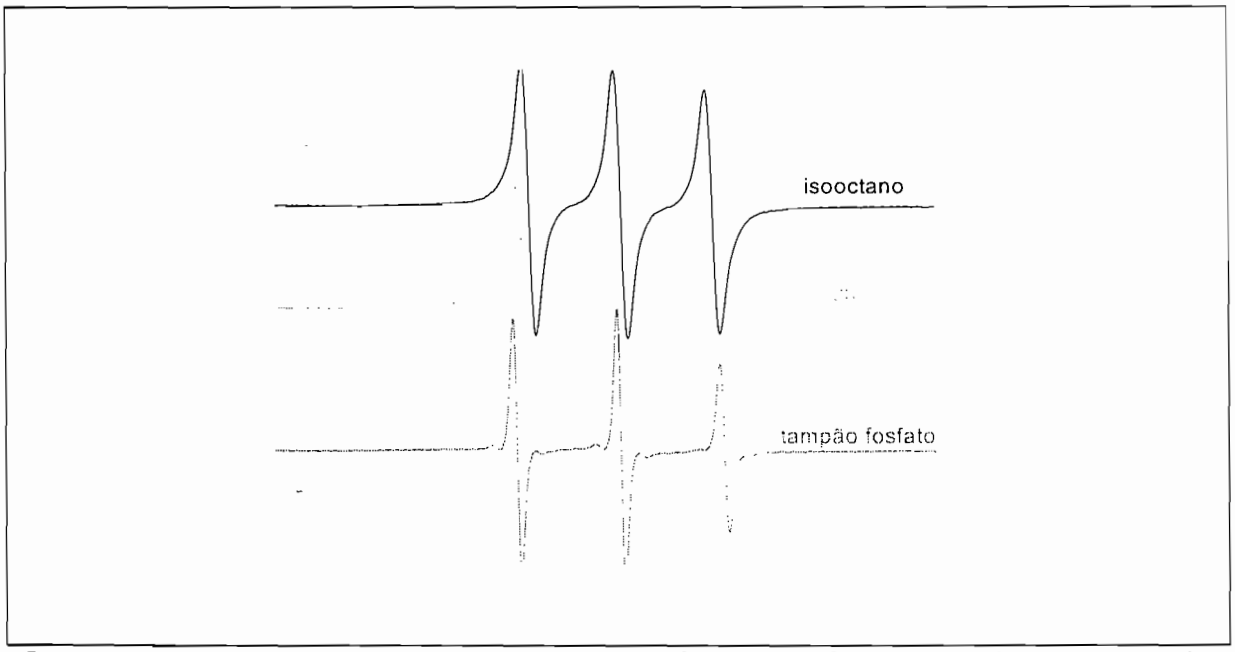


Figura IV-1: espectros de 5-SASL em isooctano, em micelas reversas de AOT (50mM) em isooctano (w_o 1,109) e em tampão fosfato (50mM, pH 7,4). (20° C).

Não observamos nenhuma queda na linha de base destes espectros. Assim, concluímos que para a concentração de 5-SASL usada (0,2% em relação ao AOT 50mM) não existe troca entre as sondas; ou seja, o grupo nitróxido de uma sonda não "enxerga" o grupo nitróxido de outra sonda próxima.

amostra	$\tau_{//}$ (ns)	$\tau_{\perp}$ (ns)
Tampão fosfato	0,0728	0,0568
isooctano	0,183	0,235
AOT 50mM (w_o=1)	1,14	1,26

Tabela IV-1: tempos de correlação rotacional para 5-SASL em isooctano e em tampão fosfato ([5-SASL]=10^{-4} M) e, para 5-SASL 0,2% em AOT (50mM, w_o = 1,109). Os espectros foram tirados a 20° C.

Resultados semelhantes foram obtidos em vários trabalhos anteriores: Yushmanov et al. (1997) no estudo da interação de dipiridamol com micelas reversas de CTAC; Kommareddi et al. (1993) no estudo de mudanças estruturais na interface de AOT em função da temperatura e da pressão em transições de fase crítica Almeida et al. (1994) no estudo do efeito da uréia nas propriedades das micelas reversas de AOT em isooctano.

2) VARIAÇÃO DO ESPECTRO DE 5-SASL COM A VARIAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁGUA PRESENTE NAS MICELAS REVERSAS DE AOT

Na Figura IV-2 apresentamos os espectros de 5-SASL em AOT 50mM em todos os valores de w_o usados, ou seja, mostramos como o espectro varia com a quantidade de água presente no sistema. Observamos que os espectros se tornam cada vez mais anisotrópicos com o aumento da quantidade de água. Este aumento na anisotropia também pode ser observado através dos valores dos tempos de correlação rotacional apresentados no gráfico da Figura IV-3; observamos que os valores de $\tau_{//}$ tornam-se cada vez maiores com o aumento de w_o , mas que este aumento não é tão pronunciado quanto o sofrido por $\tau_{\perp}$. Este

aumento nos valores dos tempos de correlação rotacional mostram que o movimento da sonda torna-se cada vez mais lento nos dois eixos, no paralelo e no perpendicular ao eixo da própria sonda.

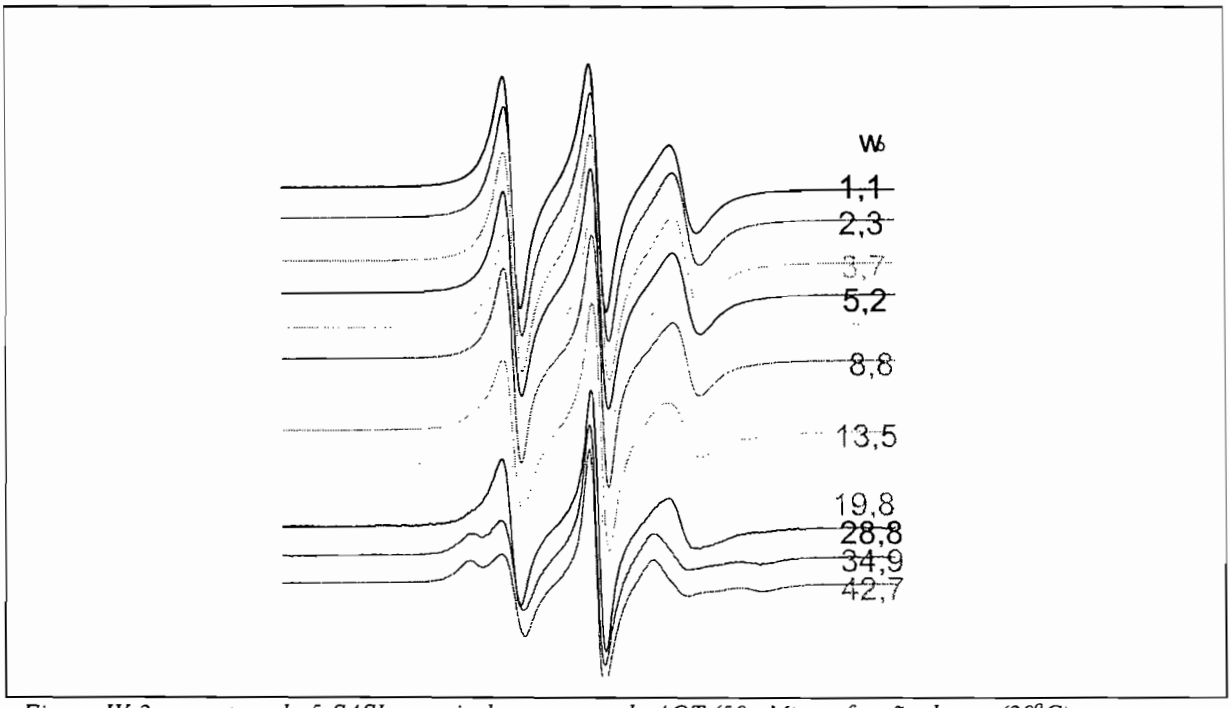


Figura IV-2: espectros do 5-SASL em micelas reversas de AOT (50mM) em função do w_o. (20°C).

Da seqüência de espectros apresentados na Figura IV-2 observamos dois comportamentos distintos dependendo da quantidade de água presente no sistema. Assim, para valores pequenos de w_o, os espectros de RPE são característicos de movimento com pequeno grau de anisotropia. Esses espectros foram interpretados por Kommareddi et al. (1993) como resultantes da combinação entre a rotação rápida das pequenas micelas reversas com a liberdade de movimentação experimentada pela parte hidrofóbica da sonda 5-SASL. Com o aumento de w_o as micelas reversas crescem de tamanho e acabam ficando mais lentas até parecerem imobilizadas para a escala de tempo das medidas de RPE. Assim, os espectros obtidos para os valores maiores de w_o apresentam os extremos internos e externos bem resolvidos resultando da soma dos espectros da sonda com movimentação anisotrópica em todas as orientações relativas ao campo magnético. É importante salientar que esta seqüência de espectros está em acordo com o encontrado por Almeida et al. (1994) no estudo da estrutura das micelas reversas. Podemos falar que dois tipos de movimento

estão presentes no sistema de micelas reversas: o tombamento da micela como um todo e a difusão lateral das moléculas de surfactante. Quando o sistema é estudado através da técnica de ressonância paramagnética eletrônica esses dois processos modulam o tensor de acoplamento hiperfino (A) e o tensor **g** (Kommareddi, 1993). Quando a freqüência desses movimentos for maior do que 10^8 s^{-1} o espectro resultante de uma sonda paramagnética inserida neste sistema será isotrópico; ou seja, o espectro representará tanto o movimento rápido da sonda quanto o da sonda inserida na micela, que tomba rapidamente.

O tombamento das micelas torna-se cada vez mais lento com o aumento de w_o. Quando a freqüência deste movimento ficar menor do que 10^7 s^{-1} , a técnica de RPE não consegue mais enxergar este movimento e tudo se passa como se a micela reversa estivesse parada. Neste caso, os espectros revelam apenas os movimentos da sonda inserida na interface de surfactante, que são anisotrópicos devido à própria inserção. Logo, os espectros para grandes valores de w_o devem ser, e são, anisotrópicos.

Nos gráficos de $\tau_{//}$ e de $\tau_{\perp}$ em função de w_o (Figura IV-3) observamos, especialmente para $\tau_{\perp}$, uma mudança na forma da curva em torno de $w_o \approx 10$. Fato semelhante foi observado por Cazianis et al. (1987) e por Correa et al. (1996) que afirmam que para $w_o \approx 10$ existe uma modificação na polaridade da água com o aparecimento de água *bulk*. Baglioni et al. (1991) e Ykushima et al. (1997) sugerem a existência de três populações possíveis de água no sistema de micelas reversas de AOT dependendo da quantidade da mesma presente no sistema: água estruturada, água isolada e água *bulk*. Nas micelas reversas que contêm poucas moléculas de água ou seja, com $w_o < 10$, estão presentes apenas a água estruturada, também chamada de água de hidratação, e as águas isoladas (Ykushima et al.,1997). As águas estruturadas localizam-se em torno das cabeças polares do AOT devido às interações entre os dipolos das mesmas com as cargas das cabeças polares negativas do AOT assim como com os contra-íons Na^+ e, as águas isoladas são as moléculas de água que ficam presas na região das cadeias hidrocarbônicas do AOT. Aumentando gradativamente a quantidade de água presente nas micelas reversas observa-se o aparecimento da terceira população possível de água - a água *bulk*, que se localiza no centro do *pool* aquoso e tem características similares à água comum. Baglioni et al.(1991)

explicam que temos apenas água estruturada e água isolada até $w_o \approx 10$. Assim, mais precisamente, com o aumento do valor de w_o para valores maiores do que 10 a camada de hidratação em torno das cabeças polares do AOT torna-se completa pois as interações responsáveis pela estruturação das moléculas de água em torno das cabeças polares do AOT e em torno dos contra-íons de sódio já estão saturadas neste valor de w_o ; o excedente de água que é introduzido passa a localizar-se no centro do *pool* aquoso na forma de água *bulk*.

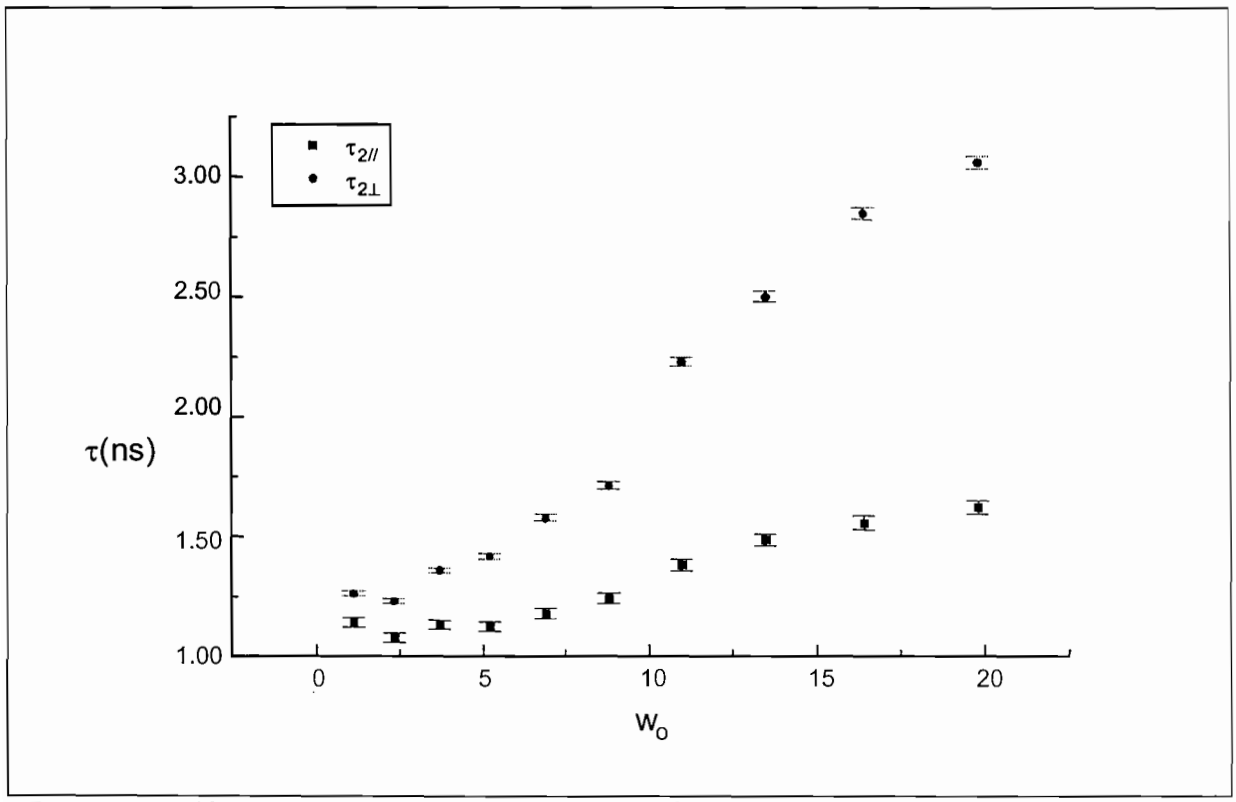


Figura IV-3:gráfico dos tempos de correlação rotacionais do 5-SASL em micelas reversas de AOT 50mM em isooctano, em função do w_o.

As micelas reversas de AOT crescem com o valor de w_o segundo a equação (Kotlarchyk et al., 1985; Luisi et al., 1988 e Sahyun, 1988) :

$$r_H\,(A) = 1{,}75.w_o$$

onde r_H é o raio hidrodinâmico, ou raio do *pool* aquoso, em angstrons. Mostramos na Tabela IV-2 os raios hidrodinâmicos compreendidos neste estudo:

w_o	r_H (Å)
1,109	1,94
2,332	4,08
3,688	6,54
5,199	9,10
6,894	12,06
8,810	15,42
10,990	19,23
13,495	23,62
16,404	28,71
19,821	34,69
28,83	50,45
34,94	61,14
42,69	74,71

Tabela IV-2: raios hidrodinâmicos das micelas estudadas neste trabalho, calculadas a partir da equação dada por Kotlarchyk (1985), Luisi (1988) e Sahyun (1988).

Segundo esta equação, concluímos que as micelas reversas de AOT usadas no nosso estudo aumentaram em até 37 vezes o tamanho.

Como as micelas reversas aumentam de tamanho é esperado que seu movimento de tombamento também mude bastante. As micelas reversas pequenas devem possuir tombamento rápido e as micelas reversas maiores tombamento mais lento, pela própria inércia do movimento. Esse aumento como um todo pode ser, em parte, responsável pelo aumento observado nos valores dos tempos de correlação rotacional, especialmente enquanto este tombamento ainda é rápido o suficiente para ser resolvido pela técnica de RPE. A partir do momento que este tempo de tombamento das micelas reversas ultrapassarem o limite de 10^8 s^{-1} ele não poderá mais ser resolvido e as micelas reversas estarão como que paradas para o equipamento. Quando as micelas puderem ser consideradas como que paradas para as medidas de RPE, o aumento observado nos tempos de correlação será resultante do aumento do empacotamento da região hidrocarbônica do

AOT onde a sonda 5-SASL se encontra localizada. Kommareddi et al. (1993) propuseram que este aumento do empacotamento da região das cadeias hidrocarbônicas de AOT pode ser devido à migração das moléculas de água do *pool* aquoso para esta região com o aumento do valor de w_o. Yoshioka et al. (1981) também observaram o aumento do tempo de correlação como conseqüência do aumento de w_o em seu estudo da dependência do movimento dos marcadores de spin em micelas reversas de AOT em função da temperatura.

Com o intuito de averiguarmos a mobilidade da sonda e a ordem do sistema em função dos valores de w_o utilizados determinamos as relações entre as alturas do campo central (h_o) e do campo alto (h_{-1}) (Tabela IV-3) e também as relações entre as alturas das linhas de campo baixo (h_{+1}) e campo central (h_o); os valores estão também apresentados na Tabela IV-3 e na Figura IV-4.

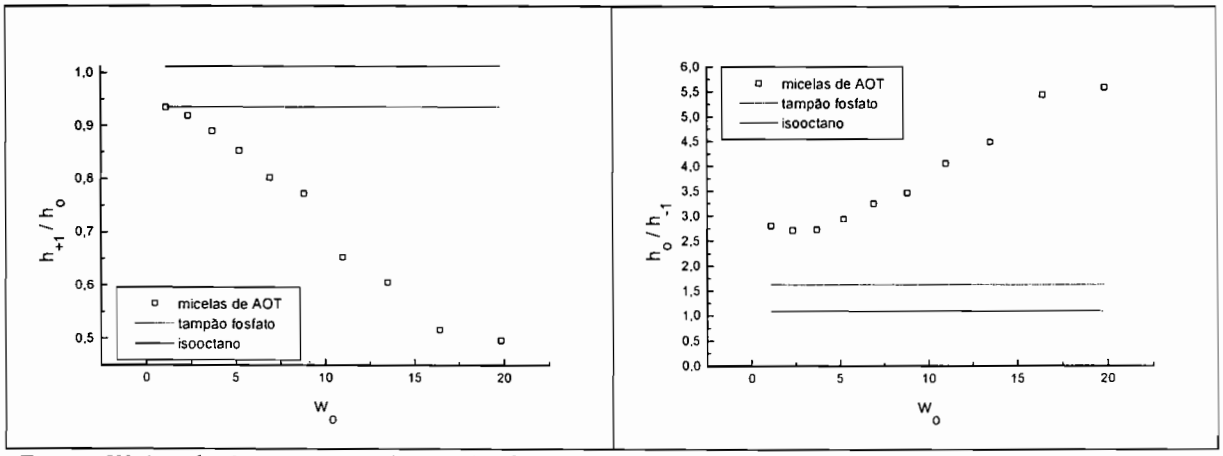


Figura IV-4: relações entre as alturas das linhas de campo baixo e campo central (esquerda) e entre as alturas das linhas do campo central e campo alto (direita), obtidas dos espectros de 5-SASL (10^{-4}M) em tampão fosfato (50mM, pH 7,4); em isooctano e em micelas reversas de AOT 50mM em isooctano com 5-SASL 0,2% em relação à concentração de anfifílico, como função da quantidade de água presente no sistema. (20° C).

Sabemos que para a sonda livre, ou sem restrições aos seus movimentos, as três linhas de campo possuem as mesmas alturas e são bastantes estreitas. Portanto, quanto mais próximo da unidade forem as relações entre as alturas mais livre será a sonda e menor será a ordem experimentada pela mesma. As curvas do gráfico na Figura IV-4 mostram que na

presença de micelas reversas o valor de h_o/h_{-1} aumenta enquanto que existe uma diminuição no valor de h_{+1}/h_o em relação às amostras de tampão fosfato e de isooctano indicando que a presença da interface diminui a mobilidade da sonda e aumenta a ordem da experimentada pela mesma. Seja por inserir-se mais profundamente na região hidrofóbica das micelas reversas, seja por um aumento da rigidez desta região.

Na Tabela IV-3 apresentamos os valores dos parâmetros a título de comparação entre os mesmos.

	h_{+1}/h_o	h_o/h_{-1}
Tampão fosfato	0,936	1,623
Isooctano	1,012	1,099
AOT w_o 1,109	0,935	2,808
2,332	0,919	2,717
3,688	0,890	2,733
5,199	0,853	2,939
6,894	0,802	3,252
8,810	0,772	3,465
10,990	0,652	4,060
13,495	0,605	4,495
16,404	0,517	5,443
19,821	0,497	5,590

Tabela IV-3: relações entre as alturas das linhas de campo baixo e campo central e entre as alturas das linhas do campo central e campo alto, obtidas dos espectros de 5-SASL 10^{-4}M em tampão fosfato (50mM, pH 7,4); em isooctano e em micelas reversas de AOT (50mM) em isooctano (0,2%) como função da quantidade de água presente no sistema. (20° C).

Com o intuito de embasar esta hipótese calculamos a constante de desdobramento hiperfino (a_N) que é usada como medida da polaridade do ambiente no qual a sonda se encontra. Determinamos a_N apenas para os maiores valores de w_o utilizados pois são os que possuem este desdobramento bem definido. Dos espectros tiramos os valores de $A_{máx}$ e $A_{mín}$ mostrados na Tabela IV-4.

w_o	$A_{máx}$	A_{min}
16,40	23,517	11,613
19,82	23,649	11,270
28,83	23,913	12,167
34,94	23,730	10,693
42,69	24,023	10,596

Tabela IV-4: valores de $A_{máx}$ e de A_{min} tirados dos espectros do 5-SASL em micelas reversas de AOT 50mM em função do valor de w_o.

A partir destes valores de $A_{máx}$ e de A_{min} e usando a correção proposta por Gaffney (1976) e Griffith (1976) conforme discutido anteriormente na capítulo de teoria obtemos os valores apresentados na Tabela IV-5 para A e para a_N

w_o	A	a_N(Gauss)
16,40	12,408	15,58
19,82	12,041	15,40
28,83	12,970	16,08
34,94	11,431	15,53
42,69	11,314	15,55

Tabela IV-5: valores das constantes de desdobramento hiperfino para o 5-SASL em micelas reversas de AOT 50mM em função do valor de w_o. Obs: as constantes foram corrigidas conforme proposto por Gaffney (1976) e Griffith (1976), para detalhes veja o capítulo III – teoria.

Para os valores de w_o apresentados na Tabela IV-5 parece haver uma saturação do valor da constante de acoplamento hiperfino a_N visto que eles não variam muito, ficando em torno de 15,5 Gauss. Tal fato está de acordo com a saturação observada para valores de w_o 10 encontrada por nós e na literatura de uma forma geral. Assim, os valores das constantes de desdobramento hiperfino (a_N) encontrados para os w_o mais altos correspondem, segundo Gaffney (1976) e Griffith (1976), a meios com polaridades parecidas com a da água (acetona ou etil acetato com muito água). Estes valores encontrados estão de acordo com os obtidos por Yoshioka (1981) em seu estudo do

movimento de marcadores de spin em AOT/heptano em função da temperatura, transcritos na Tabela IV-6:

w_o	a_N (Gauss)
0	14,3
2,5	14,5
7,8	14,8
33	15,4

Tabela IV-6: valores das constantes de desdobramento hiperfino obtidos por Yoshioka et al (1981).Observe que estes autores determinam a constante de desdobramento hiperfino mesmo para pequenos valore de w_o quando ainda não estão definidos nos espectros.

Os valores obtidos para as constantes de desdobramento hiperfino são um forte indicativo de que as moléculas de água estão migrando do *pool* aquoso para a região das cadeias hidrocarbônicas com o aumento de w_o onde o grupo nitróxido da sonda 5-SASL se encontra. Este resultado está de acordo com o proposto por Kommareddi et al. (1993) em seu estudo de RPE das mudanças estruturais no sistema de micelas reversas de AOT provocadas por variações na temperatura e na pressão e por Cazianis et al.(1987) em seu estudo da inserção da fosforilase-b marcada com sonda paramagnética em micelas reversas de AOT.

Novamente, segundo Ikushima et al. (1997) podemos ter três tipos de água em um sistema de micelas reversas: **águas isoladas** que ficam armadilhadas ou presas entre as cabeças polares do AOT, **águas estruturadas ou ligadas** que ficam próximas à interface de AOT ligadas às cabeças polares negativas através das interações dipolares entre as moléculas de água e as cabeças polares do AOT e com os contra-íons Na^+ e **águas livres ou *bulk***. O aumento gradativo da quantidade de água presente nas micelas reversas de AOT (ou aumento de w_o) faz com que as moléculas de água se solubilizem primeiramente tanto como água estruturada quanto como água isolada. Para grandes valores de w_o , ou seja, grandes quantidades de água, ocorre o aparecimento da água livre ou *bulk*.

Assim, a migração das moléculas de água para a região das cadeias hidrocarbônicas do AOT com o aumento da quantidade de água presente no sistema de micelas reversas proposta por Kommareddi et al. (1993) e por Cazianis et al. (1987), para explicar o aumento da polaridade desta região pode não ser correta. Isso porque este aumento pode estar refletindo apenas um aumento da população de águas isoladas na região das cadeias hidrocarbônicas como proposto por Ikushima et al. (1997) e não uma migração da água propriamente dita para uma região ocupada anteriormente pelo isooctano em micelas reversas com pouca água. Então, o aumento da polaridade experimentada pela sonda pode estar refletindo um aumento da quantidade média de água isolada presente na região das cadeias hidrofóbicas do AOT com o aumento do valor de w_o .

Para averiguar o que a migração da água ou o aumento do número de águas isoladas provoca na região das cadeias hidrocarbônicas calculamos o parâmetro de ordem (S) que informa sobre a organização desta região que afeta diretamente a região do nitróxido do 5-SASL, novamente só para os valores mais altos de w_o usados. Os valores estão apresentados na Tabela IV-7.

w_o	S^{ef}
16,40	0,394
19,82	0,417
34,94	0,438
42,69	0,452

Tabela IV-7: parâmetros de ordem para o 5-SASL em micelas reversas de AOT 50mM em função de w_o . (20°C).

Observamos, então, um aumento no parâmetro de ordem (S^{ef}) com o aumento do valor de w_o . Isso significa que o aumento de w_o promove um maior empacotamento da região das cadeias hidrocarbônicas, diminuindo a mobilidade da sonda. O mesmo efeito foi observado anteriormente por Cazianis et al. (1987).

Segundo De e Maitra et al. (1984) as moléculas de AOT podem estar nas configurações *trans* ou *gauche* nas micelas reversas conforme observado por estudos de RMN; sendo que a presença das populações *trans* ou *gauche* dependem da pressão, temperatura e de w_o do sistema de uma maneira complicada (Ykushima, 1997). Mas, podemos considerar, de modo geral, que para w_o pequeno a maioria das moléculas das águas em micelas reversas de AOT está na forma ligada ou estruturada. Assim as moléculas de água ou estão ligadas às cabeças polares negativas do AOT hidratando os grupos sulfônicos ou estão formando a concha de hidratação ao redor do contra-íon sódio. A interface AOT/água estruturada é, então, rígida e as moléculas de AOT ficam orientadas na configuração *gauche*, aumentando assim as interações moleculares (as interações entre as cabeças de AOT e as interações do AOT com a água). Com o aumento de w_o aumenta a quantidade de moléculas de água em torno das cabeças do AOT, mais precisamente, em torno da carbonila e do grupo sulfônico. Assim, as moléculas de AOT ficam mais flexíveis na região da interface água/AOT, o que torna a interface mais "mole" ou menos empacotada, aumentando o número de moléculas de AOT na configuração *trans*. Segundo Baglioni et al. (1991) a mudança da configuração de *gauche* para *trans* ocorre por volta de w_o=12 a 15, quando começa a aparecer a água *bulk*; assim, o aumento do *pool* aquoso provoca uma diminuição no empacotamento das cabeças polares de AOT e também muda a penetração do isooctano na região das cadeias hidrocarbônicas, que acaba se tornando mais polar pela penetração da água.

Mas, o que observamos nos nossos dados é que o grau de empacotamento da micela reversa na região das cadeias hidrocarbônicas sentido pela sonda 5-SASL está aumentando com o aumento do valor de w_o. Uma proposta de explicação para este fato seria que com o aumento de w_o a interface de AOT fica mais flexível, segundo a explicação de De e Maitra (1984) e de Ykushima et al. (1997). Assim as moléculas de água poderiam migrar através da interface para a região das cadeias hidrocarbônicas (aumentando o valor de a_N) aumentando o grau de empacotamento (o valor do parâmetro de ordem) desta região visto a interação repulsiva entre as moléculas de água e as caudas hidrocarbônicas, ou, poderíamos estatisticamente ter um aumento na quantidade média de moléculas de água aprisionadas na região das cadeias hidrocarbônicas do AOT. A repulsão entre as cadeias hidrocarbônicas

hidrofóbicas e as moléculas de água que ficam/passam por esta região seria responsável pelo aumento da anisotropia sentida pela sonda. O aumento do grau de empacotamento da região das cadeias hidrocarbônicas do AOT seria responsável pelo aumento dos valores dos tempos de correlação rotacionais obtidos para a sonda 5-SASL no meio micelar; ou seja, a sonda seria obrigada a se movimentar mais lentamente em todas as direções possíveis.

3) A ADIÇÃO DE PEPTÍDEOS AO SISTEMA DE MICELAS REVERSAS DE AOT

Com o intuito de averiguar quais mudanças ocorrem na movimentação e na ordem experimentada pela sonda 5-SASL em micelas reversas quando são adicionados os peptídeos e o amino-ácido triptofano calculamos as relações entre as alturas das linhas de campo baixo (h+1) e campo central (ho) e a relação entre as alturas das linhas de campo central (ho) e campo alto (h-1) os valores encontrados estão representados nos gráficos da Figura IV-5 .

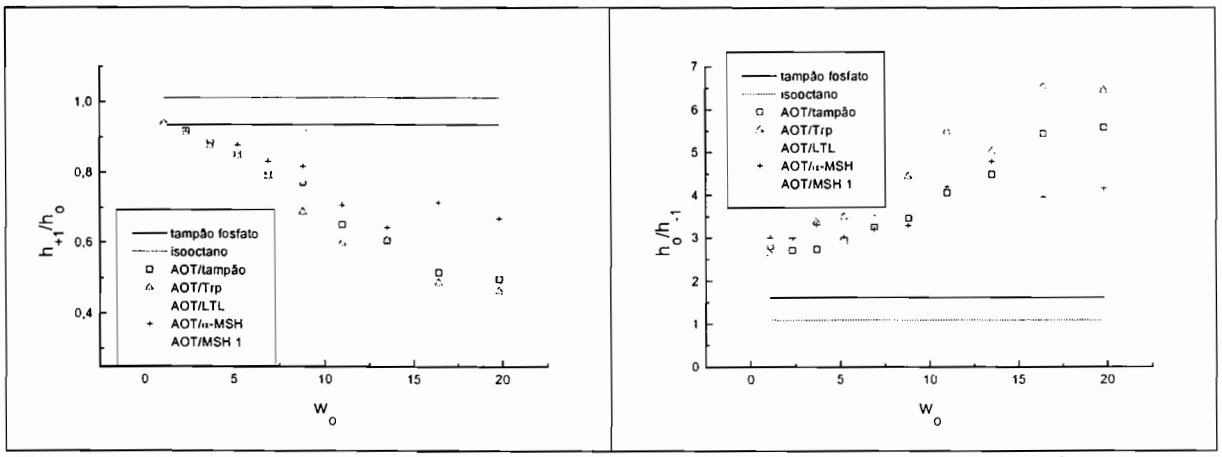


Figura IV-5: relações entre as alturas das linhas de campo baixo e campo central (esquerda) e entre as alturas das linhas do campo central e campo alto (direita), obtidas dos espectros de 5-SASL (10^{-4}M) em tampão fosfato (50mM, pH 7,4); em isooctano e em micelas reversas de AOT 50mM em isooctano com 5-SASL 0,2% em relação ao AOT com alíquotas crescentes de tampão fosfato e de Trp, LTL, α-MSH e MSH 1 10^{-3}M como função da quantidade de água presente no sistema. (20° C).

Nos gráficos da Figura IV-5 observamos o mesmo comportamento obtido para o tampão fosfato para as amostras contendo Trp, LTL, α-MSH e MSH1; ou seja, a presença da interface diminui a mobilidade experimentada pela sonda que, neste caso está inserida na mesma. Com o aumento da quantidade de água do sistema e conseqüente aumento do tamanho da micela observamos o aumento no valor de h_0/h_{-1}, mostrando que a sonda torna-se cada vez mais imóvel, seja por inserir-se mais profundamente na região hidrofóbica das micelas reversas, seja por um aumento da rigidez desta região. Isto condiz com o observado no gráfico de h_{+1}/h_0 da mesma figura; onde observamos que com o aumento de w_0 existe uma diminuição no valor de h_{+1}/h_0 indicando que o sistema está cada vez mais ordenado ou, mais precisamente, a região hidrofóbica onde a sonda 5-SASL insere-se está cada vez mais ordenada. Estes fatos parecem independer do peptídeo ou amino-ácido inserido no sistema até $w_0 \approx 10$, pois o efeito é praticamente o mesmo para todas as amostras analisadas. Agora para valores de $w_0 > 10$ quando começa a aparecer a água *bulk*, o efeito fica maior para o Trp e menor para o α-MSH; enquanto que para o LTL e o MSH 1 os efeitos são similares ao produzido pelo acréscimo de tampão fosfato à solução micelar. Estes resultados indicam que o Triptofano vai para a região da água estruturada; o LTL e o MSH1 ficam na interface de AOT, enquanto que o α-MSH enterra-se mais na região hidrocarbônica dos AOT.

Determinamos também os tempos de correlação rotacionais, $\tau_\perp$ e $\tau_{//}$ usando as equações dadas nos capítulo de teoria. Mostramos na Figura IV-6 a variação de $\tau_{//}$ em função de w_0 e na Figura IV-7 para $\tau_\perp$. Através dos gráficos apresentados para os tempos de correlação rotacionais encontrados observamos que a adição dos peptídeos diminui o efeito provocado pela água, principalmente para valores de w_0 altos (Figura IV-6 e Figura IV-7).

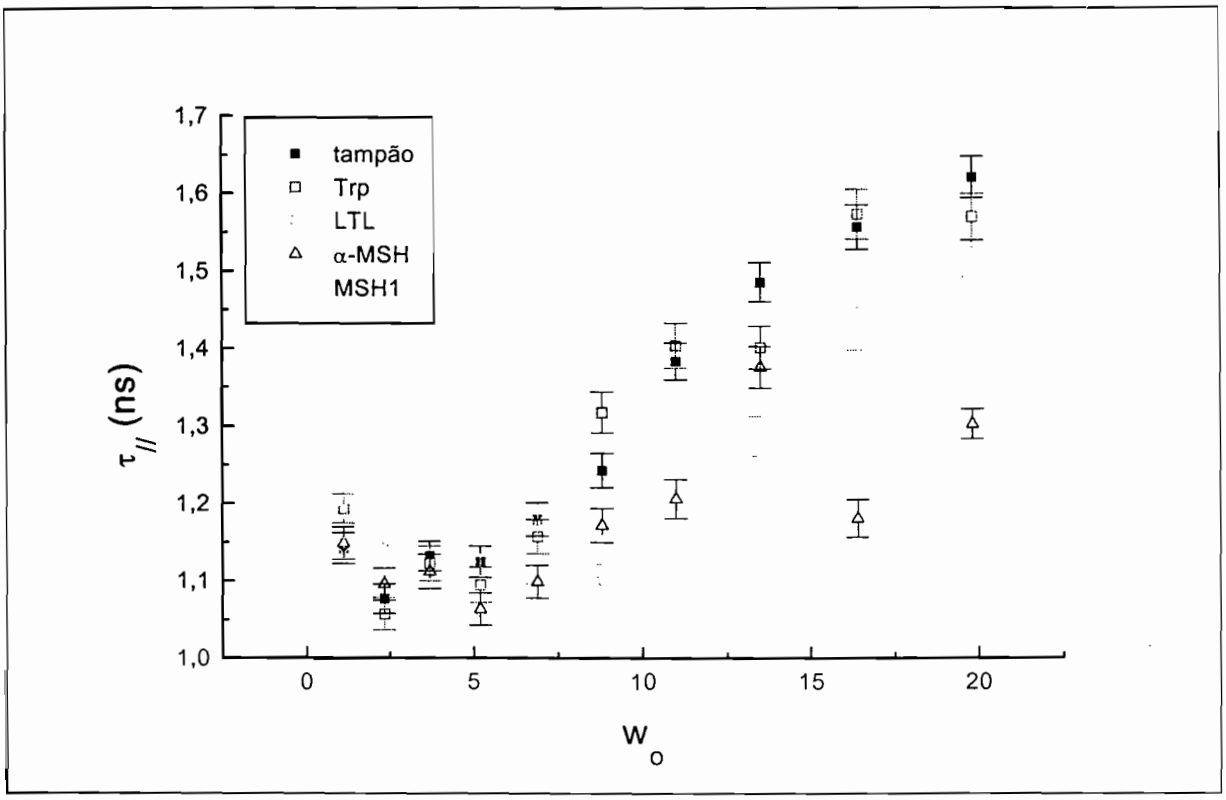


Figura IV-6: tempos de correlação rotacionais $\tau_{//}$ em nanosegundos para o 5-SASL em micelas reversas de AOT (50mM) em função de w_o, para alíquotas de tampão fosfato (50mM, pH 7,4); Triptofano em tampão fosfato (10^{-3} M), LTL , α-MSH e MSH 1 nas mesmas condições. (20° C).

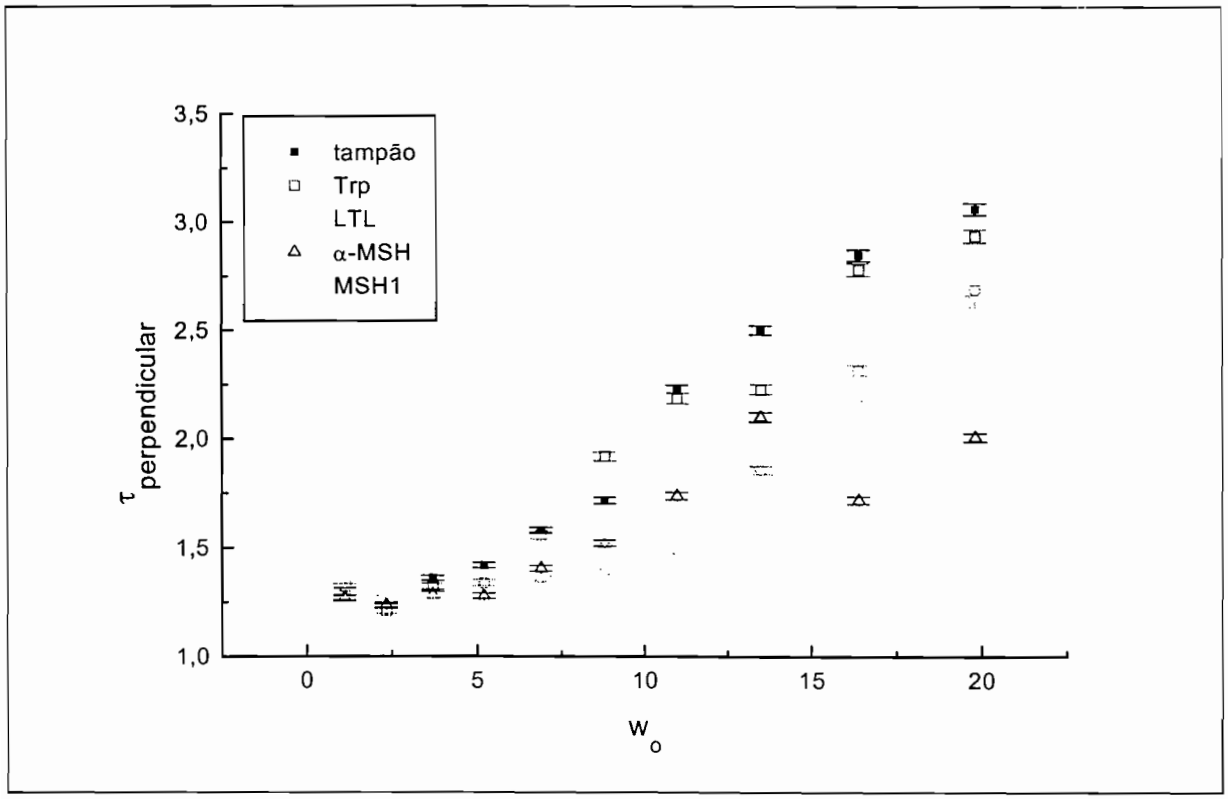


Figura IV-7: tempos de correlação rotacionais $\tau_{\perp}$ medidos em nanosegundos para o 5-SASL em micelas reversas de AOT (50mM) em função de w_o, para alíquotas de tampão fosfato (50mM, pH 7,4); Triptofano em tampão fosfato (10^{-3} M), LTL , α-MSH e MSH 1 nas mesmas condições. (20°C).

É sabido que a presença de macromoléculas em micelas reversas provoca uma redistribuição da água entre as várias micelas presentes na solução; sendo que as micelas hospedeiras (as que abrigam macromoléculas) ficam com uma quantidade maior de água do que antes da inserção da macromolécula; isso pela própria necessidade de abrigar a molécula hóspede. As micelas vazias ficam com menor quantidade de água e, portanto, menores do que antes da adição das macromoléculas ao sistema (Marzola, 1991; Zampieri, 1986). Quando comparamos os valores das constantes de desdobramento hiperfino, a_N , para a sonda 5-SASL em tampão fosfato (aproximadamente 14,3) e em presença de micelas reversas com alíquotas de tampão (em torno de 15,5) e para micelas reversas com alíquotas de Trp, LTL, α-MSH e MSH1 (em torno de 15,8) observamos que tudo se passa como se as moléculas hóspedes (Trp, LTL, α-MSH e MSH1) roubassem a água das micelas reversas vazias, caso tenhamos alguma na amostra, fazendo com que a sonda experimente um aumento na polaridade do ambiente no qual está inserida, ou seja, na região do quinto carbono da cadeia hidrofóbica do AOT. Segundo Gaffney e Griffith (1976) os valores das

constantes de desdobramento hiperfino mais altas correspondem a meios com as polaridades parecidas com a da água.

Huruguen et al. (1991) em seu estudo das mudanças drásticas provocadas na estrutura de micelas reversas pela introdução de proteínas e de enzimas mostraram isso provoca o aparecimento de interações atrativas entre micelas que acabam formando agregados micelares ou *clusters*. Este processo depende fortemente da macromolécula introduzida e de sua localização no sistema micelar. Espera-se que a formação de *clusters* reflita um aumento da anisotropia bem como um pequeno aumento na polaridade do meio ambiente experimentado por uma sonda inserida na interface do sistema micelar. Este aumento da anisotropia seria provocado pela interpenetração das cadeias hidrocarbônicas de micelas diferentes. O aumento na polaridade seria devido à interação com a água que é rapidamente trocada entre as micelas através do caminho criado pelo próprio agregado micelar ou pelo *cluster* (Kommareddi, 1993).

Os valores dos $A_{máx}$ e de $A_{mín}$, mostrados na Tabela IV-8, foram medidos nos espectros de 5-SASL em micelas reversas de AOT com alíquotas de soluções de Trp, LTL, α-MSH e MSH 1 10^{-3} M para o cálculo das constantes de desdobramento hiperfino (a_N) para as duas maiores micelas utilizadas, isso porque elas possuem o desdobramento hiperfino bem definido.

Amostra	w_o	$A_{máx}$ (G)	$A_{mín}$ (G)
Triptofano	16,404	22,217	11,670
	19,821	22,412	11,572
LTL	16,404	20,703	12,305
	19,821	20,947	11,621
α-MSH	16,404	20,459	12,500
	19,821	21,094	12,305
MSH 1	16,404	21,094	12,402
	19,821	22,412	11,719

Tabela IV-8: valores de $A_{máx}$ e de A_{min} , em Gauss, do 5-SASL em micelas reversas de AOT (50mM) com alíquotas crescentes de tampão fosfato, Trp, LTL, α-MSH e MSH 1.

Estes valores foram corrigidos da mesma forma que os medidos com o tampão fosfato no item anterior. Assim, obtivemos os valores dados na Tabela IV-9.

amostra	w_o	$A_\perp$	a_N (±0,3 Gauss)
Trp	16,404	12,534	15,8
	19,821	12,421	15,8
LTL	16,404	13,278	15,8
	19,821	12,547	15,4
α-MSH	16,404	13,496	15,8
	19,821	13,258	15,9
MSH 1	16,404	13,360	15,9
	19,821	12,576	15,8

Tabela IV-9: valores das constantes de desdobramento hiperfino para o 5-SASL em micelas reversas de AOT (50mM) com alíquotas crescentes de tampão fosfato ou de peptídeos.

Pelos valores de a_N obtidos (Tabela IV-9) observamos que a presença dos peptídeos não altera a polaridade do meio onde a sonda se encontra - permanecendo em um ambiente polar, dado o valor encontrado para o desdobramento hiperfino correspondendo à soluções aquosas segundo Gaffney (1976) e Griffith et al (1976). Logo, as moléculas de água continuam migrando para a região das cadeias hidrocarbônicas como discutido anteriormente no item do tampão fosfato.

Com o intuito de verificar a grau de empacotamento da região das caudas hidrocarbônicas do AOT calculamos o parâmetro de ordem (S^{ef}), que são mostrados na Tabela IV-10.

amostra	w_o	S^{ef}
tampão fosfato	16,404	0,394
	19,821	0,417
Trp	16,404	0,339
	19,821	0,350
LTL	16,404	0,260
	19,821	0,302
α-MSH	16,404	0,244
	19,821	0,278
MSH 1	16,404	0,269
	19,821	0,344

Tabela IV-10: parâmetros de ordem para o 5-SASL inserido em micelas reversas de AOT (50mM) em função da alíquota de tampão fosfato ou de peptídeo acrescentada à solução.

Quando estudamos o efeito do aumento de w_o no grau de empacotamento da região das cadeias hidrocarbônicas do AOT constatamos que o acréscimo de alíquotas de tampão fosfato, bem como de Trp, LTL, α-MSH e MSH1, provoca um aumento do grau de empacotamento das micelas reversas; sendo mais acentuado para o MSH 1 (28%) seguido pelo LTL (16%), α-MSH (14%), tampão fosfato (6%) e pelo Trp (3%). Além disso quando comparamos as micelas de tampão fosfato e hospedeiras temos que a presença dos peptídeos diminui o grau de empacotamento das micelas mesmas. Esse efeito é menor para o triptofano (que é zwiteriônico e a menor molécula introduzida) do que para os outros peptídeos. É importante ressaltar que não observamos nenhuma alteração adicional (além da citada anteriormente) na polaridade do meio onde a sonda se encontra para valores de w_o acima de 16. Assim, as moléculas de água continuam migrando para a região das cadeias hidrocarbônicas.

O grau de empacotamento está ligado com os valores encontrados para os tempos de correlação rotacionais, assim como com o grau de anisotropia. Quanto maior for o grau de empacotamento maiores deverão ser os tempos de correlação e maior será o grau de anisotropia, o que foi mostrado neste estudo.

Esta observação vem ao encontro da hipótese de formação de agregados de micelas reversas ou *clusters*. Sabe-se que a presença de moléculas hóspedes em micelas reversas podem mudar o tamanho e o formato das micelas (Luisi, 1988). As micelas reversas que contêm proteínas precisam de mais água para cada cabeça de surfactante do que as micelas vazias; assim, a introdução de proteínas ao sistema aumenta o valor de w_o , ou a quantidade de água (Marzola et al., 1991; Zampieri et al., 1986 e Luisi et al., 1986) e, consequentemente, o tamanho da micela. Com o aumento de w_o , o raio hidrodinâmico da micela também aumenta.

Para grandes valores de w_o as micelas reversas de AOT tendem a se juntar formando agregados micelares ou *clusters* (Blitz, 1988). Esses aumentos de tamanho das micelas fazem com que apareçam interações fortemente atrativas entre as micelas e, que ocorra interpenetração de cadeias hidrocarbônicas entre micelas (Huruguen et al., 1991; Kommareddi et al., 1993). Segundo Huang et al.(1984) esta interpenetração chega até a 2,4 angstrons. Este fato diminui bastante o coeficiente de difusão da micela, visto que ela está inserida em uma estrutura maior (o agregado anfifílico ou o *cluster*).

Além disso, a presença desses agregados ou *clusters* cria um caminho para a troca rápida de moléculas de água entre os vários *pools* das micelas constituintes dos mesmos. Assim, o 5-SASL experimenta um aumento na polaridade devido à sua interação com as moléculas de água que passam rapidamente por esta região migrando de um *pool* para outro (Kommareddi, 1993). Este processo de formação de agregados anfifílicos ou de *clusters* depende, segundo Wolbert (1989), da molécula introduzida ao sistema de micelas reversas bem como de sua localização no mesmo dentre outros fatores.

Quanto maior for a proteína introduzida ao sistema de micela reversa, maior será a quantidade de moléculas de água que deverá ser deslocada para aumentar o tamanho da micela de forma que a mesma possa hospedar a proteína inserida (Wolbert, 1989). Assim, quanto maior a proteína maior será o w_o e, portanto, mais forte será a interação entre micelas. Desta maneira as proteínas maiores induzem a formação de agregados anfifílicos ou de *clusters* . Assim, os peptídeos melanotrópicos usados neste estudo parecem induzir a formação de agregados anfifílicos ou de *clusters* em w_o menores quando comparados com

os valores obtidos com a introdução do Triptofano. A formação de *clusters* foi observado também por Huruguen et al. (1991) em seu estudo de citocromo c em micelas reversas de AOT.

Resumidamente observamos:

1) aumento do grau de empacotamento da região das cadeias hidrofóbicas do AOT onde se localiza a sonda 5-SASL provocado pela migração da água para esta região ou pelo aumento da população de águas isoladas com o aumento da quantidade de água presente nas micelas reversas (aumento do valor de w_o),

2) que a presença da interface de AOT provoca um aumento na polaridade experimentada pela sonda 5-SASL em comparação com a polaridade em solução tampão. A presença dos peptídeos não altera significantemente a polaridade experimentada pela sonda 5-SASL quando comparado com a mesma em soluções de micelas reversas contendo apenas tampão fosfato,

3) a presença de peptídeos não provoca grandes alterações no sistema de micelas reversas com pequenos valores de w_o, ou seja, quando estão presentes em baixas concentrações. Agora, quando estão presentes em grandes concentrações ou para w_o elevados, eles induzem a formação de clustres, especialmente o α-MSH e em menor grau o MSH 1 e o LTL. O Trp produz efeito menor.

MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE ESTADO ESTACIONÁRIO E RESOLVIDA NO TEMPO - RESULTADOS OBTIDOS E ANÁLISE

A dinâmica interna dos peptídeos melanotrópicos α-MSH e MSH 1 em presença de membranas modelo foi estudada baseado no único resíduo triptofano que eles possuem, através da espectroscopia de fluorescência em solução aquosa (tampão fosfato) e em micelas reversas de AOT, como função da quantidade de água presente no sistema (ou seja, o valor de w_o). As micelas reversas podem ser consideradas um modelo simples para as membranas biológicas provendo três ambientes diferentes para a localização de moléculas hóspedes: o *pool* aquoso, a interface de anfifílicos e a fase orgânica do solvente. Técnicas espectroscópicas como fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo podem ser utilizadas para informar sobre a distribuição do triptofano nestes meios. A supressão da fluorescência do resíduo triptofano por acrilamida (que fica no meio micelar) também foi medida para auxiliar na tentativa de localizar a posição do fluoróforo nas micelas reversas.

1) POSIÇÃO ESPECTRAL

As medidas de fluorescência de estado estacionário em tampão fosfato resultaram em espectros característicos do Triptofano em solução aquosa, tanto para os peptídeos quanto para o tripeptídeo. Obtivemos uma única banda de emissão fluorescente, cujos máximos localizam-se nos comprimentos de onda apresentados na Tabela V-1:

Amostra	$\lambda_{máx}$ (tampão fosfato)
Trp	358,9 ± 0,6
LTL	358,9 ± 0,6
α-MSH	358,1 ± 0,5
MSH1	357,4 ± 0,9

Tabela V-1: comprimentos de onda da máxima intensidade de emissão do fluoróforo em tampão fosfato.

A incorporação em micelas reversas de AOT desloca os comprimentos de onda de máxima emissão fluorescente para valores menores como pode ser observado na Figura V-1. Quanto menor for o valor de w_o , ou seja, a relação entre o número de moléculas de água por cabeça de AOT, maior será este deslocamento para a região do azul. Este deslocamento é um indicativo de que a sonda se encontra em uma região menos polar do que a água (Lakowicz, 1983), o que é razoável considerando a quantidade de água presente nestes sistemas e a hidrofobicidade do resíduo Triptofano (-0.9 segundo Kyte (1982)). Singh et al. (1995) também observaram este deslocamento para a região do azul em seu estudo do L-triptofano e do retinal-triptofano em micelas reversas de AOT em n-heptano. Lenz et al. (1995) também observaram este efeito em seu estudo da inserção da insulina marcada com Abz em micelas reversas de AOT. Bhattacharyya et al. (1993) encontraram também este deslocamento para a região do azul do pico de máxima emissão fluorescente sob incorporação em micelas reversas em seu estudo sobre a fluorescência dos hormônios melanotrópicos em micelas reversas de AOT em isooctano. Em 1995, Bhattacharyya et al. encontraram este mesmo efeito quando a somatostatina foi incorporada em micelas reversas de AOT em isooctano. Almeida et al. (1994) também observaram este efeito para a banda do POH em micelas reversas de AOT ressaltando que em nenhuma condição a polaridade se iguala à do ambiente da água como solvente contínuo. Nas micelas reversas que estudamos a com menor quantidade de água presente corresponde a w_o igual a 2. Nessa situação, todas as amostras que estudamos apresentam máximo de emissão em torno de 334nm. Dada a pequena quantidade de água nessas micelas, o resíduo Trp forçosamente é levado para uma região de baixa polaridade; seja a região das cabeças polares ou a região das cadeias hidrocarbônicas do AOT.

Observamos, também, dos gráficos da Figura V-1 que com o aumento do valor de w_o o comprimento de onda do máximo de emissão torna-se cada vez maior tendendo ao valor do mesmo em solução aquosa; porém, sem nunca se igualar. Este mesmo efeito de deslocamento do pico de máxima emissão para a região do vermelho com o aumento do valor de w_o foi observado anteriormente por Guharay et al. (1996) em seu estudo das propriedades fluorescentes do 7-azatriptofano em micelas reversas de AOT. Eles observaram também que este efeito é mais pronunciado para valores de w_o até aproximadamente 10, após o qual fica mais suave tendendo a um patamar. Wong et al. (1976) em seu estudo sobre a natureza do *pool* aquoso de micelas reversas de AOT em alkano com anilinonaftalenesulfonato (ANS), ácido pirenosulfônico (PSA) e rodamina B, observaram também este deslocamento do pico de máxima emissão fluorescente para a região do vermelho com o aumento da quantidade de água do *pool* aquoso.

Observamos também que para valores de w_o acima de aproximadamente 10 os comprimentos de onda dos picos de máximas emissões praticamente se estabilizam conforme pode ser observado nos gráficos apresentados na Figura V-1. Lissi et al. (1990) observaram que a fluorescência do triptofano em micelas reversas de AOT com w_o em torno de 11 é semelhante a seu espectro em etanol, apesar de ser mais estreito no meio micelar. Davis et al. (1996) observaram que o comprimento de onda de máxima emissão da NATA em micelas reversas de AOT aumentam com o aumento do *pool* aquoso (ou w_o) sugerindo assim que a polaridade média sentida pela NATA aumenta e/ou o tempo de relaxação do solvente durante o estado excitado aumenta.

Os valores nos quais os picos se estabilizam são apresentados na Tabela V-2.

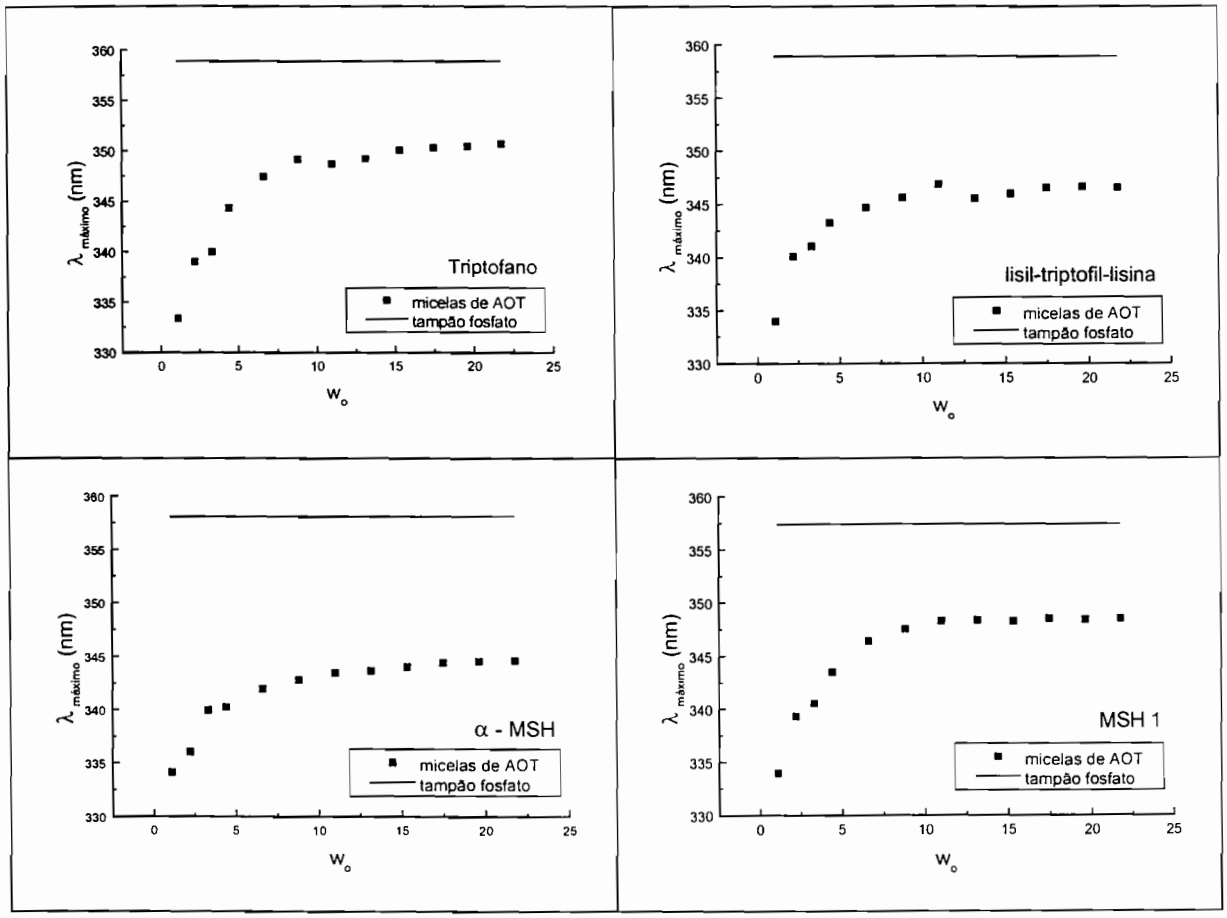


Figura V-1: comprimento de onda da máxima intensidade de emissão fluorescente do Triptofano, LTL, α-MSH e MSH 1 em tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT (50mM) como função de w_o. (20° C).

Amostra	$\lambda_{máx.}$ tampão fosfato	$\lambda_{máx.}$ micelas reversas (wo=21.76)	$\Delta\lambda$
Trp	358,9 ± 0,6	349,8 ± 0,3	9,1
LTL	358,9 ± 0,6	346,2 ± 0,2	12,7
α-MSH	358,1 ± 0,5	344.0 ± 0,2	14,1
MSH 1	357,4 ± 0,9	348,3 ± 0,1	9,1

Tabela V-2: valores de saturação dos comprimentos de onda da máxima intensidade de emissão fluorescente para os fluoróforos em micelas reversas de AOT (50mM), w_o =21,76.

Observamos (Figura V-1 e Tabela V-2) que nas micelas reversas com maior quantidade de água (w_o maior do que 20) nenhuma das amostras tem a emissão localizada

nos mesmos valores característicos dos espectros em solução aquosa (Figura V-2). Nessas micelas o maior deslocamento para o azul é apresentado pelo α-MSH, sendo um indicativo de que seu resíduo Triptofano é o que encontra-se mais escondido na interface em relação aos demais; e o menor é mostrado pelo Triptofano isolado. Como, este é o que possui o comprimento de onda mais próximo do valor do mesmo em solução tampão, é o que se encontra mais exposto à água presente no sistema de micelas reversas. Em posições intermediárias ficam o análogo MSH 1 e o tripeptídeo LTL. Estes resultados indicam a localização dos fluoróforos afastados do *pool* aquoso.

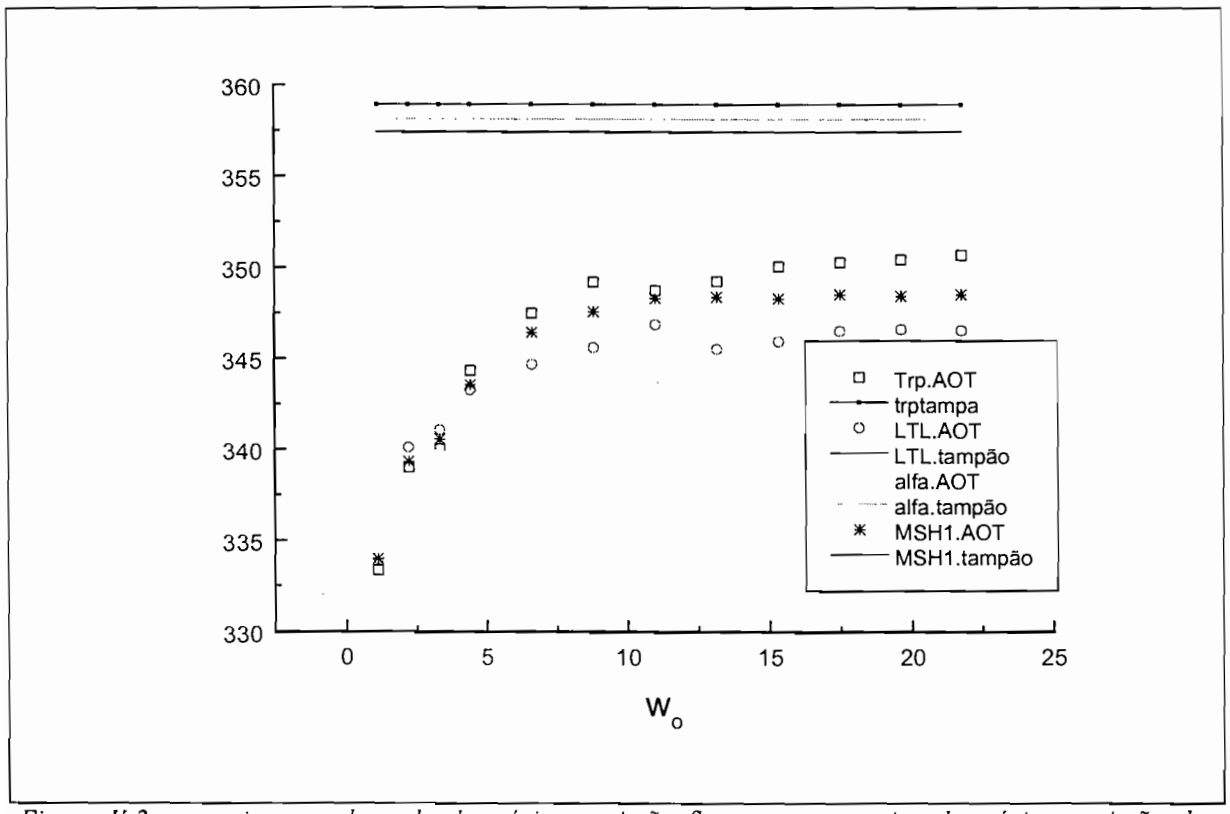


Figura V-2: comprimentos de onda de máxima emissão fluorescente ou pico de máxima emissão dos fluoróforos quando em micelas reversas de AOT em função de w_o e em tampão fosfato (50mM, pH 7,4). (20°C).

2) ANISOTROPIA DE ESTADO ESTACIONÁRIO

Os graus de anisotropia foram medidos à 16°C e 32°C no comprimento de onda de máxima intensidade de emissão fluorescente para excitação em 295nm. Mostramos na Figura V-3 suas variações em micelas reversas de AOT em função do valor de w_o.

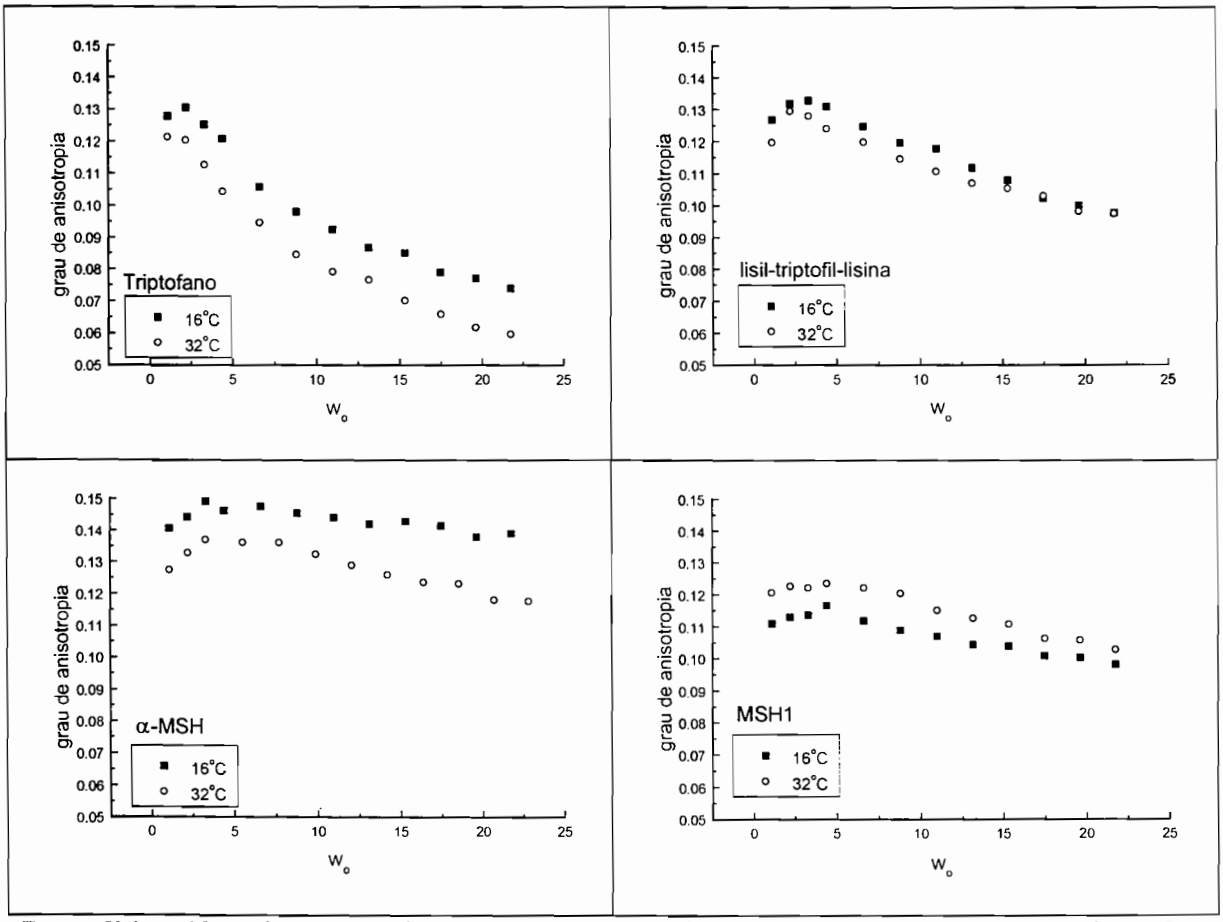


Figura V-3: gráficos da variação dos graus de anisotropia dos fluoróforos em micelas reversas de AOT em isooctano (50mM) em função do valor de w_o em duas temperaturas: 16° C e 32° C.

Observamos que os graus de anisotropia dos fluoróforos em micelas reversas de AOT são menores para a temperatura mais elevada, na região de w_o considerados, fato que se encontra dentro do esperado dado que quanto maior a temperatura maiores deverão ser os movimentos e as oscilações presentes nas micelas reversas, principalmente por se tratar de estruturas dinâmicas. Assim, menores serão as restrições à movimentação dos fluoróforos. O análogo MSH 1 apresentou comportamento diverso com valores maiores de

anisotropia à temperatura mais elevada, talvez devido a uma restrição local no sítio em que se encontra o resíduo Trp.

Nas Figuras V-4 e V-5 podemos comparar os valores das anisotropias dos fluoróforos entre si, quando em micelas reversas e quando em tampão fosfato; bem como comparar o valor dos graus de anisotropia de cada amostra nos dois meios.

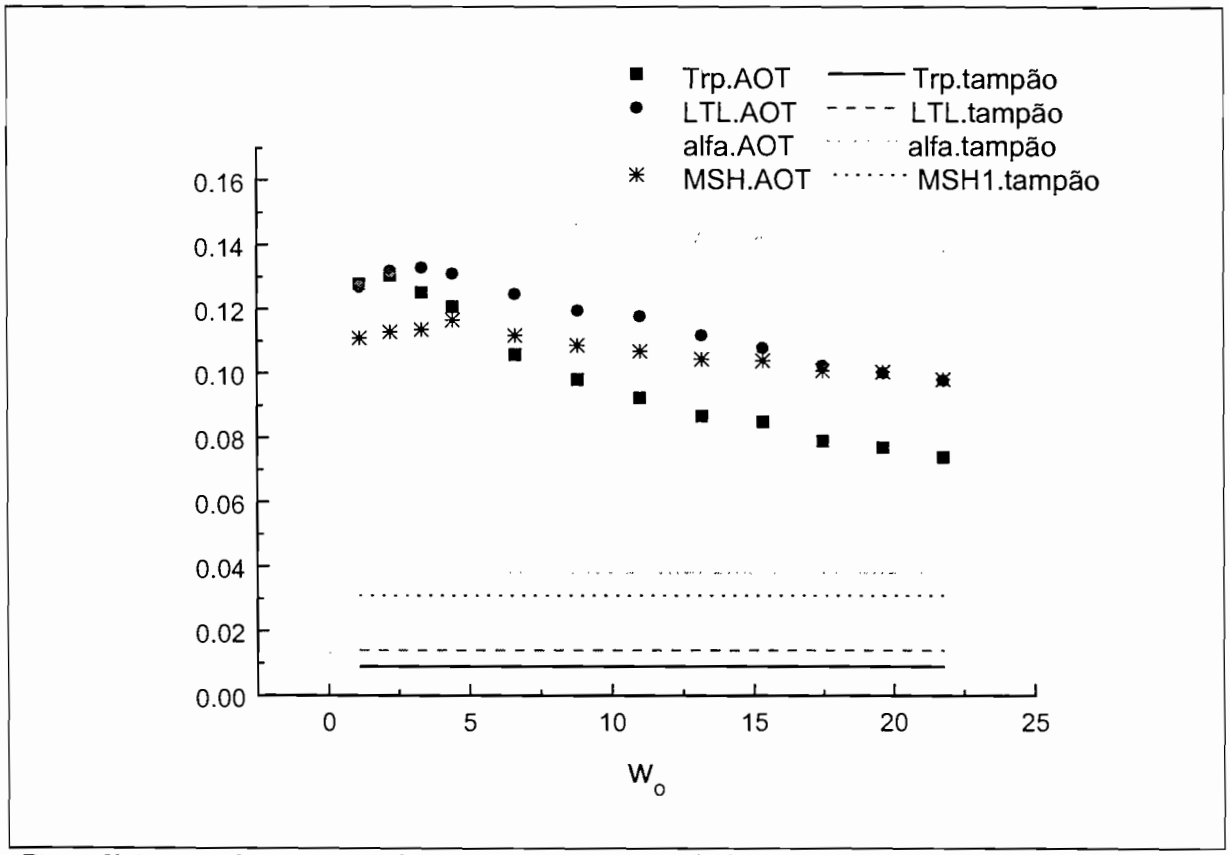


Figura V-4: graus de anisotropia dos fluoróforos em tampão fosfato (50mM, pH7,4) e em micelas reversas de AOT em isooctano (50mM) em função de w_o.

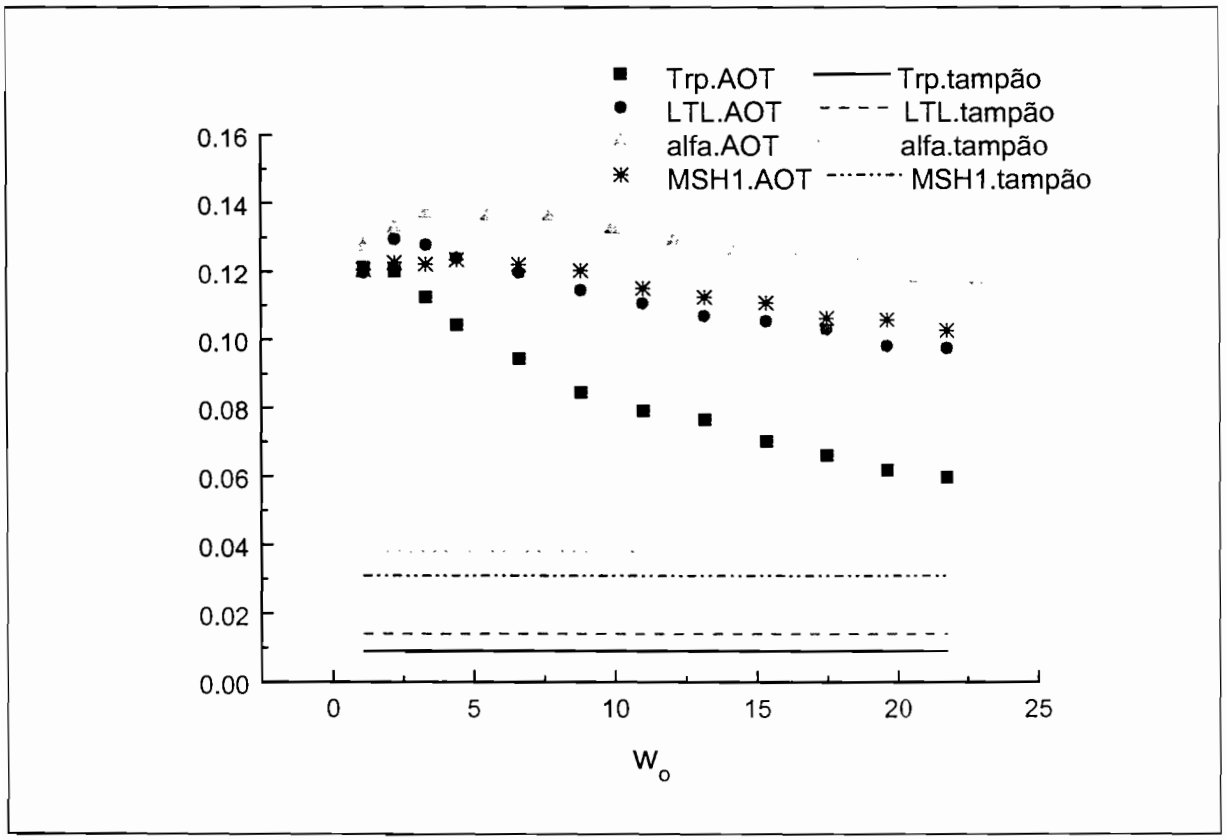


Figura V-5: graus de anisotropia dos fluoróforos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT em isooctano (50mM) em função de w_o.

Dos gráficos das Figuras V-4 e V-5 observamos que as anisotropias de estado estacionário são bem pequenas para as amostras em tampão fosfato indicando um alto grau de liberdade de movimento dos fluoróforos neste meio. A incorporação em micelas reversas provoca um aumento considerável nas anisotropias dos fluoróforos utilizados, especialmente para valores de w_o pequenos.

Bhattacharyya et al.(1993) observaram o mesmo efeito em seu estudo sobre hormônios melanotrópicos e de somatostatina (1995) em micelas reversas de AOT relacionando-os aos resultados obtidos por Valeur et al. (1977) para a anisotropia do Triptofano em solventes viscosos em baixas temperaturas. Nossos dados de anisotropia para o α-MSH estão de acordo, pois Bhattacharyya et al. (1993) observaram que a anisotropia do peptídeo permanece praticamente constante para valores de w_o maiores do que 5,6. Barbaric et al. (1981) observaram que a liberdade de movimento da α-quimotripsina em micelas reversas de AOT é bem pequena para valores de w_o da ordem de

INSTITUTO DE FÍSICA
Serviço de Biblioteca e Informação
Tombo: 2011

6,6 e, que neste caso são comparáveis à mobilidade apresentada em uma solução de água com 50% de propileno glicol em –70°C.

Observamos que os graus de anisotropia dos fluoróforos diminuem conforme o valor de w_o aumenta, para ambas as temperaturas medidas. Isso porque quanto maior for o valor de w_o maior será o raio hidrodinâmico da micela (ou seja, o tamanho do *pool* aquoso) e, mais espaçadas estarão as moléculas de AOT. Riter et al. (1998) em seu estudo sobre a imobilização da água no interior de micelas reversas de AOT em isooctano com coumarina 343 (C343) observaram que a sonda experimenta uma diminuição à restrição de seu movimento conforme o tamanho da micela aumenta (ou seja, com o aumento de w_o). Para w_o próximos a 1, a água comporta-se como se estivesse congelada devido à forte interação com a interface de AOT (Riter et al., 1998). Estas interações são principalmente do tipo íon-dipolo entre as moléculas de água e as cabeças polares do AOT, com o grupo sulfonato ou com os contra-íons de sódio, apesar de existirem também forças menos intensas como as interações dipolares entre as moléculas de água e o grupo sucinato e as interações dispersivas com as cadeias hidrocarbônicas. Sarkar et al. (1996) em seu estudo sobre a relaxação das moléculas de água em micelas reversas de AOT com coumarina 480 observaram que com o aumento do valor de w_o ocorrem aumentos no tamanho da micela, na constante dielétrica no interior do *pool* aquoso e na mobilidade das moléculas de água, o que é refletido como aumento da mobilidade da sonda inserida nesta região. Lenz et al. (1995) observaram que com o aumento da quantidade de água das micelas reversas de AOT em isooctano a mobilidade da insulina marcada com Abz aumenta indicando que a insulina não fica localizada na região da interface anfifílica.

Das Figuras V-4 e V-5 observamos também que as anisotropias dos fluoróforos em micelas reversas são sempre maiores do que as mesmas obtidas quando em tampão fosfato. Isto acontece, ou porque a presença da interface de AOT restringe de alguma forma a movimentação do Trp nas amostras investigadas, ou porque os fluoróforos encontram-se em um ambiente fisicamente mais restrito, o interior do *pool* aquoso, comparado com a solução aquosa. Além disso, o fato de que na presença das micelas reversas os valores das anisotropias são maiores do que os encontrados em solução tampão fosfato pode estar

refletindo, também, a mobilidade das próprias micelas. De acordo com Riter et al. (1998) a própria presença de íons sódio na solução diminui a mobilidade da água. Este fato está de acordo com o observado anteriormente por Bhattacharyya et al. (1993) em seu estudo de fluorescência de hormônios melanotrópicos em micelas reversas de AOT bem como o observado por Wong et al. (1976) em seu estudo sobre o interior das micelas reversas de AOT. Wong observou que um aumento na quantidade de água do sistema (aumento no valor de w_o) aumenta o grau de fluidez do *pool* aquoso o que leva a uma maior liberdade de movimento para os fluoróforos inseridos na mesma.

Comparando as anisotropias dos fluoróforos nas amostras de micelas reversas observamos que o Trp apresenta o menor valor. Isso pode ser devido a uma maior mobilidade natural por ser a menor de todas as moléculas utilizadas mas, também, pode ser um indicativo de que o Triptofano não fica inserido na interface de AOT mas, tende a localizar-se na região do *pool* aquoso, que é formado por água estruturada. O α-MSH apresenta o maior valor de anisotropia nas duas temperaturas estudadas o que sugere que este peptídeo tende a inserir-se na interface de AOT apresentando uma grande restrição à sua movimentação. Segundo Bhattacharyya et al. (1993) as interações existentes entre o α-MSH e o meio micelar fixam uma estrutura mais rígida para o peptídeo. Assim, devido à própria localização no sistema de micelas reversas de AOT, o Trp encontra-se mais livre do que o α-MSH quando em presença das mesmas. As anisotropias do LTL e do MSH 1 são praticamente iguais, principalmente para grandes valores de w_o, possuindo valores intermediários entre os valores do Trp e do α-MSH. Assim os dados obtidos para as anisotropias, tanto para o LTL quanto para o MSH 1, sugerem que ambos tendem a inserir-se na interface de AOT mas, não de maneira tão profunda quanto o α-MSH.

Na Tabela V-3 mostramos os valores das anisotropias para as amostras estudadas em tampão fosfato e em micelas reversas de AOT para w_o = 21,76. Na presença das micelas reversas os fluoróforos apresentam restrição ao movimento (seja pela inserção na interface, seja pela inserção em um ambiente restrito onde até a água se apresenta estruturada) e, que esta restrição é maior para o α-MSH, praticamente iguais e intermediários para o LTL e MSH 1 e menor para o Trp. Mais ainda, observamos que os

valores de anisotropia quando em presença de micelas reversas de AOT, são muito próximos para o MSH 1 e para o LTL e, nestes casos, não variam muito com a temperatura, indicando que em ambos os casos os fluoróforos podem estar localizados em uma região termodinamicamente mais estável das micelas reversas.

Poderíamos ter, então, o resíduo triptofano do α-MSH localizado na região das cadeias hidrocarbônicas, os resíduos triptofano do LTL e do MSH 1 localizados na região da interface próximos às cabeças polares do AOT e o amino-ácido Trp localizado no *pool* aquoso.

Amostra	anisotropia em tampão	Anisotropia em AOT (w_o=21,76) para 16° C	Anisotropia em AOT (w_o=21,76) para 32° C
Trp	0,009	0,074 ± 0,002	0,060 ± 0,002
LTL	0,014	0,098 ± 0,001	0,098 ± 0,002
α-MSH	0,038	0,139 ± 0,001	0,118 ± 0,002
MSH 1	0,031	0,098 ± 0,001	0,103 ± 0,001

Tabela V-3: anisotropias de estado estacionário para Trp, LTL, α-MSH e MSH 1 em tampão fosfato e em micelas reversas de AOT em isooctano (50mM) (20° C).

3) RENDIMENTO QUÂNTICO

Determinamos o rendimento quântico dos fluoróforos utilizados em tampão fosfato e em micelas reversas de AOT em função do valor do rendimento quântico do Triptofano em solução tampão fosfato, a saber 0,14 (Szabo e Rayner, 1980). Para tanto fizemos uma regra de três entre as áreas sob os espectros de emissão e os rendimento quânticos. Sempre que necessário normalizamos as concentrações dos fluoróforos. Os valores obtidos são apresentados na Tabela V-4 e na Figura V-6.

Solução	Trp	LTL	α-MSH	MSH1
Tampão fosfato	0,14	0,08	0,13	0,15
AOT w_o 1,109	0,079	0,088	0,130	0,147
2,216	0,060	0,061	0,081	0,112
3,320	0,050	0,048	0,075	0,094
4,422	0,044	0,045	0,078	0.086
6,620	0,038	0,039	0,073	0,078
8,810	0,035	0,037	0,074	0,075
10,99	0,034	0,036	0,073	0,072
13,162	0,033	0,036	0,072	0,073
15,325	0,033	0,037	0,075	0,074
17,480	0,032	0,036	0,075	0,074
19,627	0,032	0,036	0,075	0,074
21,765	0,032	0,037	0,074	0,074

Tabela V-4: rendimentos quânticos dos fluoróforos em tampão fosfato e em micelas reversas de AOT (50mM) em função de w_o. Os valores foram determinados em relação ao rendimento quântico do Triptofano na solução tampão fosfato 50mM, pH 7,4.

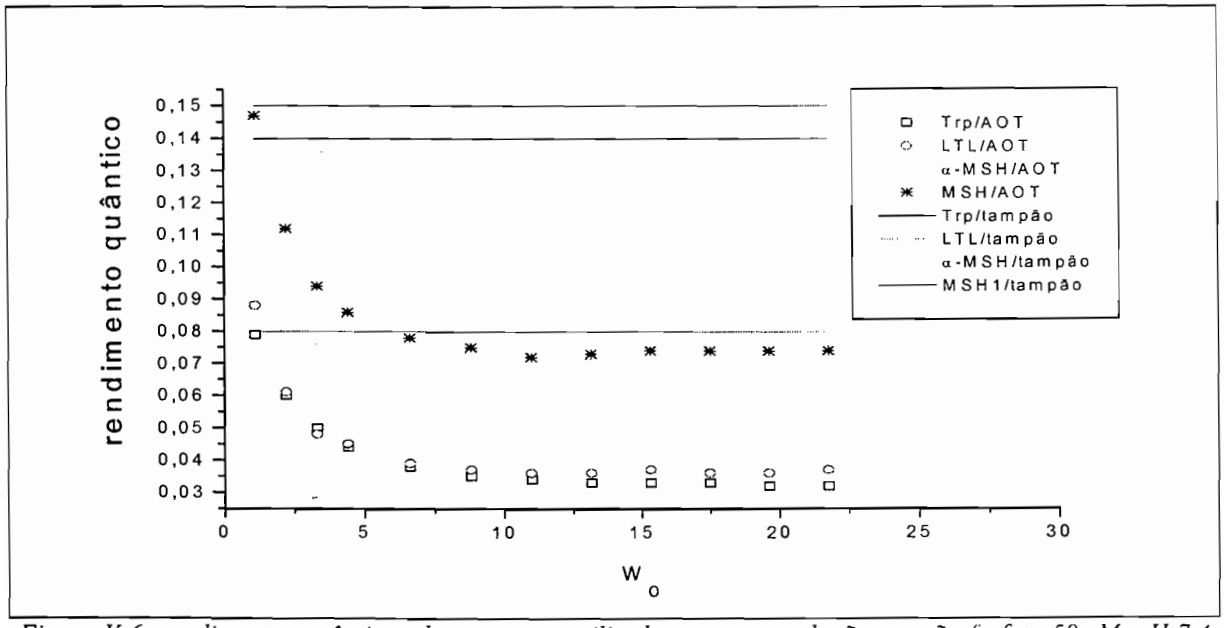


Figura V-6: rendimentos quânticos das amostras utilizadas tanto em solução tampão fosfato 50mM, pH 7,4 quanto em presença de micelas reversas de AOT 50mM em isooctano com alíquotas crescentes de soluções estoques de fluoróforos 10^{-3} M em tampão fosfato. Os valores foram determinados em relação ao valor de 0,14 para o Triptofano em solução tampão fosfato.

Comparando os valores obtidos para os rendimentos quânticos das amostras em micelas reversas de AOT ($w_o \geq 2{,}216$) com os valores em tampão fosfato, observamos uma diminuição nestes quando os fluoróforos estão nas micelas reversas, indicando que estão presentes outros modos de decaimento no sistema micelar, provavelmente uma supressão causada pela entrada do oxigênio presente no isooctano na região da interface micela, como proposto por Gurahay et al. (1996) em seu estudo de micelas reversas em heptano.

Observamos, também das curvas mostradas na Figura V-6, que o aumento de w_o provoca uma diminuição no valor do rendimento quântico, fato este que pode ser explicado pela quantidade de água presente no sistema. Para pequenos valores de w_o ou para micelas com pouca quantidade de água, o fluoróforo necessariamente experimenta um ambiente apolar decorrente da interface de AOT e do isooctano. Com o aumento do valor de w_o a quantidade de água das micelas reversas aumenta, possibilitando ao fluoróforo experimentar um ambiente mais polar. Este mesmo efeito de diminuição do rendimento quântico da emissão fluorescente com o aumento da quantidade de água no sistema foi encontrado anteriormente por Gurahay et al. (1996) e por Wong et al. (1976) em seus estudos com micelas reversas de AOT. Wong atribuiu este fato à supressão colisional ou dinâmica provocada pelas moléculas de água, apesar de haver uma supressão causada pela penetração do oxigênio presente no heptano que aparentemente pode difundir facilmente no interior das micelas reversas de AOT, especialmente em pequenos valores de w_o .

Também observamos destas curvas que os valores dos rendimentos quânticos ficam praticamente estabilizados para w_o em torno de 10 em valores menores do que os valores quando em soluções aquosas, indicando que os fluoróforos não tendem a se localizar no meio do *pool* aquoso onde temos a água *bulk*. Todos os fluoróforos utilizados tendem a ficar em um ambiente menos polar do que a água quando em presença de micelas reversas. Estes dados mostram que tanto o α-MSH quanto o MSH1 tendem a localizar-se na região da interface ou até mesmo na região das cadeias hidrocarbônicas do AOT, pois seus rendimentos quânticos são bem altos indicando que eles estão em uma região apolar. Já o Trp e o LTL tendem a localizar-se próximos à interface, talvez na região das águas

estruturadas ou próximos às cabeças polares do AOT, sendo que o Triptofano fica mais exposto.

Bhattacharyya et al. (1995) observaram a diminuição do rendimento quântico da emissão fluorescente da somatostatina em micelas reversas de AOT em isooctano. Já em seu estudo anterior sobre hormônios melanotrópicos nessas micelas, Bhattacharyya et al. (1993) observaram um aumento no rendimento quântico da emissão fluorescente para valores de w_o menores do que 3, que ficaram maiores do que os valores para solução aquosa; além disso, observaram que o aumento de w_o diminui os valores dos rendimentos quânticos das amostras analisadas porque o meio micelar é menos polar e mais rígido do que a água. Além disso, existem outros mecanismos de decaimento para o estado excitado. Ricci et al. (1976) de observações da supressão da fluorescência do indol no Triptofano por grupos carbonila atribuíram o mecanismo de supressão à formação de um complexo de transferência de carga no estado excitado entre o indol e o grupo carbonila - o indol transfere uma carga para o grupo carbonila que é eletrofílico e decai rapidamente ao estado fundamental através de um processo não radiativo. Poderíamos, então, ter no meio micelar supressão causada pelo grupo carbonila do AOT; assim quem estiver mais próximo da interface micelar estará mais sujeito à ter sua fluorescência suprimida.

4) SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO POR ACRILAMIDA

Os experimentos de supressão da fluorescência podem dar informações a respeito das posições relativas do anel indol em micelas reversas quando os supressores utilizados apresentam afinidades específicas pela fase aquosa ou pela fase de cadeias hidrocarbônicas. Apesar da grande heterogeneidade do sistema micelar, que provoca uma distribuição heterogênea dos fluoróforos e supressores nas micelas reversas, a acrilamida fica confinada ao *pool* aquoso e à região interfacial sofrendo partição entre estes dois meios (Lissi, 1990; Bhattacharyya, 1993;). Assim, para tentar localizar o Trp, o LTL e os hormônios melanotrópicos nas interfaces de AOT em micelas reversas fizemos medidas de supressão

da fluorescência através da Acrilamida utilizando um w_0 fixo de 17,48 variando a concentração do supressor.

As amostras em tampão fosfato foram excitadas em 300nm na tentativa de usarmos uma região onde a absorbância da acrilamida não fosse tão grande. Já as amostras de micelas reversas de AOT foram excitadas no comprimento de onda mais próximo possível de 300nm, desde que o comprimento de onda da máxima intensidade de emissão não se modifique muito (lembrando que em micelas reversas de AOT os comprimentos de onda da máxima intensidade de emissão fluorescente estão deslocados para a região do azul). Assim, tentamos manter o mesmo deslocamento obtido anteriormente mas, ao mesmo tempo usando a excitação o mais próximo possível de 300nm.

O acréscimo de Acrilamida diminui a intensidade do máximo de emissão fluorescente, sendo esta diminuição bastante intensa para o Triptofano quando comparado com os outros fluoróforos, especialmente o α-MSH em micelas reversas de AOT. Na Figura V-7 mostramos as curvas obtidas. Podemos observar que todas apresentam desvios positivos da linearidade sendo então ajustadas através da equação modificada de Stern-Volmer.

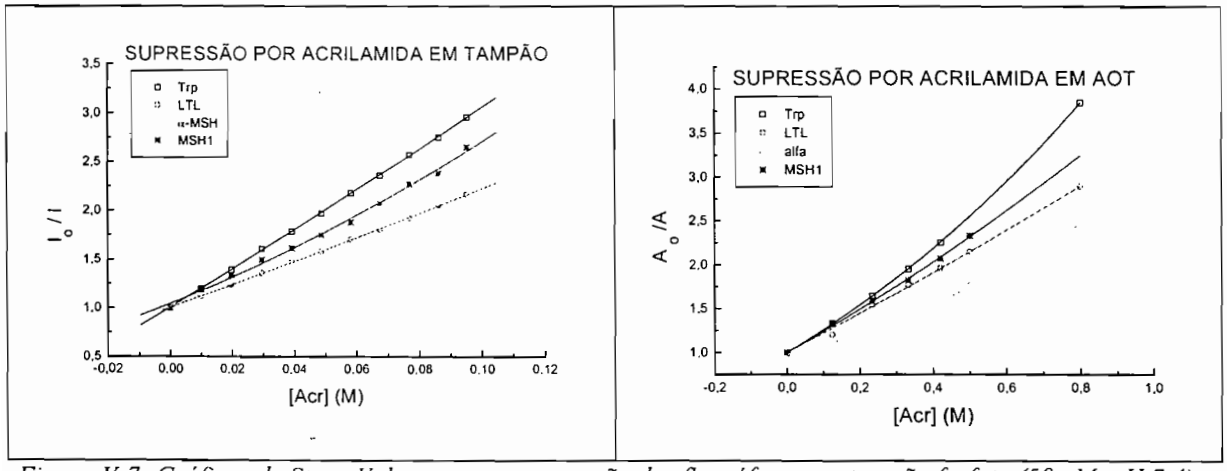


Figura V-7: Gráficos de Stern-Volmer para a supressão dos fluoróforos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT (50mM) com w_0 de 17,48. (20°C).

É fácil observar dnas curvas apresentadas na Figura V-7 que a eficiência da supressão nas micelas reversas de AOT é bem menor do que em solução aquosa. Este fato está de acordo com a diminuição na taxa de supressão do sistema observado por Matveeva et al. (1996) no estudo da supressão da atrazina marcada com fluoresceína em micelas reversas de AOT em isooctano, onde verificaram que a eficiência da supressão depende das propriedades das micelas reversas (como a concentração do surfactante e o grau de hidratação). As concentrações de Acrilamida são diferentes porque nas micelas reversas de AOT a acrilamida fica restrita à interface da micela ou ao ambiente de *pool* aquoso da mesma, ou seja em um ambiente restrito comparado com o volume total da amostra. Estas curvas tornam mais fácil a percepção de que a supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida em micelas reversas é bem menor do que em tampão fosfato.

Das curvas obtidas (Figura V-7) para as amostras em micelas reversas de AOT observamos que o Triptofano é o fluoróforo que sofre maior grau de supressão enquanto que o α-MSH é o que sofre menos supressão. Isso deve-se à localização dos mesmos nas micelas, indicando que o Triptofano encontra-se mais exposto e o resíduo triptofano do α-MSH mais escondido na interface, portanto, menos acessível à Acrilamida. Segundo os dados obtidos por Bhattacharyya et al. para o α-MSH em seu estudo de 1993, a região deste peptídeo que possui o resíduo Triptofano está provavelmente inserida na região das cadeias hidrofóbicas da interface de AOT. O LTL e o MSH 1 são intermediários nessa situação. Observamos, da mesma forma que o encontrado nos estudos de Bhattacharyya et al. (1993) com hormônios melanotrópicos e de 1995 com somatostatina, que as curvas de Stern-Volmer não são lineares mas, apresentam desvios positivos indicando que apenas uma fração dos fluoróforos no estado excitado sofre supressão colisional (difusão limitada). Davis et al.(1996) também obtiveram desvios positivos para a supressão da fluorescência da HSA por acrilamida em micelas reversas de AOT. Bhattacharyya et al. em seus dois artigos (1993 e 1995) sugeriram que uma parte dos fluoróforos do estado excitado decae estaticamente seja por um elemento de volume ativo ao redor do fluoróforo (supressão estática pela esfera de ação) seja pela formação de um complexo não fluorescente entre os reagentes. As curvas de Stern-Volmer mostradas na Figura V-7 apresentam desvios positivos indicando, portanto, a presença de supressão estática. Estes dados estão de acordo

com os obtidos por Bhattacharyya et al. (1993) no seu estudo dos hormônios melanotrópicos em micelas reversas de AOT. Segundo os dados obtidos por Bhattacharyya et al. (1995) para a supressão da fluorescência da somatostatina em micelas reversas de AOT por acrilamida e por CCl_4, existem duas localizações possíveis para o resíduo triptofano neste peptídeo – uma próxima à região das cadeias hidrocarbônicas emitindo em comprimentos de onda menores e outra na região do *pool* aquoso emitindo em comprimentos de onda maiores e mais exposto à acrilamida.

Os parâmetros obtidos após o ajuste utilizando a equação modificada de Stern-Volmer estão na Tabela V-5 que mostra também os ajustes das curvas obtidas para os fluoróforos em solução tampão fosfato. É importante observar que as curvas de Stern-Volmer obtidas para os fluoróforos em tampão fosfato também apresentam desvios positivos e, portanto, deverão também ser ajustadas pela equação de Stern-Volmer modificada. Conforme discutido anteriormente no capítulo de teoria, temos o modelo de Eftink e Ghiron (1976) que visa explicar esses desvios positivos em relação à supressão de Stern-Volmer e, que leva à equação modificada de Stern-Volmer , a saber :

$$I_o = I (1 + k_{SV} [Q]) \exp (V [Q]) \qquad \text{(V-1)}$$

onde k_{SV} é a constante de Stern-Volmer para supressão dinâmica ou por colisão, [Q] é a concentração do supressor e **V** é a chamada esfera de ação que considera o volume de uma esfera de ação em torno da molécula do supressor dentro da qual a probabilidade de haver supressão é um para qualquer molécula que se encontre dentro desta região (Frank e Vavilov, 1931),

Amostra	tampão	Micelas reversas de AOT
Trp	$K_{sv} = (20,5 \pm 0,1)$	$K_{sv} = (1,97 \pm 0,02)$
	$V = (1,00 \pm 0,05)$	$V = (0,502 \pm 0,007)$
LTL	$K_{sv} = (13,5 \pm 0,2)$	$K_{sv} = (2,1 \pm 0,2)$
	$V = (1,02 \pm 0,09)$	$V = (0,11 \pm 0,07)$
α-MSH	$K_{sv} = (16 \pm 1)$	$K_{sv} = (0,81 \pm 0,05)$
	$V = (1,1 \pm 0,5)$	$V = (0,47 \pm 0,03)$
MSH 1	$K_{sv} = (14,5 \pm 0,8)$	$K_{sv} = (2,1 \pm 0,2)$
	$V = (0,9 \pm 0,4)$	$V = (0,23 \pm 0,10)$

Tabela V-5: parâmetros obtidos das curvas de Stern-Volmer (I_o/I) para a supressão dos fluoróforos em solução tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT (50mM) com w_o 17,48 por parte da acrilamida; através do ajuste com a equação modificada de Stern-Volmer que considera tanto a supressão estática (através da esfera de ação, V) quanto a dinâmica (pela constante de Stern-Volmer, k_{sv} (20° C). A constante k_{sv} e a esfera de ação estão expressas em M^{-1}

Os valores obtidos para a constante de Stern-Volmer, $(0,81 \pm 0,05)M^{-1}$, e para a esfera de ação $(0,67 \pm 0,02)M^{-1}$ para a amostra de α-MSH em micelas reversas de AOT estão em pleno acordo com os valores obtidos por Bhattacharyya et al.(1993) para o α-MSH em AOT para w_o de 22,4 (1993), a saber: $0,64M^{-1}$ para a esfera de ação (V), $0,82M^{-1}$ para a constante de Stern-Volmer (k_{sv}), com erros de 20% para o valor de V e de 10% para o valor de k_{sv}.

Também observamos que os tempos de vida de decaimento fluorescente diminuem na presença de Acrilamida, tanto para amostras em tampão fosfato quanto para amostras em micelas reversas. Observamos que esta diminuição é muito mais intensa para as amostras em tampão fosfato do que em micelas reversas; assim sendo, a interface de AOT funciona como uma barreira dificultando a interação entre acrilamida e os fluoróforos utilizados. Os decaimentos são tri-exponenciais. Calculamos o tempo médio através da Equação V-2 mostrada abaixo:

$$\tau_{médio} = (\tau_1^2.B_1 + \tau_2^2.B_2 + \tau_3^2.B_3) / (\tau_1.B_1 + \tau_2.B_2 + \tau_3.B_3) \qquad \text{(V-2)}$$

onde τ_i são os tempos de vida e B_i são os pesos de cada tempo de vida na curva ajustada para o decaimento da amostra.

Fizemos o Gráfico de Stern-Volmer mostrados na Figura V-8. Das curvas obtidas para os tempos de decaimento de onde é fácil verificar que as curvas de τ_0/τ são lineares para as amostras em tampão fosfato e de micelas reversas de AOT.

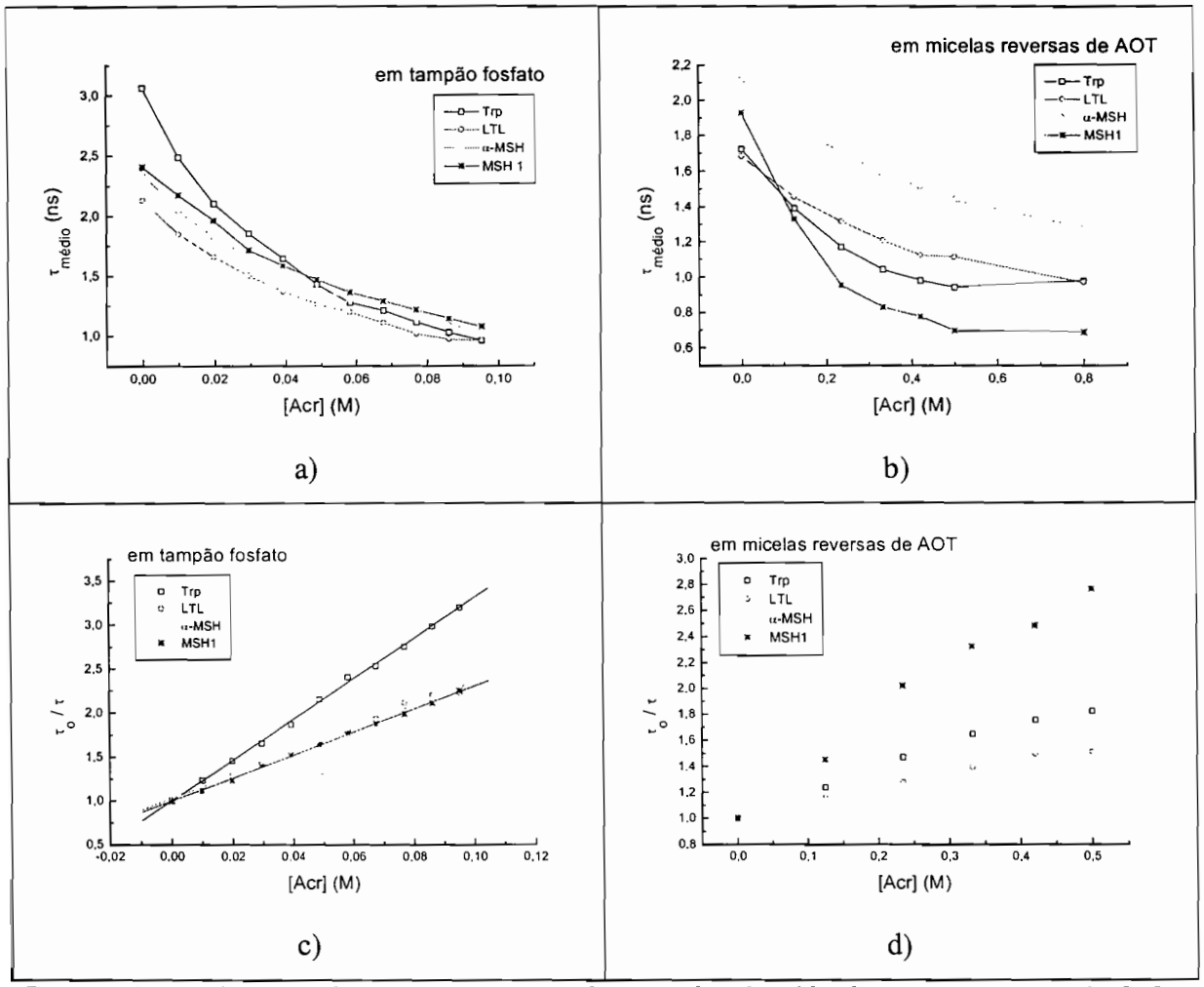


Figura V-8: os gráficos a) e b) mostram a variação do tempo de vida médio das amostras em tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT (50mM) com w_o 17,48 em função da concentração de acrilamida. Nos gráficos c) e d) são as curvas de Stern-Volmer temporais para a supressão da fluorescência em tampão fosfato e em micelas reversas de AOT em isooctano (mantidas as condições anteriores) por acrilamida. (20° C).

As curvas apresentadas na Figura V-8 estão de acordo com as obtidas por Bhattacharyya et al. (1995) para a somatostina em micelas reversas de AOT em isooctano.

São curvas lineares para as soluções tampão fosfato e para as amostras em micelas reversas de AOT devida a supressão estática. A constante de supressão dinâmica, ou constante de Stern-Volmer, k_{sv} , segundo Bhattacharyya et al. (1995) e Davis et al. (1996) podem ser obtidas diretamente das inclinações das curvas do gráfico τ_0/τ em função da concentração de acrilamida utilizando a equação de Stern-Volmer para tempos de vida ($\tau_0/\tau = 1 + k_{sv}.[Q]$) . Assim, dos gráficos da Figura V-8 obtivemos os valores apresentados na Tabela V-6 para as constantes de Stern-Volmer em solução tampão fosfato e em micelas reversas de AOT (50mM) para w_o 17,48.

(M^{-1})	Trp	LTL	α-MSH	MSH 1
k_{sv} tampão	23,1 ± 0,3	13,4 ± 0,3	13,4 ± 0,2	13,0 ± 0,2
k_{sv} micelas	1,70 ± 0,1	1,07 ± 0,07	0,93 ± 0,05	3,54 ± 0,2

Tabela V-6: constantes obtidas dos ajustes de Stern-Volmer modificado para os dados de fluorescência de estado estacionário e do ajuste de Stern-Volmer para os dados resolvidos no tempo (tempos de vida) em micelas reversas de AOT.

A partir dos valores das constantes de Stern-Volmer apresentados na Tabela V-6 e dos valores dos tempos de vida médios para o w_o de 17,48 determinamos as constantes bimoleculares, através da divisão da constante de Stern-Volmer pelo tempo de vida médio, ou $k_{sv}/\tau_{médio}$, para as amostras, apresentadas na Tabela V-7.

	Kq (tampão) (Io/I)	Kq (AOT) (Io/I)	Kq (tampão) (τ_0/τ)	Kq (AOT) (τ_0/τ)
Trp	6,91 ± 0,04	1,19 ± 0,01	7,78 ± 0,08	1,03 ± 0,06
LTL	6,43 ± 0,09	1,36 ± 0,12	6,38 ± 0,13	0,69 ± 0,04
α-MSH	6,8 ± 0,4	0,37 ± 0,02	5,70 ± 0,09	0,43 ± 0,01
MSH1	6,2 ± 0,3	0,75 ± 0,07	5,53 ± 0,08	1,27 ± 0,08

Tabela V-7: constantes bimoleculares para os fluoróforos em solução tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT (50mM) com w_o 17,48. (20° C).

A constante bimolecular para o triptofano em água é de $6{,}424.10^9 M^{-1}s^{-1}$. O valor que obtivemos para o Triptofano em micelas reversas de AOT (w_o=17,48) está em acordo

com o obtido por Lissi et al. (1990) para o triptofano em micelas reversas de AOT 0,1M (w_o=11) medido em 385nm mas para pH6 , 0,95.

Bhattacharyya et al. (1993) obtiveram o seguinte valor ajustando os dados do α-MSH em AOT (w_o=22,4) para a constante bimolecular (k_q) $0,36.10^9 M^{-1}s^{-1}$, estando em pleno acordo com nosso valor.

Observamos na Tabela V-5 que a inserção nas micelas reversas de AOT diminui o valor da constante de supressão dinâmica de um fator em torno de 10 vezes para o Triptofano, indicando um menor acesso do fluoróforo por parte do supressor como se a presença da interface impedisse o acesso da Acrilamida ao Trp. Esta mesma proporção foi encontrada por Bhattacharyya et al (1995) em seu estudo da fluorescência da somatostatina em micelas reversas de AOT em isooctano e por Davis et al. (1996) em seu estudo com NATA em micelas reversas de AOT, sugerindo que a NATA localiza-se na região da interface onde o acesso ao supressor é bem mais difícil. O mesmo fato é observado em relação ao valor da esfera de ação, ou seja, estes valores são menores quando em presença de micelas reversas de AOT. Isso indica que os fluoróforos estão de certa forma escondidos na interface, dificultando o acesso da Acrilamida. Este dado está de acordo com o observado por Bhattacharyya et al. (1993 e 1995) de que a eficiência da acrilamida como supressor dos hormônios melanotrópicos é bem menor quando eles estão inseridos em micelas reversas de AOT do que em solução aquosa, devido à menor taxa de difusão da acrilamida no meio micelar mais viscoso que a água. Isso vai ao encontro à inserção dos peptídeos na interface de AOT e a não localização no *pool* aquoso ou no isooctano, pelo menos a região que contém o resíduo triptofano. A diminuição das constantes de supressão estática e dinâmica podem ser observadas também nos gráficos apresentados na Figura V-7, onde observamos que para valores de I_o/ I parecidos precisamos de uma quantidade de acrilamida muito maior, da ordem de 10 vezes, quando em micelas reversas do que quando em solução tampão fosfato. Lissi et al.(1990) observaram uma menor taxa de supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida em micelas reversas de AOT quando comparado com etanol e atribuíram esta diminuição a dois fatores: a baixa concentração de acrilamida na interface (onde está o triptofano) pois a acrilamida tende a localizar-se no *pool* aquoso das micelas reversas, ou seja, a concentração média sentida pelo grupo indol do triptofano

excitado e pela alta viscosidade do meio considerando que o processo de supressão seja a difusão controlada na região da interface.

Observamos que a inserção de Acrilamida à solução de micelas reversas de AOT diminui o comprimento de onda do máximo de emissão fluorescente mas, não de forma linear conforme pode ser observado na Figura V-9. Bhattacharyya et al. (1993) observaram em seus estudos da fluorescência dos hormônios melanotrópicos e da somatostatina (1995) em micelas reversas que a supressão por acrilamida é dependente do comprimento de onda, sendo que a supressão é mais eficiente para comprimentos de onda de emissão maiores, sugerindo assim a existência de uma distribuição heterogênea dos fluoróforos nas micelas reversas de AOT. O mesmo fato foi observado por Lissi et al. (1990) nos estudos da supressão da fluorescência do indol em micelas reversas de AOT; os triptofanos que emitem em comprimentos de onda maiores correspondem àqueles que estão mais expostos à supressão por acrilamida e os triptofanos que emitem em comprimentos de onda menores estão localizados em um ambiente menos polar, ou seja, na interface e menos expostos à acrilamida.

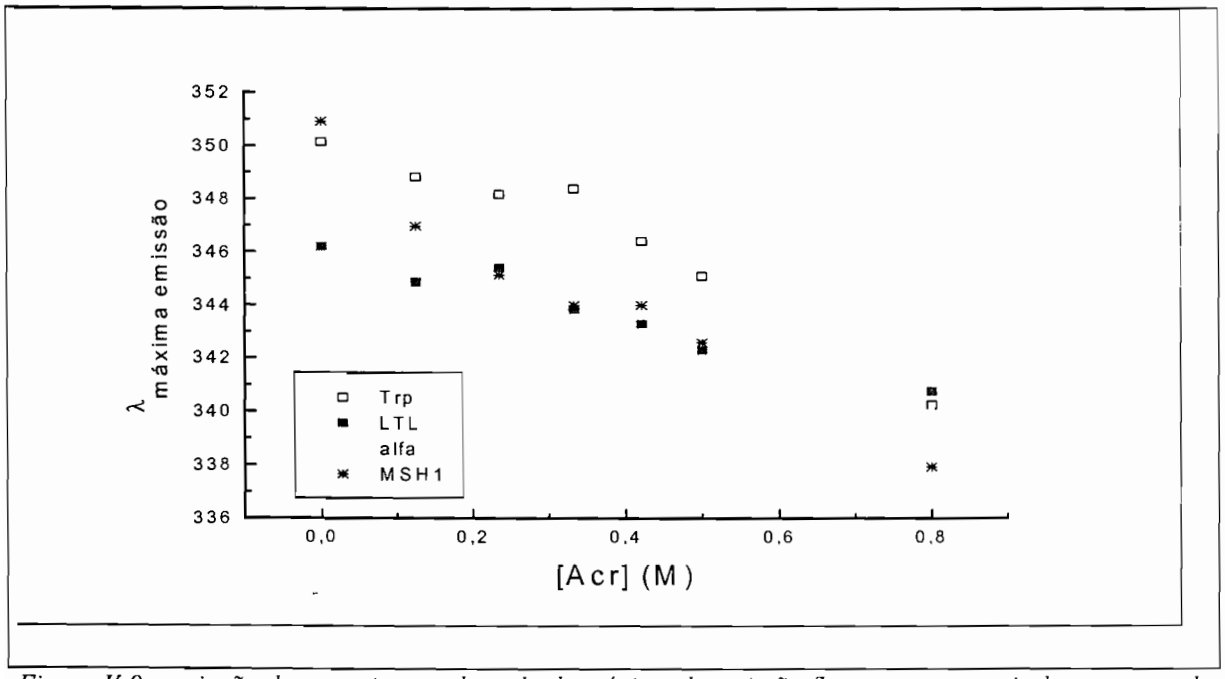


Figura V-9: variação do comprimento de onda do máximo de emissão fluorescente em micelas reversas de AOT (50mM e w_o = 17,48) como função da concentração do supressor. (20° C).

De maneira geral observamos na Figura V-9 que o acréscimo de Acrilamida provoca um deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão fluorescente para a região do azul, ou de comprimentos de onda menores. Grandi et al. (1981) observaram este mesmo efeito estudando a supressão da fluorescência do resíduo triptofano da lisozima donde concluíram que o resíduo triptofano mais exposto (Trp-62) é mais suprimido pela acrilamida na região de concentrações estudadas.

Na Figura V-10 mostramos a variação da população percentual de cada um dos tempos de vida de decaimento obtidos para o α-MSH em micela reversa de AOT (w_o=17,48). Podemos observar que a população referente ao tempo de vida longo é a que sofre maior supressão pela acrilamida. A população com tempo de vida médio praticamente não sente a presença da acrilamida. A diminuição da população do tempo de vida longo provoca naturalmente um maior percentual relativo da população de vida curta. Mas o tempo de vida como um todo, ou o tempo de vida médio continua caindo com o aumento da concentração de Acrilamida. Como o tempo longo tem máximo em comprimentos de onda maiores, passa a predominar no espectro estático a população que tem tempo curto e cujo máximo localiza-se em comprimentos de onda menores.

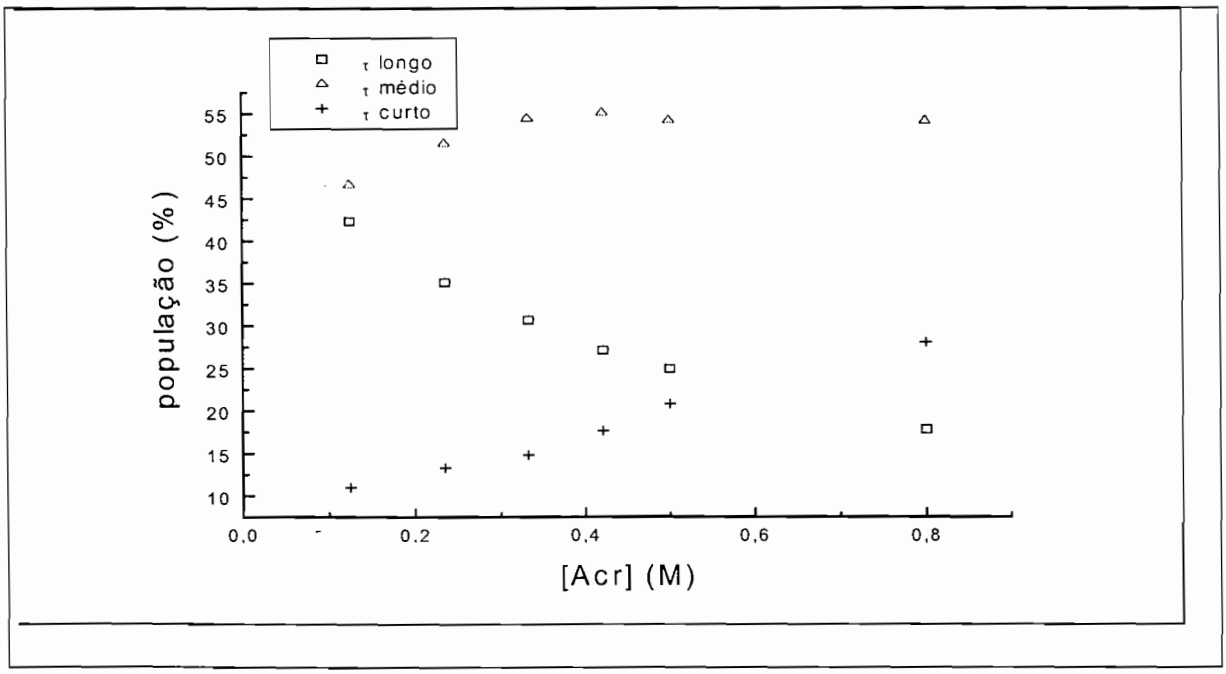


Figura V-10: variação da população percentual de cada um dos três tempos de vida encontrados para o α-MSH em micelas reversas de AOT (50mM e w_o=17,48). (20° C).

5) TEMPO DE VIDA DO DECAIMENTO FLUORESCENTE

Fizemos medidas dos tempos de vida do sinal fluorescente para todos os valores de w_o estudados. Todas as medidas de fluorescência resolvidas no tempo, ou dos decaimentos, para os peptídeos usados em tampão fosfato e micelas reversas de AOT foram satisfatoriamente ajustadas por três exponenciais (ajuste tri-exponencial) para todos os fluoróforos utilizados, inclusive para o Triptofano em tampão fosfato (o ajuste bi-exponencial para o Trp em solução tampão fosfato pH 7,4 resultou num χ^2 da ordem de 1,6 ou seja, não satisfatório). Os ajustes foram monitorados através do teste do χ^2 , que deveria se aproximar o máximo possível da unidade e da verificação visual da distribuição de resíduos, que deve ser aleatória.

O uso de três exponenciais está de acordo com o observado por Willis et al. (1992) no estudo do decaimento do sinal do triptofano onde encontraram o melhor ajuste usando a combinação de três exponenciais que foram associados à existência de três populações possíveis de rotâmeros ou conformações com diferentes tempos de decaimento. Davis et al. (1996) estudando a fluorescência da NATA e do HSA em micelas reversas de AOT obtiveram para a primeira ajustes bi-exponenciais associados a dois estados excitados para o fluoróforo neste sistema que provém do fato da NATA ocupar duas regiões de diferentes viscosidades e, para a HSA um ajuste tri-exponencial, indicando que seu resíduo triptofano está inserido em um ambiente diferente do meio aquoso.

Guharay et al. (1996) em seu estudo do 7-azatriptofano em micelas reversas de AOT relacionam as exponenciais encontradas no ajuste dos decaimentos do sinal fluorescente a dois microambientes das micelas reversas com diferentes graus de hidratação onde os fluoróforos podem se localizar (no caso, eles usaram ajustes bi-exponenciais). Bhattacharyya et al. (1993) ajustaram os dados de decaimento do α-MSH através de duas exponenciais que foram relacionadas a ambientes diferentes nos quais o resíduo triptofano em sua forma excitada pode estar localizado, com as taxas de troca entre estas posições mais lentas do que o tempo de decaimento. As moléculas de triptofano mais próximas ao isooctano fluorescerão em comprimentos de onda mais curtos enquanto que os resíduos

triptofano próximos à água (ou no *pool* aquoso) emitirão em comprimentos de onda maiores. Fazendo um paralelo com estes autores teríamos que os decaimentos tri-exponenciais que utilizamos estariam indicando a presença de três microambientes diferentes para a sonda no nosso sistema de micelas reversas; mais ainda, estes três microambientes possivelmente difeririam em relação à exposição a moléculas de água.

Já Singh et al. (1995) obtiveram decaimentos tri-exponenciais em seu estudo de L-Trp e retinal-Trp em micelas reversas de AOT em n-heptano. Associando o tempo de vida longo ao aparecimento de uma forma aniônica para o Triptofano e os dois tempos de vida curtos à espécies zwiteriônicas, explicam o decaimento tri-exponencial em termos dos rotâmeros do Triptofano. Quando o Triptofano está na forma zwiteriônica ele pode existir em três conformações: uma com o grupo mais eletrofílico perto do anel indol correspondendo ao menor tempo de vida e, as outras duas ou com o grupo NH_3^+ ou o grupo COO^- próximos ao indol. Estas duas últimas são equivalentes visto que a taxa de troca entre elas é bem rápida. Da mesma forma, segundo Beechem et al. (1985), os tempos de decaimento de aproximadamente 1, 3 e 9 nanosegundos na região de pH compreendida entre 2 e 10 podem ser explicados em termos de diferentes espécies iônicas do Triptofano presentes na solução (protonada, zwiteriônica e iônica), sendo que cada uma destas espécies possui um tempo de vida característico contribuindo para o decaimento total de acordo com sua fração molar na solução. O decaimento com tempo de vida próximo a 3 nanosegundos está associado com a emissão máxima em torno de 350nm, enquanto que o tempo de vida próximo a 0,5 nanosegundos possui o máximo de emissão fluorescente por volta de 335nm (Beechem, 1985).

Mostramos na Figura V-11 algumas das curvas de decaimento obtidas para as amostras estudadas; a saber: fluoróforo em tampão fosfato (pH 7,4) e em micelas reversas de AOT (w_o=2,22 ; 6,62 e 21,76).

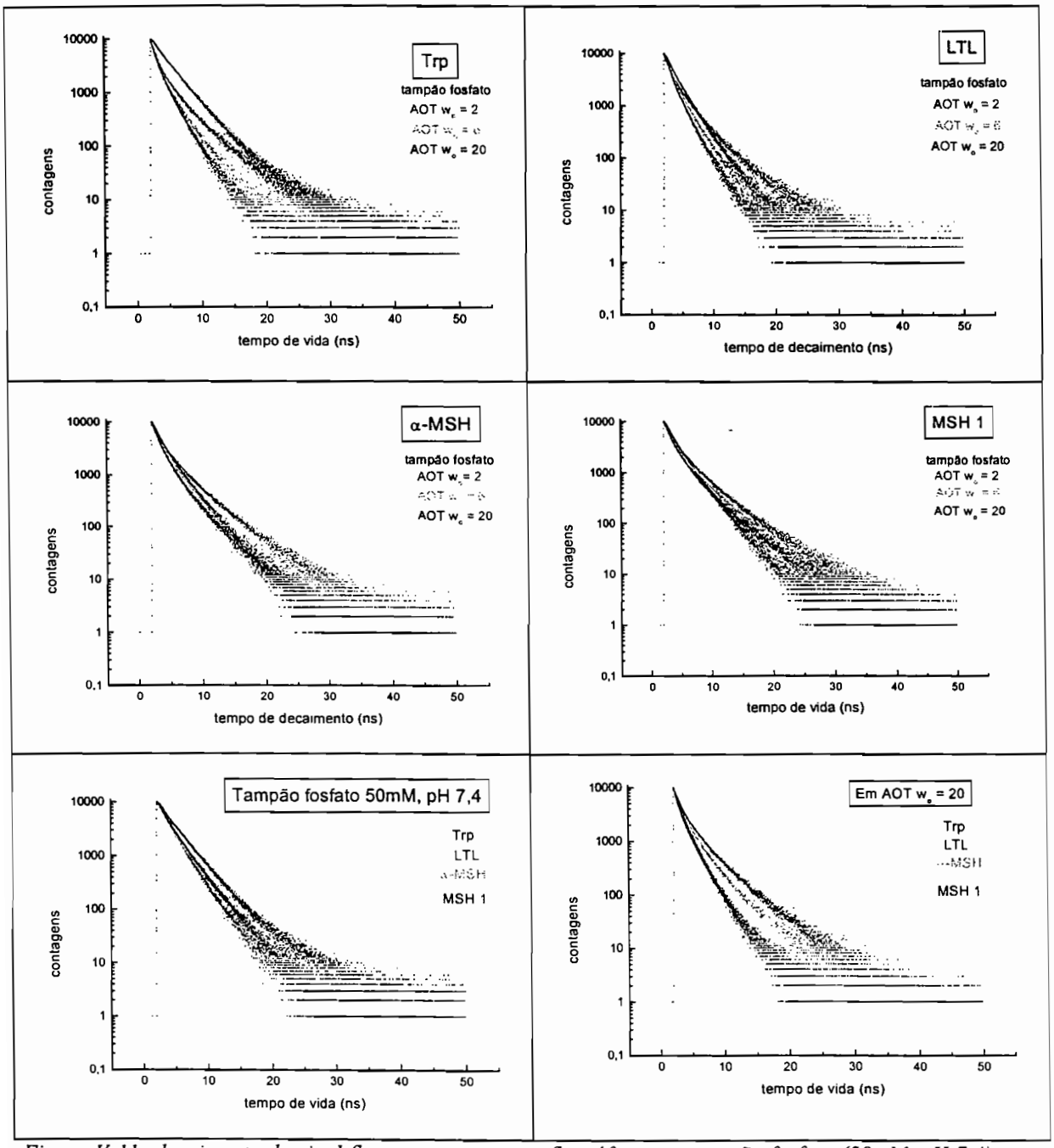


Figura V-11: decaimento do sinal fluorescente para os fluoróforos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4) e em micelas reversas de AOT em isooctano (50mM para w_o =2,22; 6,62 e 21,76). (20° C).

Observamos pela forma das curvas de decaimento para os fluoróforos em micelas reversas que quanto maior o valor de w_o mais rápido é o decaimento do estado excitado. O que pode ser mais facilmente percebido através da análise dos gráficos mostrados na Figura V-12 que relacionam os tempos de decaimento médios com os valores de w_o das micelas reversas de AOT. Lembrando que os tempos de vida estão relacionados com os processos de relaxação existentes na amostra e, consequentemente, com o meio ambiente no qual o fluoróforo se encontra, temos que estas diminuições nos tempos de vida poderiam ser devidas tanto a um aumento das interações do fluoróforo com as suas moléculas vizinhas quanto à própria conformação que o fluoróforo pode adquirir, sendo muito difícil distinguir a causa.

O tempo de vida médio foi calculado através da Equação V-2 mostrada anteriormente na parte da supressão da fluorescência por Acrilamida:

$$\tau_{médio} = (\tau_1^2.B_1 + \tau_2^2.B_2 + \tau_3^2.B_3) / (\tau_1.B_1 + \tau_2.B_2 + \tau_3.B_3) \qquad \text{(V-2)}$$

onde τ_i são os tempos de vida e B_i são os pesos de cada tempo de vida na curva ajustada para o decaimento da amostra.

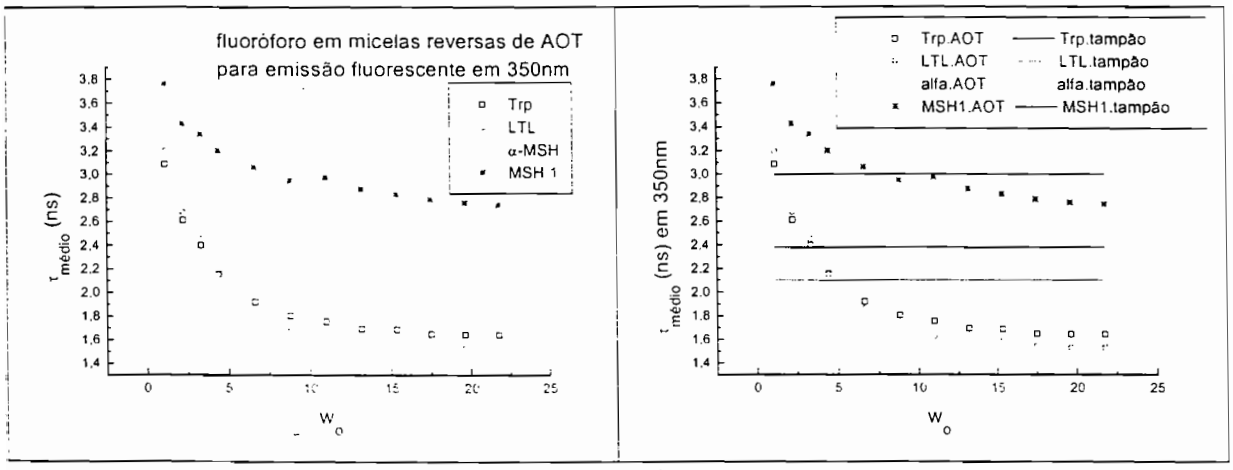


Figura V-12: variação do tempo de vida médio do Triptofano como amino-ácido e como resíduo no LTL, α-MSH e MSH 1 em micelas reversas de AOT (50mM) como função de w_o. (20° C).

Observamos nas curvas apresentadas na Figura V-12 que o acréscimo da interface de AOT faz com que ocorra um aumento no tempo de vida médio dos fluoróforos, para pequenos valores de w_o. Para o triptofano ocorre um aumento de 6 vezes da contribuição da população de maior tempo no cálculo do tempo médio em comparação com a solução tampão fosfato (veja item 6 deste capítulo), o que acaba por gerar este pequeno efeito mesmo com a diminuição dos tempos de vida quando em pequenas micelas reversas de AOT. Para o LTL, α-MSH e MSH 1 este fato deve-se ao aumento do valor dos três tempos de vida quando em micelas reversas de AOT com pouca água, comparado com a solução tampão (veja item 6 deste capítulo).

Observamos também que existe uma diminuição do valor do tempo de vida médio para todas as amostras com o aumento de w_o , sendo este efeito mais pronunciado para valores de w_o até aproximadamente 10, a partir do qual existe uma suavização do efeito. Tal fato foi observado também por Guharay et al. (1996) em seu estudo das propriedades fluorescentes do 7-azatriptofano em micelas reversas de AOT e por Bhattacharyya et al. (1995) em seu estudo da fluorescência da somatostatina em micelas reversas de AOT em isooctano (especialmente o que concerne à diminuição do tempo de vida médio com o aumento do valor de w_o, chegando até mesmo a ficar menor do que o tempo de vida médio em solução aquosa para grandes valores de w_o). Lenz et al. (1995) observaram uma diminuição do tempo de vida médio da insulina marcada com Abz sob incorporação em micelas reversas de AOT para w_o entre 3 e 50 em relação ao tempo de vida médio de solução aquosa e, concluíram que este efeito é um indicativo da existência de supressão dinâmica pelas cabeças polares do anfifílico mostrando que a dinâmica do fluoróforo é afetada pelo ambiente micelar.

É importante salientar que as curvas de decaimento para as amostras com micelas reversas de AOT não se aproximam da curva de decaimento para os fluoróforos em tampão fosfato nem mesmo quando temos uma grande quantidade de água nas micelas (w_o próximo a 20; ou seja, vinte moléculas de água para cada cabeça de AOT), conforme pode ser observado tanto nas curvas de decaimento (Figura V-11) quanto nos gráficos mostrados na Figura V-12.

Sabemos pela literatura que uma diminuição no valor do pH do meio ou a protonação do Triptofano acarreta uma diminuição do valor do tempo de decaimento do estado excitado além da diminuição do rendimento quântico (Beechem, 1985) ; ou seja, a presença de íons H^+ no meio faz com que o fluoróforo permaneça menos tempo no estado excitado, isso devido a sua capacidade de ejetar elétrons (a constante de ionização para o Trp é muito menor em solventes polares do que em não polares; desta forma os Trp que ficam mais próximos à superfícies ou à cargas são mais ionizados). Assim determinamos também os tempos de decaimento dos fluoróforos em uma solução tampão citrato fosfato (50mM de pH 4,4); mostrados na Tabela IV-8. Medimos também os tempos de decaimento dos fluoróforos em micelas diretas de AOT (25mM em tampão fosfato com 25M de fluoróforo).

Amostra	Tampão fosfato (pH 7,4)	Micelas reversas w_o 2,22	Micelas de AOT w_o 21,76	Tampão citrato (pH 4,4)	Micelas diretas de AOT
Trp	3,0	2,6	2,0	2,44	2,55
LTL	2,1	2,7	1,8	1,5	1,52
α-MSH	2,35	3,2	2,15	1,86	2,01
MSH 1	2,38	3,4	2,67	1,88	2,63

Tabela V-8: tempos de vida médios medidos em nanosegundos para os fluoróforos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4); em tampão citrato (50mM, pH 4,0); em micelas reversas de AOT (50mM; w_o=2,22 e 21,76) e em micelas diretas de AOT (25mM). (20° C).

O valor obtido para o Triptofano em micelas reversas de AOT com w_o em torno de 21 está de acordo com o obtido por Lissi et al. (1990) de (2,1±0,1)ns para o triptofano em AOT 0,1M com w_o=22. Já o valor do tempo médio obtido de 2,15ns para o α-MSH para $w_o \approx 2,2$ está de acordo com o obtido por Bhattacharyya et al. (1993) para w_o=22,4, a saber, 2,3ns. Esta concordância foi obtida independentemente do número de exponenciais usadas para o ajuste do decaimento (Bhattacharyya et al. usaram apenas duas exponenciais enquanto nós utilizamos três).

Fizemos também uma medida de Triptofano 10^{-3}M em tampão fosfato (que é a concentração da alíquota acrescentada às micelas reversas de AOT), para averiguar o efeito de uma super concentração no valor do tempo de decaimento médio. Encontramos o valor de 2,8 ns para esta amostra; ou seja, aproximadamente 7% menor. Assim, observamos que existe uma pequena diminuição no valor do tempo de decaimento médio em função da concentração; é o efeito que denominamos auto-supressão. Esperamos, desta forma, que os valores dos tempos de decaimento dos fluoróforos quando em micelas reversas sejam menores do que quando em solução tampão, pelo próprio efeito da concentração.

6) ESPECTRO DE DECAIMENTO ASSOCIADO

Acompanhamos as populações relativas de cada um dos tempos de vida obtidos para nossos decaimentos em tampão fosfato (50mM, pH 7,4); em tampão citrato (50mM, pH 4,0) e em micelas reversas de AOT (50mM; w_0=2.22 e 21,76) como função do comprimento de onda de emissão fluorescente. Os resultados são mostrados nas Figuras IV-13 (Trp), IV-14 (LTL), IV-15 (α-MSH) e IV-16 (MSH 1). As populações foram determinadas nos vários comprimentos de onda através de um programa de análise global das curvas de decaimento obtidas ao longo da banda de emissão. Nessa análise, todos os dados de decaimento são ajustados a um mesmo processo tri-exponencial, obtendo-se um único conjunto de três tempos de vida. Para cada comprimento de onda determinam-se os fatores pré-exponenciais, a partir dos quais calculam-se as contribuições percentuais à fluorescência. Aplicando-se os resultados à banda de emissão medida no fluorímetro estático obtém-se o chamado Espectro de Decaimento Associado (EDA) mostrados nas Figuras IV-20 a IV-23. Quando da determinação desses tempos de vida para todas as amostras foram encontrados três tempos, exceto para a de MSH 1 em tampão citrato 50mM com pH 4,0 que apresentou dois tempos de vida. Esses três tempos de vida de ajuste são apresentados em tabelas V-9, V-10, V-11 e V-12 acompanhando as figuras.

6a) EDA para o TRP

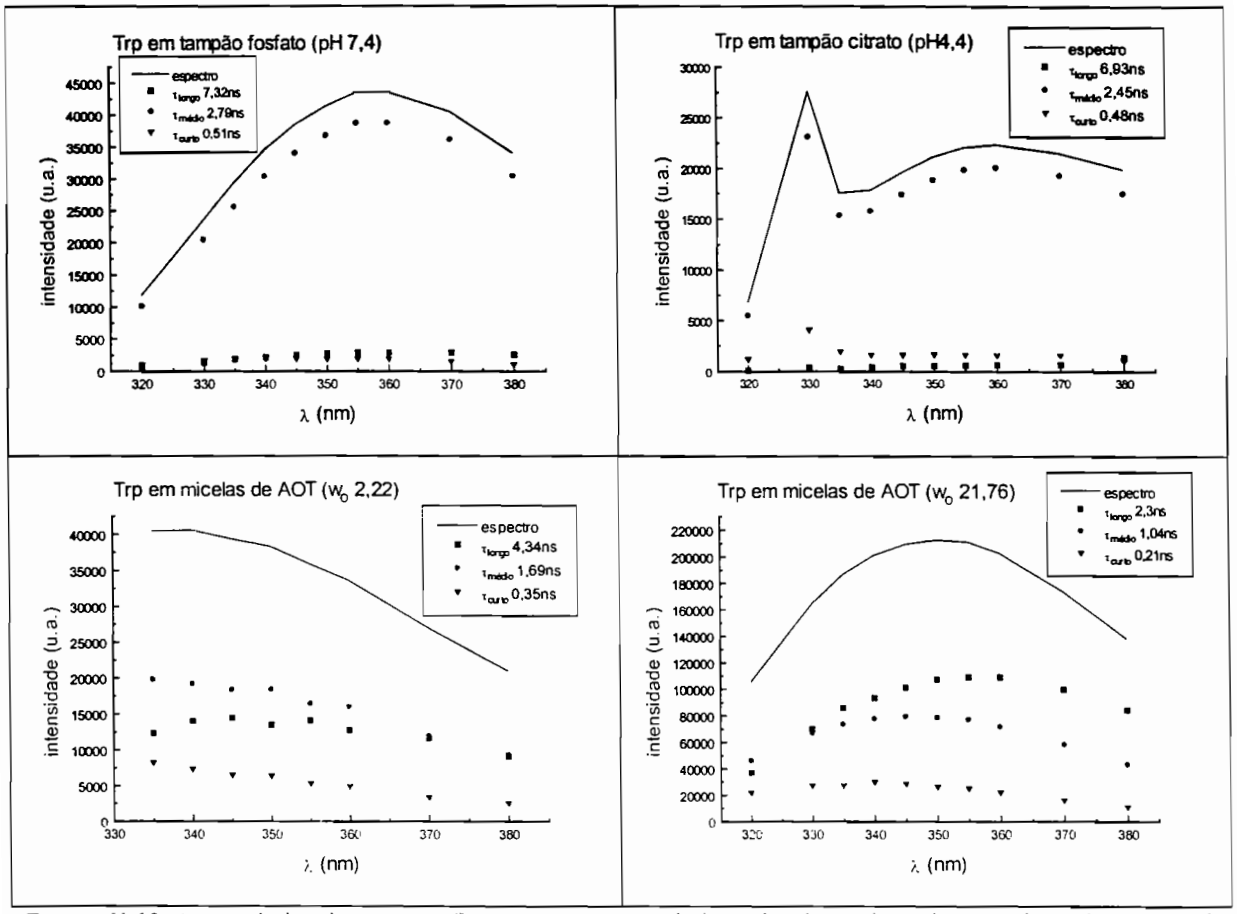


Figura V-13: intensidades de emissão fluorescente em unidades arbitrárias de cada uma dos três tempos de vida obtidos pelo ajuste do $\chi 2$ para as curvas de decaimento do Triptofano em solução tampão fosfato (50mM, pH 7,4); solução tampão citrato (50mM, pH 4,4) e em micelas reversas de AOT (50mM; w_0=2,22 e 21,76) como função do comprimento de onda de emissão. (20° C).

Das curvas na Figura V-13 observamos que para o Trp em solução aquosa o tempo de vida médio (2.79 ns para pH 7,4 e 2.45 ns para o pH 4,0) corresponde ao estado mais populoso, correspondendo a 88,5% da população total em pH 7.4 e 88,0% para pH 4,4, em detrimento dos tempos de vida longo e curto. Além disso os comprimentos de máximos de emissão dos tempos longo e médio são próximos a 360nm, típicos de região polar; já os tempos de vida curtos tem máximos em torno de 345nm correspondente a um meio menos polar.

A incorporação em micelas reversas de AOT diminui globalmente os tempos de vida. Todavia, aumenta a população dos estados com tempos de vida longos para os dois valores de w_o utilizados (Figura V-13). Para micelas reversas com w_o=2,22 aumenta a contribuição do tempo de vida longo (de 6,6% para pH 7,4 e de 2,8% para pH 4,4 para 38,0% nessas micelas reversas) com máximo em torno de 355nm, correspondentes à conformações do Trp localizados em uma região mais polar da interface de AOT. Já o máximo do tempo de vida médio é deslocado para 335nm, devendo ser responsável pela maior contribuição em um meio menos polar; o tempo de vida curto também sofre um deslocamento para a região menos polar. Para micelas reversas com w_o=21,76 existe uma predominância do tempo de vida longo com máximo correspondente ao meio mais polar (aproximadamente 350nm); o tempo de vida médio mantém as características de baixa polaridade da mesma forma que o tempo de vida curto. O Trp em micelas reversas de w_o 21,76 está em ambiente com características da água mas, diferentes da água *bulk* ou da água da solução tampão fosfato. É interessante notar a diferença populacional de cada um desses três estados nas micelas reversas em comparação com o meio aquoso (Tabela V-9).

Trp	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão citrato pH 4,0	Micela de AOT Wo=2,22	Micela de AOT Wo=21,76
τ_{longo} (ns)	7,32	6,93	4,34	2,3
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	360	350	355
população (%)	6,6	2,8	38,0	50,3
$\tau_{médio}$ (ns)	2,79	2,45	1,69	1,04
$\lambda_{máximo}$ (nm)	360	350	335	345
população (%)	88,5	88,0	46,6	37,0
τ_{curto} (ns)	0,51	0,48	0,35	0,21
$\lambda_{máximo}$ (nm)	350	350	335	340
população (%)	4,8	9,2	15,4	12,7

Tabela IV-9: tempos de vida, em nanosegundos.comprimento máximo de emissão fluorescente, em nanometros e porcentagem populacional ajustados para a determinação das populações percentuais do Triptofano em soluções aquosas e em micelas reversas de AOT 50mM em isooctano.

Da Tabela V-9 percebemos que a incorporação em micelas reversas diminui de forma geral os tempos de vida do estado excitado e que esta diminuição é tanto maior quanto maior for a quantidade de água no interior das micelas, indicando que no meio micelar existem outros processos envolvidos na desexcitação do Triptofano que não estão presentes no meio aquoso.

6b) EDA para o LTL

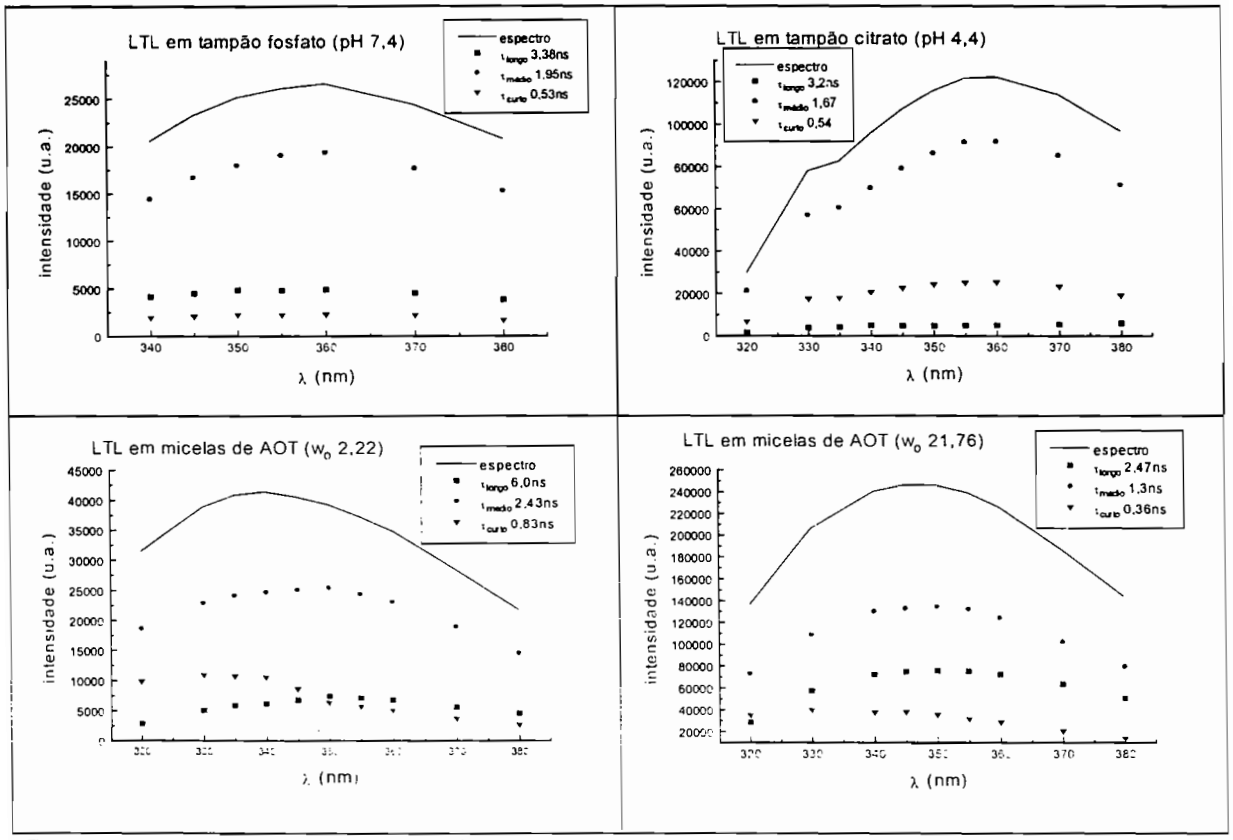


Figura V-14: intensidades de emissão fluorescente em unidades arbitrárias de cada uma dos três tempos de vida obtidos pelo ajuste do $\chi 2$ para as curvas de decaimento do resíduo Triptofano no tripeptídeo LTL em solução tampão fosfato (50mM, pH 7,4); solução tampão citrato (50mM, pH 4,4) e em micelas reversas de AOT (50mM; w_0=2,22 e 21,76) como função do comprimento de onda de emissão. (20° C).

Da Figura V-14 observamos que o LTL, da mesma maneira que o Triptofano, privilegia a população do tempo de vida médio nas soluções aquosas em pH 7,4 e pH 4,4. Os três tempos de vida têm máximos correspondentes ao meio aquoso, ou seja, aproximadamente 355nm. A incorporação em micelas reversas de AOT com w_0 baixo (2,22) resulta no aumento da população do tempo de vida curto, cujo máximo de emissão

ocorre em 335nm, correspondente a um meio não polar. A emissão correspondente ao tempo de vida médio desloca-se para 345nm, mostrando que ela está relacionada a conformações em que o Trp sente um meio de baixa polaridade. A população do estado com tempo longo deve estar em contato com as moléculas de água. Já na incorporação em micelas reversas grandes, com bastante água (w_o=21,76), ocorre um aumento na contribuição da população do tempo de vida longo correspondente aos fluoróforos que ficam escondidos em uma região de polaridade próxima à da água (na região da interface ou das cadeias hidrocarbônicas). Nota-se uma diminuição na contribuição do tempo de vida médio, que continua a sentir um meio não polar. Em w_o=21,76, há conformações que localizam o Trp do LTL em regiões de baixa polaridade, demonstrando que o peptídeo não está na água *bulk*. Embora os tempos de vida médio da solução tampão fosfato e das micelas reversas com w_o alto (21,76) sejam parecidos com os da solução tampão citrato (pH 4,4) os tempos individuais e as percentagens populacionais são diferentes sendo um indicativo de que a água próxima ao LTL não é também água *bulk* de baixo pH.

Na Tabela V-10 mostramos os três tempos de vida de emissão do Trp no LTL, bem como o comprimento do máximo de emissão fluorescente e a porcentagem populacional de cada tempo. Observamos que nas quatro amostras diferentes existe a predominância de populações, em maior ou menor grau, com tempo de vida médio para o LTL.

LTL	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão citrato pH 4,0	Micela de AOT Wo 2,22	Micela de AOT Wo 21,76
τ_{longo} (ns)	3,38	3,2	6,0	2,47
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	355	350	350
população (%)	18,8	4,8	16,7	30,6
$\tau_{médio}$ (ns)	1,95	1,67	2,43	1,3
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	355	345	345
população (%)	72,4	74,3	62,9	54,4
τ_{curto} (ns)	0,53	0,54	0,83	0,36
$\lambda_{máximo}$ (nm)	350	355	335	330
população (%)	8,8	20,9	20,4	15,0

Tabela V-10: tempos de vida, em nanosegundos, comprimentos de onda de máxima emissão, em nanometros e população porcentual ajustados para a determinação das populações percentuais do resíduo triptofano do LTL em soluções aquosas e em micelas reversas de AOT (50mM).

6c) EDA para o α-MSH

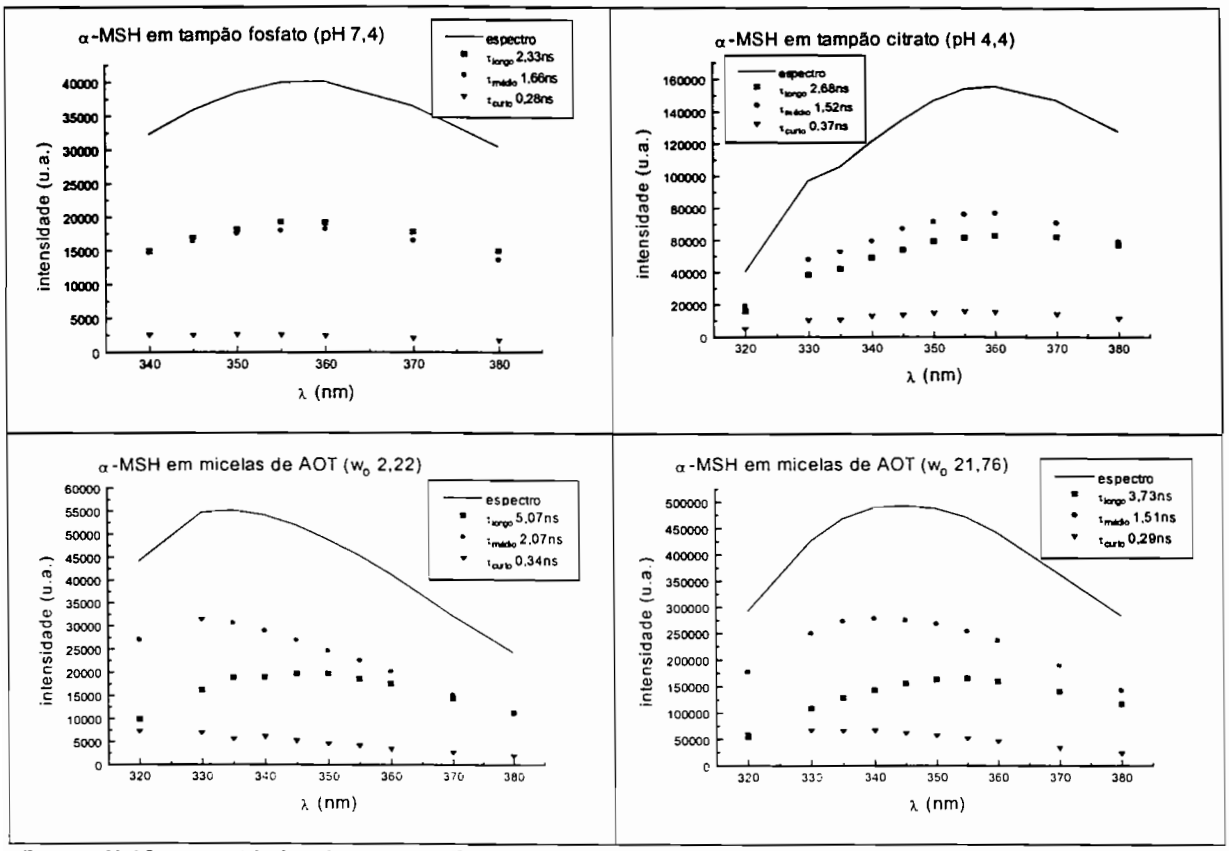


Figura V-15: intensidades de emissão fluorescente em unidades arbitrárias de cada uma dos três tempos de vida obtidos pelo ajuste do $\chi 2$ para as curvas de decaimento do resíduo Triptofano no α-MSH em solução tampão fosfato (50mM, pH 7,4); solução tampão citrato (50mM, pH 4,4) e em micelas reversas de AOT (50mM; w_o=2,22 e 21,76) como função do comprimento de onda de emissão. (20° C).

Das curvas apresentadas na Figura V-15 observamos que em solução neutra (pH 7,4) as populações com os tempos de vida médio e longo são idênticas. Já para pH 4,0 a população com tempo de vida médio é pouco maior do que a com tempo de vida longo. Mas em ambos os casos a população com tempo de vida curto é bem pequena. Nestas soluções aquosas os tempos de vida longo e médio possuem máximos em torno de 355-360nm correspondendo a um meio polar. A incorporação em micelas reversas de AOT privilegia a população com tempo de vida médio, cujo máximo de emissão desloca-se para 330nm, em detrimento da população com tempo de vida longo cuja máxima emissão mantém-se próximo a 350nm. Ou seja, a incorporação em micelas reversas indica que há

conformações em que o resíduo triptofano fica em ambiente de baixa polaridade e há conformações em que o fluoróforo fica circundado por moléculas de água. O acréscimo de água nas micelas reversas leva a uma diminuição dos tempos de vida e um ligeiro deslocamento para o vermelho das emissões correspondentes aos tempos longo e médio. As contribuições relativas são pouco alteradas, como pode ser observado na Tabela V-11 e pode-se concluir que o peptídeo não vai para a fase de água bulk nas micelas com w_o elevado.

α-MSH	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão citrato PH 4,0	Micela de AOT Wo 2,22	Micela de AOT Wo 21,76
τ_{longo} (ns)	3,33	2,68	5,07	3,73
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	360	350	355
população (%)	48,1	41,0	37,0	32,0
$\tau_{médio}$ (ns)	1,66	1,52	2,07	1,51
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	360	330	340
população (%)	45,5	48,9	52,5	55,4
τ_{curto} (ns)	0,28	0,37	0,34	0,29
$\lambda_{máximo}$ (nm)	350	355	320	330
população (%)	6,4	10,12	10,5	12,5

Tabela V-11: tempos de vida, em nanosegundos, comprimentos de onda de máxima emissão fluorescente, em nanometros e população porcentual ajustados para a determinação das populações percentuais do resíduo triptofano do α-MSH em soluções aquosas e em micelas reversas de AOT (50mM).

6d) EDA para o MSH 1

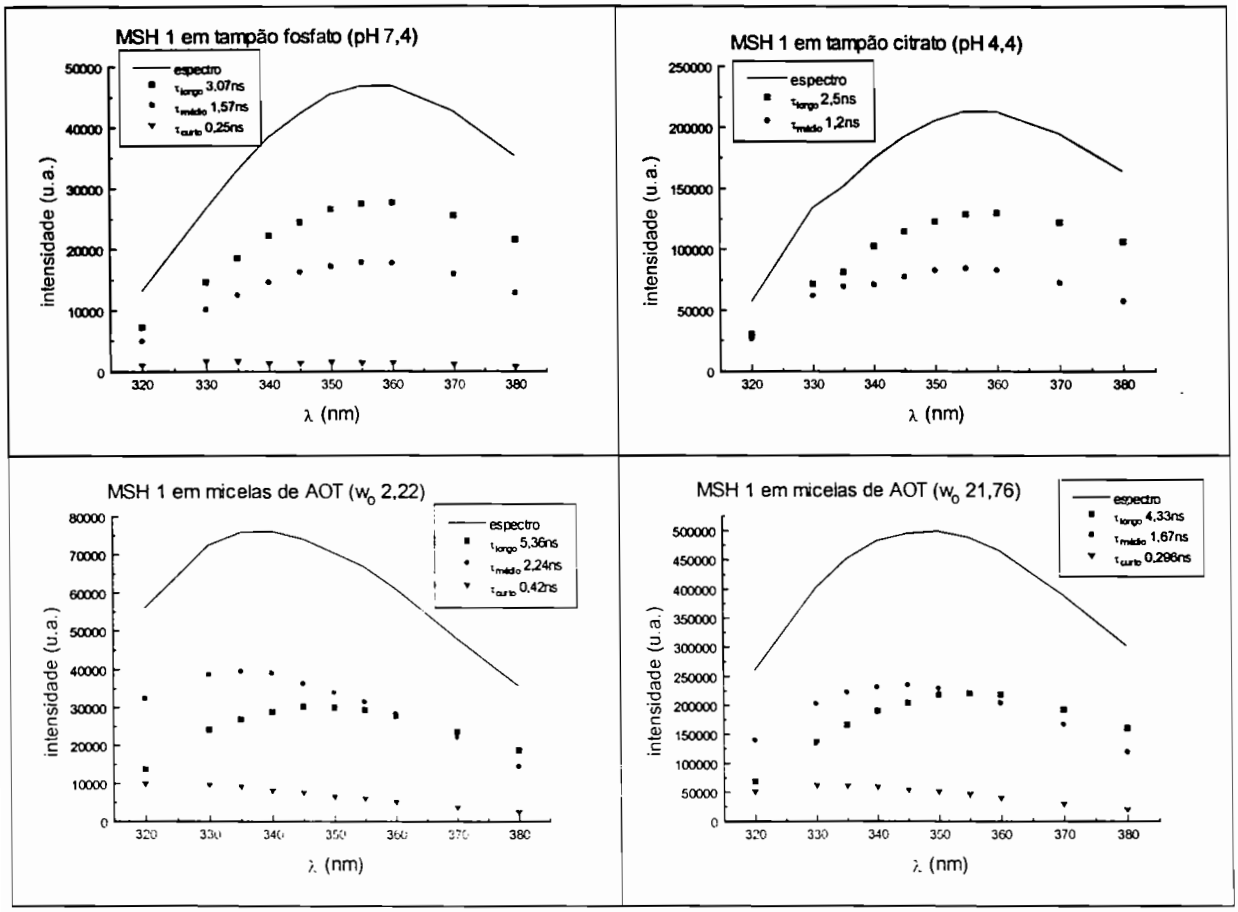


Figura V-16: intensidades de emissão fluorescente em unidades arbitrárias de cada uma dos três tempos de vida obtidos pelo ajuste do $\chi 2$ para as curvas de decaimento do resíduo Triptofano no MSH 1 em solução tampão fosfato (50mM, pH 7,4); solução tampão citrato (50mM, pH 4,4) e em micelas reversas de AOT (50mM; w_o=2,22 e 21,76) como função do comprimento de onda de emissão. (20° C).

No caso do MSH 1 observamos na Figura V-16 que é necessário o uso de três exponenciais para o ajuste do decaimento em solução neutra e apenas duas exponenciais para soluções com pH 4,4, em que deixa de existir a contribuição do tempo de vida curto. A incorporação em micelas reversas de AOT induz uma inversão nas contribuições dos tempos de vida longo e médio, ficando a população do tempo médio, com máximo em 335nm, maior do que a do tempo longo, que tem máximo em torno de 355nm. O MSH 1 parece ter sofrido uma mudança conformacional induzida pelas micelas reversas, sendo que parte da população continua expondo seu resíduo triptofano à água, mais precisamente o

resíduo com tempo de vida longo. Assim, o MSH 1 sente da mesma forma que o α-MSH a presença das micelas reversas. Note que o tempo de vida médio apresenta um deslocamento de seu máximo para 330nm quando inserido nas micelas reversas com w_o=2,22; sendo o tempo mais afetado pela presença da interface. Para w_o=21,76 o tempo de vida médio continua correspondendo a um meio não polar e o tempo de vida longo a um meio mais polar, semelhante ao obtido para o α-MSH.

MSH 1	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão citrato PH 4,0	Micela de AOT Wo 2,22	Micela de AOT Wo 21,76
τ_{longo} (ns)	3,07	2,5	5,36	4,33
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	360	350	355
população (%)	58,5	59,8	40,4	42,6
$\tau_{médio}$ (ns)	1,57	1,2	2,24	1,67
$\lambda_{máximo}$ (nm)	355	355	335	345
população (%)	37,9	40,2	49,5	46,4
τ_{curto} (ns)	0,25	-	0,42	0,296
$\lambda_{máximo}$ (nm)	350		320	330
população (%)	3,6		10,5	11,0

Tabela V-12: tempos de vida, em nanosegundos, comprimentos de onda de máxima emissão, em nanometros e população porcentual ajustados para a determinação das populações percentuais do resíduo triptofano do MSH 1 em soluções aquosas e em micelas reversas de AOT (50mM).

Da Tabela V-12 pode-se perceber que os tempos de vida em soluções aquosas dependem do valor do pH, principalmente no que concerne à quantidade de exponenciais necessárias para ajustar o decaimento fluorescente do resíduo triptofano, enquanto que os tempos de vida nas micelas reversas de AOT dependem da quantidade de água presente no sistema. Mas, acima de w_o=10, o sistema fica estável, independente da quantidade de água. O acréscimo de água nas micelas reversas acaba levando a uma diminuição dos tempos de vida e um deslocamento para o vermelho nas emissões correspondentes. Assim como no α-MSH, as conformações com o tempo de vida longo devem ter maior contato com as

moléculas de água do meio, enquanto que aquelas com tempos de vida médio e curto mantém-se na interface em meio de menor polaridade.

Resumindo os resultados obtidos com a técnica de fluorescência temos:

1) posição espectral

a) solução tampão fosfato pH 7,4. O máximo de emissão se dá no comprimento de onda característico de ambiente polar; sendo ligeiramente menos polar para o α-MSH e MSH-1,

b) em micelas reversas de AOT: ocorre um deslocamento para a região do azul com máximo de emissão em torno de 333nm para todas as amostras. Devido à pequena quantidade de água presente no sistema (que permanece como água estrutural em torno das cabeças polares do AOT), os resíduos triptofanos encontram-se em um ambiente não polar,

c) variação com o valor de w_o : aumentando a quantidade de água do sistema micelar o máximo de emissão fluorescente desloca-se para comprimentos de onda maiores. O espectro deslocado para o azul em relação à solução tampão fosfato indica um meio ambiente menos polar resultante da inserção do fluoróforo em uma posição intermediária entre as cadeias hidrocarbônicas e a cabeça polar do AOT,

2) Rendimento quântico

a) quando em solução tampão os peptídeos possuem valores similares ao Triptofano, exceto o tripeptídeo LTL que apresenta rendimento quântico bem menor,

b) em micelas reversas de AOT: o rendimento quântico é menor do que os observados em tampão. Com o aumento do valor de w_o observamos uma

diminuição do processo de desexcitação do Triptofano por emissão fluorescente devido à interação com as moléculas de água que são acrescentadas à solução. A partir de w_o=10 os valores de rendimento quântico ficam constantes e menores do que os valores para tampão fosfato., indicando que o ambiente no qual o resíduo triptofano está inserido não é o de água *bulk*

3) Grau de anisotropia

a) em solução tampão fosfato obtivemos para o Triptofano um valor bem pequeno como esperado para moléculas pequenas. Um valor um pouco maior para o LTL e em torno de 0,30 para os peptídeos. Os valores encontrados refletem os movimentos das macromoléculas e não o movimento do resíduo Triptofano dentro delas,

b) em micelas reversas de AOT com w_o=2 : o grau de anisotropia cresce até valores entre 0,12 e 0,13, mostrando que existe uma grande restrição ao movimento em micelas reversas pequenas,

c) variação com w_o: com o aumento da quantidade de água do sistema os valores dos graus de anisotropia diminuem continuamente até próximo a 0,1 para os peptídeos e fica igual a 0,060 para o Triptofano, indicando que as moléculas não estão livres na região da água *bulk* das micelas reversas, mas sim ligadas às micelas reversas,

4) Supressão da fluorescência

a) em tampão fosfato: os gráficos de Stern-Volmer apresentam desvios positivos em relação à linearidade, indicando que existe uma contribuição da supressão estática. A supressão é maior para o Triptofano, menor para o α-MSH e intermediária para o MSH-1 e para o LTL. O resíduo triptofano presente nos peptídeos está menos exposto ao solvente,

b) em micelas reversas com w_o=16: a supressão por acrilamida é menor do que em tampão fosfato, assim os fluoróforos estão menos expostos à mesma nesse último sistema,

c) as curvas de Stern-Volmer foram ajustadas usando a equação modificada de Stern-Volmer que considera a esfera de ação e a constante de supressão colisional (constante de Stern-Volmer). Utilizando os tempos de vida obtidos neste trabalho chegamos a valores para as constantes bimoleculares comparáveis com os da literatura,

d) dependência da supressão com o comprimento de onda: o componente mais polar dos fluoróforos sofre maior supressão do que o componente não polar, coerente com a existência de populações mais expostas e outras menos expostas ao meio aquoso,

5) Tempo de vida de fluorescência

a) solução tampão fosfato: os decaimentos foram ajustados pela combinação de três exponenciais. O triptofano apresentou o maior tempo de vida médio (determinado pela média ponderada) enquanto que os peptídeos apresentaram processos adicionais de decaimento,

b) em micelas reversas de AOT com w_o 2: os tempos de vida médios aumentam com exceção do Triptofano. Com o aumento da quantidade de água observamos uma saturação dos valores do tempo para w_o próximo a 10, ficando menores do que os tempos obtidos para a menor micela usada (w_o 2) mas diferentes dos valores obtidos em solução tampão fosfato.

6) EDA

Da comparação com o obtido para solução tampão e micelas reversas com w_o=2 e 20 observamos mudanças tanto nos tempos de vida quanto nas contribuições relativas das populações de cada tempo.

O tempo de vida longo apresentou, para todas as amostras, características de ambiente polar. Mas a contribuição relativa para o tempo de vida longo aumenta para o triptofano e diminui para as outras amostras. O tempo de vida intermediário possui características de ambiente não polar. É o que apresenta a maior contribuição nas micelas reversas de AOT. O tempo de vida curto é mais importante para pequenos comprimentos de onda; sofre poucas variações e é o que apresenta a menor contribuição para a fluorescência total.

As curvas de decaimento associado em micelas reversas com w_o=20 são diferentes das obtidas em solução tampão, indicando que o resíduo triptofano sente vários ambientes diferentes. As curvas para o α-MSH são similares às do MSH-1, mostrando que estes peptídeos localizam-se em posições similares nas micelas reversas. Quando a quantidade de água das micelas reversas é grande (w_o>10), estabilizam-se três arranjos conformacionais com graus diferentes de exposição às moléculas de água; enquanto as conformações mais expostas apresentam tempos de vida da ordem de 4,0ns, aquelas situadas em ambientes menos polar têm tempos de vida entre 1,5ns e 0,3ns. O LTL apresenta comportamento parecido com os dos peptídeos para w_o=2 mas, para w_o=20 está mais próximo ao *pool* aquoso, sem deixar de interagir com a interface. Comparando as contribuições porcentuais de cada tempo de vida para o tempo médio do decaimento do Trp em micelas reversas com w_o=21,76 com as porcentagens para solução tampão, observamos que: a contribuição relativa para o tempo de vida intermediário diminui acentuadamente além de ser deslocado para a região do azul; a contribuição do tempo de vida longo aumenta e é ligeiramente deslocado para o azul; a contribuição do tempo de vida curto também aumenta. Além dessas mudanças nas populações, os tempos de vida são acentuadamente menores do que os tempos obtidos para a solução tampão. Para w_o=20 as contribuições dos tempos de vida longo e intermediário do Triptofano são parecidas. Mesmo se o Triptofano localiza-se em um ambiente polar nas grandes micelas reversas, sua curva de decaimento associado é ainda bem diferente do obtido para a solução tampão; indicando que a água ao redor do Triptofano não é água *bulk*.

CONCLUSÕES

Através da técnica de ressonância paramagnética eletrônica pudemos estudar o sistema de micelas reversas e como a introdução de peptídeos e aminoácido altera esse sistema. Através das medidas de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo pudemos observar as modificações sofridas pelos peptídeos e aminoácido ao serem introduzidos no sistema de micelas reversas. Deste modo pudemos observar os dois componentes do sistema estudado: as micelas reversas e os peptídeos.

1) Micelas Reversas

Observamos pela técnica de EPR dois comportamentos distintos no sistema dependendo da quantidade de água presente no mesmo, ou seja, do valor de w_o, sendo que a transição entre estes se dá por volta de w_o=10, estando de acordo com o observado na literatura.

Para w_o<10 temos pouca água no sistema o que faz com que as cabeças polares negativas do AOT e os contraíons Na^+ estejam fortemente ligados. Desta forma, essa região encontra-se bastante rígida, fortemente ligada, organizada e compacta impedindo até que as moléculas de água penetrem na interface. Ainda, como neste caso, as micelas reversas são muito pequenas, seus raios de curvatura são muito grandes e, assim, a região das cadeias hidrocarbônicas do AOT ficam bastante livres para a movimentação apresentando pouca ordem.

Conforme aumentamos a quantidade de água do sistema a região das cabeças de AOT torna-se menos compacta, tornando-se mais flexível. Desta forma a interface de AOT fica mais "permeável" às moléculas de água que podem penetrar na região da interface. Com a migração das águas para a região das cadeias hidrocarbônicas do AOT e/ou com o aumento

da população de águas isoladas, a sonda 5-SASL que fica na região do quinto carbono das caudas hidrocarbônicas do AOT experimenta aumento da polaridade. Com o aumento de w_o as micelas reversas ficam maiores, fazendo com que seus raios de curvatura diminuam. Esta diminuição dos raios de curvatura provoca um aumento da rigidez e da ordem da região das cadeias hidrocarbônicas, fazendo com que essa região fique mais compacta – o que é sentido pela sonda 5-SASL pelo aumento do grau de empacotamento, aumento da ordem e diminuição da movimentação da sonda (aumento da anisotropia).

Observamos também que com o aumento da quantidade de água presente nas micelas reversas o sistema começa a sofrer separação de fase mas, tal fenômeno não foi estudado com maior aprofundamento pois estávamos mais interessados na interação dos peptídeos melanotrópicos com as micelas reversas do que com as mesmas propriamente ditas.

2) Os peptídeos e as micelas reversas

Dos resultados obtidos com ressonância paramagnética eletrônica e com fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo observamos que o triptofano, o tripeptídeo lisil-triptofil-lisina e os hormônios melanotrópicos α-MSH e o análogo MSH 1 interagem com as micelas reversas de AOT.

Por EPR observamos de uma forma geral que os peptídeos e aminoácido parecem diminuir os efeitos provocados nas micelas reversas pelo aumento da quantidade de água do sistema. Isso porque a presença dessas macromoléculas provoca uma redistribuição da água nas micelas reversas, fazendo com que as micelas hospedeiras (que possuem peptídeos ou aminoácido) fiquem ainda maiores do que antes da adição das moléculas hóspedes enquanto que as micelas vazias fiquem bem menores do que antes. Assim, neste caso, aumenta a distribuição de tamanho de micelas reversas no sistema que passa a ser compostos por micelas muito grandes e muito pequenas com propriedades físico-químicas diversas. Como nesta técnica observamos no espectro a média dos estados microscópicos

não podemos afirmar ao certo se os peptídeos e aminoácido diminuem o efeito provocado pela água ou se isso é um resultado médio de todas as micelas reversas presentes na amostra. Da mesma forma a observação de que os peptídeos e o aminoácido não alteram a polaridade experimentada pela sonda pode ser apenas um resultado médio e não o que realmente acontece nas micelas reversas hospedeiras.

Observamos que a presença dos peptídeos e aminoácidos pode induzir a formação de supra-agregados de micelas reversas ou clusters, o que é experimentado pela sonda de EPR como um aumento de sua anisotropia (pela interpenetração das cadeias hidrocarbônicas dos AOTs pertencentes à micelas reversas próximas), aumento da polaridade (pela troca rápida entre as moléculas de água das micelas reversas vizinhas) e aumento do empacotamento. Vimos que o MSH 1 é o que provoca o maior aumento do empacotamento experimentado pela sonda, sendo seguido pelo LTL, α-MSH e Trp. Tal resultado sugere que o MSH 1, o LTL e o α-MSH ficam inseridos na região da interface enquanto o Trp fica mais exposto. Mas, para realmente termos uma idéia da localização dos mesmos no sistema de micelas reversas precisamos nos basear nos resultados de fluorescência.

Os resultados de fluorescência podem ser assim resumidos:

a) comprimento de onda da intensidade máxima de emissão: todos os peptídeos e aminoácido experimentam um ambiente menos polar do que a água, independentemente da quantidade de água presente no sistema, indicando que nenhuma das moléculas introduzidas localiza-se na água *bulk*. Mais ainda, os resultados mostram que o Trp é o que tende a localizar-se na região mais polar, ou mais exposto à água enquanto que o α-MSH é o que insere-se mais profundamente na região das cadeias hidrocarbônicas do AOT,

b) os graus de anisotropia obtidos mostram que o todos os peptídeos e o Trp experimentam uma maior restrição ao movimento quando nas micelas reversas em comparação com a água, sendo que o Trp é o mais livre enquanto que o α-MSH é o mais "preso" nas micelas reversas, indicando novamente que o Trp é o mais exposto

a água e o α-MSH é o que insere-se mais profundamente. O LTL e o MSH 1 estão em posições intermediárias com comportamentos análogos,

c) todos eles (Trp, LTL, α-MSH e MSH1) apresentaram diminuição do rendimento quântico quando em micelas reversas indicando a presença de outros modos de desexcitação que não só a fluorescência. O α-MSH experimentou uma redução de 57%, o MSH1 de 50% enquanto que o LTL teve 46% de redução e o Trp 23%, indicando que o α-MSH é o que experimenta um ambiente mais diferente da água,

d) os dados de supressão mostram que o Trp é o que sofre maior supressão, sendo seguido pelo MSH 1 e LTL e pelo α-MSH. Sabendo que a Acrilamida fica do meio aquoso das micelas reversas temos novamente que o Trp é o mais exposto à água enquanto que o α-MSH é o que insere-se mais profundamente. Novamente temos que nas micelas reversas o grau de supressão é menor do que em água, mesmo para grandes micelas reversas, indicando que todos os fluoróforos estão menos expostos do que quando em água,

e) os tempos de vida dos fluoróforos indicam a localização dos mesmos em diferentes regiões do sistema de micelas reversas com diferentes graus de exposição à água presente no *pool* das mesmas. Cada uma dessas populações foi monitorada em relação à quantidade de água presente no sistema, dada pelo valor de w_0, nos espectros de decaimento associado. Quando em micelas reversas pequenas ($w_0 \approx 2$) os tempos de vida longos para todos os fluoróforos apresentaram características de ambiente polar enquanto que os tempos de vida intermediários são característicos de ambiente não polar; este tempo de vida intermediário é o que contribui mais no sistema de micelas reversas. Quando em grandes micelas reversas ($w_0 \approx 20$) três arranjos conformacionais com diferentes graus de hidratação são estabilizados. O α-MSH e o MSH 1 apresentam curvas similares estando inseridos mais profundamente na região das cadeias hidrocarbônicas do AOT, o LTL está mais próximo ao *pool* sem deixar de interagir com a interface e o Trp tende a localizar-se no *pool* mas na região das águas estruturadas e não na água *bulk*.

Desses resultados de fluorescência de estado estacionário, resolvida no tempo e da supressão da fluorescência pudemos montar um esquema indicando a localização dos peptídeos e aminoácido nas micelas reversas de AOT. Os resultados dos comprimentos de onda de máxima emissão revelam que todos os fluoróforos estão inseridos na região hidrofóbica, sendo o Trp e o LTL mais expostos à água (lembrando, dos dados de EPR, que a água penetra na região hidrofóbica). No caso do Trp, ele poderia através da flutuações em sua posição pois é mais livre do que os demais, alcançar a interface das micelas reversas onde sofreria maior supressão pela Acrilamida. Temos que de uma maneira geral o Trp é o mais exposto à água presente no interior das mesmas tendendo a localizar-se na região das águas estruturadas, independentemente de possuirmos água *bulk* ou não no sistema. O LTL, o MSH 1 e o α-MSH ficam ancorados na região das cadeias hidrocarbônicas de AOT, sendo que o α-MSH é o que penetra mais profundamente nessa região. Essas tendências de localizações são dependentes tanto do tamanho quanto da hidrofobicidade dos peptídeos e aminoácido; por exemplo: observando os perfis de hidrofobicidade do MSH 1 e do α-MSH temos que o MSH 1 é ligeiramente mais hidrofílico do que o α-MSH e, desta forma, tende a ficar inserido de forma menos aprofundada na interface das micelas reversas. Assim, temos;

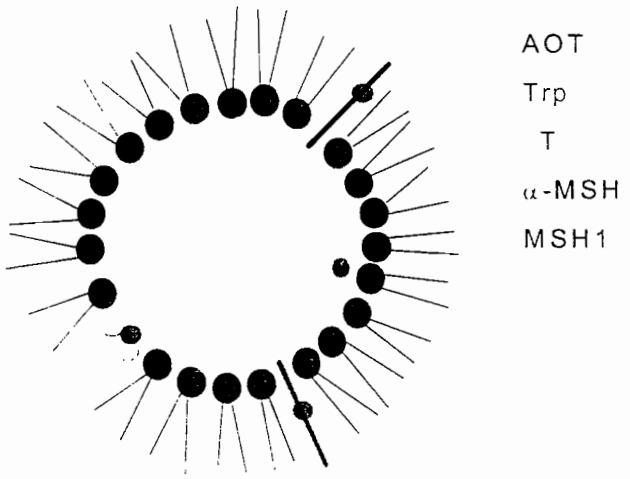


Figura VI-1: modelo representativo das localizações do tripotofano, lisil-triptofil-lisina e dos hormônios melanotrópicos α-MSH e MSH 1 no sistema de micelas reversas de AOT 50mM em isooctano. A figura não está em escala.

3) Prospostas de trabalhos futuros

Como o sistema de micelas reversas é um bom modelo para a água presente em sistemas biológicos, para receptores de membranas e para micro-ambientes onde acontece a maior parte das reações biológicas (como as reações enzimáticas), ele precisa ser melhor estudado.

Uma sugestão seria a determinação do pH dentro do pool aquoso e a sua variação com a distância da interface de AOT, ou seja, o gradiente de pH no interior das micelas reversas. Tal estudo pode ser realizado através de sondas hidrofílicas de fluorescência sensíveis ao pH e também por sondas paramagnéticas hidrofílicas através da determinação da polaridade pelo espectro de EPR.

Também seria interessante estudar o processo de micelização e o de separação de fase, este último passando anteriormente pelo estado de formação de clusters ou macro-agregados micelares. Tais estudos poderiam ser realizados através da técnica de EPR com a utilização de sondas que intercalam-se na interface de AOT e, também, pelas sondas que ficam na região das cadeias hidrocarbônicas. Uma sonda hidrofílica ajudaria a estudar o pool aquoso das micelas reversas e monitorar seu raio hidrodinâmico. E, assim, este sistema modelo estaria melhor caracterizado.

Segundo sugestão do Prof. Dr. Antonio Alonso, os peptídeos poderiam ser marcados com sondas de EPR específicas para o terminal amino ou metionina. Também seria interessante investigar a supressão da fluorescência por marcadores da classe doxil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, J. Colloid Sci., 14, 101, 1959
Apud WONG, M. in J. Am. Chem. Soc., 98, 9, **1976**

ALMEIDA, F.C.L.; Chaimovich, H.; Schreier, S.
ELECTRON SPIN RESONANCE STUDY OF THE EFFECT OF UREA ON THE PROPERTIES OF AOT REVERSE MICELLES IN ISOOCTANE.
Langmuir, 10, 1786-1792, **1994**

AL-OBEIDI, F.; HADLEY, M.E.; MONTGOMERY, P.; HRUBY, V.J.
DESIGN OF NEW CLASS OF SUPERPOTENT CYCLIC α-MELANOTROPINS BASED ON QUENCHED DYNAMIC SIMULATIONS.
J.Amer.Chem.Soc., 111, 3413-3416, **1989**.

AL-OBEIDI, F.; Castrucci, A.M.D.; Hadley, M.E.
POTENT AND PROLONGED ACTING CYCLIC LACTAM ANALOGUES OF α-MELANOTROPIN: DESIGN BASED ON MOLECULAR DYNAMICS
J. Med. Chem.; 32, 12, 2555-2561, **1989**

AL-OBEIDI, F.; Hruby, V.J.; Castrucci, A.M.D.
DESIGN OF POTENT LINEAR α-MELANOTROPIN 4-10 ANALOGUES MODIFIED IN POSITIONS 5 AND 10
J. Med. Chem.; 32, 1, 174-179, **1989**

ATHERTON, N.M.
PRINCIPLES OF ELECTRON SPIN RESONANCE
Ellis Horwood Ptr Prentice Hall, Great Britain, **1993**

BAGLIONI, P.; Nakamura, H.e Kevan, L.
ELECTRON SPIN ECHO MODULATION STUDY OF AOT REVERSE MICELLES.
J. Phys.Chem., 95, 9, 3856-3859, **1991**

BARBARIC, S. e Luisi, P.L.
MICELLAR SOLUBILIZATION OF BIOPOLYMERS IN ORGANIC SOLVENTS. 5. ACTIVITY AND CONFORMATION OF α-CHYMOTRYPSIN IN ISOOCTANE-AOT REVERSE MICELLES.
J. Amer. Chem. Soc., 103, 4239-4244, **1981**

BARZYKIN ,A.V.; Tachiya, M.
REACTION KINETICS IN MICRODISPERSE SYSTEMS
Heterog. Chem. Rev.,3, 2, 105-167, **1996**

BEECHEM, J.M. e Barnd, L.
TIME-RESOLVED FLUORESCENCE OF PROTEINS.
Ann. Rev. Biochem, 54, 43-71, **1985**

BELLETÊTE ,M.; Lachapelle, M.; Durocher, G.
DYNAMICS OF INTERFACIAL INTERACTIONS BETWEEN THE MOLECULAR PROBE 2-(P-(DIMETHYLAMINO)PHENIL)-3,3-DIMETHYL-3h-INDOLE AND THE AEROSOL OT INVERTED MICELLES
J. Phys. Chem., 94, 7642, **1990**

BHATTACHARYYA, K. e Basak, S.
FLUORESCENCE STUDY OF MELANOCYTE STIMULATING HORMONES IN AOT REVERSE MICELLES.
Biophys. Chem., 47, 21-31, **1993**

BHATTACHARYYA, K. e Basak, S.
SOMATOSTATIN IN A WATER-RESTRICTED ENVIRONMENT: FLUORESCENCE AND CIRCULAR DICHROISM STUDY IN AOT REVERSE MICELLES.
Photochem. and Photobiol., 62, 1, 17-23, **1995**

BIAGGI, M.H., SCHREIER, S., CASTRUCCI, A.M., LAMY-FREUND, M.T.
INTERACTION OF MELANOTROPIC PEPTIDES WITH LIPID MEMBRANES.
Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 680, 459-461, **1993.**

BIAGGI, M.H., PINHEIRO, T.J., WATTS, A., LAMY-FREUND, M.T.
SPIN KABEL AND ^{2}H-NMR STUDIES ON THE INTERACTION OF MELANOTROPIC PEPTIDES WITH LIPID BILAYERS.
Eur. Biophys.J., 24, 252-259, **1996**

BIAGGI, M.H., RISKE, K.A., LAMY-FREUND, M.T.
MELANOTROPIC PEPTIDES-LIPIDS BILAYERS INTERACTION. COMPARISON OF THE HORMONE α-MSH TO A BIOLOGICALLY MORE POTENT ANALOG.
Biophys.Chem., 67, 139-149, **1997**

BLITZ, J.P., FULTON, J.L., SMITH, R.D.
DYNAMIC LIGHT-SCATTERING MEASUREMENTS OF REVERSE MICELLE PHASES IN LIQUID AND SUPERCRITICAL ETHANE
J. Phys. Chem., 92, 10, 2707-2710, **1988**

CANTOR, C.R. e Schimmel, P.R.
BIOPHYSICAL CHEMISTRY, PARTES I, II E III
W.H. Freeman and Company, São Francisco, **1980**

CASTRUCCI, A.M., HADLEY, M.E., SAWYER, T.K., WILKES, B.C., AL-OBEIDI, F., ATAPLES, D.J., DE VAUX, A.E., DYM, O., HINTZ, M.F., RIEHM, J.P.
α - MELANOTROPIN: THE MINIMAL ACTIVE SEQUENCE IN LIZARD SKIN BIOASSAY.
Gen. Comp. Endocrinol., 73, 157-163, **1989.**

CASTRUCCI, A.M.D.; Lebl, M.; Hruby, V.J.
MELANIN CONCENTRATING HORMONE. III. MELANIN CONCENTRATING HORMONE (MCH): THE MESSAGE SEQUENCE.
Life Sci., 45, 13, 1141-1148, **1989**

CASTRUCCI, A.M.D.; Hadley, M.E.; Lebl, M.
MELANOCYTE STIMULATING HORMONE AND MELANIN CONCENTRATION HORMONE MAY BE STRUCTURALLY AND EVOLUTIONARILY RELATED.
Regul. Peptides, 24, 1, 27-35, **1989**

CASTRUCCI, A.M.D.; Hadley, M.E.; Wilkes, B.C.
MELANOTROPIN STRUCTURE-ACTIVITY STUDIES ON MELANOCYTES OF THE TELEOST FISH, SYNBRANCHUS MARMORATUS.
Gen. Comp. Endocr., 74, 2, 209-214, **1989**

CAZIANIS, C.T; Xenakis, A. and Evangelopoulos, A.E
SPIN-LABEL STUDIES OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE HOSTED IN MICROEMULSION DROPLETS.
Biochem. and Biophys. Res. Commun., 148, 3, 1151-1157, **1987**

CHAPMAN, D., GOMEZ-FERNANDEZ, C.; GOÑI, F.M.
INTRINSIC PROTEIN-LIPID INTERACTIONS.
FEBS Lett., 98, 211-223, **1979**

CHHAJLANI, V.
MOLECULAR-CLONING AND EXPRESSION OF THE HUMAN MELANOCYTE STIMULATINGHORMONERECEPTORCDNA
FEBS Lett., 309, 3, 417-420, **1992**

CHO, C. H.; Chung, M.; Lee, J.; Nguyen, T.; Singh. S.; Vedamuthu, M.; Yao, S.H.; Zhu, J.B.; Robinson, G.W.
TIME- AND SPACE RESOLVED STUDIES OF THE PHYSICS AND CHEMISTRY OF LIQUID WATER NEAR A BIOLOGICALLY RELEVANT INTERFACE
J. Phys. Chem., 99, 7806, **1995**

CORREA, N.M.; Biasutti. M.A. ; Silber, J.J.
MICROPOLARITY OF REVERSE MICELLES OF AEROSOL - OT IN n-HEXANE
J.Colloid Interface Sci.; 172, 71-76, **1996**

CORREA, N.M.; Biasutti, M. e Silber, J.
MICROPOLARITY OF REVERSED MICELLES: COMPARISON BETWEEN ANIONIC, CATIONIC, AND NONIONIC REVERSED MICELLES.
J. Colloid Interface Sci., 184, 570-578, **1996**

DAVIS, D.M.; McLoskey, D.; Birch, D.J.S.; Gellert, P.R.; Kittlety, R.S.; Swart, R.M.
THE FLUORESCENCE AND CIRCULAR DICHROISM OF PROTEINS IN REVERSE MICELLES: APPLICATION TO THE PHOTOPHYSICS OF SERUM ALBUMIN AND N-ACETYL-L-TRYPTOPHANAMIDE.
Biophys. Chem. 60, 63-77, **1996**

DE, T. e Maitra, A.;
SOLUTION BEHAVIOUR OF AEROSOL OT IN NON-POLAR SOLVENTS
Adv. Colloid. Interface Sci.; 59, 95, **1995**

EFTINK, M. R. e GHIRON, C. A.
EXPOSURE OF TRYPTOPHANYL RESIDUES IN PROTEINS - QUANTITATIVE-DETERMINATION BY FLUORESCENCE QUENCHING STUDIES
Biochem., 15, 3, 672-680, **1976**

EICKE, H.
SURFACTANTS IN NONPOLAR SOLVENTS. AGGREGATION AND MICELLIZATION.
Top. Curr. Chem., 87, 85-145, **1980**

EKWALL, P., MANDELL, L., FONTELL, K.L.
THE CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE-HEXANOL-WATER SYSTEM
J. Colloid Interface Sci., 29, 639-646, **1969**

FENDLER , J.H.
MICRO-EMULSIONS, MICELLES, AND VESICLES AS MEDIA FOR MEMBRANE MIMETICPHOTOCHEMISTRY
J. Phys. Chem., 84, 12, 1485-1491, **1980**

FENDLER, J.H.
MEMBRANE MIMETIC CHEMISTRY
John Wiley & Sons, Inc., New York. **1982**

FLETCHER, P.D.I.
SELF-ASSEMBLY OF MICELLES AND MICROEMULSIONS
Curr. Opin. Colloid, 1, 1, 101-106, **1996**

FRANK, J.M.: J. Phys. Chem., 77, 239, 1973
Apud WONG, M. in J. Am. Chem. Soc., 98, 9, **1976**

FRANK, J.M; J. Colloid Interface Sci., 23, 243, 1967
Apud WONG, M. in J. Am. Chem. Soc., 98, 9, **1976**

FRANK, J.M. e Vavilov S.I.
Z. Phys., 69, 100-110, **1931**
In Lakowicz J.R. - Principles of Fluorescence Spectroscopy, 1983

FULLER, B.B. e Viskochil, D.H.;
THE ROLE OF RNA AND PROTEIN SYNTHESIS IN MEDIATING THE ACTION OF MSH ON MOUSE MELANOMA CELLS.
Life Sci., 24, 2405-2415, **1979**

GAFFNEY, B.J., McCONNELL, H.M.
THE PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTRA OF SPIN LABELS IN PHOSPHOLIPID MEMBRANES
J. Mag. Res., 9, 474-485, **1974**

GAFFNEY, B.J.
PRACTICAL CONSIDERATIONS FOR THE CALCULATION OF ORDER PARAMETERS FOR FATTY ACID OR PHOSPHOLIPID SPIN LABELS IN MEMBRANES
In Berliner, L.J., Spin Labelling Theory and Applications. I,
New York, Academic Press, 567-571, **1976**

GRANDI, C.; Smith, R.E. e Luisi, P.L.
MICELLAR SOLUBILIZATION OF BIOPOLYMERS IN ORGANIC SOLVENTS.
J.Biol.Chem., 256, 2, 837-843, **1981**

GRIFFITH, O.H.; JOST, P.C.
LIPID SPIN LABELS IN BIOLOGICAL MEMBRANES
In Berliner, L.J., Spin Labeling Theory and Applications, I,
New York, Academic Press, 453-523, **1976**

GUHARAY, J. e Sengupta, P.K.
CHARACTERIZATION OF THE FLUORESCENCE EMISSION PROPERTIES OF 7-AZATRYPTOPHAN IN REVERSE MICELLAR ENVIRONMENTS.
Biochem. and Biophys. Res. Commun., 219, 388-392, **1996**

HADLEY, M.E. e Marwan, M.M.;
MECHANISMS CONTROLLING MELANIN PIGMENTATION OF THE SKIN.;
In Fitzpatrick, T.B.; Forlot, P.; Pathak, M.A. e Uback, F.; ed. Psoralens: Past, Present and Future of Photoprotection and other Biological Activities.; John Libbey, 35, **1989**

HADLEY, M.E.; Hruby, V.J.; Chaturvedi, D.N.
ALPHA-MELANOTROPIN ANALOGS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS ;
In Neural and Endocrine Peptides and Receptors;
T.W. Moody, ed. Plenum Press, New York, **1986**

HASEGAWA, M.; Sugimura, T.; Kuraishi, K.; Shindo, Y. e Kitahara, A.
MICROVISCOSITY IN AOT REVERSED MICELLAR CORE DETERMINED WITH A VISCOSITY-SENSITIVE FLUORESCENCE PROBE.
Chem.Letters, 1373-1367, **1992**

HIGASHI, in J. Pharm. Sci., 455, 1962
Apud WONG, M. J. Am. Chem. Soc., 98, 9, **1976**

HRUBY, V.J.; Wilkes, B.C.; Cody, W.L.
MELANOTROPINS: STRUCTURAL, CONFORMATIONAL AND BIOLOGICAL CONSIDERATIONS IN THE DEVELOPMENT OF SUPERPOTENT AND SUPERPROLONGED ANALOGS.
In Hearn, M.T.W., Pept. Protein Rev., 3, 1, Marcel Dekker, Inc., New York, **1984**

HRUBY, V.J.
CONFORMATIONAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS OF α-MSH FRAGMENT ANALOGUES WITH STERICALLY CONSTRAINED AMINO ACID RESIDUES.
Coll. Czechoslovak Chem.Commun., 53, 2549-2573, **1988**.

HRUBY, V.J.
CONFORMATIONAL AND TOPOGRAPHICAL CONSIDERATIONS IN THE DESIGN OF BIOLOGICALLY-ACTIVEPEPTIDES
Biopol., 33, 7, 1073-1082, **1993**

HRUBY, V.J., Sharma, S.D.; Toth, K.
DESIGN, SYNTHESIS, AND CONFORMATION OF SUPERPOTENT AND PROLONGED ACTING MELANOTROPINS
Ann. N.Y. Acad. Sci., 680, 51-63, **1993**

HRUBY, V.J.; Hallenga, K.; Hill, P.
EXAMINING THE CONFORMATIONAL DIFFERENCES OF PEPTIDES IN SOLUTION AND IN PEPTIDE PROTEIN COMPLEXES
J. Cell Biochem., 209-209, Suppl. 17C, **1993**

HRUBY, V.J.; Mosberg, H.I.; Sawyer, T.K.
CONFORMATIONAL AND DYNAMIC CONSIDERATIONS IN THE DESIGN OF PEPTIDE-HORMONE ANALOGS
Biopol., 22, 1, 517-530, **1983**

HUBBEL, W.L.; McConnell, H.M.
MOLECULAR MOTION IN SPIN-LABELED PHOSPHOLIPIDS AND MEMBRANES
J. Amer. Chem.Soc., 93, 314-26, **1971**

HUANG, J.S.; Safran, S.A.; Kim, M.W.
ATTRACTIVE INTERACTIONS IN MICELLES AND MICROEMULSIONS
Phys. Rev. Lett., 53, 6, 592-595, **1984**

HURUGUEN, J.P e Pileni, M.P.
DRASTIC CHANGE OF REVERSE MICELLAR STRUCTURE BY PROTEIN OR ENZIME ADDITION.
Eur. Biophys. J., 19, 103-107, **1991**

IKUSHIMA, Y.; Saito, N. e Arai, M.
THE NATURE AND STRUCTURE OF WATER/AOT/ETHANE (W/O) MICROEMULSION UNDER SUPERCRITICAL CONDITIONS STUDIED BY HIGH-PRESSURE FT-IR SPECTROSCOPY.
J.Colloid Interface Sci., 186, 254-263, **1997**

IMRE, V.E. e Luisi, P.L.
SOLUBILIZATION AND CONDENSED PACKAGING OF NUCLEIC ACIDS IN REVERSED MICELLES.
Biochem. and Biophys. Res. Commun., 107, 2, 538-545, **1982**

ISHIKAWA, T.; Kodama, K.; Takayama, S.
AN AUTORADIOGRAPHIC METHOD FOR MEASURING DNA-REPAIR SYNTHESIS IN THE SKIN INVIVO AND ITS APPLICATION IN STUDIES ON THE PROTECTIVE ROLE OF EPIDERMAL MELANIN GRANULES AGAINST UV DAMAGE
Yale J. Biol. Med., 57, 3, 372-372, **1984**

ISRAELACHVILI, J.J.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W.
THEORY OF SELF-ASSEMBLY OF HIDROCARBON AMPHIPHILES INTO MICELLES AND BILAYERS.
J. Chem. Soc., 72, **1976**.

ITO, A.S.; Castrucci, A.M.; Hruby,V.J.; Hadley, M.E.; Krajcarski, D.T., Szabo, A.G.
STRUCTURE-ACTIVITY CORRELATION OF MELANOTROPIN PEPTIDES IN MODEL LIPIDS BY TRIPTOPHAN FLUORESCENCE STUDIES.
Biochem., 32, 12264-12272, **1993**.

ITO ,A.S. e Szabo, A.G.;
STRUCTURES OF MELANOTROPIN PEPTIDES IN MODEL LIPIDS BY TRYPTOPHAN FLUORESCENCE STUDIES
Biophys. J., 64, 2, **1993**

JEGOU, S.; Blasquez, C.; Delbende, C.
REGULATION OF ALPHA-MELANOCYTE-STIMULATING HORMONE-RELEASE FROMHYPOTHALAMICNEURONS
Ann. N.Y. Acad. Sci., 680, 260-278, **1993**

JIMENEZ,R.; Fleming, G.R.; Kumar, P.V.; Maroncelli,M.
FENTOSECOND SOLVATION DYNAMICS OF WATER
Nature, 369,471, **1994**

KALYANASUNDARAM, K.
Photochemistry in Microheterogeneous Systems; Academic Press; Orlando, FL, **1987**

KOMMAREDDI, N.S.; John, V.T.; Waguespack, Y.Y. e McPherson, G.L.
TEMPERATURE AND GAS PRESSURE INDUCED MICROSTRUCTURAL CHANGES IN AOT WATER-IN-OIL MICROEMULSIONS: CHARACTERIZATION THROUGH ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY.
J. Phys. Chem., 97, 21, 5752-5761, **1993**

KOTLARCHYK, M.; Huang, J.S.; Chen, S.H.
STRUCTURE OF AOT-REVERSED MICELLES DETERMINED BY SMALL-ANGLE NEUTRON-SCATTERING
J. Phys. Chem., 89, 20, 4382-4386, **1985**

KYTE, J. e Doolittle, R.F.
A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPATHIC CHARACTER OF A PROTEIN
J. Mol. Biol., 157, 1, 105-132, **1982**

LANG, J.; Jada, A. e Malliaris, A.
STRUCTURE AND DYNAMICS OF WATER-IN-OIL DROPLETS STABILIZED BY SODIUM BIS(2-ETHYLHEXYL) SULFOSUCCINATE.
J.Phys. Chem., 92, 7, 1946-1953, **1988**

LAKOWICZ, J.R.
PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY
Plenum Press - NY and London, **1983**

LENZ, V.J.; Federwisch, M.; Gattner, HG.; Brandenburg, D.; Höcker, H.; Hassiepen, U. e Wollmer, A.
STRUCTURE AND ROTACIONAL DYNAMICS OF FLUORESCENTLY LABELED INSULIN IN AQUEOUS SOLUTION AND AT THE AMPHIPHILE-WATER INTERFACE OF REVERSED MICELLES.
Biochem., 34, 6130-6141, **1995**

LISSI, E.A.; Encinas, M.V.; Bertolotti, S.G.; Cosa, J.J. e Previtali,C.M.
FLUORESCENCE QUENCHING OF INDOLIC COMPOUNDS IN REVERSE MICELLES OF AOT
Photochem. Photobiol., 51, 1, 53-58, **1990**

LUISI, P.L. e MAGID, L.J.
SOLUBILIZATION OF ENZYMES AND NUCLEIC-ACIDS IN HYDROCARBON MICELLAR SOLUTIONS
Crit. Rev. Biochem. Mol., 20, 4, 409-474, **1986**

LUISI, P.L. e Straub, B.E.
REVERSE MICELLES. BIOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL RELEVANCE OF AMPHIPHILIC STRUCTURES IN APOLAR MEDIA;
Ed. Plenum Press; New York, **1987**.

LUISI, P.L.; Giomini, M.; Pileni, M.P. e Robinson, B.H.
REVERSE MICELLES AS HOSTS FOR PROTEINS AND SMALL MOLECULES.
Biochim. Biophys. Acta, 947, 209-246, **1988**

MACEDO, Z.S.; Furquim, T.A.C. e Ito, A.S.
ESTIMATION OF AVERAGE DEPTH OF PENETRATION OF MELANOTROPINS IN DMPG VESICLES.
Biophys. Chem., 59, 193-202, **1996.**

MARSH, D.
EXPERIMENTAL METHODS IN SPIN-LABEL SPECTRAL ANALYSIS.
In Berliner, L.J., Spin Labeling Theory and Applications, 8,
New York, Academic Press, 255-303, **1989**

MARTINEK, K.; Levashov, A.V. e Klyachko, N.
MICELLAR ENZYMOLOGY
Eur. J. Biochem., 155, 3, 453-468, **1986**

MARZOLA, P.; Forte, C.; Pinzino, C. e Veracini, C.A.
ACTIVITY AND CONFORMATIONAL CHANGES OF α-CHYMOTRYPSIN IN REVERSE MICELLES STUDIED BY SPIN LABELING.
FEBS Letters, 289, 1, 29-32, **1991**

MATHEWS, in J. Colloid Sci., 8, 86, 1953
Apud WONG, M. in J. Am. Chem. Soc., 98, 9, **1976**

MATVEEVA, E.G.; Melik-Nubarov, N.S.; Miethe, P. e Levashov, A.V.
ANTIGEN-ANTIBODY INTERACTIONS IN THE REVERSE MICELLAR SYSTEM: QUENCHING OF THE FLUORESCENCE OF FLUORESCEIN-LABELED ATRAZINE BY ANTIBODIES AGAINST ATRAZINE
Anal. Biochem., 234, 13-18, **1996**

MENGER, F.M.; Saito, G.; Sanzero, G.V.
MOTIONAL FREEDOM AND POLARITY WITHIN WATER POOLS OF DIFFERENT SIZES - SPIN LABEL STUDIES
J. Am. Chem. Soc., 97, 4, 909-911, **1975**

MOUNTJOY, K.G.; Robbins, L.S.; Mortrud, M.T.
THE CLONING OF A FAMILY OF GENES THAT ENCODE THE MELANOCORTIN RECEPTORS
Science, 257, 5074, 1248-1251, **1992**

MUKHERJEE, L.; Mitra, N.; Bhattacharya, P.K.; Moulik, S.P.
KINETICS IN MICROEMULSION MEDIUM.4. ALKALINE FADING OF CRYSTAL VIOLET IN AQUEOUS (H_2O/AEROSOL OT/ISOOCTANE AND H_2OAEROSOL OT/ DECANE) AND NONAQUEOUS (ETHYLENE GLYCOL/ AEROSOL OT/ ISOOCTANE) MICROEMULSIONS
Langmuir, 11, 2866-2871, **1995**

MUKHOPADHYAY, L.; Mitra, N.; Bahattacharya, P.K.; Moulik, S.P.
THERMODYNAMICS OF FORMATION OF BIOLOGICAL MICROEMULSION (WITH CINNAMIC ALCOHOL, AEROSOL OT, TWEEN 20, AND WATER) AND KINETICS OF ALKALINE FADING OF CRYSTAL VIOLET IN THEM
J. Colloid Interface Sci., 186, 1-8, **1997**

NICOT, C.; Vacher, M.; Vincent, M.
MEMBRANE-PROTEINS IN REVERSE MICELLES - MYELIN BASIC-PROTEIN IN A MEMBRANE-MIMETIC ENVIRONMENT
Biochem., 24, 24, 7024-7032, **1985**

OHNISHI, S. I.; McCONNELL, H.M.
INTERACTION OF THE RADICAL ION OF CHLORPROMAZINE WITH DEOXYRIBONUCLEIC ACID
J. Amer. Chem. Soc., 87, 2293-8, **1965**

PASCUTTI . P.G.; Cassiano, M.M.; Ito, A.S.
MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF PEPTIDE-MEMBRANE INTERACTIONS.
Biophys J.; 72, TU335, 2, **1997**

PASCUTTI, P.G.; Areas, E.P.G.; Ito, A.S.
MOLECULAR DYNAMICS OF PEPTIDES AT MEMBRANE-WATER INTERFACES
Prog. Biophys. Mol. Bio., 65, PA340, Sup. 1, **1996**

PASCUTTI, P.G.; El-Jaik, L.J.; Bisch, P.M.; Mundim, K.C.; Ito, A.S.
MOLECULAR DYNAMICS OF α-MELANOCYTE STIMULATING HORMONE IN A WATER-MEMBRANE MODEL INTERFACE.
Eur. Biophys.J., **1999**, in press

PILENI, M.P.
STRUCTURE AND REACTIVITY IN REVERSE MICELLES; Eds.: Elsevier; Amsterdam, vol. 65, **1989**

REDFIELD, A.G.
THE THEORY OF RELAXATION PROCES
Adv. Magn. Res., 1, 1, **1965**

RICCI, R. e Nesta, J.M.
INTER- AND INTRAMOLECULAR QUENCHING OF INDOLE FLUORESCENCE BY CARBONYL COMPOUNDS
J. Phys. Chem., 80, 974-980, **1976**

RITER, R.E.; Willard, D.M. e Levinger, N.E.
WATER IMMOBILIZATION AT SURFACTANT INTERFACES IN REVERSE MICELLES
J. Phys. Chem. B, 102, 2705-2714, **1998**

SARGENT, S.e SCWYZER, R.
MEMBRANE LIPID PHASE AS CATALYST FOR PEPTIDE-RECEPTOR INTERACTIONS.
Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 5774-5778, **1986**.

SARKAR, N.; Das, K., Datta, A., Das, S. e Bhattacharyya, K.
SOLVATION DYNAMICS OF COUMARIN 480 IN REVERSE MICELLES. SLOW RELAXATION OF WATER MOLECULES.
J. Phys. Chem., 100, 10523-10527, **1996**

SARKAR, N.; Datta, A.; Das, S.; Bhattacharyya, K.
SOLVATION DYNAMICS OF COUMARIN 480 IN MICELLES
J. Phys. Chem., 100, 15483, **1996**

SAHYUN, M.R.V.
TOTAL LUMINESCENCE SPECTROSCOPY IN A REVERSE MICELLAR SYSTEM
J. Phys. Chem., 92, 21, 6028-6032, **1988**

SAWYER, T.K.; Sanfilippo, P.J.; Hruby, V.J.; Engel, M.H.; Heward, C.B.; Burnett, J.B.; Hadley, M.E.
4-NORLEUCINE, 7-D-PHENYALANINE-α-MELANOCYTE STIMULATING HORMONE: A HIGHLY POTENT MELANOTROPIN WITH ULTRA LONG BIOLOGICAL ACTIVITY.
Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 5754-5758, **1980**.

SCHWYZER, R.;
MOLECULAR MECHANISM OF OPIOID RECEPTOR SELECTION.
Biochem., 25, 6335-6341, **1986**

SINGER, S.J. e Nicolson, G.L.
THE FLUID MOSAIC MODEL OF THE STRUCTURE OF CELL MEMBRANES.
Science, 175, 720-731, **1972**.

SINGH, A.K e Aruna, R.V.
FLUORESCENCE STUDIES OF TRYPTOPHAN AND TRYPTOPHAN-RETINAL SCHIFF BASE IN REVERSE MICELLAR MATRIX.
J. Photochem. Photobiol. A, Chemistry, 89, 247-250, **1995**

SMITH, R.E. e Luisi, P.L.
242. MICELLAR SOLUBILIZATION OF BIOPOLYMERS IN HYDROCARBON SOLVENTS. III. EMPIRICAL DEFINITION OF AN ACIDITY SCALE IN REVERSE MICELLES.
Helv. Chim. Acta, 63, 242, 2302-2311, **1980**

SOUTO, A.L.C.F.
dissertação de mestrado: *O PAPEL DAS MELANINAS EM SISTEMAS SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO* - USP, **1993**

STRATT, R. M. e Maroncelli, M.;
NONREACTIVE DYNAMICS IN SOLUTION: THE EMERGING MOLECULAR VIEW OF SOLVATION DYNAMICS AND VIBRATIONAL RELAXATION
J. Phys. Chem., 100, 12981, **1996**

STRYER, L.
In *Biochemistry*; 4Th ed.; W.H.Freeman and Co, New York, **1995**

SUGG, E.E.; Castrucci, A.M.D.; Hadley, M.E.
CYCLIC LACTAM ANALOGS OF AC-[NLE4]ALPHA-MSH4-11-NH2
Biochem., 27, 21, 8181-8188, **1988**

SZABO, A.G. e Rayner, D.M.
FLUORESCENCE DECAY OF TRYPTOPHAN CONFORMERS IN AQUEOUS-SOLUTION
J. Am. Chem. Soc., 102, 2, 554-563, **1980**

SZABO, A.G. e Rayner, D.M.
THE TIME RESOLVED EMISSION-SPECTRA OF PEPTIDE CONFORMERS MEASURED BY PULSED LASER EXCITATION
Biochem. Bioph. Res. Co., 94, 3, 909-915, **1980**

VALEUR, B. e Weber, G.
RESOLUTION OF THE FLUORESCENCE EXCITATION SPECTRUM OF INDOLE INTO THE ^1L_A AND ^1L_B EXCITATION BANDS.
Photochem. Photobiol., 25, 441-444, **1977**

VOET, D. e Voet, J.G.
BIOCHEMISTRY - Second Edition, John Wiley and Sons, INC, **1995**

WILLIS, K.J. e Szabo, A.G.
CONFORMATION OF PARATHYROID-HORMONE - TIME-RESOLVED FLUORESCENCE STUDIES
Biochem., 31, 37, 8924-8931, **1992**

WOLBERT, R.B.G.; Hilhorst, R.; Voskuilen, G.; Nachtegaal, H.; Dekker, M.; Van't Riet, K. e Bijsterbosch, B.H.
PROTEIN TRANSFER FROM AQUEOUS PHASE INTO REVERSED MICELLES – THE EFFECT OF PROTEIN SIZE AND CHARGE DISTRIBUTION.
Eur. Biophys. J.,184, 627-633, **1989**

WONG, M.; Thomas, J.K. e Grätzel, M.
FLUORESCENCE PROBING OF INVERTED MICELLES. THE STATE OF SOLUBILIZED WATER CLUSTERS IN ALKANE/DIISOOCTYL SULFOSUCCINATE (AEROSOL OT) SOLUTION
J. Am. Chem. Soc., 98, 9, 2391-2397, **1976**

WONG, M.; Thomas, J.K. e Nowak, T.;
STRUCTURE AND STATE OF H_2O IN REVERSED MICELLES
J. Am. Chem. Soc., 99, 4730, **1977**

YOSHIOKA, H.
TEMPERATURE DEPENDENCE OF MOTION OF A SPIN PROBE IN AEROSOL OT REVERSED MICELLES.
J.Colloid and Interface Sci., 83, 1, 214-220, **1981**

YUSHMANOV, V.E. e Tabak, M.
DIPYRIDAMOLE INTERACTS WITH THE POLAR PART OF CATIONIC REVERSED MICELLES IN CHLOROFORM: ^1H NMR AND ESR EVIDENCE.
J. Colloid and Interface Sci., 191, 384-390, **1997**

YOSHIOKA, H.
EXCHANGE OF THE POSITION OF A SPIN PROBE IN AN AEROSOL OT REVERSED MICELLE.
J. Colloid and Interface Sci., 95, 1, 81-86, **1983**

ZAMPIERI, G.C.; Jäckle, H. e Luisi, P.L.
DETERMINATION OF THE STRUCTURAL PARAMETERS OF REVERSE MICELLES AFTER UPTAKE OF PROTEINS.
J. Phys. Chem., 90, 9, 1849-1853, **1986**

ZHANG, J. e Bright, F.V.
NANOSECOND REORGANIZATION OF WATER WITHIN THE INTERIOR OF REVERSED MICELLES REVEALED BY FREQUENCY-DOMAIN FLUORESCENCE SPECTROSCOPY
J. Phys. Chem., 95, 7900, **1991**

ZUBER, H.
In *The Photosynthetic Reaction Center*; Deisenhofer,J., Ed. Academic Press; San Diego; Vol. I, p 43, **1993** .