

Diógenes de Sousa Neto

Interação da porfirina catiônica meso-tetrakis (4-N-metilpiridil) com vesículas de fosfolípido nos estados gel e líquido cristalino

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

São Carlos - SP

2014

À minha esposa e filha

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida e da minha família, pelas derrotas e vitórias alcançadas. Aos meus pais Luiz e Ana, pelos bons conselhos, pelo carinho e apoio que me proporcionaram a conquista de mais um sonho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcel Tabak, pelos ensinamentos, disposição e confiança a mim depositada para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que acreditou no desenvolvimento deste projeto com a concessão da bolsa de doutorado e auxílios financeiros.

Ao Prof. Dr. Amando Ito e à Profa. Dra. Joke A. Bouwstra, por cederem seus laboratórios para a realização das medidas de fluorescência resolvida no tempo.

Ao técnico Ézer Biazin, pela ajuda com a preparação das amostras e pelos bons momentos de distração.

Aos estudantes Wilson e Adriano, pela ajuda e sugestões com a formatação da tese.

À estudante Raquel Bitencourt, pela ajuda com os experimentos de potencial zeta e DLS.

Às secretárias Vanessa, Cláudia, Gisley e Sílvia, do Instituto de Química de São Carlos, pelo apoio com os assuntos administrativos da universidade.

A Patrícia, Adriano e Wilson pelas discussões científicas, pelos conselhos e também por ter feito da minha estadia no laboratório um período bastante agradável.

Nada façam por ambição egoísta ou por vaidade, mas humildemente considerem os outros superiores a vocês mesmos.

(Filipenses, 2:3)

Resumo

Este estudo reúne os principais resultados de fluorescência estática e resolvida no tempo sobre a interação da porfirina meso-tetrakis (4-metilpiridil), na forma de base livre (TMPyP) e complexada com Zn^{2+} (ZnTMPyP), com vesículas de fosfolípido. Adicionalmente foram utilizadas as técnicas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “*dynamic light scattering*”). As vesículas de fosfolípido foram formadas por dois conjuntos de fosfolípidios: saturados e insaturados. O primeiro grupo é formado pela mistura dos fosfolípidios zwitteriônico 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e aniônico 1,2-dipalmitoil-*sn*-3-glicero-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DPPG), a diferentes razões molares. Os estudos utilizando tais sistemas foram realizados abaixo (25 °C) e acima (50 °C) da temperatura de transição de fase gel-líquido cristalino destes fosfolípidios (~ 41 °C). O segundo grupo é formado pela mistura dos fosfolípidios zwitteriônico 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) e aniônico 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo(1-rac-glicerol) (POPG). Como a transição de fase destes dois fosfolípidios ocorre a temperaturas negativas, todos os experimentos foram realizados a 25 °C (vesículas no estado líquido cristalino). Todos os sistemas foram preparados através do método de extrusão para a obtenção de vesículas grandes unilamelares (LUV, do inglês “*large unilamellar vesicles*”). As análises dos dados de fluorescência indicaram que a atração eletrostática entre os substituintes (positivamente carregados) das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP e o grupo das cabeças polares (camada de Stern) das vesículas de fosfolípido desempenha um papel fundamental na associação da porfirina. A distribuição da TMPyP entre o meio aquoso (tampão) e as vesículas de fosfolípido foi evidenciada pela coexistência de um tempo de vida de fluorescência mais curto (~ 5 ns) e outro mais longo (~ 9-11 ns), respectivamente. Baseado nos valores das constantes pré-exponenciais, estudos adicionais mostram que a distribuição acima é afetada pela concentração de sal na solução. Os resultados de supressão de fluorescência com o supressor iodeto de potássio (KI) indicaram que ambas porfirinas estão localizadas, preferencialmente, na região da camada de Stern. Este resultado foi confirmado pelos estudos de potencial zeta e de DLS, os quais mostraram uma neutralização parcial das cargas negativas na superfície das vesículas devido à associação da porfirina.

Palavras-chave: Porfirina catiônica. Vesículas de fosfolípido. Fluorescência estática. Fluorescência resolvida no tempo. Potencial zeta. Espalhamento de luz dinâmico.

Abstract

This study presents time-resolved and steady-state fluorescence results on the interaction of the meso-tetrakis (4-methylpyridil) porphyrin, in free base form (TMPyP), and complexed with Zn^{2+} (ZnTMPyP), with phospholipid vesicles. Zeta potential and dynamic light scattering (DLS) techniques were also used. Phospholipid vesicles were formed by two phospholipid systems: saturated and unsaturated. The first group is a mixture of zwitterionic dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline (DPPC) and anionic 1,2-dipalmitoyl-*sn*-3-glycero-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG) phospholipids, at different molar ratios. Measurements were performed below (25 °C) and above (50 °C) the main gel-liquid crystalline phase transition temperature (~ 41 °C). The second group is constituted by a mixture of zwitterionic 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocoline (POPC) and anionic 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho(1-*rac*-glycerol) (POPG) phospholipids, at different molar ratios. Since the gel-liquid crystalline phase transition of these phospholipids occurs at a very low temperature value, all experiments were performed at 25 °C (liquid crystalline state vesicles). All phospholipid systems were prepared through the extrusion method in order to obtain large unilamellar vesicles (LUV). The fluorescence data analyses indicated that the electrostatic attraction between the porphyrin substituents (positively charged) and the polar head groups of the phospholipid vesicles (Stern layer) plays an important role on the porphyrin binding affinity. The distribution of TMPyP between the aqueous medium (buffer) and the phospholipid vesicles was characterized by the coexistence of a shorter (~ 5 ns) and a longer (~ 9-11 ns) fluorescence lifetimes, respectively. Based on the pre-exponential values, additional time-resolved experiments showed a redistribution of the porphyrin at increasing salt concentration. The quenching studies, using potassium iodide (KI) as quencher, indicated that both TMPyP and ZnTMPyP are preferentially located at the Stern layer region. This result is in agreement with the zeta potential and DLS findings, which demonstrated a partial neutralization of the negative charges at the vesicle surface due to the porphyrin association.

Keywords: Cationic porphyrin. Phospholipid vesicles. Steady-state fluorescence. Time-resolved fluorescence. Zeta potential. Dynamic light scattering.

Lista de ilustrações

Figura 1 -	Estrutura molecular da porfirina meso-tetrakis (4-metilpiridil) (TMPyP) na forma de base livre ($M = 2H^+$) e complexada com o íon metálico Zn^{2+} (ZnTMPyP).....	23
Figura 2 -	Modelo esquemático de uma membrana plasmática.....	27
Figura 3 -	Estrutura molecular dos fosfoglicerídeos DPPC, POPC, DPPG e POPG, os quais foram utilizados neste trabalho.....	32
Figura 4 -	Representação esquemática dos agregados lipídicos formados por surfactantes (micelas) e por fosfolipídios (vesículas).....	34
Figura 5 -	Representação esquemática dos processos comumente utilizados na preparação das MLVs, LUVs e SUVs.....	35
Figura 6 -	Níveis de energia eletrônica molecular. Figura modificada da referência (79).....	40
Figura 7 -	Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Também conhecido como diagrama de Jablonski, onde os estados singletos e tripleto estão representados por S e T, respectivamente.....	41
Figura 8 -	Modelo esquemático de um espectrofluorímetro utilizado para medidas de fluorescência estática.....	48
Figura 9 -	Modelo esquemático de um espectrofluorímetro utilizado para medidas de fluorescência resolvida no tempo.....	50
Figura 10 -	A) Decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP (25 °C) em tampão puro (linha cor preta) e na presença de concentrações crescentes (linhas cores mais claras) de LUVs, formadas pela mistura de DPPC:DPPG com 50 mol% de DPPG. Curvas de associação da TMPyP nos diferentes sistemas fosfolipídicos estudados à B) 25 °C e C) 50 °C. Os símbolos correspondem à porfirina na presença de LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG, com 30 mol% (quadrado) e 50 mol% (círculo) de DPPG, bem como de DPPG puro (triângulo).....	69
Figura 11 -	Fração de moléculas de porfirina ligada às LUVs, f_2 , em função da concentração de KCl, obtida dos dados de emissão de fluorescência resolvida no tempo, à 25 °C (símbolos sólidos) e 50 °C (símbolos vazios). Os símbolos correspondem à porfirina presente nas LUVs formadas de DPPC:DPPG, com 30 mol% (triângulos) e 50 mol% (triângulos invertidos) de DPPG, bem como na presença das LUVs formadas por DPPG puro (diamantes). Os valores de f_2 são dados em porcentagem.....	74
Figura 12 -	A) Espectros de emissão de fluorescência (25 °C) para a TMPyP livre em tampão, em função da concentração do supressor KI. A seta indica a diminuição de intensidade de fluorescência com a adição de concentrações crescentes do supressor. Os dados de supressão foram obtidos numa	

	condição de força iônica constante. (B) Gráfico de Stern-Volmer da TMPyP presente em diferentes meios à 25 °C. Os símbolos correspondem à porfirina livre em tampão puro (quadrado), na presença de LUVs de DPPC puro (círculos), LUVs formadas pelas mistura de DPPC:DPPG, com 30 mol% (triângulos) e 50 mol% (triângulos invertidos) de DPPG e LUVs de DPPG puro (diamantes).....	76
Figura 13 -	Razão da modulação (círculos sólidos) e diferença de fase (quadrados sólidos), em função da frequência de modulação, para a TMPyP na presença das LUVs formadas de DPPC:DPPG com 30 mol% de DPPG. (A) na ausência e na presença de (B) 2 mM e (C) 16 mM de KI.....	80
Figura 14 -	Gráficos de Stern-Volmer da porfirina TMPyP presente em diferentes meios à 25 °C (símbolos sólidos) e 50 °C (símbolos vazios). Os símbolos correspondem à porfirina livre em tampão puro (quadrados), na presença das LUVs formadas por DPPC puro (círculos) e pela mixtura de DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG (triângulos).....	81
Figura 15 -	A) Decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP em tampão puro e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os dois decaimentos mais curtos, atribuídos à porfirina em tampão puro (linha cor preta) e na presença de vesículas de POPC puro (linha cor cinza escuro) estão sobrepostos. Para as vesículas contendo POPG, o decaimento se torna mais longo em função do aumento da concentração do fosfolipídio aniônico (linhas cor cinza claro). B) Decaimento de fluorescência da ZnTMPyP em tampão puro.....	95
Figura 16 -	A) Espectros de absorção óptica da TMPyP na ausência e na presença de concentrações crescentes de POPG. O inserto representa a ampliação da região espectral que compreende as bandas Q. B) Espectros de absorção da porfirina na presença de diferentes concentrações de POPG após subtração do espectro da porfirina em tampão puro. A linha tracejada indica o valor do comprimento de onda ($\lambda = 436,5$ nm) no qual os valores de absorbância foram coletados para a obtenção das curvas de associação.....	98
Figura 17 -	Curvas de associação obtidas para as porfirinas (A) TMPyP e (B) ZnTMPyP na presença de diferentes vesículas de fosfolipídio à 25 °C. Os símbolos referem-se à porfirina na presença das LUVs formadas por POPC:POPG, com 30 (triângulos) e 50 mol% de POPG (triângulos invertidos) bem como por POPG puro (diamantes).....	99
Figura 18 -	A) Espectros de absorção óptica da ZnTMPyP, na ausência e na presença de concentrações crescentes de POPG. O inserto representa a ampliação da região espectral que compreende as bandas Q. B) Espectros de absorção da porfirina na presença de diferentes concentrações de POPG após subtração do espectro da porfirina em tampão puro. A linha	

- tracejada indica o valor do comprimento de onda ($\lambda = 453,5$ nm) no qual os valores de absorbância foram coletados para a obtenção das curvas de associação..... 102
- Figura 19 -** A) Espectros de emissão de fluorescência (25 °C) para a porfirina catiônica TMPyP à diferentes concentrações das LUVs de POPC:POPG com 30 mol% de POPG. B) Curvas de associação da porfirina TMPyP em diferentes vesículas de fosfolipídios à 25 °C. Os símbolos referem-se à porfirina na presença das LUVs formadas por POPC:POPG com 30 (triângulos) e 50 mol% de POPG (triângulos invertidos), bem como para as LUVs contendo POPG puro (diamantes)..... 104
- Figura 20 -** A) Espectros de emissão de fluorescência para a porfirina catiônica TMPyP na presença das LUVs de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, em função da concentração do supressor iodeto de potássio (KI). B) Gráficos de Stern-Volmer para a porfirina em tampão e na presença de diferentes LUVs. Os símbolos se referem à porfirina em tampão (quadrados), na presença das LUVs formadas por POPC puro (círculos), POPC:POPG com 30 (triângulos) e 50 mol% de POPG (triângulos invertidos) e POPG puro (diamantes)..... 106
- Figura 21 -** A) Espectros de emissão de fluorescência para a porfirina catiônica ZnTMPyP na presença das LUVs de POPC:POPG com 30 mol% de POPG, em função da concentração do supressor iodeto de potássio (KI). B) Gráficos de Stern-Volmer para a porfirina em tampão e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os símbolos se referem à porfirina em tampão (quadrados), na presença das LUVs formadas por POPC puro (círculos), POPC:POPG com 30 (triângulos) e 50 mol% de POPG (triângulos invertidos) e POPG puro (diamantes)..... 110
- Figura 22 -** A) Decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP em tampão puro. A curva experimental foi ajustada com um modelo mono-exponencial (linha vermelha), a partir de valores de tempos bastante curtos. O decaimento B), atribuído a amostra formada somente por vesículas de fosfolipídio em solução aquosa, foi somado ao decaimento da porfirina livre em tampão (curvas C e D). Em C), o decaimento foi ajustado com um modelo bi-exponencial, ao passo que em D), um modelo mono-exponencial foi utilizado. No caso da figura D), o ajuste foi realizado a partir de tempos mais longos que em relação aos ajustes das figuras A) e C). Os valores de tempo de vida, das contribuições fracionárias (em porcentagem) e das qualidades dos ajustes também estão apresentados..... 134
- Figura 23 -** A) Espectros de emissão da TMPyP em tampão puro e na presença de concentrações crescentes de metanol. Como o valor da constante dielétrica do metanol é menor que da água, tem-se que a polaridade do solvente diminui com o aumento da quantidade de metanol em solução. B) Razão das

intensidades dos espectros de emissão das porfirinas TMPyP (quadrados sólidos) e ZnTMPyP (círculos sólidos) nas diferentes concentrações de metanol, F , em relação ao espectro da porfirina em tampão puro, F_0 139

Figura 24 - Razão das intensidades dos espectros de emissão da porfirina ZnTMPyP nas diferentes concentrações de fosfolípido, F , em relação ao espectro da porfirina em tampão puro, F_0 . Os símbolos referem-se à porfirina na presença de vesículas formadas por POPC:POPG, com 30 (triângulos) e 50 mol% de POPG (triângulos invertidos) e POPG puro (diamantes)..... 141

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Sistemas fosfolipídicos (saturados e insaturados) investigados no presente estudo. Todas as vesículas de fosfolipídios foram do tipo LUVs, as quais foram preparadas através do método de extrusão utilizando uma membrana de policarbonato de 100 nm de diâmetro de poro.....	62
Tabela 2 -	Valores da constante de associação, K_b , estimados para a porfirina TMPyP na presença de diferentes vesículas de fosfolipídio. Estes valores foram obtidos para as vesículas no estado gel (25 °C) e líquido cristalino (50 °C).....	71
Tabela 3 -	Valores das constantes de Stern-Volmer, K_{SV} , e bimoleculares, k_q , obtidos dos estudos de supressão de fluorescência estática e resolvida no tempo para a porfirina TMPyP em tampão puro e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Estes experimentos foram realizados a 25 e 50 °C usando o iodeto de potássio (KI) como supressor.....	77
Tabela 4 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de DPPC puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, a diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.....	84
Tabela 5 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.....	86
Tabela 6 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por DPPC:DPPG, com 50 mol% de DPPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.....	89
Tabela 7 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de DPPG puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.....	90
Tabela 8 -	Densidade de carga superficial, σ , grau de ionização, α , número total de moléculas de DPPG (na superfície), N_m , e número de moléculas de DPPG ionizadas (na superfície), N_c , estimados para as amostras indicadas, no estado gel (25 °C)	

	e líquido cristalino (50 °C).....	93
Tabela 9 -	Tempos de vida de fluorescência das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP em tampão puro e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os valores da contribuição fracionária (em porcentagem) de cada tempo de vida no decaimento de fluorescência também estão apresentados.....	96
Tabela 10 -	Valores da constante de associação, K_b , obtidos dos experimentos de absorção óptica e fluorescência estática para as porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos.....	100
Tabela 11 -	Constantes de Stern-Volmer, K_{SV} , e bimoleculares, k_q , obtidas dos estudos de supressão para as porfirinas catiônicas TMPyP and ZnTMPyP, em tampão e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os experimentos foram realizados a 25 °C usando o iodeto de potássio (KI) como supressor.....	108
Tabela 12 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de POPC puro e pela mistura de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, a diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.....	112
Tabela 13 -	Densidade de carga superficial, σ , grau de ionização, α , número total de moléculas de POPG (na superfície), N_m , e número de moléculas de POPG ionizadas (na superfície), N_c , estimados para as amostras indicadas, no estado líquido. Estes valores foram calculados com base nos resultados de ξ e D_h apresentados nas Tabelas 12 e 14.....	114
Tabela 14 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por POPC:POPG, com 50 mol% de POPG, e para as vesículas de POPG puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico...	115
Tabela 15 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de POPC puro e pela mistura de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica ZnTMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.....	117
Tabela 16 -	Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ξ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por POPC:POPG, com 50 mol% de POPG, e para as vesículas de POPG puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica ZnTMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico...	119

Lista de abreviaturas e siglas

DPPC -	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (do inglês “ <i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocoline</i> ”)
DPPG -	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -3-glicero-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)] (do inglês “ <i>1,2-dipalmitoyl-sn-3-glycerol-[phospho-<i>rac</i>-(1-glycerol)]</i> ”)
POPC -	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (do inglês “ <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine</i> ”)
POPG -	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo(1- <i>rac</i> -glicerol) (do inglês “ <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phospho(1-<i>rac</i>-glycerol)</i> ”)
MUVs -	Vesículas multilamelares (do inglês, “ <i>multilamellar vesicles</i> ”)
LUVs -	Vesículas unilamelares grandes (do inglês, “ <i>large unilamellar vesicles</i> ”)
SUVs -	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês, “ <i>small unilamellar vesicles</i> ”)
TMPyP -	Porfirina meso-tetrakis (4-metilpiridil) (do inglês “ <i>meso-tetrakis (4-methylpyridil)porphyrin</i> ”)
ZnTMPyP -	Porfirina de zinco meso-tetrakis (4-metilpiridil) (do inglês “ <i>zinc meso-tetrakis (4-methylpyridil)porphyrin</i> ”)
DLS -	Espalhamento de luz dinâmico (do inglês, “ <i>dynamic light scattering</i> ”)
PDT -	Terapia fotodinâmica (do inglês, “ <i>photodynamic therapy</i> ”)
PDI -	Inativação fotodinâmica (do inglês, “ <i>photodymanic inactivation</i> ”)
ATP -	Adenosina trifosfato (do inglês, “ <i>adenosine triphosphate</i> ”)
LPS -	Lipopolissacarídeos (do inglês, “ <i>lypopolysaccharides</i> ”)
PE -	Fosfatidiletanolamina (do inglês, “ <i>phosphatidylethanolamine</i> ”)
PC -	Fosfatidilcolina (do inglês, “ <i>phosphatidylcholine</i> ”)
PG -	Fosfatidilglicerol (do inglês, “ <i>phosphatidylglycerol</i> ”)
PMT -	Tubos fotomultiplicadores (do inglês, “ <i>photomultiplier tubes</i> ”)
TCSPC -	Contagem de foton único correlacionado no tempo (do inglês, “ <i>time correlated single photon counting</i> ”)
TAC -	Conversor de tempo-amplitude (do inglês, “ <i>time-amplitude conversor</i> ”)
MCA -	Analisador multicanal (do inglês “ <i>multichannel analyzer</i> ”)
SDS -	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”)
PI -	Fosfatidilinositol (do inglês, “ <i>phosphatidylinositol</i> ”)
IPD -	Índice de polidispersividade

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Justificativa	18
1.2 Estruturas, Características Espectroscópicas e Físico-Químicas das Porfirinas	22
1.3 Características Fotofísicas das Porfirinas e PDI	24
1.4 Biomembranas	26
1.5 Vesículas de Fosfolipídio	31
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	39
3.1. Absorção óptica	39
3.2 Fluorescência	42
3.2.1 Fluorescência estática	47
3.2.2 Fluorescência resolvida no tempo	49
3.2.3 Estimativa da constante de associação	52
3.2.3.1 Fluorescência estática	54
3.2.3.2 Fluorescência resolvida no tempo	56
3.2.4 Estimativa da constante de supressão	57
3.2.4.1 Fluorescência estática	58
3.2.4.2 Fluorescência resolvida no tempo	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1 Materiais	61
4.1.1 Produtos químicos	61
4.2 Métodos	61
4.2.1 Preparação das vesículas de fosfolipídio	61
4.2.2 Preparação das amostras para os estudos de supressão de fluorescência (estática e resolvida no tempo)	63
4.2.3 Preparação das amostras para os estudos de associação (fluorescência e absorção óptica)	64
4.2.4. Preparação das amostras para os estudos de DLS e potencial zeta	64
4.2.5 Condições das medidas de absorção óptica	64
4.2.6 Condições das medidas de fluorescência estática	65
4.2.7 Condições das medidas de fluorescência resolvida no tempo	65
4.2.8 Condições das medidas de DLS e potencial zeta	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1. Afinidade da associação e localização da porfirina TMPyP em vesículas unilamelares de DPPC/DPPG no estado gel e líquido cristalino (Parte I)	68
5.1.1 Associação da porfirina TMPyP pelas vesículas de fosfolipídio	68
5.1.2. Efeito do sal KCl sobre a fração de porfirina ligada nas vesículas de fosfolipídio	73
5.1.3 Supressão de fluorescência da TMPyP presente em diferentes sistemas fosfolipídicos	75
5.1.3.1 Resultados de fluorescência estática	75

5.1.3.2 Resultados de fluorescência resolvida no tempo no domínio das frequências	78
5.1.4 Estudos de Potencial Zeta e DLS.....	83
5.1.4.1 Carga superficial das LUVs e número de moléculas ionizadas de DPPG	91
5.2 Afinidade da associação e localização das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP em vesículas unilamelares de POPC/POPG no estado líquido cristalino (Parte II)	94
5.2.1 Tempos de vida das porfirinas catiônicas em meio aquoso e na presença de vesículas de fosfolipídio	94
5.2.2 Associação das porfirinas catiônicas às vesículas de fosfolipídio	97
5.2.2.1 Resultados de absorção óptica.....	97
5.2.2.2 Resultados de fluorescência estática	103
5.2.3. Supressão de fluorescência das porfirinas catiônicas em meio aquoso e na presença das LUVs	105
5.2.4. Localização das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP nas LUVs	111
6 CONCLUSÕES	120
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
8 PERSPECTIVAS.....	132
APÊNDICES	133
Apêndice A – Distorção do decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP devido ao espalhamento de luz pelas LUVs	133
Apêndice B – Número de agregação das LUVs.....	135
Apêndice C – Densidade de cargas na superfície das LUVs.....	136
Apêndice D – Grau de ionização das LUVs	137
Apêndice E – Espectros de emissão de fluorescência das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP em função da polaridade do meio	138
Apêndice F – Espectro de emissão de fluorescência da ZnTMPyP em função da concentração de fosfolipídio	140
Apêndice G – Publicações relacionadas com a tese	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

As porfirinas e seus derivados metálicos desempenham um papel fundamental no metabolismo celular de diversos organismos. Nos vertebrados, por exemplo, o grupo prostético das hemoproteínas é constituído de uma porfirina de ferro, geralmente a protoporfirina IX, que participa de vários processos bioquímicos. (1,2) Dentre estes processos destacam-se: o transporte e armazenamento de oxigênio na hemoglobina e mioglobina, respectivamente; o transporte de elétrons no citocromo b e c; a transferência de elétrons para o oxigênio na enzima citocromo oxidase; a utilização e decomposição do peróxido de hidrogênio pelas enzimas peroxidase e catalase, respectivamente, e a oxidação de compostos orgânicos pelo citocromo P450. (2-6) Na clorofila, organela citoplasmática presente nas células vegetais, também encontramos uma protoporfirina complexada com magnésio que está diretamente envolvida no processo de fotossíntese. (7,8) Estes exemplos demonstram claramente a importância das porfirinas e de seus derivados para a manutenção, em nível fisiológico, de todas as formas de vida existentes no planeta (animal e vegetal). Além da sua ocorrência natural, uma grande variedade de porfirinas tem sido sintetizada para o uso clínico, seja como agentes de contraste em tomografia de fluorescência, imagem radiológica e ressonância magnética nuclear, seja como agentes terapêuticos (fotossensibilizadores) no tratamento de doenças através da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês “Photodynamic therapy”). (9-18) Em relação aos estudos clínicos por PDT, os fotossensibilizadores mais utilizados são aqueles derivados da hematoporfirina, os quais são geralmente denominados como de primeira geração. Dentre eles destaca-se o Photofrin[®], que consiste de uma mistura complexa de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina. (19-23) O Photofrin[®] foi o primeiro fotossensibilizador aprovado pela agência americana de saúde para o tratamento de câncer de bexiga e de mama.

Outra aplicação importante das porfirinas é a foto-inativação de fungos e bactérias. Esta nova modalidade de tratamento, geralmente referida como inativação fotodinâmica (PDI, do inglês “Photodynamic inactivation”), tem atraído o interesse de muitos cientistas em virtude do aumento da resistência destes microrganismos frente aos antimicrobianos comumente utilizados. Além de representar um novo

procedimento de intervenção no tratamento de doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias, a PDI também poderia contribuir para a redução do uso indiscriminado de antimicrobianos, levando à diminuição do desenvolvimento da resistência microbiana. (24) Neste sentido, uma quantidade significativa de porfirinas tem sido sintetizada e testada em diferentes estudos a fim de estabelecer uma correlação entre a eficiência antimicrobiana e a estrutura destas moléculas. As evidências experimentais indicam que as porfirinas catiônicas meso-substituídas apresentam uma maior eficiência na foto-inativação microbiana quando comparadas a outras porfirinas neutras ou aniônicas. (25) O fungo *Trichophyton rubrum*, por exemplo, responsável por grande parte das micoses superficiais ocorrentes em pelos, unhas e pele, foi totalmente inativado pela porfirina tri-catiônica 5,10,15-tris(4-N-metilpiridil)-20-fenil em apenas uma seção de exposição à luz. (26,27) A susceptibilidade deste fungo à porfirina tri-catiônica foi maior frente a outros fotossensibilizadores geralmente utilizados em PDT, tais como o Photofrin[®] e a deuteroporfirina na forma base livre. (26,27) Além disso, o efeito fotodinâmico desta porfirina também mostrou ser maior em relação às ftalocianinas, tais como a ftalocianina de zinco e as ftalocianinas tetra-sulfonadas, tanto na forma de base livre quanto complexada com alumínio. (27) Outra porfirina tri-catiônica com estrutura semelhante, a 5-fenil-10,15,20-tris(4-N-metilpiridil), também tem sido utilizada com sucesso na foto-inativação do fungo *Candida albicans*. (28,29) Este fungo é responsável por infecções superficiais de mucosa e de infecções invasivas com risco de morte.

Além dos fungos, as bactérias também demonstraram ser bastante susceptíveis às porfirinas catiônicas meso-substituídas. A bactéria *Acinetobacter baumannii*, por exemplo, foi completamente foto-inativada pela porfirina tetra-catiônica meso-tetrakis(4-N-metilpiridil) (TMPyP). (30,31) Este microrganismo, bastante patogênico aos seres humanos, está geralmente envolvido nos casos de infecções nosocomiais (hospitalares) tais como as de pele e por queimaduras. Outra bactéria gram-negativa, a *Escherichia coli*, também foi inativada com sucesso pela TMPyP. (31) A eficiência desta porfirina na foto-inativação de bactérias gram-negativas tem sido atribuída, dentre outros fatores, à sua alta acumulação nestes organismos. Alguns pesquisadores tem cogitado que este efeito está associado à alta afinidade destas moléculas pela membrana externa das bactérias, em consequência da atração eletrostática entre os grupos substituintes positivamente

carregados da porfirina e as cargas negativas na superfície externa da bactéria. (30-32) Estudos mais recentes demonstram que não somente a natureza catiônica do fotossensibilizador é importante para a sua acumulação nestes microrganismos, como também o número e a distribuição das cargas positivas devem ser levados em consideração (33,34). A susceptibilidade da bactéria *Escherichia coli* frente a uma porfirina tri-catiônica com um grupo substituinte trifluorometil, por exemplo, mostrou ser maior quando comparado à porfirina tetra-catiônica TMPyP. (34) Este resultado pode ser explicado pelo aumento do caráter anfifílico da porfirina devido à presença do substituinte lipofílico trifluorometil, o qual contribuiria para a associação desta molécula pela bicamada lipídica da membrana bacteriana externa. (34) A substituição de um certo número de substituintes catiônicos por outros grupos químicos lipofílicos também foi investigado em um estudo prévio. Este estudo demonstrou, por exemplo, que o maior acúmulo das porfirinas catiônicas anfifílicas nas membranas celulares é acompanhado por um aumento do coeficiente de partição destas moléculas entre o meio aquoso e as bicamadas lipídicas. (35)

Apesar da inclusão de grupos substituintes lipofílicos na estrutura das porfirinas resultar num aumento da inativação de bactérias gram-negativas, tais modificações químicas podem originar alguns efeitos indesejáveis. Por exemplo, tais modificações diminuem a solubilidade das porfirinas em meio aquoso, levando à formação de agregados porfirínicos. (36,37) Este efeito é bastante indesejável visto que a atividade fotodinâmica da porfirina é significativamente reduzida. Neste contexto, o uso da porfirina TMPyP como agente fotoativo em PDI é bastante atrativo, visto que esta molécula permanece na sua forma monomérica dentro de uma faixa de pH entre 3 e 12. (38) Esta faixa de pH abrange a maioria das condições fisiológicas encontradas nos sistemas biológicos. Outra característica interessante da TMPyP está associada com o fato da sua toxicidade intrínseca (citotoxicidade no escuro) ser significativamente menor quando comparada às outras meso-porfirinas catiônicas investigadas. (39) Assim, os efeitos colaterais indesejáveis advindos da administração de porfirinas, devido à produção de toxinas nas células epidermais, poderiam ser reduzidos pela utilização desta molécula. Um segundo fator positivo quanto à segurança da TMPyP diz respeito à sua ineficiência em atravessar a barreira da pele. Estudos de microscopia de fluorescência mostraram que esta molécula fica retida na camada mais superficial da pele e não permeia através das camadas mais profundas da epiderme. (29) Desta forma, os riscos de um efeito

sistêmico devido à TMPyP seriam minimizados, o qual garantiria a segurança das formulações (à base desta porfirina) empregadas no tratamento de infecções de pele causadas por fungos e bactérias. Em relação à porfirina tri-catiônica, um estudo de microscopia confocal revelou uma pequena permeação desta molécula através da epiderme. (27) Estes resultados estão em concordância com os valores dos coeficientes de partição obtidos para estes dois tipos de porfirinas (tri- e tetra-catiônica). De acordo com a literatura, moléculas que apresentam valores maiores do coeficiente de partição atravessam mais facilmente a barreira externa da pele. (40)

Estudos básicos sobre a interação da TMPyP com bactérias gram-negativas são importantes para avaliar os parâmetros físico-químicos que influenciam a associação desta moléculas com estes microrganismos. Tais informações podem ser úteis, por exemplo, na otimização de formulações para o tratamento de infecções bacterianas por PDI. No entanto, uma vez que a maioria destes microrganismos oferecem riscos à saúde humana, a sua manipulação necessita de uma infraestrutura laboratorial específica. Outra limitação técnica quanto ao uso destes organismos é a dificuldade em isolar, purificar e caracterizar as membranas bacterianas na sua forma íntegra para os estudos de interação molécula-membrana. Além disso, uma vez que estes sistemas espalham fortemente a luz, sua investigação através das técnicas espectroscópicas convencionais, especialmente de espectroscopia óptica, tais como absorção óptica e emissão de fluorescência, é bastante dificultada. Assim, uma alternativa atrativa tem sido a utilização de modelos estruturais de membrana bacteriana. Estes modelos são geralmente constituídos por uma mistura de fosfolipídios, os quais reproduzem a estrutura básica da membrana bacteriana externa (bicamada lipídica). Vários estudos na literatura utilizam tais modelos, geralmente referidos como vesículas de fosfolipídio, para investigar a interação de diferentes tipos de porfirinas. (41-48) No presente estudo, estes sistemas fosfolipídicos serão empregados para confirmar a hipótese de que a atração eletrostática entre os grupos substituintes catiônicos da porfirina e os grupos negativamente carregados no envelope celular da bactéria desempenha um papel crucial para a acumulação destas moléculas neste tipo de microrganismo. Tal aferição será realizada com base nas constantes de associação, K_b , as quais refletem a afinidade da porfirina pelos sistemas fosfolipídicos investigados. Além disso, visto que a localização das porfirinas na membrana bacteriana pode contribuir

para o entendimento dos danos causados nesta região da bactéria, tal informação também foi alvo de investigação do presente estudo.

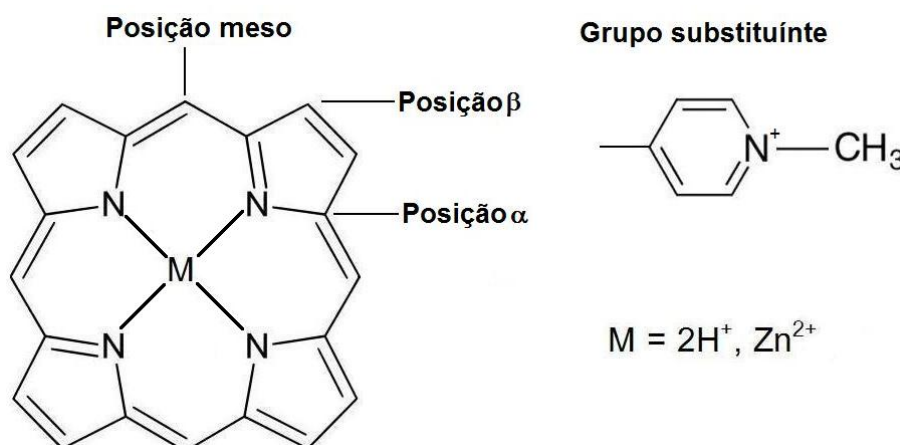
1.2 Estruturas, Características Espectroscópicas e Físico-Químicas das Porfirinas

Como foi mencionado anteriormente, as porfirinas e seus derivados abrangem uma classe muito importante de moléculas por desempenhar um papel fundamental em diferentes processos biológicos. Tanto as porfirinas de ocorrência natural, tais como aquelas presentes nas hemoproteínas e na clorofila, quanto as porfirinas sintetizadas em laboratório possuem em comum uma estrutura macrocíclica denominada de núcleo porfina. Como pode ser observado na figura 1, o núcleo porfina é formado por quatro anéis pirrólicos unidos através de pontes metilênicas. Esta estrutura é altamente conjugada com os elétrons π (aproximadamente um total de 18) delocalizados no anel macrocíclico (ver figura 1). (49,50) Assim, as porfirinas podem ser enquadradas no grupo dos compostos aromáticos, os quais apresentam características físico-químicas particulares quando interagem com a radiação eletromagnética. Uma característica comum à maioria dos compostos aromáticos, por exemplo, é a alta absorção da luz. Este fenômeno é evidenciado pelos altos valores de absorvidade molar das bandas de transição eletrônica, observadas nos espectros de absorção óptica. No caso das porfirinas, a absorção de fótons pelos elétrons π do macrociclo ocorre dentro de uma faixa de comprimento de onda que se estende desde o ultravioleta (~300 nm) até o infravermelho (~700 nm). Os valores das absorvidades molares da banda de Soret das porfirinas, por exemplo, são em geral da ordem de 10^4 - 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$. (49,50)

Outra característica espectroscópica interessante dos compostos aromáticos é que, ao absorver fótons, os elétrons π destas moléculas são excitados para o estado singleto. A ocupação deste estado caracteriza o fenômeno de fluorescência, onde o estado de spin dos elétrons π no estado excitado singleto é o mesmo quando comparado ao estado singleto fundamental. (51) O tempo médio que o elétron permanece no primeiro estado singleto é conhecido como tempo de vida de fluorescência. Valores típicos valores de tempos de vida das porfirinas são da ordem de 10^{-9} - 10^{-7} segundos. (50,51) Após este período, os elétrons π do macrociclo

retornam ao estado singleto fundamental através da emissão de um fóton. Alternativamente, através de um processo conhecido como cruzamento intersistema, os elétrons π do macrociclo podem inverter seu estado de spin e passar do estado singleto para o estado tripleto. A ocupação do estado tripleto caracteriza o fenômeno da fosforescência. (51) Como a transição dos elétrons π do estado tripleto excitado para o estado singleto fundamental envolve mudança de estados de spin, o tempo de vida das porfirinas no estado tripleto é muito mais longo que no estado singleto, sendo da ordem de 10^{-3} - 10^{-6} segundos. Como será discutido mais adiante, esta característica permite que as porfirinas e seus derivados sejam utilizados como fotossensibilizadores em PDI.

Figura 1 – Estrutura molecular da porfirina meso-tetrakis (4-metilpiridil) (TMPyP) na forma de base livre ($M = 2H^+$) e complexada com o íon metálico Zn^{2+} (ZnTMPyP).



A solubilidade do núcleo porfina em meio aquoso está associada à presença de dois átomos de nitrogênio e dois grupos NH capazes de formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Além disso, dependendo das condições do meio (pH, força iônica, etc), os dois átomos de nitrogênio do macrociclo são capazes de aceitar prótons e, desta forma, conferir um caráter catiônico ao grupo porfina. Nas porfirinas, o valor de pK dos dois átomos de nitrogênio também é influenciado pelos grupos químicos ligados à estrutura do anel. Ambos os fenômenos (interação com o solvente e protonação dos átomos de nitrogênio do macrociclo) alteram significativamente as propriedades espectroscópicas das porfirinas. (49,50) Quando o anel porfirínico é estabilizado por dois prótons de hidrogênio, o composto é chamado de porfirina base livre. Porém, quando é feita a remoção dos prótons do

nitrogênio dos anéis pela coordenação de diferentes íons de metais com os quatro átomos de nitrogênio, dá-se origem a uma grande variedade de metaloporfirinas. A interação dos elétrons π do macrociclo com os elétrons do substituínte central também alteram significativamente as características espectroscópicas mencionadas anteriormente. (49,50) Tais alterações são governadas pelo estado de spin e oxidação do metal bem como da basicidade do ligante. Além disso, elas também são atribuídas à mudança na simetria da porfirina devido à coordenação do metal na estrutura do macrociclo. (49,50)

Assim, as porfirinas se diferem pela disposição dos seus grupos substituintes, conferindo-lhes certas propriedades individuais. Como indicado na figura 1, estes grupos podem se ligar à diferentes regiões (posições) do macrociclo. (50) O grupo substituínte da porfirina meso-tetrakis (4-metilpiridil) (TMPyP), por exemplo, alvo de investigação no presente estudo, está ligado às quatro posições meso do macrociclo (ver figura 1). Devido ao caráter catônico do substituínte, sendo o mesmo facilmente solvatado pelas moléculas de água, esta porfirina apresenta uma alta solubilidade em meio aquoso. Vale a pena mencionar que, no presente estudo, esta porfirina foi investigada tanto na sua forma base livre, $2H^+$ (TMPyP), quanto complexada com Zn^{2+} (ZnTMPyP). A alta solubilidade desta porfirina juntamente com o caráter catônico dos seus substituíntes contribuem decisivamente para o desfavorecimento da formação de auto-agregados entre as suas espécies monoméricas. O fenômeno de agregação ocorre geralmente devido à baixa solubilidade das porfirinas em solução aquosa, a qual é conferida pela presença de grupos substituíntes hidrofóbicos. Além disso, a agregação pode ser favorecida por atrações eletrostáticas entre os monômeros de porfirina. Por exemplo, no caso das meso-porfirinas aniônicas, esta atração eletrostática ocorre entre os grupos substituíntes carregados negativamente e os dois átomos de nitrogênio do macrociclo que, em certas condições de pH, encontram-se protonados (carregados positivamente). (52)

1.3 Características Fotofísicas das Porfirinas e PDI

Apesar deste estudo não envolver foto-inativação microbiana, é interessante descrever algumas propriedades fotofísicas das porfirinas que as tornam excelentes fotossensibilizadores em PDI. Dentre elas destaca-se o seu alto rendimento quântico (razão entre o número de fótons emitidos e absorvidos pelo fluoróforo) de

fosforescência e longo tempo de vida no estado tripleto. (18) Neste estado, as porfirinas podem sofrer dois tipos de reações químicas, as quais são comumente referidas como reações do tipo I e do tipo II. (53) Nas reações do tipo I, as porfirinas podem tanto transferir como abstrair elétrons das moléculas do substrato (tecido, organela citoplasmática, etc). No caso em que as porfirinas se transformam em íons radicais, as espécies aniônicas do fotosensibilizador podem interagir com o oxigênio no estado fundamental tripleto, gerando radicais superóxidos. Estes radicais podem reagir com vários tipos de biomoléculas. Com relação à formação de radicais a partir das moléculas do substrato, estes mesmos podem interagir com outras moléculas do substrato gerando formas oxidadas. Na reação do tipo II, a porfirina retorna ao seu estado fundamental após transferir energia ao oxigênio molecular no estado tripleto. (53) Esta energia é suficiente para excitar as moléculas de oxigênio para seu estado excitado singleto. O oxigênio singleto é uma espécie altamente reativa e é considerado o principal mediador do dano causado nos microrganismos pelas porfirinas.

Apesar das reações do tipo I e tipo II estarem envolvidas no processo de fotoinativação de bactérias, estudos da literatura sugerem que o oxigênio singleto desempenha um papel mais significativo na inativação destes organismos. (54) No caso das porfirinas catiônicas, pelo menos dois mecanismos têm sido propostos para explicar os danos letais causados às bactérias. (30-32,55-57) O primeiro é que estas espécies reativas produzem alterações na integridade da membrana bacteriana, resultando no vazamento do conteúdo celular ou na inativação do sistema de transporte da membrana. Além disso, um estudo mais recente também demonstrou que a atividade fotodinâmica da porfirina compromete o sistema de transferência de elétrons da cadeia respiratória, levando à morte do microrganismo. (32) O segundo mecanismo proposto é que as porfirinas conseguem alcançar o interior do microrganismo e provocar mudanças à estrutura do DNA. Embora tais alterações contribuam para a morte do microrganismo, elas não são a principal razão de inativação bacteriana nos primeiros minutos do tratamento. Este segundo mecanismo é geralmente observado quando o tempo de incubação do microrganismo na presença da porfirina é suficientemente longo. (32,57) Além do tempo de incubação, outros parâmetros tais como concentração de porfirina, tempo de exposição à luz, fluência e taxa de fluência também influenciam a eficiência dos tratamentos por PDI. (57) Outro fato curioso quanto à inativação bacteriana é que

evidências experimentais indicam que as bactérias gram-negativas são geralmente menos susceptíveis à PDI em comparação às bactérias gram-positivas. (55,56,58) Este efeito tem sido associado às diferenças na arquitetura da membrana bacteriana externa destas duas espécies. A seguir está apresentada uma breve revisão sobre a estrutura molecular das membranas biológicas, em especial da membrana externa das bactérias gram-positivas e gram-negativas.

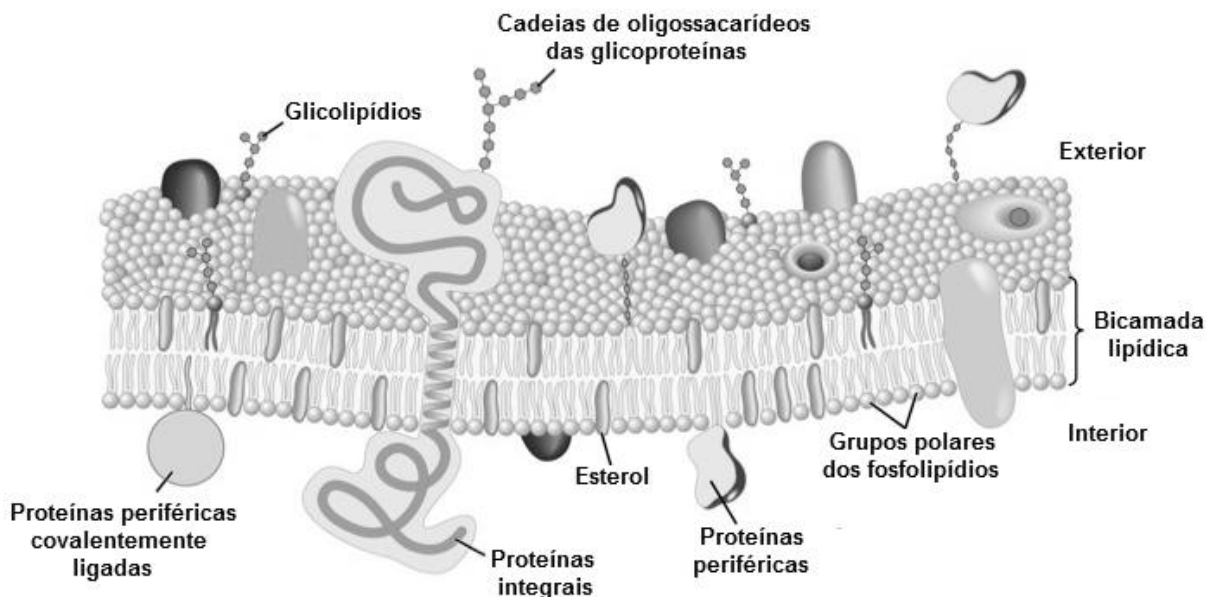
1.4 Biomembranas

As membranas biológicas desempenham um papel importante na organização celular de diferentes organismos. Nos eucariotos, por exemplo, além de delimitar o conteúdo intracelular, as membranas biológicas compartimentalizam o material genético e outros espaços celulares dando origem a um núcleo bem definido e a diferentes organelas citoplasmáticas tais como mitocôndria, complexo de Golgi, etc. (59-62) Por outro lado, nos organismos procariotos, tais como fungos e bactérias, não há evidências quanto à presença de membranas intracelulares e, desta forma, ambos os microrganismos são constituídos de apenas uma membrana que separa o meio extracelular do meio intracelular. (63) Esta membrana, geralmente referida como membrana plasmática, funciona como uma barreira seletiva à passagem de substância para o interior (ou exterior) da célula, tanto nos procariotos quanto nos eucariotos. Esta função é regulada pelas interações entre os componentes das membranas que, em geral, são constituídas basicamente de lipídios e proteínas. (64,65) A figura 2 mostra um modelo esquemático da membrana plasmática. A bicamada lipídica corresponde à estrutura básica das membranas biológicas e é constituída principalmente de fosfolipídios. Esta estrutura é formada em decorrência do efeito hidrofóbico entre as moléculas anfifílicas de fosfolipídio. As proteínas de membrana podem atravessar completamente a bicamada lipídica, sendo portanto chamadas de proteínas integrais, ou podem estar somente ancoradas à bicamada (proteínas periféricas). A constituição lipídica e proteica das membranas celulares pode variar significativamente entre as espécies e, deste modo, ter consequência direta tanto na seletividade da membrana quanto no perfil de difusão de substâncias para o interior e exterior da célula. (66,67)

O transporte de moléculas através das membranas celulares ocorre tanto pelas regiões lipídicas quanto protéicas. (59,66,67) Devido ao caráter hidrofóbico do

interior da bicamada lipídica, a principal rota de permeação de certos íons e moléculas aquo-solúveis (aquelas que são carregadas ou que possuem grupos polares) ocorre através das proteínas integrais da membrana. Existem duas classes de proteínas de membrana transportadoras: as proteínas carreadoras, as quais literalmente transportam moléculas através da bicamada, e as proteínas-canal (ou simplesmente canais iônicos), as quais formam um poro estreito através do qual íons e pequenas moléculas (tais como água, uréia, glicerol, etc.) podem permear. (59,66,67) Ao contrário das proteínas-canal, as proteínas carreadoras podem transportar moléculas com pesos moleculares maiores. Uma vez que as membranas são mantidas por interações fracas entre os constituintes lipídicos, certas moléculas são capazes de “deslizar” por entre os lipídios e atravessar de um lado para o outro da bicamada. Este processo espontâneo é chamado de difusão e permite com que moléculas pequenas e hidrofóbicas entrem e saiam facilmente da célula. A taxa com o qual estas moléculas se difundem através da membrana depende tanto do seu peso molecular quanto do seu grau de hidrofobicidade. (59,66,67)

Figura 2 – Modelo esquemático de uma membrana plasmática.



Fonte: NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: W.H. Freeman, 5ª ed., 2008, 1100 p.

Substâncias hidrofóbicas, tais como gases e hormônios esteroidais, podem se difundir facilmente através da membrana. Quanto às moléculas neutras de baixo peso molecular (como por exemplo, água, etanol, etc.), apesar de serem repelidas pelo interior hidrofóbico da bicamada, também podem se difundir para o interior (ou exterior) da célula. As bicamadas lipídicas são muito menos permeáveis às moléculas polares de maior peso molecular e, no caso dos íons que possuem moléculas de água estruturadas ao seu redor, elas são praticamente impermeáveis. (59,66,67)

Além de controlar a permeabilidade de moléculas, as membranas celulares também mediam outros processos fisiológicos importantes para a sobrevivência das células. A membrana mitocondrial das células eucarióticas, por exemplo, participa diretamente do sistema transportador de elétrons da cadeia respiratória que, como atualmente é bem estabelecido, tem como objetivo a síntese do trifosfato de adenosina (ATP, do inglês “*adenosine triphosphate*”). Ainda em relação aos eucariotos, durante a etapa inicial da divisão celular (mitose), a membrana nuclear se desintegra e, após a separação dos cromossomos, esta membrana é novamente reconstituída nos núcleos resultantes. (66,67) No caso dos procariotos, visto que os mesmos não possuem membranas intracelulares, os processos biológicos mencionados acima ocorrem na própria membrana externa. (63,66,67) Assim, a arquitetura e composição da membrana externa destes organismos unicelulares diferem consideravelmente quando comparado às dos eucariotos. Por exemplo, além da membrana plasmática, outras duas camadas mais externas também estão presentes nos procariotos. Estas três camadas morfologicamente distintas constituem o envelope celular destes organismos, onde muitos dos processos mediados por membrana ocorrem na camada mais interna (membrana plasmática) do envelope. (66,67) No caso das bactérias, por exemplo, a membrana plasmática é similar à membrana interna mitocondrial dos eucariotos. (63) Externamente à membrana plasmática encontra-se uma região rica em mureínas (peptidoglicanos) que estão covalentemente unidas entre si através de ligações peptídicas cruzadas. Esta região é geralmente referida como camada de mureína e apresenta uma estrutura bastante rígida que determina a forma das células. (63,68) É por esta razão que esta camada é reconhecida como sendo a parede celular dos procariotos. Os procariotos que não possuem parede celular são mecanicamente frágeis e muito susceptíveis às variações osmóticas do meio. Certos antibióticos como a penicilina,

por exemplo, inativam a bactéria pela interferência na formação das ligações peptídicas cruzadas dos peptidoglicanos, comprometendo assim a funcionalidade da parede celular. (65)

Nas bactérias gram-positivas, a espessura da camada de mureína é muito maior que nas bactérias gram-negativas. (68) Outra diferença importante em relação à arquitetura do envelope celular é a existência de uma terceira camada mais externa, a qual se faz presente nas bactérias gram-negativas e ausente nas bactérias gram-positivas. (63,68) Assim como na membrana plasmática, esta camada também é constituída de fosfolipídios e proteínas arranjados na forma de uma bicamada. A quantidade de fosfolipídio na camada mais externa do envelope bacteriano varia entre 20 e 25%, enquanto que a de proteínas varia de 45 a 50%, onde os 25 a 35% restantes é devido à presença de uma classe de lipídio de alto peso molecular (lipopolissacarídeos). (63,68) Os lipopolissacarídeos (LPS, do inglês "*Lipopolysaccharides*") são formados por um lipídio hidrofóbico e um polissacarídeo, os quais são unidos através de uma ligação covalente. Eles aumentam o caráter negativo da membrana bacteriana externa e ajudam a estabilizá-la como um todo. (65,66,69) Além disso, os LPS envolvem cerca de 75% da superfície bacteriana e funcionam como uma barreira de permeação eficiente à passagem de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos de alto peso molecular. (58,68,69,70) Alguns autores acreditam que esta barreira rica em LPS na superfície das bactérias gram-negativas é a razão principal pela menor susceptibilidade destes microrganismos à PDI, quando comparada às bactérias gram-positivas. (58,69,70) Devido ao caráter negativo do envelope das bactérias gram-negativas, os fotossensibilizadores aniônicos e neutros não se acumulam nestes organismos pela ausência de atração eletrostática. Além disso, estes fotossensibilizadores (neutros e aniônicos) não conseguem vencer a barreira de permeação e, desta forma, não são eficientes na inativação destas bactérias. (58,69,70) Por outro lado, os fotossensibilizadores catiônicos se ligam à superfície bacteriana carregada negativamente e deslocam os cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) que estão naturalmente presentes como contra-íons das moléculas de LPS. O deslocamento destes contra-íons enfraquece a estrutura da membrana bacteriana externa, criando "rachaduras" na barreira de permeação que possibilita a penetração destes fotossensibilizadores até a membrana mais interna do envelope celular (membrana plasmática), a qual é reconhecida ser a principal região dos danos causados pela PDI. (71) Em relação às bactérias Gram-

positivas, a camada de mureína é relativamente porosa e, como a membrana plasmática destes microrganismos é carregada negativamente, ela também é sensível aos fotossensibilizadores catiônicos, embora fotossensibilizadores aniônicos e neutros também têm sido utilizados para inativar bactérias Gram-positivas.(58,69,70)

Estudos sobre a interação de fotossensibilizadores com a membrana plasmática de bactérias podem contribuir para melhorar o entendimento sobre os danos provocados nesta região durante a PDI. No entanto, devido às dificuldades experimentais envolvidas tanto na manipulação de bactérias quanto no isolamento da membrana plasmática destes organismos, muitos estudos têm sido realizados com modelos estruturais de membrana (vesículas de fosfolipídio). Estes modelos são especialmente empregados nos estudos com bicamadas lipídicas onde, neste caso, são formados por uma mistura de fosfolipídios sintéticos que mimetizam aproximadamente a composição lipídica da membrana celular. Além disso, as vesículas podem ser utilizadas para avaliar o papel de cada fosfolipídio sobre as características físico-químicas da bicamada lipídica e, desta forma, avaliar como tais propriedades se refletem na associação de moléculas. Neste tipo de estudo, as vesículas apresentam uma constituição lipídica diferente da membrana plasmática (visto que a concentração de um ou mais fosfolipídio está sendo variada) e, portanto, elas não podem ser consideradas como modelos miméticos de membrana. Entretanto, como a unidade básica das membranas celulares (bicamada lipídica) é preservada, elas podem ainda ser consideradas como modelos estruturais de membrana. No presente estudo, os modelos estruturais de membrana plasmática bacteriana foram preparados pela mistura dos fosfolipídios derivados da fosfatidilcolina (PC, do inglês “Phosphatidylcholine”) e do fosfatidilglicerol (PG, do inglês “Phosphatidylglycerol”). Além de estar presentes em quantidades consideráveis nas bicamadas lipídicas de muitas membranas celulares, estes dois fosfolipídios também são encontrados nas membranas plasmáticas das bactérias. Além do PC e PG, a fosfatidiletanolamina (PE, do inglês “Phosphatidylethanolamine”) também está presente em grandes quantidades nesta membrana. (69,72,73) No caso das bactérias Gram-negativas *Echerichia coli* e *Salmonella typhimurium*, por exemplo, a quantidade aproximada de PE é de 76%, em relação à quantidade total de fosfolipídio. No caso do PG, esta quantidade é cerca de 20%. A bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* contem cerca de 46% de PE

e 35% de PG. (69,72) Apesar do PC não estar presente em grandes quantidades na membrana plasmática destes microrganismos, este fosfolípido desempenha um papel importante na estabilização das bicamadas lipídicas contendo PE, ao passo que o PG confere um caráter aniônico à membrana. (69,72)

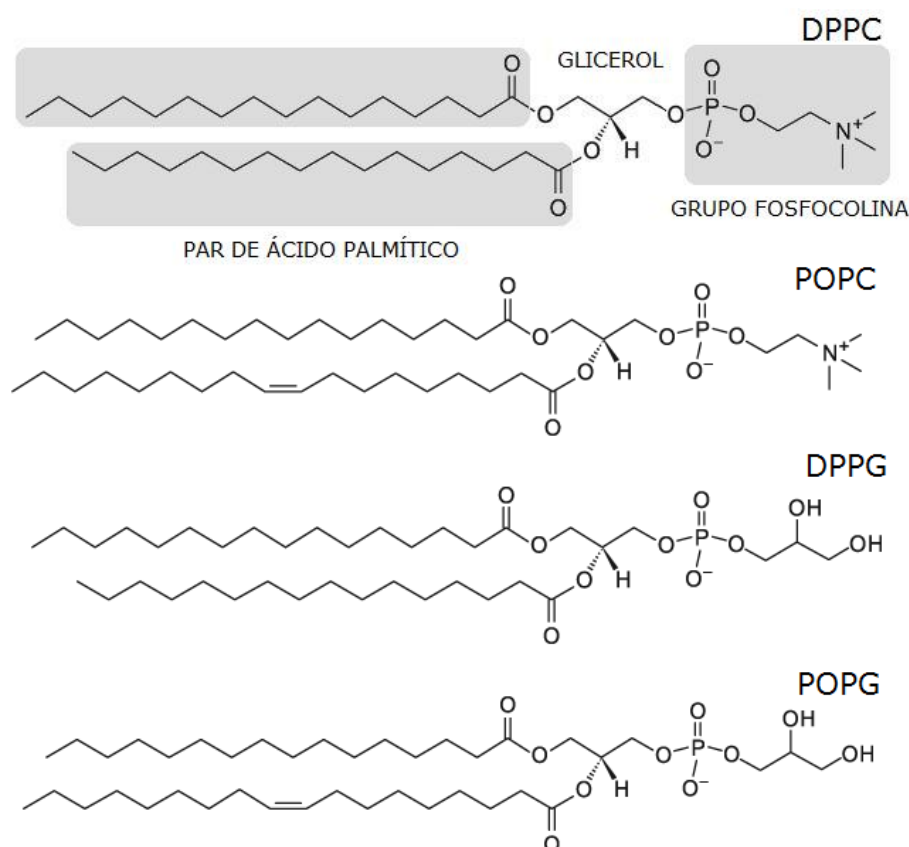
No presente estudo, as formas saturadas e insaturadas dos fosfolípidos PC e PG, ambos contendo 16 carbonos na cadeia hidrocarbônica, foram investigadas. Uma característica físico-química interessante das vesículas formadas por PC/PG na forma saturada é que a composição destes sistemas pode ser modificada ao passo que a temperatura de transição de fase do estado gel para o estado líquido cristalino permanece praticamente inalterada. (74) Assim, uma vez que o ordenamento conformacional das cadeias metilênicas dos fosfolípidos é similar a uma mesma temperatura, os valores da constante de associação K_b podem ser comparados entre estes sistemas. Como a temperatura de transição de fase das vesículas de PC/PG (forma saturada) é em torno de 41 °C, a interação das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP com estes sistemas fosfolipídicos foi estudada acima (50 °C) e abaixo (25 °C) desta temperatura. (74) Como nas vesículas de PC/PG na forma insaturada a transição de fase ocorre a temperaturas negativas, os estudos mencionados acima foram realizados a uma temperatura ambiente (25 °C). A seção a seguir apresenta a estrutura molecular destas moléculas e descreve mais detalhadamente as características estruturais das vesículas de fosfolípido, bem como os processos empregados na confecção destes sistemas.

1.5 Vesículas de Fosfolípido

Os fosfolípidos são moléculas anfífilas constituídas por duas cadeias hidrocarbônicas conectadas a um grupo químico hidrofílico (cabeça polar). Dentre os diferentes tipos de fosfolípidos, os fosfoglicerídeos (ou glicerofosfolípidos) se destacam por serem os componentes predominantes de muitas membranas celulares. (75,76) Diferentemente dos outros lipídios de membrana, tais como os esfingolipídios e esteróis, os fosfoglicerídeos possuem em sua estrutura química o grupo glicerol-3-fosfato. Assim, estas moléculas se diferenciam entre si quanto ao comprimento das cadeias hidrocarbônicas e grau de insaturação, bem como pela arquitetura dos grupos das cabeças polares. Os fosfoglicerídeos são frequentemente chamados de fosfolípidos, o qual não está correto uma vez que existem certos

fosfolipídios que não possuem moléculas de glicerol em sua estrutura química. No entanto, para padronizar a nomenclatura empregada no presente estudo, os fosfoglicerídeos serão chamados de fosfolipídios. No caso do fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), por exemplo, uma molécula de glicerol interliga o par de ácido palmítico (cadeia saturada com 16 átomos de carbono) ao grupo polar fosfocolina (ver figura 3). Este último grupo (fosfocolina) é formado pela ligação do grupo químico amina (NH_3) ao grupo fosfato. Em relação ao fosfolipídio aniônico 1,2-dipalmitoil-*sn*-3-glicero-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DPPG), apesar do comprimento das cadeias hidrocarbônicas ser o mesmo do fosfolipídio zwitteriônico 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), o grupo da cabeça polar é formado por um grupo fosfato ligado a uma segunda molécula de glicerol. Em solução aquosa, os fosfolipídios minimizam o contato das cadeias apolares com as moléculas de água através da formação de agregados. O processo de agregação depende tanto das características das espécies envolvidas quanto das condições do meio onde as mesmas estão dissolvidas. (76,77)

Figura 3 – Estrutura molecular dos fosfoglicerídeos DPPC, POPC, DPPG e POPG, os quais foram utilizados neste trabalho.



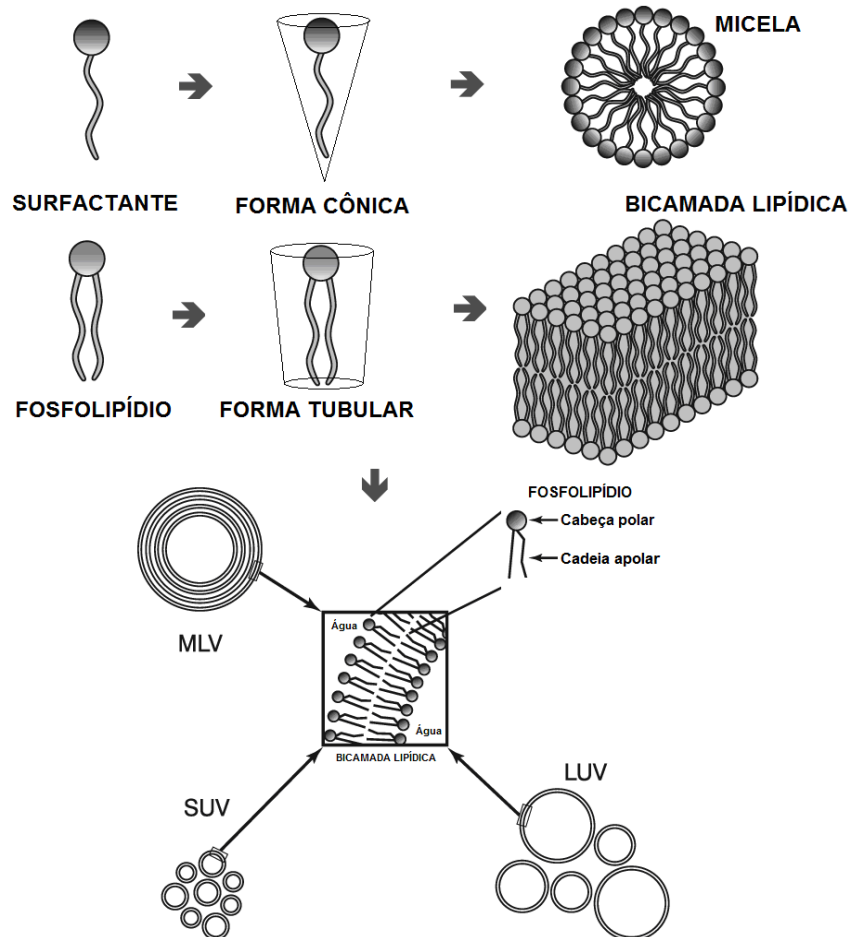
As forças repulsivas entre os grupos químicos que compõem a cabeça polar dos fosfolipídios, combinadas às forças atrativas entre as cadeias hidrocarbônicas (efeito hidrofóbico e forças de Van der Waals), representam alguns dos fatores que contribuem decisivamente no processo de agregação bem como no tamanho dos agregados. Além disso, outras interações intermoleculares envolvendo os grupos das cabeças polares com as moléculas de água (hidratação), bem como a formação de possíveis pontes de hidrogênio entre estes grupos, também influenciam o processo de agregação. (76,77)

As moléculas de fosfolipídios diferem drasticamente de outras moléculas anfifílicas, tais como surfactantes e isolectinas, no sentido que seus agregados são constituídos por bicamadas lipídicas ao invés de estruturas micelares. Esta propriedade está intimamente relacionada com o valor da área transversal ocupada tanto pelo grupo da cabeça polar dos fosfolipídios quanto pelas cadeias hidrocarbônicas. No caso do DPPC, por exemplo, a área transversal ocupada pelo grupo fosfocolina é cerca de 42 \AA^2 , sendo este valor muito próximo daquele ocupado pelas cadeias hidrocarbônicas ($\sim 39 \text{ \AA}^2$). (76) Esta característica confere aos fosfolipídios uma forma tubular, favorecendo a formação de bicamadas lipídicas concêntricas (vesículas). Por outro lado, no caso dos surfactantes, a área transversal dos grupos das cabeças polares é maior do que da cadeia hidrocarbônica (forma cônica), favorecendo a formação de estruturas micelares quase que perfeitamente esféricas. A representação esquemática de ambas as estruturas (micelas e vesículas) está apresentada na figura 4. Uma vez que a bicamada lipídica é a estrutura básica comum a todas as membranas celulares (ver seção 1.4), as vesículas de fosfolipídio têm sido muito utilizadas em muitos estudos biofísicos como modelos estruturais de membrana.

A figura 4 também mostra a classificação mais usual das vesículas de fosfolipídios com base nas suas características físicas (número de bicamadas lipídicas e tamanho). A obtenção dos diferentes tipos de vesículas apresentadas na figura 4 é, essencialmente, condicionada pelo seu método de preparação. A figura 5 mostra resumidamente os procedimentos de preparação dos tipos mais comuns de vesículas: multilamelares (MLVs, do inglês "*multilamellar vesicles*"), unilamelares grandes (LUVs, do inglês "*large unilamellar vesicles*") e unilamelares pequenas (SUVs, do inglês "*small unilamellar vesicles*"). O tamanho das MLVs varia entre 400

e 3500 nm, ao passo que nas LUVs e SUVs, a faixa de tamanho típico para cada um destes é 50-400 nm e 25-50 nm, respectivamente. (76)

Figura 4 – Representação esquemática dos agregados lipídicos formados por surfactantes (micelas) e por fosfolipídios (vesículas).

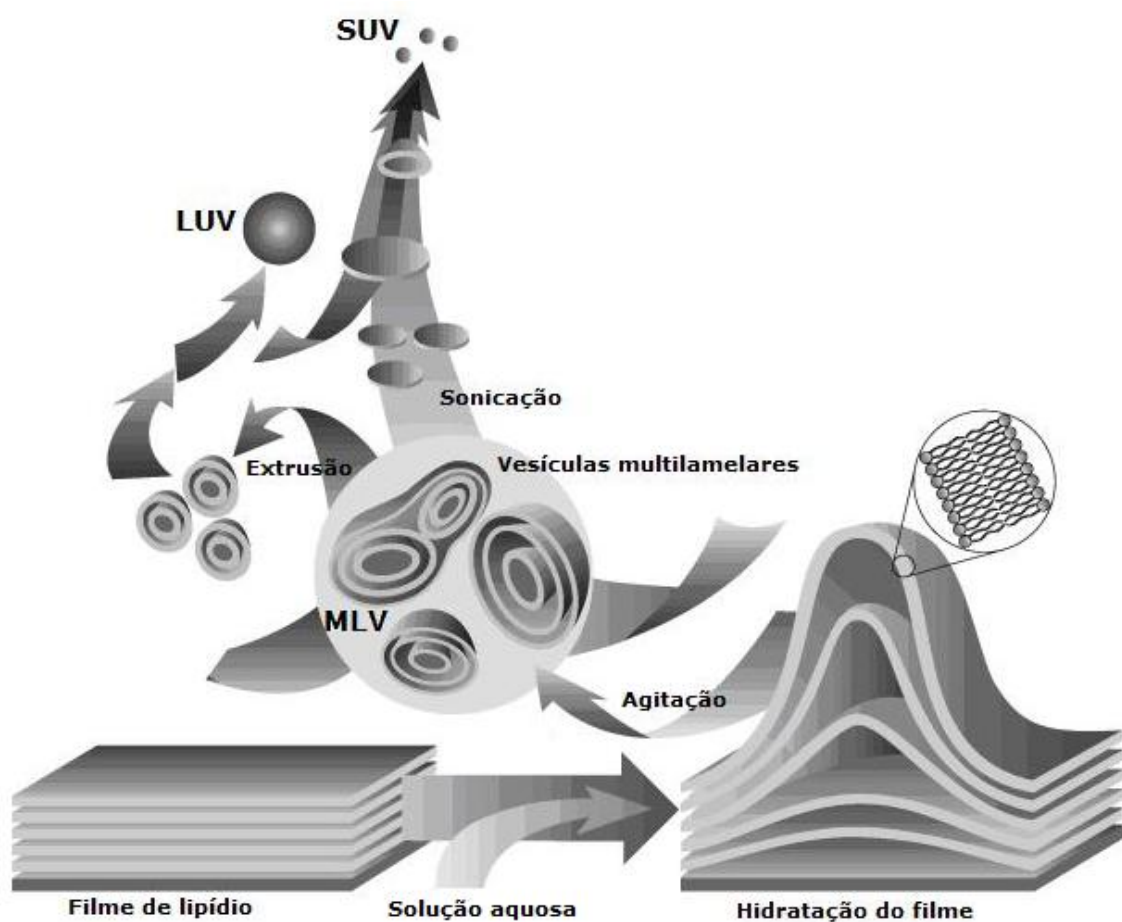


Fonte: <http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372> Acesso em: 27 nov 2013.

De um modo geral, a preparação destes sistemas pode ser dividida em três etapas consecutivas: preparação do filme de fosfolipídio, hidratação do filme com o meio aquoso desejado (usualmente uma solução tampão) e ainda, para a maioria dos sistemas, um procedimento adicional é necessário para a obtenção do produto final, o qual consiste no uso de ultrassom ou de filtração através de uma membrana de poro bem definido. As MLVs são obtidas logo após a hidratação do filme de fosfolipídio. De modo a alcançar o desprendimento total do fosfolipídio depositado

nas paredes do recipiente, a suspensão é primeiramente aquecida acima da temperatura de transição de fase do fosfolípido e, em seguida, agitada. No caso do DPPC, por exemplo, a transição de fase do estado gel (cadeias hidrocarbônicas na conformação *trans*) para o líquido cristalino (conformação *gauche*) ocorre em torno de 41 °C. (76)

Figura 5 – Representação esquemática dos processos comumente utilizados na preparação das MLVs, LUVs e SUVs.



Fonte: <http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372> Acesso em: 27 nov 2013.

Em relação aos fosfolípídios com cadeia hidrocarbônica insaturada, esta transição de fase ocorre geralmente num valor muito baixo de temperatura e, portanto, este procedimento é realizado à temperatura ambiente (vesículas no estado líquido

cristalino). Após a solubilização do filme de fosfolípido, as MLVs podem ainda ser submetidas a ciclos de congelamento e aquecimento. Este procedimento aumenta a proporção de vesículas unilamelares quando as mesmas são submetidas a um processo de extrusão.

A obtenção das LUVs e SUVs tem como base a utilização da suspensão de MLVs, preparada como descrito acima. O método de preparação de SUVs é através da sonicação de baixa potência, enquanto que no caso das LUVs o procedimento de extrusão é empregado. Neste último caso, um acessório chamado extrusor é utilizado, o qual deve ser termostatizado (por circulação interna de água, por exemplo) acima da temperatura de transição de fase do fosfolípido. Após a injeção da suspensão no interior da câmara do acessório, o sistema é hermeticamente fechado e, sob a influência de uma pressão externa (criada por um fluxo de nitrogênio), as vesículas de fosfolípido são forçadas a atravessar uma membrana com um tamanho de poro bem definido. Nesta situação, as camadas concêntricas das MLVs se deformam ao passar através dos poros da membrana, ocorrendo assim a ruptura e resselagem das membranas. A repetição deste processo de extrusão dá origem a uma população de LUVs com um tamanho médio que reflete o diâmetro do poro da membrana. No presente trabalho, as vesículas de fosfolípido são do tipo LUVs, as quais foram preparadas pelo procedimento de extrusão com membranas de policarbonato de tamanho de poros de 100 nm. Os fosfolípidos utilizados neste estudo estão apresentados na figura 3. As vesículas foram formadas pela mistura dos fosfoglicerídeos DPPC/DPPG (fosfolípidos saturados) e POPC/POPG (fosfolípidos insaturados), a diferentes razões molares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi investigar a interação da porfirina catiônica meso-tetrakis (4-N-metilpiridil), na forma de base (TMPyP) e complexada com zinco (ZnTMPyP), com vesículas de fosfolípido. A constituição lipídica destas estruturas foi modificada a fim de avaliar as características físico-químicas mais relevantes nesta interação. Tais informações contribuiriam para melhorar o entendimento sobre o acúmulo destas porfirinas na membrana externa das bactérias Gram-negativas. Este estudo foi realizado através das técnicas de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo, absorção óptica, potencial zeta e espalhamento de luz dinâmica (DLS). Grande parte dos experimentos (com exceção daqueles envolvendo fluorescência resolvida no tempo) foram realizados no Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos-USP.

2.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar o papel das interações eletrostáticas entre os grupos substituintes da porfirinas TMPyP e ZnTMPyP e os grupos das cabeças polares dos fosfolípidios na associação destas moléculas nas vesículas. Este estudo foi realizado variando a razão molar dos fosfolípidios zwitteriônico e aniônico nas vesículas.

2) Investigar o papel do estado físico das vesículas (gel e líquido cristalino) na associação das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP. Para as vesículas formadas pela mistura dos fosfolípidios saturados DPPC (zwitteriônico) e DPPG (aniônico), os experimentos foram realizados a 25 °C (vesículas no estado gel) e a 50 °C (vesículas no estado líquido cristalino). O mesmo estudo também foi feito para as vesículas constituídas dos fosfolípidios insaturados POPC (zwitteriônico) e POPG (aniônico). Neste último caso, as vesículas já se encontram no estado líquido cristalino a 25 °C, temperatura das medidas.

3) Determinar a localização das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP nas vesículas constituídas por fosfolípidios saturados (DPPC e DPPG) e insaturados (POPC e POPG).

3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

3.1. Absorção óptica

A absorção de luz na região do ultravioleta e do visível é dependente da estrutura eletrônica da molécula, produzindo mudanças na energia eletrônica da mesma e resultando na transição de elétrons de valência da molécula do estado fundamental para os estados excitados. (78,79) Em uma transição eletrônica, uma molécula absorve um fóton e um elétron é excitado do orbital que ocupa no estado fundamental para o outro de maior energia. São os orbitais do estado fundamental e excitado que caracterizam o tipo de transição eletrônica observada. Esta transição acontece somente quando a condição abaixo é satisfeita: (78,79)

$$h\nu = E_f - E_i \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck, ν a frequência da radiação excitante, E_f e E_i corresponde às energias do estado final e inicial da molécula, respectivamente. O excesso de energia da molécula no estado excitado pode resultar na sua dissociação ou ionização, ou ainda na relaxação através da dissipação de energia na forma de calor ou pela emissão de luz. A perda de energia através da emissão de luz resulta na fluorescência ou fosforescência. Cada estado eletrônico é composto por um grande número de estados vibracionais que, por sua vez, são separados por estados rotacionais.

Um espectro de absorção óptica é caracterizado pela intensidade da luz absorvida definida como densidade óptica, ou absorvância, e pela posição da banda de absorção. A posição da banda de absorção corresponde ao respectivo valor do comprimento de onda, λ , da radiação cuja energia é igual àquela requerida para uma transição eletrônica. A intensidade de absorção depende de dois fatores: da probabilidade de interação da radiação eletromagnética com a molécula e da diferença de energia entre os estados fundamental e excitado. A probabilidade de transição ou momento dipolar de transição é proporcional à mudança na distribuição de carga eletrônica que ocorre durante a excitação. A maior intensidade de absorção ocorre quando a transição é acompanhada por uma grande mudança no momento de dipolo de transição. (78,79) A quantidade de luz absorvida A (também chamada

de absorvância) está relacionada com a intensidade da luz absorvida pela amostra I e com a intensidade da luz incidente I_0 através da equação: (78,79)

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (2)$$

Além disso, temos que a absorvância A está relacionada com as características da amostra através da lei de Lambert-Beer, a qual é expressa a partir da equação: (78,79)

$$A = \varepsilon(\lambda)lC \quad (3)$$

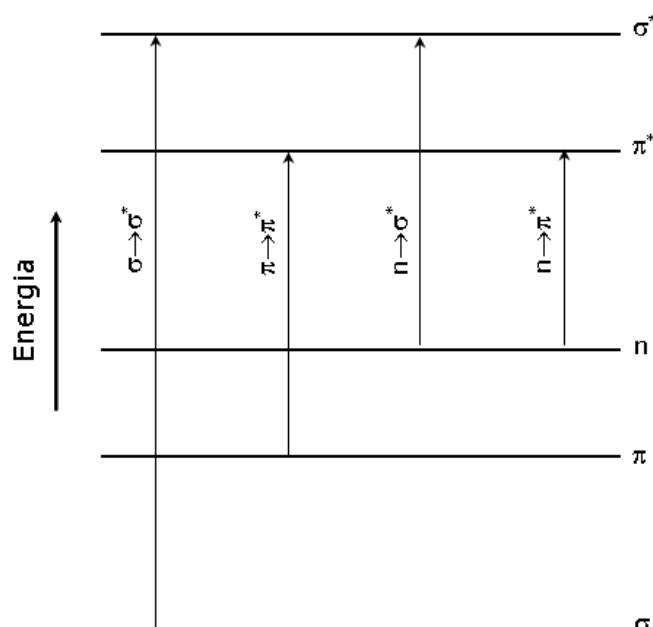
onde $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do composto, C a sua concentração e l o caminho óptico percorrido pela radiação dentro do objeto. A função $\varepsilon(\lambda)$ é característico de cada molécula em um dado solvente e, uma vez determinada, pode ser utilizada para calcular a concentração das soluções pelo método de absorção óptica, com base na lei de Beer-Lambert.

Como mencionado anteriormente, são os orbitais do estado fundamental e do estado excitado que caracterizam o tipo de transição eletrônica observada e, portanto, é relevante conhecer suas características. Por exemplo, os orbitais moleculares geralmente encontrados no estado fundamental de moléculas orgânicas são os seguintes: orbitais σ , π e n . (79) O primeiro corresponde às ligações simples, cuja densidade eletrônica assume simetria cilíndrica em torno da ligação química. Os orbitais π são encontrados nas ligações múltiplas. Neste caso, os elétrons estão delocalizados e interagem facilmente com os orbitais eletrônicos de outras moléculas vizinhas. Por fim, os orbitais n são aqueles ocupados pelos pares livres de heteroátomos, como oxigênio e nitrogênio. Eles não estão envolvidos nas ligações químicas e retêm as características do orbital atômico. Com relação ao estado excitado, dois tipos de orbitais são importantes: orbitais σ^* e π^* . Os orbitais do tipo σ^* , também conhecidos como sigma antiligante, embora possuam simetria cilíndrica, eles apresentam um plano nodal entre os átomos. No caso dos orbitais π^* , pi antiligante, como estão delocalizados no estado fundamental, eles possuem um plano nodal ao longo do eixo da ligação. O ordenamento mais comum dos orbitais em termos de energias relativas e das transições possíveis está apresentado na figura 6.

Efeitos do solvente podem alterar significativamente a ordem destes níveis de energia. As duas transições eletrônicas de energia mais baixa resultam da promoção

de um elétron do orbital n para o orbital π^* , chamada de transição $n \rightarrow \pi^*$. Da promoção de um elétron do orbital π para o orbital π^* tem-se a transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Este tipo de transição pode ser observada em todos os compostos insaturados, aparecendo na faixa do espectro que vai de 200 nm até o infravermelho próximo. (79) Além disso, em relação às porfirinas, estas transições são predominantes e estão associadas às transições dos elétrons do macrociclo. Se não forem proibidas por regras de seleção de spin ou simetria, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ tem coeficientes de absorção molar bem altos, da ordem de 10^4 - 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$. As transições $n \rightarrow \pi^*$ têm coeficientes de absorção molar menores, cerca de 10^2 $M^{-1}cm^{-1}$ e frequentemente aparecem como um “ombro” na faixa de comprimento de onda maiores dos espectros de absorção. (79) As energias requeridas para as transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ são muito altas. Essas transições aparecem na região do ultravioleta sendo observáveis somente sob vácuo.

Figura 6 – Níveis de energia eletrônico molecular. Figura modificada da referência (79).

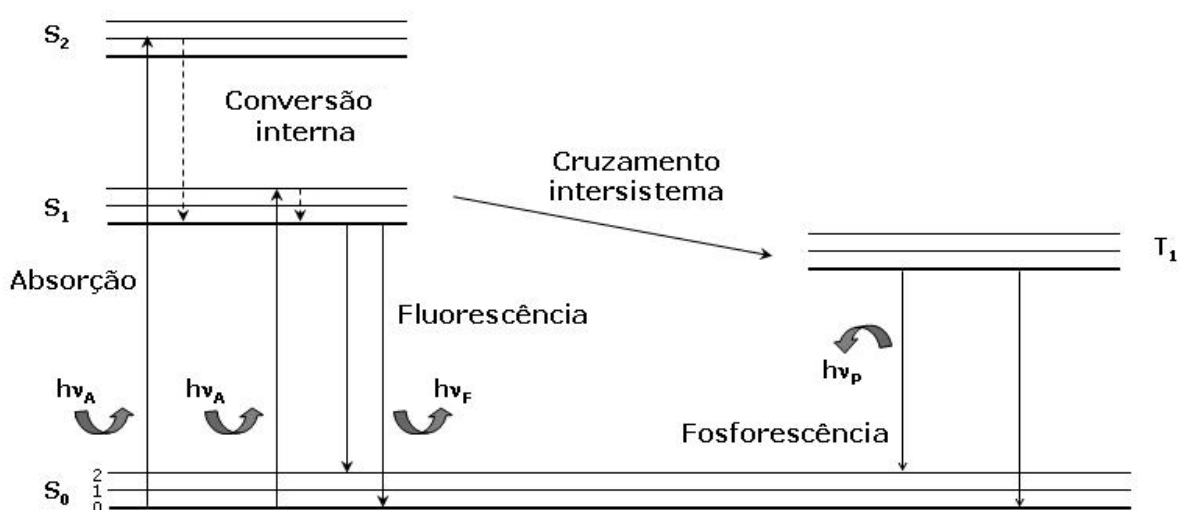


Fonte: SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental, Porto Alegre: Bookman, 2002, 838 p.

3.2 Fluorescência

A figura 7 mostra o diagrama dos níveis de energia de uma molécula orgânica, o qual é frequentemente utilizado como ponto de partida para a discussão da absorção e emissão de luz, bem como dos processos moleculares associados a ambos eventos. (51) Neste diagrama, também conhecido como diagrama de Jablonski, o estado fundamental singlete, o primeiro e o segundo estados excitados singlete estão representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Para cada um dos níveis de energia eletrônico mencionados acima, o fluoróforo pode ocupar um certo número de níveis de energia vibracionais, denotados por 0, 1, 2, etc. Na figura 7, somente os três primeiros níveis vibracionais estão apresentados. As transições entre os estados eletrônicos são representadas por linhas verticais para ilustrar a natureza instantânea da absorção de luz. Estas transições ocorrem em uma escala de tempo de 10^{-15} s, o qual corresponde a um tempo muito curto para deslocamentos significativos dos núcleos atômicos do fluoróforo (princípio de Franck-Condon).

Figura 7 – Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Também conhecido como diagrama de Jablonski, onde os estados singletos e tripleto estão representados por S e T, respectivamente.



Fonte: LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Maryland: Springer, 2006, 954 p.

A uma temperatura ambiente, o fluoróforo ocupa o nível vibracional de mais baixa energia de S_0 . Assim, ao absorver um fóton, o fluoróforo é excitado para um nível vibracional de mais alta energia do estado excitado singleto S_1 ou S_2 . Em solução, a relaxação térmica do fluoróforo excitado vibracionalmente ocorre rapidamente através da transferência do excesso de energia vibracional do fluoróforo para as moléculas do solvente. Este processo, geralmente referido de relaxação vibracional, é tão eficiente que todo o excesso de energia vibracional do estado singleto S_1 ou S_2 é perdido num intervalo de tempo entre 10^{-13} e 10^{-11} segundos. Isso significa que, antes que um fluoróforo excitado em solução possa emitir um fóton, ele sofrerá relaxação vibracional e, desta forma, um fóton de emissão sempre ocorrerá a partir do nível vibracional de menor energia (nível vibracional de ordem zero) de um estado excitado. Em geral, nos compostos aromáticos, a energia de separação dos estados singletos S_1 e S_2 é menor que a energia de separação entre o estado singleto S_1 e o estado fundamental S_0 . Isso significa que o estado vibracional de menor energia de S_2 se sobreporá aos níveis vibracionais de maior energia de S_1 , que não envolve diferenças muito grandes de configuração em relação ao estado vibracional de ordem zero do estado S_1 . Esta situação dá origem a um alto grau de acoplamento entre os níveis vibracionais dos estados de S_2 e S_1 , fornecendo um caminho extremamente eficiente para o cruzamento do estado S_2 para o estado S_1 . De fato, este processo é tão eficiente que o tempo requerido para a molécula sofrer conversão interna do estado S_2 para o nível vibracional de menor energia de S_1 é muito próximo daquele requerido para converter de um nível vibracional excitado do estado S_1 para o seu nível vibracional de ordem zero (ou seja, de 10^{-13} e 10^{-11} segundos). Assim, para o caso de compostos aromáticos em solução, é possível afirmar que o fluoróforo sofre conversão interna para o nível vibracional mais baixo do seu estado singleto excitado de menor energia num período de tempo que é muito curto, em relação à emissão de fótons, independentemente do estado singleto para o qual o fluoróforo foi inicialmente excitado. O fenômeno de fluorescência é caracterizado, portanto, pela transição $S_1 \rightarrow S_0$. (51)

É importante mencionar que a fluorescência dificilmente resulta da absorção de radiação ultravioleta de comprimentos de onda menores que 250 nm, uma vez que a energia dos fótons é suficientemente alta para causar desativação dos estados excitados por pré-dissociação ou dissociação. Por exemplo, a radiação de 200 nm

corresponde a aproximadamente 140 Kcal/mol; a maior parte das moléculas orgânicas tem pelo menos algumas ligações que podem ser rompidas por energias dessa magnitude. (79) Como consequência, a fluorescência devido à transição $\sigma^* \rightarrow \sigma$ dificilmente é observada; em vez disso, essa emissão fica restrita à transição menos energética $\pi^* \rightarrow \pi$. Neste caso, quando o fóton é absorvido pela molécula, o spin do elétron π promovido para o estado excitado singlete está emparelhado com o segundo elétron no estado fundamental singlete. Desta forma, o retorno ao estado fundamental singlete é bastante favorável (transição permitida por spin) e, desta forma, ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. É por esta razão que a taxa de emissão de fluorescência é tipicamente da ordem de 10^8 s^{-1} , onde o tempo médio que o fluoróforo permanece no estado excitado (chamado de tempo de vida de fluorescência) é bastante curto, da ordem de 10^{-7} - 10^{-9} s. (51,79)

Como a taxa de decaimento dos processos não-radioativos (conversão interna, por exemplo) é próxima da taxa de emissão de fluorescência, o tempo de vida do fluoróforo também é influenciado por estes processos. A velocidade com que a concentração dos estados excitados, dN/dt , de uma molécula diminui, depende de ambas as taxas mencionadas acima, ou seja,

$$\frac{dN}{dt} = -[\sum(\Gamma + k_{nr})]N \quad (4)$$

onde Γ e k_{nr} representam as taxas de emissão de fluorescência e dos processos não-radioativos, respectivamente, e N é a concentração de moléculas no estado excitado. (51) Resolvendo a equação diferencial acima, obtém-se:

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

onde o tempo de vida, τ , é dado por:

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

Outra característica importante dos processos de desativação dos estados excitados eletrônicos é o rendimento quântico de fluorescência Q , o qual representa a razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Desta forma, assim como τ , este parâmetro também está relacionado com as taxas de decaimento Γ e k_{nr} através da equação (ver referência 51):

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (7)$$

Com base na equação acima é possível observar que o valor de Q é próximo de um quando a taxa de decaimento não-radioativo é muito menor que a do decaimento radioativo, isto é, $k_{nr} \ll \Gamma$.

Vale a pena mencionar que, empiricamente, observa-se que a fluorescência é mais comumente encontrada em compostos nos quais as transições de menor energia são do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ que em compostos com transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$. Este efeito pode ser explicado com base na diferença dos valores de coeficiente de extinção molar (ou de absorção molar) ε associados a estes dois tipos de transição. (79) No caso de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, tem-se que o valor de ε é normalmente de 100 a 1000 vezes maior que em uma transição $n \rightarrow \pi^*$. Como o valor desta grandeza representa uma medida da probabilidade de transição entre estados eletrônicos durante a excitação ou desexcitação, o tempo de vida τ associado a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é menor (10^{-7} - 10^{-9} s em comparação com 10^{-5} - 10^{-7} s para uma transição $n \rightarrow \pi^*$) e, portanto, Γ na Eq. (7) é maior.

Como pode ser observado na figura 7, as moléculas no estado S_1 podem também sofrer uma conversão de spin para o primeiro estado triplete, T_1 . A emissão de fótons do estado T_1 é chamada de fosforescência, sendo geralmente deslocada para valores de comprimento de onda maiores (menor energia) em relação à fluorescência. (51) A conversão de S_1 para T_1 ocorre através de um processo chamado de cruzamento intersistema. A transição de T_1 para o estado fundamental singlete é proibida por spin e, como resultado, a taxa de decaimento de emissão de fosforescência é várias ordens de magnitude menor quando comparada à de fluorescência.

Uma consequência interessante da emissão para estados vibracionais de mais alta energia de S_0 é que o espectro de emissão é tipicamente uma imagem especular do espectro de absorção da transição $S_0 \rightarrow S_1$. (51) Esta similaridade ocorre porque a excitação eletrônica não altera significativamente a geometria nuclear. Assim, o espaçamento dos níveis de energia vibracionais dos estados excitados é similar àquele do estado fundamental. Como consequência, as estruturas vibracionais vistas na absorção e na emissão são similares. Uma outra propriedade geral da fluorescência é que o espectro de emissão de fluorescência é geralmente observado independentemente do comprimento de onda de excitação. (51) Após a excitação para altos níveis eletrônicos e vibracionais, o excesso de energia é

rapidamente dissipado, levando o fluoróforo para o menor nível vibracional de S_1 . Esta relaxação, como explicado anteriormente, ocorre em uma escala de tempo de 10^{-12} s e é presumivelmente um resultado da forte sobreposição de numerosos estados de energias muito próximas. Devido a esta rápida relaxação, o espectro de emissão é geralmente independente do comprimento de onda de excitação.

Em geral, as medidas de fluorescência podem ser classificadas como estática e resolvida no tempo. Medidas de fluorescência estática são aquelas realizadas com a observação sob iluminação constante. A amostra é iluminada continuamente por um feixe de luz e o espectro de excitação ou emissão é coletado. Uma vez que a escala de tempo de fluorescência é de nanosegundos, a maioria das medidas é no estado estacionário. Quando a amostra é exposta à luz, o estado estacionário é alcançado quase que imediatamente. Com relação à medida de fluorescência resolvida no tempo, ela é usada para medir, por exemplo, o decaimento de intensidade em função do tempo. Para estas medidas, a amostra é exposta à um pulso de luz, onde a largura do pulso é, em geral, menor que o tempo de decaimento da amostra. O decaimento de intensidade de emissão é detectado por um sistema de detecção de alta velocidade que permite a intensidade ser medida na escala de nanosegundos.

É importante entender que existe uma relação bem simples entre as medidas estacionária e resolvida no tempo. Uma observação estacionária é simplesmente uma média do fenômeno resolvido no tempo sobre o decaimento da intensidade da amostra. Por exemplo, considere um fluoróforo o qual apresenta um único tempo de decaimento τ . Como a intensidade de fluorescência, $I(t)$, é proporcional à concentração de moléculas no estado excitado, $N(t)$, a Eq (5) pode ser reescrita como:

$$I(t) = \alpha e^{-t/\tau} \quad (8)$$

onde α é o fator pré-exponencial que depende da intensidade de fluorescência num instante $t = t_0$, da concentração do fluoróforo e também dos parâmetros do instrumento. Esta equação pode ser usada para ilustrar como o tempo de decaimento determina o que pode ser observado utilizando fluorescência. A intensidade estática, I_E , é dada por:

$$I_E = \int_0^{\infty} \alpha e^{-t/\tau} dt = \alpha \tau \quad (9)$$

Assim, em termos moleculares, a intensidade estacionária é proporcional ao tempo de vida do fluoróforo. Isso parece fazer sentido considerando as Eqs (6) e (7). Combinando estas duas equações, tem-se que:

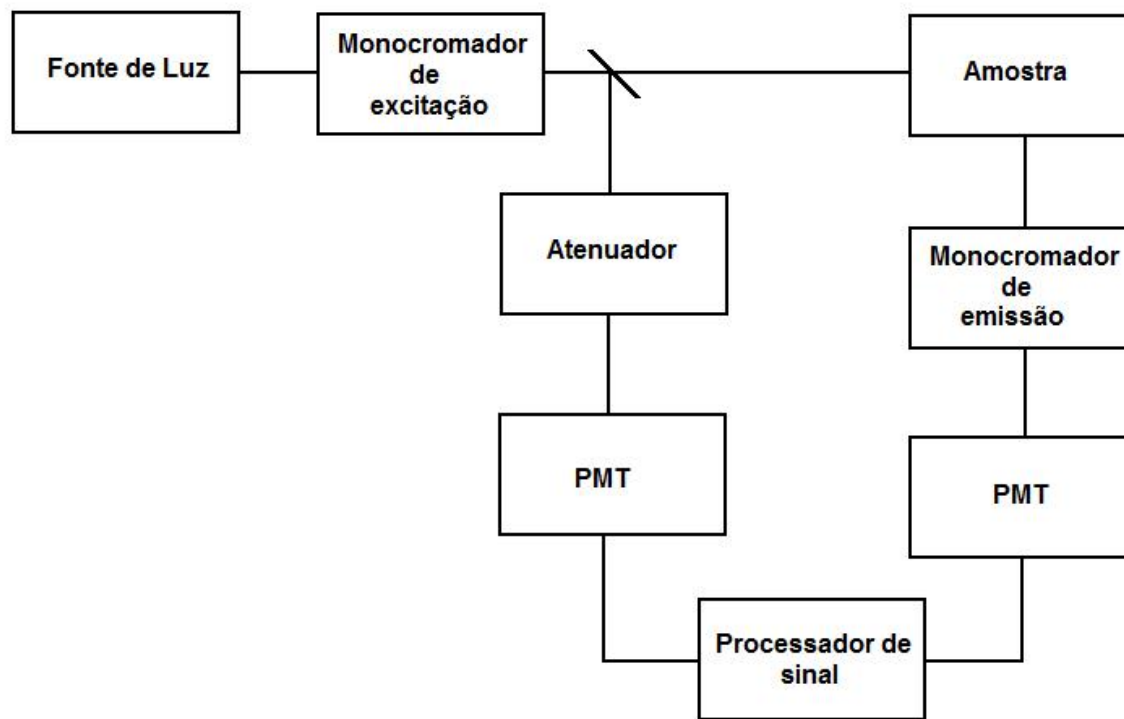
$$Q = \Gamma \tau \quad (10)$$

onde a relação acima mostra que o rendimento quântico é proporcional ao tempo de vida, do estado excitado.

3.2.1 Fluorescência estática

A figura 8 mostra um diagrama esquemático de um espectrofluorímetro de fluorescência estática. Em geral, instrumentos desta natureza utilizam uma lâmpada de xenônio como fonte de luz de excitação. Este tipo de lâmpada é bastante útil devido à sua alta intensidade em comprimentos de onda acima de 250 nm. Durante a medida, o feixe de luz é continuamente absorvido pelas moléculas da amostra e os fótons de fluorescência emitidos em todas as direções. Para diminuir os efeitos de espalhamento tanto da amostra quanto das paredes da cubeta, os fótons de fluorescência são coletados a um ângulo reto em relação ao feixe de luz incidente. Um espectrofluorímetro de fluorescência estática ideal é aquele cujo espectro de emissão representa a taxa de emissão de fótons, ou a potência de emissão, para cada valor de comprimento de onda, dentro de um intervalo de comprimento de onda determinado pela largura da fenda bem como pela dispersão da emissão no monocromador. Similarmente, o espectro de excitação representa a emissão relativa do fluoróforo para cada valor de comprimento de onda de excitação. Para a maioria dos fluoróforos, o rendimento quântico e o espectro de emissão são independentes do comprimento de onda de excitação. Assim, o espectro de excitação de um fluoróforo é geralmente idêntico ao seu espectro de absorção. Entretanto, isso é raramente observado porque a resposta do comprimento de onda de quase todos espectrofluorímetros é dependente do comprimento de onda. Mesmo sob circunstâncias ideais, esta correspondência requer a presença de um único tipo de fluoróforo e a ausência de outros fatores complicadores, como, por exemplo, uma resposta não linear resultante da alta densidade ótica da amostra ou a presença de outros cromóforos na amostra.

Figura 8 – Modelo esquemático de um espectrofluorímetro utilizado para medidas de fluorescência estática.



Fonte: LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Maryland: Springer, 2006, 954 p.

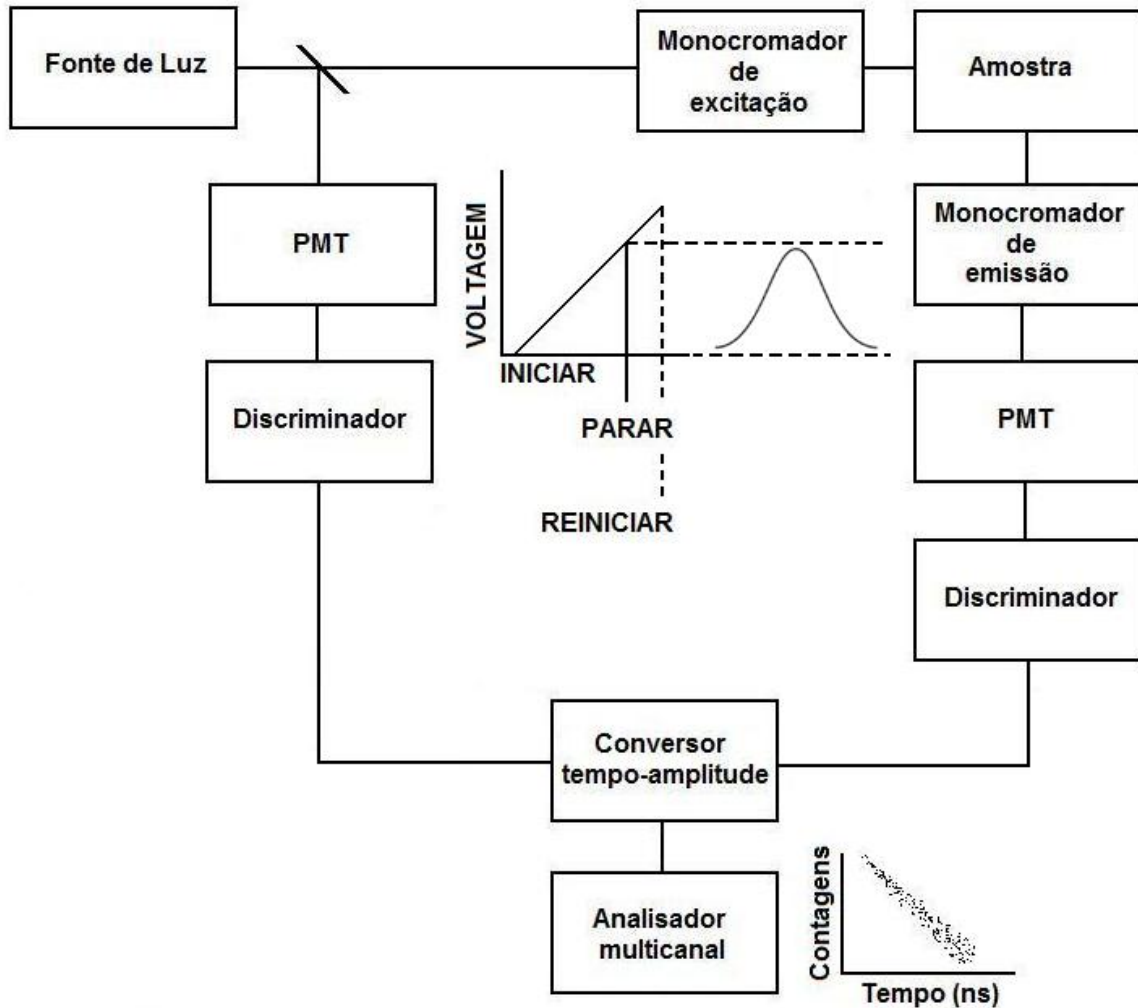
A seleção de ambos os comprimentos de onda de excitação e emissão é realizada através de monocromadores posicionados antes e depois da amostra. A maioria dos monocromadores utilizam uma rede de difração como elemento dispersante, a qual dispersa a luz incidente a um determinado ângulo. Assim, o comprimento de onda requerido, na fenda de saída do monocromador, é selecionado através da rotação do elemento dispersivo. (51) É através deste procedimento, por exemplo, que uma determinada faixa de comprimento de onda do espectro de emissão é alcançada. Após deixar o primeiro monocromador, o feixe de luz é dividido por um divisor de feixes entre o feixe de referência e de excitação. Ambos os feixes são detectados pelos seus respectivos tubos fotomultiplicadores (PMT, do inglês “*photomultiplier tubes*”) para o processamento do sinal ótico. Antes disso, o feixe de referência passa por um atenuador, que reduz a sua potência para aproximadamente aquela da radiação de fluorescência. Este processo é realizado

através da diminuição do número de fótons que chega à PMT. Por outro lado, o feixe de excitação é absorvido pelas moléculas da amostra e, após passar pelo monocromador de emissão, os fótons de fluorescência chegam na PMT. A PMT converte o sinal ótico em um sinal elétrico (pulso fotoelétrico ou corrente elétrica) e amplifica este sinal. Quando o fóton de fluorescência atinge o fotocátodo (superfície metálica) da PMT, a energia do fóton é suficiente para remover um elétron da camada de valência do átomo da superfície metálica (efeito fotoelétrico). A diferença de voltagem entre o fotocátodo e o ânodo é de 1000 a 2000 V, sendo o potencial no fotocátodo negativo. Essa diferença grande de voltagem é dividida em várias etapas entre os eletrodos, chamados de dínodos. O potencial do dínodo é mais positivo que o fotocátodo ou o dínodo anterior. O elétron ejetado do fotocátodo colide com o primeiro dínodo, provocando a emissão de vários elétrons adicionais; estes por sua vez, são acelerados em direção ao segundo dínodo produzindo mais elétrons. No instante que este processo tiver sido repetido nove vezes, cerca de 10^6 a 10^7 elétrons terão sido formados para cada fotoelétron correspondente produzido no fotocátodo. O valor médio da corrente fotoelétrica produzida pelos elétrons acima é utilizado como um sinal analógico pela maioria dos espectrofluorímetros de fluorescência estática. (51) Assim, o sinal de fluorescência é proporcional à intensidade da corrente fotoelétrica (em nanoampere), em relação à corrente gerada pelo feixe de referência.

3.2.2 Fluorescência resolvida no tempo

A figura 9 apresenta um modelo esquemático utilizado em grande parte dos equipamentos de fluorescência no domínio do tempo, que utilizam o método de contagem de foton único correlacionado no tempo (TCSPC, do inglês “*time correlated single photon counting*”). (51) Uma fonte de luz pulsada, geralmente uma lâmpada de flash ou um laser, gera pulsos de excitação multifótons que são absorvidos pelo conjunto de moléculas da amostra. Em geral, estes pulsos são gerados a uma frequência de aproximadamente 80 MHz, os quais apresentam uma largura de linha na meia altura em torno de dezenas de picosegundos. A baixos níveis de potência de excitação, ou seja, a um dado número reduzido de fótons, cada molécula da amostra absorve não mais que um fóton, numa escala de tempo que é praticamente instantânea.

Figura 9 – Modelo esquemático de um espectrofluorímetro utilizado para medidas de fluorescência resolvida no tempo.



Fonte: LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Maryland: Springer, 2006, 954 p.

Como o período associado à frequência de geração dos pulsos de excitação é da ordem de microsegundos, tem-se que a desexcitação destas moléculas, através da emissão de fótons de fluorescência, ocorre completamente no intervalo entre cada pulso. Este processo de desexcitação pode ser descrito como uma distribuição do tempo de atraso entre a absorção e a emissão de fótons, o qual é representado pela equação Eq. (8). Assim, o método TCSPC registra esta distribuição exponencial

medindo individualmente o tempo de atraso dos fótons de fluorescência em relação ao pulso de excitação. (51)

O coração do equipamento que utiliza este método é conhecido como conversor de tempo-amplitude (TAC, do inglês “*time-amplitude conversor*”), o qual pode ser considerado como um cronômetro de alta velocidade. (51) Quando o pulso de excitação dispara, um pulso de sincronização ou pulso de cronometragem INICIAR, através de uma ramificação do canal de excitação, aciona a voltagem do capacitor no sistema TAC. A voltagem no capacitor aumenta linearmente até uma faixa de tempo pré-selecionada ser alcançada ou, alternativamente, pela detecção do pulso de cronometragem PARAR, que vem do canal de emissão. Este último é iniciado pela detecção de um fóton de fluorescência, onde o intervalo de tempo INICIAR-PARAR gera uma voltagem proporcional através do capacitor. Este pulso de voltagem é armazenado de acordo com o valor da sua amplitude usando um conversor analógico-digital dentro de um analisador multicanal (MCA, do inglês “*multichannel analyzer*”) e então é alocado a um número de canal correspondente. (51) Repetindo o ciclo INICIAR-PARAR um grande número de vezes, um histograma representativo do decaimento de fluorescência é adquirido na memória do MCA, assim como está ilustrado na figura 9.

Uma vez que o pulso de excitação apresenta um certo valor de largura de linha na meia altura, tem-se que o tempo inicial do decaimento de fluorescência, t_0 , é diferente de zero. Como o fator pré-exponencial, α , também depende da intensidade de fluorescência em um instante $t = t_0$, este parâmetro é afetado pelo valor de t_0 . Assim, o decaimento medido experimentalmente é uma convolução da função de decaimento de fluorescência do fluoróforo com a função da resposta do instrumento (IRF, do inglês “*instrument response function*”). (51) A função IRF é assim chamada uma vez que representa a resposta do instrumento ao tempo de vida zero da amostra. Esta função corresponde à distribuição temporal $L(t)$ do pulso e é medida em uma experiência separada utilizando uma solução espalhadora de luz. Podemos considerar o pulso de excitação como um grande número de pulsos estreitos com intervalo entre eles a cada tempo t_k , com larguras iguais Δt , onde Δt é muito menor do que o tempo de decaimento observado. Cada pulso de excitação individual gera um outro pulso de emissão correspondente:

$$I_k(t) = L(t_k)I(t-t_k)\Delta t \quad (t > t_k) \quad (11)$$

onde o tempo $(t - t_k)$ serve para nos lembrar que o tempo de decaimento é relativo ao tempo de excitação, que é t_k . (51) Para $t < t_k$, subentende-se que não há pulso de emissão e, portanto, $I_k(t) = 0$. O decaimento medido experimentalmente, $F(t_k)$, é a soma dos pulsos de emissão criado por cada pulso de excitação individual até um tempo t_k , ou seja:

$$F(t_k) = \sum_{t'=0}^{t_k} L(t')I(t-t')\Delta t' \quad (12)$$

Para valores de $\Delta t'$ infinitesimais, a equação acima pode ser expressa como uma integral:

$$F(t) = \int_0^t L(t')I(t-t')dt' \quad (13)$$

Esta expressão diz que a intensidade do decaimento medido experimentalmente à um tempo t é dada pela soma das intensidades sobre todos os pulsos de excitação até um tempo t . É importante observar que as novas intensidades de decaimento são criadas na amostra sempre que as intensidades em $L(t_k)$ sejam diferentes de zero. Por conveniência, a variável muda da integração é alterada usando a relação $t' = t - \mu$, de modo que a integral de convolução é expressa como:

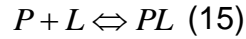
$$F(t) = \int_0^t L(t - \mu)I(\mu)d\mu \quad (14)$$

O trabalho agora é determinar $I(\mu)$ através da deconvolução de tal integral, onde são conhecidos $F(t)$ que representa o decaimento exponencial e $L(t - \mu)$ que é a função resposta do instrumento, IRF. O ajuste de $I(t)$ aos dados experimentais é feito através do método dos mínimos quadrados.

3.2.3 Estimativa da constante de associação

As técnicas de fluorescência e absorção óptica permitem avaliar a associação de um dado fluoróforo por sítios específicos de uma variedade de substratos tais como macromoléculas, membranas lipídicas e etc. Como as características espectroscópicas do fluoróforo são sensíveis às interações com as moléculas na sua circunvizinhança, a mudança entre dois meios distintos é geralmente acompanhada por alterações tanto nos espectros de absorção óptica quanto de fluorescência.

Particularizando esta situação para a interação da porfirina com as vesículas de fosfolipídio, estes dois meios (estados) seriam representados pela porfirina livre em meio aquoso e ligada à vesícula de fosfolipídio, através da relação de equilíbrio:



onde P representa a porfirina livre em tampão, L as vesículas de fosfolipídio livres em tampão e PL as porfirinas ligadas às vesículas. (80) Nesta situação de dois estados, a constante de associação, K_b , pode ser escrita como (ver referência 80):

$$K_b = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} \quad (16)$$

Assim, dentro das particularidades de cada técnica, a constante K_b é calculada a partir da equação acima.

3.2.3.1. Absorção óptica

Da relação de equilíbrio acima, temos que P e PL são as duas únicas espécies de porfirina que absorvem a luz. Como as moléculas do meio onde estas duas espécies estão dissolvidas devem interagir diferentemente com a porfirina, é razoável esperar valores distintos de coeficiente de absorção nestas duas configurações (livre em meio aquoso e ligada à vesícula de fosfolipídio). Considerando um caminho óptico de 1 cm, temos que a absorbância em um dado comprimento de onda é dada pela soma:

$$A = A_p + A_{PL} = \varepsilon_p [P] + \varepsilon_{PL} [PL] \quad (17)$$

onde ε_p e ε_{PL} são os coeficientes de absorção molar da espécie de porfirina livre em tampão e da espécie ligada às vesículas de fosfolipídio, respectivamente. (42) As concentrações de porfirina e vesícula livre em solução aquosa podem ser expressas como:

$$[P] = [P]_0 - [PL] \quad (18)$$

$$[L] = [L]_0 - [PL] \quad (19)$$

onde $[P]_0$ e $[L]_0$ são as concentrações totais de porfirina e vesícula, respectivamente. Assim, a Eq. (17) pode ser reescrita como sendo:

$$A = \varepsilon_p ([P]_0 - [PL]) + \varepsilon_{PL} [PL] = \varepsilon_p [P]_0 + (\varepsilon_{PL} - \varepsilon_p) [PL] = \varepsilon_p [P]_0 + \Delta\varepsilon [PL] \quad (20)$$

onde $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{PL} - \varepsilon_P$. Na ausência de vesículas de fosfolípido ($[L]_0 = 0$), temos que $[PL] = 0$. Logo, como $[P]_0 = [P]$, a absorvância inicial é definida como:

$$A_p^0 = \varepsilon_P [P]_0 \quad (21)$$

Logo, a variação de absorvância $\Delta A = A - A_p^0$ é dada por:

$$\Delta A = (\varepsilon_P [P]_0 + \Delta\varepsilon [PL]) - \varepsilon_P [P]_0 = \Delta\varepsilon [PL] \quad (22)$$

Substituindo as Eqs. (18) e (19) na Eq. (16), encontra-se que:

$$[PL] = K_b ([P]_0 [L]_0 - [P]_0 [PL] - [PL] [L]_0 + [PL]^2) \quad (23)$$

Como a concentração total de porfirina, $[P]_0$, em solução aquosa é da ordem de micromolar (10^{-6} M), tem-se que a concentração máxima de $[PL]$ em solução é da mesma ordem de grandeza. Uma vez que a concentração de fosfolípido em solução aquosa é da ordem de milimolar (10^{-3} M), fazendo-se uma análise da ordem de grandeza de cada um dos termos dentro do parênteses na Eq. (23), podemos desprezar os termos de segunda ordem $[P]_0 [PL]$ e $[PL]^2$, obtendo-se:

$$[PL] = K_b ([P]_0 [L]_0 - [PL] [L]_0) \quad (24)$$

Logo,

$$[PL] = \frac{K_b [P]_0 [L]_0}{1 + K_b [L]_0} \quad (25)$$

Substituindo este resultado na Eq. (22), tem-se que:

$$\Delta A = [P]_0 \Delta\varepsilon \frac{K_b [L]_0}{1 + K_b [L]_0} \quad (26)$$

No presente estudo, o ajuste do gráfico hiperbólico de ΔA em função da concentração total de lipídio, $[L]_0$, foi realizado através da equação acima para a obtenção da constante de associação K_b . Os valores de ΔA foram calculados nos comprimentos de onda de 436,5 nm e 453,5 nm, para as porfirinas TMPyP e ZnTMPyP, respectivamente.

3.2.3.1 Fluorescência estática

Como mencionado na seção anterior, P e PL são as duas únicas espécies de porfirina que absorvem a luz. Assim, a concentração total de porfirina em solução aquosa, $[P]_0$, pode ser calculada pela Eq. (18). Além disso, como o estudo de

associação pela técnica de fluorescência estática foi também realizado sob as mesmas condições experimentais (concentrações de fosfolípido e porfirina) que dos experimentos de absorção óptica, tem-se que a Eq. (24) é ainda satisfeita. Substituindo a Eq. (25) em (18), encontra-se que:

$$[P] = [P]_0 - \frac{K_b [P]_0 [L]_0}{1 + K_b [L]_0} \quad (27)$$

Isolando $[P]_0$ na equação acima, é possível mostrar que a concentração total de porfirina em solução é dada por:

$$[P]_0 = [P] + [P]K_b [L]_0 \quad (28)$$

Sendo $\alpha = [P]$ e $\beta = [P]K_b$, a Eq. (28) pode ser reescrita como (ver referência 42):

$$[P]_0 = \alpha + \beta [L]_0 \quad (29)$$

O espectro de emissão de fluorescência F da amostra será proporcional à concentração total de porfirina na solução, ou seja:

$$F = \gamma [P]_0 \quad (30)$$

onde γ é a constante de proporcionalidade. (42) Substituindo a Eq. (29) na Eq. (30), tem-se que:

$$F = \alpha' + \beta' [L]_0 \quad (31)$$

onde $\alpha' = \gamma [P]$ e $\beta' = \gamma [P]K_b$. Dividindo a Eq. (31) pela Eq. (29), encontra-se que:

$$F = \left(\frac{\alpha' + \beta' [L]_0}{\alpha + \beta [L]_0} \right) [P]_0 \quad (32)$$

Para concentrações de $[L]_0$ muito pequenas, tem-se que a emissão de fluorescência da porfirina é encontrada aplicando o limite na Eq. (32) para $[L]_0 \rightarrow 0$, ou seja,

$$\lim_{[L]_0 \rightarrow 0} F = \lim_{[L]_0 \rightarrow 0} \left[\left(\frac{\alpha' + \beta' [L]_0}{\alpha + \beta [L]_0} \right) [P]_0 \right] = \frac{\alpha'}{\alpha} [P]_0 = F_0 \quad (33)$$

Como a Eq. (32) pode ser re-escrita como:

$$F = \left[\frac{(\alpha' / [L]_0) + \beta'}{(\alpha / [L]_0) + \beta} \right] [P]_0 \quad (34)$$

tem-se que a fluorescência da porfirina será máxima à uma concentração saturante de fosfolípido, ou seja, quando $[L]_0 \rightarrow \infty$. Assim, tomando o limite da Eq. (34) nesta situação, encontra-se que:

$$\lim_{[L]_0 \rightarrow \infty} F = \lim_{[L]_0 \rightarrow \infty} \left\{ \left[\frac{(\alpha' / [L]_0) + \beta'}{(\alpha' / [L]_0) + \beta} \right] [P]_0 \right\} = \frac{\beta'}{\beta} [P]_0 = F_{\max} \quad (35)$$

Subtraíndo a Eq. (32) da Eq. (33), é possível mostrar que:

$$F - F_0 = \frac{(\alpha\beta' - \alpha'\beta)}{\alpha(\alpha + \beta[L]_0)} [L]_0 [P]_0 \quad (36)$$

Subtraíndo a Eq. (34) da Eq. (32), também é possível mostrar que:

$$F_{\max} - F = \frac{(\alpha\beta' - \alpha'\beta)}{\beta(\alpha + \beta[L]_0)} [P]_0 \quad (37)$$

Dividindo a Eq. (36) pela Eq. (37), acha-se que

$$\frac{F - F_0}{F_{\max} - F} = [L]_0 \frac{\beta}{\alpha} \quad (38)$$

Assim, substituindo α e β na equação acima, encontra-se que:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + (F_{\max} / F_0) K_b [L]_0}{(1 + K_b [L]_0)} \quad (39)$$

Assim, a partir do gráfico hiperbólico de F / F_0 em função da concentração de $[L]_0$, a constante K_b é obtida através de um ajuste não-linear com a Eq. (39).

3.2.3.2 Fluorescência resolvida no tempo

Num decaimento bi-exponencial, tem-se que a Eq. (8) (ver seção 3.2) é dada pela soma (ver referência 51):

$$I(t) = \sum_{i=1}^2 \alpha_i e^{-t/\tau_i} = \alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2} \quad (40)$$

onde no presente estudo, os tempos de vida τ_1 e τ_2 são atribuídos às moléculas de porfirina livre em meio aquoso e ligadas às vesículas de fosfolipídio, respectivamente. Na maioria das análises de decaimento, a intensidade total não é calculada e os fatores pré-exponenciais são normalizados à unidade ao final do ajuste. Como a contribuição de um dado tempo de vida na curva de decaimento é calculada pelo produto deste valor de tempo de vida pelo seu respectivo fator pré-exponencial, tem-se que esta quantidade também é normalizada ao final do ajuste. (51) É por esta razão (normalização) que esta quantidade é geralmente conhecida

como contribuição fracionária, a qual pode ser calculada, para cada um dos valores de τ_1 e τ_2 , através da equação abaixo:

$$f_1 = \frac{\alpha_1 \tau_1}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} \quad (41)$$

e

$$f_2 = \frac{\alpha_2 \tau_2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} \quad (42)$$

Os termos $\alpha_1 \tau_1$ e $\alpha_2 \tau_2$ são proporcionais a área sob a curva de decaimento associada ao tempo de vida τ_1 e τ_2 , respectivamente. (51) Por sua vez, estes termos são também proporcionais à concentração de porfirina livre em meio aquoso, $[P]$, e ligada às vesículas de fosfolipídio, $[PL]$, respectivamente. Assumindo que este fator de proporcionalidade é o mesmo em ambos os casos, ou seja,

$$\alpha_1 \tau_1 = \gamma[P] \text{ e } \alpha_2 \tau_2 = \gamma[PL] \quad (43)$$

é possível reescrever as Eqs. (41) e (42) como sendo:

$$f_1 = \frac{[P]}{[P]+[PL]} \Rightarrow [P] = f_1([P]+[PL]) \quad (44)$$

e

$$f_2 = \frac{[PL]}{[P]+[PL]} \Rightarrow [PL] = f_2([P]+[PL]) \quad (45)$$

Substituindo a Eq. (18) em (45), obtém-se que:

$$[PL] = f_2[P]_0 \quad (46)$$

Substituindo a Eq. (25) na equação acima, encontra-se que:

$$f_2 = \frac{K_b[L]_0}{1 + K_b[L]_0} \quad (47)$$

No presente estudo, a constante K_b foi calculada através do ajuste do gráfico hiperbólico de f_2 em função da concentração total de fosfolipídio, $[L]_0$, usando a equação acima.

3.2.4 Estimativa da constante de supressão

A supressão de fluorescência pode ser definida como qualquer processo onde uma diminuição da intensidade de emissão do fluoróforo é observada. Uma

variedade de interações moleculares podem resultar na supressão, dentre as quais destacam-se: reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão colisional. (51) A supressão colisional, também conhecida como supressão dinâmica, é caracterizada pela colisão entre o fluoróforo, no estado singleto excitado, e o supressor. Neste caso, o supressor precisa colidir com o fluoróforo durante o seu tempo de permanência no estado excitado. Após a colisão, o fluoróforo retorna ao estado fundamental singleto, sem a emissão de um fóton. Este fenômeno é acompanhado pela diminuição da emissão de fluorescência. Esta modalidade de supressão vem sendo bastante utilizada para avaliar a acessibilidade do fluoróforo pelo supressor, o qual tem permitido inferir sobre a sua possível localização no sistema em estudo (proteína, membrana, etc.).

3.2.4.1 Fluorescência estática

A equação que descreve o processo de supressão pode ser derivada com base na intensidade de fluorescência observada na ausência e na presença do supressor. A intensidade de fluorescência de um dado fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado, $[F^*]$. Além disso, uma população constante de fluoróforo no estado excitado é alcançada sob contínua iluminação e, portanto, temos que $d[F^*]/dt = 0$. Na ausência do supressor, a equação diferencial que descreve a variação temporal de $[F^*]$, na condição acima, é dada por (ver referência 51):

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \gamma[F^*]_0 = 0 \quad (48)$$

onde $f(t)$ é a função constante de excitação, $\gamma = (\Gamma + k_{nr})$ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor e $[F^*]_0$ é a concentração de fluoróforo no estado excitado na ausência de supressor. Como explicado na seção anterior, Γ é a taxa de decaimento radioativo e k_{nr} a taxa de decaimento não-radioativo. Na presença de supressor, temos que

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_q[Q])[F^*] = 0 \quad (49)$$

onde k_q é a constante bimolecular de supressão e $[Q]$ a concentração de supressor. Na ausência de supressão, a população de fluoróforo no estado excitado decai com a taxa γ . Na presença do supressor, existe uma taxa adicional de decaimento, dada por $k_q[Q]$. Sob contínua excitação, a população do estado excitado é constante, de modo que a razão $d[F^*]/dt$ é nula. Assim, dividindo as expressões resultantes para $f(t)$ das Eq. (49) e (48), obtém-se que:

$$\frac{(\gamma + k_q[Q])[F^*]}{\gamma[F^*]_0} = 1 \Rightarrow \frac{[F^*]_0}{[F^*]} = 1 + \frac{k_q}{\gamma}[Q] \quad (50)$$

Como a intensidade de fluorescência F é proporcional à $[F^*]$, da mesma forma que F_0 é proporcional à $[F^*]_0$, a Eq. (50) é geralmente representada como:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (51)$$

onde $K_{sv} = k_q\tau_0$. A equação acima é conhecida como equação de Stern-Volmer, onde $\tau_0 = \gamma^{-1}$ é o tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer. (51) Esta constante é obtida diretamente do gráfico dado pela razão F_0/F em função de $[Q]$. (51) Em geral este gráfico é linear, indicando uma única população de fluoróforo igualmente acessível ao supressor. O coeficiente angular da reta é atribuído ao valor da constante K_{sv} . Se duas populações de fluoróforo estão presentes e uma delas não é acessível ao supressor, o gráfico de Stern-Volmer desvia da sua linearidade na direção do eixo das abcissas. Este comportamento é geralmente observado a altas concentrações de supressor.

É importante mencionar que a linearidade do gráfico de Stern-Volmer não prova que o processo de supressão é essencialmente colisional. Este mesmo comportamento é observado, por exemplo, através da formação de complexos não fluorescentes entre supressor e o fluoróforo, durante o seu tempo de vida no estado excitado. Este processo, também conhecido como supressão estática, pode ser distinguido do processo dinâmico devido às suas diferentes dependências com a e viscosidade, ou preferencialmente pelas medidas de tempo de vida. O aumento da temperatura é acompanhado por uma maior difusão das moléculas e, conseqüentemente, por um maior número de colisões entre o fluoróforo e supressor, o que leva ao aumento da supressão colisional. Além disso, como o aumento da

temperatura geralmente desfavorece as interações fracas do complexo fluoróforo-supressor, uma diminuição da supressão estática é geralmente observada. Vale ainda a pena mencionar que a coexistência destes dois processos também induz comportamentos não lineares na curva de Stern-Volmer. Neste caso, dependendo da natureza da supressão estática, outros modelos de ajuste são necessários através de modificações da equação acima. (51)

3.2.4.2 Fluorescência resolvida no tempo

Quanto as medidas de tempo de vida de fluorescência, este é o método mais eficiente para distinguir os dois processos de supressão (estática e dinâmica). Uma vez que a supressão de fluorescência colisional é a taxa do processo de despopulação do estado excitado, os tempos de vida na ausência, τ_0 , e na presença, τ , do supressor são dados por (ver referência 51):

$$\tau_0 = \gamma^{-1} \quad (52)$$

e

$$\tau = (\gamma + k_q[Q])^{-1} \quad (53)$$

Assim:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (54)$$

Na supressão estática pela formação de complexo, o tempo de vida do fluoróforo não diminui porque somente as moléculas fluorescentes são observadas e os fluoróforos que não estão complexados apresentam seu tempo de vida conservado em função da concentração do supressor. Desta forma, temos que $\tau = \tau_0$. Em outras palavras:

$$\tau_0 / \tau = 1, \text{ supressão estática} \quad (55)$$

Uma vez que o processo de supressão colisional envolve a taxa de despopulação dos fluoróforos do estado excitado, temos que a diminuição do tempo de vida e da intensidade de fluorescência dos fluoróforos são equivalentes, ou seja, $\tau_0 / \tau = F_0 / F$. Assim, nos experimentos de supressão de fluorescência resolvida no tempo, temos que a constante k_q é obtida através da Eq. (54).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Produtos químicos

Os fosfolipídios 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-3-glicero-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DPPG), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo(1-*rac*-glicerol) (POPG) foram adquiridos da Northern Lipids Inc. (Vancouver, BC, Canadá). Os sais fosfato de sódio anidro (Na₂HPO₄), cloreto de potássio (KCl) e iodeto de potássio (KI) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) também foram adquiridos da mesma empresa. A porfirina meso-tetrakis (4-*N*-metilpiridil) (TMPyP) foi obtida da Midcentury (Posen, IL, EUA). Clorofórmio e metanol foram adquiridos da Mallinckrodt (St. Louis, Mo, EUA). Todos os produtos químicos acima foram utilizados sem purificação prévia.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das vesículas de fosfolipídio

As vesículas de fosfolipídio foram preparadas em três etapas seguindo um procedimento experimental semelhante àquele descrito na referência (76):

1ª ETAPA – Formação do filme de fosfolipídio: Uma certa massa de fosfolipídio (~ 8 mg) foi dissolvida em uma solução orgânica (0,5 ml) contendo clorofórmio:metanol na proporção 2:1 (v/v). O tubo com a solução de fosfolipídio foi conectado à um roto-vaporizador da Büchi laboratory equipments (Essen, Alemanha), equipado com um sistema de gás de nitrogênio e um banho termostático. O filme de fosfolipídio foi formado após a evaporação do solvente sob um fluxo contínuo de nitrogênio (50 psi) e com a temperatura do banho ajustada para 25 °C. Afim de evitar a presença de eventuais traços de clorofórmio/metanol, o tubo contendo o filme de fosfoglicerídeo foi colocado em um dessecador e submetido a vácuo por um período de aproximadamente 12 h. Este procedimento foi comum a ambos os tipos de sistemas

fosfolipídicos (saturados e insaturados) investigados no presente estudo (ver Tabela 1).

Tabela 1 – Sistemas fosfolipídicos (saturados e insaturados) investigados no presente estudo. Todas as vesículas de fosfolipídios foram do tipo LUVs, as quais foram preparadas através do método de extrusão utilizando uma membrana de policarbonato de 100 nm de diâmetro de poro.

Sistemas Fosfolipídicos	Razões Molares
<i>Fosfolipídios saturados</i>	
DPPC puro	-
DPPC:DPPG	7:3
DPPC:DPPG	5:5
DPPG puro	-
<i>Fosfolipídios insaturados</i>	
POPC puro	-
POPC:POPG	7:3
POPC:POPG	5:5
POPG puro	-

2ª ETAPA - Obtenção das MLVs: 2 ml de tampão fosfato 20 mM, ajustado para pH 7,0, foi adicionado ao filme de fosfolipídio. O tampão foi previamente filtrado em um conjunto de filtração de líquidos da Wheaton (Millville, NJ, EUA). Este procedimento foi realizado através de membranas de nitrato de celulose, Sartorius Stedim Biotech GmbH (Goettingen, Alemanha), com um tamanho de poro igual a 450 nm. A suspensão de vesículas multilamelares (solução turva), formada pelos fosfolipídios saturados DPPC e DPPG, foi obtida através de sucessivas agitações a uma temperatura de 50 °C (acima da temperatura de transição de fase do fosfolipídio, (~ 41-42 °C) até a obtenção de uma solução homogênea. No caso dos fosfolipídios insaturados, este procedimento foi realizado a 25 °C.

3ª ETAPA - Obtenção das LUVs: A preparação das LUVs foi realizada através do procedimento de extrusão, onde dois tipos de extrusores foram utilizados na preparação dos sistemas fosfolipídicos apresentados na Tabela 1. O primeiro, Lipex Biomembranes Inc. (Vancouver, BC, Canadá), permite a extrusão de vesículas de

fosfolipídios com a temperatura controlada através de um banho térmico externo. Este acessório também é adequado na preparação de amostras com volumes de até 10 ml. Este extrusor foi utilizado na preparação das vesículas formadas pelos fosfolipídios saturados. As membranas de policarbonato com tamanho de poro de 100 nm, utilizadas neste acessório, foram adquiridas da AMD Manufacturing Inc. (Mississauga, ON, Canadá). O segundo extrusor foi adquirido da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, EUA). Este extrusor permite a preparação de amostras com um volume máximo de 1 ml a uma temperatura ambiente. As membranas de policarbonato com tamanho de poro de 100 nm, adequadas para este acessório, foram adquiridas da mesma empresa que do extrusor. Este extrusor foi utilizado na preparação das vesículas formadas pelos fosfolipídios insaturados. Em ambos extrusores, uma dada suspensão de MLVs foi extrusada por pelo menos 8 (oito) vezes. A concentração final de fosfolipídio foi de 5 mM (~ 4 mg/ml).

4.2.2 Preparação das amostras para os estudos de supressão de fluorescência (estática e resolvida no tempo)

Este estudo foi realizado para as porfirinas TMPyP e ZnTMPyP em tampão puro e na presença dos sistemas fosfolipídicos apresentados na Tabela 1. A concentração final de porfirina em todas as amostras foi de 10 μ M, a qual foi obtida a partir da diluição de uma alíquota da solução estoque mais concentrada (~ 0,40 mM) em um volume de 1 ml. Esta concentração foi determinada através dos coeficientes de absorção da TMPyP em 422 nm ($\epsilon = 2,26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e da ZnTMPyP em 436 nm ($\epsilon = 1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). (81) Uma razão molar final de porfirina:fosfolipídio igual à 1:100 foi utilizada. O estudo de supressão foi realizado com o supressor KI (aniônico). Neste caso, uma concentração final de 0,1 mM de tiosulfato de sódio foi adicionada à solução estoque para evitar a formação de I_3^- . A partir de uma solução estoque concentrada (~ 0,5 M), pequenas alíquotas do supressor foram introduzidas diretamente dentro da cubeta contendo a solução de porfirina. Os experimentos de supressão foram realizados sem e com controle da força iônica. Neste último caso, a concentração salina foi mantida a 40 mM em todas as amostras, utilizando diferentes quantidades dos sais KCl (não-supressor) e KI (supressor). Cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, Hellma (Müllheim, Alemanha), foram utilizadas

neste estudo.

4.2.3 Preparação das amostras para os estudos de associação (fluorescência e absorção óptica)

No estudo de associação da porfirina catiônica pelos sistemas fosfolipídicos indicados na Tabela 1, a titulação de pequenas alíquotas de fosfolipídio, a partir de uma solução estoque mais concentrada (5 mM), foi realizada diretamente dentro da cubeta de quartzo (caminho óptico de 1 cm) contendo 10 μM da porfirina em um volume de 1 ml. A faixa de concentração de fosfolipídio foi de 0 - 1,5 mM.

4.2.4. Preparação das amostras para os estudos de DLS e potencial zeta

Uma outra maneira de evidenciar a associação/localização das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP às vesículas de fosfolipídio é através de medidas de potencial zeta e DLS. As amostras foram preparadas em um tubo de polipropileno a uma concentração final de 2 mM de fosfolipídio, a qual foi obtida a partir da diluição de um pequeno volume de uma solução estoque mais concentrada de fosfolipídio (5 mM) em 1 ml de solução. Com a ajuda de uma seringa, específica para a aplicação de insulina, as amostras eram transferidas para dentro de células capilares, próprios para medidas de potencial zeta, Malvern Instruments Ltd (Londres, Inglaterra). Para a adição de concentrações crescentes de porfirina, as amostras eram extraídas para o ependorfe e, a partir de uma concentração estoque mais concentrada ($\sim 0,4$ mM), uma quantidade apropriada de porfirina era adicionada às amostras. Em seguida, as amostras eram agitadas e colocadas novamente dentro das células capilares. A faixa de concentração de porfirina utilizada nestes experimentos foi de 0 - 60 μM .

4.2.5 Condições das medidas de absorção óptica

Um espectrofotômetro da Shimadzu UV-1601PC (Kyoto, Japão), localizado no Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, foi utilizado nos estudos de associação das porfirinas TMPyP com os fosfolipídios insaturados (ver Tabela 1). No caso dos fosfolipídios saturados, o forte espalhamento de luz pelas vesículas não permitiu a realização

deste estudo. Os espectros de absorção óptica foram obtidos dentro de uma faixa de comprimento de onda de 300 - 750 nm. A linha de base dos espectros foi corrigida com o espectro de absorção do tampão.

4.2.6 Condições das medidas de fluorescência estática

Os espectros de emissão das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP foram adquiridos em um fluorímetro Hitachi F-4500 (Tokyo, Japão), localizado no Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm. Este instrumento foi equipado com um banho térmico externo, onde a temperatura das amostras foi aferida por um termômetro, FLUKE (Everett, WA, EUA), com precisão de 0,2 °C. Um termopar, feito de um material inoxidável e inerte, foi contruído sob encomenda pela Instrucamp instrumentos de medição Ltda (Campinas, SP, Brasil). Para uma concentração de porfirina igual a 10 μ M, os comprimentos de onda de excitação foram 519 nm e 564 nm para a TMPyP e ZnTMPyP, respectivamente. A fim de manter uma dependência linear da intensidade de fluorescência em função da concentração da porfirina, todas as amostras exibiram uma densidade óptica menor que 0.1 no valor de comprimento de onda utilizado na excitação. Os espectros de fluorescência da TMPyP foram obtidos com os seguintes parâmetros instrumentais: largura da fenda de excitação, 5 nm; largura da fenda de emissão, 10 nm; ganho da fotomultiplicadora, 900 V; faixa de comprimento de onda de 580 - 750 nm. No caso da porfirina ZnTMPyP, a largura da fenda de emissão foi de 5 nm. Devido ao espalhamento de luz das vesículas, filtros ópticos apropriados foram posicionados na emissão.

4.2.7 Condições das medidas de fluorescência resolvida no tempo

Medidas do decaimento de intensidade de fluorescência foram feitas em um fluorímetro resolvido no tempo, localizado no Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O equipamento utiliza o método de correlação temporal de fótons únicos, o qual correlaciona temporalmente os fótons emitidos pela amostra com os fótons da excitação. O sistema utiliza um conjunto de lasers como fonte de pulsos de luz.

Inicialmente, um laser de diodo com dois feixes emitindo em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de Nd:YVO₄, Spectra Physics (Santa Clara, CA, EUA), que emite em 1064 nm. O feixe atravessa um cristal dobrador de frequências e o feixe final, com potência podendo chegar à 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira, Spectra Physics (Santa Clara, CA, EUA). Neste caso, o cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída. A radiação passa por um sistema selecionador de frequências, onde as ondas eletromagnéticas estacionárias em um cristal atuam como uma rede de difração. Esses pulsos de laser podem ter uma frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequência de 0,01 à 8 MHz, que são as mais adequadas ao método de contagem de fótons únicos. Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundo e terceiro harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para a excitação das amostras (em torno de 460 nm). O sinal detectado como pulso de excitação, chamado de IRF, tem uma largura a meia altura de 120 ps. Este sistema também é equipado com um banho térmico externo. A temperatura da amostra também foi aferida com o termômetro FLUKE (Everett, WA, EUA).

4.2.8 Condições das medidas de DLS e potencial zeta

As medidas de potencial zeta e DLS foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd (Londres, Inglaterra), localizado no Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. Este modelo calcula o tamanho das partículas a partir da radiação espalhada a um ângulo de 173 ° usando a tecnologia NIBS (“*non-invasive back-scattering*”). Neste modelo, um laser de He-Ne, com comprimento de onda de 633 nm, é utilizado como fonte de luz. A grande vantagem da tecnologia NIBS é que ela permite medir amostras concentradas bem como diminui o efeito de outras partículas indesejáveis (“*dusts*”) no cálculo do tamanho das partículas em estudo. Como o valor da absorvância da porfirina no comprimento de onda de excitação do laser é próximo de zero, nenhuma correção foi necessária. As medidas

de DLS foram realizadas através do modelo de análise “*general purpose*”, o qual é adequado para medir partículas com tamanhos desconhecidos. O tamanho das partículas foi calculado com uma média dentre outras 6 (seis) medidas, onde o número de corridas para cada uma delas foi otimizado automaticamente pelo instrumento.

Quanto às medidas de potencial zeta, este parâmetro é calculado através da mobilidade eletroforética das partículas em solução. A mobilidade eletroforética é obtida através da realização de um experimento de eletroforese, medindo a velocidade da partícula sob efeito de um campo elétrico externo. Um modelo monomodal foi utilizado para calcular o valor médio do potencial zeta. Cada valor de potencial zeta foi calculado como uma média de 12 (doze) medidas. Em ambos experimentos (DLS e potencial zeta), as amostras foram equilibradas por 5 minutos, a uma dada temperatura, antes de iniciar as medidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

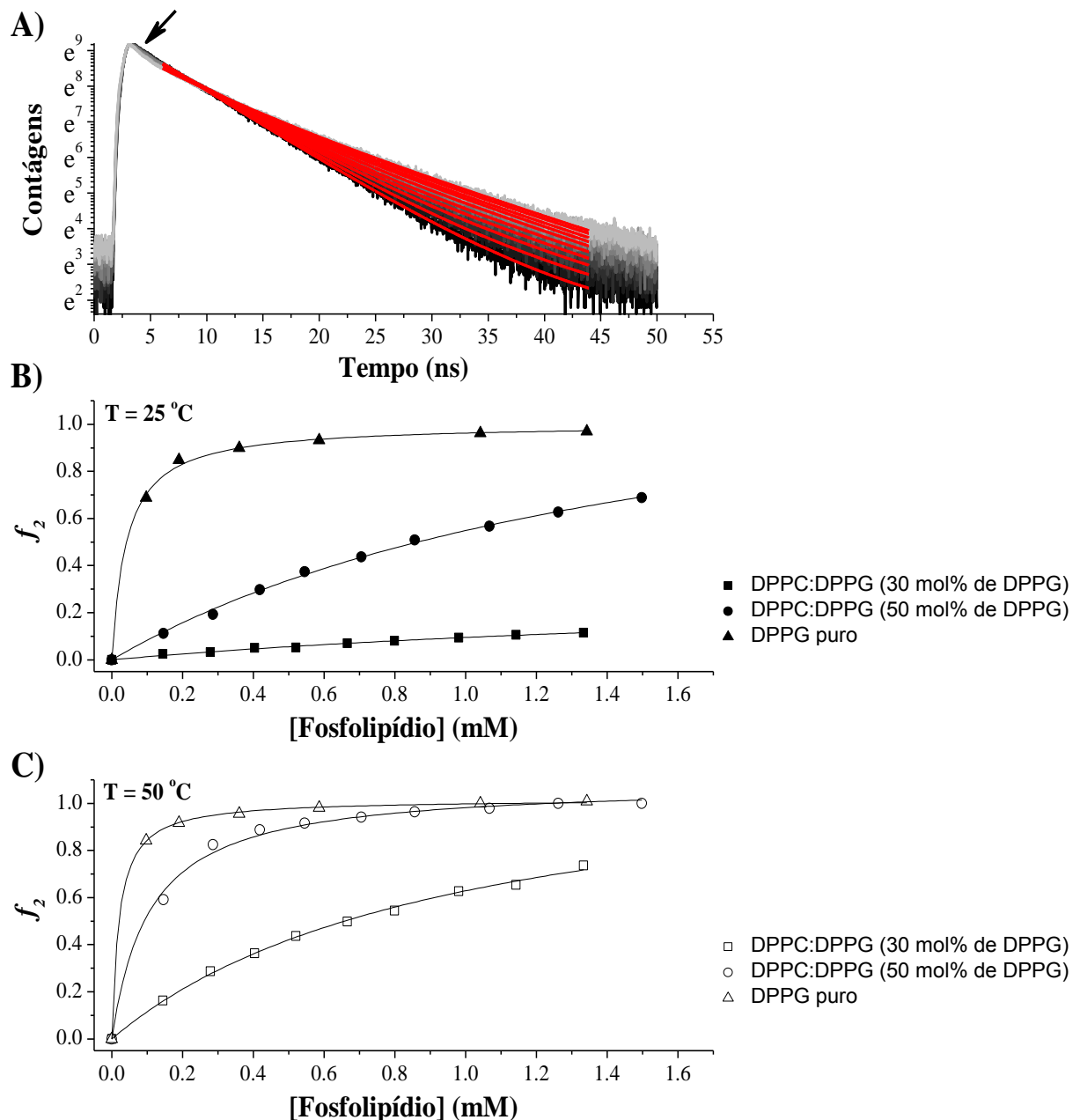
A fim de facilitar a compreensão dos resultados e discussão, o presente capítulo foi dividido em duas partes (Parte I e II). A primeira parte corresponde às investigações sobre a interação da porfirina catiônica, na forma de base livre, com vesículas formadas pela mistura dos fosfolipídios saturados DPPC e DPPG, a diferentes razões molares. Este estudo foi realizado a 25 °C (vesículas no estado gel) e 50 °C (vesículas no estado líquido cristalino). A segunda parte corresponde à interação da porfirina, tanto na forma de base livre quanto complexada com o Zn^{2+} , com vesículas formadas pelos fosfolipídios insaturados POPC e POPG, também a diferentes razões molares. Como a transição de fase do estado gel para o estado líquido cristalino dos fosfolipídios insaturados acima ocorre a um valor muito baixo de temperatura, este estudo foi realizado somente a 25 °C. Os estudos apresentados na Parte I e II já foram publicados e também estão descritos nas referências (82) e (83), respectivamente.

5.1. Afinidade da associação e localização da porfirina TMPyP em vesículas unilamelares de DPPC/DPPG no estado gel e líquido cristalino (Parte I)

5.1.1 Associação da porfirina TMPyP pelas vesículas de fosfolipídio

A figura 10A mostra o decaimento de fluorescência experimental da porfirina TMPyP (25 °C) em tampão puro (20 mM de fosfato, pH 7,0) e na presença de concentrações crescentes da mistura dos fosfolipídios DPPC:DPPG, formados com 50 mol% de DPPG. Na figura 10A também estão apresentados os ajustes teóricos dos decaimentos de fluorescência (linhas cor vermelha), os quais foram realizados através do programa de ajuste FAST (Edinburgh instruments Ltd). Os valores do parâmetro estatístico χ_R^2 bem como dos resíduos foram levados em consideração para avaliar a qualidade dos ajustes. Para a porfirina em tampão puro, o decaimento (linha cor preta) foi ajustado com um modelo mono-exponencial, resultando em um tempo de vida τ_1 igual à 5,0 ns. Este resultado está em concordância com um estudo prévio de fluorescência, onde um tempo de vida de 4,9 ns foi calculado dentro de uma faixa de pH de 2,0 a 9,0. (38)

Figura 10 – A) Decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP (25 °C) em tampão puro (linha cor preta) e na presença de concentrações crescentes (linhas cores mais claras) de LUVs, formadas pela mistura de DPPC:DPPG com 50 mol% de DPPG. Curvas de associação da TMPyP nos diferentes sistemas fosfolipídicos estudados a B) 25 °C e C) 50 °C. As linhas sólidas na cor vermelha referem-se aos ajustes. A concentração final de porfirina foi de 10 μ M e a concentração máxima de fosfolipídio utilizado neste estudo foi de 1,5 mM.



Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Uma vez que a porfirina TMPyP não forma agregado dentro desta faixa de pH, o valor de τ_1 calculado no presente estudo é atribuído às moléculas de porfirina na forma monomérica. (84). Como pode ser observado na figura 10A, os decaimentos de fluorescência sofrem mudanças significativas com a adição da mistura de DPPC:DPPG. Mesmo para uma concentração relativamente baixa de fosfolípido em solução, as análises indicaram um decaimento bi-exponencial, com a coexistência de um tempo mais curto ($\tau_1 = 5,0$ ns) e outro mais longo ($\tau_2 = 10,2$ ns). Curiosamente, a existência de um tempo de vida mais longo de 9-11 ns foi também evidenciada para a TMPyP em sistemas micelares, como nas micelas formadas pelo surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês “*sodium dodecyl sulfate*”), e também na presença de solventes mais hidrofóbicos. (81,85) Assim, com base em ambas evidências experimentais, o tempo de vida mais curto (valor de τ_1) é atribuído à porfirina livre em tampão, enquanto que o tempo de vida mais longo (valor de τ_2) é interpretado como sendo devido às moléculas de porfirina ligadas às LUVs. Este tempo de vida mais longo está possivelmente associado à localização da TMPyP nas vesículas, onde as interações deste fluoróforo com as moléculas do solvente seriam significativamente reduzidas. Este efeito contribuiria para uma diminuição dos processos de decaimento não-radioativo e, de acordo com a Eq. (6), isso resultaria num aumento do tempo de vida da porfirina. Ainda em relação ao comportamento dos decaimentos apresentados na figura 10A, vale a pena mencionar que a adição de fosfolípido é também acompanhada pelo surgimento de um decaimento mais rápido (indicado pela seta). Este decaimento expúrio está associado ao espalhamento dos fótons de excitação pelas LUVs. Assim, os ajustes foram realizados a partir de um tempo de decaimento onde a contribuição deste espalhamento é menos significativa (para maiores detalhes, ver apêndice A).

Além dos tempos de vida, os ajustes dos decaimentos também permitiram calcular as contribuições fracionárias para as moléculas de porfirina livre em tampão, f_1 , e ligadas às LUVs, f_2 , em relação ao decaimento total de fluorescência. Assim, as curvas de associação foram obtidas através do gráfico da contribuição fracionária f_2 em função da concentração total de fosfolípido em solução. A figura 10B mostra as curvas de associação para a TMPyP na presença das LUVs contendo misturas de DPPC:DPPG, com 30 e 50 mol% de DPPG, assim como daquelas formadas por DPPG puro, a 25 °C. É possível observar que a contribuição fracionária f_2 aumenta

com a adição da mistura de DPPC:DPPG, seguindo um comportamento hiperbólico típico das curvas de associação. É importante mencionar que os valores de τ_1 e τ_2 foram similares para todos os sistemas fosfolipídicos contendo DPPG e, além disso, eles permaneceram praticamente inalterados para toda a faixa de concentração de fosfolipídio. Assim, os valores de f_2 , obtidos para cada concentração de fosfolipídio (ver figura 10B), foram calculados através de um modelo de ajuste onde os tempos de vida foram mantidos fixados em $\tau_1 = 5,0$ ns e $\tau_2 = 10,2$ ns e suas respectivas contribuições fracionárias foram deixadas livres para variar. A figura 10B mostra mudanças significativas na forma hiperbólica das curvas de decaimento para as amostras investigadas. Por exemplo, somente pequenas mudanças nos valores de f_2 foram observados para as LUVs contendo DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG. No entanto, um aumento significativo de f_2 foi observado para aqueles sistemas com uma maior concentração de DPPG. Este resultado indica que a atração eletrostática entre os grupos substituintes catiônicos da TMPyP e os grupos aniônicos das cabeças polares dos fosfolipídios desempenha um papel importante para a associação da porfirina. De fato, os valores da constante de associação, K_b , apresentados na Tabela 2, mostram que a afinidade da porfirina é cerca de uma ordem de magnitude maior com o aumento da concentração molar de DPPG, a 25 °C. Vale a pena mencionar que os valores de K_b foram obtidos dos ajustes das curvas de associação utilizando a Eq. (47), descrita na seção 3.2.3.3.

Tabela 2 - Valores da constante de associação, K_b , estimados para a porfirina TMPyP na presença de diferentes vesículas de fosfolipídio. Estes valores foram obtidos para as vesículas no estado gel (25 °C) e líquido cristalino (50 °C).

Amostras	K_b (M^{-1})	
	25 °C	50 °C
DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG)	$(1,05 \pm 0,05) \times 10^2$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^3$
DPPC:DPPG (50 mol% de DPPG)	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^3$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^4$
DPPG puro	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^4$	$(6,9 \pm 0,2) \times 10^4$
DPPG puro + 50 mM KCl	$(7,1 \pm 0,3) \times 10^3$	$(8,1 \pm 0,8) \times 10^4$

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Para a TMPyP na presença das LUVs formadas por DPPC puro, somente o tempo de vida mais curto ($\tau_1 = 5,0$ ns), atribuído à porfirina livre em tampão, foi obtido dos ajustes, dentro de toda a faixa de concentração de fosfolípido. Este resultado indica que a TMPyP não apresenta afinidade de associação pelas LUVs com caráter zwitteriônico.

Outro resultado interessante está associado ao efeito da temperatura na afinidade da TMPyP pelas vesículas. A figura 10C mostra as curvas de associação desta porfirina na presença das LUVs contendo DPPG, a 50 °C. Para as vesículas constituídas pela mistura de DPPC:DPPG, com 30 e 50 mol% de DPPG, por exemplo, os valores de K_b foram mais que uma ordem de grandeza maiores a 50 °C, quando comparados aos seus respectivos valores a 25 °C (ver Tabela 2). Como a principal temperatura de transição de fase das LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG é em torno de 41 °C, as cadeias hidrocarbônicas estão na conformação *trans* (estado gel) e na conformação *gauche* (estado líquido cristalino) a 25 e 50 °C, respectivamente. (74) Assim, o resultado acima parece indicar que a estrutura complexa de anéis do macrociclo da porfirina é acomodada com maior facilidade nas LUVs quando as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolípidos estão num estado de maior fluidez. Como será demonstrado mais adiante pelos estudos de potencial zeta, esta maior afinidade pode ser também atribuída às mudanças na região dos grupos das cabeças polares dos fosfolípidos devido à transição de fase do estado gel para o estado líquido cristalino. Esta mudança é acompanhada por um aumento do potencial negativo na superfície da vesícula e da camada de hidratação, contribuindo assim para uma maior afinidade da TMPyP pelas LUVs no estado líquido cristalino. Uma vez que a afinidade desta porfirina já é consideravelmente grande pelas vesículas formadas por DPPG puro, a 25 °C, o aumento do valor de K_b devido à temperatura foi menos significativo para este sistema fosfolípido (ver Tabela 2). De fato, como pode ser observado pelos valores de f_2 nas figuras 10B e 10C, uma grande fração de porfirina ligada às LUVs é observada em ambas temperaturas, mesmo para uma concentração relativamente baixa de DPPG.

Os estudos de associação também foram realizados para as LUVs formadas por DPPG puro, na presença de 50 mM de KCl. Como pode ser observado na última linha da Tabela 2, a adição deste sal diminui a afinidade da porfirina, principalmente a 25 °C. Este resultado parece indicar que o KCl adicionado compete com a porfirina

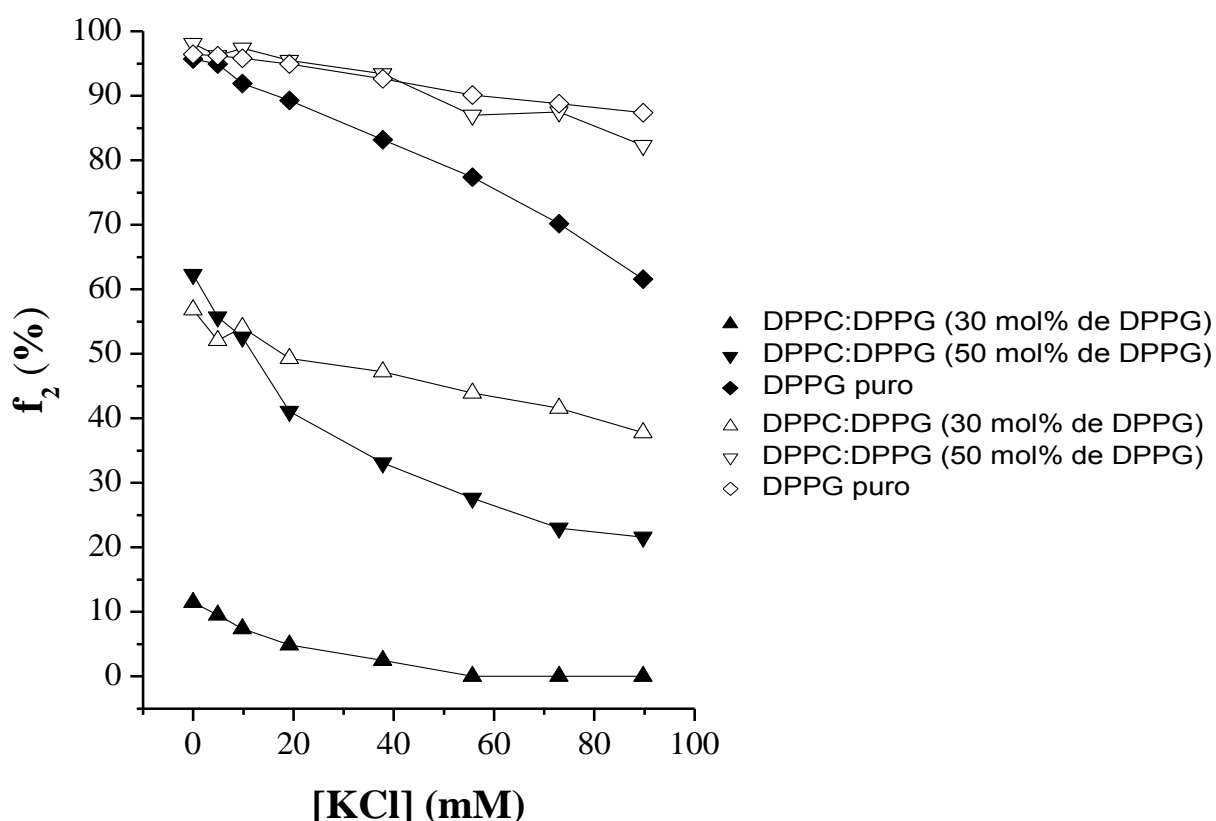
pela associação na superfície carregada da vesícula, provavelmente, devido a sua alta afinidade. (86) Por outro lado, os valores de K_b para este sistema fosfolipídico a 50 °C, na ausência e na presença do sal, são similares quando o erro experimental deste parâmetro é levado em consideração (ver Tabela 2).

5.1.2. Efeito do sal KCl sobre a fração de porfirina ligada nas vesículas de fosfolipídio

Estudos de fluorescência resolvida no tempo foram também realizados a fim de avaliar o efeito da concentração de sal na partição da porfirina TMPyP entre as fases aquosa (tampão) e orgânica (LUVs). Como foi demonstrado na seção anterior, o sal KCl diminui a associação da porfirina pelas vesículas de DPPG puro, especialmente quando a mesma se encontra no estado gel. Assim, tais investigações foram realizadas utilizando este mesmo sal. Como o raio iônico do íon cloreto (Cl^-) é muito menor que do íon iodeto (I^-), por exemplo, o processo de supressão dinâmica envolvendo a porfirina TMPyP e o íon Cl^- é praticamente inexistente. De fato, a curva de decaimento da porfirina TMPyP em tampão puro permaneceu praticamente inalterada mesmo a uma concentração de aproximadamente 90 mM de KCl (dado não apresentado). Assim, como ambos os tempos de vida ($\tau_1 = 5,0$ ns e $\tau_2 = 10,2$ ns) permaneceram inalterados na presença do sal KCl, estes valores foram mantidos fixos durante as análises de fluorescência. De modo similar ao procedimento de ajuste empregado no estudo de associação, as contribuições fracionárias associadas às porfirinas em tampão, f_1 , e ligadas às vesículas de fosfolipídio, f_2 , foram deixadas livres para variar durante os ajustes das curvas de decaimento. A figura 11 mostra a variação de f_2 em função da concentração de sal para a TMPyP na presença das LUVs estudadas neste trabalho. Como pode ser observado, a titulação com KCl resultou em uma diminuição dos valores de f_2 para os três sistemas fosfolipídicos, em ambos valores de temperatura. Este fenômeno está possivelmente associado à neutralização parcial da carga superficial das vesículas em função do aumento da concentração de sal. A neutralização da carga superficial das LUVs devido ao aumento da força iônica do meio foi demonstrada previamente por estudos de potencial zeta para diferentes sistemas fosfolipídicos. (86,87) Desta forma, um efeito similar também

pode ocorrer nas LUVs investigadas, devido ao aumento da concentração de KCl. Assim, a afinidade de associação da porfirina deve diminuir com o aumento da concentração de sal. Isso é consistente com os dados de associação, visto que a afinidade da TMPyP pelas LUVs formadas por DPPG puro foi menor na presença de 50 mM de KCl (ver Tabela 2). O deslocamento das moléculas de porfirina ligadas às LUVs para a fase aquosa, em decorrência da adição de KCl, sugere que a TMPyP está localizada na camada de Stern das vesículas.

Figura 11 – Fração de moléculas de porfirina ligada às LUVs, f_2 , em função da concentração de KCl, obtida dos dados de emissão de fluorescência resolvida no tempo, à 25 °C (símbolos sólidos) e 50 °C (símbolos vazios). As concentrações finais de porfirina e fosfolipídio foram de 10 μ M e 1 mM, respectivamente. A faixa de concentração de KCl utilizada neste estudo foi de 0-95 mM.



Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Como apresentado na figura 11, o deslocamento da porfirina para a fase aquosa é consideravelmente reduzido a 50 °C (símbolos vazios) quando comparado ao efeito observado a 25 °C (símbolos sólidos). Para as LUVs formadas por DPPC:DPPG com 50 mol% de DPPG, por exemplo, cerca de 41% (f_2 muda de 62,3% para 21,4%, a 25 °C) da fração inicial de porfirina ligada foi deslocada para o meio aquoso quando 90 mM de KCl foi adicionado ao sistema. Este efeito é significativamente reduzido a 50 °C, quando a fração de porfirina em meio aquoso é reduzida para somente 16% (f_2 muda de 98,1% para 82,3%, a 50 °C). Este comportamento pode ser explicado devido a uma maior afinidade da associação da TMPyP pelas LUVs no estado líquido cristalino. Além disso, a magnitude do efeito do sal no deslocamento da porfirina é reduzida quando a superfície externa das LUVs exibe um caráter mais negativo. Ou seja, quando uma maior quantidade de fosfolipídio aniônico está presente nas LUVs. Novamente, este comportamento pode ser explicado em termos de uma maior afinidade da porfirina pelas LUVs que apresentam uma maior concentração molar de DPPG.

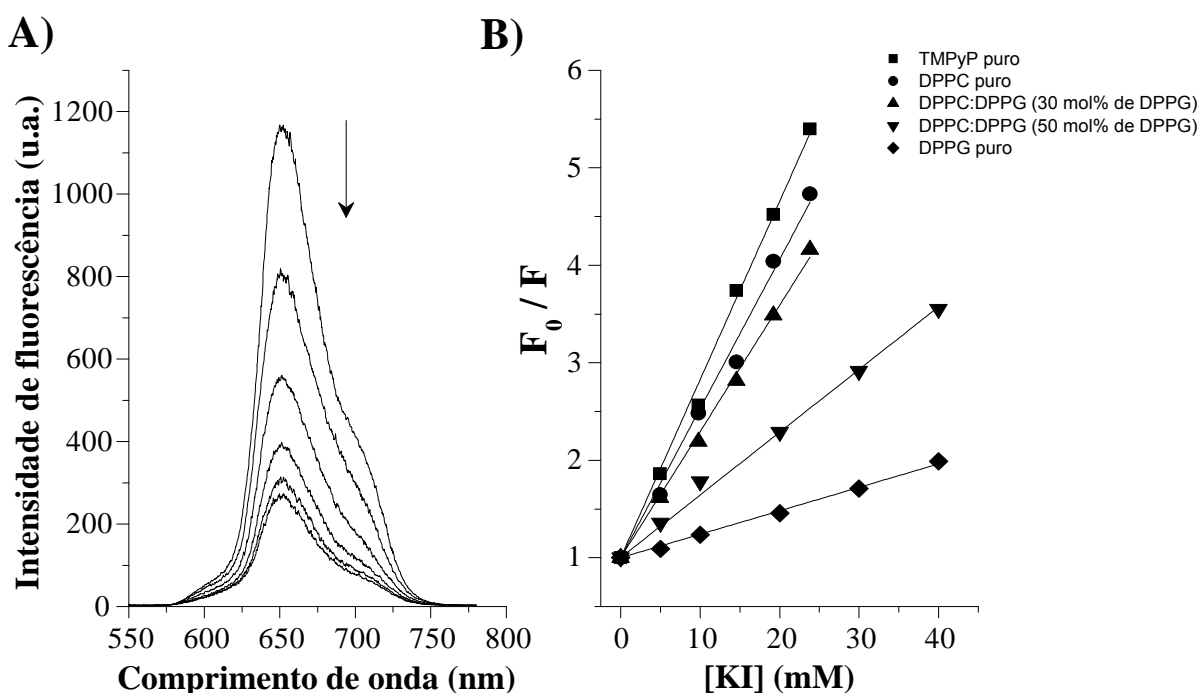
5.1.3 Supressão de fluorescência da TMPyP presente em diferentes sistemas fosfolipídicos

5.1.3.1 Resultados de fluorescência estática

Os experimentos de supressão foram realizados a fim de obter mais informações sobre a localização da porfirina nas LUVs. Uma vez que a concentração de sal altera a partição da porfirina entre o meio aquoso e as LUVs, estes experimentos foram conduzidos mantendo-se a força iônica do meio constante, utilizando o KCl como sal inerte em adição ao supressor KI. A figura 12A mostra os espectros de emissão de fluorescência (25 °C) para a TMPyP livre em tampão, em função da concentração do supressor KI. Como é geralmente observado em estudos de supressão, uma diminuição da intensidade do espectro de emissão ocorre para concentrações crescentes do supressor. É importante mencionar que o espectro de absorção da TMPyP, em especial na região do comprimento de onda utilizado na excitação ($\lambda = 519$ nm), permaneceu praticamente inalterado dentro da faixa de concentração de KI utilizada nos estudos de supressão (dados não apresentados). Assim, a diminuição da emissão da porfirina mostrada na figura 12A está associada

exclusivamente a um processo não-radioativo originado, provavelmente, pela colisão entre a porfirina e o íon iodeto (I^-). Os gráficos de Stern-Volmer, associados às mudanças espectrais mostradas na figura 12B, exibiram um comportamento linear para toda a faixa de concentração do supressor. Esta linearidade também foi observada para as outras amostras a 25 °C.

Figura 12 – A) Espectros de emissão de fluorescência (25 °C) para a TMPyP livre em tampão, em função da concentração do supressor KI. A seta indica a diminuição de intensidade de fluorescência com a adição de concentrações crescentes do supressor. Os dados de supressão foram obtidos numa condição de força iônica constante. (B) Gráfico de Stern-Volmer da TMPyP presente em diferentes meios à 25 °C. As concentrações finais de porfirina e fosfolípido foram de 10 μ M e 1 mM, respectivamente. A faixa de concentração de KI utilizada neste estudo foi de 0-40 mM. A seta indica o sentido da diminuição da emissão de fluorescência. Este experimento foi realizado numa condição de força iônica constante.



Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Para as LUVs formadas na presença de DPPG e numa condição onde a força iônica do meio não foi controlada, os gráficos de Stern-Volmer exibiram um comportamento

não linear (dados não apresentados), o qual está associado com o deslocamento da porfirina das LUVs em direção ao meio aquoso com a adição do sal (supressor).

Tabela 3 – Valores das constantes de Stern-Volmer, K_{SV} , e bimoleculares, k_q , obtidos dos estudos de supressão de fluorescência estática e resolvida no tempo para a porfirina TMPyP em tampão puro e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Estes experimentos foram realizados à 25 e 50 °C usando o iodeto de potássio (KI) como supressor.

Amostras	K_{SV} (M^{-1})		k_q ($M^{-1}s^{-1}$)*	
	25 °C	50 °C	25 °C	50 °C
Fluorescência estática				
Tampão puro	118 ± 6	198 ± 8	2,4 - 2,5 x 10 ¹⁰	3,8 - 4,1 x 10 ¹⁰
DPPC puro	110 ± 9	185 ± 7	2,0 - 2,4 x 10 ¹⁰	3,5 - 3,8 x 10 ¹⁰
DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG)	93 ± 7	45 ± 9	1,7 - 2,0 x 10 ¹⁰	0,7 - 1,1 x 10 ¹⁰
DPPC:DPPG (50 mol% de DPPG)	70 ± 5	26 ± 7	1,3 - 1,5 x 10 ¹⁰	3,8 - 6,6 x 10 ⁹
DPPG puro	14 ± 5	9 ± 6	1,8 - 3,8 x 10 ⁹	0,6 - 3,0 x 10 ⁹
Fluorescência resolvida no tempo				
Tampão puro	110 ± 9	166 ± 7	2,1 - 2,3 x 10 ¹⁰	3,3 - 3,4 x 10 ¹⁰
DPPC puro	122 ± 7	178 ± 10	2,3 - 2,6 x 10 ¹⁰	3,4 - 3,5 x 10 ¹⁰
DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG)	95 ± 10	160 ± 9	1,7 - 2,1 x 10 ¹⁰	3,0 - 3,4 x 10 ¹⁰

*Esta constante foi calculada usando a relação $k_q = K_{SV} / \tau_0$, onde o valor de τ_0 corresponde àquele encontrado para a porfirina em tampão puro ($\tau = 5.0$ ns).

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Os valores da constante de Stern-Volmer, K_{SV} , obtidos através de ajustes lineares utilizando a Eq. (51), discutida em mais detalhes na seção 3.2.4.1, estão incluídos na Tabela 3. Baseado nos valores de K_{SV} e no tempo de vida da porfirina na

ausência de supressor, τ_0 , é possível também calcular os valores da constante bimolecular, k_q , utilizando a relação $K_{SV} = k_q \tau_0$ (51) Como a constante k_q depende do coeficiente de difusão das espécies envolvidas no processo de supressão, esta constante é muito útil para avaliar a acessibilidade do supressor ao fluoróforo em estudo. Os valores de k_q também estão apresentados na Tabela 3. Como pode ser observado nesta tabela, os valores de k_q são muito próximos para a TMPyP em tampão puro e na presença das LUVs formadas por DPPC puro, em ambas as temperaturas (ver Tabela 3), sugerindo que a acessibilidade da porfirina pelo supressor é similar nestes dois sistemas. No entanto, para as vesículas formadas na presença de DPPG, uma significativa diminuição dos valores de k_q foi observada, principalmente para aqueles sistemas contendo uma maior concentração molar de DPPG e numa temperatura de 50 °C. Para as LUVs formadas de DPPG puro, o valor de k_q foi cerca de 8 vezes menor quando comparado à TMPyP em tampão puro, a 25 °C. Este fator aumenta para 22 vezes quando a temperatura de ambos sistemas é elevada para 50 °C (ver Tabela 3). Assim, os dados de supressão de fluorescência no estado estacionário sugerem que a supressão é significativamente reduzida acima da temperatura de transição de fase dos fosfolipídios.

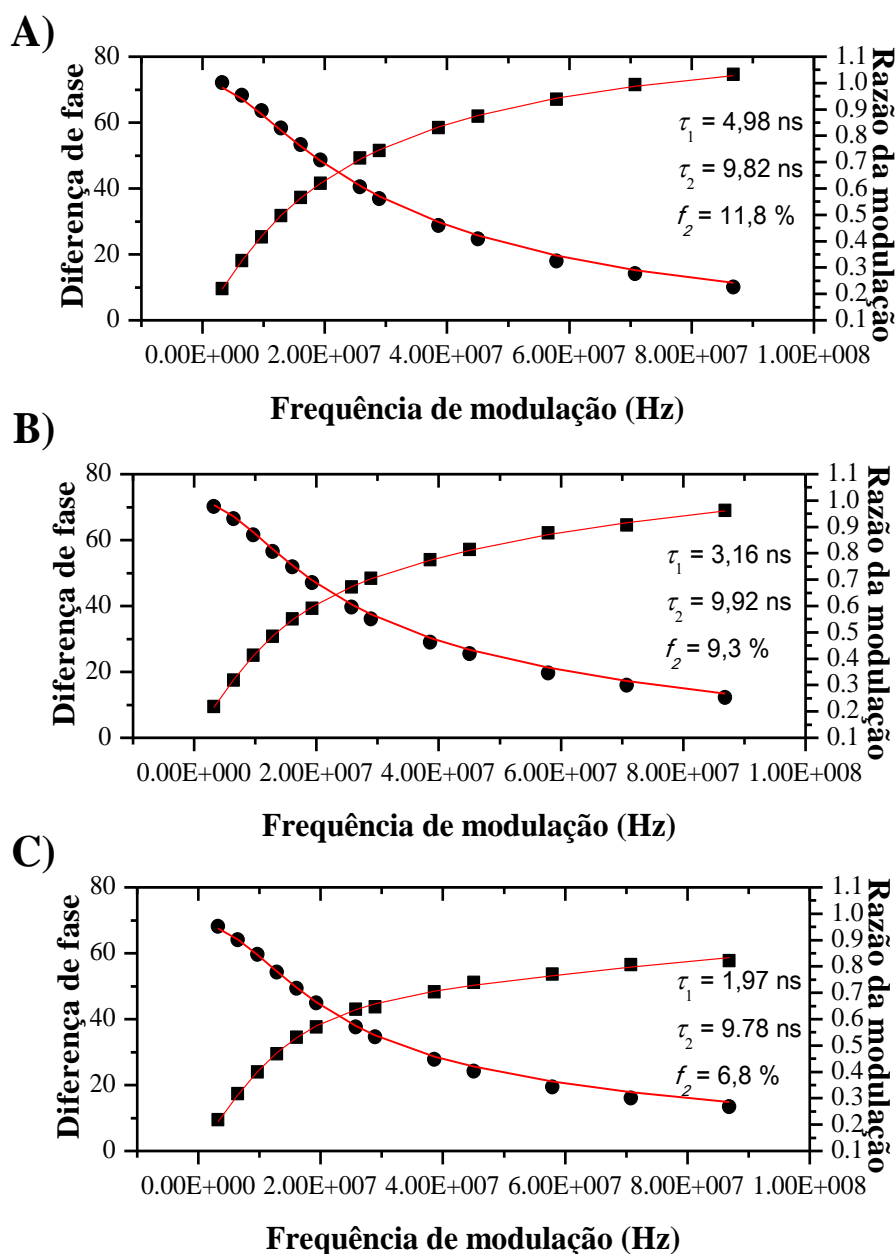
5.1.3.2 Resultados de fluorescência resolvida no tempo no domínio das frequências

Estudos de supressão de fluorescência com o supressor KI foram também realizados através da técnica de fluorescência resolvida no tempo no domínio das frequências. Com relação ao método de contagem de fóton único, a distorção do decaimento de fluorescência, devido ao forte espalhamento de fótons pelas vesículas de fosfolipídio (para mais informações, ver apêndice A), dificultou significativamente a análise dos tempos de vida mais curtos gerados pela colisão do supressor KI com as espécies de porfirina livre em solução ($\tau_1 = 5,0$ ns). Assim, os estudos de supressão foram realizados através da espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo no domínio das frequências, numa condição onde a força iônica do meio não foi mantida constante. O objetivo deste estudo é avaliar a supressão da fluorescência da TMPyP em um meio onde a porfirina está totalmente dissolvida em meio aquoso e quando a mesma está também particionada entre o meio aquoso e as LUVs. Assim, as amostras investigadas foram formadas pela TMPyP em tampão

puro, na presença de LUVs formadas por DPPC puro e pela mistura de DPPC:DPPG contendo 30 mol% de DPPG. A figura 13 mostra a razão de modulação (círculos sólidos) e a diferença de fase (quadrados sólidos) em função da frequência de modulação, para a TMPyP presente na mistura de DPPC:DPPG contendo 30 mol% de DPPG, na ausência (figura 13A) e na presença de 2 mM e 16 mM de KI (figuras 13B e 13C, respectivamente). A análise dos dados apresentados na figura 13 foi realizada através do programa de ajuste VINCI (ISS, Inc.) utilizando um modelo de ajuste bi-exponencial. Os ajustes foram realizados deixando variar todos os parâmetros (valores de tempos e respectivas contribuições fracionárias). Na ausência do supressor (figura 13A), por exemplo, os valores de τ_1 e τ_2 foram de 4,8 ns e 9,7 ns, respectivamente. Vale a pena mencionar que estes valores são muito próximos daqueles obtidos pelo método de contagem de fóton único. Na presença do supressor KI, as figuras 13B e 13C mostram que o tempo de vida longo permanece praticamente inalterado, enquanto que uma contínua diminuição do valor de tempo de vida mais curto é observada. Baseado neste resultado é possível afirmar que somente a fração de porfirina livre em solução aquosa é acessível ao supressor KI. Portanto, a diminuição da intensidade de emissão da TMPyP nos experimentos de fluorescência estática é atribuída exclusivamente à colisão do supressor aniônico I^- com as moléculas de porfirina livres em solução. À primeira vista, este resultado está em discordância com estudos prévios, os quais sugerem que o ânion I^- penetra no interior das LUVs formadas por DMPG, especialmente em temperaturas próximas àquela da transição de fase do fosfolipídio. (88) No entanto, a concentração de KI necessária para haver a penetração do I^- nas LUVs é muito maior quando comparada às concentrações (na ordem de milimolar) utilizada em nossos estudos de supressão.

Uma vez que o tempo de vida longo não é alterado na presença do supressor, o valor do mesmo ($\tau_2 = 9,7$ ns) foi fixado durante todas as análises dos dados de supressão de fluorescência. Ainda em relação à análise dos dados de supressão, vale a pena mencionar que, no caso do sistema fosfolipídico formado pela mistura de DPPC:DPPG, uma pequena diminuição do valor da contribuição fracionária f_2 (fração de porfirina ligada às vesículas), a qual está associada ao tempo de vida longo, foi observada em função da concentração de supressor a 25 °C (ver figura 13).

Figura 13 – Razão da modulação (círculos sólidos) e diferença de fase (quadrados sólidos), em função da frequência de modulação, para a TMPyP na presença das LUVs formadas de DPPC:DPPG com 30 mol% de DPPG. (A) na ausência e na presença de (B) 2 mM e (C) 16 mM de KI. As concentrações finais de porfirina e fosfolípido foram de 10 μ M e 1 mM, respectivamente. Este experimento foi realizado sem manter a força iônica constante.

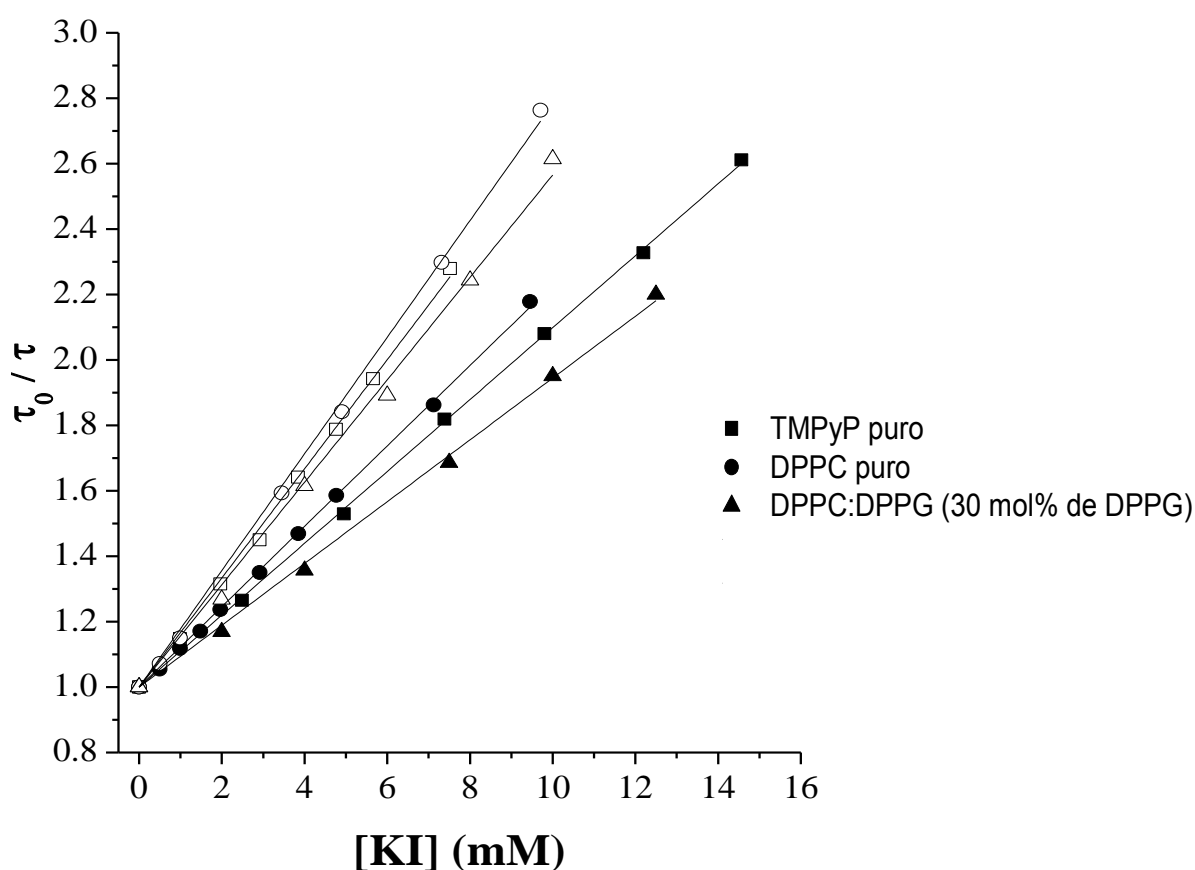


Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Este comportamento está possivelmente associado ao efeito do supressor (efeito do sal) na re-distribuição da porfirina entre o meio aquoso e as vesículas de fosfolípido.

Além disso, este resultado sugere que a TMPyP está localizada na camada de Stern das LUVs. A figura 14 mostra o gráfico de Stern-Volmer para a TMPyP nos três meios mencionados acima, em ambos valores de temperatura. Os valores das constantes K_{SV} e k_q estão apresentados na Tabela 3. Como pode ser observado, a acessibilidade do supressor KI pela fração de porfirina em meio aquoso não é significativamente diferente em relação aos outros três meios estudados, em ambos os valores de temperaturas.

Figura 14 – Gráficos de Stern-Volmer da porfirina TMPyP presente em diferentes meios à 25 °C (símbolos sólidos) e 50 °C (símbolos vazios). Os símbolos correspondem à porfirina livre em tampão puro (quadrados), na presença das LUVs formadas por DPPC puro (círculos) e pela mistura de DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG (triângulos).



Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Além disso, o aumento da temperatura é acompanhado por uma maior frequência de colisão entre o supressor e o fluoróforo (maior valor de K_{SV} e k_q). À primeira vista, os resultados acima parecem estar em discordância com aqueles obtidos nos estudos de fluorescência estática, onde uma diminuição do valor de k_q foi observada, por exemplo, em relação às LUVs formadas por DPPC:DPPG com 30 mol% de DPPG. Além disso, em relação à fluorescência estática, os resultados de supressão mostraram que, para este sistema fosfolipídico, a acessibilidade do supressor I^- é significativamente diferente quando as LUVs estão no estado gel e líquido cristalino.

Para entender este fenômeno, é importante ter em mente que as curvas de Stern-Volmer, apresentadas na figura 12B, são construídas a partir das mudanças na intensidade do espectro de emissão da TMPyP na presença do supressor. O espectro de emissão de fluorescência é proporcional ao fluxo de fótons emitidos pelo fluoróforo ao retornar ao seu estado singlete fundamental. Assim, quando duas espécies de porfirina estão presentes, o espectro de emissão é constituído pelo fluxo de fótons emitidos por ambas as espécies. Conseqüentemente, a intensidade do espectro de emissão é governada pela contribuição das espécies envolvidas bem como pelos seus respectivos valores de rendimento quântico. No caso das LUVs formadas por DPPC:DPPG com 30 mol% de DPPG, a intensidade de fluorescência é gerada tanto pela contribuição da espécie em tampão ($\tau = 5,0$ ns) quanto da espécie ligada às vesículas ($\tau = 10,2$ ns). A 25 °C (LUVs no estado gel), os dados de fluorescência resolvida no tempo mostraram que a fração de porfirina em meio aquoso é cerca de 88%. Assim, a intensidade do espectro de emissão é governada por esta espécie de porfirina. Portanto, nos estudos de supressão de fluorescência, os espectros de fluorescência estática diminuem de intensidade de forma mais significativa na presença do supressor KI a 25 °C. Por outro lado, cerca de 57% das moléculas estão ligadas às vesículas a 50 °C (LUVs no estado líquido cristalino). Outro fator que também deve ser levado em consideração diz respeito ao rendimento quântico da porfirina TMPyP. O rendimento quântico da porfirina é a razão entre o número de fótons emitidos na relaxação radiativa pelo número de fótons absorvidos. (51) Como o rendimento quântico é diretamente proporcional ao tempo de vida da porfirina (Eq. 10, seção 3.2), o fluxo de fótons devido à relaxação das espécies ligadas às vesículas de fosfolipídio (maior valor de τ) é maior que da espécie em tampão. Ou seja, o espectro de emissão da espécie de porfirina ligada

às vesículas de fosfolípido é mais intenso. Isso explica porque se observa uma menor diminuição dos espectros de emissão de fluorescência na mistura DPPC:DPPG no estado líquido cristalino, devido à presença do supressor KI. Em outras palavras, a afinidade de associação da porfirina pelas LUVs se reflete nos valores de k_q apresentados na Tabela 3.

Uma vez que os dados de supressão de fluorescência não forneceram uma descrição completa sobre a localização da TMPyP nas LUVs, estudos complementares de potencial zeta e DLS também foram realizados.

5.1.4 Estudos de Potencial Zeta e DLS

A Tabela 4 mostra os valores da mobilidade eletroforética, μ_e , do potencial zeta, ζ , e do diâmetro hidrodinâmico, D_h , para as LUVs formadas de DPPC puro no estado gel (25 °C) e líquido cristalino (50 °C), tanto na ausência quanto na presença de concentrações crescentes da porfirina TMPyP. No caso das vesículas no estado gel, as amostras exibiram valores de índice de polidispersividade (IPD) igual a um (valor máximo do IPD) na ausência e na presença de porfirina. As medidas de DLS revelaram a existência de partículas com diâmetros desde 250 nm até acima do limite de detecção do equipamento Zetasizer (>4.000 nm). Desta forma, os valores de D_h não puderam ser obtidos pelas medidas de DLS. O resultado acima sugere que, no estado gel, as vesículas de DPPC puro se agregam umas às outras formando estruturas com tamanhos bastante variados. Este fenômeno, geralmente denominado de floculação, deve estar relacionado com a baixa repulsão eletrostática entre as LUVs de DPPC puro. De fato, como apresentado na Tabela 4, os valores de ζ são muito próximos de zero para as LUVs tanto na ausência quanto na presença de concentrações crescentes da porfirina. Os resultados de DLS e potencial zeta, obtidos para este sistema fosfolipídico, estão em concordância com um estudo prévio. (89)

Os parâmetros obtidos para as LUVs formadas por DPPC puro no estado líquido cristalino também estão apresentados na Tabela 4. Uma pequena diminuição dos valores de ζ é observado, indicando que a superfície das LUVs possui um potencial levemente negativo por volta de - 4 mV. Um estudo prévio de potencial zeta têm atribuído efeito a mudanças na orientação dos grupos das cabeças polares

do fosfolípido DPPC, quando o mesmo sofre uma transição de fase do estado gel para o líquido cristalino. (87)

Tabela 4 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de DPPC puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolípido foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

DPPC puro / 25 °C			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	-0,05 \pm 0,01	-0,6 \pm 0,2	N/A
5	-0,02 \pm 0,01	-0,3 \pm 0,1	N/A
10	-0,01 \pm 0,01	0,1 \pm 0,1	N/A
20	-0,02 \pm 0,03	-0,2 \pm 0,3	N/A
40	-0,00 \pm 0,02	0,0 \pm 0,3	N/A
60	-0,00 \pm 0,01	0,0 \pm 0,1	N/A
DPPC puro / 50 °C			
0	-0,40 \pm 0,03	-3,5 \pm 0,3	140 \pm 1
5	-0,44 \pm 0,06	-3,9 \pm 0,5	139 \pm 1
10	-0,41 \pm 0,03	-3,6 \pm 0,2	140 \pm 1
20	-0,55 \pm 0,08	-4,3 \pm 0,3	142 \pm 1
40	-0,57 \pm 0,07	-4,8 \pm 0,7	141 \pm 1
60	-0,55 \pm 0,05	-4,9 \pm 0,5	145 \pm 1

N/A = Não disponível. O índice de polidispersividade (PDI) para as vesículas de DPPC puro no estado gel (25 °C), tanto na presença quanto na ausência da porfirina TMPyP, foi aproximadamente igual à uma unidade (máximo valor de PDI). Portanto, os valores de D_h não puderam ser calculados.

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Vale a pena mencionar que, no estado líquido cristalino, os valores de IPD das vesículas de DPPC puro, tanto na ausência quanto na presença da TMPyP, mantiveram em torno de 0,1. Este resultado indica que, no estado líquido cristalino,

o fenômeno de agregação (floculação) é desfavorecido pela repulsão eletrostática entre as LUVs formadas de DPPC puro. Os valores de D_h obtidos a 50 °C estão apresentados na Tabela 4. É interessante mencionar que o valor de D_h , associado às vesículas de DPPC puro e na ausência de porfirina, apresenta a mesma ordem de grandeza quando comparado ao tamanho dos poros da membrana de policarbonato utilizada na preparação das vesículas unilamelares (0,1 μm). Este resultado sustenta a interpretação sobre o efeito de floculação das vesículas de DPPC puro no estado gel. Caso o fenômeno envolvido fosse governado, por exemplo, pela fusão das vesículas de fosfolípido, o aumento da temperatura não induziria a formação de estruturas com valores de D_h próximos do diâmetro dos poros da membrana utilizada no processo de extrusão. A 50 °C, os valores de ζ indicam que a superfície da vesícula é pouco alterada pela presença da porfirina. Este resultado está em concordância com os estudos de fluorescência estática e resolvida no tempo, os quais demonstraram que a fração da porfirina livre em meio aquoso não é alterada mesmo para altas concentrações de DPPC puro em solução, indicando que não há associação da porfirina TMPyP por este sistema fosfolipídico.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para as LUVs formadas pela mistura dos fosfolípidos DPPC:DPPG com 30 mol% de DPPG, na ausência e na presença de concentrações crescentes de TMPyP, em ambos valores de temperatura. É interessante mencionar que, neste sistema fosfolipídico, a adição de DPPG a uma concentração de 30 mol% foi suficiente para produzir uma suspensão de LUVs com um valor de PDI muito pequeno (em torno de 0,08) a 25 °C (LUVs no estado gel). De fato, a Tabela 5 mostra que a mobilidade eletroforética destas vesículas a 25 °C (na ausência de porfirina), por exemplo, é cerca de 70 vezes maior quando comparado às LUVs formadas de DPPC puro (ver Tabela 4). O resultado acima sustenta a interpretação, fornecida no presente estudo, de que o desfavorecimento da agregação (floculação) das vesículas de fosfolípido está associado à repulsão eletrostática entre estes sistemas em solução aquosa. A 25 °C, as LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG com 30 mol% DPPG exibiram uma distribuição de tamanho estreita com um valor de PDI em torno de 0,10. Assim, 30 mol% de DPPG é suficiente para aumentar significativamente o potencial negativo e a repulsão eletrostática das LUVs, inibindo assim o processo de floculação. As diferenças significativas observadas na distribuição de tamanhos das LUVs formadas por DPPC puro, abaixo e acima da transição de fase, são

consideravelmente reduzidas na presença de 30 mol% do fosfolipídio aniônico (ver Tabela 5).

Tabela 5 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG) / 25 °C			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	-3,7 \pm 0,1	-48 \pm 2	118 \pm 1
5	-3,4 \pm 0,1	-44 \pm 2	118 \pm 1
10	-3,3 \pm 0,1	-42,0 \pm 1,5	118 \pm 1
20	-3,1 \pm 0,1	-40 \pm 2	119 \pm 1
40	-3,0 \pm 0,1	-37 \pm 2	124 \pm 1
60	-2,9 \pm 0,1	-36 \pm 2	145 \pm 1
DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG) / 50 °C			
0	-5,8 \pm 0,1	-51,2 \pm 1,5	130 \pm 1
5	-5,3 \pm 0,2	-47 \pm 2	129 \pm 1
10	-5,1 \pm 0,2	-44,8 \pm 1,5	129 \pm 1
20	-4,8 \pm 0,1	-42,5 \pm 1,5	130 \pm 1
40	-4,4 \pm 0,2	-39 \pm 2	129 \pm 1
60	-4,1 \pm 0,2	-36 \pm 2	127 \pm 1

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

A Tabela 5 também mostra que os valores de ζ diminuem sistematicamente em função da concentração da porfirina TMPyP, a 25 °C. A neutralização parcial das moléculas de DPPG ionizadas na superfície das LUVs indica que a porfirina TMPyP se liga preferencialmente na região da camada de Stern. Este resultado está em concordância com o estudo prévio de fluorescência resolvida no tempo, o qual demonstrou a coexistência de duas espécies de porfirina (ligada à vesícula e livre

em solução aquosa) neste sistema fosfolipídico. A Tabela 5 mostra que, a partir de uma concentração de 40 μM de porfirina, o tamanho das LUVs aumenta. O aumento dos valores de D_h está provavelmente relacionado com a formação de agregados de vesículas em solução. Estes agregados seriam mediados, possivelmente, pelo efeito de segregação dos fosfolipídios na superfície das LUVs devido à associação da porfirina. Em outras palavras, após a ligação da porfirina em um sítio não-específico das LUVs, um número maior de moléculas de DPPG se organizaria na circunvizinhança da porfirina catiônica. Entretanto, a 50 °C, o fenômeno de agregação das LUVs é desfavorecido mesmo a uma concentração mais alta de porfirina. De fato, como pode ser observado na Tabela 5, os valores de D_h não mudaram consideravelmente em função da concentração da porfirina TMPyP. Este resultado sugere que o efeito de segregação deve ser significativamente reduzido quando as LUVs se encontram no estado líquido cristalino, possivelmente em função do aumento do movimento térmico dos fosfolipídios na superfície das vesículas. Outro resultado interessante é com relação ao tamanho das vesículas de DPPC:DPPG nos dois valores de temperatura. Na ausência da porfirina TMPyP, por exemplo, os valores de D_h indicam que o tamanho das vesículas é em torno de 10 nm maior no estado líquido cristalino que no estado gel. Um estudo discutido na literatura também evidenciou um aumento do diâmetro das vesículas de fosfolipídio após sofrerem uma transição de fase do estado gel para o líquido cristalino. (90) Segundo os autores, no estado líquido cristalino, as vesículas apresentam um volume aquoso interno maior que as vesículas no estado gel. Esta expansão seria ocasionada por um aumento de pressão interna do núcleo aquoso das vesículas em decorrência de um número maior de colisões das moléculas do solvente (aumento do movimento térmico) com a parede interna da bicamada lipídica. Ainda segundo este estudo, esta expansão é acompanhada por uma diminuição da espessura da camada lipídica e um aumento da área ocupada por cada fosfolipídio na vesícula (expansão lateral). (91) Esta transição de fase também parece controlar a quantidade de moléculas de água ligadas na superfície das vesículas. Como mostrado nesse estudo, um aumento da espessura da camada de hidratação nas vesículas no estado líquido cristalino é observado. (91) Este efeito tem sido atribuído a um maior número de moléculas de água acomodadas na superfície das vesículas em função do aumento dos espaços entre os grupos das cabeças polares das moléculas de fosfolipídio. (91)

É interessante observar que, para ambos os valores de temperatura, a neutralização total da carga superficial das LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG não foi alcançada pela adição de porfirina, dentro de uma faixa de concentração de 0 - 60 μM . Os valores de ζ indicaram que a superfície das LUVs permanece negativa mesmo na concentração mais alta de porfirina (ver Tabela 5). Este comportamento é diferente daquele descrito na literatura sobre a interação dos íons lantânio (La^{3+}) com vesículas de fosfolípido, formadas pela mistura de DPPC e do fosfolípido aniônico fosfatidilinositol (PI, do inglês "*phosphatidylinositol*"), a diferentes razões molares. (92,93) Estes estudos demonstraram que o aumento da concentração deste íon na solução não só neutraliza a superfície das LUVs como também altera o sinal do seu potencial. Estes estudos também revelaram a formação de agregados de vesículas dentro de uma faixa de concentração de La^{3+} tal que o valor do potencial zeta é próximo de zero. (93,94) Entretanto, no caso da interação da TMPyP com vesículas de DPPC:DPPG, este fenômeno de agregação ocorre mesmo para valores de ζ relativamente baixos (negativos), como indicado na Tabela 5. Este resultado sustenta a ideia de que o efeito de segregação dos fosfolípidos deve contribuir decisivamente com o processo de agregação das vesículas. Além disso, outro ponto interessante diz respeito à neutralização parcial das vesículas devido à adição de porfirina. Este efeito deve estar relacionado com o fato do número de porfirinas presentes na superfície das LUVs não ser suficiente para neutralizar completamente todas as moléculas de DPPG ionizadas. Neste contexto, é interessante avaliar a proporção de moléculas de porfirina por LUVs, nas condições experimentais empregadas neste estudo. Esta estimativa será feita mais adiante, após a apresentação dos dados de potencial zeta e DLS para as LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG com 50 mol% de DPPG e DPPG puro. Estes dados se encontram descritos no parágrafo abaixo.

A Tabela 6 apresenta os dados obtidos para as LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG com 50 mol% de DPPG. De um modo geral, alguns comportamentos semelhantes àqueles previamente observados na Tabela 5 são também evidenciados neste sistema fosfolípido (ver Tabela 6). Por exemplo, os valores de ζ mostraram também ser sensíveis à presença da porfirina TMPyP e uma neutralização parcial da carga superficial das LUVs, com o aumento da concentração de porfirina, foi novamente observado. A uma concentração de 40 μM

de porfirina, os dados de DLS indicaram um aumento significativo do tamanho das vesículas. Como discutido anteriormente, este fenômeno está possivelmente relacionado com a agregação (floculação) das vesículas.

Tabela 6 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por DPPC:DPPG, com 50 mol% de DPPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolípido foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

DPPC:DPPG (50 mol% de DPPG) / 25 °C			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-4,1 \pm 0,1$	-52 ± 2	115 ± 1
5	$-3,8 \pm 0,1$	-49 ± 2	116 ± 1
10	$-3,5 \pm 0,1$	$-45,7 \pm 1,5$	116 ± 1
20	$-3,3 \pm 0,1$	$-43,1 \pm 1,5$	119 ± 2
40	$-3,1 \pm 0,1$	-40 ± 2	152 ± 1
60	$-3,1 \pm 0,2$	-40 ± 2	N/A
DPPC:DPPG (50 mol% de DPPG) / 50 °C			
0	$-6,4 \pm 0,2$	-57 ± 2	126 ± 1
5	$-6,1 \pm 0,2$	-54 ± 2	126 ± 1
10	$-5,9 \pm 0,2$	-52 ± 2	125 ± 1
20	$-5,6 \pm 0,2$	$-50,2 \pm 1,5$	123 ± 1
40	$-5,3 \pm 0,2$	$-47,4 \pm 1,5$	125 ± 1
60	$-5,2 \pm 0,2$	-45 ± 2	126 ± 1

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

Vale a pena mencionar que a 60 μM de TMPyP, o valor de D_h não pode ser obtido experimentalmente devido a uma grande variação deste parâmetro ao longo do tempo da medida. Esta evidência experimental sugere que o fenômeno de agregação é provavelmente um evento cinético. Contudo, como o objetivo do presente estudo não é avaliar o fenômeno de agregação de vesículas de fosfolípido

devido à segregação dos fosfolipídios, estudos adicionais sobre a cinética de agregação destes sistemas não foram realizados.

Tabela 7 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de DPPG puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

DPPG puro – 25 °C			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	-4,1 \pm 0,3	-53 \pm 2	112 \pm 1
5	-4,1 \pm 0,3	-52 \pm 2	110,9 \pm 1,5
10	-4,0 \pm 0,3	-51,6 \pm 2,5	111 \pm 1
20	-4,0 \pm 0,3	-51 \pm 2	112 \pm 2
40	-3,9 \pm 0,3	-50 \pm 2	114 \pm 2
60	-3,9 \pm 0,3	-49 \pm 2	115 \pm 2
DPPG puro – 50 °C			
0	-6,6 \pm 0,4	-58 \pm 2	123 \pm 1
5	-6,4 \pm 0,5	-57 \pm 2	121 \pm 1
10	-6,5 \pm 0,5	-57 \pm 2	122 \pm 1
20	-6,4 \pm 0,5	-56,2 \pm 2,5	120 \pm 1
40	-6,3 \pm 0,3	-55,8 \pm 1,5	120 \pm 1
60	-6,3 \pm 0,3	-56 \pm 2	121,0 \pm 1,5

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

No estado líquido cristalino, entretanto, a agregação das vesículas é desfavorecida e, portanto, os valores de D_h estão apresentados para toda a faixa de concentração de porfirina. Novamente, os valores de ζ mudaram em função da concentração de TMPyP, indicando a associação da porfirina pelas vesículas de fosfolipídios. Vale ainda a pena mencionar que uma comparação dos valores de ζ entre as Tabelas 6 e 7 indica que o potencial na superfície da vesícula, na ausência da porfirina TMPyP, não difere significativamente entre as duas misturas de DPPC:DPPG a uma dada

temperatura. Este resultado será discutido mais detalhadamente na próxima seção e está possivelmente associado ao fato do número de moléculas de DPPG ionizadas na superfície de ambos os sistemas (com 30 e 50 mol% de DPPG) ser muito similar.

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos para as LUVs formadas por DPPG puro. Observe que os valores de D_h puderam ser calculados dentro de toda a faixa de concentração de porfirina para as vesículas no estado gel. Este resultado reforça a interpretação fornecida anteriormente sobre o efeito de segregação de fosfolipídios. Como este fenômeno está ausente neste sistema, o qual é formado por apenas um tipo de fosfolipídio, a agregação das vesículas de DPPG (floculação) não é observada mesmo para concentrações mais altas de porfirina. Outro resultado curioso diz respeito aos valores de ζ em função da concentração de porfirina. Como pode ser observado na Tabela 7, os valores de ζ não mudaram significativamente em função da concentração de porfirina em solução aquosa. Este efeito é observado tanto para LUVs no estado gel quanto no estado líquido cristalino. Como será mostrado na próxima seção, este comportamento pode estar relacionado com uma redução significativa do número de moléculas de DPPG ionizadas na superfície das LUVs.

5.1.4.1 Carga superficial das LUVs e número de moléculas ionizadas de DPPG

Nos apêndices B-D, algumas considerações foram feitas e estimativas realizadas a fim de auxiliar a compreensão dos resultados de fluorescência e potencial zeta. Os valores destas estimativas, dentre as quais destaca-se o número máximo de moléculas de porfirinas que podem se ligar à superfície de cada LUVs, serão discutidos nesta seção. Além disso, outro parâmetro importante, o qual está relacionado com o estado de ionização do fosfolipídio DPPG nos diferentes sistemas fosfolipídicos, também será abordado abaixo. Estas estimativas foram feitas com base nos dados de difração de raios-X descritos na literatura. (94)

Para as LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG e no estado gel ($R_h = D_h/2 = 59,2$ nm, ver Tabela 5), um número de agregação n de $1,4 \times 10^5$ fosfolipídios foi estimado. Baseado neste valor, também foi possível estimar o número máximo de porfirinas por LUVs (assumindo que 100% das moléculas de porfirina estão ligadas às LUVs), o qual é em torno de $4,4 \times 10^3$.

Assim, o número máximo de cargas positivas disponíveis para interagir com a superfície das LUVs é de aproximadamente $1,8 \times 10^4$, uma vez que cada molécula de porfirina contribui com quatro cargas positivas. Além disso, para este sistema fosfolipídico, o número total de moléculas de DPPG na superfície da vesícula, N_m , é de $2,6 \times 10^4$. Este resultado sugere que, mesmo supondo que todas as moléculas de TMPyP estejam ligadas à superfície das LUVs, o número de cargas positivas ($1,8 \times 10^4$) não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas das moléculas de DPPG presente nas vesículas ($2,6 \times 10^4$). O número de cargas negativas na superfície das LUVs (parâmetro N_m) foi calculado de acordo com o apêndice B. Os valores de N_m obtidos para os outros sistemas fosfolipídicos investigados neste trabalho, em ambos os valores de temperatura, também estão apresentados na Tabela 8.

Para avaliar o grau de ionização das LUVs é necessário estimar previamente a densidade de cargas na superfície da vesícula (parâmetro σ). No caso das LUVs formadas por DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG, os valores de ζ são $-4,7 \times 10^{-2}$ V (estado gel) e $-5,1 \times 10^{-2}$ V (estado líquido cristalino), na ausência de porfirina, e os valores estimados de σ foram $3,08 \times 10^{-20}$ C/nm² e $2,98 \times 10^{-20}$ C/nm², respectivamente. Como pode ser observado, a densidade de carga na superfície da LUVs é muito próxima em ambos os valores de temperatura. Baseado na determinação de σ , o grau de ionização, α , foi estimado ser de 0,30 e 0,42, a 25 e 50 °C, respectivamente. Os valores estimados dos parâmetros σ e α também estão apresentados na Tabela 8 para todos os outros sistemas fosfolipídicos. O número de moléculas de DPPG ionizadas na superfície das LUVs, N_c , também está incluído na Tabela 8. Apesar do significativo aumento dos valores de N_m com o aumento da concentração de DPPG nas LUVs, os valores de N_c não exibiram uma diferença significativa para os três sistemas fosfolipídicos. À 25 °C, por exemplo, o valor médio de N_c é em torno de $7,8 \times 10^3$. Isto significa que o aumento da afinidade da TMPyP pelas LUVs, quando avaliada pelos valores das constantes de associação obtidas dos estudos de fluorescência, não é devido somente às interações eletrostáticas entre a porfirina e as moléculas de DPPG ionizadas na superfície das LUVs. As moléculas de porfirina devem também interagir com as outras moléculas de DPPG, via interação eletrostática, através do deslocamento dos contra-íons que neutralizam o grupo da cabeça polar do DPPG. Assim, os valores de N_m e não somente de N_c ,

devem estar envolvidos no aumento da afinidade da porfirina pelas LUVs. Esta suposição, juntamente com as estimativas do número máximo de moléculas de porfirinas por LUVs, ajuda explicar a neutralização parcial das cargas superficiais da vesícula. Este efeito de neutralização, por exemplo, é similar para ambas as misturas de DPPC:DPPG (com 30 e 50 mol% de DPPG) e é significativamente reduzido para as LUVs formadas de DPPG puro a 25 °C.

Tabela 8 – Densidade de carga superficial, σ , grau de ionização, α , número total de moléculas de DPPG (na superfície), N_m , e número de moléculas de DPPG ionizadas (na superfície), N_c , estimados para as amostras indicadas, no estado gel (25 °C) e líquido cristalino (50 °C).

Amostras	σ (C/nm ²)	α	N_m	N_c
T = 25 °C				
DPPC puro	-	-	-	-
DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG)	3,08x10 ⁻²⁰	0,30	2,60x10 ⁴	7,80x10 ³
DPPC:DPPG (50 mol% de DPPG)	3,44x10 ⁻²⁰	0,20	4,07x10 ⁴	8,10x10 ³
DPPG puro	3,49x10 ⁻²⁰	0,10	7,67x10 ⁴	7,67x10 ³
T = 50 °C				
DPPC puro	1,82x10 ⁻¹⁹	-	-	-
DPPC:DPPG (30 mol% de DPPG)	2,98x10 ⁻²⁰	0,42	2,16x10 ⁴	9,00x10 ³
DPPC:DPPG (50 mol% de DPPG)	3,41x10 ⁻²⁰	0,29	3,38x10 ⁴	9,80x10 ³
DPPG puro	3,50x10 ⁻²⁰	0,15	6,45x10 ⁴	9,60x10 ³

O erro das constantes N_m e N_c é de aproximadamente 10%.

Fonte: DE SOUSA NETO, D; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. Journal of Colloid and Interface Science. v. 381, p. 73-82, 2012. (Referência 82)

As estimativas apresentadas sugerem que, nestas condições experimentais, a magnitude desta neutralização não depende da fração de porfirina ligada às LUVs.

Ao invés disso, este efeito parece ser governado pelo grau de ionização das LUVs. Considerações similares podem ser utilizadas para explicar os resultados a 50 °C.

Como mostrado na Tabela 8, os valores de N_m para cada LUVs não são significativamente diferentes em ambos os valores de temperatura. Assim, a maior afinidade da porfirina pelas LUVs no estado líquido cristalino é devido, provavelmente, à dois fatores importantes: (1) melhor acomodação da porfirina na superfície das LUVs em função da expansão da vesícula com o aumento da camada de hidratação bem como de uma maior mobilidade das moléculas de fosfolípido e (2) aumento do caráter aniônico das LUVs (o valor médio de N_c é em torno de $9,5 \times 10^3$ para as LUVs no estado líquido cristalino). (91,94)

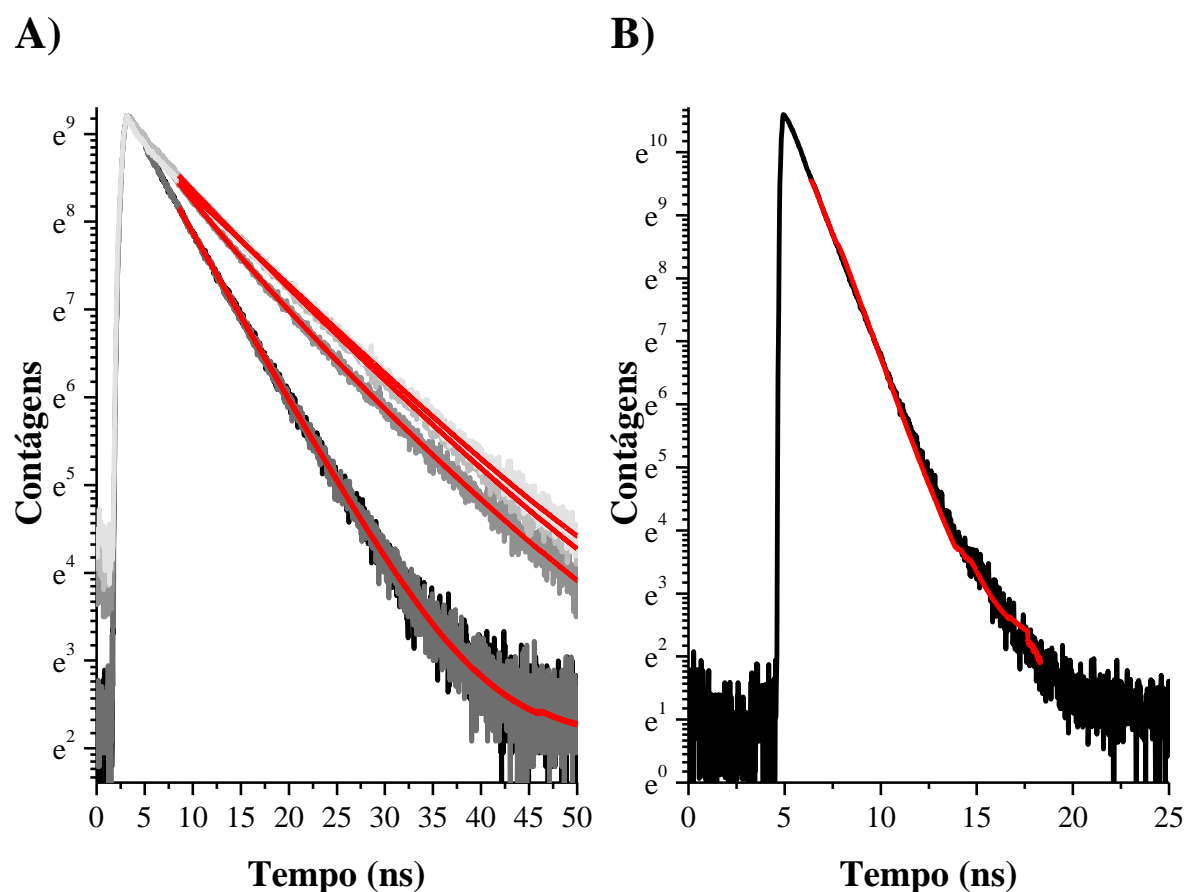
5.2 Afinidade da associação e localização das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP em vesículas unilamelares de POPC/POPG no estado líquido cristalino (Parte II)

5.2.1 Tempos de vida das porfirinas catiônicas em meio aquoso e na presença de vesículas de fosfolípido

A figura 15A mostra os decaimentos de fluorescência da porfirina TMPyP em tampão puro (linha preta) e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos (linhas cinza). Para a porfirina presente em tampão puro, a análise do decaimento foi realizada utilizando um modelo de ajuste mono-exponencial, o qual forneceu um tempo de vida igual a 5.2 ns (ver Tabela 9). A existência de um único tempo de vida igual à $\tau_1 = 5,2$ ns foi também observada para a porfirina na presença de vesículas de POPC puro. Este resultado está em concordância com o perfil bastante similar do decaimento da porfirina nos dois meios, os quais estão praticamente sobrepostos na figura 15A. Por outro lado, na presença de vesículas contendo o fosfolípido aniônico POPG, os decaimentos exibiram um comportamento diferente. Ajustes bi-exponenciais revelaram a existência de um segundo tempo de vida, τ_2 , igual à 9,7 ns (ver Tabela 9). Os valores do parâmetro estatístico Chi-quadrado, χ^2 , apresentados na Tabela 9, mostram que a qualidade dos ajustes foi em geral muito boa. Além disso, os resultados acima estão em concordância com o estudo de fluorescência resolvida no tempo realizado previamente para a TMPyP na presença dos fosfolipídios saturados (para maiores detalhes, ver seção 5.1.3.2). Como foi

discutido anteriormente, o tempo de vida mais curto ($\tau_1 = 5,2$ ns) está associado à fração de porfirina livre em meio aquoso, enquanto que o tempo de vida mais longo ($\tau_2 = 9,7$ ns) é atribuído ao fluoróforo associado às vesículas.

Figura 15 – A) Decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP em tampão puro e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os dois decaimentos mais curtos, atribuídos à porfirina em tampão puro (linha cor preta) e na presença de vesículas de POPC puro (linha cor cinza escuro) estão sobrepostos. Para as vesículas contendo POPG, o decaimento se torna mais longo em função do aumento da concentração do fosfolípido aniônico (linhas cor cinza claro). B) Decaimento de fluorescência da ZnTMPyP em tampão puro. As linhas sólidas na cor vermelha representam os ajustes do decaimento.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

A Tabela 9 apresenta os valores das contribuições fracionárias relacionados a cada tempo de vida nos diferentes sistemas fosfolipídicos. Como pode ser observado nessa tabela, um aumento do valor de f_2 é observado naqueles sistemas fosfolipídicos que apresentam uma maior concentração de POPG na sua constituição lipídica.

Tabela 9 – Tempos de vida de fluorescência das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP em tampão puro e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os valores da contribuição fracionária (em porcentagem) de cada tempo de vida no decaimento de fluorescência também estão apresentados.

TMPyP					
Meios	τ_1 (ns)	f_1 (%)	τ_2 (ns)	f_2 (%)	χ^2
Tampão puro	5,2	100	-	-	1,01
POPC puro	5,2	100	-	-	1,02
POPC:POPG (30 mol% de POPG)	5,2	35,1	9,7	64,9	1,01
POPC:POPG (50 mol% de POPG)	5,2	14,5	9,7	85,5	1,02
POPG puro	-	-	9,7	100	1,02
ZnTMPyP					
Meios	τ_1 (ns)	f_1 (%)	τ_2 (ns)	f_2 (%)	χ^2
Tampão puro	1,3	100	-	-	1,05
POPC puro	1,3	100	-	-	1,04
POPC:POPG (30 mol% de POPG)	1,3	100	-	-	1,05
POPC:POPG (50 mol% de POPG)	1,3	100	-	-	1,05
POPG puro	1,3	100	-	-	1,06

A figura 15B mostra o decaimento de fluorescência da porfirina ZnTMPyP em tampão puro. Um ajuste mono-exponencial forneceu um valor de tempo de vida τ_1 igual a 1,3 ns (ver Tabela 9). Este valor é muito próximo daquele estimado em um estudo discutido na literatura. (83,95) Além disso, vale a pena mencionar que este valor é cerca de 4 vezes menor quando comparado ao tempo de vida da porfirina base livre (ver Tabela 9). Este efeito pode ser atribuído a uma sobreposição parcial dos orbitais do Zn^{2+} e do macrociclo da porfirina, o qual seria acompanhado por um aumento da interação spin-órbita. Como este tipo de interação contribui com a taxa

de decaimento não-radioativo, o tempo médio de permanência da porfirina no estado excitado singlete é reduzido (menor valor de τ_1). Outro resultado interessante é que apenas um decaimento mono-exponencial foi observado para a ZnTMPyP na presença de todos os sistemas fosfolipídicos estudados. Além disso, como demonstrado na Tabela 9, o valor de τ_1 é o mesmo em todos os meios. À primeira vista, este resultado parece indicar que a afinidade da ZnTMPyP pelas vesículas de fosfolipídio é muito baixa e, portanto, estas moléculas permanecem preferencialmente na fase aquosa. Entretanto, como será demonstrado no estudo de absorção óptica (ver seção 5.2.2.1), a porfirina ZnTMPyP exibe uma alta afinidade de associação pelas vesículas contendo POPG. A existência de um único tempo de vida para a ZnTMPyP tanto em meio aquoso quanto na presença das vesículas de fosfolipídio, poderia ser atribuído ao fato do seu macrociclo ser menos sensível às interações com as moléculas do solvente. De fato, o apêndice E mostra, por exemplo, que o espectro de emissão da TMPyP aumenta consideravelmente a sua intensidade quando o meio se torna menos polar (menor valor da constante dielétrica), enquanto que para a emissão da ZnTMPyP ele permanece praticamente inalterado.

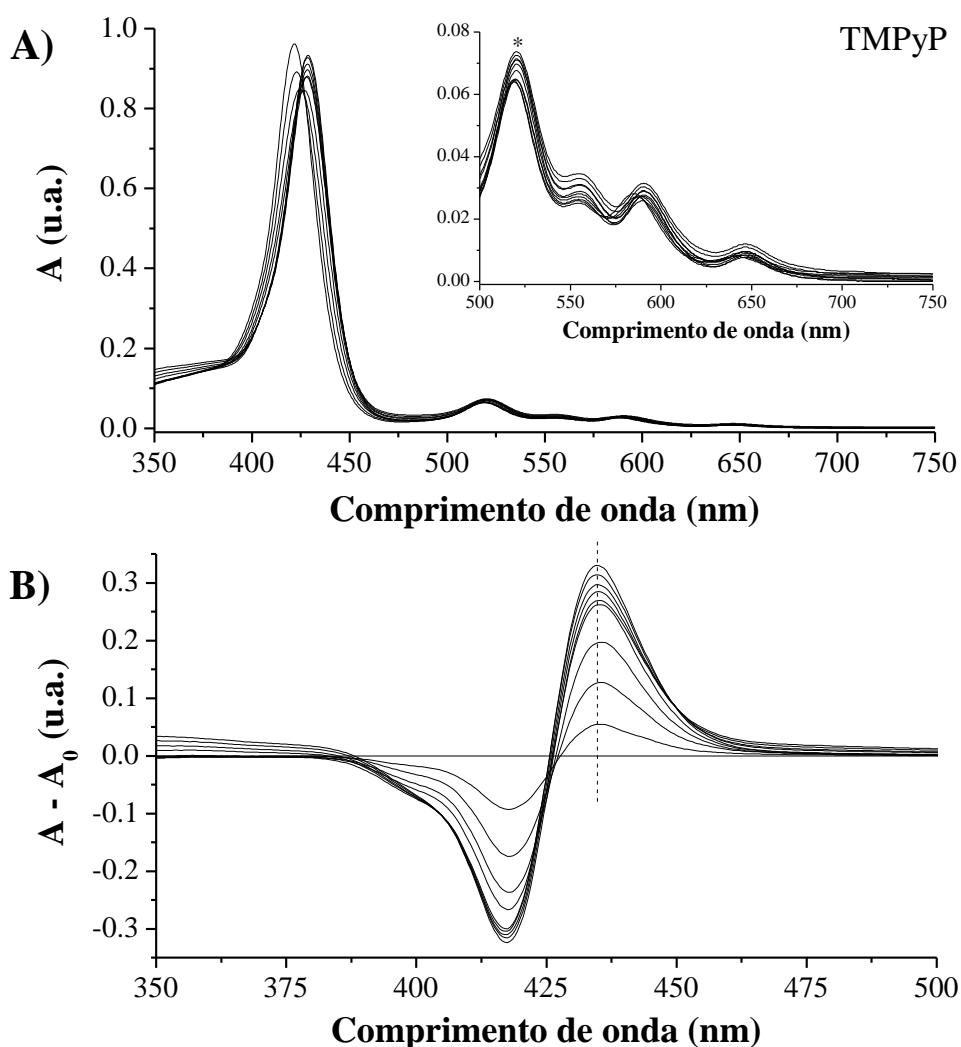
5.2.2 Associação das porfirinas catiônicas às vesículas de fosfolipídio

5.2.2.1 Resultados de absorção óptica

A figura 16A mostra os espectros de absorção óptica da TMPyP em tampão puro e em função da concentração do fosfolipídio POPG. As transições eletrônicas observadas na faixa de comprimento de onda de 350-750 nm são atribuídas aos elétrons π delocalizados no macrociclo do anel porfirínicos. (19) A banda de Soret é a mais intensa, com seu máximo centralizado em torno de 422 nm para a porfirina livre em tampão puro. A inserção da figura 16 mostra a região espectral entre 500 e 750 nm ampliada, onde é possível observar a existência de outras quatro bandas menos intensas, geralmente denominadas de bandas Q. Estas transições π de menor energia envolve os níveis vibracionais do estado singlete fundamental com outros dois níveis no estado singlete excitado. (49,50) A banda de Soret sofre mudanças significativas na presença do fosfolipídio POPG (Fig. 16A). O

deslocamento do máximo da banda de Soret na direção de valores maiores de comprimento de onda, em função da titulação com o POPG, é típico de mudanças de polaridade na vizinhança da molécula.

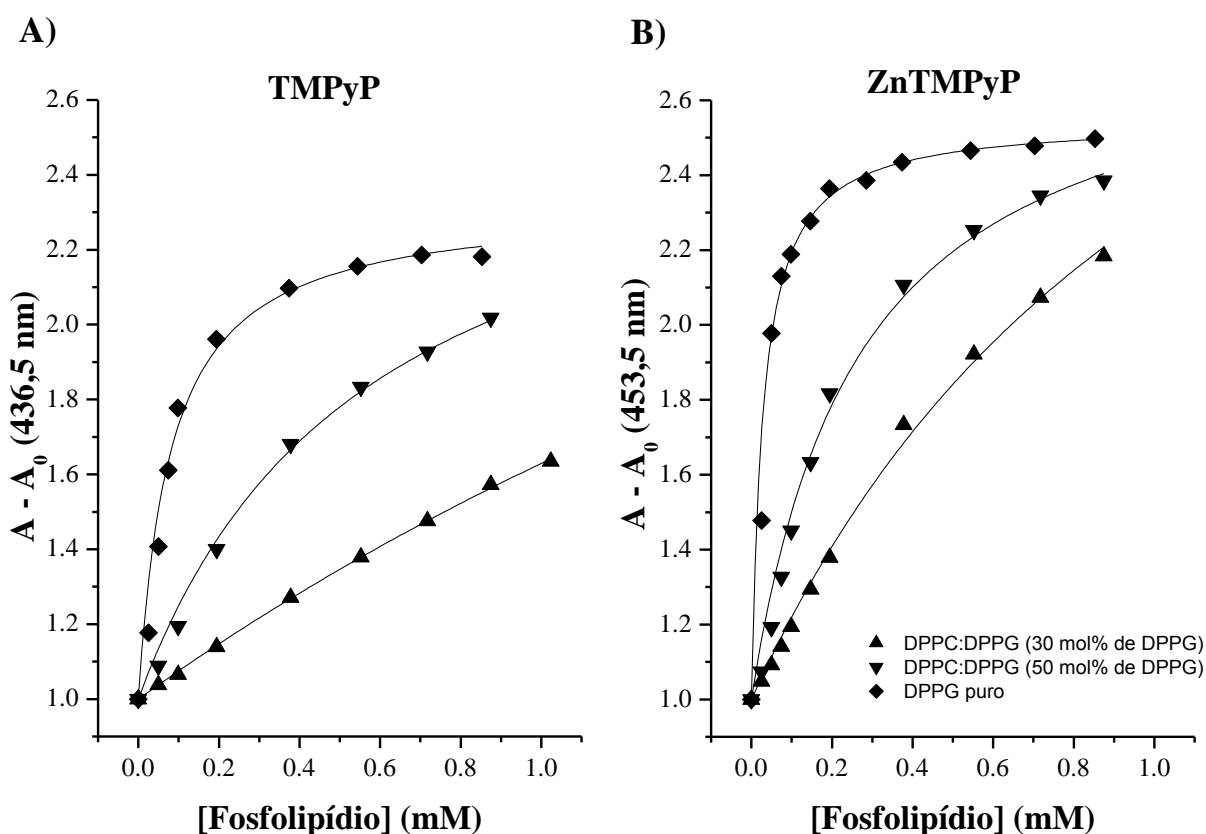
Figura 16 – A) Espectros de absorção óptica da TMPyP na ausência e na presença de concentrações crescentes de POPG. O inserto representa a ampliação da região espectral que compreende as bandas Q. B) Espectros de absorção da porfirina na presença de diferentes concentrações de POPG após subtração do espectro da porfirina em tampão puro. A linha tracejada indica o valor do comprimento de onda ($\lambda = 436,5$ nm) no qual os valores de absorbância foram coletados para a obtenção das curvas de associação. A concentração final de porfirina foi de $10 \mu\text{M}$ e a faixa de concentração de fosfolipídio utilizada neste estudo foi de 0-1,2 mM.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Este efeito deve estar relacionado, provavelmente, com a associação da porfirina às vesículas de fosfolípido (região menos polar). Esta interpretação é sustentada pela existência de um ponto isobéstico em torno de 426 nm, o qual indica o equilíbrio de pelo menos duas espécies de porfirina em solução. De fato, como foi discutido anteriormente na seção 5.2.1, os resultados de fluorescência resolvida no tempo demonstraram a partição da TMPyP entre o meio aquoso e as vesículas de fosfolípido.

Figura 17 – Curvas de associação obtidas para as porfirinas (A) TMPyP e (B) ZnTMPyP na presença de diferentes vesículas de fosfolípido à 25 °C. Os símbolos referem-se à porfirina na presença das LUVs formadas por POPC:POPG, com 30 e 50 mol% de POPG, bem como por POPG puro.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Na presença das LUVs formadas pela mistura de POPC:POPG, com 30 e 50 mol% de POPG, tais mudanças foram menos significativas, principalmente em relação à mistura contendo uma menor razão molar de POPG (espectros não apresentados). Além disso, para o sistema fosfolipídico formado apenas por POPC puro, a banda de Soret da porfirina permaneceu praticamente inalterada dentro de toda a faixa de concentração do fosfolipídio (espectros não apresentados). Este resultado indica que a afinidade de associação da porfirina TMPyP pelas vesículas de POPC puro é praticamente nula. A figura 16B representa a diferença espectral entre os espectros de absorção óptica da porfirina TMPyP na presença de diferentes concentrações de POPG em relação ao espectro da porfirina em tampão puro. A curva de associação foi obtida registrando o valor de absorvância no comprimento de onda onde a diferença espectral é máxima, ou seja, em torno de 436,5 nm, em função da concentração do fosfolipídio aniônico. A figura 17A mostra a curva de associação para o sistema fosfolipídico mencionado acima como também para as duas misturas de POPC:POPG com 30 e 50 mol% de POPG. Como não houve alterações espectrais significativas no caso da porfirina na presença de vesículas de POPC puro, a respectiva curva de associação foi omitida na figura.

Tabela 10 – Valores da constante de associação, K_b , obtidos dos experimentos de absorção óptica e fluorescência estática para as porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos.

Sistemas fosfolipídicos	K_b (M^{-1})		
	Absorção		Fluorescência
	TMPyP	ZnTMPyP	TMPyP
POPC puro	0.0	0.0	0.0
POPC:POPG (30 mol% de POPG)	$6,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$
POPC:POPG (50 mol% de POPG)	$2,5 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
POPG puro	$1,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$

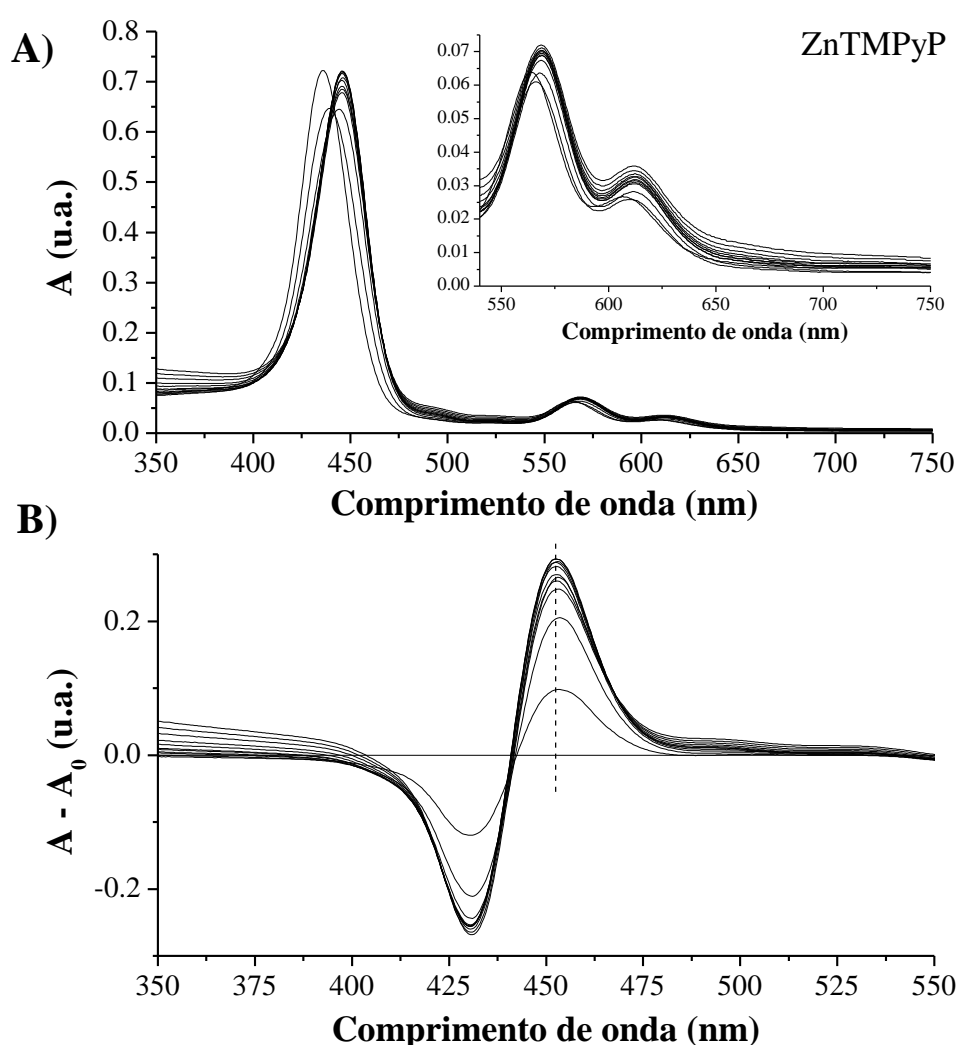
Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

É interessante observar que todas as curvas apresentadas na figura 17A exibiram um comportamento hiperbólico típico de curvas de associação. O comportamento destas curvas parece indicar uma maior afinidade de associação da porfirina pelos sistemas fosfolipídicos contendo uma maior concentração de POPG na sua constituição lipídica. Com o objetivo de obter os valores da constante de associação, K_b , as curvas da figura 17 foram ajustadas através da Eq. (26) (ver a seção 3.2.3.1). Os valores de K_b estão apresentados na Tabela 10. Como indicado na tabela, a afinidade da TMPyP pelas vesículas de POPG puro é aproximadamente 25 vezes maior quando comparado à mistura de POPC:POPG com 30 mol% de POPG. Este aumento significativo do valor de K_b indica que a atração eletrostática entre os grupos substituintes da porfirina e o grupo da cabeça polar do fosfolipídio POPG desempenha um papel crucial na afinidade destas moléculas pelas vesículas de fosfolipídio.

O estudo acima foi realizado também para a porfirina ZnTMPyP nos mesmos sistemas fosfolipídicos. Mas antes de apresentar os resultados de associação, vale a pena mencionar algumas características interessantes observadas no espectro de absorção da ZnTMPyP em tampão puro. Por exemplo, como pode ser observado na figura 18A, o máximo da banda de Soret está deslocado cerca de 14 nm na direção de comprimentos de ondas maiores quando comparado à porfirina base livre. Este fenômeno está possivelmente associado à perturbação das transições eletrônicas dos elétrons π do macrociclo devido ao estado de oxidação e/ou de spin do Zn^{2+} . Além disso, como a ligação do metal à parte central do macrociclo aumenta a simetria da molécula, algumas transições eletrônicas na região das bandas Q se tornam degeneradas. Assim, somente duas bandas Q são observadas no espectro de absorção da ZnTMPyP na região entre 500-750 nm. No entanto, apesar das diferenças nos espectros de absorção das duas porfirinas, um comportamento similar foi evidenciado na região da banda de Soret da ZnTMPyP com a titulação de fosfolipídio, ou seja: o máximo da banda de Soret é deslocado para valores maiores de comprimento de onda em função do aumento da concentração do fosfolipídio. Como pode ser observado na figura 18B, o máximo da diferença espectral para a ZnTMPyP na presença de vesículas de POPG puro, está centralizado em torno de 453,5 nm. Os valores de absorbância, monitorados neste comprimento de onda, foram utilizados para a obtenção da curva de associação da ZnTMPyP neste

sistema fosfolipídico bem como na presença das outras duas amostras (misturas de POPC:POPG).

Figura 18 – A) Espectros de absorção óptica da ZnTMPyP, na ausência e na presença de concentrações crescentes de POPG. O inserto representa a ampliação da região espectral que compreende as bandas Q. B) Espectros de absorção da porfirina na presença de diferentes concentrações de POPG após subtração do espectro da porfirina em tampão puro. A linha tracejada indica o valor do comprimento de onda ($\lambda = 453,5$ nm) no qual os valores de absorbância foram coletados para a obtenção das curvas de associação. A concentração final de porfirina foi de $10 \mu\text{M}$ e a faixa de concentração de fosfolipídio utilizada neste estudo foi de 0-1,2 mM.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

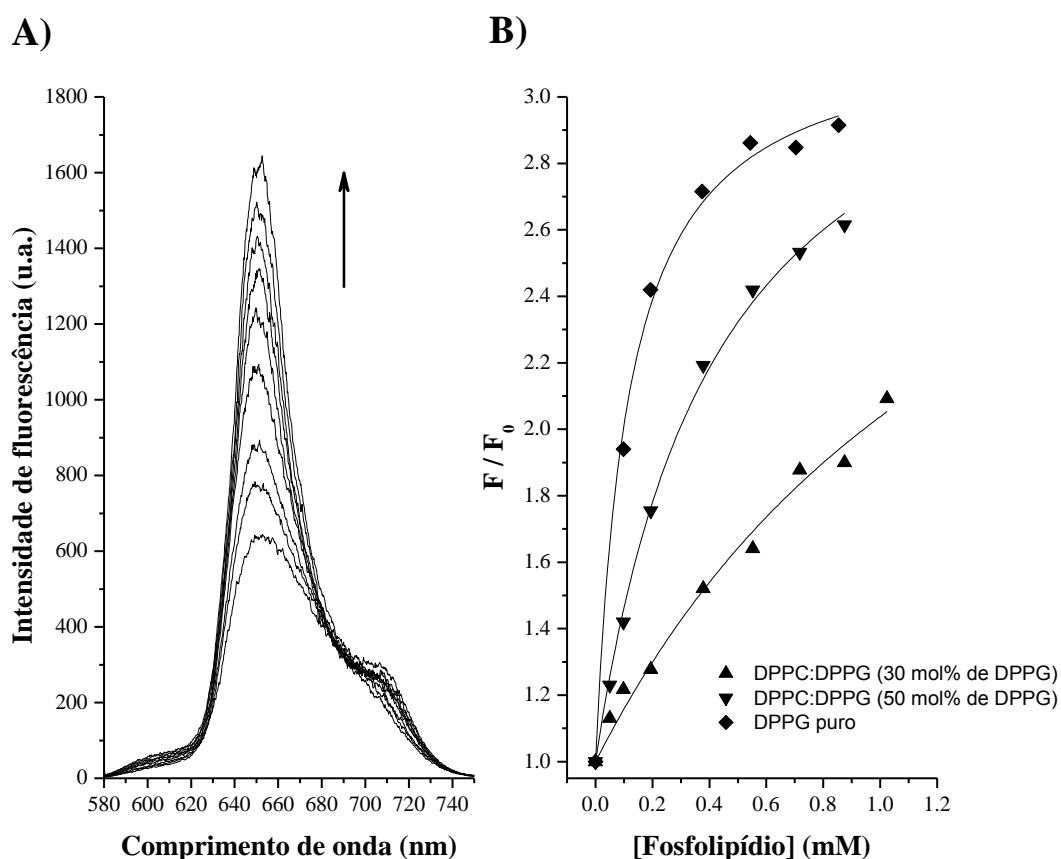
As curvas de associação (ver figura 17B) foram ajustadas como descrito anteriormente e os valores obtidos de K_b estão apresentados na Tabela 10. Como foi evidenciado previamente para a porfirina base livre, os valores de K_b também indicaram uma maior associação da ZnTMPyP pelas vesículas contendo uma maior concentração de POPG na sua constituição lipídica. Este efeito está provavelmente associado a um maior caráter catiônico desta porfirina devido à presença do cátion metálico Zn^{2+} .

5.2.2.2 Resultados de fluorescência estática

A associação de ambas porfirinas pelas vesículas de fosfolipídio foi também investigada através da espectroscopia de fluorescência estática. A figura 19A mostra, por exemplo, os espectros de emissão da TMPyP em tampão puro e na presença de diferentes concentrações da mistura de POPC:POPG com 30 mol% de POPG. Como indicado na figura, um aumento significativo da emissão da porfirina é observado para concentrações crescentes da mistura de fosfolipídio. Este efeito pode ser explicado em termos do aumento da contribuição fracionária do tempo de vida mais longo (aumento de f_2), o qual reflete a quantidade percentual das moléculas de porfirina presentes nas vesículas de fosfolipídio. Uma vez que o rendimento quântico desta fração de porfirina é maior que aquelas presentes em meio aquoso, um maior fluxo de fótons emitidos da fluorescência será observado com o aumento da fração de porfirina presente nas vesículas. O aumento da emissão de fluorescência foi observado para todos os sistemas fosfolipídicos contendo POPG. As curvas de associação da TMPyP presente nestes sistemas estão apresentadas na figura 19B. No caso do POPC puro, o espectro de emissão da porfirina permaneceu praticamente inalterado dentro de toda a faixa de concentração do fosfolipídio e, portanto, a respectiva curva de associação foi omitida da figura 19B. Baseado nesta figura, é possível inferir que a associação da TMPyP às vesículas de fosfolipídio aumenta com o aumento da fração molar de POPG. De fato, os valores das constantes K_b (ver Tabela 10), obtidas através dos ajustes das curvas de associação utilizando a Eq. (39) (para maiores detalhes, ver a seção 3.2.3.2), mostram este efeito. Uma comparação dos valores de K_b , estimados dos estudos de absorção óptica e de fluorescência estática, demonstra uma boa

concordância de ambas as técnicas na avaliação da afinidade da TMPyP pelas LUVs.

Figura 19 – A) Espectros de emissão de fluorescência (25 °C) para a porfirina catiônica TMPyP à diferentes concentrações das LUVs de POPC:POPG com 30 mol% de POPG. B) Curvas de associação da porfirina TMPyP em diferentes vesículas de fosfolipídios à 25 °C. A concentração final de porfirina foi de 10 μM e a faixa de concentração de fosfolipídio utilizada neste estudo foi de 0-1,2 mM.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Um comportamento incomum da emissão de fluorescência foi observado para a porfirina ZnTMPyP, na presença dos sistemas fosfolipídicos formados com POPG (para maiores detalhes, ver apêndice F). Para vesículas de POPG puro, por exemplo, a titulação com baixas concentrações de fosfolipídio (menores que 50 μM)

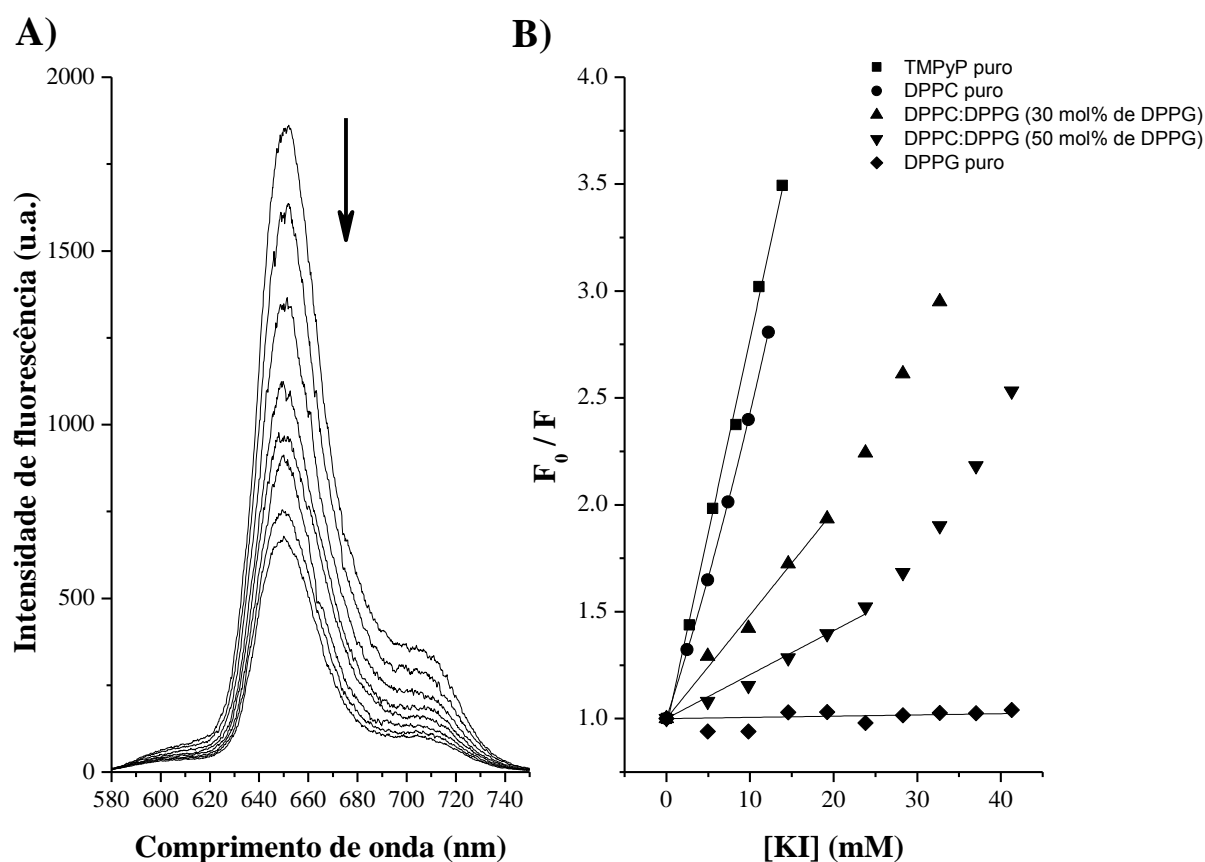
foi acompanhada por uma diminuição da emissão da porfirina. É importante mencionar que, dentro de uma faixa de concentração de 0-50 μM POPG, a concentração de vesículas em meio aquoso deve ser muito menor quando comparado à concentração de porfirina (10 μM). Além disso, como demonstrado previamente, a afinidade de associação desta porfirina por este sistema fosfolipídico é muito maior quando comparado às duas outras misturas de POPC:POPG. Assim, esta diminuição da emissão poderia ser associado ao surgimento de processos não-radioativos originados possivelmente da interação entre as moléculas de ZnTMPyP presentes nas LUVs. Este efeito (diminuição da emissão) parece ser menos significativo nas misturas dos fosfolipídios POPC:POPG, onde a afinidade de associação da porfirina é menor. No entanto, para concentrações maiores de fosfolipídio, foi possível observar um aumento da intensidade de fluorescência. Este comportamento está possivelmente associado ao desfavorecimento das interações entre as moléculas de porfirinas uma vez que, nestas condições, a concentração de porfirina deve ser muito menor que de vesículas em solução. Além disso, é interessante observar que a intensidade da emissão da porfirina livre em tampão puro é próxima daquela observada para a porfirina presente numa concentração saturada de fosfolipídio. Este efeito é observado tanto nas misturas de POPC:POPG quanto nas vesículas de POPG puro. Este resultado de fluorescência estática está em concordância com os resultados de fluorescência resolvida no tempo, os quais demonstraram a existência de um único tempo de vida ($\tau_1 = 1.3 \text{ ns}$) para a ZnTMPyP, na presença de uma concentração saturada de fosfolipídio. Em outras palavras, o fluxo de fótons emitidos pela ZnTMPyP é aproximadamente o mesmo nos diferentes sistemas fosfolipídicos. Devido a esse comportamento não foi possível avaliar as constantes de associação K_b através da fluorescência estática para a ZnTMPyP.

5.2.3. Supressão de fluorescência das porfirinas catiônicas em meio aquoso e na presença das LUVs

A figura 20A mostra os espectros de emissão da TMPyP, na presença das vesículas de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, em função da concentração do

supressor iodeto de potássio (KI). Como pode ser observado na figura, ocorre uma contínua diminuição da emissão da porfirina com o aumento da concentração de KI.

Figura 20 – A) Espectros de emissão de fluorescência para a porfirina catiônica TMPyP na presença das LUVs de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, em função da concentração do supressor iodeto de potássio (KI). B) Gráficos de Stern-Volmer para a porfirina em tampão e na presença de diferentes LUVs. As concentrações finais de porfirina e fosfolípido foram de 10 μM e 1 mM, respectivamente. A faixa de concentração de KI utilizada neste estudo foi de 0-40 mM. A seta indica o sentido da diminuição da emissão de fluorescência. Este experimento foi realizado sem manter a força iônica constante.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. *European Biophysics Journal*, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Vale a pena mencionar que os espectros de absorção da porfirina permaneceram praticamente inalterados dentro da faixa de concentração de supressor utilizado neste estudo (dados não apresentados). Assim, a diminuição da intensidade de

fluorescência mostrada na figura 20A pode ser atribuída exclusivamente ao surgimento de processos não-radioativos originados, provavelmente, das colisões entre as moléculas de porfirina e os íons iodetos (I^-). O gráfico de Stern-Volmer associado à estas mudanças espectrais está apresentado na figura 20B. É interessante notar que o gráfico apresenta um comportamento linear até uma concentração em torno de 20 mM de KI. Contudo, para concentrações maiores de supressor, o gráfico de Stern-Volmer exibe um comportamento não-linear. Esta não-linearidade foi também observada para a porfirina na presença das LUVs de POPC:POPG, com 50 mol% de POPG, para concentrações mais altas de supressor. Como foi discutido anteriormente na primeira parte deste estudo (ver seção 5.1.2, para maiores detalhes), este comportamento pode ser atribuído ao efeito do supressor (efeito do sal KI) no deslocamento das moléculas de porfirinas das LUVs em direção ao meio aquoso. Por outro lado, no caso da porfirina em tampão puro e na presença das LUVs de POPC puro, o gráfico de Stern-Volmer exibiu um comportamento linear para toda a faixa de concentração do supressor. Este comportamento linear também foi observado para a porfirina na presença das LUVs formadas por POPG puro. Em relação à este último sistema fosfolipídico, o espectro de emissão da porfirina não mudou significativamente mesmo para altas concentrações de KI, indicando que a fluorescência da porfirina não é suprimida na presença das vesículas de POPG puro.

A constante de supressão de Stern-Volmer, K_{SV} , foi estimada através de ajustes lineares dos gráficos apresentados na figura 20B. O procedimento de ajuste foi realizado utilizando a Eq. (51) (ver seção 3.2.4.1, para maiores detalhes) e os valores obtidos de K_{SV} estão apresentados na Tabela 11. No caso das LUVs formadas pelas mistura de POPC:POPG, os ajustes foram realizados dentro da faixa de concentração de supressor para o qual o gráfico de Stern-Volmer exibiu um comportamento linear. Baseado nos valores de K_{SV} bem como no tempo de vida, τ_0 , da porfirina na ausência do supressor, a constante bimolecular, k_q , foi também calculada utilizando a relação matemática $k_q = K_{SV} / \tau_0$. Os valores de k_q estão apresentados na Tabela 11. Como mencionado anteriormente, a constante k_q depende dos coeficientes de difusão das espécies envolvidas no processo de supressão. Assim, esta constante é bastante útil para avaliar a acessibilidade do supressor pelo fluoróforo. É importante mencionar que os valores de k_q foram

calculados com base no valor de τ_1 da TMPyP na ausência do supressor ($\tau_0 = \tau_1 = 5,0$ ns), mesmo para aqueles sistemas fosfolipídicos onde a existência de um segundo tempo de vida mais longo foi observado. Isso porque, como foi demonstrado anteriormente pelos resultados de fluorescência resolvida no tempo no domínio das frequências (ver seção 5.1.3.2, para maiores detalhes) somente a fração de porfirina em meio aquoso ($\tau_1 = 5,0$ ns) mostrou ser acessível ao supressor. É interessante observar que os valores de k_q não diferem significativamente para a porfirina em tampão e na presença das vesículas de POPC, sugerindo que a acessibilidade do supressor pela porfirina ocorre de forma similar em ambos os sistemas. Por outro lado, uma significativa diminuição do valor de k_q é observada em relação às LUVs contendo a mistura de POPC:POPG.

Tabela 11 – Constantes de Stern-Volmer, K_{SV} , e bimoleculares, k_q , obtidas dos estudos de supressão para as porfirinas catiônicas TMPyP and ZnTMPyP, em tampão e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. Os experimentos foram realizados à 25 °C usando o iodeto de potássio (KI) como supressor.

Meios	TMPyP		ZnTMPyP	
	K_{SV} (M^{-1})	k_q ($M^{-1}s^{-1}$)*	K_{SV} (M^{-1})	k_q ($M^{-1}s^{-1}$ **)
Tampão puro	167 ± 8	$3,3 \pm 0,2 \times 10^{10}$	40 ± 6	$2,6 \pm 0,4 \times 10^{10}$
POPC puro	140 ± 3	$2,7 \pm 0,1 \times 10^{10}$	35 ± 2	$2,4 \pm 0,2 \times 10^{10}$
POPC:POPG (30 mol% POPG)	54 ± 4	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$	8 ± 1	$5,4 \pm 0,7 \times 10^9$
POPC:POPG (50 mol% de POPG)	16 ± 4	$2,4 \pm 0,8 \times 10^9$	2 ± 1	$1,7 \pm 0,6 \times 10^9$
POPG puro	0	0	0	0

* Esta constante foi calculada usando a equação $k_q = K_{SV} / \tau$ e o valor de tempo de vida atribuído à porfirina livre em tampão ($\tau = 5,0$ ns).

** Esta constante foi calculada usando a equação $k_q = K_{SV} / \tau$ e o valor de tempo de vida atribuído à porfirina livre em tampão ($\tau = 1,3$ ns).

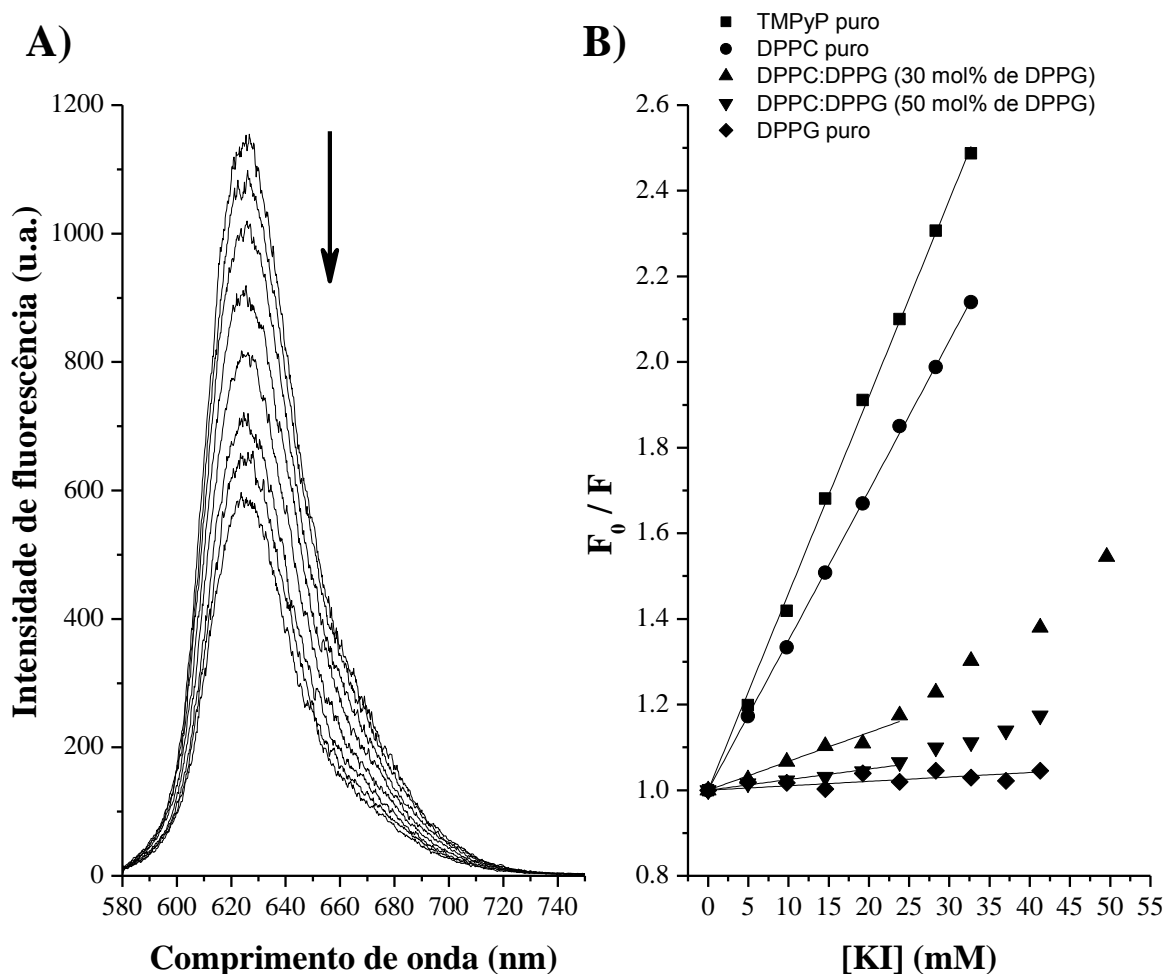
Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Para as LUVs de POPC:POPG com 50 mol% de POPG, por exemplo, o valor de k_q é cerca de 11 vezes menor quando comparado à porfirina livre em tampão. Outro resultado curioso diz respeito às vesículas de POPG puro. Como pode ser observado na Tabela 11, o valor de k_q indica que a acessibilidade do supressor KI pela porfirina TMPyP é inexistente. Como discutido anteriormente (ver seção 5.1.3.2, para maiores detalhes), a diminuição dos valores de k_q nos sistemas fosfolipídicos contendo uma maior concentração de POPG reflete o efeito de associação da porfirina pelas LUVs. Assim, quanto menor for a contribuição da emissão de fluorescência da fração de porfirina livre em meio aquoso, menor será a diminuição da emissão de fluorescência total da amostra devido à adição do supressor. Este efeito, conseqüentemente, se reflete nos valores de k_q apresentados na Tabela 11.

O estudo de supressão de fluorescência foi também realizado para a ZnTMPyP na presença dos mesmos meios. A figura 21A mostra, por exemplo, a diminuição da emissão da porfirina na presença das LUVs de POPC:POPG com 30 mol% de POPG, em função da concentração do supressor KI. A figura 21B mostra os gráficos de Stern-Volmer associados à estas mudanças espectrais, onde é possível também observar um comportamento não-linear a altas concentrações de supressor. Este comportamento foi também observado para a ZnTMPyP presente na mistura de POPC:POPG, com 50 mol% de POPG. Como foi discutido anteriormente para a porfirina base livre, este fenômeno é atribuído ao efeito do sal KI na redistribuição da porfirina entre as LUVs e o meio aquoso. No entanto, uma comparação das figuras 20B e 21B parece indicar que o desvio não-linear das curvas de Stern-Volmer é menos significativo no caso da porfirina ZnTMPyP. Este efeito deve estar possivelmente associado a uma maior afinidade de associação da ZnTMPyP pelas misturas de POPC:POPG (ver valores de K_b na Tabela 10). Assim, o efeito do sal no deslocamento das moléculas de ZnTMPyP das vesículas para o meio aquoso deve ser menor. Os valores de K_{SV} estimados para a ZnTMPyP nos diferentes meios também estão apresentados na Tabela 11. Os valores de K_{SV} para a ZnTMPyP, na presença das misturas de POPC:POPG, é muito menor que em tampão puro ou mesmo na presença de vesículas de POPC puro. Além disso, no caso das vesículas de POPG puro, o valor de K_{SV} indica que a fluorescência da porfirina ZnTMPyP não é suprimida pelo KI. É interessante observar que os valores de K_{SV} obtidos para a

ZnTMPyP em todos os meios estudados são muito menores quando comparados à porfirina base livre.

Figura 21 – A) Espectros de emissão de fluorescência para a porfirina catiônica ZnTMPyP na presença das LUVs de POPC:POPG com 30 mol% de POPG, em função da concentração do supressor iodeto de potássio (KI). B) Gráficos de Stern-Volmer para a porfirina em tampão e na presença de diferentes sistemas fosfolipídicos. As concentrações finais de porfirina e fosfolípido foram de 10 μ M e 1 mM, respectivamente. A faixa de concentração de KI utilizada neste estudo foi de 0-40 mM. A seta indica o sentido da diminuição da emissão de fluorescência. Este experimento foi realizado sem manter a força iônica constante.



Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Como a frequência de colisão entre a porfirina e o íon iodeto depende do tempo médio de permanência do fluoróforo no estado singlete excitado, o menor valor de τ_1 estimado para a ZnTMPyP poderia explicar esta diferença. Baseado no tempo de vida da ZnTMPyP na ausência do supressor ($\tau_0 = 1,3$ ns), os valores de k_q foram também estimados (ver Tabela 11). A tabela mostra, por exemplo, que os valores de k_q estimados para a ZnTMPyP e TMPyP em tampão puro e na presença de vesículas de POPC puro são similares. As maiores diferenças dos valores de k_q entre as duas porfirinas foram observadas quando elas estão presentes nas misturas de POPC:POPG. Como pode ser notado na Tabela 11, a ZnTMPyP exibiu menores valores de k_q nestes dois sistemas em relação à porfirina base livre. Este resultado está em concordância com uma maior afinidade de associação da ZnTMPyP por estes sistemas fosfolipídicos. Assim, como uma menor fração de ZnTMPyP está presente no meio aquoso, mudanças menos significativas da emissão de fluorescência são observadas em função da concentração de supressor (valores menores de k_q).

5.2.4. Localização das porfirinas TMPyP e ZnTMPyP nas LUVs

A Tabela 12 mostra os valores da mobilidade eletroforética, μ_e , do potencial zeta, ζ , e do diâmetro hidrodinâmico, D_h , para as vesículas de POPC puro no estado líquido cristalino, tanto na ausência quanto na presença de concentrações crescentes da porfirina TMPyP. É interessante observar que, na ausência da porfirina, o valor de ζ indica que a superfície das vesículas de POPC puro apresenta cargas negativas ionizadas. Este resultado parece ser contraditório visto que as moléculas de POPC possuem um caráter zwitteriônico. À primeira vista, este valor negativo de ζ poderia ser atribuído à presença de possíveis impurezas na amostra. Entretanto, como foi discutido anteriormente para as LUVs formadas de DPPC puro (ver seção 5.1.4, para maiores detalhes), a transição de fase deste sistema fosfolipídico do estado gel para o estado líquido cristalino é acompanhada por uma diminuição do valor do potencial zeta. Em outras palavras, a superfície da vesícula de DPPC apresenta um caráter negativo no estado líquido cristalino. Estudos anteriores atribuíram este efeito às mudanças na orientação dos grupos das cabeças polares do fosfolipídio quando o mesmo sofre uma transição de fase do

estado gel para o líquido cristalino. (87,90) Desta forma, o caráter negativo das vesículas de POPC puro está provavelmente relacionado com a conformação assumida pelo seu grupo fosfolipina na superfície da vesícula. Em relação às LUVs de POPC puro na presença da TMPyP, a Tabela 12 mostra que os valores de ξ permaneceram praticamente inalterados dentro de toda a faixa de concentração de porfirina.

Tabela 12 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de POPC puro e pela mistura de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

TMPyP			
POPC puro			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-1,0 \pm 0,1$	$-6,1 \pm 1,5$	121 ± 1
5	$-1,0 \pm 0,2$	-6 ± 2	120 ± 1
10	$-1,0 \pm 0,1$	-6 ± 1	120 ± 1
20	$-1,0 \pm 0,1$	-6 ± 1	122 ± 1
40	$-1,0 \pm 0,2$	-6 ± 1	121 ± 1
60	$-1,1 \pm 0,2$	$-6,1 \pm 1,5$	122 ± 1
POPC:POPG (30 mol% POPG)			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-3,9 \pm 0,7$	-51 ± 3	114 ± 1
5	$-3,6 \pm 0,8$	-47 ± 3	114 ± 1
10	$-3,5 \pm 0,6$	$-44,5 \pm 2,5$	115 ± 1
20	$-3,2 \pm 0,7$	-41 ± 3	114 ± 1
40	$-3,0 \pm 0,6$	$-38,6 \pm 2,5$	115 ± 1
60	$-2,8 \pm 0,6$	-37 ± 2	$114,0 \pm 1,5$

Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Este resultado está em concordância com os dados de fluorescência e absorção óptica (ver seção 5.2.2, para maiores detalhes), os quais demonstraram que a TMPyP não apresenta afinidade de associação por este sistema fosfolipídico. Os valores de D_h também estão apresentados na Tabela 12. Como pode ser observado, o tamanho das LUVs não mudaram significativamente em função da concentração de porfirina. Diferentemente das vesículas de DPPC no estado gel ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$), as vesículas de POPC no estado líquido não se agregam entre si. Este efeito está possivelmente relacionado com a repulsão eletrostática das vesículas, as quais apresentam um pequeno potencial negativo na sua superfície. Os valores de IPD (índice de polidispersividade) observados para as LUVs de POPC puro na ausência e na presença de porfirina foram muito baixos, variando entre 0,07 e 0,09.

Como pode ser observado na Tabela 12, a adição de 30 mol% de POPG promoveu mudanças significativas no potencial de superfície e no diâmetro hidrodinâmico das LUVs em relação ao sistema formado por POPC puro. Por exemplo, na ausência da porfirina, a tabela mostra uma variação considerável do valor de ζ , o qual diminuiu de - 6 mV para - 51 mV com a adição do fosfolípido aniônico. Além disso, os valores de D_h indicam que o tamanho das LUVs de POPC:POPG é um pouco menor quando comparado aquelas formadas de POPC puro, na ausência da porfirina (ver Tabela 12). Um comportamento comum a ambos os sistemas fosfolipídicos, devido à adição de porfirina, é que os valores de D_h permaneceram praticamente inalterados para toda a faixa de concentração de TMPyP. No entanto, uma neutralização parcial da superfície das LUVs de POPC:POPG foi observada com o aumento da concentração de porfirina, indicando que a TMPyP está preferencialmente localizada na região da camada de Stern. Este resultado está em concordância com os dados de fluorescência resolvida no tempo (ver seção 5.2.1), os quais demonstraram a existência de um tempo de vida mais longo associado às moléculas de porfirina ligadas nas LUVs. Este fenômeno (neutralização parcial das LUVs) foi discutido na parte I do presente estudo (ver seção 5.1.4) e está relacionado com o fato do número de moléculas de porfirina por vesícula ser insuficiente para neutralizar todas as cargas negativas disponíveis na superfície das LUVs. Baseado no apêndice B é possível estimar que o número máximo de moléculas de porfirina por LUVs (assumindo que 100% destas moléculas estão ligadas neste sistema) é em torno de $2,6 \times 10^3$. Assim, como cada porfirina apresenta quatro grupos substituintes carregados positivamente, tem-se que o

número máximo de cargas positivas disponíveis para interagir com a superfície das LUVs é de $1,0 \times 10^4$. Além disso, para este sistema fosfolipídico, o número total de moléculas de POPG na superfície da vesícula (parâmetro N_m) é $1,3 \times 10^4$ (ver Tabela 13). Este resultado sugere que, mesmo assumindo que todas as moléculas de TMPyP estão ligadas à superfície das LUVs, o número de cargas positivas ($1,0 \times 10^4$) não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas das moléculas de POPG na superfície das vesículas ($1,3 \times 10^4$). Com base no potencial residual apresentado na Tabela 12 (valor de ξ à $60 \mu\text{M}$ de TMPyP), uma neutralização de apenas 28% é observada para este sistema fosfolipídico.

Tabela 13 – Densidade de carga superficial, σ , grau de ionização, α , número total de moléculas de POPG (na superfície), N_m , e número de moléculas de POPG ionizadas (na superfície), N_c , estimados para as amostras indicadas, no estado líquido. Estes valores foram calculados com base nos resultados de ξ e D_h apresentados nas Tabelas 12 e 14.

Amostras	σ (C/nm ²)	α	N_m	N_c
POPC puro	$3,47 \times 10^{-19}$	-	-	-
POPC:POPG (30 mol% de POPG)	$3,38 \times 10^{-20}$	0,58	$1,34 \times 10^4$	$7,77 \times 10^3$
POPC:POPG (50 mol% de POPG)	$4,10 \times 10^{-20}$	0,42	$3,38 \times 10^4$	$9,98 \times 10^3$
POPG puro	$4,91 \times 10^{-20}$	0,25	$4,19 \times 10^4$	$1,04 \times 10^4$

O erro das constantes N_m e N_c é de aproximadamente 10%.

Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Outros fatores que poderiam contribuir para a neutralização parcial da camada externa das vesículas estão discutidos abaixo. Por exemplo, é razoável assumir que fatores estéricos também estão envolvidos neste fenômeno. Como os quatro grupos substituintes catiônicos estão fixos na estrutura rígida da porfirina, um arranjo conformacional específico deveria ocorrer para que estes grupos interagissem mais efetivamente com os grupos fosfatos dos lipídios. Assim, a menor neutralização observada nos dados de potencial zeta está possivelmente associada ao fato de que

certos grupos substituintes da porfirina não interagirem via interação eletrostática. Além disso, visto que a associação da porfirina deve promover a dissociação de contra-íons da superfície das LUVs, a neutralização parcial das vesículas também deve ocorrer devido ao aumento do seu caráter aniônico para maiores concentrações de porfirina.

Tabela 14 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por POPC:POPG, com 50 mol% de POPG, e para as vesículas de POPG puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica TMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolipídio foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

TMPyP			
POPC:POPG (50 mol% de POPG)			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-4,6 \pm 0,4$	-59 ± 3	118 ± 1
5	$-4,5 \pm 0,4$	-58 ± 2	118 ± 1
10	$-4,4 \pm 0,3$	$-56,1 \pm 2,5$	118 ± 1
20	$-4,2 \pm 0,3$	-54 ± 3	118 ± 1
40	$-3,8 \pm 0,4$	-50 ± 2	117 ± 1
60	$-3,7 \pm 0,3$	-47 ± 2	116 ± 1
POPG puro			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-5,2 \pm 0,3$	-67 ± 4	111 ± 1
5	$-5,0 \pm 0,4$	-64 ± 5	111 ± 1
10	$-5,2 \pm 0,3$	-67 ± 4	110 ± 1
20	$-4,9 \pm 0,3$	-63 ± 4	110 ± 1
40	$-4,8 \pm 0,4$	-61 ± 6	107 ± 1
60	$-4,5 \pm 0,2$	-57 ± 3	105 ± 1

Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

A princípio, um terceiro fator associado à ocupação da camada mais interna da bicamada lipídica pelas moléculas de porfirina poderia ainda ser considerado. No entanto, devido ao seu caráter catiônico, a difusão destas moléculas através da bicamada lipídica deve ser bastante limitada e, assim, a neutralização de cargas deve estar restrita à camada mais externa das LUVs. De fato, a floculação das vesículas para concentrações de porfirina mais altas que as apresentadas na Tabela 12 parece confirmar esta interpretação.

A neutralização parcial das LUVs de POPC:POPG, com 50 mol% de POPG, em função do aumento da concentração de TMPyP também é observada (ver Tabela 14). No entanto, a magnitude deste efeito parece ser menor quando comparado às LUVs com uma concentração menor de POPG (20% de neutralização versus 28% à 30 mol% de POPG). Além disso, para as LUVs constituídas de POPG puro, a neutralização é significativamente reduzida devido à adição de porfirina, onde apenas 15% de neutralização é observada para este sistema (Tabela 15). Os resultados acima indicam que a magnitude da neutralização não pode ser atribuída à fração de porfirina presente na superfície das LUVs. Como foi demonstrado pelos dados de fluorescência resolvida no tempo, a quantidade de porfirina ligada nas LUVs aumenta consideravelmente para concentrações maiores de POPG (ver seção 5.2.1, Tabela 9). Portanto, é razoável assumir que este efeito pode ser atribuído à pelo menos dois fatores: (1) as interações porfirina-vesícula não são puramente eletrostática em natureza mas também contém uma componente hidrofóbica e (2) o menor grau de ionização, α , das LUVs com concentração maior de POPG. A contribuição destas interações hidrofóbicas sobre a associação da porfirina ainda necessita ser avaliada em futuros estudos termodinâmicos, através da estimativa das variáveis de estado (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs). Assim, somente a discussão sobre o grau de ionização é apresentado abaixo. Este último parâmetro foi estimado de acordo com o apêndice C e D, onde os valores encontrados estão apresentados na Tabela 13 para as LUVs contendo POPG. A densidade de carga na superfície das vesículas (parâmetro σ), necessária para a estimativa de α , também está incluída nesta tabela. Como pode ser observado, os valores de α diminuem consideravelmente para concentrações maiores de POPG nas LUVs. Baseado nos valores de N_m e α , o número de moléculas de POPG ionizadas na superfície das LUVs (parâmetro N_c) também foi estimado (ver apêndice D). Estes valores estão

mostrados na Tabela 13 e, juntamente com os valores de N_m , é possível afirmar que o aumento na afinidade das porfirinas pelas LUVs, dada pelas constantes de associação calculadas dos experimentos de absorção óptica e fluorescência, está associado com o aumento do caráter aniônico das LUVs.

Tabela 15 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas de POPC puro e pela mistura de POPC:POPG, com 30 mol% de POPG, na ausência e na presença da porfirina catiônica ZnTMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolípido foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

ZnTMPyP			
POPC puro			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-0,9 \pm 0,1$	-6 ± 1	121 ± 1
5	$-1,0 \pm 0,3$	$-7,0 \pm 1,5$	121 ± 1
10	$-0,9 \pm 0,1$	-6 ± 2	121 ± 1
20	$-0,9 \pm 0,2$	$-6,7 \pm 1,5$	$120,5 \pm 1,5$
40	$-1,0 \pm 0,1$	-6 ± 2	121 ± 2
60	$-0,9 \pm 0,1$	-6 ± 1	122 ± 2
POPC:POPG (30 mol% de POPG)			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	$-4,0 \pm 0,2$	-52 ± 3	117 ± 1
5	$-3,8 \pm 0,2$	-49 ± 3	116 ± 1
10	$-3,5 \pm 0,2$	-46 ± 3	117 ± 1
20	$-3,3 \pm 0,2$	-42 ± 3	116 ± 1
40	$-2,0 \pm 0,2$	-36 ± 2	116 ± 1
60	$-2,6 \pm 0,2$	-34 ± 2	120 ± 2

Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

Outro fator que dificulta a análise quantitativa do fenômeno na camada de Stern está relacionado aos cálculos do grau de ionização, apresentados nos apêndices C e D. Os valores dos parâmetros apresentados na Tabela 13 estão relacionados com vesículas puras. No entanto, como foi discutido anteriormente, a adição da porfirina catiônica com quatro grupos substituintes poderia produzir alguma ionização adicional do fosfolípido na superfície da vesícula pelo deslocamento de contra-íons através da repulsão eletrostática, o qual contribuiria para o aumento do seu caráter aniônico. Este efeito poderia ser muito importante nas LUVs de POPG puro, onde de acordo com os dados de potencial zeta, a neutralização é menor.

Os resultados de DLS e potencial zeta obtidos para a porfirina ZnTMPyP na presença dos mesmos sistemas fosfolípidios estão apresentados nas Tabelas 14 e 15. Em geral, comportamentos similares foram observados para ZnTMPyP em relação à porfirina base livre. Por exemplo, os valores de ζ estimados para as vesículas de POPC puro, na ausência e na presença da ZnTMPyP, também permaneceram praticamente inalterados dentro de toda a faixa de concentração da porfirina. Além disso, em relação às LUVs formadas pelas misturas de POPC:POPG, a diminuição dos valores de ζ também foi observada devido o aumento da concentração de porfirina. Contudo, uma comparação deste efeito entre ambas as porfirinas mostra que a neutralização parcial é mais significativa no caso da ZnTMPyP quando comparada à porfirina base livre. À 30 mol% de POPG, por exemplo, esta neutralização é de aproximadamente 35% (ver Tabela 14). Nas LUVs formadas por 50 mol% de POPG este valor é de 50%, enquanto que nas vesículas de POPG puro este valor retorna para 14% (ver Tabela 15). Este resultado parece indicar que a presença do cátion metálico Zn^{2+} no centro do macrociclo aumenta significativamente a atração eletrostática entre a porfirina e os lipídios na camada mais externa das LUVs. O aumento significativo da neutralização nas LUVs contendo 50 mol% de POPG poderia também ser resultado de uma coordenação efetiva do metal com os grupos fosfatos, como mencionado previamente na seção 5.2.2. Como foi demonstrado dos estudos de absorção óptica e fluorescência, a ZnTMPyP exibe uma maior afinidade de associação pelas LUVs contendo POPG. Entretanto, mesmo para esta porfirina, a neutralização incompleta das cargas na superfície das LUVs é uma evidência para a existência de uma componente hidrofóbica, o qual é maior para a TMPyP, que contribui para a associação da

porfirina e possivelmente facilita a remoção da água de hidratação e um certo número de contra-íons na camada de Stern das vesículas.

Tabela 16 – Mobilidade eletroforética, μ_e , potencial zeta, ζ , e diâmetro hidrodinâmico, D_h , estimados para as LUVs formadas por POPC:POPG, com 50 mol% de POPG, e para as vesículas de POPG puro, na ausência e na presença da porfirina catiônica ZnTMPyP, à diferentes concentrações. A concentração final de fosfolípido foi de 2 mM para ambas medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico.

ZnTMPyP			
POPC:POPG (50 mol% de POPG)			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	-4,5 \pm 0,4	-58 \pm 3	118 \pm 1
5	-4,3 \pm 0,3	-55 \pm 3	117 \pm 1
10	-3,8 \pm 0,2	-48 \pm 3	116 \pm 1
20	-3,6 \pm 0,2	-46 \pm 4	116 \pm 1
40	-3,0 \pm 0,2	-38 \pm 2	117 \pm 1
60	-2,7 \pm 0,1	-34 \pm 2	117 \pm 1
POPG puro			
[TMPyP] (μM)	μ_e ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	ζ (mV)	D_h (nm)
0	-5,2 \pm 0,2	-66,4 \pm 3,5	114 \pm 1
5	-5,0 \pm 0,4	-64 \pm 5	113 \pm 1
10	-4,9 \pm 0,3	-63 \pm 4	113 \pm 1
20	-4,8 \pm 0,3	-61,7 \pm 4,5	112 \pm 1
40	-4,6 \pm 0,3	-58 \pm 4	111 \pm 1
60	-4,4 \pm 0,4	-56 \pm 3	109 \pm 1

Fonte: DE SOUSA NETO, D., HAWE, A., TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. European Biophysics Journal, v. 42, 267-279, 2013. (Referência 83)

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que a fluorescência resolvida no tempo é uma ferramenta bastante útil para avaliar a associação de porfirinas catiônicas, em especial a TMPyP, por vesículas de fosfolípido. Os ajustes dos decaimentos de fluorescência revelaram, por exemplo, a existência de um segundo tempo de vida mais longo da porfirina na presença das vesículas formadas pela mistura de DPPC e DPPG. Este tempo de vida mais longo foi atribuído à fração de porfirina ligada às vesículas e, a partir da sua contribuição fracionária no decaimento total de fluorescência, foi possível calcular a constante de associação K_b . O comportamento desta constante nas diferentes amostras investigadas mostrou que a atração eletrostática entre os grupos substituintes carregados positivamente da porfirina e a superfície externa negativamente carregada das vesículas é importante para a associação da porfirina. O papel das interações eletrostáticas para a associação das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP nos sistemas fosfolipídicos insaturados formados por POPC e POPG também foi demonstrado pelos estudos de absorção óptica e fluorescência estática. De uma forma geral, os resultados apresentados nesta tese estão em concordância com os estudos da literatura que relataram o acúmulo de porfirinas catiônicas no envelope bacteriano, especialmente na sua camada mais interna (membrana plasmática), onde uma alta quantidade de fosfolípidos aniônicos derivados de PG está presente.

A fluorescência resolvida no tempo também possibilitou monitorar com sucesso o efeito do sal cloreto de potássio na partição da porfirina entre o meio aquoso e as vesículas. Como foi demonstrado no presente trabalho, o sal compete com a porfirina catiônica pela associação aos grupos aniônicos dos fosfolípidos na superfície das vesículas, deslocando as porfirinas para o meio aquoso para concentrações crescentes de sal. Este resultado sugere que, em termos de aplicação em PDI, a presença do sal deve diminuir o acúmulo da porfirina catiônica na membrana externa bacteriana, a qual resultaria numa menor fotoinativação do microrganismo. Além disso, com base nestes dados, também foi possível descrever de uma forma mais completa os resultados de supressão de fluorescência. Por exemplo, o comportamento não linear das curvas de Stern-Volmer, obtidas através da técnica de fluorescência estática, foi atribuído ao efeito do deslocamento da fração de porfirina ligada nas vesículas para o meio aquoso devido o aumento da

concentração do supressor iodeto de potássio. Assim, para obter as constantes de supressão K_{SV} e k_q através de ajustes lineares, as medidas de supressão de fluorescência tiveram de ser realizadas numa condição de força iônica constante. A diminuição da supressão (redução dos valores de K_{SV} e k_q) nas amostras contendo uma maior fração molar do fosfolipídio aniônico foi atribuída ao fato do supressor iodeto ser acessível somente à fração de porfirina livre em tampão. Este resultado foi demonstrado pelos estudos de supressão de fluorescência utilizando a técnica de fluorescência resolvida no tempo no domínio das frequências. Assim, o fenômeno de supressão foi consideravelmente reduzido naquelas amostras com uma maior fração de porfirina ligada às vesículas.

Outra informação relevante deste estudo é em relação à localização da porfirina catiônica nas vesículas. Os resultados de potencial zeta demonstraram que as porfirinas TMPyP e ZnTMPyP estão localizadas preferencialmente na região da camada de Stern das vesículas. Este resultado poderia explicar as alterações estruturais no envelope celular das bactérias Gram-negativas provocadas pelas moléculas de oxigênio singleto, originadas pela foto-sensibilização. Esta alteração desempenha um papel fundamental na foto-inativação deste microrganismo, a qual deve estar associada com o fato da TMPyP se ligar mais superficialmente na membrana plasmática. A localização mais superficial das porfirinas foi aferida devido à neutralização parcial da superfície negativa das vesículas com o aumento da concentração de porfirina. A magnitude desta neutralização foi maior no caso da porfirina ZnTMPyP, a qual foi atribuída à presença das duas cargas adicionais do íon metálico Zn^{2+} . Com base nos dados de DLS sobre o tamanho das vesículas foi possível demonstrar algebricamente que o número de cargas positivas das porfirinas ligadas às vesículas é insuficiente para promover a completa neutralização da superfície das vesículas. Outras duas razões que também contribuiriam para a neutralização parcial das vesículas seria em razão de alguns grupos substituintes catiônicos da porfirina não interagirem eficientemente com o grupo das cabeças polares dos fosfolipídios aniônicos e também ao fato das porfirinas se ligarem a outras moléculas de fosfolipídio não-ionizadas através do deslocamento dos seus respectivos contra-íons. Como foi demonstrado neste estudo, o efeito de neutralização parcial das vesículas também depende do grau de ionização (parâmetro α); ou seja, quanto menor o valor de α menor é a magnitude deste efeito.

Os dados de potencial zeta e DLS também revelaram outros comportamentos interessantes das vesículas de fosfolípido, tanto na ausência quanto na presença da porfirina catiônica. Por exemplo, devido o baixo valor do potencial zeta das vesículas de DPPC no estado gel, as vesículas agregaram entre si formando estruturas com tamanhos bem variados. Outro fator que também contribuiu para a agregação (floculação) das vesículas foi à segregação dos fosfolípidos aniônicos na superfície das vesículas devido à associação da porfirina catiônica. Este efeito de segregação mostrou ser desfavorecido quando a vesícula de fosfolípido se encontra no estado líquido cristalino, possivelmente devido um aumento no grau de agitação dos fosfolípidos na superfície da vesícula.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) MORGAN, B.; DOLPHIN, D. Synthesis and structure of biomimetic porphyrins. **Structure and Bonding**, v. 64, p. 115-203, 1987.
- (2) HO, C.; EATON, W. A.; COLLMAN, J. P.; GIBSON, Q. H.; LEIGH, J. S.; MARGOLIASH, E.; MOFFAT, K.; SCHEIDT, W. R. **Hemoglobin and oxygen binding**. New York: Elsevier Biomedical, 1982. 486 p.
- (3) MATHEWS, F. S. The structure, function and evolution of cytochrome. **Progress in Biophysical and Molecular Biology**, v. 45, n.1, p. 1-56, 1985.
- (4) HATELI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 1015-1069, 1985.
- (5) FREW, J. E.; JONES, P. Structure and functional properties of peroxidases and catalases. In: SYKES A. G. (Ed.). **Advances in inorganic and bioinorganic mechanisms**. New York: Academic Press, 1984. v. 3, p.175-212.
- (6) MURRAY, R. I.; FISHER, M. T.; DEBRUNNER, P. G.; SLIGAR, S. G. Metal proteins with redox roles. In: HARRISON, P. M. (Ed.). **Metalloproteins**. London: Macmillan, 1985. v. 1, p. 157-206.
- (7) GRANICKT, S. Magnesium protoporphyrin as precursor of chlorophyll. **Journal of Biological Chemistry**, v. 175, p. 333-342, 1948.
- (8) MAUZERALL, D. **Photosynthesis I - Porphyrin, chlorophyll and photosynthesis**. In: ENCYCLOPEDIA of plant physiology. New York: Springer, 1977. p. 117-124.
- (9) DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- (10) BERG, K.; BOMMER, J. C.; WINKELMAN, J. W.; MOAN, J. Cellular uptake and relative efficiency in cell inactivation by photoactivated sulfonated meso-tetraphenylporphines. **Photochemistry and Photobiology**, v. 52, n. 4, p. 775-781, 1990.
- (11) HAMBRIGHT, P.; FAWWAZ, R.; VALK, P.; MCRAE, J.; BEARDEN, A. J. The distribution of various water soluble radioactive metalloporphyrins in tumor bearing mice. **Bioinorganic Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 87-92, 1975.
- (12) KESSEL, D.; THOMPSON, P.; SAATIO, K.; NANTWI, K. D. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 6, p. 787-790, 1987.

(13) PATRONAS, N. J.; COHEN, M.; KNOP, R. H.; DWYER, A. J.; COLCHER, D., LUNDY, J.; MORNEX, F.; HAMBRIGHT, P.; SOHN, M.; MYERS, C. E. Metalloporphyrin contrast agents for magnetic resonance imaging of human tumor in mice. **Cancer Treatment Reports**, v. 70, n. 3, p. 391-395, 1986.

(14) CHEN, C. W.; COHEN, J. S.; MYERS, C. E.; SOHN, M. Paramagnetic metalloporphyrins as potential contrast agents in NMR imaging. **FEBS Letters**, v. 168, n. 1, p. 70-74, 1984.

(15) BATTLE, A. M.; DEL, C. Porphyrin, porphyrias, cancer and photodynamic therapy - a model for carcinogenesis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 20, n. 1, p. 5-22, 1993.

(16) BONNETT, R. **Chemical aspects of photodynamic therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Science, 2000. 324 p.

(17) ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PENDEY, R. K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 340-362, 2011.

(18) KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. Phototherapy, radioimmunotherapy and imaging. In: KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. (Ed.). **Handbook of porphyrin science with applications to chemistry, physics, materials science, engineering, biology and medicine**. Singapore: World Scientific, 2010. v. 4, p. 495-530.

(19) DOUGHERTY, T. J.; BOYLE, D. G.; WEISHAUP, K. R.; HENDERSON, B. A.; POTTER, W. R.; BELINIER, D. A.; WITYK, K. E. Photoradiation therapy: clinical and drug advances. In: DOUGHERTY, T. J.; KESSEL, D. (Ed.). **Porphyrin photosensitization**. New York: Plenum, 1983. p. 294.

(20) KESSEL, D.; CHANG, C. K.; MUSSELMAN, B. Chemical and biophysical studies on hematoporphyrin derivative. In: KESSEL, D. (Ed.). **Methods in porphyrin photosensitization**. New York: Plenum, 1985. p. 352.

(21) BYRNE, J.; MARSHALLSAY, L. V.; WARD, D. The structure of the active material in hematoporphyrin derivative. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 5, p. 575-580, 1987.

(22) JESSEL, D.; CHENG, M. L. Biological and biophysical properties of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative. **Cancer Research**, v. 45, n. 7, p. 3053-3057, 1985.

(23) BERENBAUM, M. C.; BONNET, R.; SCOURIDES, P. A. In vivo biological activity of the components of hematoporphyrin derivative. **British Journal of Cancer**, v. 45, n. 4, p. 571-581, 1981.

(24) PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, p. 988-994, 2007.

(25) DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Effects of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.

(26) SMIJS, T.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 556-560, 2003.

(27) SMIJS, Threes. **The susceptibility of *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment**. 2008. 196 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Leiden, Leiden, 2008.

(28) LAMBRECHTS, S. A.; AALDERS, M. C.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.

(29) EICHNER, A.; GONZALES, F. P.; FELGENTRAGER, A.; REGENSBURGER, J.; HOLZMANN, T.; BRACHERT, W. S.; BAUMLER, W.; MAISCH, T. Dirty hands: Photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and candida within seconds. **Journal of Photochemistry and Photobiology Science**, v. 12, n.1, p. 135-147, 2013.

(30) NITZAN, H.; ASHKENAZI, H. Photoinactivation of *Acinetobacter Baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. **Current Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 408-414, 2001.

(31) NITZAN, Y., BALZAM-SUDAKEVITZ, A., ASHKENAZI, H. Eradication of *Acinetobacter Baumannii* by photosensitized agents in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 42, n. 3, p. 211-218, 1998.

(32) KOMAGOE, K., KATO, H., INOUE, T., KATSU, T. Continuous real-time monitoring of cationic porphyrin-induced photodynamic inactivation of bacterial membrane functions using electrochemical sensors. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 10, n. 7, p. 1181-1188, 2011.

(33) ALVES, E.; COSTA, L.; CARVALHO, C. M. B.; TOMÉ, J. P. C.; FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Charge effect on the photoinactivation of gram-negative and gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 70-76, 2009.

(34) LAZZERI, D.; ROVERA, M.; PASCUAL, L.; DURANTINI, E. N. Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrins derivatives with asymmetric charge distribution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 2, p. 286-293, 2004.

(35) ENGELMANN, F. M.; MAYER, I.; GABRIELLI, D. S.; TOMA, H. E.; KOWALTOWSKI, A. J.; ARAKI, K.; BAPTISTA, M. S. Interaction of cationic mesoporphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. **Journal of Bioenergy and Biomembranes**, v. 39, n. 2, p. 175-185, 2007.

(36) SILVA, J. N.; BOSCA, F.; TOMÉ, J. P. C.; SILVA, E. M. P.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; PATTERSON, L. K.; FILIPE, P.; MAZIÈRE, J. C.; SANTUS, R.; MORLIÈRE, P. Tricationic porphyrin conjugates: evidence for chain-structure-dependent relaxation of excited singlet and triplet states. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 52, p. 16695-16704, 2009.

(37) CHAUHAN, S. M. S.; KUMAR, A.; SRINIVAS, K. A.; MISHRA, M. K. Effect of side chain length on the aggregation of amphiphilic 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-[4-(alkoxy)phenyl]21H,23H porphyrin tritosylates. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, n. 6, p. 429-438, 2003.

(38) SANTIAGO, P.S.; SOUSA NETO, D.; GANDINI, S.C.M.; TABAK, M. On the localization of water-soluble porphyrins in micellar systems evaluated by static and time-resolved frequency-domain fluorescence techniques. **Colloids and Surfaces B: Biointerface**, v. 65, n. 2, p. 247-256, 2008.

(39) JENSEN, T. J.; VICENTE, M. G. H.; LUGUYA, R.; NORTON, J.; FRONCZEK, F. R.; SMITH, K. M. Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 100, n. 2, p. 100-111, 2010.

(40) HADGRAFT, J. **Transdermal drug delivery systems**. Boca Raton: CRC, 2002. 329 p.

(41) GROSS, E.; EHRENBERG, B. The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. **Biochimica Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 983, n. 1, p. 118-122, 1989.

(42) BRAULT, D.; VEVER-BIZET, C.; LE DOAN, T. Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models - evidence for pH effects. **Biochimica Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 857, n. 2, p. 238-250, 1986.

(43) RICCHELLI, F.; JORI, G.; MORENO, G.; VINZENS, F.; SALET, C. Factors influencing the distribution pattern of porphyrins in cell membranes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 6, n. 1, p. 69-77, 1990.

(44) COUTINHO, P. J. G.; COSTA, S. M. B. The formation of radical ions of ZnTPP in lecithin vesicles evaluated by a global kinetic treatment. **Chemical Physics**, v. 182, n. 2, p. 399-408, 1994.

(45) BONNEAU, S.; MAMAN, N.; BRAULT, D. Dynamics of pH-dependent self-association and membrane binding of a dicarboxylic porphyrin: a study with small

unilamellar vesicles. **Biochimica Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1661, n. 1, p. 87-96, 2004.

(46) RICCHELLI, F.; JORI, G.; GOBBO, S.; TRONCHIN, M. Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. **Biochimica Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1065, n. 1, p. 42-48, 1991.

(47) RICCHELLI, F.; GOBBO, S. Porphyrins as fluorescent probes for monitoring phase transitions of lipid domains in biological membranes. Factors influencing the microenvironment of haematoporphyrin and protoporphyrin in liposomes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 29, n. 1, p. 65-70, 1995.

(48) AHARON, D.; WEITMAN, H.; EHRENBERG, B. The effect of liposomes' surface electric potential on the uptake of hematoporphyrin. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 8, p. 2031-2035, 2011.

(49) SMITH, K. M. **Porphyrins and metalloporphyrins**. Amsterdam: Elsevier, 1975. 934 p.

(50) GOURTERMAN, M. **The porphyrins**. New York: Academic Press, 1978. 571 p.

(51) LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Maryland: Springer, 2006. 954 p.

(52) GANDINI, S. C. M.; GELAMO, E. L.; ITRI, R.; TABAK, M. Small-angle X-ray scattering study of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin in aqueous solution: A self-aggregation model. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 2, p. 1259-1268, 2003.

(53) FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659-661, 1991.

(54) RAGÀS, X.; AGUT, M.; NONELL, S. Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 5, p. 770-776, 2010.

(55) MERCHAT, M.; BERTOLINI, G.; GIACOMINI, P.; VILLANUEVA, A.; JORI, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 153-157, 1996.

(56) MERCHAT, M.; SPIKES, J. D.; BERTOLINI, G.; JORI, G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 35, n. 3, p. 149-157, 1996.

- (57) HAMBLIN, M. R.; JORI, G. **Photodynamic inactivation of microbial pathogens. Medical and environmental applications.** Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011. 425 p.
- (58) HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Science**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.
- (59) GENNIS, R. R. **Biomembranes: Molecular structure and functions.** New York: Springer, 1988. 533 p.
- (60) ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WLATER, P. **Molecular biology of the cell.** New York: Garland Science, 2002. 1392 p.
- (61) BERG, J.M., TYMOCKO, J.L., STRYER, L. **Biochemistry.** New York: W.H. Freeman, 2007. 1050 p.
- (62) NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry.** New York: W.H. Freeman, 2008. 1100 p.
- (63) BRASS, J. M. The cell envelope of gram-negative bacteria: New aspects of its function in transport and chemotaxis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 129, p. 1-92, 1986.
- (64) EPAND, R. M. **Lipid polymorphism and membrane properties.** San Diego: Academic Press, 1997. 568 p.
- (65) SPERELAKIS, N. **Cell physiology sourcebook: a molecular approach.** San Diego: Academic Press, 2001. 1235 p.
- (66) PETTY, H. R. **Molecular biology of membranes: structure and function.** New York: Academic Press, 1993. 348 p.
- (67) YEAGLE, P. L. **The membrane of cell.** San Diego: Academic Press, 1993. 349 p.
- (68) HAWKER, L. E.; LINTON, A. H. **Micro-organisms: function, form, and environment.** London: Edward Arnold, 1985. 529 p.
- (69) MAISCH, T.; SZEIMIES, R. M.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 3, n. 10, p. 907–917, 2004.
- (70) JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 3, n. 5, p. 403-405, 2004.

- (71) MINNICK, A.; VERNON, D. I.; SCHOFIELD, J.; GRIFFITHS, J.; PARISH, J. H.; BROWN, S. B. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 522–527, 2000.
- (72) ROGERS, H. J.; PERKINS, H. R.; WARD, J. B. **Microbial cell walls and membranes**. London: Chapman and Hall, 1980. 564 p.
- (73) GOLDFINE, H. Bacterial membrane and lipid packing theory. **Journal of Lipid Research**, v 25, n. 13, p. 1501-1507, 1984.
- (74) CONSTANTIDES, P. P.; INOUCHI, N.; TRITTON, T. R.; SARTORELLI, A. C.; STURTEVANT, J. M. A scanning calorimetric study of the interaction of anthracyclines with neutral and acid phospholipids alone and in binary mixtures. **Journal of Chemical Biology**, v. 261, n. 22, p. 10196-10203, 1986.
- (75) MARSH, D.; CEVC, G. **Phospholipid bilayers: physical principles and models**. New York: John Wiley, 1987. 442 p.
- (76) NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. New York: Oxford University, 1990, 320 p.
- (77) GENNIS, R. R. **Biomembranes: molecular structure and functions**. New York: Springer, 1988. 533 p.
- (78) CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. London: Benjamin-Cummings, 1984. 404 p.
- (79) SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 838 p.
- (80) CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry: the behavior of biological macromolecules**. Oxford: W. H. Freeman, 1980. 597 p.
- (81) KALYANASUNDARAM, K.; NEUMANN-SPALLART, M. Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous media. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 26, p. 5163-5169, 1982.
- (82) SOUSA NETO, D.; TABAK, M. Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 381, p. 73-82, 2012.
- (83) SOUSA NETO, D.; HAWE, A.; TABAK, M. Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridil) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. **European Biophysical Journal**, v. 42, p. 267-279, 2013.

(84) SANTIAGO, P. S.; GANDINI, S. C. M.; MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Interaction of cationic water-soluble *meso*-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin (TMPyP) with ionic and nonionic micelles: aggregation and binding. **Journal of Porphyrins Phthalocyanines**, v. 12, n. 8, p. 942-952, 2008.

(85) GONÇALVES, P. J.; FRANZEN, P.L.; CORREA, D. S.; ALMEIDA, L. M.; TAKARA, M.; ITO, A. S.; ZÍLIO, S. C.; BORISSEVITCH, I. E. Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP). **Spectrochim. Acta Part A**, v. 79, n. 5, p. 1532-1539, 2011.

(86) MOZURAITYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRO, I. Oxidation of cod phospholipids in liposomes: effect of salts, pH and zeta potential. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 11, p. 944-950, 2006.

(87) MAKINO, K.; YAMADA, T.; KIMURA, M.; OKA, T.; OHSHIMA, H.; KONDO, T. Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. **Biophysical Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 175-183, 1991.

(88) LARGER, M.; HUI, S.W. Iodide penetration into lipid bilayer as a probe of membrane lipid organization. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 60, n. 2, p. 127-132, 1991.

(89) PARK, Y.; HUANG, R.; CORTI, D.S.; FRANCES, E.I. Colloidal dispersion stability of unilamellar DPPC vesicles in aqueous electrolyte solutions and comparisons to predictions of the dlvo theory. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 342, n. 2, p. 300-310, 2010.

(90) CLARKE, R.J.; LUEPFERT, C. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect. **Biophys. Journal**, v 76, n. 5, p. 2614-2624, 1999.

(91) WATTS, A.; MARSH, D.; KNOWLES, P. F. Characterization of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles and their dimensional change through the phase transition: molecular control of membrane morphology. **Biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 1792-1801, 1978.

(92) REBOIRAS, M. D.; JONES, M. N. The electrophoretic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine-phosphatidylinositol vesicles in the presence of lanthanum ions. **Colloids and Surfaces**, v. 15, p. 239-247, 1985.

(93) JONES, M. N.; HAMMOND, K.; REBOIRAS, M. D.; ACERETE, C.; JACKSON, S. M.; NOGUEIRA, M.; NICHOLAS, A. R. The interaction of lanthanum ions with dipalmitoylphosphatidylcholine-phosphatidylinositol vesicles. **Colloids and Surfaces**, v. 18, n. 1, p. 75-91, 1986.

(94) MARSH, D. **Handbook on lipid bilayers**. Boca Raton: CRC, 1990. 386 p.

(95) TOGASHI, D. M.; COSTA, S. M. B. Excited state quenching kinetics of zinc meso-tetrakis (N-methylpyridinium-4-yl) porphyrin by methyl viologen in AOT reverse micelles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, p. 1141-1150, 2002.

8 PERSPECTIVAS

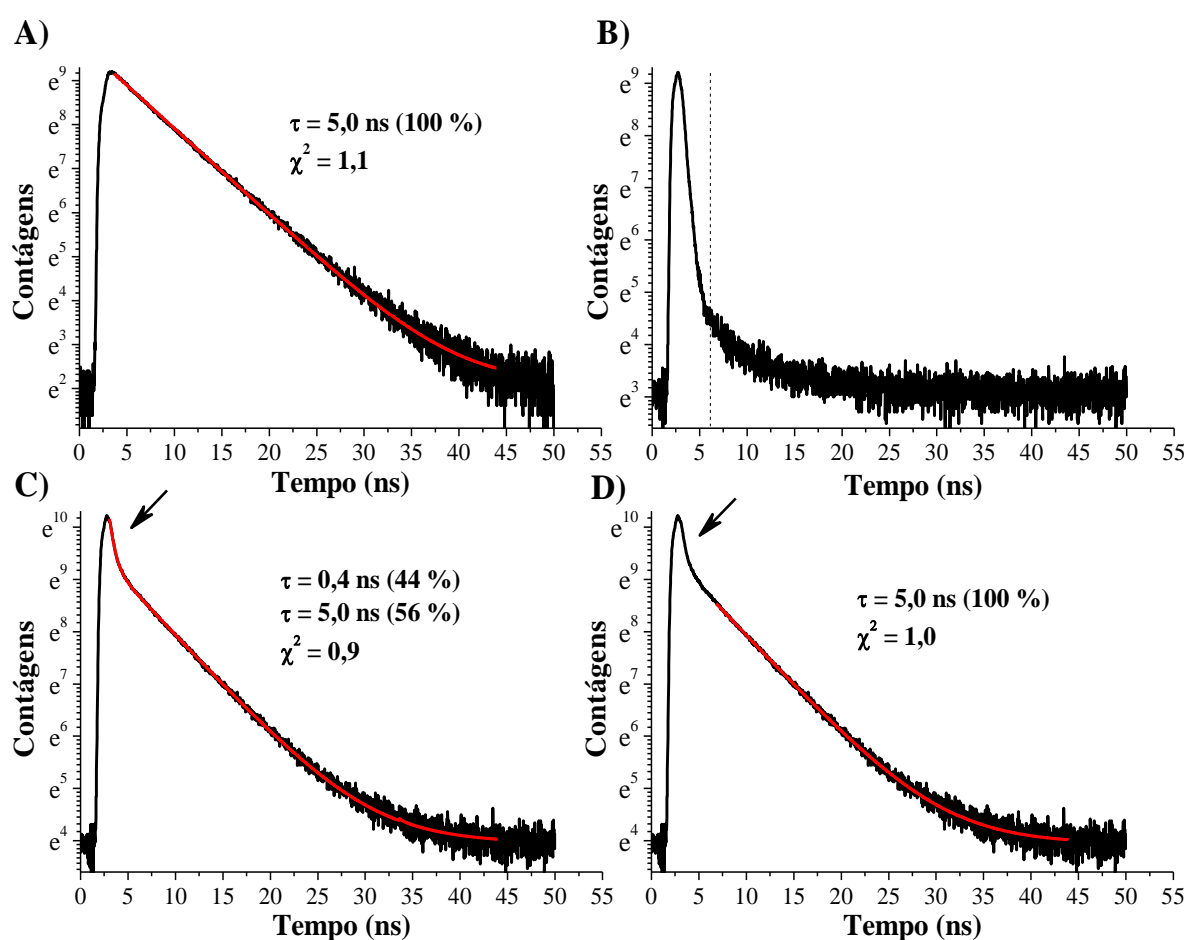
As propriedades espectroscópicas e físico-químicas da porfirina TMPyP em meio aquoso e na presença de sistemas fosfolipídicos e micelares foram extensivamente investigadas nos últimos anos pelo Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Estes estudos servirão de base para futuras investigações com modelos miméticos que reproduzem mais fielmente a constituição fosfolipídica das membranas (interna e externa) do envelope bacteriano. Tais investigações serão realizadas em colaboração com o Prof. MSc. Diógenes de Sousa Neto, da Fundação de Medicina Tropical da Universidade Federal do Tocantins, em Araguaína – TO. Dentre as técnicas empregadas neste estudo destacam-se: absorção óptica, fluorescência, DLS, potencial zeta e ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês “*electron paramagnetic resonance*”). Esta última técnica permitirá avaliar possíveis mudanças de fluidez da bicamada lipídica devido à associação da porfirina. Inicialmente, este estudo será realizado com vesículas unilamelares de fosfolipídio formadas por 75 mol% de POPE, 20 mol% de POPG e 5 mol% de POPC. Esta composição fosfolipídica é similar àquela encontrada na membrana mais interna do envelope bacteriano (bactérias Gram-negativas). Este sistema fosfolipídico também será preparado na presença de um fosfolipídio fluorescente derivado da fosfatidiletanolamina (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-1-pyrenesulfonyl). Através do fenômeno de supressão de fluorescência, esta sonda fluorescente permitirá monitorar a formação de radicais livres devido à foto-ativação das moléculas de porfirina ligadas nas vesículas. A foto-ativação da porfirina será realizada com o equipamento PhotoLaser III, o qual é equipado com um laser de comprimento de onda de excitação igual a 650 nm. Possíveis mudanças nas características físico-químicas das vesículas (tais como tamanho, potencial de superfície, fluidez da bicamada lipídica, etc.) também serão avaliadas para diferentes tempos de exposição do sistema porfirina-vesícula à radiação. Um estudo similar também será realizado com vesículas de composição fosfolipídica similar àquela presente na camada mais externa da bactéria.

APÊNDICES

Apêndice A – Distorção do decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP devido ao espalhamento de luz pelas LUVs

A análise do decaimento de fluorescência de um dado fluoróforo na presença de sistemas que espalham o feixe de excitação, como vesículas de fosfolipídios e micelas de surfactante, por exemplo, exige uma atenção especial. À princípio, o tempo de vida atribuído aos fótons do espalhamento deveria ser igual à zero, uma vez que os mesmos não são absorvidos pela amostra. Contudo, devido à resposta do instrumento, os fótons espalhados pelas vesículas de fosfolipídio apresentam um tempo de vida cujo valor é geralmente da ordem de magnitude da largura de linha da função resposta do instrumento, IRF. Assim, dependendo do número de fótons espalhados, o histograma do decaimento de fluorescência pode ser distorcido por conta deste fenômeno. Esta distorção é geralmente observada na faixa de canal associado à aquisição dos tempos curtos. Este fenômeno pode ser facilmente observado na figura 22. A figura 22A representa o decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP em tampão puro. Esta curva foi analisada através de um modelo de ajuste mono-exponencial (linha vermelha), desde valores de tempo muito curtos no decaimento. O valor do tempo de vida da porfirina bem como a qualidade do ajuste, representada pelo valor do parâmetro estatístico, χ^2 , também estão apresentados na figura. A figura 22B corresponde ao decaimento das vesículas puras, na ausência de porfirina. Somando o decaimento de fluorescência somente das vesículas de fosfolipídio em solução aquosa (figura 22B) ao decaimento da porfirina (figura 22A), obtém-se a curva representada pela figura 22C. Como indicado pela seta, esta soma é acompanhada pelo surgimento de um tempo de vida aparentemente mais curto no decaimento da porfirina. De fato, o ajuste da figura 22C, com um modelo bi-exponencial, fornece dois valores de tempo de vida para a porfirina em tampão: um tempo mais curto de 0,4 ns e outro mais longo de 5,0 ns. Logo, é possível concluir que o tempo de 0,4 ns, que contribui com cerca de 44% do total da curva de decaimento, está associado com os fótons espalhados exclusivamente pelas vesículas de fosfolipídio e não está associado ao decaimento da porfirina. Vale ainda a pena mencionar que a largura de linha do IRF é de aproximadamente 0,6 ns, ou seja, da mesma ordem de magnitude que o tempo de vida mais curto (0,4 ns).

Figura 22 – A) Decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP em tampão puro. A curva experimental foi ajustada com um modelo mono-exponencial (linha vermelha), a partir de valores de tempos bastante curtos. O decaimento B), atribuído a amostra formada somente por vesículas de fosfolípido em solução aquosa, foi somado ao decaimento da porfirina livre em tampão (curvas C e D). Em C), o decaimento foi ajustado com um modelo bi-exponencial, ao passo que em D), um modelo mono-exponencial foi utilizado. No caso da figura D), o ajuste foi realizado a partir de tempos mais longos que em relação aos ajustes das figuras A) e C). Os valores de tempo de vida, das contribuições fracionárias (em percentagem) e das qualidades dos ajustes também estão apresentados.



Observe que os ajustes das figuras 22A e 22C foram realizados a partir de um valor de tempo de decaimento bastante curto. No caso da figura 22C, por exemplo, o ajuste inclusive foi realizado sobre todos os tempos de decaimento associado aos fótons espalhados pelas vesículas de fosfolípido (ver seta). Uma vez que a contribuição do espalhamento no decaimento de fluorescência é variável nos estudos de associação, por exemplo, onde um aumento da concentração de

vesículas é realizado ao longo do experimento, os valores das contribuições fracionárias dos tempos de vida reais da porfirina são afetados por este fenômeno. Uma forma de contornar este problema é iniciar os ajustes a partir de um certo valor de tempo de decaimento no qual a contribuição dos fótons advindos do espalhamento é muito pequena. No presente estudo, todas as medidas de decaimento foram realizadas até alcançar uma contagem máxima de 10.000 fótons. Considerando que todos os fótons de excitação são espalhados, ao invés de serem absorvidos, um decaimento típico daquele apresentado na figura 22B seria registrado. Baseado nesta figura, o tempo de decaimento utilizado como ponto de partida dos ajustes é aquele cujo valor de intensidade corresponde à 1 % do valor máximo de decaimento (100 fótons). No caso da figura 22B, este tempo de decaimento corresponde à um valor de 5,7 ns (ver linha tracejada). A figura 22D mostra o ajuste realizado a partir deste valor de tempo de decaimento. Como pode ser observado, o valor do tempo de vida é praticamente o mesmo que aquele estimado na figura 22A.

É importante mencionar que a forma dos decaimentos associados aos fótons espalhados pelas vesículas de fosfolipídio (ver figura 22B) é semelhante para todos os tipos de vesículas de fosfolipídio investigados no presente estudo, quando os mesmos são obtidos para um mesmo valor de contagem (10.000 fótons, por exemplo). No caso das vesículas formadas pelos fosfolipídios saturados, este comportamento é também observado quando as vesículas estão no estado gel (25 °C) e líquido cristalino (50 °C). Contudo, o tempo necessário para alcançar este valor de contagem (10.000 fótons) difere drasticamente entre estes sistemas fosfolipídicos bem como pelo seu estado físico (gel ou líquido cristalino). Assim, dependendo das características da amostra (baixo ou alto valor de rendimento quântico, por exemplo), a contribuição do espalhamento (ver setas na figura 22) pode ser maior ou menor no decaimento de fluorescência.

Apêndice B – Número de agregação das LUVs

O número de agregação, n , das LUVs nos dois sistemas fosfolipídicos (saturado e insaturado) foi calculado através da equação:

$$n = 4\pi \frac{\{(R_h - d_w)^2 + [(R_h - d_w) - d_l]^2\}}{S} \quad (56)$$

onde R_h é o raio hidrodinâmico, d_l a espessura da bicamada lipídica, d_w a espessura da camada de hidratação e S a área ocupada por cada grupo da cabeça polar do fosfolípido. O valor de R_h foi obtido dos estudos de DLS, enquanto que os valores de d_l , d_w e S foram àqueles obtidos dos dados de difração de raios X descritos na literatura. (94) Para as LUVs formadas pelos fosfolípidos saturados no estado gel cristalino (25 °C), os valores de d_l , d_w e S são 4,75 nm, 1,70 nm e 0,48 nm², respectivamente. Para as LUVs no estado líquido cristalino (50 °C), estes valores são 3,50 nm, 2,50 nm e 0,68 nm², respectivamente. Em relação às LUVs formadas pelos fosfolípidos insaturados, os valores de d_l , d_w e S são 3,2 nm, 3,2 nm e 0,82 nm². A Eq. (56) assume que as LUVs possuem uma simetria esférica, o qual está em concordância com um estudo prévio de microscopia eletrônica. (91) Além disso, a estimativa do erro deste parâmetro foi em torno de 10% quando comparado aos valores de n calculados dos experimentos de ultracentrifugação. (91) Este parâmetro é muito útil para estimar o número máximo de moléculas de porfirina por LUVs (parâmetro C), obtido através da equação abaixo:

$$C = n \frac{c_p}{c_L} \quad (56)$$

onde c_p é a maior concentração molar de porfirina (6×10^{-5} mol/L) e c_L é a concentração molar de fosfolípido (2×10^{-3} mol/L para todas as amostras). Esta equação assume que 100% das moléculas de porfirina estão ligadas nas LUVs. Uma vez que cada porfirina contribui com quatro cargas positivas, o lado direito da Eq. (56) pode ser multiplicado por 4 (quatro) a fim de estimar o número máximo de cargas positivas disponíveis para interagir com a superfície das LUVs.

Outro parâmetro de interesse, o número nominal de moléculas de DPPG na superfície da vesículas, N_m , foi calculado como

$$N_m = 4\pi \frac{(R_h - d_w)^2}{S} \chi \quad (58)$$

onde χ é a razão molar de DPPG nas vesículas. Assim, para as LUVs formadas pela mistura de DPPC:DPPG, com 30 mol% de DPPG, por exemplo, o valor de χ é 0,3.

Apêndice C – Densidade de cargas na superfície das LUVs

Os valores da densidade de cargas na superfície das LUVs, σ , foram calculados para as LUVs no estado gel (25 °C) e líquido cristalino (50 °C) usando a equação abaixo:

$$\sigma = \sqrt{8n^{\circ} \varepsilon_0 \varepsilon_r kT} \sinh\left(\frac{ze\zeta}{2kT}\right) \quad (59)$$

onde n° é a concentração de eletrólitos (ions/m³), ε_0 a permissividade do espaço livre (8,584x10⁻¹² C²/J.m) e ε_r a constante dielétrica do meio (adimensional). k é a constante de Boltzmann (1,38x10⁻²³ m²Kg/s²K), T a temperatura (expressa em K) e e a carga elementar (1,602x10⁻¹⁹ C). (92,93) Os valores do potencial zeta, ζ , foram obtidos diretamente das medidas correspondentes. No presente estudo, 20 mM de Na₂HPO₄ foi utilizado como tampão. Como este sal está praticamente dissociado em Na⁺ e HPO₄²⁻ no pH 7,0, a valência z dos íons é portanto igual à 2. Baseando-se na concentração salina e na estequiometria (Na₂HPO₄ \leftrightarrow 2Na⁺ + HPO₄²⁻), o valor de n° foi calculado como sendo igual à 60 ions/m³. Uma vez que o íon Na⁺ é também contra-íon das moléculas de DPPG (e POPG), sua concentração na solução aquosa deve também ser levada em consideração no cálculo do valor total de n° . O parâmetro ε_r foi escolhido como sendo da água pura ($\varepsilon_r = 80$). (92,93) Ambos valores de μ_e e ξ foram obtidos para vesículas de fosfolipídicos (DPPC puro, misturas de DPPC:DPPG e DPPG puro) na ausência de porfirina em ambos valores de temperatura. Estes parâmetros estão correlacionados através da equação:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \xi \quad (60)$$

onde η é a viscosidade do meio (expressa em Kg.s/m²). À 25 e 50 °C, os valores de η foram 8,9x10⁻³ Kg.s/m² e 6,8x10⁻³ Kg.s/m², respectivamente. Baseado na Eq (60), é possível notar que o valor de ε_r pode ser calculado pelo coeficiente angular do gráfico de μ_e versus ξ . Através de ajustes lineares, o valor encontrado de ε_r foi de aproximadamente 76 em ambos os valores de temperatura. Este valor é muito próximo daquele para a água pura. (92,93)

Apêndice D – Grau de ionização das LUVs

Os valores do grau de ionização, α , foram calculados à 25 e 50 °C de acordo com a equação abaixo:

$$\alpha = \frac{\sigma S}{\chi^e} \quad (61)$$

onde todos os parâmetros do lado direito da Eq. (61) foram definidos previamente nos Apêndices B e C. (92,93) No presente estudo, o valor de χ variou de 0,3 à 1,0. Baseando-se nos valores de α , o número de moléculas ionizadas de DPPG na superfície das LUVs, N_c , foi estimada através da equação:

$$\alpha = \frac{N_c}{N_m} \quad (62)$$

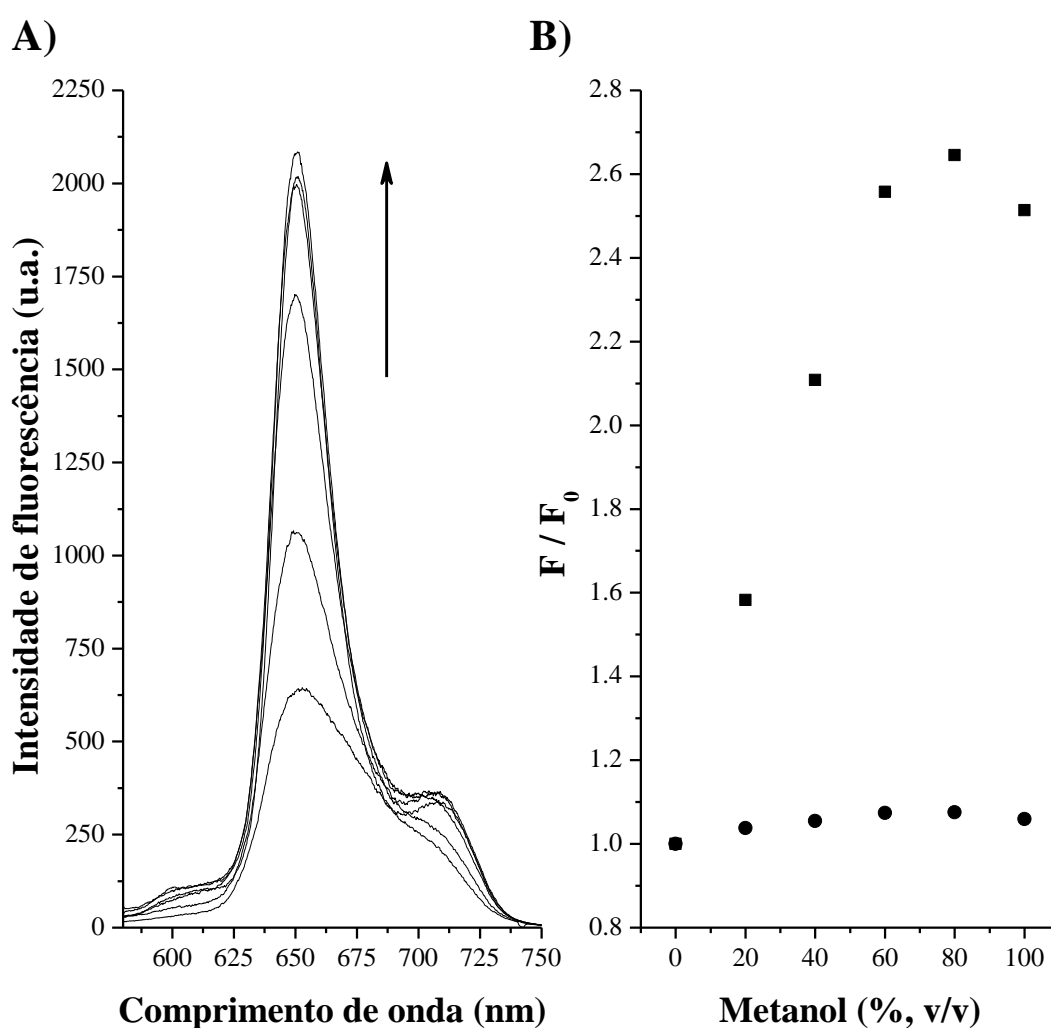
onde o valor de N_m é calculado pela Eq. 58, descrita no Apêndice B.

Apêndice E – Espectros de emissão de fluorescência das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP em função da polaridade do meio

A Figura 23A mostra os espectros de emissão da TMPyP em tampão puro e em função da concentração de metanol. Como pode ser observado, a intensidade de emissão de fluorescência da TMPyP aumenta em função da concentração de metanol. Este comportamento está possivelmente associado com o fato do macrociclo da porfirina ser sensível à polaridade do meio. Vale a pena mencionar que o macrociclo da porfirina apresenta dois grupos NH capazes de realizar ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Assim, a substituição de destas moléculas por metanol deve ser acompanhada por uma diminuição do efeito de solvatação dos grupos NH (redução das interações de hidrogênio). Como as interações de hidrogênio das moléculas de água com a porfirina contribuem com os processos de relaxação não-radioativo, o tempo de permanência da TMPyP no estado singleto excitado deve ser aumentado continuamente em função da concentração de metanol. Esta afirmação está em concordância com um estudo prévio de fluorescência descrito na literatura, o qual mostrou um aumento do tempo de vida de fluorescência da TMPyP em meios com uma menor constante dielétrica, ϵ , quando comparado a da água. (83) O valor de ϵ é igual à 80,4 e 33,1 para a água e metanol, respectivamente. Como o rendimento quântico da porfirina é diretamente

proporcional ao seu tempo de vida, um maior fluxo de fótons será emitido pela TMPyP em função da concentração de metanol (ver Figura 23A).

Figura 23 – A) Espectros de emissão da TMPyP em tampão puro e na presença de concentrações crescentes de metanol. Como o valor da constante dielétrica do metanol é menor que da água, tem-se que a polaridade do solvente diminui com o aumento da quantidade de metanol em solução. B) Razão das intensidades dos espectros de emissão das porfirinas TMPyP (quadrados sólidos) e ZnTMPyP (círculos sólidos) nas diferentes concentrações de metanol, F , em relação ao espectro da porfirina em tampão puro, F_0 .



Este efeito pode ser melhor visualizado com base Figura 23B, onde a razão das intensidades dos espectros de emissão da TMPyP (quadrados sólidos) nas diferentes concentrações de metanol, F , em relação ao espectro da porfirina em tampão puro, F_0 , está apresentado. Por outro lado, no caso da ZnTMPyP (ver círculos sólidos na Figura 23B), esta razão permaneceu praticamente inalterada

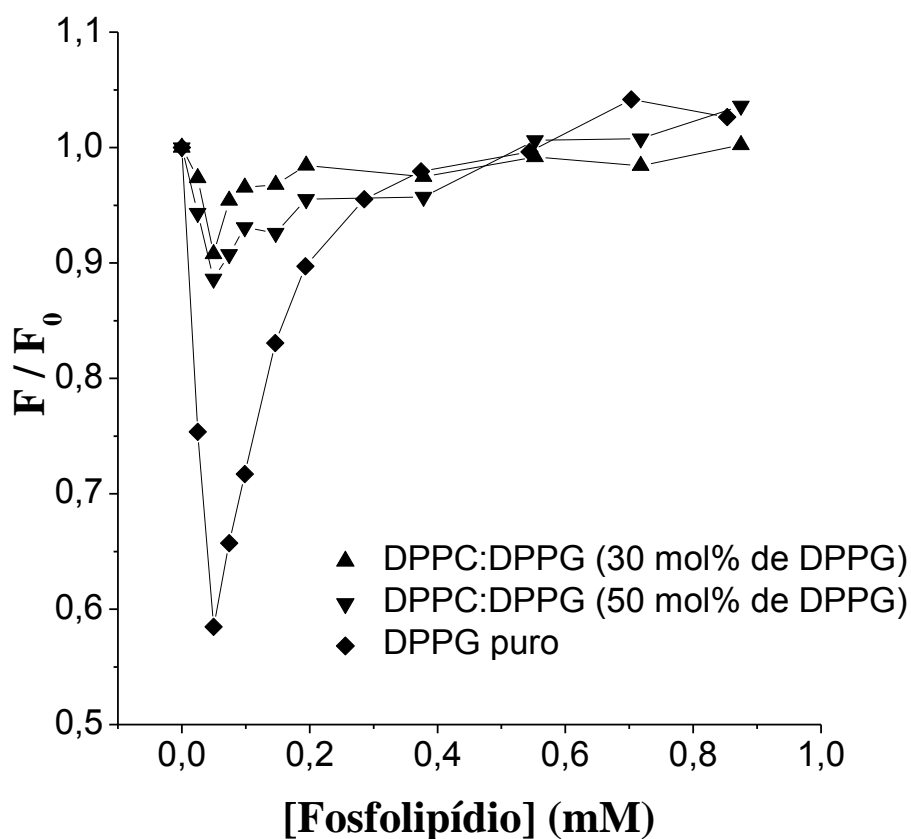
dentro de toda a faixa de concentração de metanol. Este resultado indica que o macrociclo da ZnTMPyP é menos sensível às interações com as moléculas do solvente. Este resultado acima está em concordância com os estudos de fluorescência resolvida no tempo, discutidos neste trabalho para a TMPyP e a ZnTMPyP, em função da concentração de fosfolipídio (ver seção 5.2.1). Como a porfirina TMPyP é mais sensível à polaridade do meio na sua circunvizinhança, dois valores de tempo de vida de fluorescência foram obtidos para a porfirina distribuída entre o meio aquoso ($\tau_1 = 5,0$ ns) e associada às vesículas de fosfolipídio ($\tau_2 = 10,2$ ns). Por outro lado, apenas um único valor de tempo de vida de fluorescência ($\tau_1 = 1,3$ ns) foi obtido para a ZnTMPyP nas duas regiões (meio aquoso e vesículas).

Apêndice F – Espectro de emissão de fluorescência da ZnTMPyP em função da concentração de fosfolipídio

A Figura 24 mostra a razão das intensidades dos espectros de emissão da porfirina TMPyP nas diferentes concentrações de fosfolipídio, F , em relação ao espectro da porfirina em tampão puro, F_0 . Como indicado na figura, um comportamento bastante singular é observado para a ZnTMPyP, onde uma contínua diminuição da emissão da porfirina ocorre com a titulação de fosfolipídio dentro da faixa de concentração entre 0 e 50 μM . Como foi discutido anteriormente, nesta faixa de concentração de fosfolipídio a concentração de vesículas em meio aquoso deve ser muito menor quando comparado à concentração de porfirina (10 μM). Assim, esta diminuição pode ser atribuída à uma alta concentração microscópica de porfirina na superfície das vesículas. Como pode ser observado na Figura 24, a diminuição da emissão é maior naqueles sistemas fosfolipídicos pelos quais a ZnTMPyP apresenta maior afinidade de associação. A diminuição da emissão pode ser interpretada como sendo devido ao surgimento de processos não-radioativos originados, possivelmente, da interação entre as moléculas de ZnTMPyP presentes nas vesículas de fosfolipídio. Esta interação deve influenciar o tempo de permanência da porfirina no estado excitado singlete. Infelizmente este tipo de análise é bastante difícil visto que o tempo de vida de fluorescência da ZnTMPyP já é relativamente curto ($\tau_1 = 1,3$ ns). Como o espalhamento de luz pelas vesículas de fosfolipídio produz um tempo de vida expúrio em torno de 0,4 ns no decaimento de

fluorescência, a obtenção de tempos de vida de fluorescência menores que 1,0 ns torna-se difícil por conta deste fenômeno. Desta forma, as medidas de tempos de vida da ZnTMPyP na presença das vesículas de fosfolipídio foram realizadas para uma concentração saturada de fosfolipídio (ver Figura 15).

Figura 24 – Razão das intensidades dos espectros de emissão da porfirina ZnTMPyP nas diferentes concentrações de fosfolipídio, F , em relação ao espectro da porfirina em tampão puro, F_0 . A concentração final de porfirina foi de 10 μM e a faixa de concentração de fosfolipídio utilizada neste estudo foi de 0-1 mM.




Como pode ser observado na Figura 24, para concentrações maiores que 50 μM de fosfolipídio, um aumento da intensidade de fluorescência é observado. Como discutido anteriormente, este comportamento está possivelmente associado ao desfavorecimento das interações entre as porfirinas uma vez que, nestas condições, a concentração de porfirina deve ser muito menor que de vesículas em solução. Além disso, é interessante observar que a intensidade da emissão da porfirina livre em tampão puro é próxima daquela observada para a porfirina presente numa

concentração saturada de fosfolípido Este efeito é observado tanto nas misturas de POPC:POPG quanto nas vesículas de POPG puro. Este resultado está em concordância com os resultados de fluorescência resolvida no tempo, os quais demonstraram a existência de um único tempo de vida ($\tau_1 = 1,3$ ns) para a ZnTMPyP na presença de uma concentração saturada de fosfolípido. Como o fluxo de fótons emitidos pela ZnTMPyP é aproximadamente o mesmo nos diferentes sistemas fosfolipídicos estudados, um espectro de emissão com valores próximos de intensidade também é observado.

Apêndice G – Publicações relacionadas com a tese

Artigo 1


Journal of Colloid and Interface Science 381 (2012) 73–82



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

www.elsevier.com/locate/jcis



Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles

Diógenes de Sousa Neto^{a,b,*}, Marcel Tabak^a

^aLaboratório de Biologia Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 780, CEP 13560-970 São Carlos, SP, Brazil
^bInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 400, CEP 14801-001 Montes Claros, MG, Brazil

<p>ARTICLE INFO</p> <p><i>Article history:</i> Received 1 March 2012 Accepted 18 May 2012 Available online 31 May 2012</p> <p><i>Keywords:</i> Phospholipid vesicles Cationic porphyrin binding Fluorescence Zeta potential Dynamic light scattering</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>The interaction of the cationic meso-tetrakis 4-N-methylpyridyl porphyrin (TMPyP) with large unilamellar vesicles (LUVs) was investigated in the present study. LUVs were formed by mixtures of the zwitterionic 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylcholine (DPPC) and anionic 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) phospholipids, at different DPPG molar percentages. All investigations were carried out above (50 °C) and below (25 °C) the main phase transition temperature of the LUVs (~41 °C). The binding constant values, K_b, estimated from the time-resolved fluorescence study, showed a significant increase of the porphyrin affinity at higher mol% DPPG. This affinity is markedly increased when the LUVs are in the liquid crystalline state. For both situations, the increase of the K_b value was also followed by a higher porphyrin fraction bound to the LUVs. The displacement of the vesicle-bound porphyrins toward the aqueous medium, upon titration with the salt potassium chloride (KCl), was also studied. Altogether, our steady-state and frequency-domain fluorescence quenching data results indicate that the TMPyP is preferentially located at the LUVs Stern layer. This is supported by the zeta potential studies, where a partial neutralization of the LUVs surface charge, upon porphyrin titration, was observed. Dynamic light scattering (DLS) results showed that, for some phospholipid systems, this partial neutralization leads to the LUVs flocculation.</p> <p style="text-align: right;">© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.</p>
---	---

Interaction of meso-tetrakis (4-*N*-methylpyridyl) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles

Diógenes de Sousa Neto · Andrea Hawe · Marcel Tabak

Received: 8 September 2012 / Revised: 10 November 2012 / Accepted: 16 November 2012
© European Biophysical Societies' Association 2012

Abstract Our aim was to investigate the interaction of the cationic meso-tetrakis (4-*N*-methylpyridyl) porphyrin, a photosensitizer used for photodynamic therapy, in its free base form (TMPyP) and complexed with Zn(II) (ZnTMPyP), with large unilamellar vesicles (LUVs), as a model for the gram-negative bacterial cell wall. Mixtures of the zwitterionic 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and anionic 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG) phospholipids, at different molar percentages, were used as LUVs. A significant increase of porphyrin affinity at higher POPG molar concentrations was observed from the binding constant values, K_b , estimated by optical absorption and steady-state fluorescence. Besides, as demonstrated by time-resolved fluorescence, this affinity increase is also followed by a

higher fraction of vesicle-bound porphyrin in the LUVs. Moreover, based on the K_b values, we have observed a higher affinity of the ZnTMPyP to the POPG containing LUVs as compared to the TMPyP. Steady-state fluorescence quenching and zeta potential studies revealed that both porphyrins are possibly located at the LUVs Stern layer region. Therefore, the electrostatic attraction between the positively charged porphyrin peripheral groups and the negatively charged outer surface of the LUVs plays an important role in porphyrin association and localization. Our results have improved the understanding of the successful application of cationic porphyrins on the photo-inactivation of gram-negative bacteria. Since a higher accumulation of the ZnTMPyP in the bacterial cell wall would be expected, this porphyrin could be a more efficient therapeutic drug for this treatment.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00249-012-0872-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Phospholipid vesicles · Cationic porphyrin binding · Fluorescence · Zeta potential · Dynamic light scattering