UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO
PRETO

ISAMARA JULIA CAMURI DE LIMA

**Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações
com agregados anfifílicos de interesse biológico**

Ribeirão Preto
2018

ISAMARA JULIA CAMURI DE LIMA

**Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações
com agregados anfifílicos de interesse biológico**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina
e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

Co-orientador: Dr. Wallance Moreira Pazin.

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Isamara Julia Camuri de

Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações com agregados anfifílicos de interesse biológico. Ribeirão Preto, 2018.

85 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Ito, Amando Siuti.

Co-orientador: Pazin, Wallance Moreira.

1. Própolis verde. 2. Artepilina C. 3. Espectroscopia óptica. 4. Efeitos de pH. 5. Propriedades de agregação. 6. Interação com micelas. 7. Interação com vesículas lipídicas.

Nome: LIMA, Isamara Julia Camuri de

Título: Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações com agregados anfífilos de interesse biológico.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Aprovado em: __ / __ / ____ .

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*À minha família, em especial minha mãe, que
nunca deixou de acreditar em mim e me apoiar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por tudo o que tem feito em minha vida e ter me permitido vivenciar novas experiências com saúde.

Ao professor Amando e ao Wallance, pela orientação mesmo que à distância e em tempos conturbados, pelos ensinamentos e todo o conhecimento que obtive neste tempo em que estivemos juntos.

À minha “mamamis” Maria que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e nunca mediu esforços para me ajudar. É simplesmente impossível colocar em palavras tudo o que a senhora significa para mim. Eu te amo incondicionalmente e obrigada por ser este exemplo de mulher e de ser humano. Agradeço também minha família.

Aos meus colegas de grupo André, Danilo e Leonardo. Sem vocês, minha vida em Ribeirão teria sido extremamente triste. Obrigada pelos ensinamentos, pelas discussões, pelos puxões de orelha, pelos lanches no GF e no BK, pelas caçadas de Pokemon no centro da cidade e pelas procrastinações regadas a muito chá.

Ao Adriano, que foi bem mais do que apenas um técnico do laboratório, me auxiliando em todos os experimentos e explicando tudo com a sua calma característica. Obrigada pelas risadas e pelo conhecimento adquirido.

A todos os amigos do grupo de Fotobiofísica: André Miele, Débora, Érika, Luciana, Marina e todos aqueles que por ventura eu tenha me esquecido no momento de escrever esse agradecimento.

Ao pessoal do grupo do Jabá, Natália e Rafael, pelas dicas sobre biomembranas, auxílio com experimentos e disponibilização do laboratório quando necessitei.

Ao Julio “Tropeço”, por todas as risadas e conversas nerds sobre jogos e Digimon ou simplesmente divagar sobre a vida. Pode parecer besteira, mas me ajudou muito tudo isso. Obrigada também por me apresentar o croissant de chocolate do HC. Ao André “Potter”, pelas dicas de jogos, auxílio com a internet e risadas pelo corredor.

Aos amigos do departamento: Minhoca, Ste, Laranja, Cecília, Jéssica e tantos outros que não caberiam neste espaço.

Ao Prof. Iouri, por todo o conhecimento obtido e pela confiança depositada em meu trabalho no workshop em Goiânia.

À dona Giuse e profa. Galina, pelo carinho, conselhos e risadas.

Aos professores Abel e em especial Sérgio da Educação Física, pelos treinamentos e conversas jogadas fora ao caminhar pelo campus, e aos colegas Nicolle e Vitor, que “sofreram” as aulas de ginástica comigo.

À Profa. Ana Paula e ao grupo de Físico-Química, pelo auxílio com as medidas de DLS e por terem disposto parte do tempo para tal.

Ao pessoal da catequese, catequista Sérgio e Murilo, pelos ensinamentos sobre o caminho da fé e piadas diversas em nossos encontros aos sábados, bem como à dona da sorveteria Flocomellow pelas conversas e deliciosas sobremesas “pré-missa”.

Ao Sr. Minoru e dona Marlene, donos do hostel em que vivi estes últimos dois anos, obrigada pela hospitalidade e yakisobas.

À Larissa, minha *roommate*, melhor colega de quarto não-army que eu poderia ter pedido à Deus. Obrigada por ter me aguentado todo esse tempo, pelas gargalhadas a plenos pulmões, pela companhia e por ter me ensinado a cavalgar (saudades Branca, Argo e Chalana).

À Driele, pela amizade que nunca pensei chegar a este patamar quando te conheci em 2015. Obrigada pelos surtos e travesseiradas ouvindo kpop, pelos jantares regados a muita comida japonesa e por ter me apresentado às fotinhas. Amo muito todas vocês: Ana Luiza, Ísis, Joy, Judite, Julie, Julia, Karen, Lia, Lorena, Millena, Sara e Thais! Obrigada pelas teorias e risadas sobre a seita, Tizy e Polaroid.

Às fotinhas que tenho orgulho de chamar de filhas de Tisa, Luana e Nínive. Vocês são os anjinhos que iluminam meus dias. Obrigada por tudo.

À Naymary, minha melhor amiga que, mesmo à distância, sempre me faz sorrir. Obrigada por todos esses anos e que venham muitos mais cheios de doramas e oppas.

Aos funcionários Nilza, Ricardo e todos os demais funcionários do Departamento de Física.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pelo suporte e estrutura e ao CNPq pelo auxílio financeiro através do processo 305771/2016-7.

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, através de dicas ou conversas descontraídas.

“Você não acorda um belo dia e se transforma em borboleta”

- *crescer é um processo*

Rupi Kaur^[1]

RESUMO

LIMA, Isamara Julia Camuri de. **Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações com agregados anfifílicos de interesse biológico**. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Departamento de Física, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A própolis verde brasileira é um dos produtos de abelha mais consumidos no mundo devido às suas atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas e antitumorais. Coletada pela espécie *Apis mellifera*, esta própolis possui a maior porcentagem de Artepilina C dentre as demais própolis. A molécula, derivada do ácido cinâmico, possui dois grupos prenilados, o que favorece a afinidade do composto pelo ambiente lipofílico. Um grupo carboxila também está presente na estrutura da Artepilina C, tornando-a um composto sensível ao pH, o que pode modular sua atividade biológica relacionada a interações com a membrana celular de organismos e tecidos. Neste trabalho investigamos as propriedades da Artepilina C em solução aquosa e interações entre Artepilina C e agregados anfifílicos comumente usados como modelos de membranas, ou seja, micelas e vesículas unilamelares, usando absorção óptica e espectroscopias de fluorescência em estado estacionário e resolvida no tempo. O grupo carboxila pode estar tanto na forma protonada quanto na forma desprotonada, mostrando equilíbrio em pH 4,65. Em pH abaixo do valor de pKa, uma banda de absorção aumentou em torno de 350 nm em concentração de Artepillin C acima de 50 μ M devido à agregação da molécula. Em pH neutro, com excitação a 310 nm, a Artepilina C apresenta dupla emissão a 400 e 450 nm, onde a segunda pode estar relacionada com diferentes interações entre as formas isoméricas da molécula. O tempo de vida fluorescente foi ajustado por uma função triexponencial, dominada por uma componente muito curta, em torno de 60 ps. Desta forma, a emissão fluorescente ocorreu antes da despolarização, resultando em valores muito altos de anisotropia de fluorescência. A interação da Artepilina C e membranas modelo foi estudada com micelas aniônicas, catiônicas e zwitteriônicas (respectivamente SDS, CTAB e HPS) e com vesículas unilamelares grandes de DMPC, DMPG e DODAB. Devido às cargas na superfície das micelas e das vesículas, o pH local é diferente do meio (bulk) e os espectros de absorção óptica mostraram que o estado de protonação do composto depende deste pH local. A polaridade em torno da Artepilina C diminuiu na presença de micelas e vesículas de acordo com os espectros de emissão de fluorescência, levando-nos a acreditar que a molécula está localizada na interface água/lipídio.

A carga negativa do composto em estado desprotonado favorece a interação com micelas catiônicas e vesículas neutras. Os efeitos são mais proeminentes quando vesícula lipídica está na fase fluida.

Palavras-chave: Própolis verde. Artepilina C. Espectroscopia óptica. Efeitos de pH. Propriedades de agregação. Interação com micelas. Interação com vesículas lipídicas.

ABSTRACT

Lima, Isamara Julia Camuri de. **Aggregation properties of the bioactive compound Artepillin C and interactions with amphiphilic aggregates of biological interest.** 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Departamento de Física, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Brazilian green propolis is one of the most consumed bee product in the world because of its known antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor activities. Collected by the species *Apis mellifera*, this propolis has the major percentage of Artepillin C among others worldwide propolis. The molecule, derived of cinnamic acid, has two prenylated groups, which improves the affinity of the compound for lipophilic environment. A carboxylic group is also present in the Artepillin C structure, making it a pH-sensitive compound, what may modulate its biological activity related to interactions with the cellular membrane of organisms and tissues. In this work we investigated the properties of Artepillin C on aqueous solution and interactions between Artepillin C and amphiphilic aggregates commonly used as membrane models, namely, micelles and unilamellar vesicles, using optical absorption, steady state and time-resolved fluorescence spectroscopies. The carboxyl group may be either in protonated or deprotonated form, showing equilibrium at pH 4,65. In pH below the pKa value, an absorption band raised around 350 nm at Artepillin C concentration above 50 μM , due to aggregation of the molecule. In neutral pH, with excitation at 310 nm, Artepillin C presents dual emission at 400 and 450 nm, where the second one could be related with different interactions between isomeric forms of the molecule. The fluorescent lifetime is a three-exponential function dominated by a very short component, around 60 ps. Therefore, the emission occurred before fluorescence depolarization, resulting in very high values of fluorescence anisotropy. The interaction of Artepillin C and membrane models was studied with anionic, cationic and zwitterionic (respectively SDS, CTAB and HPS) micelles, and with large unilamellar vesicles of DMPC, DMPG and DODAB. Due to the charges in micelles and in vesicles surfaces, the local pH was different from the bulk and the optical absorption spectra showed that the protonation state of the compound depends on this pH. The polarity around Artepillin C decreased in the presence of micelles and vesicles according to fluorescence emission spectra, leading us to believe that the molecule should be located at the water/lipid interface. The

negative charge of the compound in deprotonated state favors the interaction with cationic micelles and neutral vesicles. The effects are more prominent when the lipid vesicles are in the fluid phase.

Keywords: Green propolis. Artepillin C. Optical spectroscopy. pH effects. Aggregation properties. Interaction with micelles. Interaction with lipid vesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da Artepilina C.	23
Figura 2. Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso.	25
Figura 3. Esquema ilustrativo representando a estrutura de uma bicamada lipídica composta por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina quando a temperatura está abaixo (à esquerda) e acima da temperatura de transição (à direita).....	30
Figura 4. Esquema de um espectrofotômetro de feixe único.....	32
Figura 5. Diagrama de Jablonski	33
Figura 6. Esquema de um espectrofluorímetro estático	32
Figura 7. Esquema de um espectrofluorímetro com resolução temporal	324
Figura 8. (a) Histograma de contagens. (b) Medida experimental do decaimento de intensidade....	35
Figura 9. Esquema para medida de anisotropia estática.....	37
Figura 10. Esquema do equipamento para medida de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo com excitação vertical (a) e excitação horizontal (b).....	40
Figura 11. (a) Espectro de absorção da Artepilina C com a variação do pH entre 2,6 e 9,2 normalizado na intensidade máxima da banda de absorção. (b) Curva de titulação da Artepilina C: comprimento de onda do pico da banda de absorção em função do pH do meio. Concentração da Artepilina C: 20 μ M. Tampão citrato-fosfato. Temperatura: 25 °C.....	49
Figura 12. (a) Espectro de absorção normalizado da Artepilina C em concentrações diferentes. (b) Espectro de emissão fluorescente da Artepilina C em concentrações diferentes, excitação em 310 nm. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperatura: 25 °C.....	51
Figura 13. (a) Espectro de absorção corrigido por subtração da linha de base da Artepilina C em diferentes concentrações (de baixo para cima, 10, 30, 50, 70, 80 μ M em tampão citrato-fosfato, pH 3,0. (b) Ajuste (vermelho) das curvas Gaussianas (verde) do espectro (preto) de Artepilina C 80 μ M.....	51
Figura 14. (a) Espectro de absorção normalizado da Artepilina C em concentrações diferentes. (b) Absorbância em relação à concentração em 291 nm. Tampão citrato-fosfato pH 7,0. Temperatura: 25 °C.....	53

Figura 15 (a) Espectro de emissão fluorescente da Artepilina C. (b) Correção de filtro interno na intensidade de emissão fluorescente com o aumento da concentração de Artepilina C. Excitado em 310 nm. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato, pH 7,0. Temperatura: 25 °C.....	54
Figura 16. (a) Espectro de absorção normalizado da Artepilina C variando a concentração de 10 a 100 µM. (b) Ajuste (vermelho) das curvas Gaussianas (verde) do espectro de Artepilina C 100 µM (preto), corrigido com subtração da linha de base. Tampão citrato-fosfato, pH 4,9. Temperatura: 25 °C.....	54
Figura 17. Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C variando a concentração. Amostras excitadas em 310 nm. Tampão citrato-fosfato, pH 4,9. Temperatura: 25 °C.....	55
Figura 18. Espectro de emissão da Artepilina C 80 µM em pH 3,0 (preto), 4,9 (vermelho) e 7,0 (azul). Comprimento de onda de excitação 310 nm. Temperatura: 25 °C.....	56
Figura 19. Perfil de decaimento da intensidade da Artepilina C, 80 µM, em pH 3,0 (vermelho), 4,9 (azul) e 7,0 (rosa). Excitação 296 nm, emissão 400 nm. Tampão citrato-fosfato. Temperatura: 25 °C. A curva em preto representa a Função de Resposta do Instrumento (IRF).	57
Figura 20. Espectros de absorção de Artepilina C normalizados de 5 a 20 µM em tampão citrato-fosfato com NaCl 100 mM em pH 3,0 (a) e pH 7,4 (b). Temperatura 25 °C.	59
Figura 21. Espectro de emissão fluorescente da Artepilina C de 5 a 20 µM em tampão citrato-fosfato com NaCl 100 mM em pH 3,0 (a) e pH 7,4 (b). Excitado em 310 nm. O pico em 350 nm é o Raman da água. Temperatura 25 °C.	60
Figura 22. (a) Espectros de absorção de Artepilina C [20 µM] com micelas. (b) Ajuste linear da absorbância em 300 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperatura: 25 °C.	62
Figura 23. (a) Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C [20 µM] com micelas de SDS, CTAB e HPS. O pico em 350 nm é o Raman da água. (b) Intensidade de fluorescência versus a concentração em 409 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperatura: 25 °C.	63
Figura 24. (a) Espectros de absorção normalizados da Artepilina C [20 µM] com micelas de SDS, CTAB e HPS. (b) Ajuste linear da absorbância para Artepilina C com micelas em 300 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 5,5. Temperatura: 25 °C.	64

Figura 25. (a) Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C [20 μ M] com micelas de SDS, CTAB e HPS. O pico em 350 nm é o Raman da água. (b) Intensidade de fluorescência versus a concentração de Artepilina C com micelas em 390 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 5,5. Temperatura: 25 °C.	65
Figura 26. (a) Espectros de absorção normalizados da Artepilina C [20 μ M] com micelas de SDS, CTAB e HPS. (b) Ajuste linear da absorbância para Artepilina C com micelas em 300 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 7,4. Temperatura: 25 °C.	66
Figura 27. (a) Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C [20 μ M] com micelas de SDS, CTAB e HPS. O pico em 350 nm é o Raman da água. (b) Intensidade de fluorescência versus a concentração de Artepilina C com micelas em 390 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 7,4. Temperatura: 25 °C.	66
Figura 28. Espectros de absorção normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 3,0 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. Tampão citrato-fosfato.	70
Figura 29. Espectros de emissão fluorescente normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 3,0 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato.	71
Figura 30. Espectros de absorção normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 7,4 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. Tampão citrato-fosfato.	72
Figura 31. Espectros de emissão fluorescente normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 7,4 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As radiações eletromagnéticas com suas regiões espectrais e respectivas técnicas espectroscópicas	30
Tabela 2 - Valores da temperatura de transição T_c , concentração micelar crítica (CMC) e informações sobre a estrutura dos anfifílicos utilizados.....	43
Tabela 3 - Ajuste do espectro de absorção da Artepilina C em solução tampão citrato-fosfato em pH 3,0 para a soma das bandas gaussianas. Parâmetros P_i , h_i , w_i e A_i são o comprimento de onda, a altura, a largura da meia altura e a área do pico i , respectivamente	51
Tabela 4 - Ajuste do espectro de absorção da Artepilina C em solução tampão citrato-fosfato pH 4,9. Parâmetros P_i , h_i , w_i e A_i são comprimento de onda de máxima absorbância, altura, largura e área do pico i , respectivamente.....	54
Tabela 5 - Tempo de vida da i -ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i -ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Tampão citrato-fosfato em pH 3,0, 4,9 e 7,0. Comprimento de onda de excitação em 296 nm e emissão em 400 nm. Temperatura: 25 °C.....	56
Tabela 6 - Anisotropia estacionária (r_s), tempo de correlação rotacional (φ), anisotropia inicial (r_0) e anisotropia média calculada ($\langle r \rangle$)	57
Tabela 7 - Dados do coeficiente de absorção molar ε para 20 μ M de Artepilina C em tampão citrato-fosfato com e sem a adição de 100 mM de NaCl em pH 3,0 e 7,4. Temperatura: 25 °C ..	59
Tabela 8 - Tempo de vida (τ), fator pré-exponencial normalizado (α) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Tampão citrato-fosfato com 100 mM de NaCl em pH 3,0 e 7,4. Comprimento de onda de excitação em 296 nm e emissão em 400 nm. Temperatura: 25 °C	60
Tabela 9 - Valores de pH na solução (bulk) e no microambiente da superfície das micelas	61
Tabela 10 - Tempo de vida da i -ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i -ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato em pH (meio) 3,0, 5,5 e 7,4. Comprimento de onda de excitação em 296 nm e emissão em 400 nm. Temperatura: 25 °C.....	66

Tabela 11 - Anisotropia estacionária (r_s), tempo de correlação rotacional (φ), anisotropia inicial (r_0) e anisotropia média calculada ($\langle r \rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato. Temperatura: 25 °C.....	67
Tabela 12 - Valores do comprimento de onda de absorção e emissão e da intensidade da emissão fluorescente da Artepilina C [20 μ M] em tampão e em sistemas contendo vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] com e sem 100 mM de NaCl, pH 3,0. Tampão citrato-fosfato. Os valores em parênteses representam a variação no comprimento de onda em relação ao obtido em tampão	69
Tabela 13 - Valores do comprimento de onda de absorção e emissão e da intensidade da emissão fluorescente da Artepilina C em tampão e em sistemas contendo vesículas de DMPC, DMPG e DODAB com e sem NaCl, pH 7,4. Tampão citrato-fosfato. Os valores em parênteses representam a variação no comprimento de onda em relação ao obtido em tampão	72
Tabela 14 - Tempo de vida da i -ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i -ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle \tau \rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], DMPC, DMPG e DODAB [1 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperaturas acima e abaixo da transição dos lipídios	73
Tabela 15 - Tempo de vida da i -ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i -ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle \tau \rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], DMPC, DMPG e DODAB [1 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 7,4. Temperaturas acima e abaixo da transição dos lipídios	74
Tabela 16 - Anisotropia estacionária (r_s), tempo de correlação rotacional (φ), anisotropia inicial (r_0) e anisotropia média calculada ($\langle r \rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], DMPC, DMPG e DODAB [1 mM]. Tampão citrato-fosfato em pH 3,0 (tabela superior) e 7,4 (tabela inferior). Temperaturas acima e abaixo da transição dos fosfolipídios	75

LISTA DE SÍMBOLOS

T_c	temperatura de transição
h	constante de Planck – $6,63 \times 10^{-34}$ J.s
ν	frequência
c	velocidade da luz no vácuo
λ	comprimento de onda
ε	coeficiente de absorção molar
C	concentração
l	caminho ótico
τ	tempo de vida fluorescente
r	anisotropia
r_0	anisotropia inicial
G	fator G
φ	tempo de correlação rotacional
r_s	anisotropia de estado estacionário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DLS	do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio
GUV	do inglês <i>Giant Unilamellar Vesicle</i>
HPS	Hexadecildimetilamônio propanosulfato
LUV	do inglês <i>Large Unilamellar Vesicle</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUV	do inglês <i>Small Unilamellar Vesicle</i>
TCSPC	do inglês, <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>
UV-Vis	região do ultravioleta ao visível no espectro eletromagnético

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Própolis	22
1.2. Membranas modelo	24
1.3. Objetivos.....	27
2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	28
2.1. Técnicas espectroscópicas de absorção ótica e fluorescência	29
2.1.1. Espectroscopia de absorção ótica UV-Vis	29
2.1.2. Espectroscopia de fluorescência	31
2.1.2.1. Tempo de vida fluorescente	33
2.1.2.2. Anisotropia de fluorescência.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1. Materiais.....	43
3.2. Titulação ácido-base para determinação de pKa	43
3.3. Artepilina C em tampão.....	44
3.4. Preparação de micelas.....	44
3.5. Preparação das vesículas fosfolipídicas	44
3.6. Medidas de espectroscopia de absorção	45
3.7. Medidas de espectroscopia de fluorescência de estado estacionário.....	45
3.8. Medidas de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47

4.1.	Efeitos de pH: determinação do pKa	48
4.2.	Efeitos de concentração em diferentes valores de pH	49
4.2.1.	pH 3,0: Artepilina C neutra	49
4.2.2.	pH 7,0: Artepilina C carregada negativamente	52
4.2.3.	pH 4,9: espécies protonadas e desprotonadas de Artepilina C	53
4.2.4.	Decaimento da intensidade fluorescente e anisotropia resolvida no tempo ...	55
4.3.	Força iônica do meio: Artepilina C em tampão com NaCl	58
4.4.	Interação com micelas	60
4.4.1.	Micelas com Artepilina C em pH 3,0 (bulk)	61
4.4.2.	Micelas com Artepilina C em pH 5,5 (bulk)	63
4.4.3.	Micelas com Artepilina C em pH 7,4 (bulk)	64
4.4.4.	Anisotropia e tempo de vida fluorescente	66
4.5.	Interação da Artepilina C com vesículas unilamelares grandes (LUVs)	68
4.5.1.	Vesículas com Artepilina C em pH 3,0 (neutra)	68
4.5.2.	Vesículas com Artepilina C em pH 7,4 (carregada negativamente)	71
5.	CONCLUSÕES	77
5.1.	Estudos da Artepilina C em tampão	78
5.2.	Estudos da Artepilina C com micelas	78
5.3.	Estudos da Artepilina C com vesículas	78
5.4.	Conclusões gerais	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Própolis

A própolis é uma substância formada por ceras e resinas coletadas de diversas partes das plantas pelas abelhas e alteradas pela ação das enzimas em sua saliva com o intuito de evitar a proliferação de micróbios e vírus na colmeia. ^[2,3] O uso da própolis para fins medicinais vem desde o século III a.C. devido às suas propriedades terapêuticas. Atualmente, sabe-se que a própolis possui, dentre todas as atividades biológicas já comprovadas, ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, anestésica e cicatrizante. ^[4–10]

A própolis é composta de resina (50%), cera (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outras substâncias orgânicas (5%). ^[11] Sua composição química pode sofrer influência das diferentes regiões geográficas de coleta das abelhas. ^[12] No Brasil, cuja vegetação é extremamente diversificada, a própolis foi subdividida em doze classes: cinco delas provém da região Sul do país e possui cores que variam do amarelo ao marrom esverdeado; outros seis grupos são da região Nordeste com tons diferentes de marrom e amarelo e a última classe vem do Sudeste e possui coloração marrom esverdeada ou verde, sendo denominada própolis verde. ^[13]

Comercialmente, a própolis verde coletada pela espécie de abelha *Apis mellifera* é a mais importante no Brasil e contém principalmente fenilpropanóides prenilados (Artepilina C) e ácidos cafeoilquínicos. Estas substâncias provêm da extração de botões vegetativos de alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*, conhecido popularmente como “vassourinha”. ^[14] Dentre os compostos identificados presentes na própolis verde brasileira, a Artepilina C foi destacada como composto majoritário e responsável por diversos mecanismos de ação contra patógenos, tornando-se uma molécula de interesse farmacológico. ^[15,16]

A Artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é uma molécula derivada do ácido cinâmico. Na Figura 1 está representada a estrutura molecular da Artepilina C em sua forma neutra. A presença de anel aromático, duplas ligações e além de grupos hidroxila e carboxila ligados ao anel possibilitam diferentes tipos de interações intermoleculares com a membrana celular, segundo estudos com agentes fitoquímicos que possuem semelhanças estruturais com a Artepilina C. ^[17–19] Assim, a Artepilina C pode possuir propriedades que levam a ações terapêuticas em células-alvo ao interagir com a membrana celular, alterando suas propriedades sem a utilização de um receptor (proteínas ou glicoproteínas transmembrana), elevando o seu potencial no desenvolvimento de novas drogas contra o câncer. ^[20–22]

Figura 1. Estrutura molecular da Artepilina C.

Fonte: [16].

A citotoxicidade da Artepilina C contra células tumorais tem sido investigada *in vitro* e *in vivo* [5,23–25], mostrando alta citotoxicidade em células tumorais malignas humanas e de ratos por meio de ações específicas, dentre elas a apoptose celular, que podem estar relacionadas à perda da funcionalização de proteínas transmembrana pela alteração na organização lipídica durante a inserção da droga na membrana celular. [16,26] Em estudos recentes foi demonstrado que a Artepilina C, utilizada em cotratamento de câncer de próstata, induz a autofagia e a apoptose das células cancerígenas. [27]

A genotoxicidade da própolis também tem sido investigada *in vivo*, revelando que, em baixas concentrações (< 100 mg/mL), as própolis verde e marrom brasileiras contribuíram para a ausência de ações mutagênicas no DNA de ratos Wistar e *Drosophila melanogaster*. [28] Em um estudo físico-químico mais aprofundado acerca da atividade antimicrobiana da Artepilina C, realizado aqui em nosso grupo, foi revelada sua atividade contra o patógeno *Pythium aphanidermatum* e esta atividade está vinculada à afinidade do composto na interface água/lipídio em membranas modelo. Em suma, a molécula diminui a espessura da bicamada lipídica em cerca de 2 Å e aumenta a fluidez da membrana. Os resultados sugerem que os efeitos causados nas membranas são essenciais para desvendar seu mecanismo de ação nas células-alvo. [16] Tendo em vista a complexidade de sistemas biológicos, que impõe limitações às tentativas de uma descrição completa de todos os seus componentes, comumente são utilizados modelos simplificados, os quais são capazes de representar ao menos uma parte do sistema.

1.2. Membranas modelo

Moléculas anfifílicas (ou anfipáticas) são caracterizadas por possuírem duas regiões distintas em sua estrutura: a cabeça polar, possuindo afinidade com a água, e a cadeia carbônica apolar, ou seja, hidrofóbica. Elas podem ser classificadas de acordo com a carga da cabeça polar: aniônica (carregada negativamente), catiônica (carregada positivamente) ou possuir o balanço total de cargas igual a zero (zwitteriônica).

Em soluções aquosas estas moléculas tendem a se agregar de tal forma que este arranjo constitua o estado de menor energia livre para essas moléculas em água. Para ocorrer essa agregação, a concentração de moléculas anfifílicas no meio aquoso deve ultrapassar a denominada concentração micelar crítica (CMC), cujo valor varia dependendo do tamanho da parte hidrofóbica, alterações na temperatura e força iônica do meio é menor com o aumento da parte hidrofóbica, a diminuição da temperatura ou a adição de sais. A estrutura do agregado depende da molécula anfifílica, podendo organizar-se em micelas (Figura 2.a), bicamadas lipídicas (Figura 2.b) ou lipossomos (Figura 2.c). A CMC de moléculas anfifílicas com uma cadeia hidrocarbônica é da ordem de $10^{-2} - 10^{-5}$ M e para duas cadeias, esta concentração diminui significativamente para $10^{-6} - 10^{-10}$ M. [29]

Surfactantes são moléculas anfipáticas com uma única cadeia carbônica, como sabões e detergentes, e devido à forma cônica e afilada de suas moléculas, constituem preferencialmente micelas. As micelas são geralmente esféricas, porém também podem ser elipsoides, cilíndricas e em camadas. Seu diâmetro pode variar entre 1 e 20 nm, porém o formato e o tamanho são em função da geometria molecular dos surfactantes, bem como das condições da solução, tais como: concentração, temperatura, pH e força iônica. [29]

A maioria dos fosfolipídios e glicolipídios com duas cadeias hidrocarbônicas associam-se em uma camada dupla de moléculas, a bicamada lipídica. As moléculas alinham-se lado a lado, compondo duas monocamadas. Estas bicamadas tendem a se converter em estruturas fechadas, chamadas lipossomos, que são mais estáveis pois não apresentam caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Lipossomos são, portanto, vesículas esféricas sintéticas formadas por uma bicamada lipídica contínua, que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente, podendo ser produzidos com moléculas de um único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos. [30]

Figura 2. Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso.

Fonte: [30].

Geralmente, lipídios neutros e zwitteriônicos tendem a formar uma fase lamelar, na qual se formam bicamadas adjacentes com uma camada aquosa entre elas e lipídios carregados tendem a formar unilamelas ou multilamelas com uma distância grande de repetição para minimizar a repulsão eletrostática entre lamelas adjacentes. Já as membranas biológicas são compostas por apenas uma lamela e existem métodos de formação de vesículas unilamelares que as mimetizam muito bem. Estas vesículas unilamelares são caracterizadas de acordo com seu diâmetro como: pequena (SUV), da ordem de 20 nm; grande (LUV), entre 100 e 500 nm; e gigante (GUV) da ordem de micrômetros.^[31] A bicamada lipídica isola o líquido contido no interior do lipossomo do líquido externo. Apesar disto, os mais diversos compostos, desde que estejam presentes no meio utilizado para a formação das vesículas, podem ser englobados no seu compartimento interno. Devido a esta propriedade, os lipossomos têm sido testados como uma via alternativa para a administração de medicamentos^[32–34] e também largamente empregados como modelos para o estudo de bicamadas lipídicas e membranas por facilitar o entendimento da estrutura básica e dos aspectos dinâmicos de

membranas biológicas. ^[35] Estas substâncias são encapsuladas em lipossomos, que são transportados pela circulação até o tecido; por fusão das vesículas com a membrana plasmática, os fármacos são introduzidos diretamente nas células. ^[36]

As bicamadas lipídicas puras, ou seja, com apenas um tipo de fosfolípido, sofrem mudanças de estado físico em uma temperatura característica denominada temperatura de transição (T_c). Essa mudança de fase é devida à alteração do grau de interação das cadeias hidrocarbônicas constituintes da bicamada. Abaixo da temperatura de transição, as cadeias são mais ordenadas, interagem fortemente e a bicamada tem uma consistência sólida, determinando o chamado estado gel; acima dessa temperatura, elas são mais desordenadas e menos compactadas, o que determina o estado líquido (Figura 3).

As grandes classes de moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios formadores de membranas não apresentam grupos com grande rendimento quântico de fluorescência. Todavia a espectroscopia de fluorescência tem sido aplicada com grande sucesso no estudo de sistemas biológicos, tendo como base os processos fundamentais envolvidos na técnica experimental, e no uso de processos adequados de inserção de marcadores fluorescentes. ^[37]

Figura 3. Esquema ilustrativo representando a estrutura de uma bicamada lipídica composta por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina quando a temperatura está abaixo (à esquerda) e acima da temperatura de transição (à direita).

Fonte: Adaptado de [36].

1.3. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi investigar propriedades básicas de agregação da Artepilina C em meio aquoso, considerando-se efeitos de concentração, pH e força iônica do meio. Interações com agregados micelares e vesículas fosfolipídicas também foram analisadas em relação ao pH e variações na carga das cabeças polares das moléculas anfifílicas utilizadas para suas formações. Foram utilizadas micelas e vesículas aniônicas (Dodecil sulfato de sódio / SDS e Dimiristoilfosfatidilglicerol / DMPG), catiônicas (Brometo de cetiltrimetilamônio / CTAB e Brometo de dioctadecildimetilamônio / DODAB) e zwitteriônicas (Hexadecildimetilamônio propanosulfato / HPS e Dimiristoilfosfatidilcolina / DMPC). O trabalho foi desenvolvido empregando-se metodologias baseadas nas espectroscopias de absorção ótica, emissão fluorescente e anisotropia de fluorescência tanto em estado estacionário quanto resolvida no tempo e fluorescência.

2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

2.1. Técnicas espectroscópicas de absorção ótica e fluorescência

O trabalho de investigação sobre propriedades básicas da Artepilina C em meio aquoso e a dependência com a concentração, pH e força iônica do meio, assim como as interações com agregados micelares e vesículas unilamelares, foi desenvolvido empregando-se metodologias baseadas nas espectroscopias de absorção ótica e fluorescência. Apresentamos aqui os fundamentos das técnicas empregadas.

2.1.1. Espectroscopia de absorção ótica UV-Vis

Há duas visões acerca da natureza da luz. Segundo a Mecânica Clássica, a luz se trata de uma onda eletromagnética transversal com os campos elétrico e magnético perpendiculares entre si e em fase. Porém apenas esta definição não explicava alguns resultados experimentais obtidos no final do século XIX. Pela Mecânica Quântica, a luz se trata de “pacotes de energia” sendo estes pacotes denominados de “fótons” ou “*quanta* de luz”, caracterizados pela energia E :

$$E = pc = h\nu \quad , \text{ onde } p = \frac{h\nu}{c}$$

O que nos leva a

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Onde h é a constante de Planck ($= 6,63 \times 10^{-34}$ J.s), c é a velocidade da luz no vácuo ($= 3 \times 10^8$ m/s), λ é o comprimento de onda e ν é a frequência da onda. A natureza ondulatória da luz nos permite classificá-la de acordo com o comprimento de onda (ou frequência). Com base nessa classificação, diversas técnicas espectroscópicas podem ser utilizadas dependendo dos efeitos provocados no material (Tabela 1).

A espectroscopia de absorção ótica analisa a dependência da intensidade da luz que é absorvida pelo material em função do comprimento de onda na faixa do ultravioleta próximo ao visível. [38] Ondas eletromagnéticas nesta região do espectro induzem a excitação eletrônica de átomos e moléculas. O espectro de absorção de um átomo consiste de algumas linhas, porém para moléculas observa-se uma larga banda de absorção devido aos seus vários modos de excitação vibracional e rotacional, banda esta centrada no comprimento de onda de maior absorção.

Tabela 1 - As radiações eletromagnéticas com suas regiões espectrais e respectivas técnicas espectroscópicas

Região	Comp. de onda [m]	Frequência [MHz]	Método
Ondas de rádio	$10^2 - 10^{-1}$	$3 - 3 \times 10^3$	Res. Mag. Nuclear
Micro-ondas	$10^{-1} - 10^{-3}$	$3 \times 10^3 - 3 \times 10^5$	Res. Paramag. Eletrônica
Infravermelho	$10^{-3} - 7 \times 10^{-7}$	$3 \times 10^5 - 4 \times 10^8$	Espectr. Infravermelho
Visível	$7 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-7}$	$4 \times 10^8 - 7,5 \times 10^8$	Espectr. UV-Vis.
Ultravioleta	$4 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-9}$	$7,5 \times 10^8 - 6 \times 10^{10}$	Espectr. UV de vácuo
Raios X	$5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-11}$	$6 \times 10^{10} - 3 \times 10^{12}$	Espectr. de Raios X
Raios γ	$> 1 \times 10^{-11}$	$> 3 \times 10^{12}$	Espectr. de Mössbauer

Fonte: [38].

A intensidade de absorção da luz em uma amostra pode ser determinada pela Lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon Cl} \quad (2)$$

Sendo I a intensidade de luz transmitida pela amostra ao atingir o detector, I_0 a intensidade de luz incidente na amostra, ε o coeficiente de absorção molar, C a concentração molar da amostra e l o caminho ótico da luz na cubeta em que consta a amostra. A equação (2) pode ser reescrita na forma:

$$\varepsilon Cl = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = A \quad (3)$$

Onde A é a absorbância da amostra.

O equipamento utilizado para se obter medidas de absorção é chamado espectrofotômetro. Para se obter o espectro de absorção de uma amostra, é utilizada uma lâmpada policromática cujo feixe de luz é separado em pequenos intervalos de comprimento de onda por um monocromador, então passa através da amostra e é medida por um detector (Figura 4). Inicialmente é medida a intensidade de energia que atinge o detector usando uma cubeta com a referência (branco). Quando a referência é substituída pela amostra de interesse, a intensidade de luz que atinge o detector, cujo valor está, preferencialmente, entre os valores de 0,1 e 2.

Figura 4. Esquema de um espectrofotômetro de feixe único.

Fonte: [39].

2.1.2. Espectroscopia de fluorescência

As moléculas demoram cerca de 10^{-15} s para absorver a luz, fazendo com que saiam do estado fundamental para um estado eletrônico excitado de maior energia e, segundo o princípio de Franck-Condon, esta transição eletrônica é mais provável que ocorra sem mudança nas posições dos núcleos da molécula devido ao tempo característico deste movimento (10^{-12} s) ser muito maior que o tempo característico das transições eletrônicas.

Ao ser excitada, a molécula pode perder energia por processos radiativos e não-radiativos. Os processos radiativos envolvem a emissão de fótons equivalentes à energia em excesso sendo denominada fluorescência. Em processos não-radiativos, a molécula perde energia: (i) para as moléculas do meio através de colisões; (ii) relaxação do solvente; (iii) reações fotoquímicas; (iv) supressões; (v) processos de conversão interna de energia; ou (vi) cruzamentos intersistemas, este último podendo levar à emissão fosforescente.

No diagrama de níveis de energia da Figura 5, denominado diagrama de Jablonski, estes processos estão esquematizados. O tempo característico para a emissão fluorescente está entre o intervalo de 10^{-10} a 10^{-7} s e para a emissão fosforescente está entre 10^{-6} e 10^{-1} s. A emissão fluorescente sempre ocorrerá com energia menor do que a energia absorvida pela molécula devido aos processos não-radiativos citados anteriormente e pela equação (1), temos que o comprimento de onda de emissão será sempre maior do que o comprimento de onda de absorção, sendo chamado de deslocamento de Stokes.

Figura 5. Diagrama de Jablonski.

Fonte: autora.

A espectroscopia de fluorescência de estado estacionário se trata da detecção e análise da emissão fluorescente através de um espectrofluorímetro de excitação contínua (Figura 6). O aparato possui uma lâmpada com emissão de espectro contínuo e um monocromador de excitação para controlar o comprimento de onda da luz proveniente da fonte de luz. O feixe de luz emitido pela amostra passa então por um monocromador de emissão para definir o comprimento de onda em que será feita a medida e uma fotomultiplicadora para a determinação da intensidade de luz

Figura 6. Esquema de um espectrofluorímetro estático.

Fonte: [37]

emitida naquele comprimento de onda. Para evitar a detecção da luz que excitou a amostra, o monocromador de emissão está configurado a um ângulo de 90° em relação à fonte de excitação.

2.1.2.1. Tempo de vida fluorescente

Como muitos eventos em sistemas biológicos envolvem tempos da ordem daqueles relacionados à fluorescência, é de interesse a resolução temporal da emissão fluorescente e a obtenção do perfil de decaimento da fluorescência, bem como a determinação do tempo que a amostra permanece no estado excitado. ^[37] Na Figura 7 temos o esquema de um espectrofluorímetro com resolução temporal que faz uso do método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (*Time-Related Single Photon Counting*, TCSPC). Diferentemente do espectrofluorímetro estático, a excitação da amostra é feita com uma fonte de *laser* pulsado, cuja largura do pulso é da ordem de 10^{-12} s.

Figura 7. Esquema de um espectrofluorímetro com resolução temporal.

Fonte: [37].

O pulso é detectado quando passa pela primeira multiplicadora, gerando um sinal de partida. Quando a amostra absorve a luz pulsada, emite um pulso de luz de fluorescência, sendo detectado pela segunda fotomultiplicadora do esquema da Figura 7, gerando um sinal de chegada. Estes sinais são correlacionados por um conversor tempo-amplitude (TAC), cuja voltagem é proporcional ao tempo entre os sinais de partida e de chegada. A voltagem do TAC é convertida

para um canal de tempo em um analisador multicanal (MCA) através de um conversor digital-analógico (ADC). O MCA então constrói um histograma do número de contagens em função dos canais de tempo. Após um número grande de eventos (geralmente 10.000 contagens no pico) e fazendo a aquisição em um grande número de canais, o histograma se aproxima bastante do perfil de decaimento temporal da intensidade de fluorescência (Figura 8). Devido a questões experimentais em relação à estatística de contagem dos fótons, não deve haver mais que um fóton detectado em 100 pulsos de excitação emitidos pelo *laser*. Desta forma, o histograma dos tempos de chegada dos fótons representa o decaimento da intensidade de fluorescência da amostra.

Figura 8. (a) Histograma de contagens. (b) Medida experimental do decaimento de intensidade.

Fonte: [37].

A fonte pulsada ao excitar a amostra cria uma população inicial N_0 no estado excitado, onde a taxa de decaimento desta população pode ser escrita da forma:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_f + k_{nr})N(t) \quad (4)$$

Onde k_f é a taxa de decaimento por emissão fluorescente e k_{nr} é a taxa de decaimento não-radiativo. Assumindo que em $t = 0$ a população do estado excitado é $N = N_0$ e em $t = \infty$, $N = 0$, a população do estado excitado em t será:

$$N(t) = N_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (5)$$

Onde

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}} \quad (6)$$

É o tempo de vida da fluorescência. Ao realizar medidas de tempo de vida de fluorescência não se observa o número de moléculas excitadas, mas a intensidade de fluorescência $I(t)$, a qual é proporcional a $N(t)$. Então, (6) pode ser reescrita como:

$$I(t) = I_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (7)$$

Com I_0 sendo a intensidade no tempo zero. O valor médio de tempo que uma molécula permanece no estado excitado é dado por:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^\infty t I(t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt} = \frac{\int_0^\infty t I_0 e^{\frac{-t}{\tau}} dt}{\int_0^\infty I_0 e^{\frac{-t}{\tau}} dt} = \tau \quad (8)$$

Ou seja, para um decaimento exponencial, o tempo de vida é igual ao tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado. Quando existe mais de uma espécie de fluoróforo ou o decaimento é mais complexo sendo inviável o ajuste com apenas um τ , denomina-se um decaimento multiexponencial. Nesses casos, cada tempo τ_i representa o decaimento da fluorescência de um estado i e o ajuste dos decaimentos é dado por uma somatória de exponenciais, onde cada estado está associado a um fator pré-exponencial A_i :

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (9)$$

Então por (9) temos que:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^\infty t I(t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i} \quad (10)$$

A contribuição individual de cada tempo de vida é dada por:

$$\alpha_i = \frac{A_i \tau_i}{\sum_{j=1}^n A_j \tau_j} \quad (11)$$

2.1.2.2. Anisotropia de fluorescência

A anisotropia da fluorescência está relacionada às propriedades de absorção de luz polarizada por um fluoróforo e as características de polarização da luz emitida pelo mesmo. A origem deste fenômeno está baseada na existência de momentos de dipolos de transição da absorção e emissão, que estão alinhados ao longo de direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo.

Os fluoróforos quando no estado fundamental são orientados aleatoriamente em uma solução homogênea e ao serem expostos à luz polarizada, as moléculas que têm seus momentos de dipolo de transição orientados na direção do vetor campo elétrico da radiação incidente são preferencialmente excitadas. Se a população dos estados excitados não está orientada aleatoriamente, o resultado seria uma emissão polarizada. Medições de anisotropia revelam o deslocamento médio angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton. Este deslocamento angular depende da velocidade e extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Os movimentos de difusão interna, por sua vez, dependem da viscosidade do solvente, do tamanho e da forma das espécies que sofrem difusão.

Figura 9. Esquema para medida de anisotropia estática.

Fonte: [40].

Na Figura 9 está representada a configuração dos aparatos para a medida da anisotropia de fluorescência estática. Uma fonte de luz monocromática com polarização na direção vertical paralela ao eixo z excita a amostra. A luz emitida pela amostra passa então por polarizadores em

duas configurações: com orientação paralela ao eixo z ($I_{\parallel}$) e com orientação perpendicular ao eixo z ($I_{\perp}$). A anisotropia de fluorescência é definida pela relação:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (122)$$

A anisotropia é uma quantidade adimensional que independe da intensidade total da amostra, pois a diferença $I_{\parallel} - I_{\perp}$ é normalizada pela intensidade total, dada por $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$.

Em uma amostra homogênea em um solvente isotrópico, as moléculas no estado fundamental estão orientadas aleatoriamente. Esta amostra é então excitada por uma luz polarizada ao longo do eixo z. Supondo que os fluoróforos não apresentam difusão rotacional, então seus momentos de dipolo de absorção e emissão serão paralelos, seguindo o sistema de coordenadas da Figura 9, onde os ângulos entre estes momentos de dipolo e os eixos z e y são θ e ϕ . Teremos então que:

$$I_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos^2\theta \quad \text{e} \quad I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2\theta \sin^2\phi \quad (13)$$

Devido à homogeneidade do sistema, nem todas as moléculas serão excitadas pela luz polarizada, ocorrendo o efeito de fotosseleção: as moléculas excitadas terão distribuição preferencial ao longo da direção da polarização, excluindo a dependência em ϕ uma vez que a fração de moléculas excitadas tem distribuição simétrica em torno do eixo z. Então, ao calcular a média de moléculas excitadas utilizando (13) e a relação em (12), a anisotropia média pode ser escrita na forma:

$$r = \frac{3\langle \cos^2\theta \rangle - 1}{2} \quad (143)$$

Onde o valor de r possui uma dependência com o valor médio do cosseno do ângulo θ . Para um único fluoróforo orientado ao longo do eixo z com transições colineares, $\theta = 0$ e $r = 1$.

Entretanto, não é possível obter uma população no estado excitado perfeitamente orientada excitando óticamente soluções homogêneas. Por isso, as anisotropias são sempre menores que 1. Outro ponto importante é notar que são raros os casos em que os momentos de dipolo de absorção e emissão são paralelos, havendo um ângulo α entre eles. Refazendo os cálculos tendo isso em vista, obtém-se uma equação em função deste ângulo:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} \right) \quad (154)$$

Onde o termo r_0 é usado para se referir à anisotropia observada na ausência de outros processos de despolarização como difusão rotacional ou transferência de energia.

Note que quando os dipolos de absorção e emissão são coplanares, o valor da anisotropia é 0,4 e para os dipolos perpendiculares entre si, a anisotropia vai a -0,2. É oportuno registrar também que experimentos para medidas da anisotropia podem resultar em valores maiores que 0,4, o que ocorre principalmente quando há influências de espalhamento. No processo de espalhamento não há mudança na direção de polarização da radiação e se o feixe de luz incidente está polarizado na direção vertical, os fótons espalhados por partículas presentes no meio também estarão polarizados na direção vertical. Desse modo esses fótons contribuirão apenas com a componente de intensidade paralela, aumentando a anisotropia. Se na medida experimental existir apenas espalhamento, não haverá componente perpendicular e a anisotropia terá o valor 1,0.

Na prática, as medidas de anisotropia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo são realizadas, em geral, utilizando-se o método do Formato-L. Neste método os fluorímetros usam um único canal de emissão. O monocromador de excitação polariza parcialmente a luz incidente. Como resultado, a rotação do polarizador de excitação para as posições horizontal (H) e vertical (V) dá origem a diferentes intensidades da luz incidente. Similarmente, o monocromador de emissão tem eficiência diferente para transmissão da luz polarizada horizontalmente e verticalmente. Consequentemente, a rotação do polarizador de emissão muda a sensibilidade efetiva do canal de emissão. O objetivo é medir as intensidades $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ independentemente do sistema de detecção.

Na Figura 10, os polarizadores de excitação estão denotados pelas letras H e V, sendo orientação horizontal e vertical, respectivamente, e os polarizadores de emissão combinam a orientação configurada com a orientação da excitação. As intensidades observadas verticalmente e horizontalmente quando a amostra é excitada com polarização vertical são:

$$I_{VV} = k S_V I_{\parallel} \quad (165)$$

)

$$I_{VH} = k S_H I_{\perp} \quad (17)$$

Figura 10. Esquema do equipamento para medida de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo com excitação vertical (a) e excitação horizontal (b).

Fonte: [37].

Sendo k um fator de proporcionalidade que leva em consideração o rendimento quântico do fluoróforo e S_V e S_H são os fatores que descrevem a sensibilidade do sistema de detecção para polarizações vertical e horizontal respectivamente. Então:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (18)$$

e assim, a razão entre as intensidades de emissão paralela e perpendicular à excitação, depende do fator G , que é dado pela razão entre as sensibilidades do sistema de detecção para a luz polarizada verticalmente e horizontalmente. Seguindo estas relações, a anisotropia pode ser escrita em função das intensidades I_{VV} e I_{VH} e do fator G :

$$r = \frac{I_{\parallel}/I_{\perp} - 1}{I_{\parallel}/I_{\perp} + 2} = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (19)$$

Os cálculos até agora foram feitos supondo que não há difusão rotacional, onde a população de fluoróforos não se move durante os processos de absorção e emissão fluorescente. Quando há difusão rotacional da molécula ocorre uma diminuição nos valores da anisotropia. Uma maneira de amenizar os efeitos da difusão rotacional é ligar o fluoróforo a uma macromolécula, como por exemplo membranas modelo. Neste sistema, haveria pouca ou nenhuma alteração angular nos momentos de dipolo das moléculas causando um aumento no valor da anisotropia.

Se o fluoróforo é excitado com um pulso de luz verticalmente polarizado, o decaimento da anisotropia é determinado pela medida da dependência temporal das componentes verticalmente e horizontalmente polarizadas da emissão. A anisotropia dependente do tempo é:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)} \quad (20)$$

A difusão rotacional para rotores esféricos pode ser relacionada com a anisotropia através da equação de Perrin:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\varphi} = 1 + 6D\tau \quad (21)$$

Onde τ é o tempo de vida de fluorescência, φ é o tempo de correlação rotacional e D é o coeficiente de difusão rotacional. Se o tempo de correlação é muito maior do que o tempo de vida ($\varphi \gg \tau$), então a anisotropia medida (r) é igual à anisotropia fundamental (r_0). Se o tempo de correlação é muito menor do que o tempo de vida ($\varphi \ll \tau$), então a anisotropia é zero. Para uma molécula esférica o decaimento resolvido no tempo da anisotropia $r(t)$, após um pulso de excitação é uma exponencial simples:

$$r(t) = r_0 e^{-\frac{t}{\varphi}} = r_0 e^{-6Dt} \quad (226)$$

Nesta equação, o tempo de correlação rotacional do fluoróforo é dado por:

$$\varphi = \frac{\eta V}{RT} \quad (23)$$

onde η é a viscosidade, T é a temperatura em kelvins, R é a constante dos gases e V é o volume do rotor molecular. O tempo de correlação rotacional é relacionado com o coeficiente de difusão rotacional por $\varphi = (6D)^{-1}$ e somente moléculas esféricas apresentam um decaimento de anisotropia monoexponencial.

A anisotropia de estado estacionário pode ser calculada a partir da média do decaimento da anisotropia $r(t)$ sobre o decaimento de intensidade $I(t)$.

$$\langle r \rangle = r = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\varphi}} \quad (247)$$

Que é a equação de Perrin (21). Caso o fluoróforo tenha mais de um tempo de vida fluorescente, a anisotropia média será:

$$r = \frac{\int_0^\infty r(t) \sum_{i=1}^n [\alpha_i \exp(-t/\tau_i)] dt}{\int_0^\infty \sum_{i=1}^n [\alpha_i \exp(-t/\tau_i)] dt}$$

Resolvendo as integrais, obtemos:

$$r = r_0 \varphi \left[\frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\alpha_i \tau_i}{\phi + \tau_i} \right)}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \right] \quad (258)$$

Note que se o fluoróforo tiver apenas um tempo de vida, ou seja, $i = 1$, a equação retorna à forma dada pela equação (24).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A Artepilina C (pureza 98,43%) foi adquirida da Apis Flora, os fosfolipídios Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids e os surfactantes Dodecil sulfato de sódio (SDS), Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), Hexadecildimetilamônio propanosulfato (HPS) e Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O tampão citrato (ácido cítrico 0,1 M) e fosfato (fosfato sódico dibásico 0,2 M) e os solventes orgânicos metanol e clorofórmio são de qualidade analítica.

Tabela 2 - Valores da temperatura de transição T_c , concentração micelar crítica (CMC) e informações sobre a estrutura dos anfifílicos utilizados.

Anfifílico	T_c (°C)	CMC (M)	Fórm. química	Estrutura química
CTAB	-	$0,92 \times 10^{-3}$	$C_{19}H_{42}BrN$
DMPC	24	$6,00 \times 10^{-9}$	$C_{36}H_{72}NO_8P$
DMPG	23	11×10^{-6}	$C_{34}H_{66}O_{10}PNa$
DODAB	42,7~45	$3,7 \times 10^{-9}$	$C_{38}H_{80}BrN$
HPS	-	$(10 \sim 60) \times 10^{-9}$	$C_{21}H_{45}NO_3S$
SDS	-	$(7 \sim 10) \times 10^{-3}$	$C_{12}H_{25}SO_4Na$

Fontes: [41–46]

3.2. Titulação ácido-base para determinação de pKa

Soluções estoque de Artepilina C na concentração de 30 mM foram preparadas ao solubilizar o composto em metanol. Para determinar o pKa da Artepilina C, foram preparadas 25 soluções tampão citrato-fosfato com pH variando entre 2,6 e 9,0 ao variar as proporções de cada tampão, em frascos de vidro de 5 mL e adicionadas alíquotas da solução estoque de modo que a concentração final fosse 20 μ M. A partir dos espectros de absorção coletados para cada amostra,

foi obtida uma curva de titulação pH x comprimento de onda de máxima absorbância e o pKa foi determinado pelo ajuste da curva. Todas as medidas deste trabalho foram realizadas a 25 °C, com exceção para as medidas obtidas com as vesículas fosfolipídicas, detalhadas na seção 2.5.

3.3. Artepilina C em tampão

Alíquotas da solução estoque foram adicionadas em cubetas com tampão citrato-fosfato com concentrações de 10 a 100 μ M. O tampão foi preparado ao se adicionar proporções de tampão citrato e do tampão fosfato com água Milli-Q de acordo com o pH desejado (3,0, 4,9 e 7,0). Para medidas de força iônica do meio foi adicionado 100 mM de NaCl no tampão citrato-fosfato para pH 3,0 e 7,4 e concentrações de 5-20 μ M de Artepilina C.

3.4. Preparação de micelas

Micelas de SDS, CTAB e HPS foram preparadas a partir da adição de tampão citrato-fosfato (em pH 3,0, 5,5 e 7,4) em frascos contendo os respectivos surfactantes. Para garantir a formação de micelas, a adição do tampão foi em volume necessário para que a concentração final da suspensão fosse acima da concentração micelar crítica (CMC) para cada um dos surfactantes (SDS 15 mM e ambos CTAB e HPS 3 mM) – ver Tabela 2.

3.5. Preparação das vesículas fosfolipídicas

As vesículas unilamelares grandes (LUVs) utilizadas no trabalho foram obtidas pelo método de extrusão, onde ocorre a passagem da suspensão lipídica por membranas de policarbonato com poros de 0,1 μ m inseridas no extrusor *Mini-extruder Avanti*.

Para a preparação da suspensão lipídica, foram feitos filmes finos de cada fosfolipídio com concentração 1 mM ao dissolvê-los em 200 μ L de clorofórmio em tubos de ensaio, seguido de agitação e evaporação contínuos do solvente sob o fluxo de N₂. O filme resultante foi colocado no dessecador a vácuo por no mínimo 2 horas e logo após hidratado pela adição de tampão citrato-fosfato no pH desejado acima da temperatura de transição do lipídio (T_c), controlada por um termopar durante todo o processo até a obtenção das vesículas. Após a hidratação, as suspensões

contendo as MLVs (vesículas unilamelares) foram obtidas a partir da agitação do tubo por no mínimo dois minutos.

Em seguida, a suspensão foi colocada em uma seringa e injetada em um dos lados do extrusor, onde havia uma segunda seringa vazia para que recebesse a suspensão após a passagem pelo filtro. A filtragem foi repetida 19 vezes de modo que a última passagem preencheu a segunda seringa para minimizar a contaminação com as partículas maiores da filtração inicial. A suspensão extrusada é retirada da seringa e transferida para um *ependorf* para posterior análise das vesículas.

As medidas com vesículas foram feitas em temperaturas abaixo e acima da transição da fase gel para a fase fluida. As temperaturas foram de 16 °C e 34 °C para os fosfolipídios DMPG e DMPC, e 16 °C e 50 °C para o anfifílico DODAB. O pH do tampão citrato-fosfato foi ajustado para 3,0 e 7,4.

Uma alíquota da suspensão de vesículas diluída em tampão foi adicionada em uma cubeta para a averiguação do diâmetro através da utilização do equipamento *Zetasizer 3000 HS_A* da *Malvern Instruments*, o qual se encontra no laboratório de Físico-Química de Superfícies e Coloides do Departamento de Química da FFCLRP-USP. Nestas medidas de DLS, o diâmetro médio das partículas é 117,3 nm e possui de baixa à média polidispersidade (Pdl) com índice médio de 0,373.

3.6. Medidas de espectroscopia de absorção

As medidas de absorção ótica foram realizadas no espectrofotômetro *Amersham Ultrospec 2100 pro* disponível em nosso laboratório de Fotobiofísica, no Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) na Universidade de São Paulo. O equipamento nos permite fazer medidas com comprimentos de onda entre 190 e 900 nm e absorbância entre -3,0 e 3,0.

3.7. Medidas de espectroscopia de fluorescência de estado estacionário

Para as medidas de emissão fluorescente e anisotropia de estado estacionário, foi utilizado o espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* em nosso laboratório. Este possui uma lâmpada de xenônio de 150 W como fonte de luz de excitação, podendo varrer o intervalo de comprimento de onda de

excitação e emissão de 200 a 750 nm. Os experimentos foram realizados com comprimento de onda de excitação fixado em 310 nm e abertura de fendas de 5,0 nm.

3.8. Medidas de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Os experimentos foram feitos utilizando como fonte de excitação um *laser* pulsado *Tsunami 3950* (*Spectra Physics*) de titânio-safira bombeado pelo *laser* de estado sólido *Millennia Xs*. Os fótons emitidos pelas amostras foram detectados pela fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu C4878*. O laser de estado sólido tem uma saída com potência máxima de 10 W no comprimento de onda de 532 nm. A saída do laser é dada entre 850 e 930 nm, que pode ser escolhido com o auxílio de geradores harmônicos podendo dobrar ou triplicar a frequência. A largura à meia altura da função de resposta do instrumento é tipicamente 0,2 a 0,5 ns. As medidas foram feitas com uma resolução temporal de 24 ps por canal. O software F900 fornecido pela *Edinburgh Instruments* foi utilizado para análise dos perfis de decaimento obtidos. A inspeção do ajuste dado pelo software foi feita pela observação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico χ^2 (*chi-square*) reduzido. Para as medidas dos perfis de decaimento da anisotropia foi utilizado um compensador *Babinet-Soleil BSC100* da *Halbo Optics* no feixe de excitação e um polarizador P920 da *Edinburgh Instruments* de prisma *Glan-Tompson* no feixe de emissão. A temperatura da amostra foi controlada por banho térmico e o comprimento de onda utilizado para excitar a amostra foi 296 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Efeitos de pH: determinação do pKa

Soluções tampão contendo Artepilina C em baixa concentração, 20 μM , foram preparadas e os espectros de absorção do composto foram obtidos conforme descrito na Seção 3.2. Com o aumento do pH da solução (Figura 11.a), foi observado um deslocamento do pico de máxima absorção de 310 nm para 290 nm. Em baixas concentrações, as mudanças no equilíbrio ácido-base do composto são fatores importantes associados a alterações na banda principal de absorção e este deslocamento do comprimento de onda máximo reflete as mudanças no estado de protonação do grupo carboxila.

Figura 11. (a) Espectro de absorção da Artepilina C com a variação do pH entre 2,6 e 9,2 normalizado na intensidade máxima da banda de absorção. (b) Curva de titulação da Artepilina C: comprimento de onda do pico da banda de absorção em função do pH do meio. Concentração da Artepilina C: 20 μM . Tampão citrato-fosfato. Temperatura: 25 °C.

O ponto de pKa é o valor do pH em que há o equilíbrio entre as formas protonada e desprotonada do grupo carboxila da Artepilina C. Para determiná-lo, foi feita uma curva de titulação dada pelo gráfico do comprimento de onda do pico de absorção em função do pH (Figura 11.b) e o ajuste foi feito utilizando a sigmoide de Boltzmann, obtendo-se o valor de $4,65 \pm 0,03$. Baseando-se neste dado, a Artepilina C possui dois estados: neutra (meio ácido, abaixo de 4,65) e carregada negativamente (acima de 4,65). Além da mudança no comprimento de onda de absorção, observou-se um aumento da absorbância com o aumento do pH. O coeficiente de absorção molar ϵ variou de $0,61 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em meio ácido para $2,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em pH neutro.

Na forma neutra, em pH ácido abaixo de 4,65, o pico de absorção ocorre em 310 nm na região do ultravioleta próximo e possui coeficiente de absorção molar baixo. Na forma desprotonada, em pH acima de 4,65, o pico de absorção deslocou para 290 nm e possui coeficiente de absorção molar alto se comparado com a molécula neutra. Isto sugere que, na Artepilina C desprotonada, a distribuição eletrônica é mais deslocalizada e menos estruturada do que nas espécies protonadas ou neutras, afetando a magnitude do momento do dipolo estático nos estados fundamental e excitado, o que resulta em um deslocamento para o azul da banda de absorção eletrônica como descrito para complexos moleculares funcionalizados com grupo carboxila ^[47] e também para compostos orgânicos como o ácido orto-aminobenzóico e derivados. ^[48–50]

4.2. Efeitos de concentração em diferentes valores de pH

Com o estudo anterior, assumiu-se que para valores de pH abaixo (3,0) e acima (7,0) do pKa da Artepilina C, o composto está predominantemente nas formas neutra e aniônica respectivamente, e para o pH próximo ao pKa as duas espécies estão presentes.

4.2.1. pH 3,0: Artepilina C neutra

Em uma cubeta contendo solução tampão citrato-fosfato pH 3,0 a 25 °C, foram adicionadas alíquotas de solução estoque de Artepilina C [30 mM] com o intuito de variar a concentração de 10 a 100 μ M, conforme descrito na Seção 3.3. No espectro de absorção (Figura 12.a) observa-se que a banda centrada em 315 nm está presente em todas as concentrações e acima de 50 μ M de Artepilina C, uma nova banda centrada próximo a 360 nm aparece, cuja absorbância aumenta em concentrações mais elevadas. O espectro de emissão fluorescente da Artepilina C foi obtido ao excitar as amostras em 310 nm, observando a intensidade máxima de emissão próximo a 425 nm independente da concentração (Figura 12.b).

Figura 12. (a) Espectro de absorção normalizado da Artepilina C em concentrações diferentes. (b) Espectro de emissão fluorescente da Artepilina C em concentrações diferentes, excitação em 310 nm. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperatura: 25 °C.

Para melhor visualização das mudanças no espectro de absorção, uma subtração da linha de base foi feita seguida de uma convolução (Figura 13). Acima de 50 μM nota-se o surgimento de um ombro por volta de 360 nm e o espectro se alarga para concentrações acima de 70 μM . Em concentrações baixas (até 40 μM), o espectro corrigido pode ser expressado por uma gaussiana com centro próximo a 312 nm. Em concentrações intermediárias (50 μM), aparece a contribuição de uma segunda gaussiana centrada próxima a 347 nm e em concentrações elevadas

Figura 13. (a) Espectro de absorção corrigido por subtração da linha de base da Artepilina C em diferentes concentrações (de baixo para cima, 10, 30, 50, 70, 80 μM em tampão citrato-fosfato, pH 3,0. (b) Ajuste (vermelho) das curvas Gaussianas (verde) do espectro (preto) de Artepilina C 80 μM .

(acima de 60 μM), há a contribuição de uma terceira gaussiana centrada próxima a 400 nm. Os dados da convolução gaussiana estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Ajuste do espectro de absorção da Artepilina C em solução tampão citrato-fosfato em pH 3,0 para a soma das bandas gaussianas. Parâmetros P_i , h_i , w_i e A_i são o comprimento de onda, a altura, a largura da meia altura e a área do pico i , respectivamente

[ArtC] (μM)	P_1 (nm)	h_1	w_1 (nm)	A_1	P_2 (nm)	h_2	w_2 (nm)	A_2	P_3 (nm)	h_3	w_3 (nm)	A_3	Soma área
10	314	0,06	54,7	3,75	-	-	-	-	-	-	-	-	3,70
20	315	0,05	48,0	2,06	-	-	-	-	-	-	-	-	2,10
30	312	0,16	42,4	8,82	-	-	-	-	-	-	-	-	8,80
40	310	0,14	42,9	7,79	-	-	-	-	-	-	-	-	7,80
50	312	0,17	38,9	8,44	343	0,05	57,9	3,80	-	-	-	-	12,3
60	311	0,20	41,0	10,3	347	0,05	52,9	3,60	398	0,02	108	2,00	15,9
70	311	0,21	35,0	9,20	347	0,16	55,6	9,60	399	0,05	112	4,40	23,2
80	313	0,25	36,5	11,3	360	0,15	46,6	8,80	397	0,08	90,0	8,90	30,0
90	313	0,21	32,8	8,62	369	0,14	64,5	11,3	429	0,08	113	11,2	31,1
100	314	0,20	32,1	8,05	371	0,12	69,7	10,9	436	0,08	126	13,0	32,0

Como descrito anteriormente, em pH 3,0 o grupo carboxila se encontra protonado e a molécula está na forma eletricamente neutra. Desta forma, é possível que as moléculas se agregaram devido às interações hidrofóbicas.^[50] As espécies formadas podem estar na forma de agregados do tipo J, expressos pelo comprimento de onda mais longo (por volta de 350 nm) na banda de absorção.^[51]

Ao excitar as amostras em 310 nm, o espectro de emissão é caracterizado por uma emissão larga centrada próxima a 425 nm independente de sua concentração (Figura 12.b). A intensidade da emissão não aumenta linearmente com a concentração devido aos efeitos de filtro interno causados pela alta absorção das amostras mais concentradas. Como as soluções mais concentradas apresentam alta absorbância, tanto em comprimentos de onda de excitação quanto de emissão, os efeitos de filtro interno se sobressaem.

4.2.2. pH 7,0: Artepilina C carregada negativamente

Em pH neutro, o espectro de absorção da Artepilina C nas concentrações variando de 10 a 100 μM possuem uma banda larga centrada em 291 nm, que corresponde ao estado desprotonado e negativamente carregado da molécula (Figura 14.a). A absorbância no pico segue a lei de Beer-Lambert (Eq. 3), com crescimento linear ao aumentar a concentração de Artepilina C (Figura 14.b).

Figura 14. (a) Espectro de absorção normalizado da Artepilina C em concentrações diferentes. (b) Absorbância em relação à concentração em 291 nm. Tampão citrato-fosfato pH 7,0. Temperatura: 25 °C.

O espectro de emissão fluorescente foi obtido ao excitar a amostra em 310 nm. O espectro é largo com emissão máxima próximo a 400 nm (Figura 15.a). A intensidade não aumenta linearmente com a concentração devido ao alto valor do coeficiente de absorção molar. A correção da intensidade por causa dos efeitos de filtro interno mostra um desvio da linearidade.

Em pH 7,0 é notável o aparecimento de uma nova banda com emissão acima de 450 nm. Uma possibilidade para esta emissão é a ocorrência de formas isoméricas de Artepilina C desprotonada. Diferentes formas isoméricas envolvendo o grupo carboxila resultam em interações diferentes com as moléculas de água doadoras de próton, tanto experimentalmente quanto em cálculos de estruturas eletrônicas. [48,52]

Figura 15. (a) Espectro de emissão fluorescente da Artepilina C. (b) Correção de filtro interno na intensidade de emissão fluorescente com o aumento da concentração de Artepilina C. Excitado em 310 nm. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato, pH 7,0. Temperatura: 25 °C.

4.2.3. pH 4,9: espécies protonadas e desprotonadas de Artepilina C

O espectro de absorção da Artepilina C em solução tampão citrato-fosfato, pH 4,9, é largo e possui máximo próximo a 296 nm, com uma notável contribuição de uma banda com máximo próximo a 360 nm em concentrações mais elevadas (Figura 16.a). Comparando os espectros obtidos pela curva de titulação, os dados indicam a coexistência de ambas as formas, protonada e desprotonada, do grupo carboxila na Artepilina C.

Figura 16. (a) Espectro de absorção normalizado da Artepilina C variando a concentração de 10 a 100 μM . (b) Ajuste (vermelho) das curvas Gaussianas (verde) do espectro de Artepilina C 100 μM (preto), corrigido com subtração da linha de base. Tampão citrato-fosfato, pH 4,9. Temperatura: 25 °C.

Em concentração baixa, 20 μM , o espectro de absorção pode ser ajustado em duas gaussianas, uma centrada em 293 nm com altura 0,98 e outra em 313 nm com altura 0,09. O espectro é dominado pelas espécies desprotonadas por causa de sua alta absortividade molar ($2,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) comparado com a forma protonada ($0,61 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Por outro lado, em alta concentração, 100 μM , a absorbância é ajustada com três gaussianas centradas em 298, 318 e 334 nm, com alturas 0,42, 0,42 e 0,45 respectivamente (Figura 16.b) e podemos observar a contribuição de uma banda larga em comprimento de onda maior, indicando que provavelmente agregados estão se formando envolvendo formas protonadas de Artepilina C, presentes em pH 4,9. Os dados do ajuste estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Ajuste do espectro de absorção da Artepilina C em solução tampão citrato-fosfato pH 4,9. Parâmetros P_i , h_i , w_i e A_i são comprimento de onda de máxima absorbância, altura, largura e área do pico i , respectivamente

[ArtC] (μM)	P_1 (nm)	h_1	w_1 (nm)	A_1	P_2 (nm)	h_2	w_2 (nm)	A_2	P_3 (nm)	h_3	w_3 (nm)	A_3	Soma área
20	293	0,98	52,0	64,0	313	0,09	-	-	-	-	-	-	-
100	298	0,42	24,7	13,0	318	0,42	25,3	13,5	334	0,45	41,7	23,8	50,3

Figura 17. Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C variando a concentração. Amostras excitadas em 310 nm. Tampão citrato-fosfato, pH 4,9. Temperatura: 25 °C.

O espectro de emissão fluorescente foi obtido excitando as amostras em 310 nm (Figura 17). Os espectros são relativamente largos com emissão máxima próxima a 410 nm. As intensidades não aumentam linearmente com a concentração, pois as medidas foram afetadas pelo

alto coeficiente de absorção molar da absorção no comprimento de onda de excitação, como também obtido para os casos estudados em pH 3,0 e 7,0.

Uma comparação dos espectros de emissão em diferentes valores de pH, com excitação em 310 nm, é ilustrada na Figura 18. De forma similar aos espectros de absorção, a posição espectral da banda de emissão depende do pH do meio: o comprimento de onda de máxima emissão é localizado em 425 nm na forma protonada da Artepilina C (pH 3), próximo ao pKa, o máximo de emissão ocorre em 410 nm (pH 4,9); e para as espécies desprotonada de Artepilina C, o pico de emissão ocorre em 400 nm (pH 7,0).

Figura 18. Espectro de emissão da Artepilina C 80 μ M em pH 3,0 (preto), 4,9 (vermelho) e 7,0 (azul). Comprimento de onda de excitação 310 nm. Temperatura: 25 °C.

O deslocamento para o azul observado está também relacionado a deslocalização e menor estruturação dos elétrons na molécula carregada, como foi discutido para o espectro de absorção da Artepilina C. ^[53] Devido aos processos de relaxação diferentes do solvente para o estado excitado e da transição de dipolo dos isômeros, o comprimento de onda de emissão pode ser diferente com a ocorrência de dupla emissão. ^[50,54] Em pH baixo, os isômeros protonados neutros devem possuir interações similares por pontes de hidrogênio com as moléculas da água.

4.2.4. Decaimento da intensidade fluorescente e anisotropia resolvida no tempo

Amostras de 20 e 80 μ M de Artepilina C em pH 3,0, 4,9 e 7,0 foram utilizadas para os experimentos com resolução temporal excitadas com *laser* pulsado em 296 nm. Para ajustar os perfis de decaimento (Figura 19) foram necessárias curvas triexponenciais (Tabela 5), tendo em

vista o valor do χ^2 . O tempo de vida médio foi calculado pela Eq. (10) e os fatores pré-exponenciais normalizados pela Eq. (11).

O tempo de vida mais curto, por volta de 30 a 60 ps, é o predominante tendo em vista o valor do fator pré-exponencial normalizado. O tempo de vida intermediário, próximo a 0,60 ns, também está presente e para um melhor ajuste, foi necessária mais uma componente com um tempo de vida longo (acima de 2,0 ns), mas com contribuição muito baixa. Os tempos de vida médios estão na região de centenas de picosegundos, mostrando que processos não-radiativos muito eficientes dominam o decaimento do estado excitado.

Figura 19. Perfil de decaimento da intensidade da Artepilina C, 80 μM , em pH 3,0 (vermelho), 4,9 (azul) e 7,0 (rosa). Excitação 296 nm, emissão 400 nm. Tampão citrato-fosfato. Temperatura: 25 °C. A curva em preto representa a Função de Resposta do Instrumento (IRF).

Tabela 5 - Tempo de vida da i -ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i -ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Tampão citrato-fosfato em pH 3,0, 4,9 e 7,0. Comprimento de onda de excitação em 296 nm e emissão em 400 nm. Temperatura: 25 °C

pH – Tampão Citrato-fosfato	[Artepilina C] (μM)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	$\langle\tau\rangle$ (ns)
3,0	20	0,05	0,94	0,60	<0,06	3,45	<0,01	0,46
4,9		0,07	0,97	0,66	<0,03	3,42	<0,01	0,62
7,0		0,06	0,98	0,80	<0,02	3,20	<0,01	0,18
3,0	80	0,04	>0,98	0,54	<0,02	2,01	<0,01	0,20
4,9		0,03	>0,99	0,81	<0,01	4,05	<0,01	0,26
7,0		0,03	>0,99	0,89	<0,01	4,18	<0,01	0,20

A anisotropia em estado estacionário foi medida em pH 3,0, 4,9 e 7,0 e os valores obtidos são relativamente altos: 0,21, 0,16 e 0,20 para 20 μM e 0,19, 0,25 e 0,20 para 80 μM de Artepilina C, respectivamente. Os resultados devem levar em conta que a anisotropia no estado estacionário depende do decaimento da intensidade e do decaimento da anisotropia.^[55] Em pH acima, os tempos de correlação rotacional para o decaimento da anisotropia foram de 0,44, 0,46 e 0,59 ns para 20 μM e 0,54, 0,73 e 0,64 ns para 80 μM de Artepilina C, respectivamente. Como os valores de tempo de vida dominantes são muito curtos (Tabela 5), o estado excitado é depopulado antes que os dipolos de emissão executem a difusão rotacional. Portanto, a emissão ocorre muito antes da rotação dos fluoróforos e o valor da componente perpendicular à direção da excitação é pequeno, resultando em valores altos para a anisotropia no estado estacionário.

Apesar de os valores para o tempo de vida fluorescente da Artepilina C serem tão curtos e conterem erros de espalhamento da lâmpada, ainda assim os valores foram utilizados como parâmetros, pois ao ignorar estes valores estaremos avaliando apenas 10% dos fótons emitidos pela amostra (ver Figura 19). Além disso, estes dados de tempo de vida nos ajudam a explicar os valores altos obtidos de anisotropia.

A partir dos dados resolvidos no tempo, foi possível calcular um valor médio para a anisotropia,^[56] resultando em valores entre 0,13 e 0,28 (Tabela 6), onde a Eq. (25) foi utilizada.

Tabela 6 - Anisotropia estacionária (r_s), tempo de correlação rotacional (ϕ), anisotropia inicial (r_0) e anisotropia média calculada ($\langle r \rangle$)

pH – Tampão Citrato-fosfato	[Artepilina C] (μM)	r_s	ϕ (ns)	r_0	$\langle r \rangle$
3,0	20	0,21	0,44	0,40	0,17
4,9		0,16	0,46	0,36	0,20
7,0		0,20	0,59	0,37	0,26
3,0	80	0,19	0,54	0,22	0,13
4,9		0,25	0,73	0,34	0,21
7,0		0,20	0,64	0,35	0,28

4.3. Força iônica do meio: Artepilina C em tampão com NaCl

Devido aos altos valores de absorbância observados para concentrações mais altas, mudou-se a concentração de Artepilina C variando de 5 a 20 μM . No tampão citrato-fosfato, foram adicionados 100 mM de NaCl em pH 3,0 e 7,4.

Na Figura 20 estão os espectros de absorção em pH 3,0 (a) e pH 7,4 (b). Observa-se que para pH 3,0, assim como para a Artepilina C em tampão na ausência de NaCl, o pico de máxima absorção está em 314 nm e ocorre a formação de uma banda de comprimento de onda longo próximo a 360 nm, indicando a formação de agregados. Para pH 7,4, a máxima absorção está em 290 nm, como obtido na ausência de sal. Nos espectros de emissão fluorescente (Figura 21) também não houveram alterações no comprimento de onda. O que se observa de diferente pela adição de NaCl em ambos valores de pH é o aumento do coeficiente de absorção molar se comparado com apenas tampão (Tabela 7) e também a formação do ombro em pH 3,0 ocorre em uma concentração mais baixa do que apenas em solução tampão, juntamente com o aumento do perfil de espalhamento. Uma possível explicação seria o efeito do íon comum: como há sódio no tampão, ao adicionar NaCl na solução, o equilíbrio é deslocado segundo o Princípio de Le Chatelier. No caso do tampão com NaCl e Artepilina C, o aumento do coeficiente de absorção molar nos leva a conclusão de que o equilíbrio da Artepilina C foi deslocado para a forma desprotonada.

Figura 20. Espectros de absorção de Artepilina C normalizados de 5 a 20 μM em tampão citrato-fosfato com NaCl 100 mM em pH 3,0 (a) e pH 7,4 (b). Temperatura 25 °C.

Figura 21. Espectro de emissão fluorescente da Artepilina C de 5 a 20 μM em tampão citrato-fosfato com NaCl 100 mM em pH 3,0 (a) e pH 7,4 (b). Excitado em 310 nm. O pico em 350 nm é o Raman da água. Temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$.

Tabela 7 - Dados do coeficiente de absorção molar ϵ para 20 μM de Artepilina C em tampão citrato-fosfato com e sem a adição de 100 mM de NaCl em pH 3,0 e 7,4. Temperatura: 25 $^{\circ}\text{C}$

Artepilina C [20 μM]	ϵ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] ($\lambda = 300 \text{ nm}$)	
	pH 3,0	pH 7,4
Sem sal	$0,61 \times 10^4$	$2,13 \times 10^4$
Com sal	$1,99 \times 10^4$	$3,95 \times 10^4$

Os dados de tempo de vida (Tabela 8) mostram que o ajuste das curvas de decaimento foi realizado com três componentes, tendo em vista o valor do χ^2 . O tempo de vida médio foi calculado pela Eq. (10) e os fatores pré-exponenciais normalizados pela Eq. (11). O valor do tempo mais longo diminuiu em relação ao tampão sem NaCl, estando abaixo de 2 ns, porém sua contribuição continua extremamente baixa. A anisotropia em estado estacionário permaneceu alta: 0,24 para pH 3,0 e 0,17 para pH 7,4.

Desta forma, temos que os espectros de absorção da Artepilina C nos indicam, então, qual o estado de protonação de acordo com o comprimento de onda de máxima absorção sendo ele próximo a 290 nm para o estado desprotonado, próximo a 315 nm para o estado protonado e em torno de 300 nm para soluções aquosas com ambas as espécies. Abaixo do ponto de pKa, a molécula agrega acima de 50 μM em 360 nm devido a interações hidrofóbicas. Acima do pKa, a Artepilina C não agrega, entretanto, um ombro acima de 450 nm no espectro de emissão fluorescente acusa interações diferentes com formas isoméricas da molécula desprotonada. E nas

imediações do pKa, como há a presença de ambas as espécies, os resultados exibem valores entre os apresentados anteriormente. De acordo com os dados de tempo de vida, a emissão da radiação ocorre muito rapidamente, antes mesmo da rotação do fluoróforo decorrendo em valores elevados de anisotropia.

Tabela 8 - Tempo de vida (τ), fator pré-exponencial normalizado (α) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Tampão citrato-fosfato com 100 mM de NaCl em pH 3,0 e 7,4. Comprimento de onda de excitação em 296 nm e emissão em 400 nm. Temperatura: 25 °C

[Artepilina C] (μ M)	pH 3,0			pH 7,4		
	τ (ns)	α	$\langle\tau\rangle$ (ns)	τ (ns)	α	$\langle\tau\rangle$ (ns)
5	0,01	>0,99		0,01	>0,99	
	0,57	<0,01	0,53	0,34	<0,01	0,48
	2,63	<0,01		2,11	<0,01	
10	0,01	>0,99		0,02	0,99	
	0,44	<0,01	0,21	1,20	0,01	0,16
	1,60	<0,01		-	-	
15	0,01	>0,99		0,01	>0,99	
	0,35	<0,01	0,30	0,33	<0,01	0,33
	1,45	<0,01		1,78	<0,01	
20	0,01	>0,99		0,02	>0,99	
	0,36	<0,01	0,26	0,36	<0,01	0,10
	1,25	<0,01		1,08	<0,01	

4.4. Interação com micelas

Os valores de pH nesta etapa foram alterados de 4,9 para 5,5 e de 7,0 para 7,4 (pH fisiológico). Três compostos anfifílicos com balanço de cargas diferentes (CTAB, SDS e HPS) foram utilizados para a formação de micelas com o objetivo de observar a interação da Artepilina C com tais estruturas anfifílicas dados os efeitos de carga, conforme descrito na Seção 3.4.

Como as micelas apresentam cargas em sua superfície, o microambiente criado ali possui pH diferente do bulk da suspensão. ^[50] Este pH foi calculado utilizando a equação em ^[57]:

$$pH_s = pH_b + 0,434 \frac{e_0}{kT} \psi_s \quad (27)$$

Onde pH_s e pH_b são o pH da superfície da micela e do meio respectivamente, e_0 é a carga do elétron, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin e ψ_s é o potencial elétrico da superfície da micela. O pH_s foi calculado utilizando o ψ_s da literatura.^[50] Os resultados encontram-se na Tabela 9. Para as micelas de HPS, devido às suas características zwitteriônicas dependentes do meio, o valor do potencial na superfície da micela não foi obtido e o comportamento da molécula de Artepilina C com esta micela foi avaliado tendo em vista o quão próximos os resultados se aproximaram das demais, uma vez que seu valor deve estar entre o encontrado para SDS e CTAB.

Tabela 9 - Valores de pH na solução (bulk) e no microambiente da superfície das micelas

pH	SDS			CTAB		
Bulk	3,0	5,5	7,4	3,0	5,5	7,4
Superfície	1,3	3,8	5,7	4,5	7,0	8,9

4.4.1. Micelas com Artepilina C em pH 3,0 (bulk)

Em pH 3,0 da solução (bulk), as micelas de SDS possuem pH 1,3 em sua superfície e para as micelas de CTAB, o pH da superfície é 4,5, bem próximo ao pK_a (4,65). Devido às propriedades

Figura 22. (a) Espectros de absorção de Artepilina C [20 μ M] com micelas. (b) Ajuste linear da absorbância em 300 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperatura: 25 °C.

Figura 23. (a) Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C [20 μM] com micelas de SDS, CTAB e HPS. O pico em 350 nm é o Raman da água. (b) Intensidade de fluorescência versus a concentração em 409 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperatura: 25 $^{\circ}\text{C}$.

zwitteriônicas do HPS, observamos seu comportamento nos baseando no quão próximo seus dados estão se comparados com micelas aniônicas (SDS) e catiônicas (CTAB). A absorbância da Artepilina C aumentou em relação ao tampão alcançando valores elevados (próximos a 2,0) e por este motivo não há mais dados para algumas micelas (Figura 22.b). Os coeficientes de absorção molar calculados através do ajuste linear com λ em 300 nm foram $(1,25 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (HPS), $(2,35 \pm 0,03) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (SDS) e $(3,24 \pm 0,13) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (CTAB).

Uma hipótese para o aumento do coeficiente de absorção molar observado para a Artepilina em suspensão contendo micelas de CTAB seria o aumento da população desprotonada na superfície da micela, já que o pH da superfície está próximo ao pKa da molécula. O aparecimento de picos que diferem da banda principal não foi observado em nenhum dos espectros, que é possivelmente devido à não formação de agregados de Artepilina C. Não houve deslocamento do pico de máxima absorção, o qual é uma banda larga indo de 314 a 318 nm para todas as micelas.

Os espectros de emissão fluorescente são mostrados na Figura 23.a. Em solução tampão, o pico de emissão para este pH está próximo a 425 nm e na presença de micelas houve um deslocamento para o azul, sendo este mais acentuado em CTAB e HPS (~400 nm). Quanto maior o deslocamento para o vermelho, maior é a polaridade do meio; quanto menor for o deslocamento para o vermelho, menor a polaridade, segundo o modelo de Lippert-Mataga^[48], o qual considera os efeitos gerais de solvente. Tendo isto em vista, a Artepilina C ao interagir com CTAB e HPS se localiza em regiões das micelas com menor polaridade se compararmos com os dados em tampão.

Desta forma, a molécula pode estar posicionada na região superficial da micela entre o interior e o bulk aquoso.

A intensidade aumentou com a concentração até aproximadamente $20\ \mu\text{M}$ e então começou a ser suprimida devido aos valores altos de absorção ocasionando efeito de filtro interno. Há a emissão em comprimento de onda longo ($\sim 460\ \text{nm}$), o qual não é muito evidente para SDS e HPS bem como em tampão, porém se torna bem pronunciado em CTAB. Em micelas de CTAB, como o pH em sua superfície está bem próximo ao pKa, pode haver uma pequena população carregada negativamente da Artepilina C, havendo então formas isoméricas, levando a um aumento na intensidade do segundo pico de emissão, assim como ocorre para Artepilina C em tampão em pH próximo ao pKa.

4.4.2. Micelas com Artepilina C em pH 5,5 (bulk)

Pouco acima do pKa, o pH na superfície das micelas de SDS está próximo a 3,8 e em CTAB, 7,0. Pela Figura 24.a é notável a influência do potencial de superfície: o composto está negativamente carregado em CTAB com máxima absorção em 293 nm e em SDS, a Artepilina C está neutra com pico de absorção em 315 nm. Nas micelas de HPS há a ocorrência de ambas populações, exibindo pico em 305 nm.

Não houve formação de agregado. A absorptividade molar aumentou em CTAB alcançando valores elevados de absorbância - $(3,49 \pm 0,07) \times 10^4\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -, motivo pelo qual as medidas

Figura 24. (a) Espectros de absorção normalizados da Artepilina C [$20\ \mu\text{M}$] com micelas de SDS, CTAB e HPS. (b) Ajuste linear da absorbância para Artepilina C com micelas em 300 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 5,5. Temperatura: $25\ ^\circ\text{C}$.

pararam em 50 μM de Artepilina C. Para as interações com micelas de SDS e HPS, o coeficiente de absorção molar do composto teve um pequeno aumento que está na margem de erro para pH 3,0 em micelas de SDS - $(2,38 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - e aumento em micelas de HPS - $(1,37 \pm 0,01) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Figura 25. (a) Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C [20 μM] com micelas de SDS, CTAB e HPS. O pico em 350 nm é o Raman da água. (b) Intensidade de fluorescência versus a concentração de Artepilina C com micelas em 390 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 5,5. Temperatura: 25 °C.

Em tampão, o pico de emissão neste pH está próximo a 410 nm e na presença de micelas houve um deslocamento para o azul, sendo este mais acentuado em CTAB e HPS novamente. Como o pH na superfície das micelas de CTAB está acima do pKa (7,0), há Artepilina C desprotonada e o aumento na emissão fluorescente na banda próxima a 460 nm, assim como pode ser observado para o composto em tampão. A intensidade aumentou com a concentração até aproximadamente 30 μM e então começou a ser suprimida por causa dos valores altos de absorção ocasionando no efeito de filtro interno. Há a emissão em comprimento de onda longo, pico este que permanece em 460 nm devido às formas isoméricas de Artepilina C.

4.4.3. Micelas com Artepilina C em pH 7,4 (bulk)

Tanto as micelas de SDS quanto as de CTAB possuem pH superficial acima do pKa da Artepilina C, logo é esperado que o grupo carboxila esteja desprotonado e, assim, o composto carregado negativamente.

Figura 26. (a) Espectros de absorção normalizados da Artepilina C [$20 \mu\text{M}$] com micelas de SDS, CTAB e HPS. (b) Ajuste linear da absorbância para Artepilina C com micelas em 300 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 7,4. Temperatura: 25°C .

Pela Figura 26 observa-se que o pico de máxima absorção ocorre em 291 nm para CTAB e HPS e com uma banda mais alargada para SDS com pico em 294 nm, o que provavelmente se deve ao fato de que mesmo que o pH superficial esteja acima do pK_a do composto, o valor ainda está próximo ($\text{pH } 5,7$) podendo haver espécies protonadas interagindo com a micela. As amostras absorveram mais luz do que para outros pH alcançando valores extremamente altos para a interação com CTAB, por este motivo há apenas três medidas realizadas com esta micela. Para SDS também há menos pontos.

Figura 27. (a) Espectros de emissão fluorescente da Artepilina C [$20 \mu\text{M}$] com micelas de SDS, CTAB e HPS. O pico em 350 nm é o Raman da água. (b) Intensidade de fluorescência versus a concentração de Artepilina C com micelas em 390 nm. Concentrações: SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 7,4. Temperatura: 25°C .

Os espectros de emissão estão na Figura 27 e possuem máxima emissão em valores próximos ou abaixo de 400 nm. Em 460 nm há a segunda banda de emissão em CTAB com Artepilina C, devida a interações diferentes da micela com formas isoméricas do composto.

4.4.4. Anisotropia e tempo de vida fluorescente

Os dados de tempo de vida fluorescente estão na Tabela 10. Mesmo com micelas houve a necessidade de utilizar uma terceira componente de tempo de vida para melhorar o ajuste, tendo em vista o valor do χ^2 , apesar de sua contribuição ser extremamente baixa ao observar o valor do fator pré-exponencial normalizado. O tempo de vida médio foi calculado pela Eq. (10) e os fatores pré-exponenciais normalizados pela Eq. (11). Os tempos de vida médios estão na ordem de centenas de picosegundos para pH abaixo do pKa e acima de 1 ns em pH acima do pKa, com exceção das micelas de SDS.

Tabela 10 - Tempo de vida da i-ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i-ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato em pH (meio) 3,0, 5,5 e 7,4. Comprimento de onda de excitação em 296 nm e emissão em 400 nm. Temperatura: 25 °C

Meio	pH _b (pH _s)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	$\langle\tau\rangle$ (ns)
Tampão	3,0	0,05	0,94	0,60	0,05	3,45	0,01	0,46
	4,9	0,07	0,97	0,66	0,03	3,42	<0,01	0,62
	7,0	0,06	0,98	0,8	0,02	3,2	<0,01	0,18
SDS	3,0 (1,7)	0,03	>0,99	0,90	<0,01	3,70	<0,01	0,19
	5,5 (3,8)	0,01	>0,99	1,20	<0,01	5,77	<0,01	0,31
	7,4 (5,7)	0,01	>0,99	1,07	<0,01	4,15	<0,01	0,21
CTAB	3,0 (4,5)	0,03	0,99	0,70	0,01	2,93	<0,01	0,53
	5,5 (7,0)	0,02	0,99	0,96	0,01	5,98	<0,01	1,22
	7,4 (8,9)	0,03	0,98	0,95	0,02	4,40	<0,01	1,15
HPS	3,0	0,03	>0,99	0,74	<0,01	3,33	0,01	0,12
	5,5	0,02	0,99	1,02	<0,01	6,03	0,01	1,24
	7,4	0,03	0,98	0,90	0,01	4,51	0,01	1,21

Os dados de anisotropia estacionária e resolvida no tempo encontram-se na Tabela 11. Na presença de micelas de SDS, os valores de anisotropia são relativamente elevados, refletindo os valores de tempos de vida da Artepilina C predominantemente muito baixos, de modo que a molécula fica pouco tempo no estado excitado, insuficiente para que haja a rotação do dipolo, como já observado para os casos estudados na ausência de micelas.

Tabela 11 - Anisotropia estacionária (r_s), tempo de correlação rotacional (ϕ), anisotropia inicial (r_0) e anisotropia média calculada ($\langle r \rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], SDS [15 mM], CTAB [3 mM], HPS [3 mM]. Tampão citrato-fosfato. Temperatura: 25 °C

Meio	pH	r_s	ϕ (ns)	r_0	$\langle r \rangle$
Tampão	3,0	0,21	0,44	0,40	0,17
	4,9	0,16	0,46	0,36	0,20
	7,0	0,20	0,59	0,37	0,26
SDS	3,0 (1,7)	0,22	0,31	0,34	0,21
	5,5 (3,8)	0,19	0,49	0,30	0,18
	7,4 (5,7)	0,19	0,59	0,28	0,21
CTAB	3,0 (4,5)	0,19	0,70	0,28	0,16
	5,5 (7,0)	0,14	0,52	0,27	0,08
	7,4 (8,9)	0,12	0,29	0,30	0,06
HPS	3,0	0,19	0,27	0,36	0,25
	5,5	0,18	0,43	0,34	0,09
	7,4	0,12	0,72	0,13	0,05

A situação é semelhante para meios com micelas de CTAB e HPS em pH do bulk igual a 3,0. Os tempos de vida são muito curtos, resultando em valores elevados de anisotropia. Todavia, quando o pH do meio é 5,5 ou 7,4, os tempos de vida médios para a Artepilina C na presença de micelas de CTAB e HPS são mais elevados, superiores a 1,0 ns. Para as micelas de CTAB e HPS, os valores de pH na superfície das micelas são ainda mais elevados, com predominância da forma desprotonada da Artepilina C e os dados indicam que, sendo os tempos de decaimento mais elevados, há maior efeito da rotação da molécula na despolarização da emissão fluorescente. Dessa maneira, tanto a anisotropia estática como a anisotropia média calculada dos parâmetros de decaimento, apresentam valores mais baixos que os observados em pH do bulk igual a 3,0.

Em suma, a Artepilina C na presença de micelas possui espectros de emissão deslocados para o azul, indicando a preferência da molécula por regiões de menor polaridade se comparado com o solvente. Os anfífilicos utilizados possuem carga superficial, o que altera o pH em suas imediações fazendo com que a Artepilina C expresse diferentes espectros de absorção dependendo da micela, estando ou neutra ou negativamente carregada. As micelas de HPS por serem zwitteriônicas demonstraram pH superficial entre o observado para as demais micelas aniônicas e catiônicas, tal qual os resultados apontam. O deslocamento do pico de absorção foi mais pronunciado para micelas catiônicas do que para aniônicas. Isso significa que o posicionamento do composto é diferente para cada uma: a polarizabilidade do ambiente ao redor da molécula é claramente menor nas micelas de CTAB e HPS em comparação com a observada nas micelas de SDS, expressando a importância da contribuição das interações eletrostáticas para o local da Artepilina C na superfície das micelas. O aumento observado para o tempo de vida é devido à localização da molécula na membrana, onde ocorre uma menor dissipação não-radiativa. O tempo de vida médio observado continua rápido, mas com o aumento da componente longa observou-se a diminuição da anisotropia, indicando a difusão rotacional.

4.5. Interação da Artepilina C com vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Apenas sistemas com valores de pH acima e abaixo do ponto de pKa da Artepilina C foram utilizados nesta parte do trabalho. As vesículas foram preparadas conforme descrito na Seção 3.5 e analisadas juntamente em dois valores de pH comparando as diferenças observadas em relação à fase gel e à fase líquida das vesículas e em relação à força iônica do meio.

4.5.1. Vesículas com Artepilina C em pH 3,0 (neutra)

Para obter os espectros de absorção da Artepilina C, a cubeta de referência foi preenchida com a mesma suspensão lipídica de estudo a uma concentração fixa de 1 mM. O intuito foi minimizar os efeitos do espalhamento Rayleigh da suspensão, o qual decai exponencialmente na razão $1/\lambda^4$, afetando os resultados. O objetivo em si foi observar se o pico de absorção deslocou, por este motivo os coeficientes de absorção molar não foram calculados. Como as vesículas são carregadas, podem haver diferenças no pH próximo à superfície assim como ocorre em micelas,

porém o potencial elétrico depende da presença de íons no meio. Para as vesículas de DMPC na presença de NaCl, seu potencial diminui com o acréscimo do sal devido aos efeitos de contra-íon.

[57]

Figura 28. Espectros de absorção normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 3,0 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. Tampão citrato-fosfato.

Tabela 12 - Valores do comprimento de onda de absorção e emissão e da intensidade da emissão fluorescente da Artepilina C [20 μ M] em tampão e em sistemas contendo vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] com e sem 100 mM de NaCl, pH 3,0. Tampão citrato-fosfato. Os valores em parênteses representam a variação no comprimento de onda em relação ao obtido em tampão

Meio	λ_{abs} (nm)		λ_{emiss} (nm)	
	16 °C	34/50 °C	16 °C	34/50 °C
Tampão	315		425	
DMPC	315 (0)	311 (-4)	404 (-21)	397 (-28)
DMPG	316 (+1)	313 (-2)	412 (-13)	398 (-27)
DODAB	315 (0)	308 (-7)	423 (-2)	420 (-5)
DMPC+NaCl	314 (-1)	310 (-5)	415 (-10)	410 (-15)
DMPG+NaCl	318 (+3)	315 (0)	418 (-7)	415 (-10)
DODAB+NaCl	320 (+5)	309 (-6)	422 (-3)	418 (-7)

Na Figura 28 estão apresentados os espectros de absorção normalizados. Todos possuem banda pouco alargada, exceto para Artepilina C com vesículas de DMPG com NaCl, o que possivelmente é devido ao espalhamento ocasionado pela suspensão das vesículas. Pelos dados obtidos do pico de máxima absorção da Artepilina C, não houve considerável alteração no pH na

superfície das vesículas e os valores permaneceram em torno dos 315 nm, indicando que o composto está protonado independente da carga do lipídio e da fase da bicamada. Não é observado ombro em comprimentos de onda maiores, pois foram utilizadas concentrações baixas ($< 30 \mu\text{M}$) para evitar agregados.

Figura 29. Espectros de emissão fluorescente normalizados de Artepilina C [$20 \mu\text{M}$] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 3,0 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato.

Pelos espectros de emissão fluorescente na Figura 29 e os dados da Tabela 12, nota-se que os espectros são bem alargados e sem estrutura, sugerindo contribuições de diferentes locais da molécula na bicamada. Para temperaturas abaixo da transição dos fosfolipídios ocorre o deslocamento do pico de emissão para comprimentos de onda menores se comparados com Artepilina C em tampão. Este deslocamento é mais pronunciado sem NaCl, indicando que a presença dos íons desloca o equilíbrio como observado para Artepilina C em tampão com o sal. Em DODAB como a diferença entre os picos de emissão com e sem o sal é de 1 nm, pode-se considerar o espectro sem alteração com a adição do mesmo. Com o aumento da temperatura houve também deslocamento do pico de emissão em todas as micelas, sendo mais pronunciado para DMPC (28 nm) e DMPG (27 nm), indicando um posicionamento da molécula em regiões com menor polarização do que na fase gel, podendo ser mais adentro da bicamada onde possua menor contato com as moléculas polares do meio aquoso. Desta forma, temos que a estrutura fluida da bicamada acima da temperatura de transição mantém a Artepilina C neutra em regiões menos polares, influenciadas pelo posicionamento das cargas das vesículas. O pico de emissão em 460 nm é bem pronunciado quando a Artepilina C está em contato com vesículas de DODAB acima da

temperatura de transição, assim como foi observado para Artepilina C em contato com micelas de CTAB. Uma explicação seria devido a ambos anfífilicos serem catiônicos.

4.5.2. Vesículas com Artepilina C em pH 7,4 (carregada negativamente)

Em pH 7,4, a Artepilina C possui carga negativa e apresenta pico de máxima absorção próximo a 290 nm. Ao interagir com vesículas, o comprimento de onda permanece nas imediações deste valor tanto na fase gel quanto na fase líquido-cristalina, com ou sem NaCl, indicando que o pH na superfície das mesmas está acima do pKa.

Figura 30. Espectros de absorção normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 7,4 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. Tampão citrato-fosfato.

Figura 31. Espectros de emissão fluorescente normalizados de Artepilina C [20 μ M] com vesículas de DMPC, DMPG e DODAB [1 mM] na presença e ausência de NaCl [100 mM] em pH 7,4 abaixo (a) e acima (b) da temperatura de transição. O pico em 350 nm é o Raman da água. Tampão citrato-fosfato.

Tabela 13 - Valores do comprimento de onda de absorção e emissão e da intensidade da emissão fluorescente da Artepilina C em tampão e em sistemas contendo vesículas de DMPC, DMPG e DODAB com e sem NaCl, pH 7,4. Tampão citrato-fosfato. Os valores em parênteses representam a variação no comprimento de onda em relação ao obtido em tampão

Meio	λ_{abs}		λ_{emiss}	
	16 °C	34/50 °C	16 °C	34/50 °C
Tampão	291		400	
DMPC	293 (+2)	291 (0)	404 (+4)	393 (-7)
DMPG	290 (-1)	292 (+1)	403 (+3)	401 (+1)
DODAB	290 (-1)	289 (-2)	406 (+6)	400 (0)
DMPC+NaCl	288 (-3)	292 (+1)	411 (+11)	406 (+6)
DMPG+NaCl	291 (0)	293 (+2)	412 (+12)	401 (+1)
DODAB+NaCl	292 (+1)	290 (-1)	414 (+14)	406 (+6)

Os espectros de emissão em pH 7,4 são largos, porém mais estruturados do que em pH 3,0. Em temperatura abaixo da transição dos fosfolipídios houve o deslocamento para o vermelho, ou seja, para comprimentos de onda maiores do que em tampão (400 nm), indicando que a molécula se situa em locais com maior polaridade do que em tampão e este deslocamento é ainda maior na presença de sal, possivelmente pelo deslocamento do equilíbrio para formas desprotonadas já comentado anteriormente. Ao interagir Artepilina C com vesículas na fase líquido-cristalina, ocorre um rearranjo das moléculas para regiões com menor polaridade se compararmos com temperaturas mais baixas. O comportamento da Artepilina C carregada negativamente, seja na presença ou ausência de sal, é variado dependendo da carga de cada vesícula e envolve interações específicas não descritas pelos efeitos gerais do solvente. Em vesículas de DMPC a carga positiva do grupo colina pode interagir com o grupo carboxila desprotonado da Artepilina C de forma atrativa, evitando sua inserção em ambientes menos polares. Em vesículas de DMPG, a carga negativa resulta em uma repulsão fazendo com que o composto fique em ambientes com menor polaridade na vesícula. E em vesículas de DODAB, como este possui carga positiva, atrai eletrostaticamente a Artepilina C mantendo-a no meio aquoso.

4.5.3. Anisotropia e tempo de vida fluorescente

Novamente para o melhor ajuste do tempo de vida fluorescente foram utilizadas curvas triexponenciais, tendo em vista o valor do χ^2 , apesar de sua contribuição ser extremamente baixa ao observar o valor do fator pré-exponencial normalizado. O tempo de vida médio foi calculado pela Eq. (10) e os fatores pré-exponenciais normalizados pela Eq. (11).

Tabela 14 - Tempo de vida da i-ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i-ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], DMPC, DMPG e DODAB [1 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 3,0. Temperaturas acima e abaixo da transição dos lipídios

Meio	T (°C)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	$\langle\tau\rangle$ (ns)
Tampão	25	0,05	0,94	0,60	0,05	3,45	<0,01	0,46
DMPC	16	0,03	0,98	0,86	0,01	4,15	0,01	0,30
DMPG	16	0,02	0,99	0,96	0,01	4,80	<0,01	0,35
DODAB	16	0,02	0,98	1,05	<0,02	7,24	<0,01	0,68
DMPC	34	0,16	0,85	1,18	0,14	5,81	0,01	0,84
DMPG	34	0,02	0,99	0,95	0,01	6,51	<0,01	0,46
DODAB	50	0,03	0,98	0,88	0,01	5,00	<0,01	0,42
DMPC+NaCl	16	0,09	0,94	0,97	<0,06	5,97	<0,01	1,11
DMPG+NaCl	16	0,02	0,99	1,00	<0,01	6,14	<0,01	0,62
DODAB+NaCl	16	0,02	0,99	0,74	<0,01	6,94	<0,01	0,34
DMPC+NaCl	34	0,16	0,90	1,25	0,09	5,72	0,01	1,57
DMPG+NaCl	34	0,02	0,99	0,91	0,01	5,92	<0,01	0,59
DODAB+NaCl	50	0,03	0,97	0,90	<0,03	5,00	0,01	0,45

A maior contribuição é da componente curta com tempos em sua maioria abaixo de 100 ps, porém a contribuição da componente longa aumentou se comparada com Artepilina C em tampão, com valores acima de 4 ns para ambos pH, resultando em valores maiores de tempo de vida. Observa-se que a Artepilina C tem preferência por regiões com menor polaridade e menor contato com a água na maioria dos casos. Espera-se que para altas temperaturas, o tempo de vida fluorescente deve ser menor do que encontrado em tampão devido ao aumento da dissipação

térmica do estado excitado. Contudo, foi observado o aumento no tempo de vida em alta temperatura, indicando que a fase fluida da bicamada favorece o posicionamento do composto em regiões onde a dissipação térmica pelo meio aquoso é menos efetiva.

Para a anisotropia estacionária, os dados tanto em pH 3,0 quanto em pH 7,4 aumentaram ao ser comparados com os dados obtidos em tampão (0,209 em tampão pH 3,0 e 0,201 em pH 7,0) e apenas alguns valores diminuíram para temperaturas acima da transição de fase. Os dados de tempo de vida mostram a predominância da componente de tempo curto, de modo que a emissão decai rápido, mesmo antes do deslocamento rotacional da Artepilina C se tornar significativo, resultando em valores muito altos de anisotropia. Os valores calculados da anisotropia média a partir dos dados resolvidos no tempo mostram que à medida que os decaimentos de intensidade se tornam mais longos, a contribuição da difusão rotacional é observada no decaimento da anisotropia de fluorescência, resultando em valores menores de anisotropia média.

Tabela 15 - Tempo de vida da i-ésima componente (τ_i), fator pré-exponencial normalizado da i-ésima componente (α_i) e tempo de vida fluorescente médio ($\langle\tau\rangle$). Concentrações: Artepilina C [20 μ M], DMPC, DMPG e DODAB [1 mM]. Tampão citrato-fosfato pH 7,4. Temperaturas acima e abaixo da transição dos lipídios

Meio	T (°C)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2	τ_3 (ns)	α_3	$\langle\tau\rangle$ (ns)
Tampão	25	0,06	98,0	0,80	1,70	3,20	0,12	0,18
DMPC	16	0,04	0,98	0,96	0,01	6,81	0,01	0,34
DMPG	16	0,02	0,99	0,93	0,01	6,08	<0,01	0,32
DODAB	16	0,01	0,99	0,89	<0,01	4,25	<0,01	0,82
DMPC	34	0,18	0,86	1,27	0,12	4,67	0,02	1,55
DMPG	34	0,17	0,85	1,28	0,13	5,15	0,02	1,70
DODAB	50	0,01	0,99	1,05	<0,01	8,49	<0,01	1,07
DMPC+NaCl	16	0,18	0,90	1,28	0,09	5,91	0,01	1,39
DMPG+NaCl	16	0,01	0,99	1,03	0,01	7,74	<0,01	1,14
DODAB+NaCl	16	0,03	0,99	0,72	0,01	4,33	<0,01	0,26
DMPC+NaCl	34	0,16	0,90	1,25	0,09	5,72	0,01	1,57
DMPG+NaCl	34	0,02	0,99	1,00	<0,01	5,05	<0,01	0,85
DODAB+NaCl	50	0,02	0,98	0,83	0,01	5,75	0,01	0,42

Tabela 16 - Anisotropia estacionária (r_s), tempo de correlação rotacional (ϕ), anisotropia inicial (r_0) e anisotropia média calculada ($\langle r \rangle$). Concentrações: Artepilina C [$20 \mu\text{M}$], DMPC, DMPG e DODAB [1 mM]. Tampão citrato-fosfato em pH 3,0 (tabela superior) e 7,4 (tabela inferior). Temperaturas acima e abaixo da transição dos fosfolipídios

Meio	T (°C)	r_s	ϕ (ns)	r_0	$\langle r \rangle$
Tampão	25	0,21	0,44	0,40	0,17
DMPC	16	0,21	0,30	0,30	0,21
DMPG	16	0,18	0,41	0,20	0,15
DODAB	16	0,31	0,33	0,30	0,18
DMPC	34	0,21	0,26	0,21	0,08
DMPG	34	0,20	0,27	0,26	0,17
DODAB	50	0,25	0,16	0,27	0,16
DMPC+NaCl	16	0,22	0,23	0,32	0,15
DMPG+NaCl	16	0,21	0,37	0,28	0,21
DODAB+NaCl	16	0,24	0,20	0,23	0,16
DMPC+NaCl	34	0,19	0,15	0,33	0,09
DMPG+NaCl	34	0,20	0,25	0,35	0,24
DODAB+NaCl	50	0,21	0,22	0,37	0,21

Meio	T (°C)	r_s	ϕ (ns)	r_0	$\langle r \rangle$
Tampão	25	0,20	0,59	0,37	0,26
DMPC	16	0,22	0,14	0,26	0,16
DMPG	16	0,22	0,28	0,26	0,20
DODAB	16	0,17	0,31	0,26	0,18
DMPC	34	0,23	0,24	0,27	0,08
DMPG	34	0,20	0,23	0,29	0,08
DODAB	50	0,16	0,32	0,26	0,16
DMPC+NaCl	16	0,26	0,14	0,29	0,07
DMPG+NaCl	16	0,23	0,20	0,28	0,20
DODAB+NaCl	16	0,19	0,23	0,25	0,19
DMPC+NaCl	34	0,23	0,15	0,34	0,09
DMPG+NaCl	34	0,22	0,31	0,27	0,18
DODAB+NaCl	50	0,19	0,29	0,27	0,19

Desta forma, os resultados obtidos para Artepilina C na presença de vesículas fosfolipídicas de DMPC, DMPG e DODAB indicam que a molécula possui preferência pela região de menor polaridade, observando o deslocamento da emissão fluorescente. A falta de estruturação nos espectros de emissão também sugere que há diferentes contribuições locais da molécula nas membranas. Na presença e na ausência de sal não foi observada considerável alteração nos dados sobre o pico de máxima absorção, indicando que o pH na superfície das vesículas está próximo ao do bulk e a Artepilina C se manteve protonada em pH 3,0 e desprotonada em pH 7,4. Em pH 3,0, a molécula neutra exibe caráter hidrofóbico ao possuir preferência por locais com menor polaridade; já em pH 7,4, a molécula carregada negativamente possui preferência em locais com maior contato com a água, já que ocorreu um deslocamento para o vermelho em relação aos dados em tampão, sendo mais pronunciado este deslocamento para a fase fluida da bicamada na presença de NaCl. Aumentos no tempo de vida são coerentes com a localização nas regiões apolares das vesículas, com menor dissipação não-radiativa. Decaimento continua muito rápido, mas o aumento da componente longa permite observar a rotação da molécula e diminuição da anisotropia.

5. CONCLUSÕES

5.1. Estudos da Artepilina C em tampão

A Artepilina C, derivada do ácido cinâmico, possui dois estados de protonação para o grupo carboxila, podendo estar na forma protonada e neutra ou na forma desprotonada e negativamente carregada. Estudos em tampão revelaram que o estado de protonação do composto pode ser caracterizado pelo comprimento de onda de máxima absorção, onde: para valores próximos a 290 nm, a molécula se encontra desprotonada; para valores próximos a 315 nm, ela se encontra protonada. Foi possível também determinar o pKa, que é igual a 4,65. Quando neutra, para concentrações acima de 50 μ M, a Artepilina C se agrega devido às interações hidrofóbicas. Acima do pKa, a Artepilina C não agrega, entretanto, um ombro acima de 450 nm no espectro de emissão fluorescente acusa emissões diferentes possivelmente originadas de formas isoméricas da molécula desprotonada. Pelos dados de tempo de vida, a emissão da radiação ocorre muito rapidamente, antes mesmo da rotação do fluoróforo resultando em valores elevados de anisotropia. Os resultados dessa parte da dissertação encontram-se publicados. ^[52]

5.2. Estudos da Artepilina C com micelas

Ao interagir com micelas compostas por anfifílicos carregados, a Artepilina C possui espectros de emissão deslocados para o azul, indicando a preferência da molécula por regiões de menor polaridade se comparado com o solvente. Devido às cargas presentes na superfície das micelas, o pH próximo a elas se altera fazendo com que a Artepilina C expresse diferentes espectros de absorção dependendo da carga da micela e o pH relativo em sua superfície. Os dados de tempo de vida fluorescente na presença de micelas aumentaram pela preferência da molécula por regiões de menor polaridade e menor contato com a água. O aumento do tempo de vida permitiu a observação da difusão rotacional da molécula, indicada pela diminuição da anisotropia.

5.3. Estudos da Artepilina C com vesículas

Na presença de vesículas fosfolipídicas, a molécula possui preferência pela região de menor polaridade, observando o deslocamento da emissão fluorescente. Essa preferência é mais acentuada quando as bicamadas estão na fase fluida. A falta de estruturação nos espectros de emissão também

sugere que há diferentes contribuições locais para a desexcitação da molécula nas membranas. O pH na superfície das vesículas está próximo ao do bulk, ao contrário das micelas, e a Artepilina C se manteve protonada em pH 3,0 e desprotonada em pH 7,4. A molécula em pH 3,0 exibe caráter hidrofóbico ao possuir preferência por locais com menor polaridade; já em pH 7,4, a molécula carregada negativamente possui preferência em locais com maior contato com a água. Aumentos no tempo de vida indicam localização nas regiões apolares das vesículas, com menor dissipação não-radiativa. O decaimento da intensidade é rápido, porém o aumento da componente longa se comparado com tampão nos permite observar a rotação da molécula e consequente diminuição da anisotropia.

5.4. Conclusões gerais

Desta forma, podemos concluir que:

- O grupo carboxila da Artepilina C pode se apresentar nas formas protonada e desprotonada em pH mais alto. O equilíbrio entre as duas formas corresponde ao pKa, para o qual foi determinado o valor 4,65;
- As interações com micelas dependem da carga superficial das mesmas e do estado de protonação do composto;
- O composto possui preferência pelas regiões de menor polaridade tanto em micelas quanto em vesículas;
- Em vesículas a posição do pico de emissão tem maior deslocamento em temperatura mais elevada, mostrando que a Artepilina C se posiciona com mais facilidade na região superficial da bicamada, com menor contato com moléculas de água, quando a membrana está na fase líquido-cristalina;
- O decaimento da fluorescência é complexo e ajustado com três tempos de vida fluorescente. A componente curta é predominante e a componente longa possui baixíssima contribuição. Alterações nestes valores foram observados em contato com micelas e vesículas, com aumento no tempo de vida, levando à observação da difusão rotacional da molécula e a uma diminuição na anisotropia de fluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAUR, R. **o que o sol faz com as flores**. 3a ed. São Paulo: Editora Planeta do Brasil, 2018. 248 p.
2. GHISALBERTI, E. L. **Propolis: A Review**. Bee World, 1979. Vol. 60(2), p. 59–84.
3. SFORCIN, J. M. **Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis**. Phytotherapy Research, 2016. Vol. 30(6), p. 894–905.
4. PEREIRA, A. dos S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras**. Química Nova, 2002. Vol. 25(2), p. 321–6.
5. CHEUNG, K-W.; SZE, D. M-Y; CHAN, W. K.; DEND, R-X; TU W.; CHAN, G. C-F. **Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation**. Journal of Ethnopharmacology, 2011. Vol 138(2), p. 463–71.
6. AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K. et al. **Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivatives from Propolis on Human Tumor Cell Lines**. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003. Vol. 26(7), p. 1057–9.
7. BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. **Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis**. Zeitschrift für Naturforsch C, 1995. Vol. 50(3–4), p. 167–72.
8. PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D. et. al. **Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis**. European Journal of Pharmacology, 2008. Vol. 587(1–3), p. 296–301.
9. TORRES, A. R.; SANDJO, L. P.; FRIEDEMANN, M. T.; TOMAZZOLI, M. M. et al. **Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from Melipona quadrifasciata quadrifasciata and Tetragonisca angustula stingless bees**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2018. Vol. 51(6).
10. LUJÁN, M. DEL R. M.; RESÉNDEZ, A. M.; BARRÓN, G. S. G.; CARRILLO, J. L. R. et al. **Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods**. Nova Scientia, 2018. Vol. 10(20), p. 397.

11. ALVES PINTO, L. de M.; PRADO, N. R. T.; DE CARVALHO, L. B. **Propriedades, usos e aplicações da própolis.** Revista Eletrônica de Farmácia, 2011. Vol. 8(3)
12. CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; DUARTE, S. et al. **Própolis do sudeste e nordeste do Brasil:** influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. Química Nova, 2007. Vol. 30(7), p. 1512–6.
13. BERRETTA, A. A.; ARRUDA, C.; MIGUEL, F. G.; BAPTISTA, N.; NASCIMENTO, A. P.; MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. **Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market.** In: Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization. InTechOpen, 2017. p. 55-98.
14. SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA, C. C.; RIGHI, A. A.; SALATINO, M. L. F. **Propolis research and the chemistry of plant products.** Natural Product Reports, 2011. Vol. 28(5), p. 925.
15. SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. **Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004. Vol. 424(2), p. 181–8.
16. PAZIN, W. M. **Atividade da própolis verde contra o fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* e análise da interação do composto majoritário Artepillin C com sistemas biomiméticos de membranas.** Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2016.
17. SCHEIDT, H. A.; PAMPEL, A.; NISSLER, L.; GEBHARDT, R.; HUSTER, D. **Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy.** Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 2004. Vol. 1663(1–2), p. 97–107.
18. OTA, A.; ABRAMOVIČ, H.; ABRAM, V.; ULRIH, N. P. **Interactions of p-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes.** Food Chemistry, 2011. Vol. 125(4), p. 1256–61.
19. TEIXEIRA, S.; SIQUET, C.; ALVES, C.; BOAL, I.; MARQUES, M. P.; BORGES, F. et al. **Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet.** Free Radical Biology and Medicine, 2005. Vol. 39(8), p. 1099–108.

20. SUN, Y.; HUNG, W-C.; CHEN, F-Y.; LEE, C-C.; HUANG, H. W. **Interaction of Tea Catechin (—)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Bilayers.** Biophysical Journal, 2009. Vol. 96(3), p. 1026–35.
21. SUN, Y.; LEE, C-C.; HUNG, W-C.; CHEN, F-Y.; LEE, M-T.; HUANG, H. W. **The Bound States of Amphipathic Drugs in Lipid Bilayers: Study of Curcumin.** Biophysical Journal, 2008. Vol. 95(5), p. 2318–24.
22. PAZIN, W. M.; OLIVIER, D. DA S.; VILANOVA, N.; RAMOS, A. P.; VOETS, I. K.; SOARES, A. E. E.; ITO, A. S. **Interaction of Artepillin C with model membranes.** European Biophysics Journal, 2017. Vol. 46(4), p. 383–93.
23. AHN, M-R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K. et al. **Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation.** Cancer Letters, 2007. Vol. 252(2), p. 235–43.
24. MATSUNO, T.; JUNG, S. K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. **Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis.** Anticancer Research, 1997. Vol. 17(5A), p. 3565–8.
25. KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M. J. et al. **Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis.** Anticancer Research, 2001. Vol. 21(1A), p. 221–8.
26. BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. **Interactions of anticancer drugs with biomembranes: What can we learn from model membranes?** Journal of Controlled Release, 2014. Vol. 190, p. 127–38.
27. ENDO, S.; HOSHI, M.; MATSUNAGA, T.; INOUE, T.; ICHIHARA, K.; IKARI, A. **Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artepillin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. Vol. 497(1), p. 437–43.
28. RODRIGUES, C. R. F.; PLENTZ, L. C.; MARCUCCI, M. C.; DIHL, R. R.; LEHMANN, M. **In vivo evaluation of mutagenic and recombinagenic activities of Brazilian propolis.** Food and Chemical Toxicology, 2016. Vol. 96, p. 117–21.
29. ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular & surface forces.** 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1992. 450 p.

30. MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Terceira ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 2007. 386 p.
31. 31. RISKE, K. DO A. **Comportamento térmico peculiar de dispersões aquosas do fosfolipídio aniônico DMPG**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2001.
32. DARAEI, H.; ETEMADI, A.; KOUHI, M.; ALIMIRZALU, S.; AKBARZADEH, A. **Application of liposomes in medicine and drug delivery**. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2016. Vol. 44(1), p. 381–91.
33. KRAFT, J. C.; FREELING, J. P.; WANG, Z.; HO, R. J. Y. **Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems**. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. Vol. 103(1), p. 29–52.
34. SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; WU, S. Y.; SOOD, A. K.; HUA, S. **Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery**. Frontiers in Pharmacology, 2015. Vol. 6, p. 286.
35. BAGATOLLI, L. A.; IPSEN, J. H.; SIMONSEN, A. C.; MOURITSEN, O. G. **An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes**. Progress in Lipid Research, 2010. Vol. 49(4), p. 378–89.
36. VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Terceira ed. Artmed, 2008. 1596 p.
37. ITO, A. S.; BERARDI, M. B.; PAZIN, W. M. **Fluorescência e aplicações em Biofísica**. Primeira ed. Livraria da Física, 2016. 134 p.
38. BORISSEVITCH, I. E.; GONÇALVES, P. J.; SCHABERLE, F. A. **Fundamentos da Espectroscopia de Absorção Óptica**. Primeira ed. Livraria da Física, 2016. 113 p.
39. Esquema de um espectrofotômetro - Kasvi. Disponível em: <<http://kasvi.com.br/espectrofotometria-principios-aplicacoes/espectrofotometro/>>. Acesso em: 02 jul. 2018.
40. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2nd ed. New York: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1999. 698 p.
41. MUKERJEE, P.; MYSELS, K. J. **Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems**. National Standard Reference Data System, 1971.

42. FEITOSA, E.; BROWN, W. **Fragment and Vesicle Structures in Sonicated Dispersions of Dioctadecyldimethylammonium Bromide.** *Langmuir*, 1997. Vol. 13(18). p. 4810-4816.
43. BHAIRI, S. M.; MOHAN, C.; IBRYAMOVA, S.; LAFAVOR, T. **Detergents: a guide to the properties and uses of detergents in biological systems.** Sigma-Aldrich, 2017.
44. **Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids** - Avanti Polar Lipids Sigma-Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/phase-transition-temperatures-for-glycerophospholipids.html>>. Acesso em: 15 set. 2018.
45. **Detergents and solubilization reagents.** Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/2/biofiles_issue3_3.pdf>. Acesso em: 15 set. 2018.
46. FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C.; OLOFSSON, G. **Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 2000. Vol. 105(2), p. 201–13.
47. BADAIEVA, E.; ALBERT, V. V.; KILINA, S.; KOPOSOV, A.; SYKORA, M.; TRETIK, S. **Effect of deprotonation on absorption and emission spectra of Ru(ii)-bpy complexes functionalized with carboxyl groups.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010. Vol. 12(31), p. 8902.
48. TAKARA, M.; ITO, A. S. **General and Specific Solvent Effects in Optical Spectra of ortho-Aminobenzoic Acid.** *Journal of Fluorescence*, 2005. Vol. 15(2), p. 171–7.
49. TAKARA, M.; EISENHUT, J. K.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, L.; ITO, A. S. **Solvent Effects in Optical Spectra of ortho-Aminobenzoic Acid Derivatives.** *Journal of Fluorescence*, 2009. Vol. 19(6), p. 1053–60.
50. MARQUEZIN, C. A.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, L.; ITO, A. S. **Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes.** *Biophysical Chemistry*, 2006. Vol. 124(2), p. 125–33.

51. AGGARWAL, L. P. F.; BORISSEVITCH, I. E. **On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2006. Vol. 63(1), p. 227–33.
52. OLIVIER, D. DA S.; ITO, A. S.; GALEMBECK, S. E. **Microhydration effects on geometric properties and electronic absorption spectra of ortho-aminobenzoic acid.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015. Vol. 147, p. 328–33.
53. CAMURI, I. J.; COSTA, A. B.; ITO, A. S.; PAZIN, W. M. **Optical absorption and fluorescence spectroscopy studies of Artepillin C, the major component of green propolis.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018. Vol. 198, p. 71–7.
54. AMAT, A.; CLEMENTI, C.; DE ANGELIS, F.; SGAMELLOTTI, A.; FANTACCI, S. **Absorption and Emission of the Apigenin and Luteolin Flavonoids: A TDDFT Investigation.** *The Journal of Physical Chemistry A*, 2009. Vol. 113(52), p. 15118–26.
55. BERLIM, L. S.; BEZERRA, A. G.; PAZIN, W. M.; RAMIN, T. S.; SCHREINER, W. H.; ITO, A. S. **Photophysical properties of flavonoids extracted from Syngonanthus nitens, the golden grass.** *Journal of Luminescence*, 2018. Vol. 194, p. 394–400.
56. ITO, A. S.; RODRIGUES, A. P.; PAZIN, W. M.; BARIONI, M. B. **Fluorescence depolarization analysis of thermal phase transition in DPPC and DMPG aqueous dispersions.** *Journal of Luminescence*, 2015. Vol. 158, p. 153–9.
57. FORNÉS, J. A.; ITO, A. S.; CURI, R.; PROCOPIO, J. **pH fluctuations in unilamellar vesicles.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1999. Vol. 1(22), p. 5133–8.
58. RISKE, K. A.; NASCIMENTO, O. R.; PERIC, M.; BALES, B. L.; LAMY-FREUND, M. T. **Probing DMPG vesicle surface with a cationic aqueous soluble spin label.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1999. Vol. 1418(1), p. 133–46.