

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA



INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: 4005 Ex.1

ESTUDOS CONFORMACIONAIS EM PEPTÍDEOS ATRAVÉS DA TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA RESSONANTE DE FÖRSTER.

ALBERTO HAYATO KATAGIRI
ORIENTADOR: PROF. DR. AMANDO SIUITI ITO

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito (orientador)
Prof.^a Dr.^a Maria Tereza Lamy Freund
Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

FFCLRP-USP
IFUSP
IQ-USP

Armando Siuiti Ito

Armando
Prof. Armando Corbani Ferraz
Presidente da Comissão de Pós Graduação

São Paulo
2004

del 20/10/04

571.4

K 392

M

Ex. 1

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Katagiri, Alberto Hayato

Estudos Conformacionais em Peptídeos através da
Transferência de Energia Ressonante de Förster.
São Paulo, 2004.

Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo.
Depto. de Física e Matemática /FFCLRP-USP

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Área de Concentração: Física Aplicada a Biologia e
Medicina (Biofísica)

Unitermos: 1. Transferência de Energia Ressonante de
Förster (Fret);

2. Fret e Espectro de Distribuição de Distâncias;

3. Espectroscopia de Fluorescência e Dinâmica
Conformacional de Peptídeos;

4. Análise Computacional de Fret através do Programa
Contin;

5. Orto-aminobenzoil Peptídeos.

USP/IF/SBI-014/2004

*À minha Mãe,
por seu amor, apoio e sabedoria.*

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão às várias pessoas que me deram apoio ao longo dos anos em que trabalhei nesta dissertação. Sinto-me especialmente grato

ao *Prof. Dr. AMANDO SIUITI ITO* pela valiosa orientação;

a *EDUARDO SÉRGIO DE SOUZA* pela amizade e pelo fundamental suporte laboratorial e computacional;

a *ROSÂNGELA PEREIRA TOGNI*, pela amizade e pelo excelente convívio;

ao *GRUPO DE BIOFÍSICA E FÍSICA MÉDICA* do Departamento de Física Geral do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (FGE-IFUSP) pelo suporte laboratorial;

ao *GRUPO DE FOTOBIOFÍSICA* do Departamento de Física e Matemática (DFM) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) pelo suporte laboratorial;

ao *DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA* do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) pelo suporte laboratorial;

ao *DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA* da Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) pelo suporte laboratorial;

a *FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)* pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.	1
1.1. Fenômeno de Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET).	1
1.2. Relação entre FRET e as Medidas Espectroscópicas.	3
1.3. Eficiência da Transferência de Energia por FRET e sua Dependência com a Distância de Förster R_0 .	5
1.4. Polipeptídeo RKK4 e FRET.	9
1.4.1. Estrutura e função do polipeptídeo RKK4.	9
1.4.2. Mobilidade das cadeias peptídicas.	12
1.4.3. Relação entre FRET e o decaimento fluorescente. Determinação do espectro de distribuição de distâncias do polipeptídeo RKK4.	17
1.5. Objetivos.	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS.	20
2.1. Materiais.	20
2.1.1. Polipeptídeos RKK4, KKA e KKQ.	20
2.1.2. Solventes.	22
2.1.3. Concentração das soluções de polipeptídeos no solvente TFE / Tampão Hepes.	22
2.2. Equipamentos.	22
2.2.1. Espectrofotômetro HP-8452.	22
2.2.2. Espectrofluorímetro estático ISA JOBIN YVON-SPEX.	23
2.2.3. Sistema de detecção da fluorescência resolvida no tempo.	23
2.2.4. Dicroísmo circular (CD).	26
2.2.5. Refratômetro.	26
3. TAXA DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA.	27
3.1. Estudo sobre o Mecanismo Semiclássico do Fenômeno de FRET.	27
3.1.1. Campo elétrico de um dipolo hertziano e a taxa de FRET por	27

absorção estimulada.	
3.1.2. Relação entre a taxa de transferência de energia por FRET e as quantidades observáveis.	33
3.2. Decaimento Fluorescente Observado e FRET para o Caso em que a Distância Doador- Aceitador não é Fixa.	37
3.2.1. Decaimento fluorescente e integral de convolução.	37
3.2.2. Deconvolução e obtenção da função de decaimento $f(t)$.	40
3.2.3. Decaimento fluorescente observado e FRET.	43
3.3. CD e Estrutura Secundária de Polipeptídeos.	44
4. ANÁLISE COMPUTACIONAL.	47
4.1. Programa CONTIN.	47
4.2. Elaboração do Programa INPUT para a Simulação do Decaimento Fluorescente.	50
4.3. O Programa INPUT como Teste de Validação dos Resultados Gerados pelo CONTIN.	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.	55
5.1. Rendimento Quântico do Doador KKA.	55
5.2. Índice de Refração do Meio Solvente TFE / Tampão Hepes.	57
5.3. Integral de Sobreposição.	58
5.4. Distância de Förster.	60
5.5. Fluorescência Resolvida no Tempo.	61
5.5.1. Decaimento temporal.	61
5.5.2. Curva de ajuste.	62
5.6. Distribuição de Distâncias.	64
5.7. CD.	65
5.8. Polipeptídeo RKK4 em Tampão Hepes, na Presença de Micelas de SDS.	68
5.8.1. Rendimento quântico.	68
5.8.2. Índice de refração.	69
5.8.3. Integral de sobreposição.	69
5.8.4. Distância de Förster.	70
5.8.5. Fluorescência resolvida no tempo.	70

5.8.6. Distribuição de distâncias.	71
5.8.7. CD.	72
5.9. Reprodução do Decaimento Fluorescente através do Programa INPUT e sua Comparação com o Decaimento Observado.	73
6. CONCLUSÕES.	76
APÊNDICE.	79
A. Interpretação Clássica para o Fenômeno de FRET.	79
A.1. Campo de um dipolo hertziano na zona próxima.	79
A.2. Potência total irradiada pelo dipolo hertziano.	86
A.3. Modelo molecular de Lorentz e FRET.	88
B. Fator de Orientação k^2 como uma Média Dinâmica.	96
C. CD.	97
C.1. Fenômeno de CD.	97
C.2. Medida de CD.	99
D. Algoritmo do Programa INPUT, Elaborado em Linguagem FORTRAN 77.	102
E. Breve Estudo da Integral	121
$I = \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ f(\omega) \operatorname{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right] / \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2 \right\} d\omega .$	
BIBLIOGRAFIA.	130

RESUMO

Elaboramos inicialmente uma dedução semiclássica para calcular a taxa de *transferência de energia ressonante de Förster* (FRET) entre duas moléculas que formam um par doador-aceitador. Neste modelo, fundamentado na teoria de perturbação tempo-dependente de 1ª ordem, o aceitador é considerado como um sistema quântico que interage com um dipolo elétrico hertziano, o doador, através de fraco campo clássico de radiação eletromagnética em região de zona próxima. Dentro da aproximação adotada, a taxa obtida de transferência de energia por FRET coincide com as deduções clássica e quântica encontradas em literatura.

Em seguida, valemo-nos do FRET como técnica para a realização de experimentos de fluorescência com resolução temporal, onde determinamos as distribuições de distâncias intramoleculares entre duas sondas – ácido *o*-aminobenzóico (*o*-Abz, doador) e o grupo Gln-[N-(2,4-dinitrofenil)etileno-diamina] (Q-EDDnp, aceitador) – acopladas covalentemente às extremidades N-terminal e C-terminal de um peptídeo em particular, o RKK4, que se notabiliza pela habilidade de formar complexos com heparina de baixo peso molecular. Distribuições de distâncias foram recuperadas de perfis de decaimento fluorescente através do programa computacional CONTIN. Elaboramos também o programa INPUT como uma ferramenta para a validação dos resultados gerados pelo CONTIN. Acompanhamos mudanças na distribuição de distâncias do peptídeo devido a interações com proporções distintas de solvente indutor de α -hélice (mistura TFE/tampão hepes) e com agregados micelares de SDS. Experimentos complementares foram feitos através de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), comparando-se seus espectros com as distribuições de distâncias. Houve boa concordância entre ambos os resultados: os dados de CD indicaram a ocorrência de uma transição de estrutura aleatória (random coil), em meio aquoso, para um arranjo mais compacto em α -hélice nas soluções que apresentaram porcentagem v/v de TFE acima de 30%, ao passo que a distribuição de distâncias recuperada pelo CONTIN mostrou redução tanto na posição do pico de distribuição como na medida de dispersão FWHM (Full Width at Half-Maximum). Conclui-se, assim, que a adição crescente de alíquotas de TFE promove a estabilização de estrutura em α -hélice, tornando a cadeia peptídica mais curta e rígida. Na presença de micelas de SDS, uma forma conformacional mais compacta coexiste com a estendida e menos organizada encontrada em meio aquoso.

ABSTRACT

We performed a semiclassical derivation for the *Förster resonant energy transfer* (FRET) rate between a donor-acceptor pair. The derivation was based on the first order time-dependent perturbation theory, assuming the acceptor as a quantum system in interaction with the donor hertzian electric dipole, through the classical field of the electromagnetic radiation, in the near zone region. The energy transfer rate calculated agrees with the results from entirely classical or quantum derivations found in the literature.

FRET techniques were employed to perform time-resolved fluorescence experiments in order to obtain intra-molecular distance distributions for the peptide RKK4 labeled with the donor group *o*-aminobenzoic acid (*o*-Abz) and the acceptor group Gln-[N-(2,4-dinitrophenyl)ethylene-diamine] (Q-EDDnp). Distance distributions were recovered from fluorescence decay profiles using the computational program CONTIN. We developed the program INPUT to be used as a tool for the validation of results generated by CONTIN. We monitored modifications in the distance distribution in the RKK4 peptide due to interaction with solvents having different α -helix induction abilities (TFE/hepes buffer mixtures) and with SDS micelle aggregates. Complementary experiments were performed using circular dichroism (CD) spectroscopy, comparing the CD spectra with the distance distributions. Both results largely agreed: CD data indicated the occurrence of a transition from the random coil structure present in aqueous media to a more compact compact α -helix structure in solutions with a v/v TFE percentage above 30%, while the distance distribution recovered from the decay profiles showed decrease in the donor-acceptor distance and in the FWHM (Full Width at Half-Maximum). One may conclude that addition of TFE aliquots promotes the stabilization of an α -helix structure making the peptide chain more compact and less mobile. In the presence of SDS micelles, a more compact structure coexists with the extended and random structure found in the aqueous medium.

1. INTRODUÇÃO.

1.1. Fenômeno da Transferência de Energia por Ressonância de Förster (FRET).

A transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) foi descoberta experimentalmente por Cario & Franck (1923) mediante a exposição de uma mistura de vapores de mercúrio e tálio a uma frequência de luz absorvível somente pelo mercúrio; a presença de frequências provenientes tanto do mercúrio como do tálio em seu espectro de emissão demonstrava a ocorrência de transferência de energia de excitação de um elemento atômico a outro. Uma explicação para esse fenômeno foi proposta por J. Perrin (1926) com base na teoria clássica dos osciladores acoplados. Posteriormente, Kallman & London (1928) e F. Perrin (1932) iniciaram a teorização de um modelo quântico para o mecanismo de FRET, o qual foi sucessivamente aperfeiçoado por outros autores, notadamente por Theodore Förster (1946, 1948, 1949 e 1965), o pioneiro na elaboração de ferramentas teóricas e práticas utilizadas na realização de medidas espectroscópicas envolvendo FRET. Segundo Förster, o fenômeno de FRET, que leva seu nome, caracteriza-se pela transferência de energia do estado excitado de um fluoróforo doador para um cromóforo aceitador através de interações dipolo-dipolo de longo alcance, que ocorre no intervalo de distâncias de 10 a 100 Å, comparável às dimensões de muitas macromoléculas biológicas. A taxa de transferência de energia por FRET de um doador para um aceitador depende da distância desse par e é dada por

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 \quad (1.1.1)$$

onde τ_d é o tempo de vida da forma excitada do doador na ausência do aceitador, r_{ad} é a distância entre o par doador-aceitador ($a-d$) e R_0 é uma distância característica - a *distância de Förster* - para a qual a eficiência de transferência de energia por FRET é de 50%. A taxa k_{FRET} varia inversamente com a sexta potência de r_{ad} , sendo portanto muito sensível a sua variação, o que torna o FRET uma ferramenta poderosa para a determinação de propriedades estruturais dinâmicas e estáticas de macromoléculas em solução: se uma de suas extremidades é marcada por um doador e a outra por um aceitador, a variação da eficiência de transferência de energia observada deve refletir a multiplicidade das conformações adotadas pela macromolécula. Centenas de artigos envolvendo FRET e macromoléculas de interesse biológico têm sido publicadas, sendo metade destas devotadas ao estudo de estruturas protéicas, e o restante dividido entre estudos de estruturas de membranas, de DNA e RNA, além de processos fotossintéticos.

O doador e o aceitador, acoplados estrategicamente em regiões de interesse de moléculas biológicas, chamam-se sondas e geralmente apresentam em comum o fato de possuir anéis aromáticos, com elétrons deslocalizados resultantes de ligações duplas conjugadas.

O fenômeno de FRET ocorre mesmo que as sondas não façam parte da mesma molécula, bastando que estejam em concentração alta o suficiente para ter uma distância intermolecular dentro do intervalo para o qual é válida a

formulação de Förster. Modernas técnicas espectroscópicas permitem o estudo de FRET com moléculas em concentrações muito reduzidas, da ordem de algumas dezenas de micromolar (μM); para essas concentrações, a distância média entre duas moléculas do soluto é de cerca de 500-1000 Å, o que caracteriza o FRET como um fenômeno seguramente intramolecular.

1.2. Relação entre FRET e as Medidas Espectroscópicas.

A eq.(1.1.1) é a forma concisa da eq.(1.2.1)

$$k_{\text{FRET}} = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \phi_d}{128 \pi^5 n^4 N R_0^6 \tau_d} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \varepsilon_a(\nu) d\nu}{\nu^4} \quad (1.2.1)$$

onde os termos constantes estão reunidos na distância de Förster R_0 , tal que

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \phi_d}{128 \pi^5 n^4 N} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \varepsilon_a(\nu) d\nu}{\nu^4} = 8,8 \cdot 10^{-25} \kappa^2 n^{-4} \phi_d J \quad (\text{cm}^6) \quad (1.2.2)$$

O termo $\phi_d = \frac{k_{\text{FLUO}}}{k_{\text{FLUO}} + \sum k_{\text{OD}}}$ é chamado de *rendimento quântico* do doador

na ausência do aceitador e representa a fração da energia que sofre desexcitação por fluorescência; n é o índice de refração do meio solvente; N é o número de Avogadro; τ_d é o tempo de vida do doador na ausência do aceitador; κ^2

representa a orientação relativa dos dipolos de transição do doador e do aceitador no espaço tridimensional; a integral J expressa o grau de sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceitador, onde ν é o número de onda, $F_d(\nu)$ é a intensidade total da fluorescência do doador no intervalo $[\nu, \nu + d\nu]$, normalizada a 1 pela área, $\varepsilon_a(\nu)$ é o coeficiente de extinção do aceitador. Neste trabalho, elaboramos uma dedução semiclássica para k_{FRET} (capítulo 3 desta monografia) utilizando a teoria de perturbação tempo-dependente de 1ª ordem, sendo o potencial perturbador dado pelo campo elétrico de um dipolo hertziano na zona próxima.

Uma forma alternativa para a integral J é dada pela substituição de ν pelo comprimento de onda λ :

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.2.3)$$

As medidas experimentais de ϕ_d e $F_d(\lambda)$ são obtidas através de um espectrofluorímetro estático, e $\varepsilon_a(\lambda)$ é adquirido por meio de um espectrofotômetro de absorção. A medida de n , obtém-se através de um refratômetro. A medida experimental da grandeza κ^2 não é trivial, geralmente usa-se uma média estimada através de considerações teóricas. O fator de orientação κ^2 é dado por $\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_d \cos \theta_a)^2$, onde θ_T é o ângulo entre os dipolos de emissão do doador e de absorção do aceitador, e θ_d e θ_a são os ângulos entre estes dipolos e o vetor que une o doador e o aceitador. Toma-se

comumente $\langle \kappa^2 \rangle = \frac{2}{3}$, chamado de média dinâmica (ver apêndice B), dado o caráter aleatório da orientação dos dipolos que ocorre por difusão rotacional antes do processo de transferência de energia; em outras palavras, supõe-se que os dipolos dos doadores e aceptadores assumem todas as direções possíveis num curto intervalo de tempo comparativamente ao tempo de transferência de energia (condição isotrópica). No entanto, cabe a ressalva de que nem sempre tal condição é satisfeita pois a distribuição dos dipolos pode ser limitada pela estrutura da macromolécula a que estão ligados.

1.3. Eficiência da Transferência de Energia por FRET e sua Dependência com a Distância de Förster R_0 .

Numa molécula contendo o par a-d, à medida que o fluoróforo doador absorve energia luminosa, ocorre rápida excitação (10^{-15} s) do estado eletrônico de singlete fundamental S_0 para um estado excitado S_n ; o retorno para S_0 por emissão fluorescente é comparativamente mais lento, com tempo de vida da ordem de 10^{-8} s. Essa emissão é apenas uma das potenciais vias de perda de energia de excitação. Vários outros processos, sobretudo o FRET e a conversão interna, competem para a despopulação do estado excitado. Estes e outros processos concorrentes de desexcitação estão ilustrados no chamado Diagrama de Jablonski (fig.1.3.1).

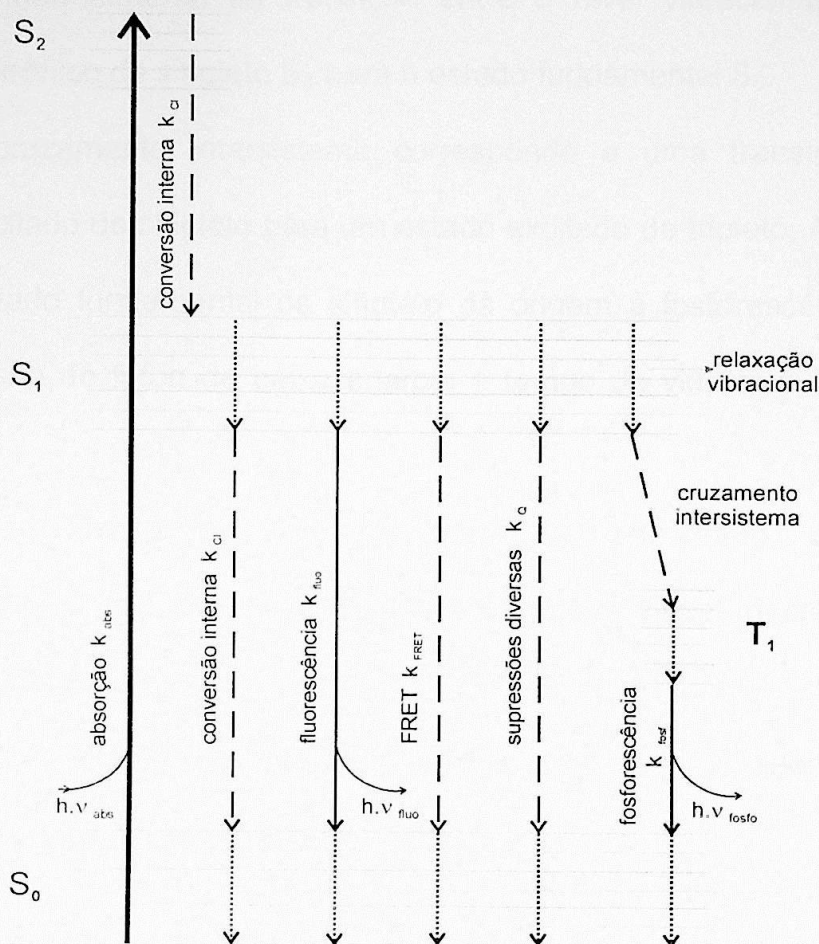


Fig.1.3.1. Diagrama de Jablonski, que ilustra os diversos processos de desexcitação eletrônica.

A fluorescência e a fosforescência, que promovem a desexcitação por emissão direta de fótons, são chamadas de processos de desexcitação *radiativos*. Os demais são conhecidos como processos *não-radiativos*.

Na conversão interna, a perda de energia ocorre através de colisões com as moléculas solventes ao redor do fluoróforo, bem como através de relaxação para os menores níveis vibracionais. Essa transição ocorre em cerca de 10^{-12} s, sobretudo entre singletos excitados superiores. Ocorre, portanto, muito mais rapidamente que a emissão fluorescente, de modo que a fluorescência observada

origina-se normalmente da transição entre o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico de singleto S_1 para o estado fundamental S_0 .

O cruzamento intersistema corresponde a uma transição proibida do estado excitado de singleto para um estado excitado de tripleto. A transição deste para o estado fundamental de singleto dá origem à fosforescência, que ocorre com emissão de fóton de baixa energia e tempo de vida que varia de 10^{-4} s a horas.

As desexcitações por supressão correspondem a colisões ou complexações com outras moléculas do soluto, ou também mediante supressores conhecidos como O_2 e I^- .

A taxa total de decaimento k_T de S_1 para S_0 corresponde à soma das diversas taxas de desexcitação envolvidas:

$$k_T = k_{FLUO} + k_{FRET} + \sum k_{OD} \quad (1.3.1)$$

onde k_{FLUO} , k_{FRET} e $\sum k_{OD}$ são, respectivamente, as taxas de decaimento por fluorescência, FRET e somatório das demais formas de desexcitação.

As taxas k_T e $k_{FLUO} + \sum k_{OD}$ são estimadas, respectivamente, a partir dos inversos dos tempos de vida de excitação da molécula na presença e na ausência do cromóforo aceitador.

A eficiência de transferência de energia por FRET, ε , dada pela eq.(1.3.2), é um parâmetro freqüentemente usado em estudos envolvendo FRET.

$$\varepsilon = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + (k_{FLUO} + \sum k_{OD})} = \frac{\frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6}{\frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 + \frac{1}{\tau_d}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r_{ad}}{R_0} \right)^6} \quad (1.3.2)$$

É imediato ver que para $r_{ad} = R_0$ a eficiência é de 50%. O comportamento típico de ε é ilustrado na fig.1.3.2.

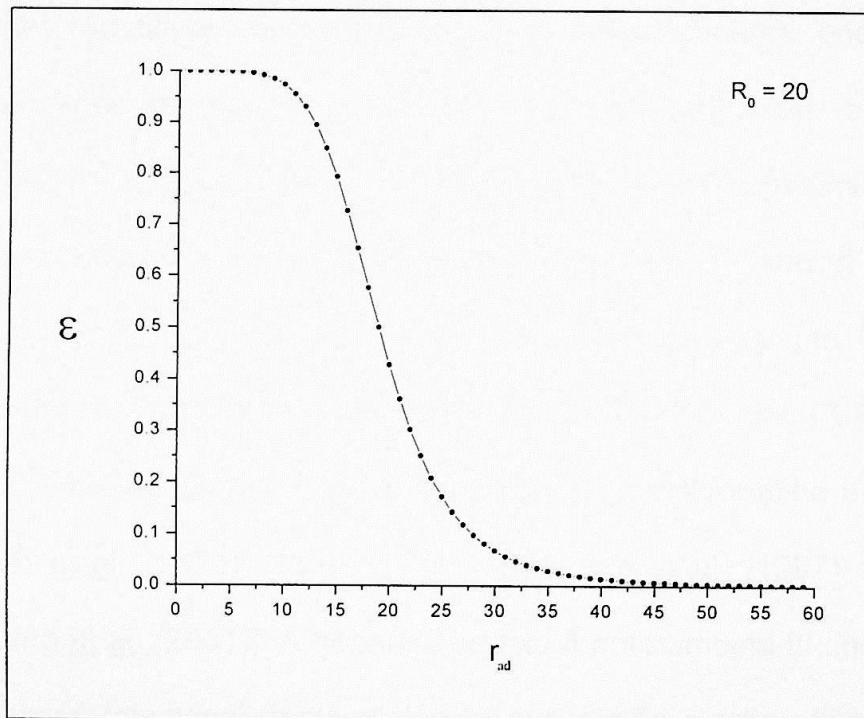


Fig.1.3.2. Curva de eficiência de transferência de energia por FRET para o caso $R_0 = 20$.

Adota-se, via de regra, o intervalo crítico $0,5 \cdot R_0 < r_{ad} < 1,5 \cdot R_0$, dentro do qual a eficiência ε se mantém muito sensível a pequenas variações da distância a-d. Fora desse intervalo, a alteração de ε com r_{ad} é muito pequena, o que reduz a precisão da medida com que a eficiência e a distância estão relacionadas.

1.4. Polipeptídeo RKK4 e FRET.

1.4.1. Estrutura e função do polipeptídeo RKK4.

Muitos processos biológicos - como a modulação de enzimas proteolíticas e seus inibidores, a regulação do crescimento, proliferação, adesão e mobilidade celular - são resultado da associação entre proteínas e glicosaminoglicanas (GAG's) [Jackson *et al.* (1991)]. Estas são cadeias de polissacarídeos aniônicos cujas unidades repetitivas são dissacarídeos de aminoaçúcares, onde ao menos uma das unidades repetitivas apresenta um grupo carboxilato ou sulfato. A heparina (fig.1.4.1.1) é uma GAG freqüentemente usada como modelo para o estudo da interação com proteínas [Olson & Björk (1991); Olson *et al.* (1991)] e peptídeos [Verrecchio *et al.* (2000)]; é conhecido anticoagulante que atua na inibição da trombina e de outros fatores de coagulação ativados (XIIa, XIa, IXa e Xa) através de sua ligação com o cofator plasmático antitrombina III [Lane *et al.* (1984); Olson *et al.* (1992); Carrell *et al.* (1991); Jin *et al.* (1997); Belzar *et al.* (2000); Chuang *et al.* (2001)]. A heparina se fixa à antitrombina III, induzindo uma modificação conformacional desta molécula que expõe o sítio ativo acessível à trombina e a outras proteases resultantes da ativação dos fatores de coagulação. Através de extensa pesquisa com heparina, Cardin & Weintraub (1989) obtiveram o que hoje se conhece como as seqüências-consenso de aminoácidos responsáveis pela associação de sítios protéicos com GAG's: estas são dadas por XBBXBX e XBBBXXBX, onde 'X' representa um aminoácido hidropático ou sem carga e 'B' é um aminoácido básico.

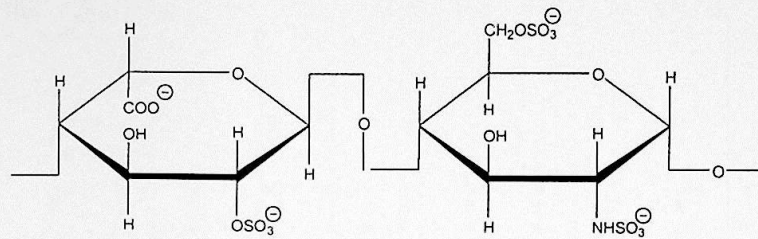


Fig.1.4.1.1. Fórmula estrutural da unidade dissacarídica da heparina.

Com base em medidas conjuntas de decaimento fluorescente resolvido no tempo e de dicroísmo circular, um estudo feito por Pimenta *et al.* (2002) mostrou a existência de alteração na conformação dos chamados *peptídeos fluorogênicos com supressão interna* (IFQ's), quando complexados com heparina de baixo peso molecular. IFQ's são peptídeos sintetizados de acordo com a seqüência-consenso de Cardin, possuindo, respectivamente, a sonda fluorescente ácido *o*-aminobenzóico (*o*-Abz, doador) e o grupo Gln-[N-(2,4-dinitrofenil)etilenodiamina] (Q-EDDnp, aceitador) nas extremidades N- e C-terminal. Um peptídeo IFQ em particular, denominado RKK4, é objeto de estudo aqui. Sua estrutura é dada por Abz-(ARKKAAKA)₄-Q-EDDnp, sendo a unidade repetitiva ARKKAAKA a seqüência-consenso de Cardin; 'A', 'R', 'K' e 'Q' são as notações para os resíduos de L- α -aminoácidos de alanina, arginina, lisina e glutamina, respectivamente. A massa molecular do RKK4 é de 3192 Da e, na forma totalmente estendida, possui comprimento de 115,2 Å; em pH fisiológico (pH=7,4) apresenta-se carregado positivamente (fig.1.4.1.2).

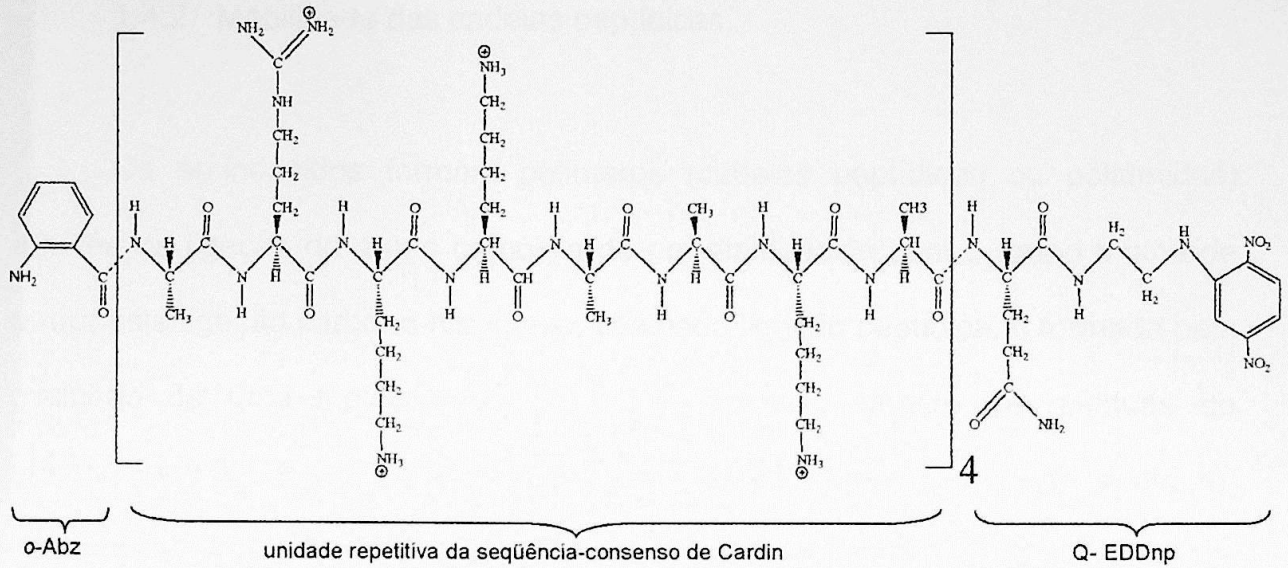


Fig.1.4.1.2. Fórmula estrutural do peptídeo RKK4 em pH=7,4.

A fig.1.4.1.3. ilustra a estrutura tridimensional do polipeptídeo RKK4 e a distância entre as sondas exógenas responsáveis pelo fenômeno de FRET.

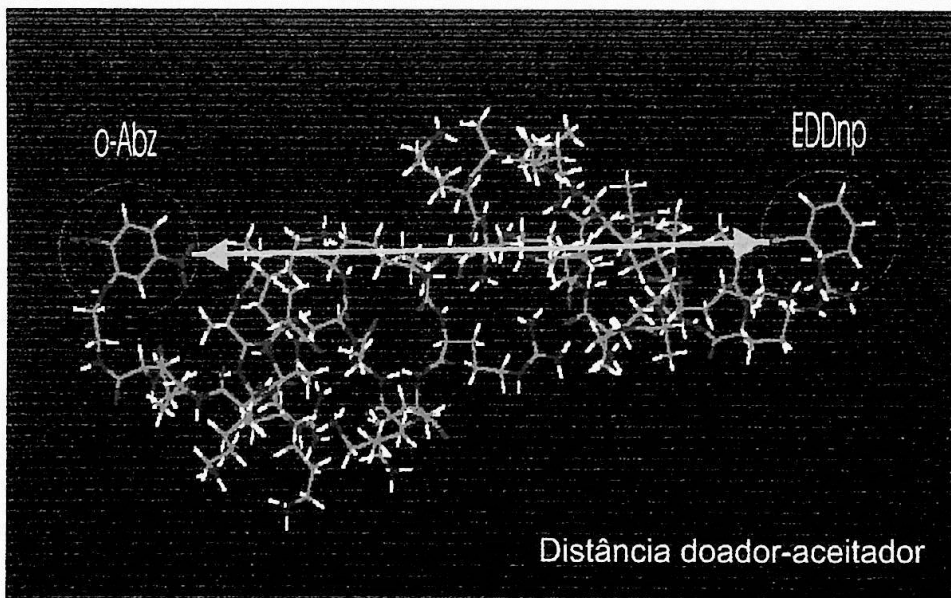


Fig.1.4.1.3. Estrutura tridimensional do polipeptídeo RKK4, obtida por dinâmica molecular (a 300K, durante 5 ps) através do programa "HyperChem Pro 6.0". A linha reta amarela é a distância entre a sonda doadora, o-Abz, e a aceitadora, EDDnp.

1.4.2. Mobilidade das cadeias peptídicas.

Os aminoácidos formam polímeros (cadeias peptídicas ou poliamidas) através da ligação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amina de outro; esta ligação carbono-nitrogênio, chamada ligação peptídica, é formada pela exclusão de uma molécula de água. Conforme o número de resíduos de aminoácidos por molécula, recebem o nome de dipeptídeos, tripeptídeos, etc., e, finalmente, polipeptídeos (por convenção, chamam-se polipeptídeos os peptídeos de massa molecular até 10000 u, e proteínas, os de massa molecular superior) [Morrison e Boyd (1986)].

Os peptídeos podem assumir comumente uma ou mais conformações específicas em condições biológicas normais de temperatura e pH, conferindo-lhes estereoespecificidades, as conformações nativas, indispensáveis às suas atividades funcionais. Essas conformações são, em última análise, reflexo dos ajustes resíduo a resíduo da cadeia peptídica para produzir condições locais de energia livre mínima. Estudos das conformações de cadeias peptídicas são encontrados em diversos livros-textos de bioquímica, como Lehninger (1984) e Stryer (1998).

Os tipos de interação estabilizadores da conformação consistem das seguintes ligações não covalentes: (1) pontes de hidrogênio, responsáveis pelas estruturas secundárias como a α -hélice (pontes de hidrogênio intracadeia) e a β -folha (pontes de hidrogênio intercadeia); (2) interações eletrostáticas ou iônicas (pontes salinas) e (3) interações hidrofóbicas, responsáveis pela conformação terciária característica de proteínas globulares bem como pela estrutura quaternária dada pela união de subunidades oligoméricas. Além das ligações não

covalentes, os dobramentos de uma cadeia peptídica podem ser estabilizados por uma ligação covalente, a ponte de dissulfeto ($-S-S-$), obtida através de uma reação de oxidação entre os grupos sulfidríla de duas cadeias laterais de cisteína.

Quanto à mobilidade da cadeia peptídica, esta é limitada pela rigidez das ligações peptídicas, que têm 40% de caráter de dupla ligação devido ao fenômeno estabilizador da ressonância (fig.1.4.2.1.a), bem como também pelas limitações estéricas nos ângulos diedrais de rotação ϕ e Ψ em torno, respectivamente, das ligações $C_{\alpha}-N$ e $C_{\alpha}-C$ (fig.1.4.2.1.b). Os 4 átomos do grupo peptídico e os 2 átomos de C_{α} estão localizados num plano único, onde o átomo de oxigênio do grupo carbonila e o átomo de hidrogênio amídico são preferencialmente *trans* um em relação ao outro. A ressonância torna a ligação peptídica mais curta (1.33 Å, caso *trans*; 1.32 Å, caso *cis*) que a ligação $C_{\alpha}-N$ (1.46 Å, caso *trans*; 1.47 Å, caso *cis*). Portanto, o esqueleto de uma cadeia peptídica pode ser considerado como uma série de planos relativamente rígidos, separados por grupos de metileno substituídos ($-C_{\alpha}HR-$). Como 1/3 de todas as ligações é constituído de ligações peptídicas, estas impõem restrições significativas no número de conformações que a cadeia pode assumir.

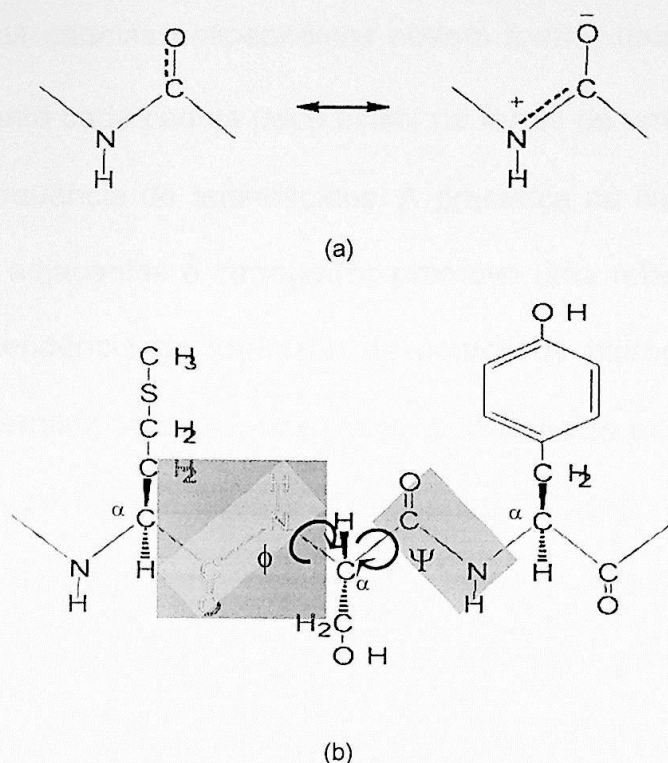


Fig.1.4.2.1. (a) a ligação peptídica, resultante das 2 formas de ressonância possíveis, apresenta 40% de caráter de dupla ligação; (b) ângulos diedrais ϕ e Ψ entre dois grupos peptídicos adjacentes: ϕ é o ângulo subtendido quando o plano à esquerda sofre rotação na direção indicada na seta; já Ψ é o ângulo para o qual o plano à direita sofre rotação na direção indicada. [Lehninger (1986)]

As regiões livres e proibidas para os ângulos diedrais ϕ e Ψ são estimadas pelo chamado Mapa Conformacional (ou Diagrama de Ramachandran), elaborado a partir de considerações teóricas e de modelos precisos de peptídeos, o que reduz a quantidade de conformações estáveis possíveis a um número pequeno. Quando os planos das unidades peptídicas estão paralelos ao plano da página, tem-se a chamada forma estendida (totalmente *trans*) da ligação peptídica, onde, por convenção, $(\phi, \Psi) = (+180^\circ, +180^\circ)$. Um exemplo de interferência à rotação ocorre quando $(\phi \rightarrow 0^\circ, \Psi = +180^\circ)$, pois as nuvens eletrônicas (raios de Van der Waals) dos átomos de oxigênio carbonílico se sobrepõem, evitando o livre giro dos planos peptídicos.

Nem todas as cadeias polipeptídicas podem formar uma α -hélice estável em pH = 7,4; o quanto cada cadeia pode existir na forma de uma α -hélice estável é reflexo de sua seqüência de aminoácidos. A presença na cadeia polipeptídica de grupamentos R adjacentes e carregados promove uma repulsão eletrostática tal que supera a tendência de formação de pontes de hidrogênio intracadeia. Outro fator que determina se uma certa cadeia polipeptídica pode formar uma α -hélice é o tamanho ou volume desses grupamentos. A água, solvente presente em todo meio biológico, tem papel importante no enfraquecimento da estabilização da α -hélice pois possui grande capacidade de formar pontes de hidrogênio, competindo com o hidrogênio do grupo amida como doador de hidrogênio e com o oxigênio carbonílico como aceitador; uma ligação mais intensa entre os grupos CO e NH pode ocorrer se a capacidade da água de formar pontes de hidrogênio for atenuada. Diversos estudos, como os elaborados por Waterhous & Johnson (1994), mostram que solventes como o trifluoroetanol (TFE) e o hexafluoroetanol (HFE) são indutores de formação de α -hélice.

Na forma totalmente estendida, o polipeptídeo RKK4 possui comprimento $d = 115,2 \text{ \AA}$. Quando sua estrutura secundária assume totalmente a forma de α -hélice, o comprimento torna-se $d' = 48 \text{ \AA}$. A fig.1.4.2.2 ilustra essas duas formas.

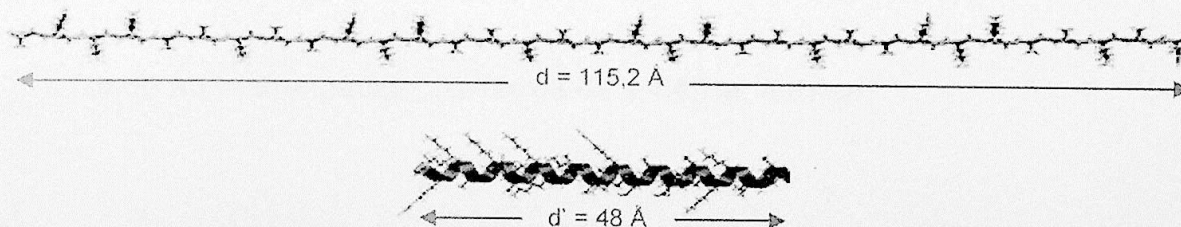


Fig.1.4.2.2. Polipeptídeo RKK4 na forma totalmente estendida e em α -hélice. (Imagem gerada através do programa RasMol 2.6.)

As medidas de d e d' foram obtidas levando-se em conta as dimensões médias do plano peptídico e da distância axial de uma volta inteira de α -hélice (fig.1.4.2.3).

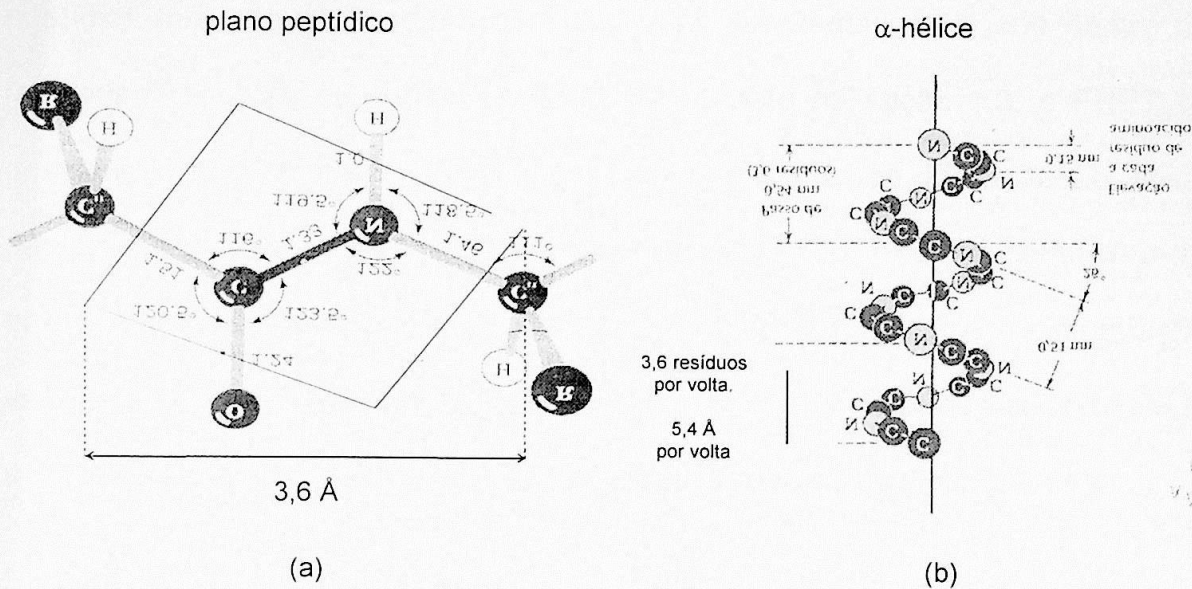


Fig.1.4.2.3. (a) medida da distância média C-C do plano peptídico [Stryer (1998)] e (b) medida do comprimento axial médio de uma volta da α -hélice [Lehninger (1986)].

Assim, na forma estendida, tem-se

$$d = n^{\circ} \text{ planos peptídicos} \times 3,6 \text{ \AA} = n^{\circ} \text{ resíduos de aa} \times 3,6 \text{ \AA} = 115,2 \text{ \AA}$$

onde aa = aminoácido; na forma de α -hélice, tem-se

$$d' = \frac{n^{\circ} \text{ de resíduos de aa}}{3,6} \times 5,4 \text{ \AA} = \frac{32}{3,6} \times 5,4 \text{ \AA} = 48 \text{ \AA}$$

1.4.3. Relação entre FRET e o decaimento fluorescente. Determinação do espectro de distribuição de distâncias do polipeptídeo RKK4.

A distância a-d entre as duas sondas pode assumir medidas diversas caso não seja rígida. Este é o caso do polipeptídeo RKK4 em solução, onde a cadeia peptídica que une as sondas não é fixa, mas apresenta mobilidade dentro das restrições expostas na subseção 1.4.2. Como visto na seção 1.3, o FRET e o decaimento fluorescente competem entre si no processo de desexcitação; assim, dada a sensibilidade da transferência de energia por FRET com a distância a-d, o decaimento fluorescente do doador o-Abz é afetado também pelas conformações adotadas pelo polipeptídeo RKK4 em solução. A expressão que relaciona FRET e a fluorescência à multiplicidade de distâncias a-d é dada pela eq.(1.4.3.1).

$$R(t) = \int_{r_{ad}^{(min)}}^{r_{ad}^{(max)}} s(r_{ad}) \int_0^t L(t') \left\{ \sum_{i=1}^n B_i^{(ad)} \exp \left[- \left[1 + \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 \right] \frac{t-t'}{\tau_i^{(d)}} \right] \right\} dt' dr_{ad} \quad (1.4.3.1)$$

$R(t)$ é a medida observada do decaimento da intensidade fluorescente no tempo, obtida através de um espectrofluorímetro com resolução temporal. Esta equação corresponde à chamada equação integral de Fredholm de 1ª espécie, e encontra-se completamente deduzida no capítulo 3 (seção 3.2) deste trabalho. A inversão desta integral fornece $s(r_{ad})$, o espectro das conformações do polipeptídeo RKK4.

1.5. Objetivos.

Este trabalho tem como proposta estudar o fenômeno de FRET e aplicá-lo na análise da dinâmica conformacional de peptídeos. Numa primeira etapa, desenvolvemos os fundamentos teóricos do fenômeno mediante o ponto de vista semiclássico, onde a taxa k_{FRET} de transferência de energia por FRET resulta da interação do sistema quântico da molécula aceitadora com a energia do campo elétrico de um dipolo hertziano, o doador. Utilizamos para o cálculo de k_{FRET} o método de perturbação de 1ª ordem dependente do tempo.

Posteriormente, o fenômeno de FRET foi aplicado na investigação do comportamento conformacional do polipeptídeo RKK4 em diferentes proporções da mistura de solventes TFE/tampão hepes. Para esse fim, foram usadas as sondas exógenas ácido *o*-aminobenzóico (*o*-Abz, doador) e o N-(2,4-dinitrofenol)-etilenodiamina (EDDnp, aceitador), ligados respectivamente às extremidades amino-terminal e carboxila-terminal do esqueleto peptídico.

Adotamos como técnica experimental principal a espectroscopia de fluorescência resolvida temporalmente; as medidas de intensidade de decaimento fluorescente observadas através desta técnica foram tratadas computacionalmente pelo programa CONTIN para obter um espectro de distribuição de distâncias entre as duas sondas. O programa - criado por S. W. Provencher (1982) e projetado para realizar a inversão de equações integrais de Fredholm de 1ª espécie - foi pioneiramente implementado no Grupo de Biofísica e Física Médica do IFUSP por *Eduardo S. Souza* para o estudo de estruturas de bradicininas [Souza (1999)]. Em seguida, foi aplicado no estudo de interações de peptídeos IFQ's com heparina [Pimenta *et al.* (2002)]. Foram feitos também

estudos de distribuição de distâncias com RKK4 na presença de agregados micelares do anfifílico sódio dodecilsulfato (SDS) em tampão hepes. Como forma complementar de análise, medidas de dicroísmo circular (CD) foram tomadas, comparando-se seus espectros com os obtidos através do programa CONTIN.

Como critério de validação dos resultados adquiridos pelo CONTIN, elaboramos o programa INPUT, capaz de simular os decaimentos fluorescentes a partir de um espectro de distribuição de distâncias conhecido *a priori*. Esses decaimentos são utilizados pelo CONTIN para gerar um espectro de distribuição de distâncias, permitindo verificar de maneira qualitativa a destreza do CONTIN em recuperar o espectro conhecido. Por fim, os decaimentos observados foram comparados quantitativamente com os obtidos pelo programa INPUT através do teste de chi-quadrado reduzido (χ^2_{red}).

2. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS.

2.1. Materiais.

2.1.1. Polipeptídeos RKK4, KKA e KKQ.

A síntese dos polipeptídeos RKK4, KKA e KKQ, contendo as sondas exógenas Abz (ácido o-aminobenzóico) e EDDnp (N-(2,4-dinitrofenil)etilenodiamina), foi realizada pelo grupo do Prof. Luís Juliano, da Escola Paulista de Medicina. As fórmulas estruturais desses polipeptídeos são mostradas nas figs. 2.1.1.1, 2.1.1.2 e 2.1.1.3.

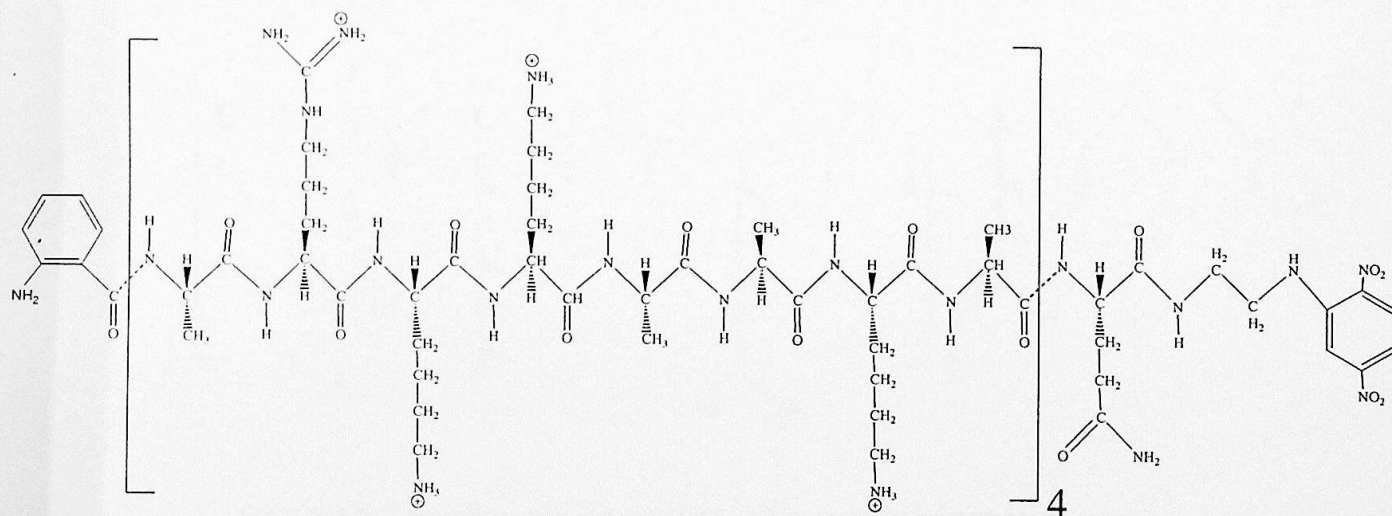


Fig.2.1.1.1. Fórmula estrutural do polipeptídeo RKK4: [Abz - (ARKKAAKA)₄Q - EDDnp].

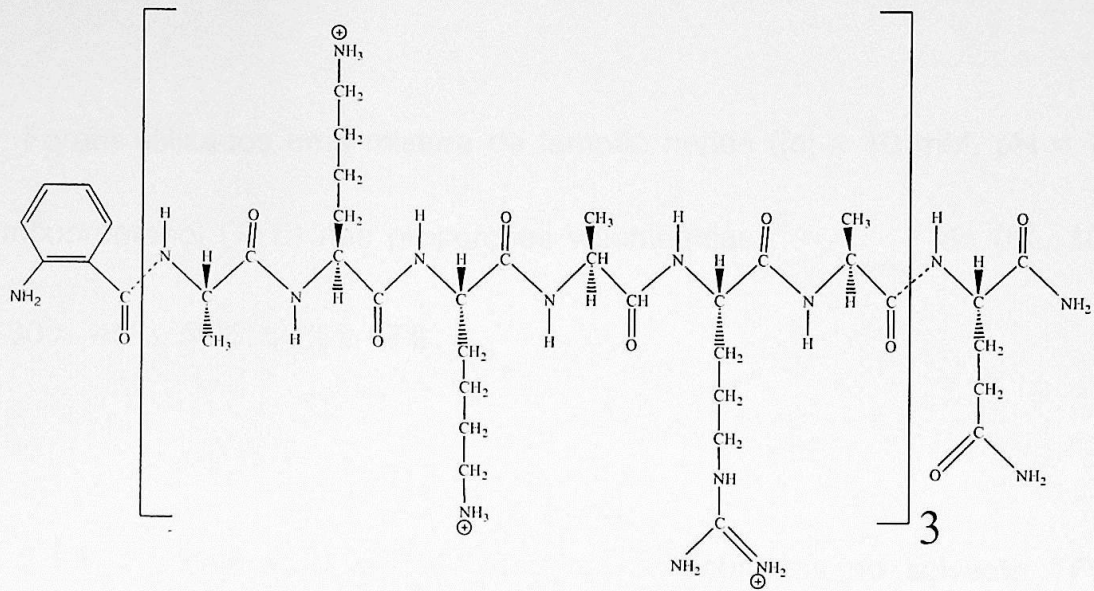


Fig.2.1.1.2. Fórmula estrutural do polipeptídeo KKA: [Abz - (AKKARA)₃Q - NH₂].

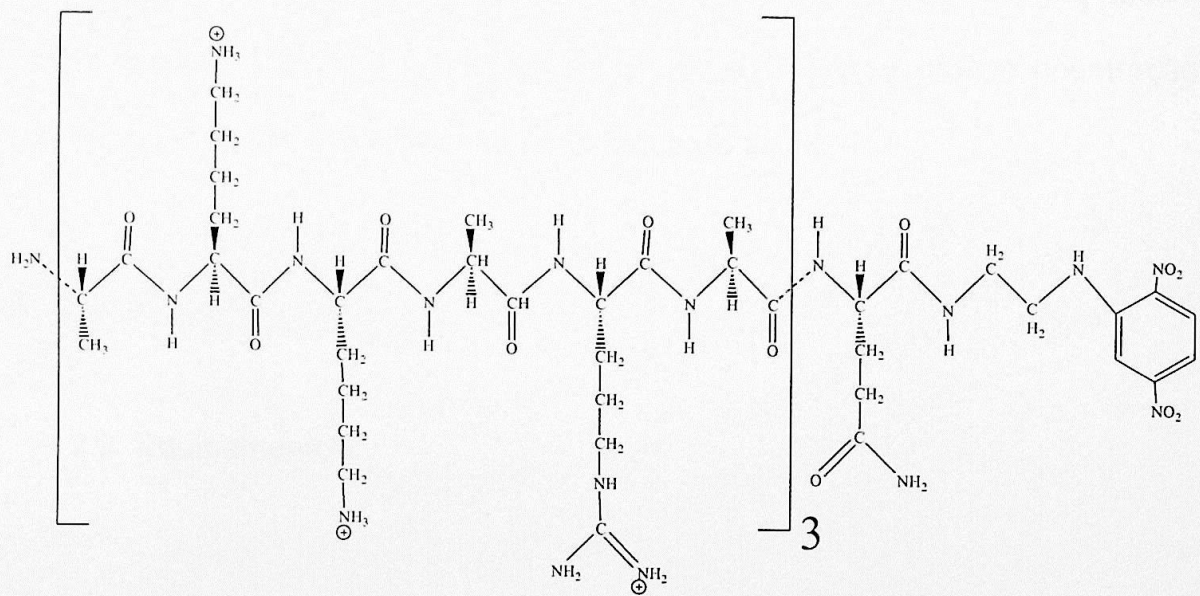


Fig.2.1.1.3. Fórmula estrutural do polipeptídeo KKQ: [(AKKARA)₃Q - EDDnp].

2.1.2. Solventes.

Foram utilizados uma mistura de tampão hepes ($[c] = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,4$) com trifluoroetanol (TFE) nas proporções volumétricas V_{TFE}/V_{HEPES} de 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 97%.

2.1.3. Concentração das soluções de polipeptídeos no solvente TFE / Tampão Hepes.

As soluções foram acondicionadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico, na concentração $[c] = 50 \mu\text{M}$, mantidas a uma temperatura de cerca de $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Nas celas de quartzo com 1,00 mm e 0,20 mm de caminho óptico, utilizadas para a obtenção do espectro de CD, manteve-se uma concentração fixada em $[c] = 10 \mu\text{M}$, em temperatura de cerca de $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Equipamentos.

2.2.1. Espectrofotômetro HP-8452.

Equipamento utilizado na obtenção dos espectros de absorção óptica do KKQ/TFE-hepes e do Abz/etanol. Por meio de uma fonte de luz originária de uma lâmpada de deutério, o espectrofotômetro proporciona um espectro de absorbância que varia de 190 nm a 820 nm, com passo de 2 nm.

2.2.2. Espectrofluorímetro estático ISA JOBIN YVON-SPEX.

Utilizado na obtenção dos espectros de emissão do KKA/TFE-hepes e do Abz/etanol. Uma lâmpada de xenônio é usada como fonte de luz para a excitação do doador. Excitado a 314 nm, a varredura da intensidade da luz emitida pelo doador durante o decaimento fluorescente é registrada num intervalo de 340nm a 550 nm, com incremento de 1nm.

2.2.3. Sistema de detecção da fluorescência resolvida no tempo.

O sistema de detecção da fluorescência resolvida no tempo utiliza-se da *técnica de contagem de fóton único*. Um pulso de luz, originário de um laser, é detectado por um fotodiodo que envia um sinal para um conversor tempo-amplitude, TAC, iniciando a subida de uma rampa linear de tensão. Um pulso de luz emitido pela amostra fluorescente é detectado por uma fotomultiplicadora de parada (R3809U, Hamamatsu) que envia um sinal para o TAC, interrompendo a rampa de tensão. O valor dessa tensão é proporcional ao tempo transcorrido entre a excitação e a emissão. Um analisador multicanal, MCA, computa a

ocorrência desse evento e o seu tempo correspondente. O processo repete-se a cada pulso de excitação e, ao final de $\sim 10^6$ contagens, tem-se a curva de decaimento temporal. A amostra e as fotomultiplicadoras estão conectadas a um espectrômetro (OB900, Edinburg Instruments).

A fonte de excitação consiste de um sistema que tem como ponto de partida um laser de argônio (2060-10SA, Spectra Physics) cujas transições 4p e 4s produzem diversas linhas entre 4545 Å e 5287 Å. A luz de saída deste laser, com potência entre 6,0 W e 10,0 W, bombeia um laser de titânio-safira (3950, Spectra Physics) que gera pulsos de laser na faixa compreendida entre 840 nm e 1000 nm, com frequência de repetição de pulsos de 4 MHz. Estes pulsos passam por um selecionador de pulsos (3980-25, Spectra Physics) que permite a operação em frequências na faixa de 80 kHz a 400 kHz, adequadas ao método de contagem de fóton único. Finalmente, o laser passa por um gerador de terceiros harmônicos (GW-23PL, Spectra Physics), de modo que o feixe emergente tem comprimentos de onda sintonizados na região entre 280 nm e 333 nm.

A fig.2.2.3.1 ilustra o mecanismo de funcionamento do espectrofluorímetro com resolução temporal baseado na *técnica de correlação temporal de fóton único* (SPTC). Curvas típicas de decaimento são apresentadas no capítulo 3. Uma descrição mais extensa dos métodos de análise dos dados, em particular aplicado ao FRET, é feita nos capítulos 3 e 4.

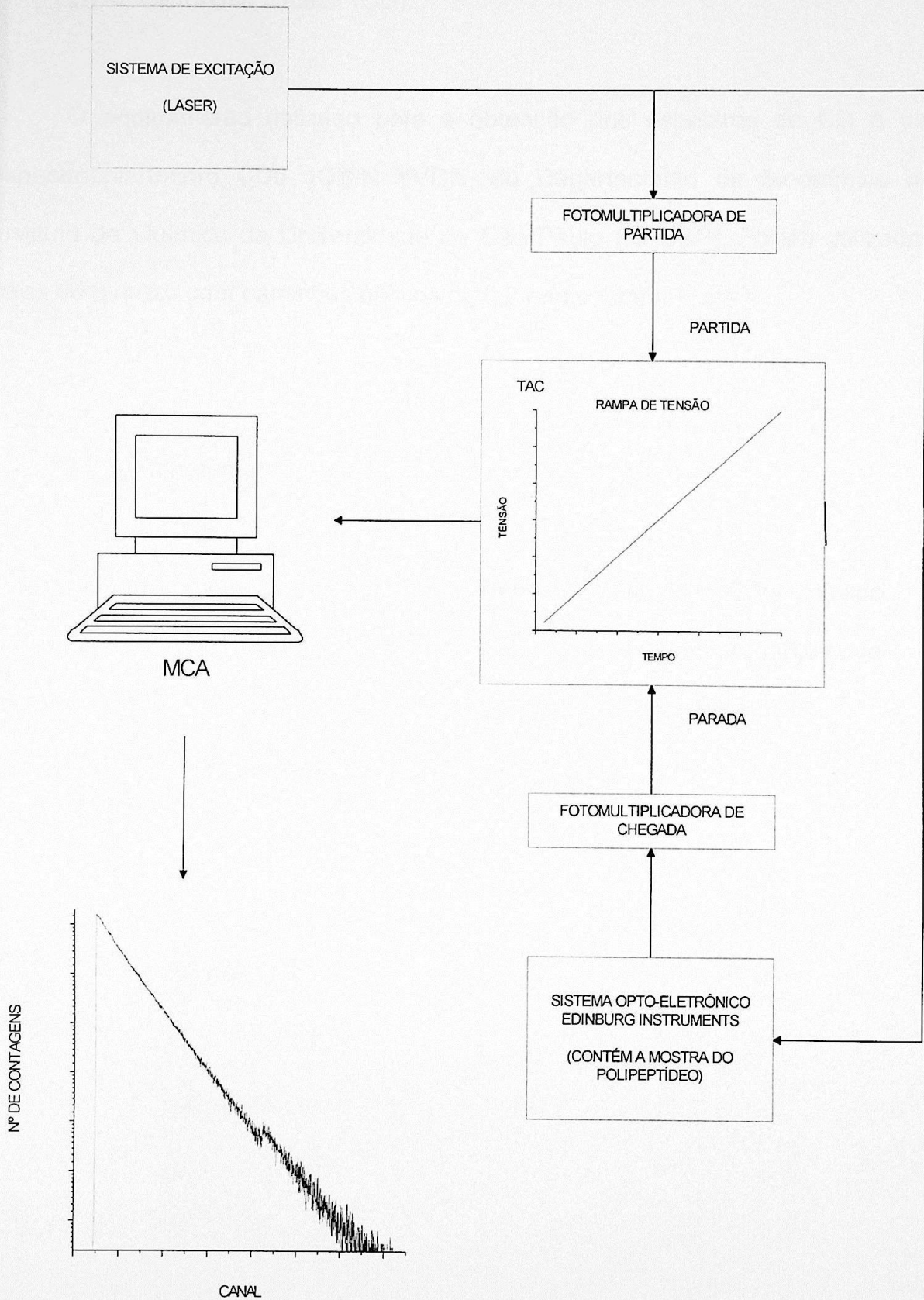


Fig.2.2.3.1. Sistema de detecção da fluorescência resolvida no tempo por contagem de fóton único.

2.2.4. Dicroísmo circular (CD).

O equipamento utilizado para a obtenção dos espectros de CD é um espectropolarímetro CD6 JOBIN YVON, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Foram utilizados celas de quartzo com caminhos ópticos de 0,2 mm e 1 mm.

2.2.5. Refratômetro.

Um refratômetro cedido pelo Laboratório Didático do IFUSP foi utilizado para realizar as medições dos índices de refração das diversas proporções de misturas solventes TFE/tampão hepes e da mistura tampão hepes/SDS.

3. TAXA DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA.

3.1. Estudo sobre o Modelo Semiclássico do Fenômeno de FRET.

3.1.1. Campo elétrico de um dipolo hertziano e a taxa de FRET por absorção estimulada.

Na literatura recente, o FRET é visto sob o escopo da eletrodinâmica quântica [Andrews (1989); Andrews & Sherborne (1987); Avery (1984)]. Há também interpretações baseadas unicamente na eletrodinâmica clássica [Hoch & Knox (1968)]. Förster segue o caminho semiclássico, fundamentado em intrincada interação entre a energia de dipolo elétrico e as funções de onda vibrônicas [Förster (1965)]. Propomos uma abordagem didática, simples, de natureza também semiclássica, a qual descrevemos a seguir. A energia de transferência por FRET tem origem no campo elétrico de um dipolo hertziano (fig.3.1.1.1) o qual representa o fluoróforo doador, e seu momento de dipolo varia senoidalmente com o tempo, $p(t) = p_d e^{i\omega t} \hat{k}$, exercendo uma pequena perturbação periódica sobre um sistema quântico, dado pela molécula aceitadora.

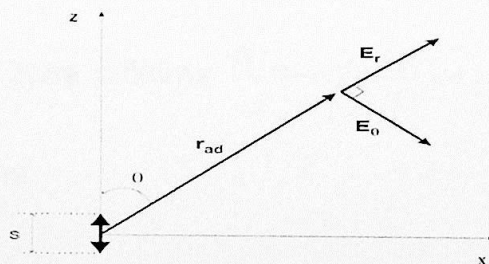


Fig.3.1.1.1. Dipolo hertziano de momento $p = p_d e^{i\omega t} \hat{k}$, onde $p_d = q_a s$. E_r e E_θ são os vetores componentes do campo elétrico produzido pelo dipolo a uma distância r_{ad} e em ângulo azimutal θ .

Existem três regiões espaciais de interesse para o campo eletromagnético emitido por um dipolo hertziano de dimensão s , confinado a uma pequena região comparativamente ao comprimento de onda λ da radiação emitida: (a) zona próxima (ou estática): $s \ll r \ll \lambda$, (b) zona intermediária (ou de indução): $s \ll r \sim \lambda$ e (c) zona distante (ou de radiação): $s \ll \lambda \ll r$. O estudo de FRET limita-se à região de zona próxima pois a dimensão de uma sonda fluorescente como o o-Abz é da ordem de 5Å , a distância d -a situa-se num intervalo de $10\text{-}10^2\text{ Å}$ e o comprimento de onda da radiação envolvida na transferência de energia por FRET é de cerca de $3 \cdot 10^3\text{ Å}$ (ultravioleta distante).

Na zona próxima o vetor campo elétrico é dado pela eq.(3.1.1.1):

$$E_d(\mathbf{r}_{ad}, t) = \frac{2p_d \cos\theta}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \left(1 + i n(\omega) \frac{\omega r_{ad}}{c} \right) e^{i\omega \left(n(\omega) \frac{r_{ad}}{c} - t \right)} \hat{\mathbf{r}} + \frac{p_d \sin\theta}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \left[\left(1 - n(\omega) \frac{\omega r_{ad}}{c} \right) + i n(\omega) \frac{\omega r_{ad}}{c} \right] e^{i\omega \left(n(\omega) \frac{r_{ad}}{c} - t \right)} \hat{\boldsymbol{\theta}} \quad (3.1.1.1)$$

onde $p_d = q_0 \cdot s$ é a amplitude do momento de dipolo, ω é a frequência angular do dipolo hertziano, $n(\omega)$ é o índice de refração do meio e c é a velocidade da luz no vácuo.

A dedução completa deste campo é feita no apêndice A.1.

Uma vez que na zona próxima $\frac{\omega r_{ad}}{c} = 2\pi \frac{r_{ad}}{\lambda} \ll 1$, a eq.(3.1.1.1) pode ser

reduzida à seguinte forma:

$$E_d(\mathbf{r}_{ad}, t) = \left(\frac{2p_d \cos\theta}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \hat{\mathbf{r}} + \frac{p_d \sin\theta}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \hat{\boldsymbol{\theta}} \right) e^{-i\omega t} \quad (3.1.1.2)$$

Com a mudança de coordenadas $\hat{z} = \cos\theta \hat{r} - \text{sen}\theta \hat{\theta}$, a eq.(3.1.1.2) pode ser rescrita como:

$$E_d(\mathbf{r}_{ad}, t) = E_\theta(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\omega t} \quad (3.1.1.3)$$

$$\text{onde } E_\theta(\mathbf{r}_{ad}) = \frac{3(\mathbf{p}_d \cdot \hat{r})\hat{r} - \mathbf{p}_d}{n^2(\omega)r_{ad}^3}.$$

O hamiltoniano da perturbação é representado pela energia da interação do campo de dipolo hertziano com o dipolo da molécula aceitadora:

$$H_1(\mathbf{r}_{ad}, t) = -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_d(\mathbf{r}_{ad}, t) \quad (3.1.1.4)$$

Considerando $H_1(\mathbf{r}_{ad}, t)$ uma perturbação pequena, a função de onda $\Psi(\mathbf{r}_{ad}, t)$ que descreve o sistema aceitador pode ser expressa em termos das autofunções do hamiltoniano não perturbado:

$$\Psi(\mathbf{r}_{ad}, t) = \sum_n a_n(t) \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_n t}{\hbar}} \quad (3.1.1.5)$$

onde $H_0 \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) = E_n \Phi_n(\mathbf{r}_{ad})$. A equação de Schrödinger assume a forma:

$$\sum_n [i\hbar \dot{a}_n(t) + E_n a_n(t)] \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_n t}{\hbar}} = (H_0 + H_1) \sum_n a_n(t) \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_n t}{\hbar}}$$

ou

$$\sum_n i\hbar \dot{a}_n(t) \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_n t}{\hbar}} = \sum_n a_n(t) H_1 \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_n t}{\hbar}} \quad (3.1.1.6)$$

pois $\Phi(\mathbf{r}_{ad})$ é autofunção de H_0 .

Uma vez que o campo de radiação é muito fraco, pode-se supor que a amplitude de probabilidade $a_n(t)$ não se altera significativamente com o tempo; se o sistema está no estado p em $t = 0$, então $a_p(t) \cong a_p(0) = 1$ e $a_{n \neq p}(t) \cong a_{n \neq p}(0) = 0$. Logo, a eq.(3.1.1.6) assume a forma:

$$\sum_n i\hbar \dot{a}_n(t) \Phi_n(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_n t}{\hbar}} = H_1 \Phi_p(\mathbf{r}_{ad}) e^{-i\frac{E_p t}{\hbar}} \quad (3.1.1.7)$$

Multiplicando esta última equação por $\Phi_k^*(\mathbf{r}_{ad}) e^{i\frac{E_k t}{\hbar}}$, tal que $E_k > E_p$, e integrando sobre as coordenadas espaciais, tem-se:

$$\begin{aligned} i\hbar \dot{a}_k(t) &= \int \Phi_k^*(\mathbf{r}_{ad}) H_1 \Phi_p(\mathbf{r}_{ad}) d^3\mathbf{r} e^{i\frac{(E_k - E_p)t}{\hbar}} = \\ &= \langle k | H_1 | p \rangle e^{i\frac{(E_k - E_p)t}{\hbar}} = \langle k | -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}) | p \rangle e^{i(\omega_{pk} - \omega)t} \end{aligned} \quad (3.1.1.8)$$

onde $\omega_{pk} = \frac{E_k - E_p}{\hbar}$.

Integrando no tempo, com a condição inicial $a_k(0) = 0$, tem-se:

$$a_k(t) = \frac{1}{\hbar} \langle k | -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}) | p \rangle \frac{1 - e^{i(\omega_{pk} - \omega)t}}{\omega_{pk} - \omega} \quad (3.1.1.9)$$

A probabilidade de encontrar a molécula no estado excitado k e no tempo t é dada por:

$$\begin{aligned} |a_k(t)|^2 &= \frac{1}{\hbar^2} \left| \langle k | -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}) | p \rangle \right|^2 \frac{1 - e^{-i(\omega_{pk} - \omega)t}}{\omega_{pk} - \omega} \cdot \frac{1 - e^{i(\omega_{pk} - \omega)t}}{\omega_{pk} - \omega} = \\ &= \frac{1}{\hbar^2} \left| \langle k | -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}) | p \rangle \right|^2 \frac{\text{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]}{\left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2} t^2 \end{aligned} \quad (3.1.1.10)$$

Num arranjo espectroscópico real a luz incidente não é estritamente monocromática, e a absorção $p \rightarrow k$ ocorre numa banda estreita de freqüências em torno de ω_{pk} ; a absorção total, correspondente à transição $p \rightarrow k$, dá-se pela expressão:

$$|a_k(t)|^2 = \frac{1}{\hbar^2} \int \left| \langle k | -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}, \omega) | p \rangle \right|^2 \frac{\text{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]}{\left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2} t^2 d\omega \quad (3.1.1.11)$$

Como integramos em ω , lembramos na eq.(3.1.1.11) que $\mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad})$ é função também de ω , ou seja, $\mathbf{E}_0 = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}, \omega)$.

O integrando da eq.(3.1.1.11) corresponde a uma função muito estreita em torno de ω_{pk} . A absorção é desprezível para valores afastados dessa freqüência; assim, é possível estender os limites de integração até $\pm \infty$:

$$\begin{aligned}
 |a_k(t)|^2 &= \frac{1}{\hbar^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \left| \left\langle k \left| -\mathbf{p}_a \cdot \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_{ad}, \omega) \right| p \right\rangle \right|^2 \frac{\text{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]}{\left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2} \right\} t^2 d\omega = \\
 &= \frac{1}{\hbar^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \left| \left\langle k \left| -\mathbf{p}_a \cdot \frac{3(\mathbf{p}_d \cdot \hat{\mathbf{r}})\hat{\mathbf{r}} - \mathbf{p}_d}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \right| p \right\rangle \right|^2 \frac{\text{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]}{\left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2} \right\} t^2 d\omega = \quad (3.1.1.12) \\
 &= \frac{1}{\hbar^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \left| \left\langle k \left| -\mathbf{p}_a \cdot \frac{3(\mathbf{p}_d \cdot \hat{\mathbf{r}})\hat{\mathbf{r}} - \mathbf{p}_d}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \right| p \right\rangle \right|^2 \delta(\omega_{pk} - \omega) \frac{2\pi}{t} \right\} t^2 d\omega \cong \\
 &\cong 2\pi \frac{\kappa^2 |\mathbf{p}_a|^2 |\mathbf{p}_d|^2}{\hbar^2 n^4 (\omega_{pk}) r_{ad}^6} t
 \end{aligned}$$

onde $\kappa^2 = (\cos\theta_{ad} - 3\cos\theta_a \cos\theta_d)^2$ é o fator de orientação entre o dipolo doador e o aceitador. Uma breve análise desta integral é apresentada no apêndice E.

A taxa de transição $k_{p \rightarrow k}$ é constante e dada por:

$$k_{p \rightarrow k} = \frac{|a_k(t)|^2}{t} = 2\pi \frac{\kappa^2 |\mathbf{p}_a|^2 |\mathbf{p}_d|^2}{\hbar^2 n^4 (\omega_{pk}) r_{ad}^6} \quad (3.1.1.13)$$

Este resultado, em que o campo clássico do doador (um dipolo hertziano) interage com um sistema quântico do aceitador por meio de perturbação tempo-dependente de 1ª ordem, representa de maneira simples o fenômeno de FRET.

As deduções seguintes têm ponto de partida na eq.3.1.1.13 e são devidas a Förster (1965). Elas relacionam a taxa de FRET a quantidades espectroscópicas observáveis.

3.1.2. Relação entre a taxa de transferência de energia por FRET e as quantidades observáveis.

A excitação dos elétrons devido à radiação incidente modifica a distribuição da nuvem eletrônica, alterando a força de interação desta com o núcleo, que passa a vibrar mais como resposta a essa redistribuição; assim, às transições eletrônicas sucedem-se as transições vibracionais nucleares. São chamadas de transições vibrônicas essas transições eletrônicas acompanhadas das transições vibracionais. Considerando as funções de onda vibrônicas $\Psi_{ad^*}(E_a, E_{d^*})$ e $\Psi_{a^*d}(E_{a^*}, E_d)$ que representam, respectivamente, as funções de onda do sistema doador-aceitador antes e depois da transferência de energia do campo elétrico, a eq.(3.1.1.13) adquire a forma

$$k_{FRET} = \frac{2\pi}{\hbar^2} \left\langle \left| \Psi_{a^*d}(E_{a^*}, E_d) \left| \frac{\kappa |\mathbf{p}_a| \cdot |\mathbf{p}_d|}{n^2 r_{ad}^3} \right| \Psi_{ad^*}(E_a, E_{d^*}) \right| \right\rangle^2 \quad (3.1.2.1)$$

Mediante a aproximação de Born-Oppenheimer, as funções de onda eletrônicas e vibracionais podem ser expressas como:

$$\Psi_{ad}(E_a, E_{d'}) = \Phi_a(E_a)\Phi_{d'}(E_{d'})\chi_a(E_a)\chi_{d'}(E_{d'}) \quad (3.1.2.2)$$

$$\Psi_{a'd}(E_{a'}, E_d) = \Phi_{a'}(E_{a'} + \hbar\omega)\Phi_d(E_{d'} - \hbar\omega)\chi_{a'}(E_{a'} + \hbar\omega)\chi_d(E_{d'} - \hbar\omega) \quad (3.1.2.3)$$

onde Φ corresponde à parte eletrônica da função de onda e χ à parte vibracional. Levando em conta todas as transições $\hbar\omega$ possíveis a partir dos estados iniciais E_a e $E_{d'}$, tem-se

$$\begin{aligned} k_{\text{RET}} &= \frac{2\pi}{\hbar^2} \int_0^\infty \left| \left\langle \Phi_a(E_a)\Phi_{d'}(E_{d'})\chi_a(E_a)\chi_{d'}(E_{d'}) \left| \frac{\kappa |\mathbf{p}_a| |\mathbf{p}_d|}{n^2 r_{ad}^3} \right. \right. \right. \\ &\quad \left. \left. \Phi_{a'}(E_{a'} + \hbar\omega)\Phi_d(E_{d'} - \hbar\omega)\chi_{a'}(E_{a'} + \hbar\omega)\chi_d(E_{d'} - \hbar\omega) \right\rangle \right|^2 d\omega = \quad (3.1.2.4) \\ &= \frac{1}{\hbar^2} \int_0^\infty U^2 S_a^2(E_a, E_a + h\nu) S_d^2(E_{d'}, E_{d'} - h\nu) d\nu \end{aligned}$$

onde

$$\begin{aligned} U^2 &= \left| \left\langle \Phi_a(E_a)\Phi_{d'}(E_{d'}) \left| \frac{\kappa |\mathbf{p}_a| |\mathbf{p}_d|}{n^2 r_{ad}^3} \right. \right. \right. \\ &\quad \left. \left. \Phi_{a'}(E_{a'} + \hbar\omega)\Phi_d(E_{d'} - \hbar\omega) \right\rangle \right|^2 = \\ &= \frac{\kappa^2 |\mathbf{p}_a|^2 |\mathbf{p}_d|^2}{n^4 r_{ad}^6} \end{aligned}$$

$$S_a^2(E_a, E_a + h\nu) = \left| \left\langle \chi_a(E_a) \left| \chi_{a'}(E_a + h\nu) \right\rangle \right|^2$$

$$S_d^2(E_{d^*}, E_{d^*} - h\nu) = \left| \langle \chi_{d^*}(E_{d^*}) | \chi_d(E_{d^*} - h\nu) \rangle \right|^2$$

U^2 é a energia de interação entre os dipolos, S_a^2 e S_d^2 representam as integrais de sobreposição vibracional do aceitador e do doador, respectivamente. Logo, a eq.(3.1.2.4) assume a forma

$$k_{FRET} = \frac{\kappa^2}{\hbar^2 n^4 r_{ad}^6} \int |\mathbf{p}_a|^2 S_a^2(E_a, E_a + h\nu) |\mathbf{p}_d|^2 S_d^2(E_{d^*}, E_{d^*} - h\nu) d\nu \quad (3.1.2.5)$$

Através da introdução dos fatores de Boltzmann g e integração sobre todos os estados iniciais possíveis, tem-se a taxa total de transferência por FRET:

$$k_{FRET\ total} = \frac{\kappa^2}{\hbar^2 n^4 r_{ad}^6} \int \left[|\mathbf{p}_a|^2 \int g(E_a) S_a^2(E_a, E_a + h\nu) dE_a \right] \left[|\mathbf{p}_d|^2 \int g(E_{d^*}) S_d^2(E_{d^*}, E_{d^*} - h\nu) dE_{d^*} \right] d\nu \quad (3.1.2.6)$$

a conexão entre a eq.(3.1.2.6) e as quantidades espectroscópicas observáveis é dada por:

$$\varepsilon_a(\nu) = \frac{2^2 \pi^2 N |\mathbf{p}_a|^2 \nu}{3(\ln 10) n \hbar c} \int g(E_a) S_a^2(E_a, E_a + h\nu) dE_a \quad (3.1.2.7)$$

$$f_d(\nu) = \frac{2^5 \pi^3 n \tau_d |\mathbf{p}_d|^2 \nu^3}{3 \hbar c^3} \int g(E_{d^*}) S_d^2(E_{d^*}, E_{d^*} - h\nu) dE_{d^*} \quad (3.1.2.8)$$

$\varepsilon_a(\nu)$ é o coeficiente de extinção molar; $f_d(\nu)$ é a intensidade fluorescente, normalizada a 1 pela área; τ_d é o tempo de vida fluorescente do doador; N é o número de moléculas por milimol. Através da inserção destas equações na eq.(3.1.2.6) obtém-se a taxa de transferência de energia por FRET:

$$k_{FRET\ total} = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2}{128\pi^5 n^4 N \tau_d r_{md}^6} \int \frac{f_d(\nu)\varepsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (3.1.2.9)$$

A equação de Förster para a taxa de transferência de energia pode ser deduzida também de maneira inteiramente clássica, onde o sistema quântico do aceitador é substituído pelo Modelo Molecular de Lorentz que aproxima o movimento do elétron da molécula aceitadora pela equação de movimento amortecido

$$\ddot{\mathbf{r}} + \gamma \dot{\mathbf{r}} + \omega_0^2 \mathbf{r} = \frac{\mathbf{F}_0}{m_e} e^{i\omega t}$$

onde $\frac{\mathbf{F}_0}{m_e} e^{i\omega t}$ é a força exercida ao elétron pelo campo elétrico do dipolo

hertziano. A dedução clássica de $k_{FRET\ total}$, mostrada no apêndice A (seção A.2), foi elaborada tendo como ponto de partida um breve resumo para a taxa clássica de FRET feito por Hoch & Knox (1968).

3.2. Decaimento Fluorescente Observado e FRET para o Caso em que a Distância Doador-Aceitador não é Fixa.

3.2.1. Decaimento fluorescente e integral de convolução.

Quando um pulso de luz atinge uma solução contendo uma amostra fluorescente, ocorre absorção de fótons pela amostra e subsequente desexcitação por mecanismos conhecidos como emissão fluorescente, FRET, conversão interna e outros. Num espectrofluorímetro temporal, a medida observada da desexcitação por fluorescência no tempo é dada pela integral de convolução [Badea & Brand (1971); Yguerabide (1972)]:

$$R(t) = (f * L)(t) = \int_0^t f(t') L(t-t') dt' \quad (3.2.1.1)$$

onde $R(t)$ é o número de contagens dos decaimentos fluorescentes no tempo t , $f(t)$ é uma função que corresponde à cinética correta da intensidade de decaimento quando a amostra é excitada por um único pulso instantâneo de luz. A curva $L(t)$ dá forma a um pulso real, não-instantâneo, com certa largura temporal e que tem origem em fatores instrumentais. Tal pulso real é conhecido como o *perfil da lâmpada*.

Podemos interpretar o pulso real que caracteriza o perfil da lâmpada como uma soma de inúmeros pulsos unitários instantâneos com largura temporal

infinitesimal (fig.3.2.1.1.a). O número de fótons absorvidos pela molécula fluorescente por pulso instantâneo é dado por:

$$\lim_{\Delta t \rightarrow 0} L(t) \cdot \Delta t \quad (3.2.1.2)$$

A intensidade do decaimento fluorescente no tempo t , após a excitação da amostra por pulso instantâneo (fig. 3.2.1.1.b), é dada por:

$$r_i(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} L(t) \cdot \Delta t \cdot f(t - t_i) \quad (3.2.1.3)$$

onde $f(t - t_i)$ é a função que dá forma ao decaimento após excitação por pulso instantâneo; o argumento de f expressa o fato de que o decaimento é medido a partir de pulso instantâneo iniciado em $t = t_i$, de modo que $f(t - t_i) = 0$ para $t < t_i$.

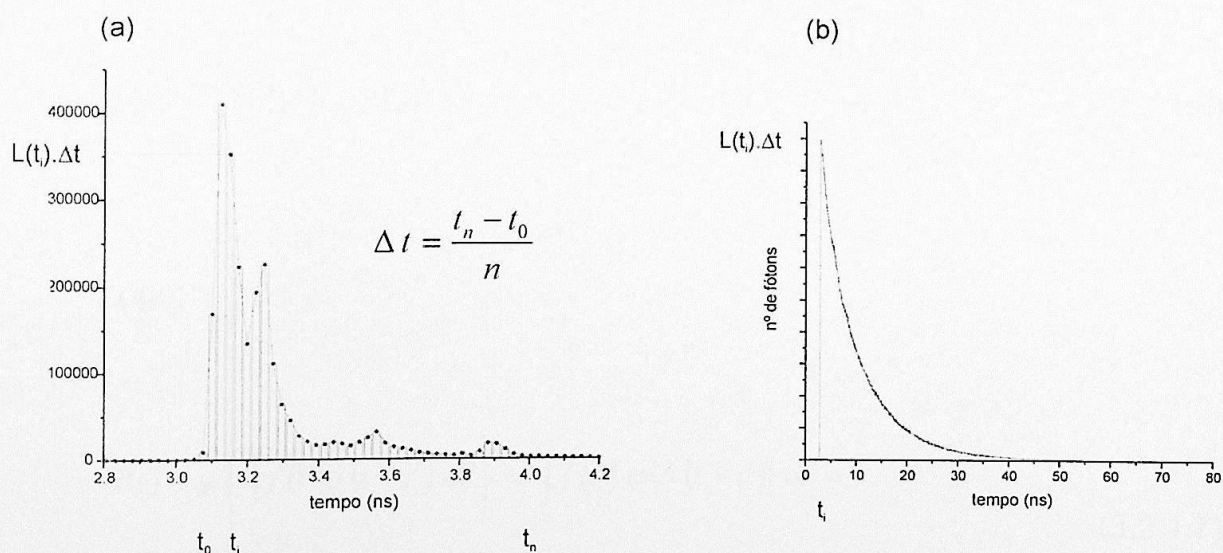


Fig. 3.2.1.1. (a) Perfil da lâmpada, composto por n 'pulsos instantâneos', com resolução de picossegundos; (b) Curva de decaimento fluorescente após excitação por pulso instantâneo.

Na ausência de efeitos ópticos não lineares a superposição de respostas infinitesimais $r_i(t)$ até o tempo t dá o decaimento total observado:

$$\begin{aligned} R(t) &= \lim_{\substack{\Delta t \rightarrow 0 \\ n \rightarrow \infty}} \sum_{i=0}^n L_n(t_i) \cdot f(t - t_i) \cdot \Delta t \rightarrow \\ &\rightarrow \int_0^t L(t') f(t - t') dt' = \\ &= (L * f)(t) \end{aligned} \tag{3.2.1.4}$$

A equação $R(t)$ é, de modo geral, uma função-resposta a uma função-entrada $f(t)$ [Hsu (1987)]:

$$R(t) = \wp\{f(t)\} \tag{3.2.1.5}$$

onde \wp é um certo operador linear. A função-entrada f pode ser escrita na forma integral da função delta de Dirac:

$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t') \delta(t - t') dt' \tag{3.2.1.6}$$

Logo:

$$\begin{aligned} R(t) &= \wp\left\{ \int_{-\infty}^{+\infty} f(t') \delta(t - t') dt' \right\} = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t') \wp\{\delta(t - t')\} dt' = \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} f(t') L(t - t') dt' \end{aligned} \tag{3.2.1.7}$$

onde $L(t-t')$ é a função-resposta do sistema a um impulso unitário instantâneo. Como $L(t-t')=0$ e $f(t')=0$ para $0 < t < t'$, a eq.(3.2.1.7) adquire a forma da eq.(3.2.1.1):

$$R(t) = \int_0^t f(t') L(t-t') dt' \quad (3.2.1.8)$$

Ao fazer a substituição $u = t - t'$, obtém-se:

$$\begin{aligned} R(t) &= (f * L)(t) = \int_0^t L(u) f(t-u) du = \\ &= (L * f)(t) \end{aligned} \quad (3.2.1.9)$$

o que mostra que a convolução é comutativa.

3.2.2. Deconvolução e obtenção da função de decaimento $f(t)$.

Como visto na seção 3.2.1, a curva de decaimento fluorescente observada $R(t)$ é distorcida por fatores instrumentais e não representa a cinética correta do decaimento $f(t)$. A obtenção de $f(t)$ é realizada mediante a deconvolução de $R(t) = (f * L)(t)$. Diversos métodos de deconvolução são conhecidos, como o Método da Transformada de Laplace, o Método da Transformada de Fourier e o Método dos Momentos. Outro método, chamado de *Método de Reconvolução Iterativa*, faz uso de uma soma de funções exponenciais para o decaimento $f(t)$:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n B_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (3.2.2.1)$$

A eq.(3.2.2.1) é uma soma de decaimentos que obedecem a uma cinética de 1ª ordem. O índice n da somatória diz respeito ao número de espécies fluorescentes distintos de uma mesma molécula que podem coexistir em solução (espécies protonadas, não-protonadas, etc.), capazes de emitir de maneira independente e simultânea. O parâmetro τ_i caracteriza o tempo de vida no estado excitado da espécie i , B_i expressa a sua quantidade relativa e é comumente chamado de fator pré-exponencial.

Na reconvolução iterativa, valores iniciais dos parâmetros τ_i e B_i são selecionados e $f(t)$ é numericamente convoluido com $L(t)$ de modo a obter valores $R'(t)$; esses valores são comparados com os observados $R(t)$. Ajustes posteriores dos parâmetros são feitos iterativamente até se encontrar o melhor valor para $R'(t)$ segundo o critério de chi-quadrado reduzido:

$$\chi_{red}^2 = \sum_i \omega_i \frac{[R'(t) - R(t)]^2}{n - p - 1} \quad (3.2.2.2)$$

onde ω_i é o fator de peso estatístico, n é o número de medidas realizadas e p é o número de parâmetros da função ajustada. No caso do decaimento, tem-se $\omega_i = \frac{1}{R(t)}$, que é o fator de peso segundo a estatística de Poisson. Valores

contidos no intervalo $1 \leq \chi_{\text{red}}^2 < 1,2$ são indicadores de bom ajuste e aqueles tais que $\chi_{\text{red}}^2 > 2$ devem ser descartados.

O espectrofluorímetro com resolução temporal SPTC, do Grupo de Biofísica e Física Médica do IFUSP, traz consigo um programa para a determinação de $f(t)$ pelo Método de Reconvolução Iterativa, baseado no algoritmo de Marquardt. Um exemplo de ajuste feito por esse algoritmo é mostrado na fig.3.2.2 onde, ao decaimento observado de RKK4 em 97% v/v de TFE, obtiveram-se os parâmetros $\tau_1 = (8,120 \pm 0,026) \cdot 10^{-9} s$, $\tau_2 = (3,66 \pm 0,15) \cdot 10^{-9} s$, $\tau_3 = (3,576 \pm 0,031) \cdot 10^{-10} s$, $B_1 = 0,137 \pm 0,002$, $B_2 = 0,036 \pm 0,001$ e $B_3 = 0,066 \pm 0,006$, com $\chi_{\text{red}}^2 = 1,127$.

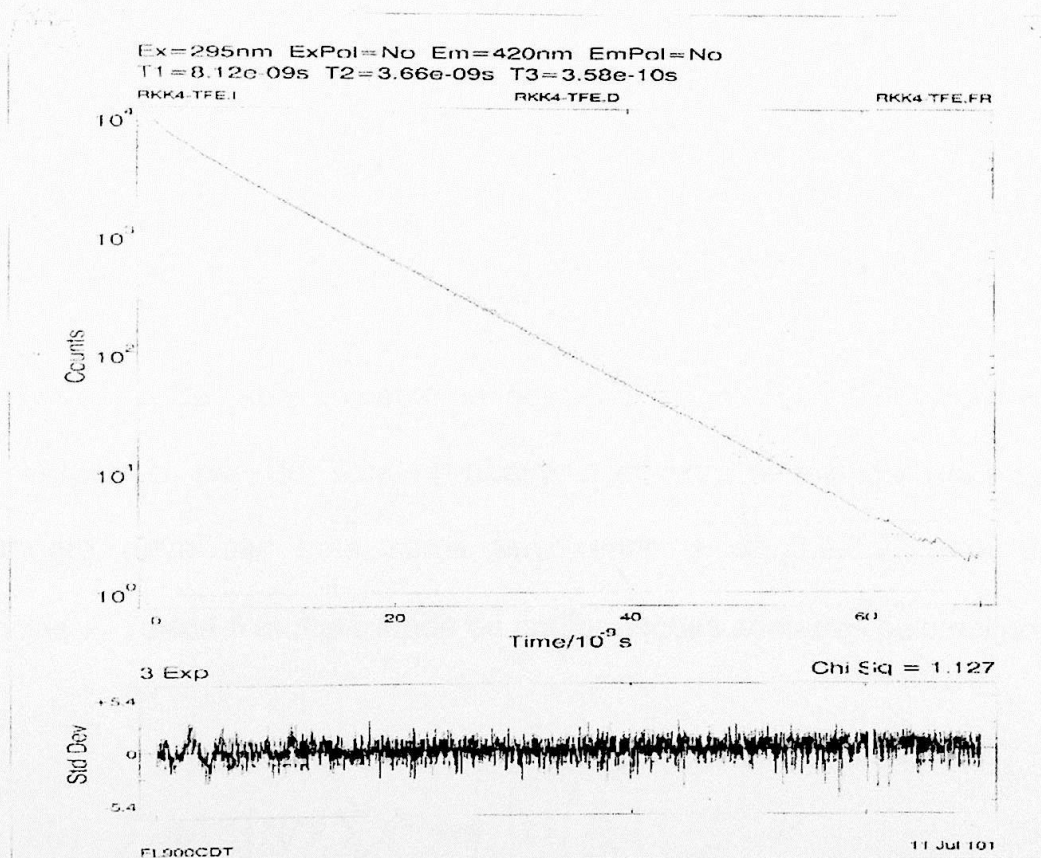


Fig.3.2.2. Curva de decaimento (linha preta), ajustada ao decaimento observado (pontilhados) através do Método de Reconvolução Iterativa, baseado no algoritmo de Marquardt.

3.2.3. Decaimento fluorescente observado e FRET.

Na presença de uma molécula aceitadora, o tempo de vida da molécula fluorescente no estado excitado reduz-se devido à transferência de energia por FRET. A taxa de decaimento é o inverso do tempo de vida, e a eq. 1.3.1 - que dá a taxa total por espécie - pode ser rescrita na forma

$$\tau_i^{(ad)-1} = \tau_i^{(d)-1} + \tau_i^{FRET-1} = \tau_i^{(d)-1} \left[1 + \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 \right] \quad (3.2.3.1)$$

Vê-se que a taxa total de decaimento depende da distribuição da distância doador-aceitador. Para uma distância fixa r_{ad} , a eq.(3.2.1.4) adquire a forma

$$R(r_{ad}, t) = \int_0^t L(t') \left\{ \sum_{i=1}^n B_i^{(ad)} \exp \left[- \left[1 + \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 \right] \frac{t-t'}{\tau_i^{(d)}} \right] \right\} dt' \quad (3.2.3.2)$$

No caso de uma amostra de peptídeo em solução, contendo em suas extremidades o par de sondas doador-aceitador, a medida observada de decaimento deve ser uma soma envolvendo a eq.(3.2.3.2) para diversas distâncias r_{ad} , dada a multiplicidade de conformações adotadas pelo polipeptídeo:

$$R(t) = \sum_{k=1}^m s(r_{ad}^{(k)}) \int_0^t L(t') \left\{ \sum_{i=1}^n B_i^{(ad)} \exp \left[- \left[1 + \left(\frac{R_0}{r_{ad}^{(k)}} \right)^6 \right] \frac{t-t'}{\tau_i^{(d)}} \right] \right\} dt' \quad (3.2.3.3)$$

O termo $s(r_{ad}^{(k)})$ da eq.(3.2.3.3) representa o número de polipeptídeos com conformações tais que $r_{ad} = r_{ad}^{(k)}$. Pode-se generalizar s como uma função contínua que representa o espectro de uma distribuição de distâncias doador-aceitador. Assim:

$$R(t) = \int_{r_{ad}^{(min)}}^{r_{ad}^{(max)}} s(r_{ad}) \int_0^t L(t') \left\{ \sum_{i=1}^n B_i^{(ad)} \exp \left[- \left[1 + \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 \right] \frac{t-t'}{\tau_i^{(d)}} \right] \right\} dt' dr_{ad} \quad (3.2.3.4)$$

A eq.(3.2.3.4), que relaciona o decaimento fluorescente observado no tempo com o espectro de distribuição de distâncias, é conhecida como a integral de Fredholm de 1ª espécie; sua inversão, feita pelo programa CONTIN, fornece o espectro de $s(r_{ad})$ (cap.4).

3.3. CD e Estrutura Secundária de Polipeptídeos.

Quando um campo elétrico uniforme planopolarizado (soma de dois campos de mesma amplitude, circularmente polarizados nos sentidos horário e anti-horário) atravessa uma amostra absorvente opticamente ativa, os campos ainda mantêm-se circularmente polarizados, embora agora com amplitudes e fases distintas uma vez que são absorvidos diferentemente pela amostra. Isso faz com que se tenha um campo elétrico elipticamente polarizado. Este é o fenômeno de Dicroísmo Circular (CD, do inglês 'Circular Dichroism'). Uma breve introdução

teórica ao fenômeno de CD, bem como suas formas de medição, são apresentadas no apêndice C.

O estudo de CD aplicado a cadeias peptídicas tem mostrado uma relação segura entre a estrutura secundária da cadeia e o espectro de CD [Fasman (1996)]. Devido à natureza tetraédrica dos orbitais sp^3 do átomo de carbono, os quatros substituintes diversos podem ocupar dois arranjos diferentes no espaço em torno do carbono, produzindo enantiômeros diferentes. Com exceção única da glicina, todos os aminoácidos essenciais apresentam atividade óptica devido a presença do átomo assimétrico de carbono α (C_α). Numerosos estudos mostram que ao menos qualitativamente a natureza da cadeia lateral do aminoácido não altera marcadamente o espectro de CD, mas há uma dependência significativa entre esse espectro e o tipo de estrutura secundária existente no peptídeo. Espectros utilizados como padrões são elaborados a partir de homopolipeptídeos de estruturas secundárias conhecidas (α -hélices puras, β -folhas puras e conformações secundárias aleatórias puras, os 'random coils'). Esses 3 tipos de espectros representam as bases a partir das quais pode-se estimar a estrutura secundária de uma dada cadeia peptídica em estudo (fig.3.3.3.1). A absorção do grupamento amida da ligação peptídica, que ocorre na região de 190-250 nm (ultravioleta distante), é utilizada na obtenção dos espectros de CD.

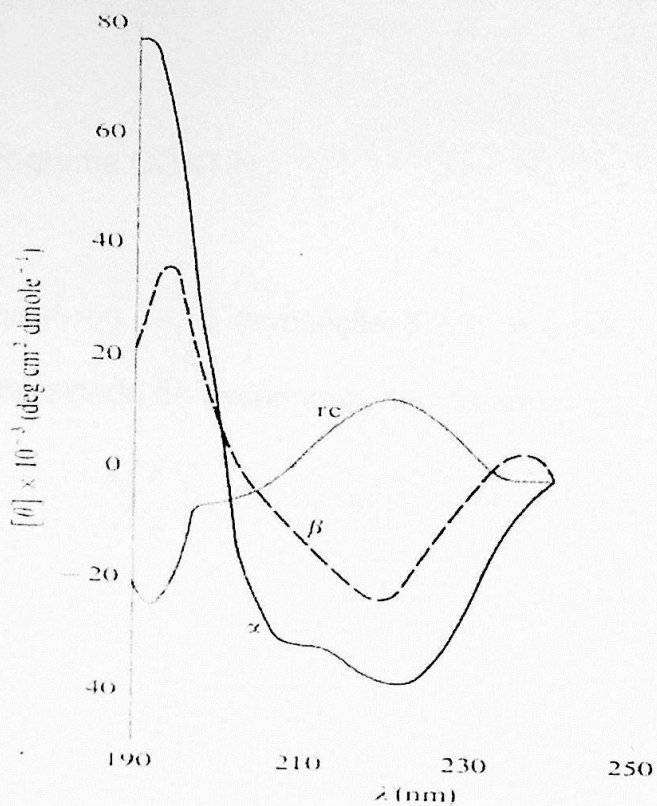


Fig.3.3.3.1. Espectros-padrões de CD para as estruturas secundárias em α -hélice, β -folha e random-coil [Cantor (1980)].

4. ANÁLISE COMPUTACIONAL.

4.1. Programa CONTIN.

Como visto no cap.3 (subseção 3.2.3), a eq.(3.2.3.4) é a expressão que relaciona a intensidade de decaimento fluorescente observado no tempo ao FRET através de $s(r_{ad})$ e $\left(\frac{R_0}{r_{ad}}\right)^6$. Vamos reescrevê-la numa forma sintética [eq.(4.1.1)]:

$$R(t) = \int_{r_{ad}^{(min)}}^{r_{ad}^{(max)}} s(r_{ad}) F(r_{ad}, t) dr_{ad} \quad (4.1.1)$$

onde $F(r_{ad}, t)$ [eq.(4.1.2)] é a integral de convolução para uma distância fixa

r_{ad} .

$$F(r_{ad}, t) = \int_0^{t_k} L(t') \left\{ \sum_{i=1}^n B_i^{(ad)} \exp \left[- \left[1 + \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6 \right] \frac{t - t'}{\tau_i^{(d)}} \right] \right\} dt' \quad (4.1.2)$$

Mas a medida observada de $R(t)$ é sempre acompanhada de erros experimentais; logo, é mais correto escrevê-la na forma

$$R(t_k) = \int_{r_{ad}^{(min)}}^{r_{ad}^{(max)}} s(r_{ad}) F(r_{ad}, t_k) dr_{ad} + \varepsilon_k \quad (4.1.3)$$

onde ε_k é o erro em $R(t_k)$ no tempo t_k .

Um problema se apresenta agora: a inversão da eq.(4.1.3) admite mais de uma solução para $s(r_{ad})$ pois, segundo o lema de Riemann-Lebesgue [Provencher (1982)], se o integrando $F(r_{ad}, t_k)$ é absolutamente integrável, então

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} \int_a^b F(r_{ad}, t_k) A \operatorname{sen}(\omega r_{ad}) dr_{ad} = 0$$

onde A é um valor arbitrário. Para qualquer amplitude A , irá existir sempre um valor de ω tal que $s'(r_{ad}) = s(r_{ad}) + A \operatorname{sen}(\omega r_{ad})$ mantém-se dentro do limite dos erros experimentais, satisfazendo a eq.(4.1.3) :

$$R(t_k) = \int_{r_{ad}^{(min)}}^{r_{ad}^{(max)}} s(r_{ad}) F(r_{ad}, t_k) dr_{ad} + \varepsilon_k \cong \int_{r_{ad}^{(min)}}^{r_{ad}^{(max)}} \underbrace{[s(r_{ad}) + A \operatorname{sen}(\omega r_{ad})]}_{s'(r_{ad})} F(r_{ad}, t_k) dr_{ad}$$

Há assim um conjunto Ω de soluções possíveis $s'(r_{ad})$ que satisfazem a eq.(4.1.2). O erro que se comete ao adotar $s'(r_{ad})$ como solução é dado por

$$s'(r_{ad}) - s(r_{ad}) = A \operatorname{sen}(\omega r_{ad})$$

Esse erro pode ser grande ou pequeno, o que pode induzir a uma solução longe da verdadeira para A grande.

Levando em conta esse problema, foi desenvolvido o programa CONTIN por S. W. Provencher (1982, 1984), que busca obter do conjunto Ω a função $s'(r_{ad})$ que satisfaz o melhor compromisso entre uma solução estável e a mais

adequada à medida observada $R(t)$. O programa CONTIN é versátil e determina $s'(r_{ad})$ a partir de uma equação mais geral que a dada pela eq.(4.1.3):

$$g(t_k) = \int_a^b K(r_{ad}, t_k) \cdot s'(r_{ad}) dr + \sum_{j=1}^{n_{\Theta}} \beta_j \Theta_j(t_k) + \varepsilon_k \quad (4.1.4)$$

O termo $\Theta_j(t_k)$ refere-se a uma função pré-determinada dependente do tempo e β_j é uma constante. Caso haja impurezas fluorescentes na amostra que

não decaem por FRET, é possível adotar $\Theta_j(t_k) = \int_0^{t_k} L(t') \exp\left(-\frac{t_k - t'}{\tau_{impureza_j}}\right) dt'$. Assim, a

eq.(4.1.4) assume a forma

$$\begin{aligned} R(t_k) &= \int_0^1 s'(r_{ad}) F(r_{ad}, t_k) dr_{ad} + \varepsilon_k = \\ &= \int_0^1 s'(r_{ad}) \left\{ \int_0^{t_k} L(t') \cdot \left\{ \sum_{i=1}^n \left\{ B_i^{(ad)} \exp\left[-\left[1 + \left(\frac{R_{\nu}}{r_{ad}}\right)^6\right] \cdot \frac{t_k - t'}{\tau_{di}}\right]\right\} dt' \right\} \right\} dr_{ad} + \\ &+ \sum_{j=1}^{n_I} \beta_j \int_0^{t_k} L(t') \cdot \exp\left(-\frac{t_k - t'}{\tau_{impureza_j}}\right) dt' + \varepsilon_k \end{aligned} \quad (4.1.5)$$

Para a obtenção de $s'(r)$, o programa CONTIN utiliza-se de três estratégias fundamentais que são: (1) o conhecimento *a priori* de certas características de $s(r_{ad})$, como a de que $s(r_{ad}) \geq 0$ e de que $s(r_{ad}^{min}) = s(r_{ad}^{max}) = 0$; isso elimina muitas soluções oscilatórias de Ω . (2) o 'princípio da parcimônia', que pode ser interpretado como um critério que seleciona dentre as soluções possíveis aquela que é a mais simples, com poucos detalhes, mas cujo espectro

é o mínimo necessário para o ajuste adequado ao modelo dado; o princípio da parcimônia pode ocultar certas informações sobre $s(r_{ad})$ mas inibe o aparecimento de meros artifícios numéricos criados para a adequação ao modelo. (3) Conhecimento a priori do erro estatístico relacionado a ε_k , que segue uma distribuição de Poisson no caso do decaimento $R(t_k)$.

4.2. Elaboração do Programa INPUT para a Simulação do Decaimento Fluorescente.

Por meio de um espectro de distribuição de distâncias $s(r_{ad})$ definido *a priori* - que pode ser uma soma normalizada de gaussianas ou qualquer outra fornecida pelo usuário - o programa INPUT simula, através da integração da eq.(4.1.1), o decaimento fluorescente $R(t)$ obtido por um espectrofluorímetro temporal SPTC. O código-fonte de INPUT está no apêndice D e é escrito em linguagem FORTRAN 77. A integração numérica adotada para $R(t)$ é o Método dos Trapézios.

Além da simulação, INPUT gera também um arquivo de entrada com os parâmetros necessários para o programa CONTIN obter $s'(r_{ad})$ a partir da inversão de $R(t)$. Esses parâmetros são essencialmente o decaimento fluorescente observado $R(t)$, os tempos de vida τ_i e os fatores pré-exponenciais B_i que constituem a eq.(4.1.1). O arquivo-fonte do programa INPUT está no apêndice C. Seu fluxograma é apresentado na fig.(4.2.1).

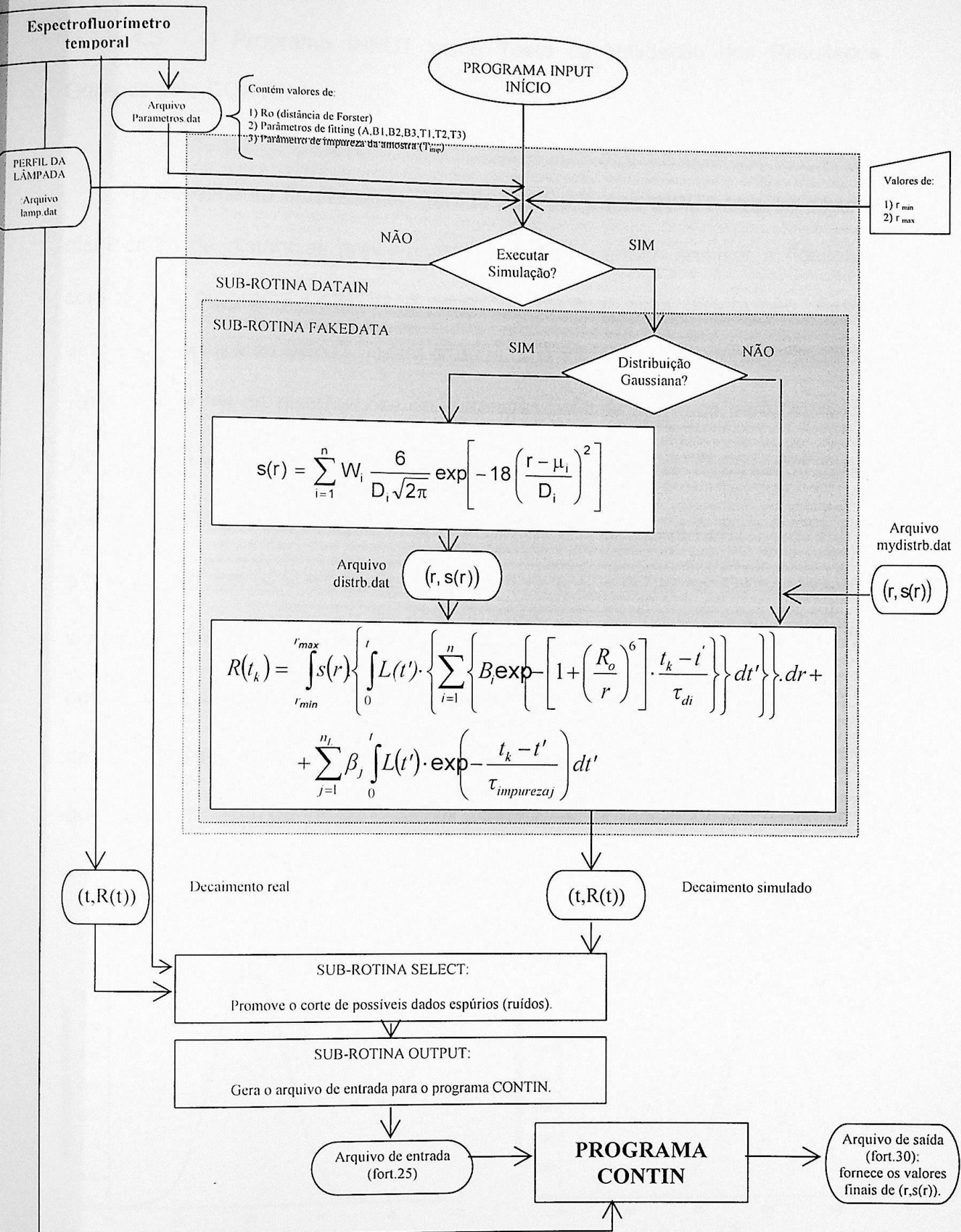
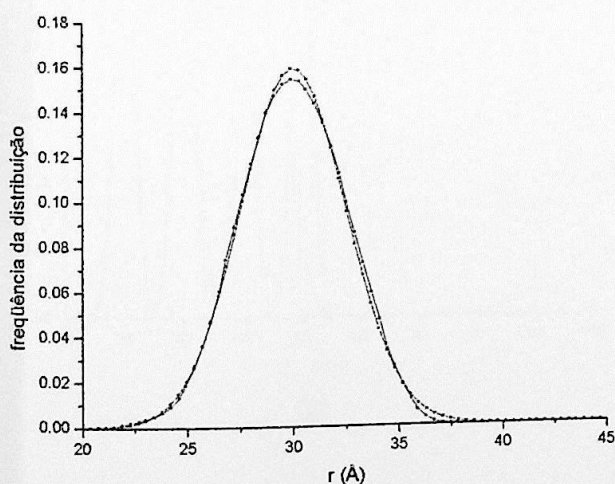


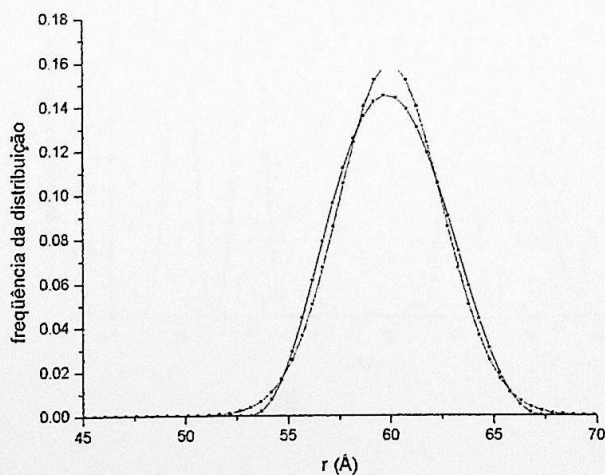
Fig.4.2.1. Fluxograma do programa INPUT e sua relação com o programa CONTIN.

4.3. O Programa INPUT como Teste de Validação dos Resultados Gerados pelo CONTIN.

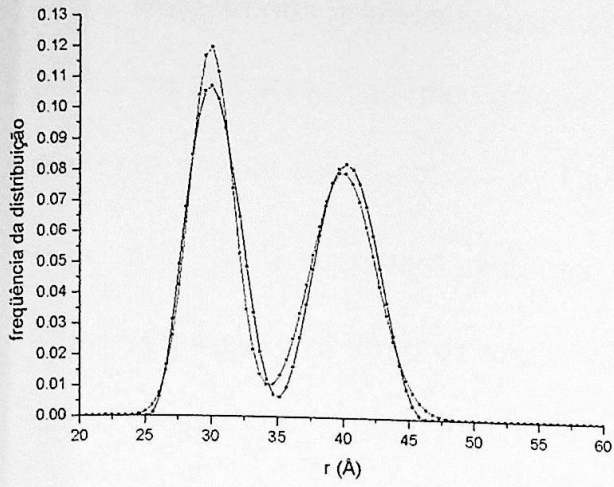
O decaimento fluorescente, gerado pelo programa INPUT através de uma distribuição de distâncias previamente conhecida, permite analisar a fidelidade com que o programa CONTIN é capaz de retornar essa distribuição. Assim, através do programa INPUT, foram criados uma série de decaimentos simulados $R(t)$, resultantes de distribuições de distâncias fictícias $s(r_{ad})$; os parâmetros R_0 , B_1 , τ_1 e $L(t)$ utilizados na simulação são aqueles realmente observados para o polipeptídeo RKK4 em solução TFE / tampão = 0%: $R_0 = 29,4 \text{ \AA}$, $B_1 = 0,159$, $B_2 = 0,025$, $B_3 = 0,028$, $\tau_1 = 8,242 \text{ ns}$, $\tau_2 = 3,249 \text{ ns}$ e $\tau_3 = 0,728 \text{ ns}$. Os decaimentos simulados $R(t)$, obtidos pelo INPUT, foram finalmente submetidos ao CONTIN para gerar a distribuição $s'(r_{ad})$. A comparação entre a distribuição recuperada e a distribuição inicial de entrada no INPUT, $s(r_{ad})$, permite uma avaliação da qualidade do desempenho do CONTIN (figs.4.3.1.a-h).



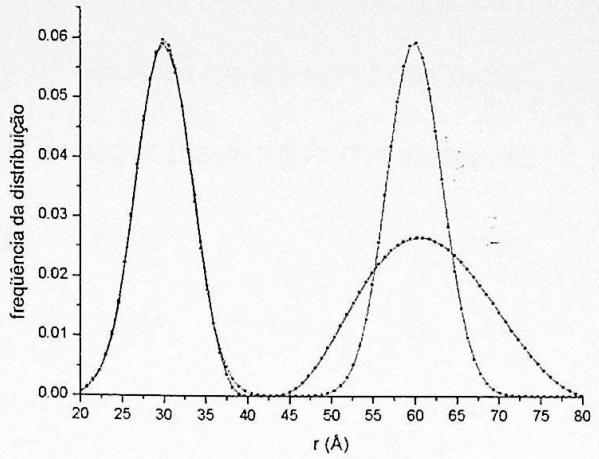
(a)



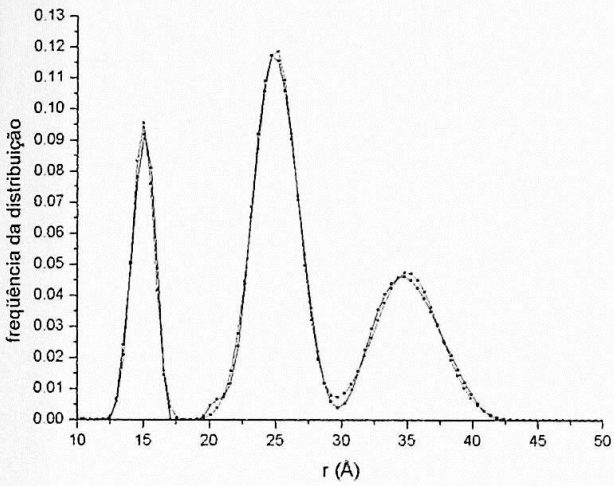
(b)



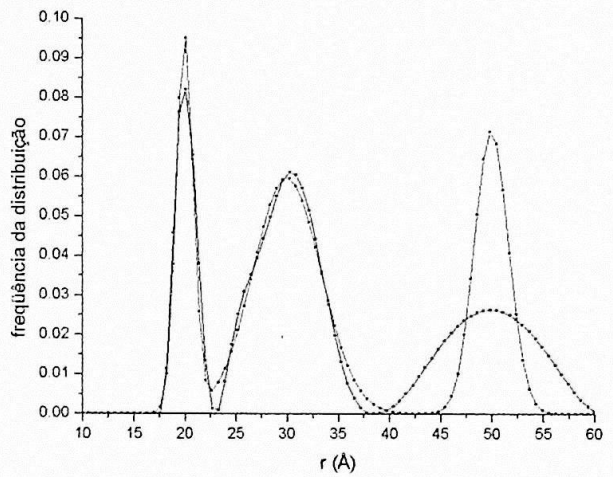
(c)



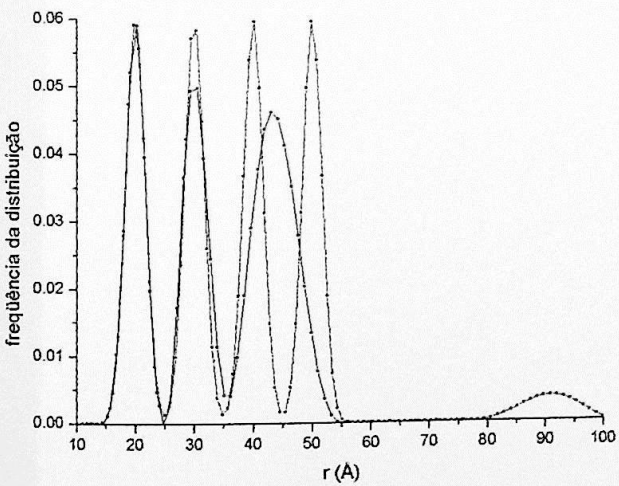
(d)



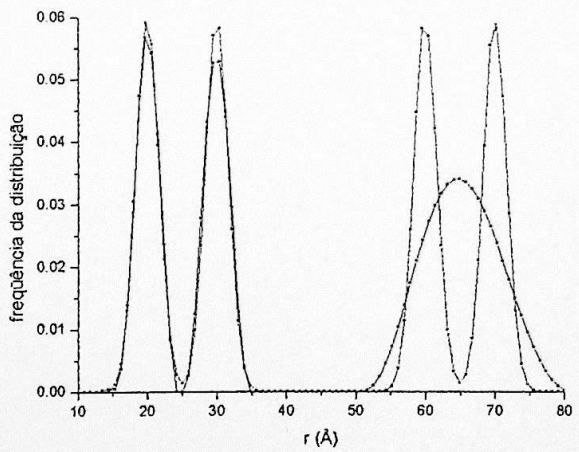
(e)



(f)



(g)



(h)

fig.3.3.1. Comparação entre a distribuição recuperada pelo programa CONTIN (em vermelho) e a distribuição inicial de entrada no programa INPUT (em preto).

Nota-se nos gráficos apresentados que o programa CONTIN reproduz com fidelidade as curvas com pico unitário (figs. a e b). Quando há dois ou mais picos, somente os que se situam em $r_{ad} \lesssim 1,5 \cdot R_0 = 44 \text{ \AA}$ são reproduzidos corretamente (figs. c e e). As curvas postadas em regiões onde $r_{ad} \gtrsim 44 \text{ \AA}$ apresentam dispersão maior em torno de seus picos (figs. d e f) e são, por vezes, uma fusão de curvas distintas (figs. g e h). Essa redução na fidelidade de reconstituição para $r_{ad} \gtrsim 44 \text{ \AA}$ deve-se ao fato de que o argumento de FRET, $\left(\frac{R_0}{r_{ad}}\right)^6$, assume valores muito pequenos, e a exponencial de decaimento $F(r_{ad}, t_k)$ torna-se cada vez menos dependente de r_{ad} , o que acarreta a perda de precisão com que o programa CONTIN é capaz de relacionar $s(r_{ad})$ com $R(t)$.

Portanto, a fidelidade na reconstituição do espectro de distribuição de distâncias pelo CONTIN é reflexo da eficiência com que ocorre o fenômeno de FRET.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.

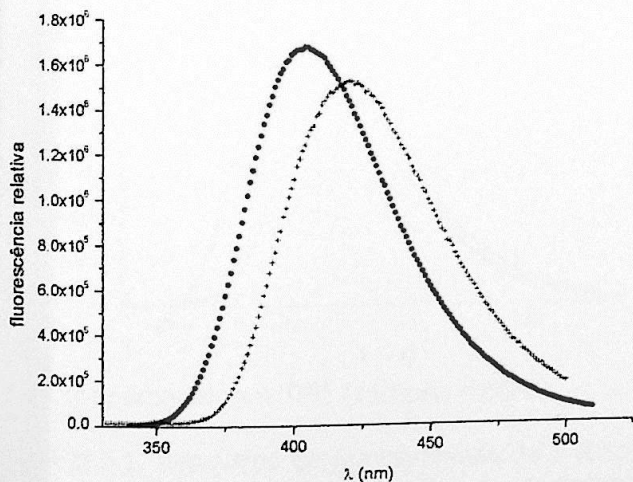
5.1 Rendimento Quântico do Doador KKA.

Experimentalmente, o rendimento quântico do doador (ϕ_d) é obtido pela relação

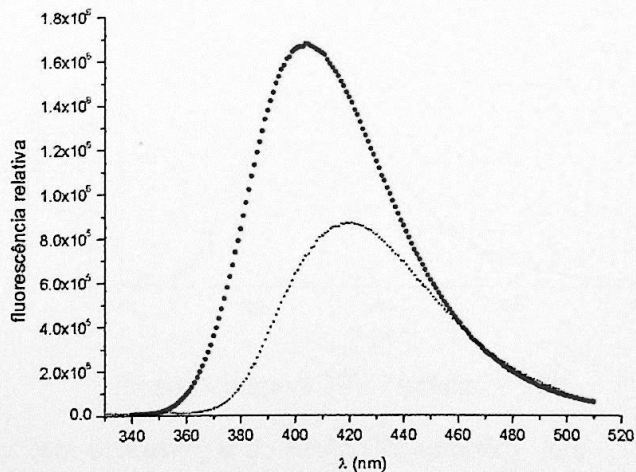
$$\phi_d = \phi_{Abz} \cdot \frac{\text{área sob a curva de fluorescência de KKA}}{\text{área sob a curva de fluorescência de Abz}} \quad (5.1)$$

onde $\phi_{Abz} = 0,60$ é o rendimento quântico padrão do fluoróforo *o*-Abz em solvente etanol.

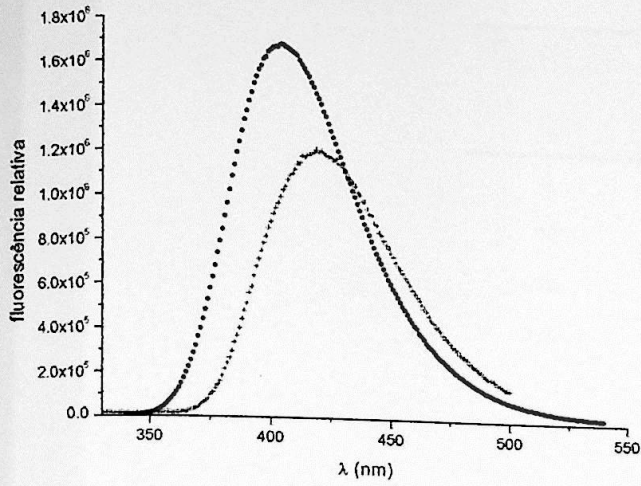
As figuras (5.1.a-h) mostram os espectros de fluorescência do *o*-Abz / etanol e do polipeptídeo KKA em proporções volumétricas V_{TFE}/V_{lepes} iguais a 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 97%. Os rendimentos quânticos, calculados pela eq.(5.1), estão postos na tabela 5.1.



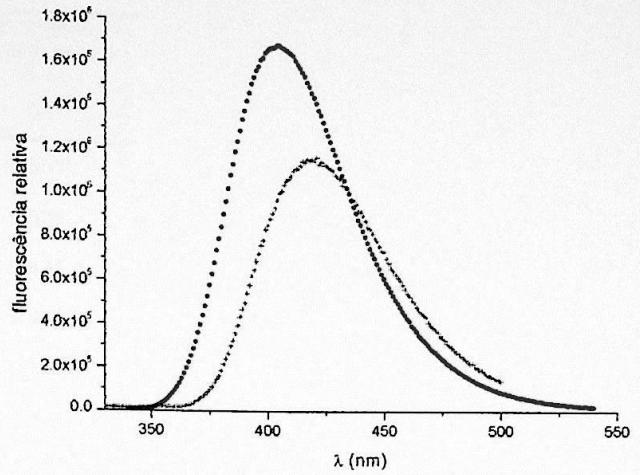
(a) porcentagem TFE / tampão = 0%



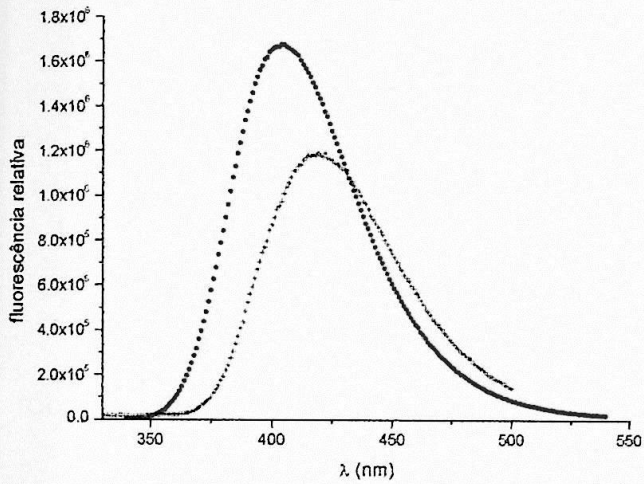
(b) porcentagem TFE / tampão = 10%



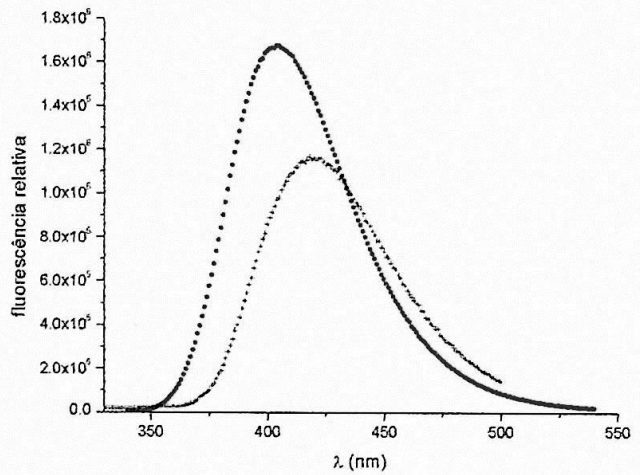
(c) porcentagem TFE / tampão = 20%



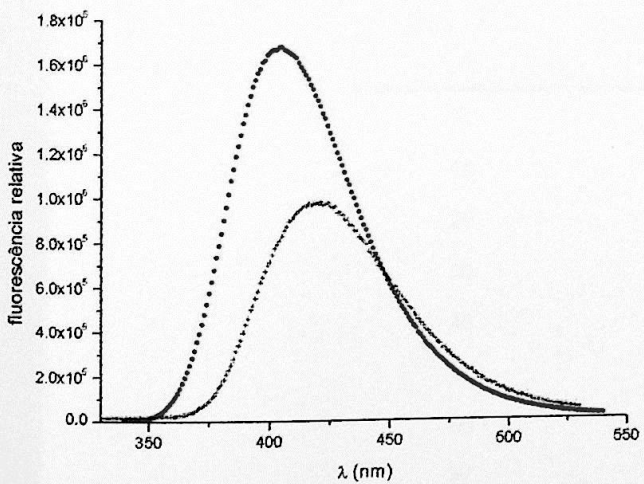
(d) porcentagem TFE / tampão = 30%



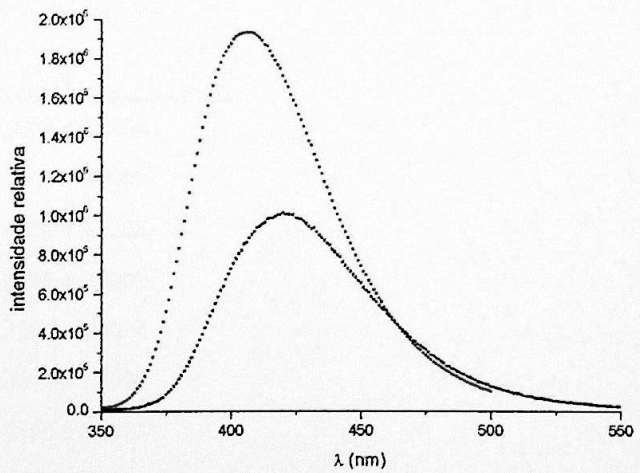
(e) porcentagem TFE / tampão = 40%



(f) porcentagem TFE / tampão = 50%



(g) porcentagem TFE / tampão = 60%



(h) porcentagem TFE / tampão = 97%

Fig.5.1. Espectros de fluorescência do *o*-Abz/etanol (em vermelho) e do KKA/(TFE-tampão) (em preto) obtidos através do espectrofluorímetro estático para proporções volumétricas V_{TFE}/V_{hepes} iguais a 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 97%.

V_{TFE} / V_{hepes}	rendimento quântico para o KKA
%	ϕ_d
0	0,561
10	0.325
20	0.445
30	0.429
40	0.441
50	0.438
60	0.385
97	0,349

Tabela 5.1. Valores do rendimento quântico ϕ_d do KKA.

5.2. Índice de Refração do Meio Solvente TFE / Tampão Hepes.

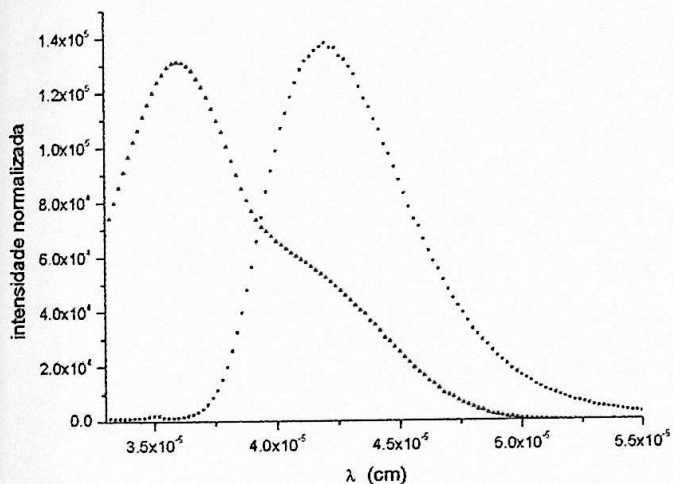
Os valores do índice de refração do meio solvente TFE / tampão hepes, obtidos por meio de um refratômetro, estão apresentados na tabela 5.2.

V_{TFE} / V_{hepes}	índice de refração
%	n
0	1,3339 ± 0,0003
10	1,3330 ± 0,0003
20	1,3322 ± 0,0003
30	1,3288 ± 0,0005
40	1,3258 ± 0,0004
50	1,3215 ± 0,0006
60	1,3155 ± 0,0003
97	1,290 (*)

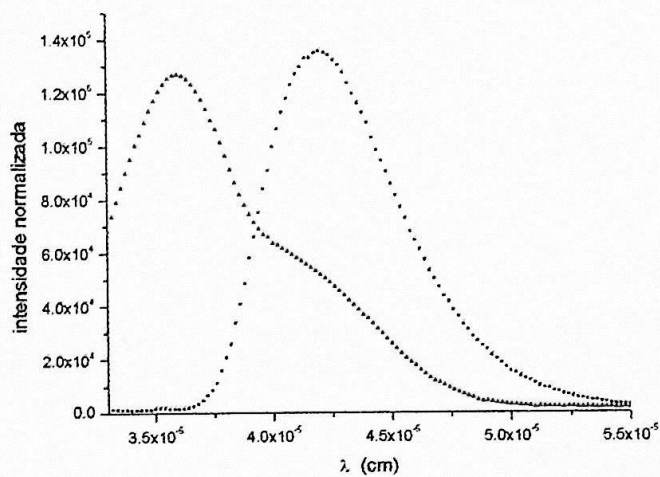
Tabela 5.2. Medidas do índice de refração obtidas em função da porcentagem v/v do solvente TFE em tampão hepes, tomadas a uma temperatura de 21 °C. (*) Valor obtido através do *Handbook of Organic Solvents* (ed. 1995).

5.3. Integral de Sobreposição.

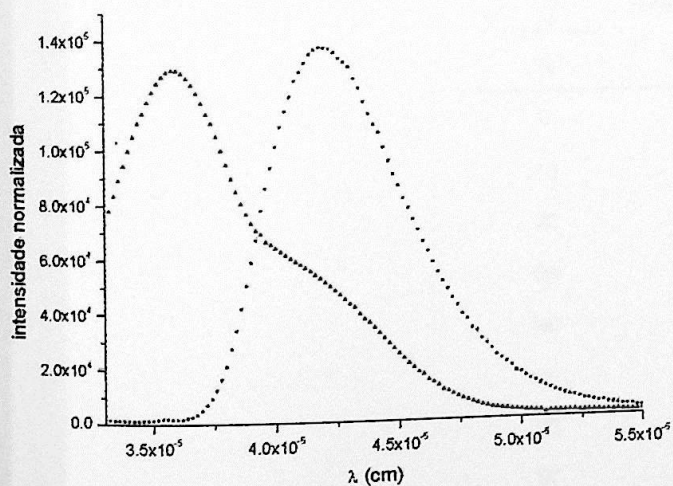
A integral de sobreposição J , que expressa o grau de sobreposição espectral entre a emissão do doador (KKA) e a absorção do aceitador (KKQ), é obtida pela integração em λ no intervalo limitado pela intersecção entre os espectros do coeficiente de extinção do KKQ ($\epsilon_a(\lambda)$) e da intensidade de fluorescência do KKA normalizada a 1 pela área ($F_d(\lambda)$). As figuras (5.3.a-h) ilustram os espectros obtidos de absorção e de fluorescência; nelas, $\epsilon_a(\lambda)$ e $F_d(\lambda)$ estão normalizadas a 1 pelas respectivas áreas para efeito de ilustração.



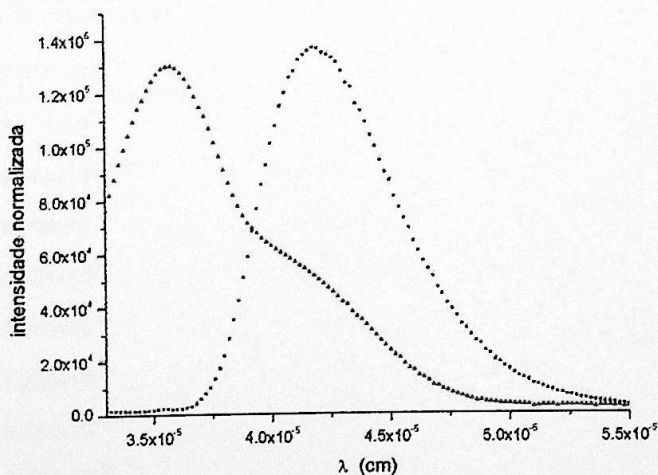
(a) porcentagem TFE / tampão = 0%



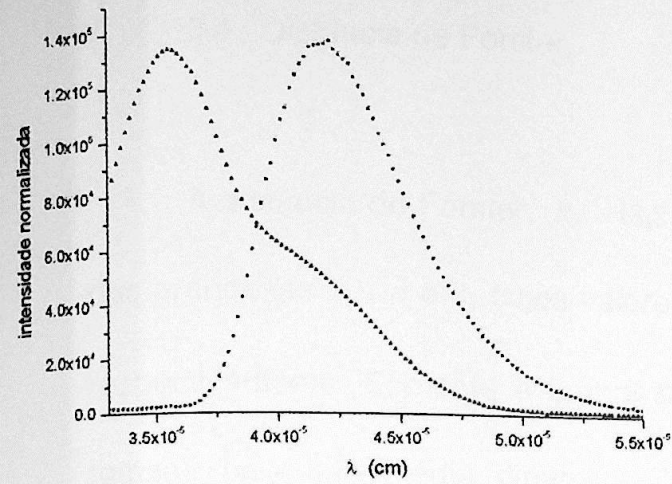
(b) porcentagem TFE / tampão = 10%



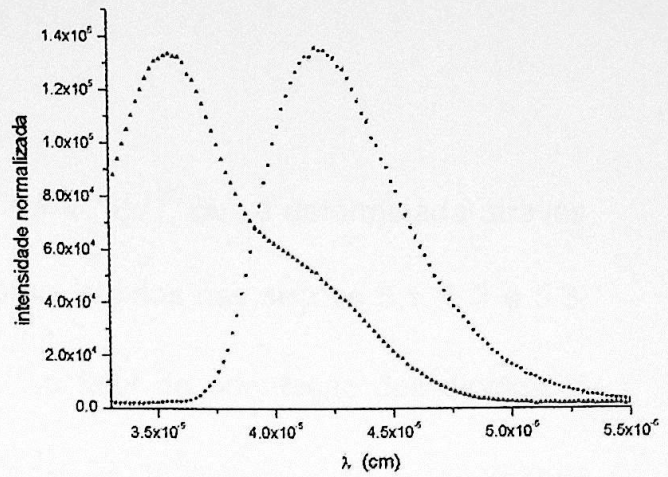
(c) porcentagem TFE / tampão = 20%



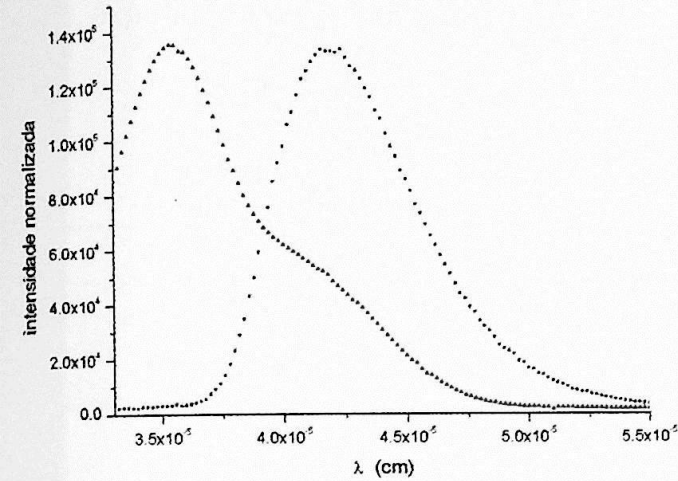
(c) porcentagem TFE / tampão = 30%



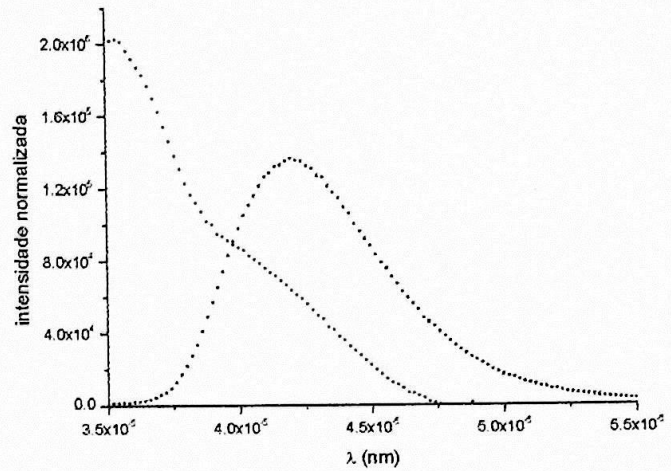
(e) porcentagem TFE / tampão = 40%



(f) porcentagem TFE / tampão = 50%



(g) porcentagem TFE / tampão = 60%



(h) porcentagem TFE / tampão = 97%

Fig.5.3. Espectros normalizados do coeficiente de extinção do KKQ (em vermelho) e da fluorescência do KKA (em preto) para diversas razões da mistura de solventes TFE / tampão hepes.

V_{TFE} / V_{hepes} %	Integral de sobreposição $J \text{ (mol.cm)}^{-1}$
0	$9,274 \times 10^{-15}$
10	$9,489 \times 10^{-15}$
20	$9,066 \times 10^{-15}$
30	$8,528 \times 10^{-15}$
40	$7,665 \times 10^{-15}$
50	$7,239 \times 10^{-15}$
60	$6,742 \times 10^{-15}$
97	$6,675 \times 10^{-15}$

Tabela 5.3. Valores da integral de sobreposição J

5.4. Distância de Förster.

A distância de Förster, $R_0 = (8,8 \cdot 10^{-25} k^2 n^{-4} \phi_d^2 J)^{1/6} \text{ cm}$, é determinada através das grandezas ϕ_d , n e J , cujos valores foram obtidos nas seções 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente. Somente a grandeza k^2 , o fator de orientação dos dipolos, é tomada pela sua média dinâmica $\langle k^2 \rangle = 2/3$. A tabela 5.4 expõe os valores experimentais das grandezas citadas.

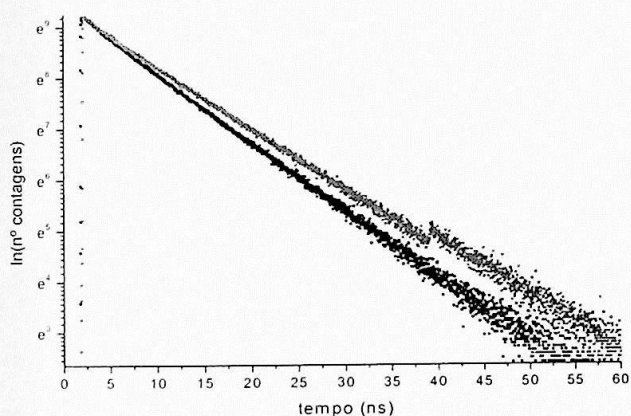
V_{TPE} / V_{hspcs}	índice de refração do meio solvente	rendimento quântico para o KKA	integral de sobreposição	fator de orientação dos dipolos	distância de Förster para o RKK4
%	n	ϕ_d	$J \text{ (mol.cm)}^{-1}$	k^2	$R_0 \text{ (Å)}$
0	$1,3339 \pm 0,0003$	0,561	$9,274 \times 10^{-15}$	2/3	29,4
10	$1,3330 \pm 0,0003$	0,325	$9,489 \times 10^{-15}$	2/3	26,9
20	$1,3322 \pm 0,0003$	0,445	$9,066 \times 10^{-15}$	2/3	28,2
30	$1,3288 \pm 0,0005$	0,429	$8,528 \times 10^{-15}$	2/3	27,8
40	$1,3258 \pm 0,0004$	0,441	$7,665 \times 10^{-15}$	2/3	27,5
50	$1,3215 \pm 0,0006$	0,438	$7,239 \times 10^{-15}$	2/3	27,2
60	$1,3155 \pm 0,0003$	0,385	$6,742 \times 10^{-15}$	2/3	26,4
97	1,290	0,349	$6,675 \times 10^{-15}$	2/3	24,0

Tabela 5.4. Resumo dos valores de ϕ_d , n e J , calculados nas seções 5.1, 5.2 e 5.3. A grandeza k^2 é dada pela sua média dinâmica $\langle k^2 \rangle = 2/3$. A última coluna fornece a medida calculada de R_0 a partir desses valores.

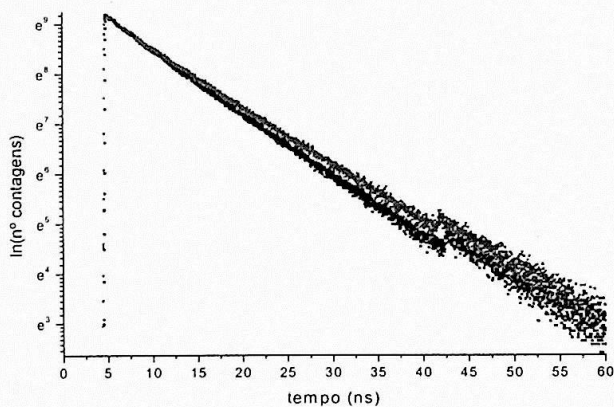
5.5. Fluorescência Resolvida no Tempo.

5.5.1. Decaimento temporal.

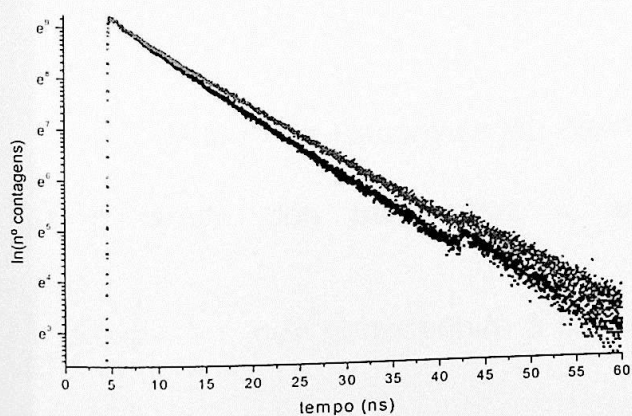
As curvas logarítmicas de decaimento fluorescente (figs.5.5.1.a-h), obtidas através do espectrofluorímetro temporal, mostram-se ligeiramente côncavas, sobretudo no início dos tempos de decaimento, evidenciando seu caráter não mono-exponencial. As comparações entre os decaimentos fluorescentes de KKA e RKK4 demonstram a redução do decaimento fluorescente deste último devido ao fenômeno de FRET.



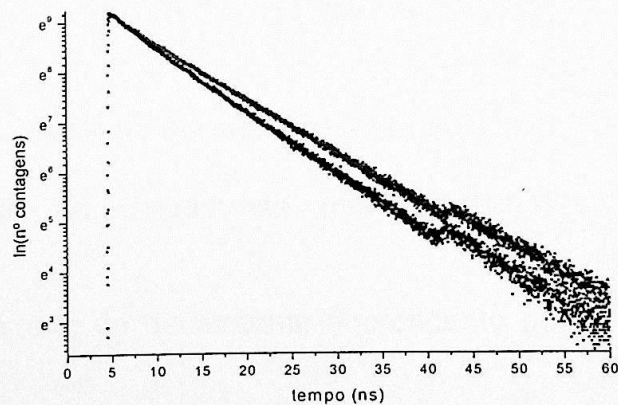
(a) porcentagem TFE / tampão = 0%



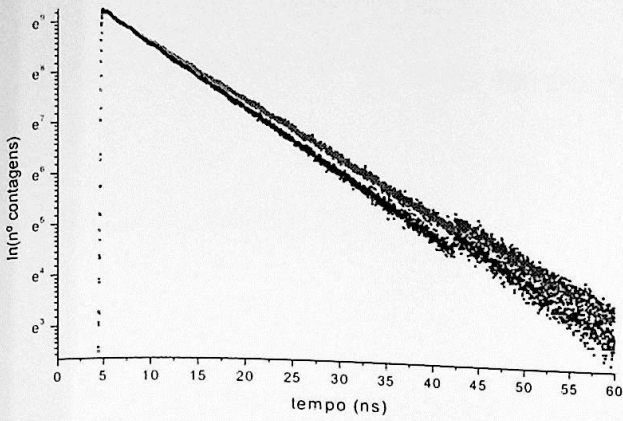
(b) porcentagem TFE / tampão = 10%



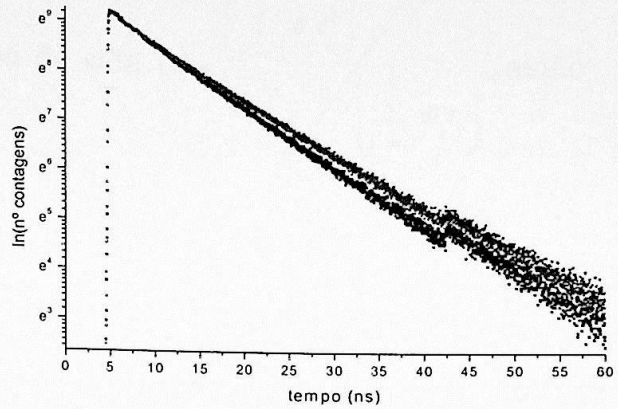
(c) porcentagem TFE / tampão = 20%



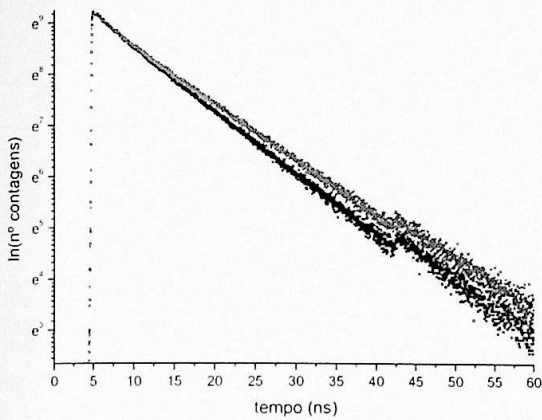
(d) porcentagem TFE / tampão = 30%



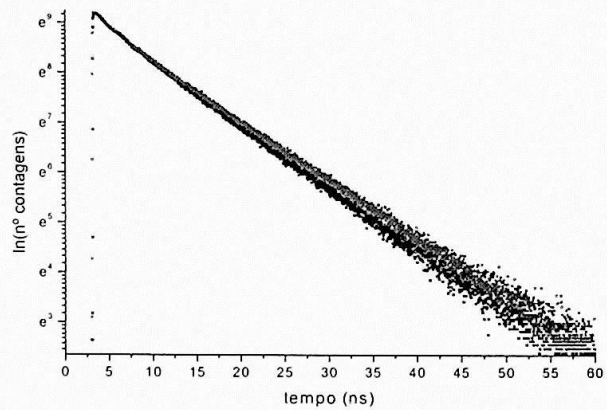
(e) porcentagem TFE / tampão = 40%



(f) porcentagem TFE / tampão = 50%



(g) porcentagem TFE / tampão = 60%



(h) porcentagem TFE / tampão = 97%

Fig.5.5.1. Curvas de decaimento temporal da fluorescência do polipeptídeo KKA (em vermelho) e do polipeptídeo RKK4 (em preto).

5.5.2. Curva de ajuste.

O Método de Reconvolução Iterativa, baseado no algoritmo de Marquardt, faz o ajuste dos parâmetros τ_i e B_i do decaimento multiexponencial

$\sum_{i=1}^3 B_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$, que corresponde à melhor curva de decaimento fluorescente por

pulso instantâneo pelo critério de χ^2_{red} . Os valores de τ_i e B_i assim obtidos, bem

como os valores de χ^2_{red} e do tempo médio de vida $\langle \tau \rangle = \frac{\left(\sum_{i=1}^3 B_i \tau_i^2 \right)}{\left(\sum_{i=1}^3 B_i \tau_i \right)}$, estão

listados na tabela 5.5.2.

$V_{m2}/V_{s,ns}$ %	Polipeptídeo KKA				Polipeptídeo RKK4			
	tempos de vida	tempo médio de vida	fatores pré-exponenciais	chi-quadrado reduzido	tempos de vida	tempo médio de vida	fatores pré-exponenciais	chi-quadrado reduzido
	τ_d (ns)	$\langle \tau_d \rangle$ (ns)	B (% rel)	χ^2_{red}	τ_{ad} (ns)	$\langle \tau_{ad} \rangle$ (ns)	B (% rel)	χ^2_{red}
0	8,242 ± 0,019	7,946 ± 0,010	80,6 ± 1,4	1,035	7,598 ± 0,025	7,228 ± 0,015	75,0 ± 1,7	1,015
	3,25 ± 0,36		9,5 ± 0,7		3,64 ± 0,32		11,8 ± 0,7	
	0,728 ± 0,15		9,9 ± 1,1		0,658 ± 0,099		13,2 ± 1,3	
10	8,868 ± 0,029	8,451 ± 0,019	73,0 ± 1,5	1,177	8,209 ± 0,022	7,791 ± 0,010	67,6 ± 1,3	1,136
	4,31 ± 0,25		12,4 ± 0,8		3,58 ± 0,15		13,2 ± 0,6	
	0,411 ± 0,039		14,6 ± 1,1		0,222 ± 0,020		19,2 ± 1,5	
20	9,182 ± 0,022	8,805 ± 0,010	73,5 ± 1,1	1,145	8,298 ± 0,020	7,856 ± 0,010	71,6 ± 1,2	1,156
	3,79 ± 0,21		10,9 ± 0,5		3,43 ± 0,15		14,9 ± 0,5	
	0,355 ± 0,032		15,6 ± 1,0		0,360 ± 0,016		13,4 ± 1,3	
30	9,384 ± 0,024	8,948 ± 0,011	72,3 ± 1,2	1,145	8,254 ± 0,024	7,781 ± 0,011	71,3 ± 1,3	1,125
	4,00 ± 0,20		12,4 ± 0,5		3,64 ± 0,17		15,8 ± 0,6	
	0,384 ± 0,035		15,3 ± 1,0		0,423 ± 0,018		12,9 ± 1,1	
40	9,455 ± 0,025	8,975 ± 0,010	71,3 ± 1,1	1,157	8,601 ± 0,031	8,063 ± 0,021	71,1 ± 1,5	1,139
	3,99 ± 0,20		13,2 ± 0,5		4,15 ± 0,19		17,6 ± 0,9	
	0,458 ± 0,041		15,5 ± 1,0		0,496 ± 0,057		11,3 ± 0,9	
50	9,443 ± 0,027	8,889 ± 0,015	69,9 ± 1,2	1,183	8,522 ± 0,026	8,016 ± 0,015	71,2 ± 1,3	1,138
	4,21 ± 0,18		15,5 ± 0,6		3,85 ± 0,17		16,5 ± 0,7	
	0,490 ± 0,045		14,6 ± 0,9		0,456 ± 0,051		12,3 ± 0,9	
60	9,441 ± 0,025	8,864 ± 0,011	70,0 ± 1,2	1,236	8,534 ± 0,028	7,987 ± 0,014	68,5 ± 1,4	1,126
	4,10 ± 0,17		16,7 ± 0,6		4,03 ± 0,16		17,4 ± 0,8	
	0,497 ± 0,020		13,3 ± 1,1		0,393 ± 0,041		14,1 ± 1,2	
97	8,524 ± 0,015	8,011 ± 0,002	54,5 ± 2,1	1,036	8,120 ± 0,026	7,512 ± 0,011	57,3 ± 1,7	1,127
	2,88 ± 0,13		10,8 ± 0,5		3,66 ± 0,15		15,1 ± 0,7	
	0,294 ± 0,014		34,7 ± 3,9		0,358 ± 0,031		27,6 ± 2,7	

Tabela 5.5.2 Valores dos parâmetros τ_i e B_i (B_i é dado em porcentagem relativa por espécie i) obtidos pelo método de reconvolução iterativa baseado no algoritmo de Marquardt. Na tabela estão presentes também seu chi-quadrado reduzido e o tempo médio de vida $\langle \tau \rangle$.

A redução de $\langle \tau \rangle$ que ocorre quando passamos de KKA para RKK4 evidencia a diminuição do decaimento fluorescente devido ao fenômeno de FRET.

5.6. Distribuição de Distâncias.

Os tempos de vida τ_{di} do polipeptídeo KKA, os fatores pré-exponenciais B_i do RKK4, a distância de Förster R_0 , as medidas de decaimento fluorescente do RKK4 ($t, R(t)$) e as medidas do perfil da lâmpada ($t, L(t)$) compõem os principais elementos do arquivo de entrada para o programa CONTIN. O resultado da inversão da eq.(3.3.4), que resulta no espectro de distribuição de distâncias $s(r_{at})$, está apresentado na fig.5.6.

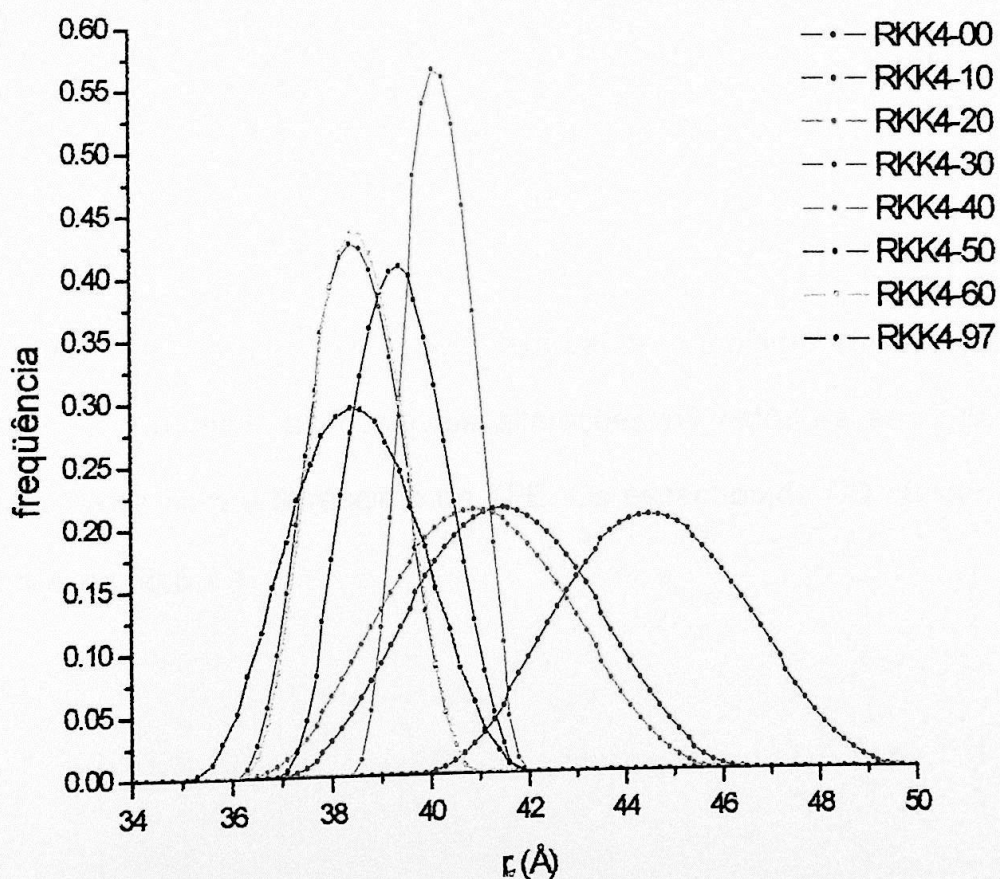


Fig.5.6. Espectros de distribuição para o polipeptídeo RKK4 em diversas razões volumétricas de TFE em tampão hepes.

Os espectros de distribuição de distâncias têm simetria em torno de seus picos r_p . À medida que o solvente TFE é acrescentado à solução de RKK4, há um deslocamento desse pico para valores menores da distância a-d. Quanto à medida de dispersão FWHM - Full Width at Half-Maximum (semi-largura da curva) - pode-se classificar as curvas em 2 grupos distintos: (1) grupo com $\text{FWHM} \geq 4,5$ Å, mais disperso, que compreende as soluções que vão de 0% a 20% v/v de TFE, e (2) grupo com $\text{FWHM} \leq 3,2$ Å, menos disperso, que corresponde a soluções de 30% a 97% v/v de TFE. Levando-se em conta o fato de que o TFE é um indutor de formação de estrutura secundária em α -hélice, as reduções nos valores de r_p e FWHM sugerem uma redução na mobilidade e no comprimento da cadeia peptídica do RKK4 devido ao acréscimo crescente de TFE.

5.7. CD.

Uma análise complementar pela técnica de dicroísmo circular (CD) foi realizada para verificar as possíveis alterações na estrutura secundária do polipeptídeo RKK4 com o acréscimo de TFE. Os espectros de CD obtidos estão apresentados na fig.5.7.1.

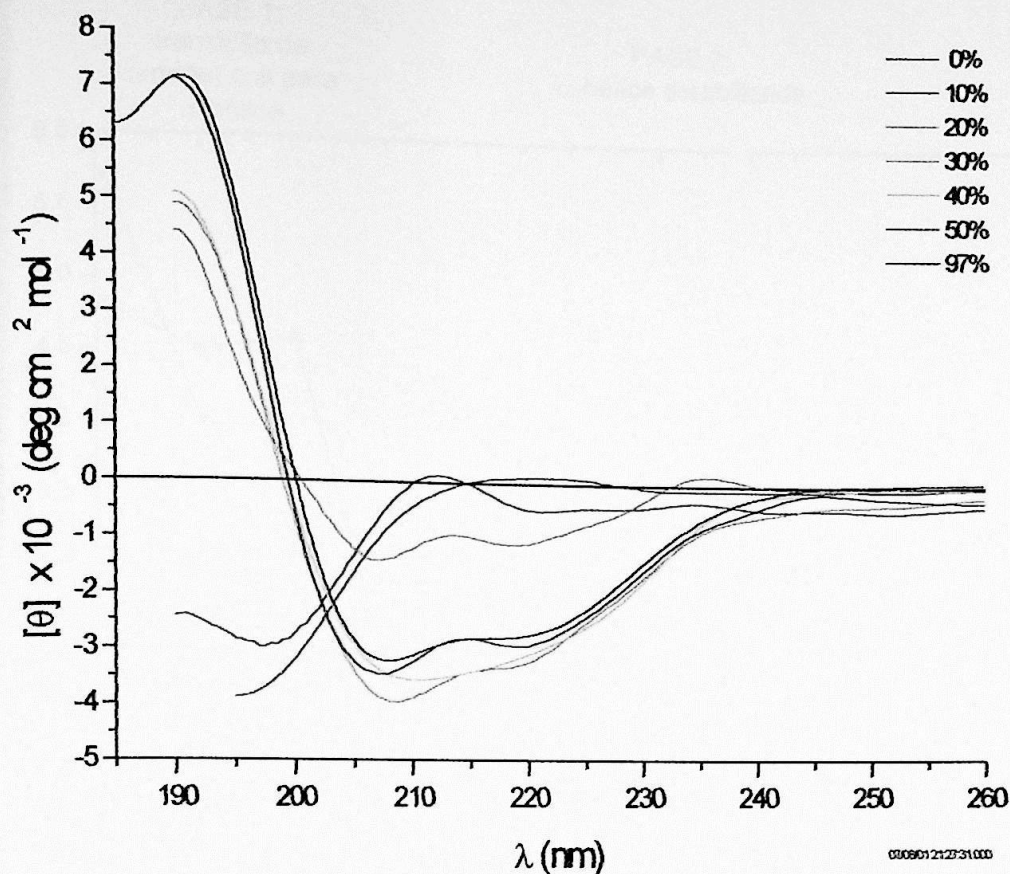


Fig.5.7.1. Espectro de CD do polipeptídeo RKK4 ($[\text{RKK4}] = 10 \mu\text{M}$, em $T \approx 20^\circ\text{C}$) para razões $V_{\text{TFE}}/V_{\text{hepex}}$ iguais a 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 97%.

Os espectros de CD mostram que a adição progressiva de TFE induz de fato a uma formação de estrutura secundária em α -hélice: O RKK4, inicialmente em random coil a 0% v/v de TFE, assume completamente a forma de α -hélice a partir de 30% v/v de TFE.

A fig.5.7.2 é uma síntese dos resultados obtidos pelo CONTIN e pelo CD; mostra o comportamento de r_p e FWHM mediante o acréscimo de TFE e a formação de α -hélices.

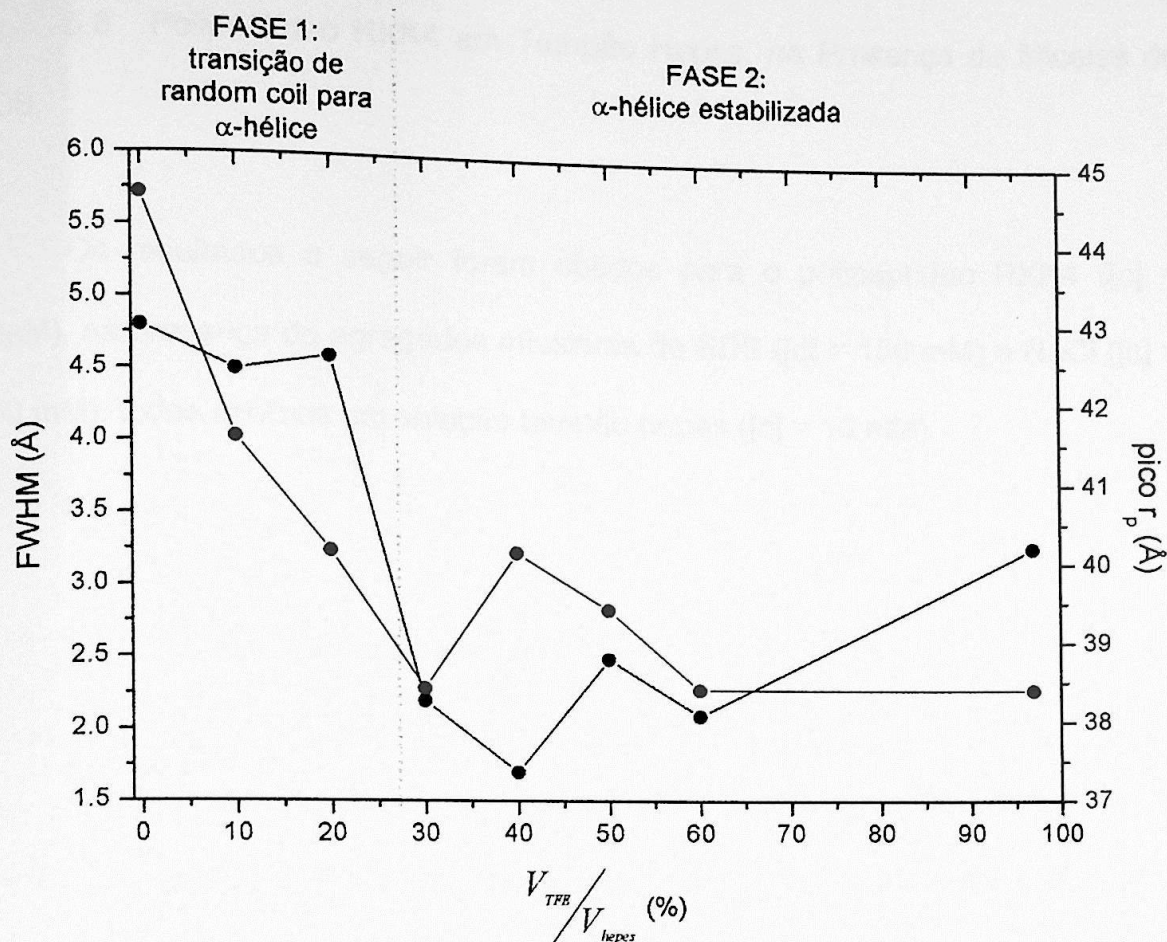


Fig.5.7.2. Comportamento dos parâmetros r_p e FWHM com o acréscimo de TFE e a formação de estrutura secundária em α -hélice.

A fase 1 compreende a formação crescente de pontes de hidrogênio intracadeia, induzida pela adição de alíquotas de TFE. Como reflexo dessa adição, tem-se o encurtamento de r_p , que passa de 44,5 Å para 40,0 Å. Já a pouca variação na dispersão FWHM, que se mantém próximo a 4,5 Å, indica que as pontes de hidrogênio não são ainda suficientes para estabilizar a cadeia peptídica em α -hélice. Na fase 2, onde a porcentagem v/v de TFE é igual ou maior que 30%, os valores de r_p e FWHM são menores que os encontrados na fase 1 pois há formação de estrutura secundária estável em α -hélice, conferindo-lhe menor comprimento médio e maior rigidez.

5.8. Polipeptídeo RKK4 em Tampão Hepes, na Presença de Micelas de SDS.

Os resultados a seguir foram obtidos para o polipeptídeo RKK4 ($[c] = 20\mu\text{M}$), na presença de agregados micelares de SDS ($[c] = 150\text{ mM}$) e NaCl ($[c] = 100\text{ mM}$), todos imersos em solução tampão hepes ($[c] = 10\text{ mM}$).

5.8.1 Rendimento quântico.

O rendimento quântico do doador KKA, calculado pela eq.(5.1), é de $\phi = 0,516$. A fig.5.8.1 ilustra os espectros de fluorescência do *o*-Abz/etanol e do polipeptídeo KKA.

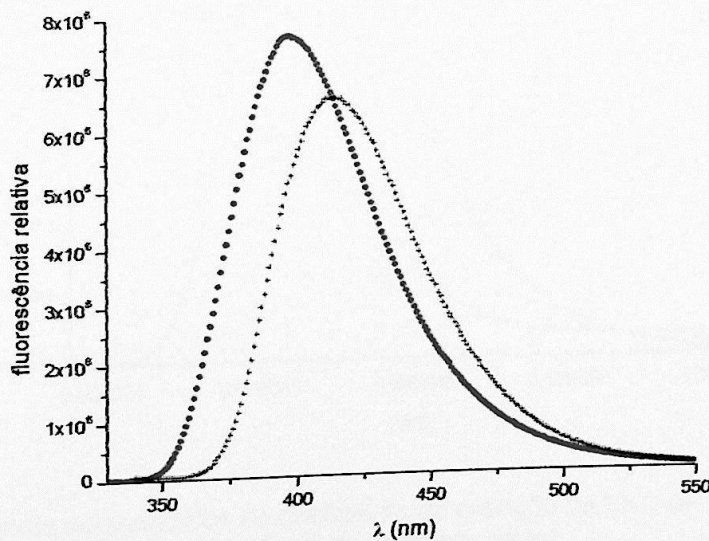


Fig.5.8.1. Espectros de fluorescência do *o*-Abz/etanol (em vermelho) e do KKA/tampão hepes (em preto), obtidos através de espectrofluorímetro estático.

5.8.2. Índice de refração.

O valor do índice de refração, medido através de refratômetro, é $n = 1,3390 \pm 0,0003$.

5.8.3. Integral de sobreposição.

A medida da integral de sobreposição é $J = 1,018 \cdot 10^{-14} \text{ (mol.cm)}^{-1}$. Os espectros normalizados do coeficiente de extinção do KKQ e da fluorescência do KKA estão ilustrados na fig.5.8.3.

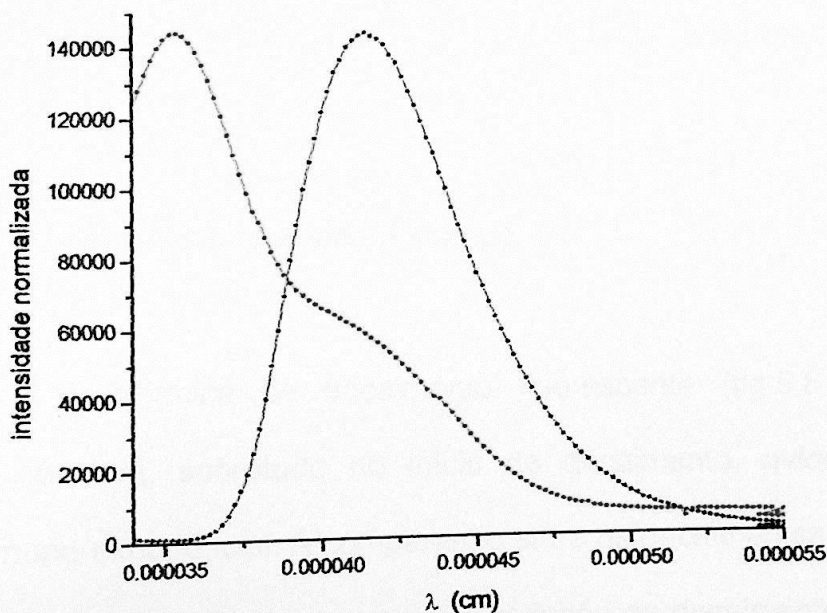


Fig.5.8.3. Espectros normalizados do coeficiente de extinção do KKQ (em vermelho) e da fluorescência do KKA (em preto).

5.8.4 Distância de Förster.

A distância de Förster, R_0 , é determinada através das grandezas ϕ_d , n e J obtidas nas subseções 5.8.1, 5.8.2 e 5.8.3; a grandeza k^2 é tomada pela sua média dinâmica $\langle k^2 \rangle = 2/3$. A tabela 5.8.4 lista os valores experimentais dessas grandezas.

Polipeptídeo RKK4 na presença de micelas de SDS				
índice de refração	rendimento quântico	integral de sobreposição	fator de orientação dos dipolos	distância de Förster
n	ϕ_d	$J \text{ (mol.cm)}^{-1}$	k^2	$R_0 \text{ (Å)}$
$1,3390 \pm 0,0003$	0,516	$1,018 \times 10^{-14}$	2/3	31,4

Tabela 5.8.4. Valores das grandezas n , ϕ_d , J , $k = \langle k^2 \rangle$ e R_0 para o polipeptídeo RKK4 em SDS.

5.8.5. Fluorescência resolvida no tempo.

A curva logarítmica de decaimento fluorescente (fig.5.8.5) mostra-se ligeiramente côncava, sobretudo no início do decaimento, evidenciando seu caráter *não* mono-exponencial. A comparação entre os decaimentos fluorescentes dos polipeptídeos KKA e RKK4 comprova a redução do decaimento fluorescente deste último devido ao fenômeno de FRET.

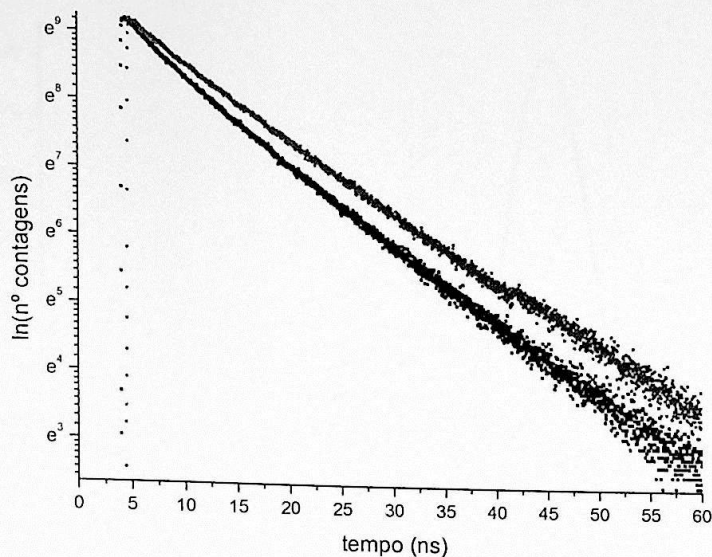


Fig.5.8.5. Curvas de decaimento temporal da fluorescência do polipeptídeo KKA (em vermelho) e do polipeptídeo RKK4 (em preto).

Os valores obtidos dos parâmetros τ_i e B_i estão postos na tab.(5.8.5).

KKA na presença de micelas de SDS				RKK4 na presença de micelas de SDS			
tempos de vida	fatores pré-exponenciais	tempo médio de vida	chi-quadrado reduzido	tempos de vida	fatores pré-exponenciais	tempo médio de vida	chi-quadrado reduzido
τ (ns)	B (% rel)	$\langle \tau \rangle$	χ^2_{red}	τ (ns)	B (% rel)	$\langle \tau \rangle$	χ^2_{red}
$10,35 \pm 0,21$	65 ± 11	$9,5 \pm 1,6$	1,100	$8,850 \pm 0,038$	$64,5 \pm 1,8$	$7,98 \pm 0,19$	1,052
$6,98 \pm 0,82$	$24,1 \pm 8,4$			$4,197 \pm 0,25$	$9,8 \pm 1,5$		
$1,636 \pm 0,058$	$10,5 \pm 1,5$			$1,326 \pm 0,25$	$25,6 \pm 1,2$		

Tabela 5.8.5. Valores dos parâmetros τ_i e B_i (este em % relativa), ajustados pelo método de reconvolução iteração segundo o algoritmo de Marquardt. Na tabela estão também os valores do tempo médio de vida $\langle \tau \rangle$ e do chi-quadrado reduzido χ^2_{red} .

5.8.6. Distribuição de distâncias.

O espectro de distribuição de distâncias, obtido através do programa

CONTIN, é dado na fig.5.8.6.

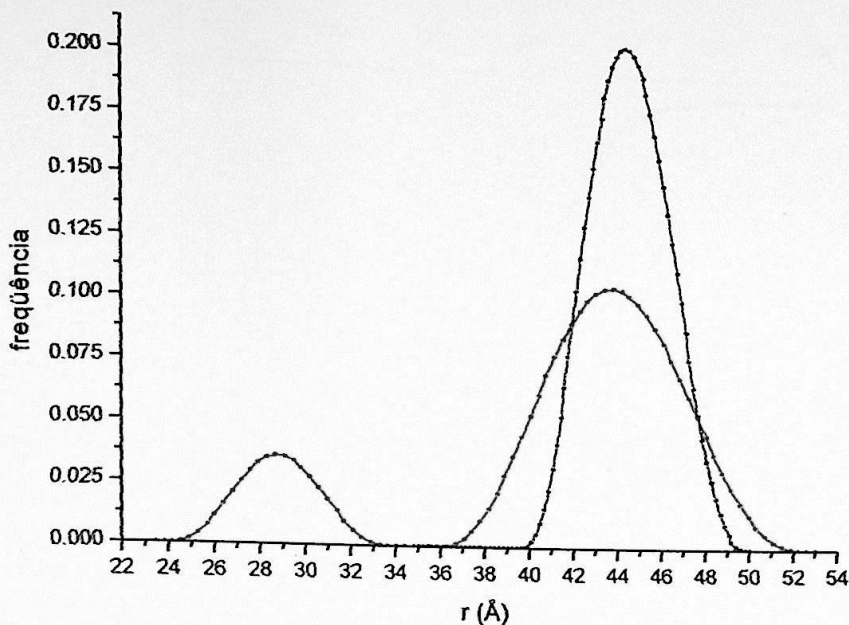
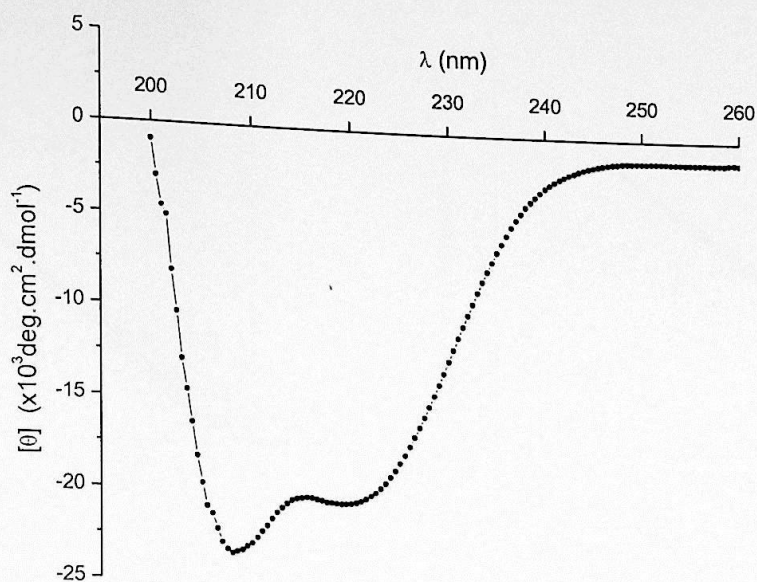


Fig.5.8.6. Espectro de distribuição de distâncias para o RKK4 em tampão hepes, na presença de micelas de SDS (em vermelho). O outro espectro (em preto) representa o RKK4 somente em tampão hepes.

O espectro de distribuição de distâncias se altera na presença de micelas de SDS, promovendo o aparecimento de 2 curvas distintas, a primeira com $r_{p1} = 43,9 \text{ \AA}$ e $FWHM_1 = 8,0 \text{ \AA}$, e a segunda com $r_{p2} = 28,7 \text{ \AA}$ e $FWHM_2 = 4,6 \text{ \AA}$. A primeira curva, que corresponde a 84% da distribuição, tem pico próximo ao do RKK4 em tampão hepes ($r_p = 44,5 \text{ \AA}$). O que a distingue é a sua medida de dispersão: $FWHM_2 = 8,0 \text{ \AA}$, contra $FWHM = 4,6 \text{ \AA}$. A segunda curva, que corresponde a 16% da distribuição, deve-se unicamente à interação de RKK4 com as micelas de SDS.

5.8.7. CD.

O espectro de CD do polipeptídeo RKK4 é apresentado na fig.(5.8.7).



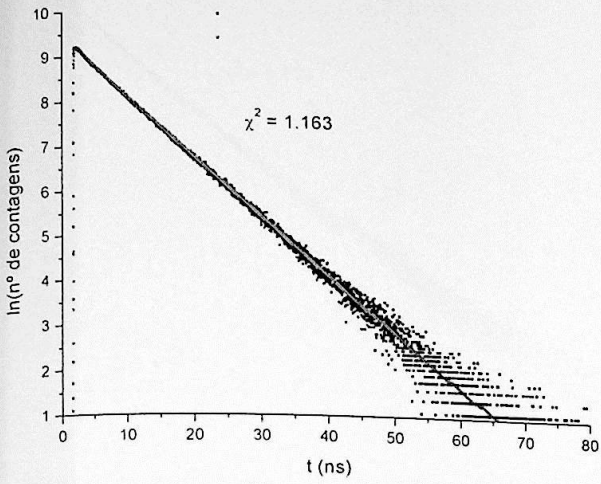
5/2/2003 21:21:40

Fig.5.8.7. Espectro de dicroísmo circular (CD) do polipeptídeo RKK4 em tampão hepes, na presença de micelas de SDS. [RKK4]=10 μ M e T \cong 20°C.

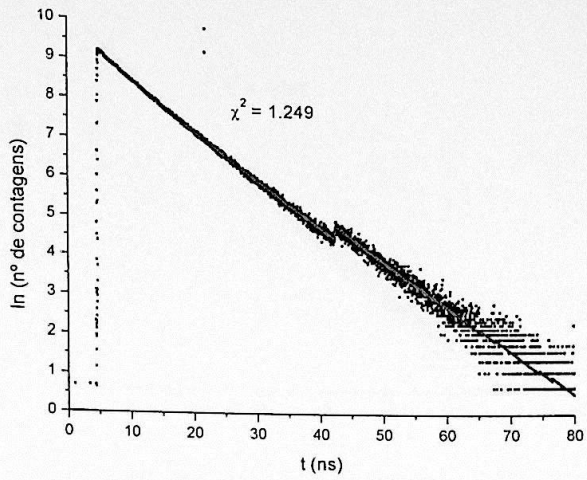
O espectro de dicroísmo circular mostra que a interação de RKK4 com SDS induz a formação de uma estrutura secundária em α -hélice no polipeptídeo.

5.9. Reprodução do Decaimento Fluorescente Através do Programa INPUT e sua Comparação com o Decaimento Observado.

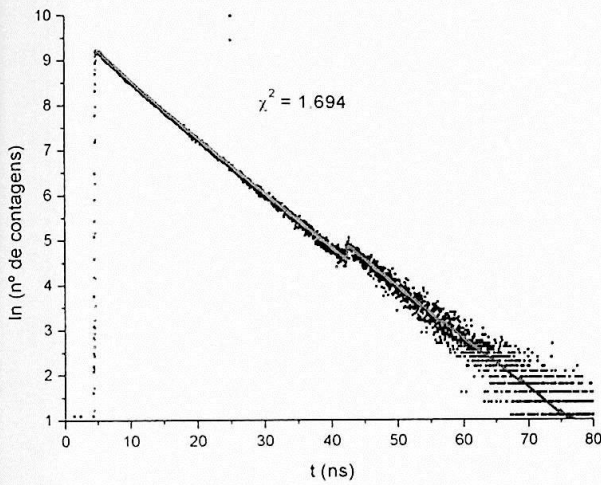
Os decaimentos simulados através do programa INPUT, baseados nas distribuições de distâncias obtidas pelo programa CONTIN, foram comparados com os decaimentos obtidos experimentalmente. Os resultados estão representados na fig. 5.9.



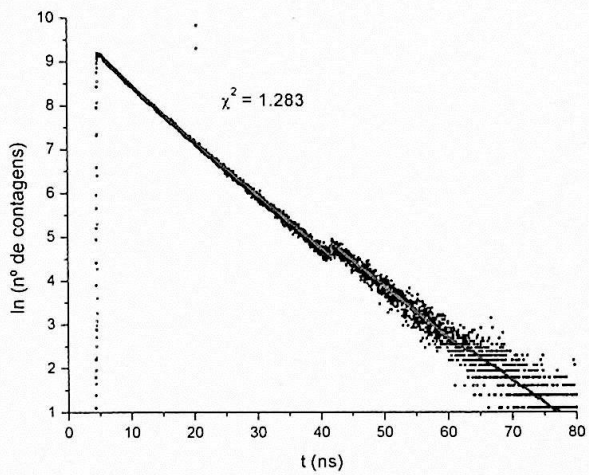
(a) porcentagem TFE / tampão = 0%



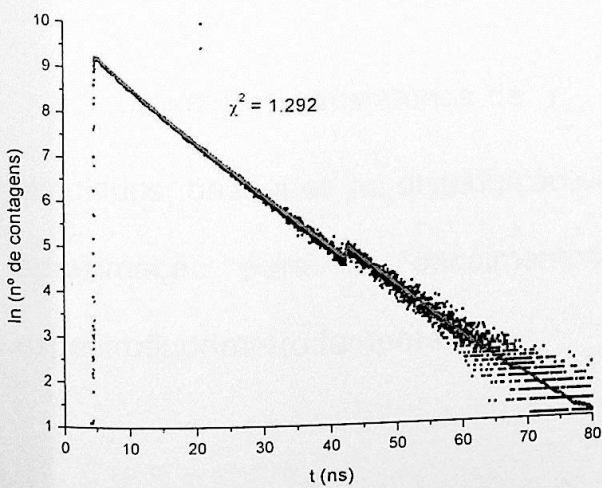
(b) porcentagem TFE / tampão = 10%



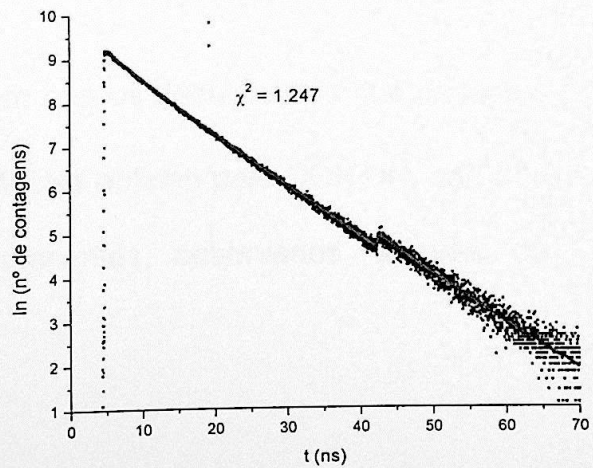
(c) porcentagem TFE / tampão = 20%



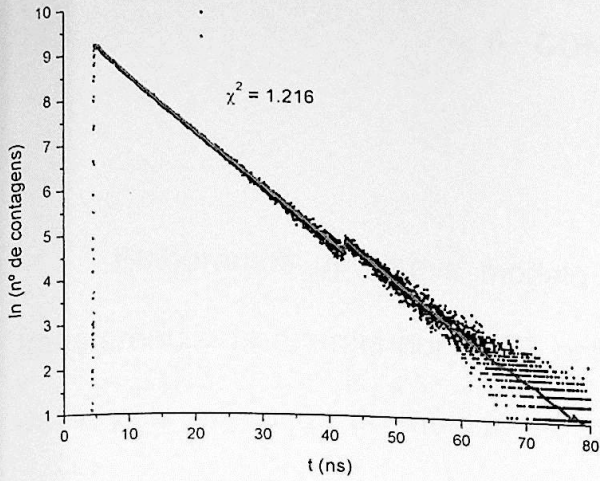
(d) porcentagem TFE / tampão = 30%



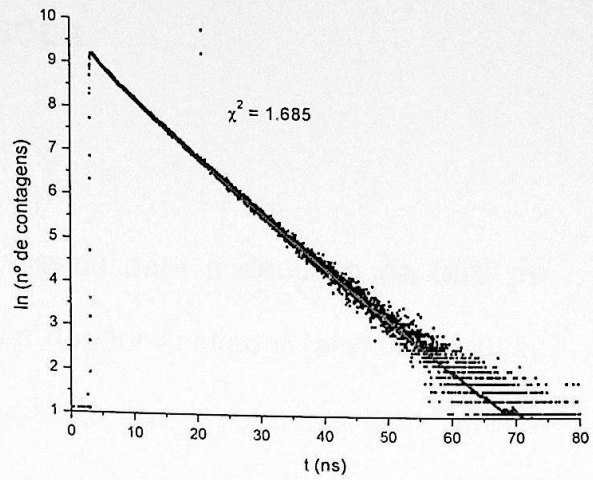
(e) porcentagem TFE / tampão = 40%



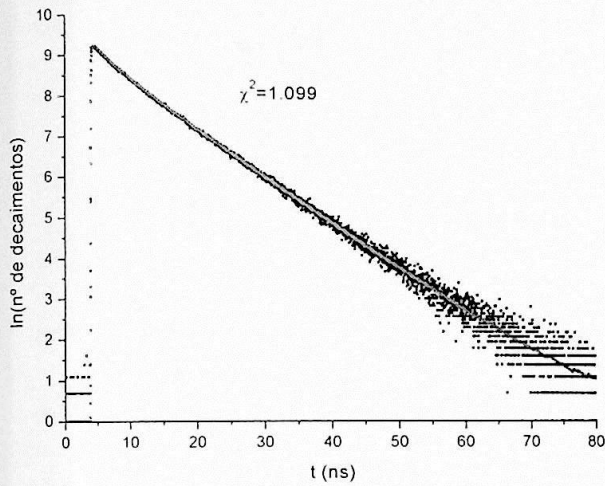
(f) porcentagem TFE / tampão = 50%



(g) porcentagem TFE / tampão = 60%



(h) porcentagem TFE / tampão = 97%



(i) tampão e SDS

Fig.5.9. Comparação por χ^2_{red} entre as intensidades dos decaimentos fluorescentes observados experimentalmente (em preto) e os obtidos através de simulação (em vermelho).

Os valores satisfatórios de χ^2_{red} indicam que os decaimentos fluorescentes simulados, baseados na distribuição de distâncias obtidas pelo CONTIN, são boa aproximação para os decaimentos fluorescentes observados através do espectrofluorímetro temporal.

6. CONCLUSÕES.

Elaboramos um breve modelo semiclássico para a dedução da taxa de transferência de energia por FRET entre o par doador-aceitador (a-d). A dedução dá-se pela aplicação do método de perturbação tempo-dependente de 1ª ordem ao problema da interação de um sistema quântico com a energia de um campo elétrico, proveniente de um dipolo hertziano em região de zona próxima. Dentro da aproximação adotada, a taxa coincide com a encontrada em literatura.

A determinação da distribuição de distâncias a-d envolve a análise de dados de decaimento fluorescente. O caso mais simples consiste de um decaimento monoexponencial a uma distância a-d fixa. No caso de um peptídeo em solução, marcado com sondas doadora e aceitadora, é comum a ocorrência de desexcitação multiexponencial aliada a uma variação dinâmica na distância a-d, criando um espectro de distribuição de distâncias $s(r_{ad})$ que reflete o comportamento conformacional do peptídeo.

O programa INPUT foi elaborado como critério para a validação dos resultados obtidos pelo CONTIN. Através do programa INPUT foi possível verificar que o procedimento de determinação de $s(r_{ad})$ através do CONTIN é válido para o intervalo crítico $0,5 \cdot R_0 \lesssim r_{ad} \lesssim 1,5 \cdot R_0$.

Quanto aos resultados obtidos, há boa concordância entre os espectros de distribuição de distâncias e de CD. As medidas de CD mostram a transição de uma estrutura secundária em random coil, no meio aquoso, para um arranjo em α -hélice nas soluções com porcentagem $V_{TFE} / V_{hepes} (\%) \geq 30\%$. A distribuição de

distâncias, recuperada pelo CONTIN a partir dos perfis de decaimento fluorescente, mostrou que a posição r_p do pico diminui à medida que TFE é adicionado e sua largura à meia altura (FWHM) estreita-se significativamente para $V_{TFE}/V_{\text{acqua}} (\%) \geq 30\%$. Conclui-se, portanto, que a adição crescente de alíquota de TFE promove a formação de estrutura em α -hélice, encurtando o comprimento médio da cadeia peptídica e reduzindo sua mobilidade. Mas o valor do pico oscila em torno de 38-40 Å na presença de TFE suficiente para a estabilização de α -hélice; logo, a cadeia peptídica de RKK4 não assume integralmente a forma de uma α -hélice estável (que ocorreria para r_p em torno de 48 Å). Esse fato sugere que partes da estrutura secundária da cadeia peptídica não são suscetíveis à formação de α -hélice estável, induzindo o polipeptídeo a assumir conformações que permitem uma maior aproximação entre as sondas doadora e aceitadora. Uma simulação de decaimento fluorescente, feita pelo programa INPUT com suposição em diversas distribuições gaussianas $f(r_{ad})$ centradas em $r_p = 48 \text{ \AA}$ (fig.6.1), trouxe resultados insatisfatórios para χ^2_{red} , o que reforça a conclusão de que uma α -hélice típica estável não se forma ao longo de toda a cadeia peptídica do RKK4. A comparação entre os decaimentos temporais simulados e os observados fornece $\chi^2_{red} (\mu = 48 \text{ \AA}, \sigma = 0,333 \text{ \AA}) = 2,822$, $\chi^2_{red} (\mu = 48 \text{ \AA}, \sigma = 0,833 \text{ \AA}) = 3,058$, $\chi^2_{red} (\mu = 48 \text{ \AA}, \sigma = 1,333 \text{ \AA}) = 3,027$, $\chi^2_{red} (\mu = 48 \text{ \AA}, \sigma = 3,333 \text{ \AA}) = 2,716$. Todos apresentam χ^2_{red} insatisfatório. Quando aproximamos o resultado $s^*(r_{ad})$ obtido pelo CONTIN por uma gaussiana dada por $\mu = 38,5 \text{ \AA}$ e $\sigma = 1,167 \text{ \AA}$, obtemos $\chi^2_{red} = 1,87$.

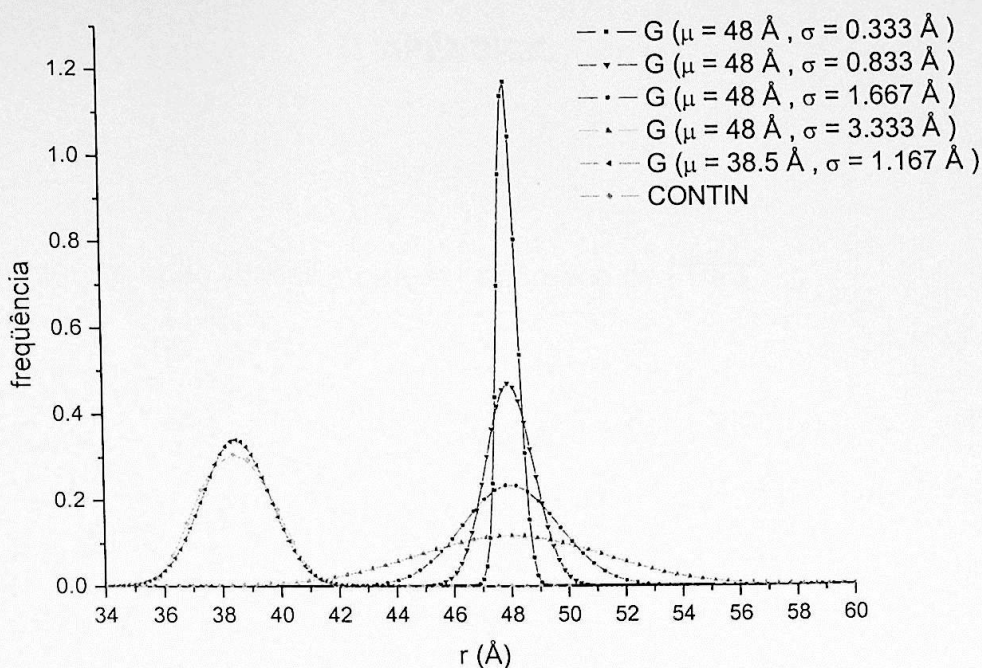


Fig.6.1. Distribuições gaussianas com centro em $\mu = 48 \text{ \AA}$ e $\mu = 38,5 \text{ \AA}$, utilizadas para gerar um decaimento fluorescente simulado através do programa INPUT.

Na presença de micelas de SDS (carregadas negativamente), há interação de 16% dos polipeptídeos com esse anfifílico, devido possivelmente à força eletrostática pois o RKK4 é carregado positivamente. Os resultados para r_n , FWHM e CD mostram que a interação RKK4-SDS leva à formação de uma estrutura compacta que coexiste com o random coil encontrado em solvente hepes.

APÊNDICE.

A. Interpretação Clássica para o Fenômeno de FRET.

O mecanismo de transferência de energia por FRET pode ser verificado através de uma aproximação clássica (Hoch & Knox, 1968), onde a molécula doadora é vista como um dipolo hertziano e a molécula aceitadora como um conjunto de dipolos oscilantes em que cada elétron é ligado a um núcleo massivo por uma mola, experimentando uma força de amortecimento proporcional a sua velocidade. A molécula aceitadora, descrita dessa maneira, é conhecida como o modelo molecular de Lorentz. O FRET corresponde à transferência de energia elétrica em região de zona próxima do dipolo hertziano para o modelo molecular de Lorentz. Nas páginas que seguem, determinamos a taxa de FRET através de cálculos detalhados e fundamentados unicamente na eletrodinâmica clássica.

A.1. Campo de um dipolo hertziano na zona próxima.

O dipolo hertziano consiste de duas pequenas esferas metálicas carregadas, localizadas em $z = \pm \frac{s}{2} \hat{k}$ e conectadas entre si por um fino fio condutor; um gerador promove o movimento das cargas a uma frequência ω , conferindo um momento de dipolo que varia senoidalmente com o tempo:

$$p = p_0 e^{i\omega t} \hat{k} \quad (\text{fig.A.1.1}).$$

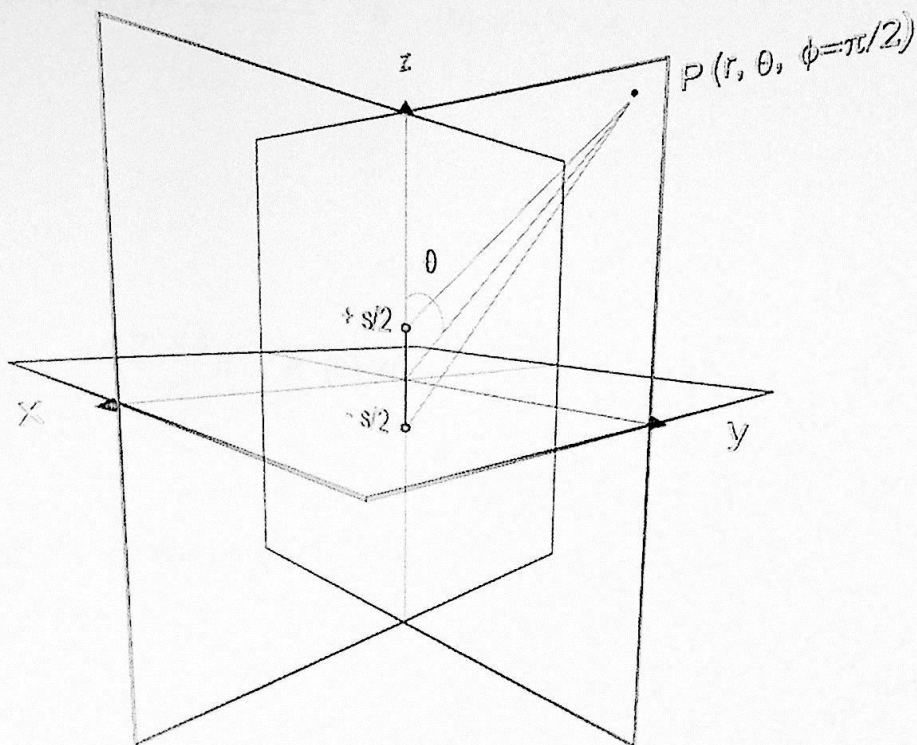


Fig.A.1.1. Dipolo hertziano de momento $p = p_0 e^{i\omega t} \hat{k}$, onde $p_0 = q_0 s$.

Existem três regiões espaciais de interesse para o campo eletromagnético emitido por um dipolo hertziano de dimensão s , confinado a uma pequena região comparado ao comprimento de onda λ da radiação emitida: (a) zona próxima (ou estática): $s \ll r \ll \lambda$, (b) zona intermediária (ou de indução): $s \ll r \sim \lambda$ e (c) zona distante (ou de radiação): $s \ll \lambda \ll r$. O estudo clássico de FRET limita-se à região de zona próxima pois a dimensão de uma molécula cromófora é da ordem de 5Å , a distância $a-d$ situa-se num intervalo de $10-10^2 \text{Å}$ e o comprimento de onda da radiação envolvida na transferência de energia por FRET é de cerca de $3 \cdot 10^3 \text{Å}$ (ultravioleta distante).

Em termos dos potenciais escalar e vetor retardados, os campos elétrico e magnético são dados por

$$(a) \mathbf{E} = -\nabla\phi(\mathbf{r}, t) - \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \quad \text{e} \quad (b) \mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} \quad (\text{A.1.1})$$

onde

$$(a) \phi(\mathbf{r}, t) = \int_{V'} \frac{\rho(\mathbf{r}', \tilde{t})}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^3x' \quad \text{e} \quad (b) \mathbf{A}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{c} \int_{V'} \frac{\mathbf{J}(\mathbf{r}', \tilde{t})}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^3x', \quad \tilde{t} = t - \frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}{c} \quad (\text{A.1.2})$$

A densidade de corrente $\mathbf{J}(\mathbf{r}, \tilde{t})$ do dipolo hertziano é dada por

$$\mathbf{J}(\mathbf{r}', \tilde{t}) = \frac{\partial}{\partial \tilde{t}} [q_0 e^{i\omega \tilde{t}} \delta(x') \delta(y') \hat{\mathbf{k}}] = i\omega q_0 e^{i\omega \tilde{t}} \delta(x') \delta(y') \hat{\mathbf{k}}$$

Logo:

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{c} \int_{V'} \frac{i\omega q_0 e^{i\omega \left(t - \frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}{c}\right)} \delta(x') \delta(y') \hat{\mathbf{k}}}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^3x' = \frac{1}{c} \int_{-\frac{s}{2}}^{\frac{s}{2}} \frac{i\omega q_0 e^{i\omega \left(t - \frac{|\mathbf{r} - z' \hat{\mathbf{k}}|}{c}\right)} \hat{\mathbf{k}}}{|\mathbf{r} - z' \hat{\mathbf{k}}|} dz'$$

Como $r \gg s$, são válidas as seguintes aproximações binomiais até o termo de 1ª ordem:

$$|\mathbf{r} - z' \hat{\mathbf{k}}| \cong r \left[1 - \frac{\mathbf{r}}{r^2} \cdot (z' \hat{\mathbf{k}}) \right] \quad \text{e} \quad |\mathbf{r} - z' \hat{\mathbf{k}}|^{-1} \cong r^{-1} \left[1 + \frac{\mathbf{r}}{r^2} \cdot (z' \hat{\mathbf{k}}) \right]$$

Com estas aproximações o vetor potencial adquire a seguinte forma:

$$A(r, t) \cong \frac{1}{c} \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} i \omega q_0 e^{i \omega \left(t - \frac{r}{c} \left[1 + \frac{r}{r^2} (z' \hat{k}) \right] \right)} \hat{k} \cdot \frac{1}{r} \left[1 + \frac{r}{r^2} (z' \hat{k}) \right] dz' \cong$$

$$\cong \frac{i \omega q_0 \hat{k}}{cr} \cdot e^{i \omega \left(t - \frac{r}{c} \right)} \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} e^{i \frac{r}{c} \left(\frac{\omega z'}{c} \hat{k} \right)} dz'$$

Mas:

$$\int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} e^{i \frac{r}{c} \left(\frac{\omega z'}{c} \hat{k} \right)} dz' = \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} e^{i \alpha z'} dz' = \frac{1}{i \alpha} \left[e^{i \alpha z'} \right]_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} = s \cdot \left[\frac{\text{sen} \left(\frac{\alpha s}{2} \right)}{\frac{\alpha s}{2}} \right]$$

onde $\alpha s = \frac{r}{c} \cdot \left(\frac{\omega s}{c} \hat{k} \right)$.

Assim,

$$A(r, t) \cong \frac{i \omega q_0 \hat{k}}{cr} \cdot e^{i \omega \left(t - \frac{r}{c} \right)} \int_{-\frac{1}{2}}^{\frac{1}{2}} e^{i \frac{r}{c} \left(\frac{\omega z'}{c} \hat{k} \right)} dz' = \frac{i \omega q_0 \hat{k}}{cr} \cdot e^{i \omega \left(t - \frac{r}{c} \right)} \cdot s \cdot \left[\frac{\text{sen} \left(\frac{\alpha s}{2} \right)}{\frac{\alpha s}{2}} \right]$$

Como também $s \ll \lambda$, tem-se $s \ll \frac{2\pi c}{\omega}$, ou seja, $\frac{\omega s}{c} \ll 1$. Assim,

$$s \cdot \left[\frac{\text{sen} \left(\frac{\alpha s}{2} \right)}{\frac{\alpha s}{2}} \right] \rightarrow s$$

Portanto:

$$A(\mathbf{r}, t) \cong \frac{i\omega q_0 e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}}{cr} \cdot s \hat{\mathbf{k}} \quad (\text{A.1.3})$$

A eq.(A.1.3) mostra que na zona próxima as dimensões do dipolo são tão pequenas que o tempo retardado \tilde{t} em $z=0$ pode ser tomado como o tempo do dipolo como um todo e a corrente considerada como igual ao longo de todo o fio.

Conhecido $A(\mathbf{r}, t)$, a expressão para $\phi(\mathbf{r}, t)$ pode ser obtida por meio da condição de Lorentz:

$$\nabla \cdot \mathbf{A} + \frac{1}{c} \frac{\partial \phi}{\partial t} = 0 \quad (\text{A.1.4})$$

Assim:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi}{\partial t} &= -c \nabla \cdot \mathbf{A} = -c \nabla \cdot \left[\frac{i\omega q_0 s e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}}{cr} \hat{\mathbf{k}} \right] = -c \nabla \cdot \left[\frac{i\omega q_0 s e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}}{cr} (\cos\theta \hat{\mathbf{r}} - \sin\theta \hat{\boldsymbol{\theta}}) \right] = \\ &= \frac{i\omega q_0}{r} \left[\frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}}{r^2} + i \frac{\mathbf{r}}{r} \cdot \left(\frac{\omega \mathbf{s}}{c} \right) \right] e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)} \end{aligned}$$

Logo:

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \frac{q_0}{r} \left[\frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}}{r^2} + i \frac{\mathbf{r}}{r} \cdot \left(\frac{\omega \mathbf{s}}{c} \right) \right] e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)} \quad (\text{A.1.5})$$

Podemos também fazer uso da eq.(A.1.2.a) e da condição de zona próxima $s \ll r \ll \lambda$ para obter $\phi(\mathbf{r}, t)$:

$$\phi(\mathbf{r}, t) = \int_{V'} \frac{\rho(\mathbf{r}', \tilde{t})}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d^3x' = q_0 \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k e^{i\omega \left[t - \frac{|\mathbf{r} - (-1)^k \frac{\mathbf{s}}{2}|}{c} \right]}}{\left| \mathbf{r} - (-1)^k \frac{\mathbf{s}}{2} \right|} \quad (\text{A.1.6})$$

A condição de zona próxima permite que sejam válidas as seguintes aproximações:

$$(a) \quad \left| \mathbf{r} - (-1)^k \frac{\mathbf{s}}{2} \right| \cong r \left[1 - (-1)^k \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}}{2r^2} \right]$$

$$(b) \quad \left| \mathbf{r} - (-1)^k \frac{\mathbf{s}}{2} \right|^{-1} \cong r^{-1} \left[1 + (-1)^k \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}}{2r^2} \right] \quad (\text{A.1.7})$$

$$(c) \quad e^{i\omega \left[t - \frac{|\mathbf{r} - (-1)^k \frac{\mathbf{s}}{2}|}{c} \right]} \cong e^{i\omega \left[t - \frac{r}{c} + (-1)^k \frac{1}{2r} \left(\frac{\omega \mathbf{s}}{c} \right) \cdot \mathbf{r} \right]} \cong \left[1 + i(-1)^k \frac{1}{2} \frac{\mathbf{r}}{r} \cdot \left(\frac{\omega \mathbf{s}}{c} \right) \right] e^{i\omega \left(t - \frac{r}{c} \right)}$$

Portanto:

$$\begin{aligned} \phi(\mathbf{r}, t) &= q_0 \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k r^{-1} \left[1 + (-1)^k \frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}}{2r^2} \right] \left[1 + i(-1)^k \frac{1}{2} \frac{\mathbf{r}}{r} \cdot \left(\frac{\omega \mathbf{s}}{c} \right) \right] e^{i\omega \left(t - \frac{r}{c} \right)} = \\ &= \frac{q_0}{r} \left[\frac{\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}}{r^2} + i \frac{\mathbf{r}}{r} \cdot \left(\frac{\omega \mathbf{s}}{c} \right) \right] e^{i\omega \left(t - \frac{r}{c} \right)} \quad (\text{A.1.8}) \end{aligned}$$

Como seria de esperar, esse resultado é igual àquele obtido pela condição de Lorentz.

Conhecidas as expressões para $\phi(r,t)$ e $A(r,t)$, estamos aptos a obter as expressões para os campos elétrico e magnético do dipolo hertziano:

$$\begin{aligned}
 E_c(r,t) &= -\nabla\phi(r,t) - \frac{1}{c} \frac{\partial A(r,t)}{\partial t} = \\
 &= \frac{2q_0 s \cos\theta}{r^3} \left(1 + i \frac{\omega r}{c}\right) e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)} \hat{r} + \\
 &\quad + \frac{q_0 s \sin\theta}{r^3} \left[\left(1 - \left(\frac{\omega r}{c}\right)^2\right) + i \frac{\omega r}{c} \right] e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)} \hat{\theta}
 \end{aligned} \tag{A.1.9}$$

$$\begin{aligned}
 B_c(r,t) &= \nabla \times A = \nabla \times \left[\frac{i\omega q_0 e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}}{cr} \cdot s \hat{k} \right] = \\
 &= \nabla \times \left[\frac{i\omega q_0 e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}}{cr} \cdot s (\cos\theta \hat{r} - \sin\theta \hat{\theta}) \right] = \\
 &= \frac{i\omega q_0 s \sin\theta}{cr} \left[i \frac{\omega}{c} + \frac{1}{r} \right] e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)} \hat{\phi}
 \end{aligned} \tag{A.1.10}$$

Como são as partes reais de $E_c(r,t)$ e $B_c(r,t)$ que interessam, temos

$$\begin{aligned}
 E(r,t) &= \text{Re}\{E_c(r,t)\} = \\
 &= \frac{2q_0 s \cos\theta}{r^3} \left[\cos\omega\left(t-\frac{r}{c}\right) - \frac{\omega r}{c} \sin\omega\left(t-\frac{r}{c}\right) \right] \hat{r} + \\
 &\quad + \frac{q_0 s \sin\theta}{r^3} \left[\left(1 - \left(\frac{\omega r}{c}\right)^2\right) \cos\omega\left(t-\frac{r}{c}\right) - \frac{\omega r}{c} \sin\omega\left(t-\frac{r}{c}\right) \right] \hat{\theta}
 \end{aligned} \tag{A.1.11}$$

$$\begin{aligned}
 \mathbf{B}(r, t) &= \text{Re}\{\mathbf{B}_c(r, t)\} = \\
 &= -\frac{q_0 s \sin\theta}{r^3} \left[\left(\frac{\omega r}{c}\right)^2 \cos\omega\left(t - \frac{r}{c}\right) + \frac{\omega r}{c} \sin\omega\left(t - \frac{r}{c}\right) \right] \hat{\phi} \quad (\text{A.1.12})
 \end{aligned}$$

A.2. Potência total irradiada pelo dipolo hertziano.

A potência total irradiada pelo dipolo hertziano é dada pela expressão:

$$\langle P_{\text{irrad}} \rangle = \oint_{\substack{\text{superfície} \\ \text{esférica} \\ \text{de raio } r}} \langle \mathbf{S} \rangle \cdot d\mathbf{a} = \oint \left[\frac{1}{T} \int_0^T \mathbf{S} dt \right] \cdot d\mathbf{a}$$

O vetor de Poynting em torno de um ciclo de oscilação é igual a:

$$\begin{aligned}
 \langle \mathbf{S} \rangle &= \frac{1}{T} \int_0^T \mathbf{S} dt = \frac{1}{T} \int_0^T \frac{c}{4\pi} \text{Re}\{\mathbf{E}\} \times \text{Re}\{\mathbf{B}\} dt = \frac{c}{16\pi T} \int_0^T (\mathbf{E} + \mathbf{E}^*) \times (\mathbf{B} + \mathbf{B}^*) dt = \\
 &= \frac{c}{16\pi T} \int_0^T (\mathbf{E} \times \mathbf{B} + \mathbf{E} \times \mathbf{B}^* + \mathbf{E}^* \times \mathbf{B} + \mathbf{E}^* \times \mathbf{B}^*) dt = \frac{c}{8\pi} \text{Re}\{\mathbf{E} \times \mathbf{B}^*\}
 \end{aligned}$$

onde

$$\begin{aligned} \operatorname{Re}\{\mathbf{E} \times \mathbf{B}^*\} &= \operatorname{Re}\left\{-\left[\frac{2q_0 s \cos \theta}{r^3}\left(1+i\frac{\omega r}{c}\right)e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}\hat{\mathbf{r}}+\right.\right. \\ &\quad \left.+\frac{q_0 s \sin \theta}{r^3}\left[\left(1-\left(\frac{\omega r}{c}\right)^2\right)+i\frac{\omega r}{c}\right]e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}\hat{\boldsymbol{\theta}}\right] \times \left[\right. \\ &\quad \left.\left.\frac{i\omega q_0 s \sin \theta}{cr}\left[i\frac{\omega}{c}+\frac{1}{r}\right]e^{i\omega\left(t-\frac{r}{c}\right)}\hat{\boldsymbol{\phi}}\right]^*\right\} = \\ &= \left(\frac{\omega^4(q_0 s)^2 \sin^2 \theta}{r^2 c^4}\right)\hat{\mathbf{r}} \end{aligned}$$

Assim:

$$\langle S \rangle = \frac{\omega^4(q_0 s)^2 \sin^2 \theta}{8\pi c^3 r^2} \hat{\mathbf{r}}$$

Portanto, a potência total irradiada pelo dipolo hertziano será dada por

$$\begin{aligned} \langle P_{\text{irrad}} \rangle &= \oint \left[\frac{\omega^4(q_0 s)^2 \sin^2 \theta}{8\pi c^3 r^2} \hat{\mathbf{r}} \right] \cdot [r^2 \sin \theta \, d\theta \, d\phi \, \hat{\mathbf{r}}] = \\ &= \frac{\omega^4(q_0 s)^2}{3c^3} \end{aligned} \tag{A.2.1}$$

Na zona próxima somente o termo do campo elétrico que é r^{-3} -dependente é significativo. Este termo é similar ao campo elétrico gerado por um dipolo estático e não contribui para a irradiação de energia, embora seja responsável pelo armazenamento de energia e momento. O termo r^{-1} -dependente do campo elétrico, que é o termo que dissipa energia por radiação, é comparativamente pouco importante. Portanto, uma molécula aceitadora interage sobretudo com o campo elétrico r^{-3} -dependente, drenando a energia contida

nesse campo. Esta é a razão porque a molécula aceitadora afeta o tempo de vida da molécula doadora (o tempo de vida do doador é reduzido na presença do aceitador).

A.3. Modelo molecular de Lorentz e FRET.

O dipolo hertziano representa a molécula doadora que interage com os elétrons da molécula aceitadora; esta, por sua vez, corresponde a um conjunto de dipolos oscilantes, onde cada elétron é ligado a um núcleo massivo por uma mola, experimentando uma força de amortecimento proporcional a sua velocidade. A equação de movimento do elétron da molécula aceitadora é dada por

$$\ddot{r} + \gamma \dot{r} + \omega_0^2 r = \frac{F_0}{m} e^{i\omega t}$$

onde F_0 é a força exercida pelo dipolo hertziano.

A molécula, assim descrita, corresponde ao chamado *Modelo Molecular de Lorentz*.

Como $\frac{\omega r}{c} = 2\pi \frac{r}{\lambda} \ll 1$, a força elétrica é muito maior que a magnética, de

modo que vale a aproximação $F_0 = eE_0$.

Por simplicidade, vamos admitir que o dipolo aceitador oscila ao longo do eixo z, de modo que

$$\ddot{z} + \gamma \dot{z} + \omega_0^2 z = \frac{F_0}{m} e^{i\omega t} \quad (\text{A.3.1})$$

onde

$$F_0 = eE_r = \frac{2eq_0s}{r^3} \left(1 + i \frac{\omega r}{c} \right) \cong \frac{2eq_0s}{r^3} \quad (\text{A.3.2})$$

A solução estacionária da eq.2.1 é do tipo $z(t) = Ae^{i\omega t}$. Obtemos, portanto:

$$z(t) = \frac{F_0}{m} \frac{(\omega_0^2 - \omega^2) + i\gamma\omega}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\gamma\omega)^2} e^{i\omega t} \quad (\text{A.3.3})$$

A potência média absorvida pelo dipolo acionador é dada por

$$\langle P_{abs} \rangle = \langle F_{dissip} \cdot \dot{z} \rangle = m\gamma \langle (\dot{z})^2 \rangle$$

Ou seja:

$$\begin{aligned} \langle P_{abs} \rangle &= m\gamma \left[F_0 \frac{\omega}{m} \right]^2 \left\langle \left[\text{Re} \left\{ \frac{\gamma\omega - i(\omega_0^2 - \omega^2)}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\gamma\omega)^2} e^{i\omega t} \right\} \right]^2 \right\rangle = \\ &= \frac{\gamma\omega^2}{m} \left[\frac{2eq_0s}{r^3} \right]^2 \cdot \frac{1}{[(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\gamma\omega)^2]^2} \cdot \\ &\quad [(\gamma\omega)^2 \langle \cos^2 \omega t \rangle + (\omega_0^2 - \omega^2)^2 \langle \sin^2 \omega t \rangle + \\ &\quad + 2\gamma\omega(\omega_0^2 - \omega^2) \langle \cos \omega t \sin \omega t \rangle] = \\ &= \frac{2e^2(q_0s)^2}{mr^6} \frac{\gamma\omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\gamma\omega)^2} \end{aligned} \quad (\text{A.3.4})$$

Até agora assumimos a radiação eletromagnética se propagando no vácuo, mas podemos generalizar os resultados até aqui obtidos para um meio homogêneo, isotrópico e linear, onde \mathbf{D} e \mathbf{H} são proporcionais a \mathbf{E} e \mathbf{B} , respectivamente. Logo, as características do material, ϵ , μ e σ , independem da posição e da direção. Em meios dispersivos estas características são funções da frequência da onda eletromagnética incidente. As eqs.(A.1.11), (A.1.13) e (A.3.4) podem, portanto, ser reescritas como:

$$\begin{aligned}
 E(r, t) = & \frac{2q_0 s \cos \theta}{\epsilon(\omega) r^3} \left(\cos \omega \left(t - \frac{n(\omega) r}{c} \right) - \frac{n(\omega) \omega r}{c} \operatorname{sen} \omega \left(t - \frac{n(\omega) r}{c} \right) \right) \hat{r} + \\
 & + \frac{q_0 s \operatorname{sen} \theta}{\epsilon(\omega) r^3} \left[\left(1 - \left(\frac{n(\omega) \omega r}{c} \right)^2 \right) \cos \omega \left(t - \frac{n(\omega) r}{c} \right) - \right. \\
 & \left. - \frac{n(\omega) \omega r}{c} \operatorname{sen} \omega \left(t - \frac{n(\omega) r}{c} \right) \right] \hat{\theta}
 \end{aligned} \tag{A.3.5}$$

$$\langle P_{\text{rad}} \rangle = \frac{\omega^4 (q_0 s)^2 n(\omega)}{3c^3} \tag{A.3.6}$$

$$\langle P_{\text{abs}} \rangle = \frac{2e^2 (q_0 s)^2}{\epsilon^2(\omega) m r^6} \frac{\gamma \omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\gamma \omega)^2} \tag{A.3.7}$$

Escrevemos $n = n(\omega)$ pois o índice de refração é tal que

$$n \equiv \frac{c}{v(\omega)} = \sqrt{\epsilon(\omega) \mu(\omega)}.$$

O termo $\frac{\gamma \omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\gamma \omega)^2}$ da potência absorvida está relacionado à seção total de choque $\sigma_B(\omega)$, que é a taxa total com que o elétron da molécula doadora remove energia da radiação eletromagnética incidente.

Vamos calcular agora a expressão para $\sigma_B(\omega)$: suponha as moléculas aceitadoras suficientemente afastadas umas das outras, apresentando interações mútuas negligíveis. Cada uma dessas moléculas é um oscilador harmônico baseado no modelo molecular de Lorentz, onde há N elétrons por unidade de volume e cada fração f_j de elétrons apresenta uma freqüência natural ω_j e um coeficiente de amortecimento γ_j . O campo elétrico externo do dipolo doador (eq.(A.3.5)) cria uma polarização das moléculas aceitadoras:

$$\begin{aligned} \mathbf{P} &= N \sum_j f_j \cdot (e \cdot z_j(t) \hat{\mathbf{k}}) = \\ &= Ne \sum_j f_j \frac{F_0}{m} \frac{(\omega_j^2 - \omega^2) + i\gamma_j \omega}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} e^{i\omega t} \hat{\mathbf{k}} = \left[\frac{Ne^2}{m} \sum_j f_j \frac{(\omega_j^2 - \omega^2) + i\gamma_j \omega}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} \right] \mathbf{E}(t) \end{aligned}$$

A polarização complexa \mathbf{P} é proporcional ao campo elétrico complexo \mathbf{E} .

Lembrando que $\mathbf{D} = \varepsilon \mathbf{E} = \mathbf{E} + 4\pi \mathbf{P}$, tem-se

$$\varepsilon = 1 + 4\pi \frac{Ne^2}{m} \sum_j f_j \frac{(\omega_j^2 - \omega^2) + i\gamma_j \omega}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2}$$

Nesse meio a equação de onda para uma dada freqüência ω é dada por

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0, \quad v^2 = \frac{c^2}{\epsilon \mu}$$

cuja solução é

$$E(r, t) = E_0 e^{i(kr - \omega t)}, \quad k = \frac{\omega}{v} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon \mu} \quad (\text{A.3.8})$$

Supondo o meio não magnético ($\mu = 1$), o número de onda k pode ser escrito como

$$k = \frac{\omega}{c} \left[1 + 4\pi \frac{Ne^2}{m} \sum_j f_j \frac{(\omega_j^2 - \omega^2) + i\gamma_j \omega}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

A constante dielétrica ϵ é, na maioria dos casos, próximo de 1, de modo que vale a seguinte aproximação binomial de 1ª ordem:

$$\begin{aligned} k &\cong \frac{\omega}{c} \left[1 + 2\pi \frac{Ne^2}{m} \sum_j f_j \frac{(\omega_j^2 - \omega^2) + i\gamma_j \omega}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} \right] = \\ &= \frac{\omega}{c} \left(1 + 2\pi \frac{Ne^2}{m} \sum_j f_j \frac{(\omega_j^2 - \omega^2)}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} \right) + \\ &\quad + i \left(2\pi \frac{Ne^2}{mc} \sum_j f_j \frac{\gamma_j \omega}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} \right) = \\ &= k_r + i k_i \end{aligned}$$

A eq.(A.3.8) é, portanto, da forma $E(r,t) = E_0 e^{-k_r r} e^{i(k_r r - \omega t)}$. O termo $e^{-k_r r}$ representa a atenuação da onda devido à absorção. A intensidade do campo é proporcional a E^2 e a quantidade

$$\sigma = 2k_r = 4\pi \frac{Ne^2}{mc} \sum_j f_j \frac{\gamma_j \omega^2}{(\omega_j^2 - \omega^2)^2 + (\gamma_j \omega)^2} = N \sum_j f_j \sigma_{B_j}(\omega) \quad (\text{A.3.9})$$

é chamada de *coeficiente de absorção da intensidade da onda incidente*; $\sigma_{B_j}(\omega)$ é a *seção total de choque por dipolo aceitador*.

Conhecido $\sigma_{B_j}(\omega)$ a eq.(A.3.7) pode ser rescrita como

$$\langle P_{abs} \rangle = \frac{(q_0 s)^2 c}{2\pi \epsilon^2(\omega) r^6} \sigma_B(\omega) \quad (\text{A.3.10})$$

Como o espectro observado da potência transferida de uma molécula doadora para uma aceitadora é contínuo, devemos escrever

$$\langle P_{abs} \rangle = \int \frac{p_0^2(\omega) c}{2\pi \epsilon^2(\omega) r^6} \sigma_B(\omega) d\omega \quad (\text{A.3.11})$$

Vamos usar a seguinte notação para $\langle P_{irrad} \rangle$:

$$\langle P_{irrad} \rangle = \frac{p_0^2(\omega) \omega^4 n(\omega)}{3c^3} \equiv I_\lambda(\omega) \quad (\text{A.3.12})$$

Das eqs.(A.3.11) e (A.3.12) obtemos a potência transferida de uma molécula doadora para uma aceitadora na forma de uma integral de sobreposição

$$\langle P_{abs} \rangle = \frac{3c^4}{2\pi r^6} \int \frac{I_A(\omega) \sigma_B(\omega)}{\varepsilon^2(\omega) \omega^4} d\omega \quad (A.3.13)$$

onde $I_A(\omega) \sigma_B(\omega)$ expressa o grau de sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceitador.

A eq.(A.3.13) foi deduzida unicamente para o caso em que a orientação do dipolo aceitador está alinhada ao longo do eixo z. De modo geral, a energia de interação entre dois dipolos \vec{p}_D e \vec{p}_A (fig.(A.3.1)) é dada por

$$W_{DA} = \frac{\vec{p}_D \cdot \vec{p}_A - 3(\hat{n} \cdot \vec{p}_D)(\hat{n} \cdot \vec{p}_A)}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|^3 n^2} \quad (A.3.14)$$

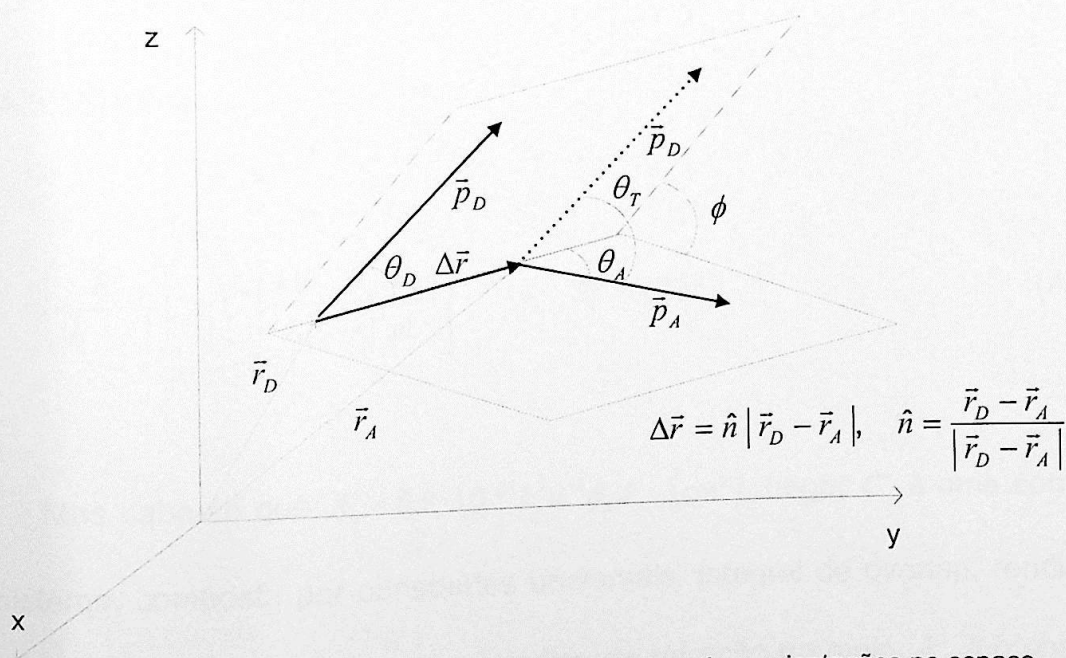


Fig.(A.3.1) Dipolos \vec{p}_D e \vec{p}_A e suas respectivas orientações no espaço.

A eq.(A.3.14) pode ser rescrita como

$$W_{D,A} = \frac{C}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|^3 n^2} k(\theta_T, \theta_D, \theta_A) \quad (\text{A.3.15})$$

onde $k(\theta_T, \theta_D, \theta_A)$ representa um fator de orientação entre os dipolos. Esse fator é dado por

$$k = \cos \theta_T - 3 \cos \theta_d \cos \theta_A \quad (\text{A.3.16})$$

onde

$$\cos \theta_T = \text{sen} \theta_D \text{sen} \theta_A + \cos \theta_D \cos \theta_A \quad (\text{A.3.17})$$

A energia de FRET é proporcional a $\left(\frac{R_0}{r}\right)^6$; uma relação entre esta e a eq.(A.3.15) fornece

$$\left(\frac{R_0}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|}\right)^6 = C' \left[\frac{k(\theta_T, \theta_D, \theta_A)}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|^3 n^2}\right]^2 \rightarrow R_0^6 = C' k^2 \quad (\text{A.3.18})$$

Mas sabe-se que $R_0^6 = 8.8 \cdot 10^{-25} k^2 n^{-4} \phi_d J$ (cm^6). Logo, C' é uma constante do sistema, composta por constantes universais, integral de overlap, rendimento quântico de D na ausência de A e o índice de refração do meio. k^2 é o chamado

fator de orientação entre os dipolos. Quando os dipolos estão alinhados ao longo do eixo z tem-se $\theta_i = 0$, $\theta_D = 0$ e $\theta_A = 0$, o que fornece $k^2 = 4$. Portanto, para um caso mais geral em que a orientação assume outras geometrias é preciso acrescentar o fator angular $\frac{1}{4}k^2$ à eq.(A.3.13). Assim:

$$\langle P_{abs} \rangle = \frac{3c^4 \kappa^2}{8 \pi r^6} \int \frac{I_A(\omega) \sigma_B(\omega)}{\varepsilon^2(\omega) \omega^4} d\omega \quad (\text{A.3.19})$$

A eq.(A.3.19) é o análogo clássico da taxa k_T de transferência de energia por FRET:

$$k_{FRET} = \frac{9000 (\ln 10) k \phi_d}{128 \pi^5 n^4 N r^6 \tau_d} \int_0^\infty \frac{F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) d\lambda}{\lambda^4} \quad (\text{A.3.20})$$

B. Fator de Orientação k^2 como uma Média Dinâmica.

Na hipótese de os dipolos da fig.(A.3.1) se difundirem rapidamente sobre todas as orientações possíveis num tempo curto comparado ao processo de transferência de energia é comum o uso da média dinâmica $\langle k^2 \rangle$:

$$\begin{aligned} \langle k^2 \rangle &= \langle (\sin\theta_D \sin\theta_A \sin\phi - 2\cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \rangle = \\ &= \langle \sin^2\theta_D \rangle \langle \sin^2\theta_A \rangle \langle \sin^2\phi \rangle - \\ &\quad \langle \sin 2\theta_D \rangle \langle \sin 2\theta_A \rangle \langle \sin\phi \rangle + 4 \langle \cos^2\theta_D \rangle \langle \cos^2\theta_A \rangle \end{aligned} \quad (\text{B.1})$$

onde a integração sobre todo o ângulo sólido fornece

$$\langle \cos^2 \theta_i \rangle_{i=D,A} = \frac{\int \cos^2 \theta_i d\Omega}{\int d\Omega} = \frac{\int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi \cos^2 \theta_i \sin \theta_i d\theta_i}{4\pi} = \frac{1}{3}$$

$$\langle \sin^2 \theta_i \rangle = 1 - \langle \cos^2 \theta_i \rangle = \frac{2}{3}$$

$$\langle \sin 2\theta_i \rangle_{i=D,A} = \langle \cos \phi \rangle = 0$$

Logo:

$$\langle k^2 \rangle = \frac{2}{3} \cdot \frac{2}{3} \cdot \frac{1}{2} + 4 \cdot \frac{1}{3} \cdot \frac{1}{3} = \frac{2}{3} \tag{B.2}$$

C. CD.

C.1. Fenômeno de CD.

Um campo elétrico planopolarizado que se propaga na direção z pode ser representado pela seguinte soma de dois campos elétricos circularmente polarizados:

$$\mathbf{E}(z,t) = \mathbf{E}_{\text{rcp}}(z,t) + \mathbf{E}_{\text{lcp}}(z,t) \quad (\text{C.1.1})$$

onde

$$\mathbf{E}_{\text{rcp}}(z,t) = E_{0,\text{rcp}} (\hat{\mathbf{i}} + i \hat{\mathbf{j}}) e^{\left[2\pi i \left(\nu t - \frac{z}{\lambda} \right)\right]} \quad (\text{C.1.2})$$

$$\mathbf{E}_{\text{lcp}}(z,t) = E_{0,\text{lcp}} (\hat{\mathbf{i}} - i \hat{\mathbf{j}}) e^{\left[2\pi i \left(\nu t - \frac{z}{\lambda} \right)\right]} \quad (\text{C.1.3})$$

$\mathbf{E}_{\text{rcp}}(z,t)$ e $\mathbf{E}_{\text{lcp}}(z,t)$ são, respectivamente, o campo elétrico circularmente polarizado no sentido horário (rcp) e o campo elétrico circularmente polarizado no sentido anti-horário (lcp). Ambos têm a mesma amplitude, i.e., $E_{0,\text{rcp}} = E_{0,\text{lcp}}$ (fig. C.1.1.a). Após passar através de uma amostra absorvente opticamente ativa os campos $\mathbf{E}_{\text{rcp}}(z,t)$ e $\mathbf{E}_{\text{lcp}}(z,t)$ mantêm-se circularmente polarizados, embora agora com amplitudes e fases diferentes uma vez que são absorvidos diferentemente pela amostra; quando estes campos resultantes são combinados tem-se um campo elétrico elipticamente polarizado (fig.C.1.1.b). Este é o fenômeno de Dicroísmo Circular (CD, do inglês 'Circular Dichroism').

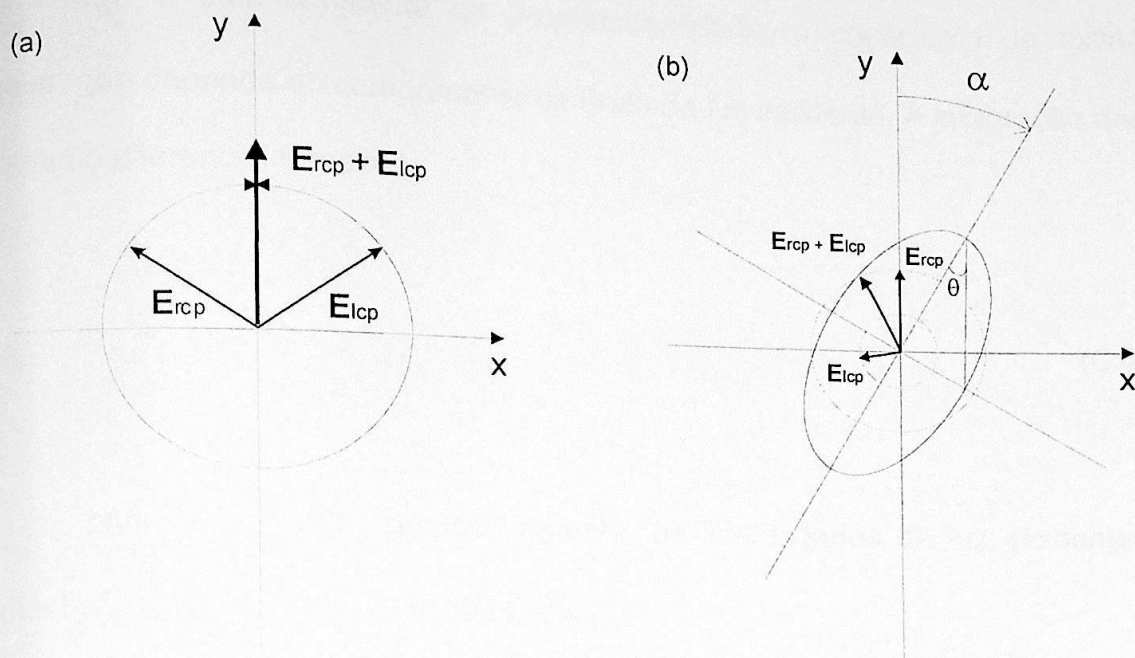


Fig.C.1.1. (a) campo elétrico plano-polarizado resultante de dois campos circularmente polarizados; (b) campo elipticamente polarizado, onde α é o ângulo de rotação óptica e θ é o ângulo de elipsidade.

C.2. Medida de CD.

A medida de CD é feita expondo a amostra alternativamente a campos elétricos polarizados circulares horário e anti-horário e detectando-se a diferença de absorção do campo.

A fração de luz absorvida é proporcional à concentração C das moléculas absorventes e ao caminho $d\ell$ percorrido pela luz:

$$-\frac{dI}{I_0} = \epsilon'(\lambda) \cdot C \cdot d\ell \tag{C.2.1}$$

$\varepsilon(\lambda)$ é uma constante de proporcionalidade, o coeficiente de extinção molar, que depende do comprimento de onda da luz incidente. A integração dessa equação diferencial fornece

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon' \cdot C \cdot \ell \quad (\text{C.2.2})$$

onde I_0 e I são, respectivamente, as intensidades da luz incidente na amostra e após percorrer uma distância ℓ .

Define-se a absorbância 'A' como

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot C \cdot \ell \quad (\text{C.2.3})$$

A medida de CD é definida como

$$\Delta A = A_r - A_l = \varepsilon_r C \ell - \varepsilon_l C \ell = \Delta \varepsilon C \ell \quad (\text{C.2.4})$$

onde $A_r = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I_r}\right) = \varepsilon_r C \ell$ e $A_l = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I_l}\right) = \varepsilon_l C \ell$.

Outra medida de CD, amplamente usada em literatura bioquímica, é dada pela razão entre os eixos menor e maior da luz elipticamente polarizada resultante da diferença de absorção. Essa razão corresponde à tangente de um ângulo θ , ilustrado na fig.C.1.b, chamado elipsidade. Uma vez que esse ângulo é comumente muito pequeno, vale a aproximação

$$\theta \text{ (rad)} \cong \text{tg}\theta = \frac{|\mathbf{E}_i| - |\mathbf{E}_r|}{|\mathbf{E}_i| + |\mathbf{E}_r|} \quad (\text{C.2.5})$$

Como $I_{k=r,l} \propto |E_k|^2$, tem-se que $\theta = \frac{e^{\Delta A \cdot \ln 10} - 1}{e^{\Delta A \cdot \ln 10} + 1} \cong \frac{(\ln 10) \cdot \Delta A}{2}$, pois ΔA é também pequeno. Convertendo em graus, obtém-se:

$$\theta \text{ (graus)} = \frac{180}{2\pi} \cdot \frac{(\ln 10) \Delta A}{2} = 32.98 \Delta A \quad (\text{C.2.6})$$

Para remover a dependência linear da concentração do soluto e do caminho óptico define-se a elipsidade molar $[\theta]$:

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot \ell} \quad (\text{C.2.7})$$

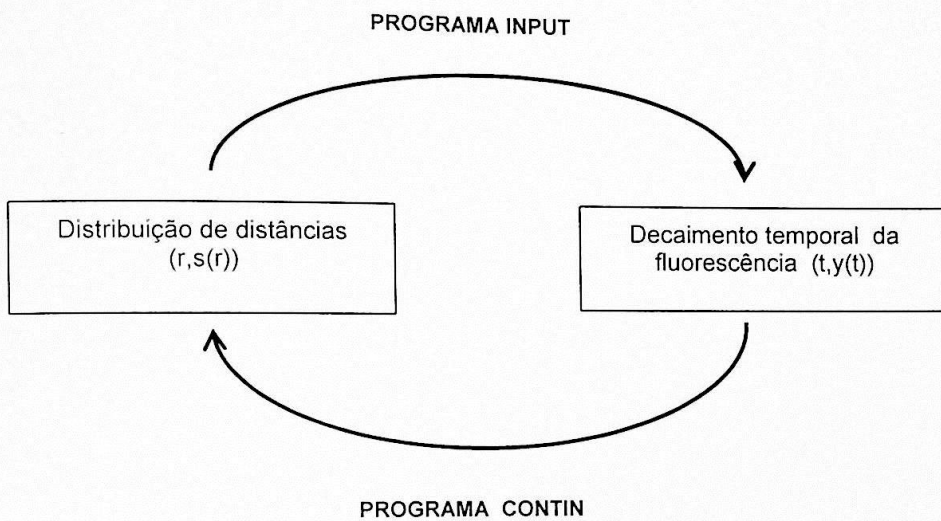
É prática comum usar a concentração residual média para o caso de polipeptídeos e proteínas; assim tem-se a elipsidade residual $[\theta]_{res}$:

$$[\theta]_{res} = \frac{100 \cdot \theta}{n \cdot C \cdot \ell} \quad (\text{C.2.8})$$

onde n representa o número de resíduos de aminoácidos presentes no polipeptídeo.

D. Algoritmo do Programa INPUT, Elaborado em Linguagem FORTRAN 77.

O programa INPUT foi concebido para criar uma curva de decaimento fluorescente a partir de uma distribuição de distâncias definida pelo usuário. Existe uma relação importante entre os programas CONTIN e INPUT:



Esta relação permite verificar se o programa CONTIN retorna corretamente o resultado $(r,s(r))$ a partir do decaimento simulado $(t,y(t))$ obtido para uma dada distribuição de distâncias $(r,s(r))$. Segue abaixo o algoritmo INPUT:

C=====

C= PROGRAM INPUT: cria o arquivo de entrada do programa CONTIN. =

C= O programa INPUT permite criar também uma cur- =

C= va de decaimento por FRET a partir de uma dis- =

C= tribuição de distâncias definida pelo usuário. =

C= (Criado por Alberto H Katagiri em 20.08.2001) =

C=====

PROGRAM INPUT

COMMON y,t,yl,tl,c,NY,INI,sml,np,ri,rf,noFRET

INTEGER NY,INI,sml,np,noFRET

REAL y(4095),t(4095),yl(4095),tl(4095),c(30),ri,rf

CALL Datain

CALL Select

CALL Output

CALL Sttstc

END

C=====

C= SUBROUTINE Datain: abre os arquivos 'lamp.dat' (perfil da lâmpa- =

C= da), 'parametros.dat' (arquivo que contém va- =

C= lores da distância de Förster, tempos de vida, =

C= fatores pré-exponenciais, impurezas, etc.) e =

C= 'decay.dat' (valores de decaimento fluores - =

C= cente, obtidos experimentalmente ou por simu- =

C= lação). =

C=====

SUBROUTINE Datain

COMMON y,t,y1,t1,c,NY,INI,sml,np,ri,rf,noFRET

INTEGER NY,INI,sml,np,noFRET

REAL y(4095),t(4095),y1(4095),t1(4095),c(30),ri,rf

INTEGER j,eof,decay,lamp,paramt,fdecay

DATA decay,lamp,paramt,fdecay /1,9,20,35/

WRITE(*,'(/X,A/)') 'P R O G R A M A I N P U T'

OPEN(lamp,FILE='lamp.dat')

DO 11 j=1,4095

 READ(lamp,'(E10.4,2X,E10.4)') t1(j),y1(j)

11 CONTINUE

CLOSE(lamp)

OPEN(paramt,FILE='parametros.dat')

 j=1

 eof=0

 DO WHILE(eof.EQ.0)

 READ(paramt,'(E10.4)',IOSTAT=eof) c(j)

 j=j+1

 ENDDO

CLOSE(paramt)

WRITE(*,'(/X,2A\)') 'Deseja fazer uma simulacao?'

& ' [0] nao [1] sim : '

READ(*,'(I1)') sml

IF(sml.EQ.0) THEN

```
WRITE(*, '(/X,A\)' ) 'Digite o numero de pontos desejado (NG): '  
READ(*,*) np
```

```
WRITE(*, '(/X,A\)' ) 'Distancia minima da distrb. (GMNMX1): '  
READ(*,*) ri
```

```
WRITE(*, '(/X,A\)' ) 'Distancia maxima da distrb. (GMNMX2): '  
READ(*,*) rf
```

```
OPEN(decay, FILE='decay.dat')
```

```
DO 12 j=1,4095
```

```
READ(decay, '(E10.4,2X,E10.4)' ) t(j),y(j)
```

```
12 CONTINUE
```

```
CLOSE(decay)
```

```
ELSE IF(sml.EQ.1) THEN
```

```
CALL Fakedata
```

```
OPEN(fdecay, FILE='fdecay.dat')
```

```
DO 13 j=1,4095
```

```
READ(fdecay, '(E10.4,2X,E10.4)' ) t(j),y(j)
```

```
13 CONTINUE
```

```
CLOSE(fdecay)
```

```
ENDIF
```

```
RETURN
```

```
END
```

```
C=====
C=  SUBROUTINE Select: promove o corte de possíveis dados espúrios   =
C=                               (ruídos).                             =
C=====
```

```
SUBROUTINE Select
```

```
COMMON y,t,yl,tl,c,NY,INI,sml,np,ri,rf,noFRET
```

```
INTEGER NY,INI,sml,np,noFRET
```

```
REAL y(4095),t(4095),yl(4095),tl(4095),c(30),ri,rf
```

```
INTEGER j,u,m,choice
```

```
REAL cut,rate
```

```
CHARACTER sn*1
```

```
WRITE(*,'(//X,A\)' ) 'Ajuste a partir do pico (s/n): '
```

```
READ(*,'(A1)') sn
```

```
IF(sml.EQ.0) THEN
```

```
WRITE(*,'(//X,A,A\)' ) 'Selecione a forma de corte: ',
```

```
&                               '[1] valor minimo   [2] porcentagem:  '
```

```
READ(*,'(I1)') choice
```

```
ELSE
```

```
choice=1
```

```
ENDIF
```

```
DO 11 j=1,4095
```

```
IF(y(j).GE.1.0E+04) INI=j  
11 CONTINUE
```

```
u=0
```

```
m=INI
```

```
IF(choice.EQ.1) THEN
```

```
WRITE(*,'(//X,A\')') 'Intensidade minima final p/ corte: '  
READ(*,*) cut
```

```
DO WHILE((u.LE.1).AND.(m.LE.4095))
```

```
IF(y(m).LE.cut) u=u+1
```

```
m=m+1
```

```
ENDDO
```

```
ELSE IF(choice.EQ.2) THEN
```

```
WRITE(*,'(//X,A\')') 'Tolerancia (em %): '
```

```
READ(*,*) cut
```

```
DO WHILE((u.LE.10).AND.(m.LE.4095))
```

```
rate=100*ABS(LOG(y(m+1)/y(m))/AMAX1(LOG(y(m)),LOG(y(m+1))))
```

```
IF(rate.GT.cut) u=u+1
```

```
m=m+1
```

```
ENDDO
```

```
ENDIF
```

```
NY=m-1
```

```
IF(sn.NE.'s') INI=1
```

```
RETURN
```

```
END
```

```
C=====
C= SUBROUTINE Fakedata: simula o decaimento fluorescente de uma dis- =
C= tribuição de distâncias definida pelo usuá- =
C= rio. Esta sub-rotina só é acionada quando a =
C= opção 'simulação' é requisitada. =
C=====
```

```
SUBROUTINE Fakedata
```

```
COMMON y,t,y1,t1,c,NY,INI,sml,np,ri,rf,noFRET
```

```
INTEGER NY,INI,sml,np,noFRET
```

```
REAL y(4095),t(4095),y1(4095),t1(4095),c(30),ri,rf
```

```
INTEGER i,j,h,q,choice,npico,eof,fdecay,my,distrb
```

```
REAL r(100),s(100),K(100,4095),P(5),L(5),W(5),pico(200),cte,
```

```
& pmax,weight,cnoFRET,imp(4095),Gauss,Kernel,Userlf
```

```
DATA fdecay,my,distrb /35,40,50/
```

```
WRITE(*,'(//3X,A/)') 'Sub-rotina F A K E D A T A acionada:'
```

```
WRITE(*,'(/3X,2A\)' ) 'Selecione o tipo de distribuicao: ',
```

```
& '[1] soma de gaussianas [2] outro '
```

```
READ(*,'(I1)') choice
```

```
IF(choice.EQ.1) THEN
```

```
WRITE(*,'(/3X,A\)' ) 'Digite o numero de pontos desejado (NG): '  
READ(*,*) np
```

```
WRITE(*,'(/3X,A\)' ) 'Distancia minima da distrb. (GMNMX1): '  
READ(*,*) ri
```

```
WRITE(*,'(/3X,A\)' ) 'Distancia maxima da distrb. (GMNMX2): '  
READ(*,*) rf
```

```
WRITE(*,'(/3X,A\)' ) 'Numero de picos: '  
READ(*,*) npico
```

```
DO 12 q=1,npico
```

```
WRITE(*,'(/3X,A,I2,A\)' ) 'Posicao do pico',q,' = '  
READ(*,*) P(q)
```

```
WRITE(*,'(/3X,A,I2,A\)' ) 'Largura do pico',q,' = '  
READ(*,*) L(q)
```

```
IF(npico.GT.1) THEN
```

```
IF(q.LT.npico) THEN
```

```
WRITE(*,'(/3X,A,I2,A\)' ) 'Peso do pico',q,' = '  
READ(*,*) W(q)
```

```
ELSE IF(q.EQ.npico) THEN
```

```
weight=0
```

```
DO 11 i=1,npico-1
```

```
weight=weight+W(i)
```

```
11 CONTINUE
```

```
W(npico)=1-weight
```

```
ENDIF
```

```
ELSE
    W(1)=1
ENDIF
12 CONTINUE
```

```
DO 13 h=1,np
    r(h)=ri+(h-1)*(rf-ri)/(np-1)
    s(h)=Gauss(h,npico,r,P,L,W)
13 CONTINUE
```

```
ELSE IF(choice.EQ.2) THEN
```

```
OPEN(my,FILE='mydistrb.dat')
```

```
h=1
```

```
eof=0
```

```
DO WHILE(eof.EQ.0)
```

```
    READ(my,'(E10.4,2X,E10.4)',IOSTAT=eof) r(h),s(h)
```

```
h=h+1
```

```
ENDDO
```

```
np=h-2
```

```
CLOSE(my)
```

```
ri=r(1)
```

```
rf=r(np)
```

```
ENDIF
```

```
OPEN(distrb,FILE='distrb.dat')
```

```
DO 14 h=1,np
```

```
    WRITE(distrb,'(E10.4,2X,E10.4)') r(h),s(h)
```

14 CONTINUE

CLOSE(distrb)

WRITE(*, '(/3X,2A\)') 'Deseja incluir uma impureza?',
& ' [0] nao [1] sim : '

READ(*, '(I1)') noFRET

IF(noFRET.EQ.0) THEN

DO 15 j=1,4095

imp(j)=0

15 CONTINUE

ELSE IF(noFRET.EQ.1) THEN

WRITE(*, '(/3X,A,E10.4,A)') 'Tempo de vida da impureza = ',
& c(6+2*c(3)), ' ns'

WRITE(*, '(/3X,A\)') 'Coeficiente da impureza: '

READ(*,*) cnoFRET

DO 16 j=1,4095

imp(j)=Userlf(j,t1,y1,c,cnoFRET)

16 CONTINUE

ENDIF

DO 18 h=1,np

cte=1+(c(1)/r(h))**6

DO 17 j=1,4095

$K(h, j) = \text{Kernel}(j, \text{cte}, t1, y1, c)$

WRITE(*, *) h, j, K(h, j)

17 CONTINUE

18 CONTINUE

DO 20 j=1, 4095

y(j)=0

DO 19 h=2, np

$y(j) = y(j) + (K(h, j) * s(h) + K(h-1, j) * s(h-1)) * (r(h) - r(h-1)) / 2$

19 CONTINUE

y(j)=y(j)+imp(j)

20 CONTINUE

i=1

DO 21 j=2, 200

IF((y(j-1).LT.y(j)).AND.(y(j).GT.y(j+1))) THEN

pico(i)=y(j)

i=i+1

ENDIF

21 CONTINUE

IF((i-1).GT.1) THEN

pmax=0

DO 22 j=1, i-1

IF(pico(j).GT.pmax) pmax=pico(j)

22 CONTINUE

ELSE

pmax=pico(1)

ENDIF

```
DO 23 j=1,4095
    y(j)=y(j)*1.0E+04/pmax
23 CONTINUE

OPEN(fdecay,FILE='fdecay.dat')
    DO 24 j=1,4095
        WRITE(fdecay,'(E10.4,2X,E10.4)') t1(j),y(j)
24 CONTINUE
CLOSE(fdecay)

RETURN

END
```

```
C=====
C= SUBROUTINE Output: gera o arquivo de entrada para o programa =
C= CONTIN. =
C=====
```

SUBROUTINE Output

```
COMMON y,t,yl,t1,c,NY,INI,sml,np,ri,rf,noFRET
INTEGER NY,INI,sml,np,noFRET
REAL y(4095),t(4095),yl(4095),t1(4095),c(30),ri,rf
INTEGER i,j,out,nlife,nimp,NLINF
DATA out/25/

OPEN(out)
```

```
IF(noFRET.EQ.1) THEN
```

```
  NLINF=1
```

```
ELSE
```

```
  NLINF=0
```

```
ENDIF
```

```
WRITE(out,200) NLINF,np,ri,rf,c(1),INI
```

```
200 FORMAT(
```

```
& 1X,'TEST DATA SET 1 (MOLECULAR DISTANCE DISTRIBUTION)',/,
& 1X,'IUNIT',19X,'8.',/,
& 1X,'NINTT',19X,'0.',/,
& 1X,'NLINF',19X,I1,'.',/,
& 1X,'NG',20X,I3,'.',/,
& 1X,'GMNMX',5X,'1',5X,F10.2,/,
& 1X,'GMNMX',5X,'2',5X,F10.2,/,
& 1X,'IQUAD',19X,'2.',/,
& 1X,'IGRID',19X,'1.',/,
& 1X,'IWT',21X,'2.',/,
& 1X,'NENDZ',5X,'1',13X,'2.',/,
& 1X,'NENDZ',5X,'2',13X,'2.',/,
& 1X,'NERFIT',16X,'050.',/,
& 1X,'RUSER',5X,'4',9X,F6.2,/,
& 1X,'IUSER',5X,'2',13X,'1.',/,
& 1X,'IUSER',5X,'4',13X,'0.',5X,'[0]=s/backg, [1]=c/backg',/,
& 1X,'IUSER',4X,'22',11X,I3,'.',5X,'indice do tempo inicial')
```

! n° de tempos de vida.

```
nlife=c(3)
```

```
WRITE(out,201) 29,nlife
```

```
201 FORMAT(1X,'IUSER',4X,I2,13X,I1,'.',5X,'no de tempos',
```

```
&      ' de vida')

WRITE(out,202) 30,c(2)
202  FORMAT(1X,'RUSER',4X,I2,9X,F6.3,5X,'constante A')

DO 11 i=1,nlife
      WRITE(out,203) i+30,c(i+3),i
203  FORMAT(1X,'RUSER',4X,I2,9X,F6.3,5X,'T',I1)
11  CONTINUE

WRITE(out,204) 70,c(3+nlife+1)
204  FORMAT(1X,'RUSER',4X,I2,9X,F6.3,5X,'shift')

DO 12 i=1,nlife
      WRITE(out,205) i+30+nlife,c((3+nlife+1)+i),i
205  FORMAT(1X,'RUSER',4X,I2,9X,F6.3,5X,
&      'fator pre-exponencial ',I1)
12  CONTINUE

nimp=c((3+2*nlife+1)+1) ! n° de impurezas.

DO 13 i=1,nimp
      WRITE(out,206) i+50,c(((3+2*nlife+1)+1)+i),i
206  FORMAT(1X,'RUSER',4X,I2,9X,F6.3,5X,
&      'tempo da impureza ',I1)
13  CONTINUE

WRITE(out,207)
207  FORMAT(
&      1X,'IFORMT',/,
```

```
& 1X, '(1E10.4)', //,  
& 1X, 'IFORMY', //,  
& 1X, '(1E10.4)', //,  
& 1X, 'END')  
  
WRITE(out, 208) NY-INI+1  
208 FORMAT(1X, 'NY', 4X, I5)  
  
DO 14 j=INI, NY  
    WRITE(out, 209) t(j)  
14 CONTINUE  
DO 15 j=INI, NY  
    WRITE(out, 209) y(j)  
15 CONTINUE  
209 FORMAT(E10.4)  
  
CLOSE(out)  
  
RETURN  
  
END
```

```
C=====
```

C= SUBROUTINE Sttstc: faz o cálculo do Chi-quadrado e dos resíduos. =

```
C=====
```

```
SUBROUTINE Sttstc
```

```
COMMON y,t,y1,t1,c,NY,INI,sml,np,ri,rf,noFRET
INTEGER NY,INI,sml,np,noFRET
REAL y(4095),t(4095),y1(4095),t1(4095),c(30),ri,rf
INTEGER j,n,p,stat
REAL decay,texp(4095),yexp(4095),R(4095),w(4095),chisq,chisqr
DATA decay,stat /1,60/

IF(sml.EQ.1) THEN

    OPEN(decay,FILE='decay.dat')
        DO 11 j=1,4095
            READ(decay,'(E10.4,2X,E10.4)') texp(j),yexp(j)
11        CONTINUE
        CLOSE(decay)

        DO 12 j=INI,NY
            R(j)=y(j)-yexp(j)
            IF(y(j).EQ.0) THEN
                w(j)=0
            ELSE
                w(j)=1/y(j)
            ENDIF
12        CONTINUE

            chisq=0

            DO 13 j=INI,NY
                chisq=chisq+w(j)*(R(j)**2)
13        CONTINUE
```

n=NY-INY+1

p=2*c(3)+NINT(c(3+c(3)+1)/(c(3+c(3)+1)+1.0E-08))+
& NINT(c(2)/(c(2)+1.0E-08))

chisqr=chisq/(n-p-1)

OPEN(stat, FILE='fSttstc.dat')

WRITE(stat, '(/2X,A/)') 'Resíduos:'

DO 14 j=INI, NY

WRITE(stat, '(E10.4,2X,E10.4)') t1(j),w(j)*R(j)

14 CONTINUE

WRITE(stat, '(/2X,A,E10.4)') 'Chi-quad red = ', chisqr

CLOSE(stat)

ENDIF

RETURN

END

C=====

C= REAL FUNCTION Gauss: cria a distribuição de distâncias dada por =

C= uma soma normalizada de gaussianas. =

C=====

REAL FUNCTION Gauss(h, npico, r, P, L, W)

INTEGER i, h, npico

```
REAL r(100),P(5),L(5),W(5),pi  
PARAMETER (pi=3.14159265)
```

```
Gauss=0
```

```
DO 11 i=1,npico
```

```
    Gauss=Gauss+6/(SQRT(2*pi)*L(i))*
```

```
    &      EXP(-18*((r(h)-P(i))/L(i))**2)*W(i)
```

```
11 CONTINUE
```

```
IF((Gauss).LT.(1.0E-08)) Gauss=0
```

```
END
```

```
C=====
```

```
C=  REAL FUNCTION Kernel: executa a integral de convolução entre o  =
```

```
C=                                perfil da lâmpada (yl(t')) e o decaimento  =
```

```
C=                                fluorescente (y(r,t-t')).                =
```

```
C=====
```

```
REAL FUNCTION Kernel(j,cte,tl,yl,c)
```

```
INTEGER j,i,q,m
```

```
REAL yl(4095),tl(4095),c(30),f(j),cte
```

```
Kernel=0
```

```
DO 12 i=1,j
```

```
    f(i)=0
```

```
DO 11 q=1,c(3)
    f(i)=f(i)+c(3+c(3)+1+q)*
&      EXP(-(t1(j)-t1(i)+c(3+c(3)+1))*cte/c(3+q))
11 CONTINUE
    f(i)=f(i)+c(2)
12 CONTINUE

IF(j.GE.2) THEN
    DO 13 m=2,j
        Kernel=Kernel+(y1(m)*
&      f(m)+y1(m-1)*f(m-1))*1/2
13 CONTINUE
ENDIF

IF(Kernel.LT.(1.0E-08)) Kernel=0

END
```

```
C=====
C= REAL FUNCTION Userlf: executa a integral de convolução entre o =
C= perfil da lâmpada e o decaimento do fluo- =
C= róforo doador (impureza). =
C=====
```

```
REAL FUNCTION Userlf(j,t1,y1,c,cnoFRET)
```

```
INTEGER i,j,m
```

```
REAL t1(4095),y1(4095),c(30),fimp(j),cnoFRET
```

```
Userlf=0

DO 11 i=1,j
    fimp(i)=cnoFRET*EXP(-(t1(j)-t1(i))/c(6+2*c(3)))
11 CONTINUE

IF(j.GE.2) THEN
    DO 12 m=2,j
        Userlf=Userlf+(yl(m)*fimp(m)+yl(m-1)*fimp(m-1))*
&                1/2
12 CONTINUE
ENDIF

IF((Userlf).LT.(1.0E-08)) Userlf=0

END
```

E. Breve Estudo da Integral $I = \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ f(\omega) \operatorname{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right] / \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2 \right\} d\omega .$

A função

$$\phi(\omega) = \operatorname{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right] / \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2 \tag{E.1}$$

é fortemente concentrada em torno de $\omega = \omega_{pk}$, sendo conhecida por possuir o comportamento de um delta de Dirac, $\delta\left(\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2}\right)$. Uma propriedade importante de $\phi(\omega)$ corresponde à filtragem de $f(\omega)$:

$$I = \int_{-\infty}^{+\infty} f(\omega) \phi(\omega) d\omega = f(\omega_{pk}) \tag{E.2}$$

Vamos primeiramente analisar a integral abaixo:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 x}{x^2} dx = \pi . \tag{E.3}$$

O integrando da eq.(E.3) é uma função par; logo:

$$\int_0^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 x}{x^2} dx = \frac{\pi}{2} \tag{E.4}$$

Seja agora a função $f(x) = \frac{\text{sen}^2 x}{x}$. Derivando-a e posteriormente integrando-a ao longo do intervalo $]0, +\infty[$ temos

$$\int_{0^+}^{+\infty} \frac{d}{dx} \left(\frac{\text{sen}^2 x}{x} \right) dx = \int_{0^+}^{+\infty} \frac{\text{sen} 2x}{2x} d(2x) - \int_{0^+}^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 x}{x^2} dx \Leftrightarrow \int_{0^+}^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 x}{x^2} dx = \int_{0^+}^{+\infty} \frac{\text{sen} y}{y} dy \tag{E.5}$$

Vamos considerar agora a integral complexa

$$I = \oint_{\Gamma} \frac{e^{iz}}{z} dz \tag{E.6}$$

onde o caminho de integração Γ é uma curva fechada no plano complexo (fig.(E.1)), tal que $\frac{e^{iz}}{z}$ é analítica dentro e ao longo desta curva. Pelo *Teorema de Cauchy*, temos que $\oint_{\Gamma} \frac{e^{iz}}{z} dz = 0$.

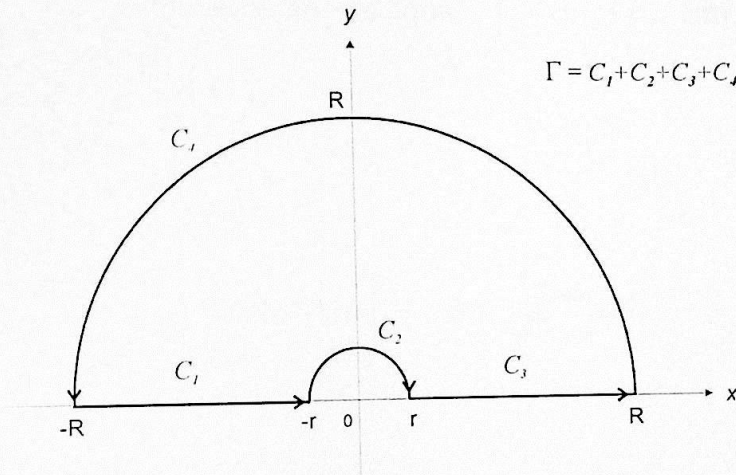


Fig.(E.1). Caminho de integração Γ no plano complexo.

Podemos dividir a eq.(E.6) nas partes

$$\int_{-R \rightarrow -\infty}^{-r \rightarrow 0^-} \frac{e^{ix}}{x} dx + \int_{C_2} \frac{e^{iz}}{z} dz + \int_{r \rightarrow 0^+}^{R \rightarrow +\infty} \frac{e^{ix}}{x} dx + \int_{C_4} \frac{e^{iz}}{z} dz = 0 \tag{E.7}$$

Ao reescrever a equação acima, obtemos:

$$\int_{r \rightarrow 0+}^{R \rightarrow +\infty} \frac{e^{ix} - e^{-ix}}{x} dx = \int_{r \rightarrow 0+}^{R \rightarrow +\infty} \frac{\text{sen}x}{x} dx = -\frac{1}{2i} \left(\int_{C_2} \frac{e^{iz}}{z} dz + \int_{C_4} \frac{e^{iz}}{z} dz \right) \quad (\text{E.8})$$

Vamos calcular a integral $\int_{C_2} \frac{e^{iz}}{z} dz$:

$$\int_{C_2} \frac{e^{iz}}{z} dz = \lim_{r \rightarrow 0+} \int_{\pi}^0 \frac{e^{ire^{i\theta}}}{re^{i\theta}} \left[\frac{d}{d\theta} (re^{i\theta}) d\theta \right] = \lim_{r \rightarrow 0+} i \int_{\pi}^0 e^{ire^{i\theta}} d\theta \cong i \int_{\pi}^0 d\theta = -i\pi \quad (\text{E.9})$$

Segue agora a demonstração de que $\int_{C_4} \frac{e^{iz}}{z} dz \rightarrow 0$. Em coordenadas

polares, temos

$$\int_{C_4} \frac{e^{iz}}{z} dz = \lim_{R \rightarrow +\infty} \int_0^{\pi} \frac{e^{iRe^{i\theta}}}{Re^{i\theta}} \left[\frac{d}{d\theta} (Re^{i\theta}) d\theta \right] = \lim_{R \rightarrow +\infty} i \int_0^{\pi} e^{iRe^{i\theta}} d\theta \quad (\text{E.10})$$

Em módulo, vale a desigualdade

$$\begin{aligned} \left| \int_0^{\pi} e^{iRe^{i\theta}} d\theta \right| &\leq \int_0^{\pi} |e^{iRe^{i\theta}}| d\theta = \\ &= \int_0^{\pi} e^{iR \cos \theta - R \text{sen} \theta} d\theta = \int_0^{\pi} e^{-R \text{sen} \theta} d\theta = 2 \int_0^{\pi/2} e^{-R \text{sen} \theta} d\theta \end{aligned} \quad (\text{E.11})$$

No intervalo $]0, \frac{\pi}{2}]$ a função $\frac{\text{sen} \theta}{\theta}$ é estritamente decrescente. Logo, nesse

intervalo vale a desigualdade

$$\frac{\operatorname{sen} \theta}{\theta} \geq \frac{\operatorname{sen} \frac{\pi}{2}}{\frac{\pi}{2}} \Leftrightarrow \operatorname{sen} \theta \geq \frac{2\theta}{\pi} \quad (\text{E.12})$$

Assim:

$$\int_0^{\pi} e^{-R \operatorname{sen} \theta} d\theta \leq \int_0^{\frac{\pi}{2}} e^{-R \frac{2\theta}{\pi}} d\theta = \frac{\pi}{2R} (1 - e^{-R}) \xrightarrow{R \rightarrow +\infty} 0 \quad (\text{zero}) \quad (\text{E.13})$$

Portanto:

$$\int_{C_R} \frac{e^{iz}}{z} dz = 0 \quad (\text{E.14})$$

A equação acima é um caso particular da eq.(E.15) abaixo:

$$I_R = \int_{C_R} e^{iz} f(z) dz \quad (\text{E.15})$$

onde C_R é um semicírculo de centro na origem e raio R . O *Lema de Jordan*, que citamos a seguir, estabelece condições suficientes para que a integral da eq.(E.15) tenda a zero com $R \rightarrow \infty$: "Sejam $r > 0$ e $C_R = z = Re^{i\theta}$, $0 \leq \theta \leq \pi$ no semiplano superior. Suponhamos que f seja regular nesse semiplano à exceção, eventualmente, de número finito de singularidades isoladas, e que o máximo $G(R)$ de $|f(z)|$ para z em C_R tenda a zero com $R \rightarrow \infty$. Então $I_R \rightarrow 0$ com $R \rightarrow \infty$ ".

Portanto, as eqs. (E.9, E.13) determinam a eq.(E.8):

$$\int_{0+}^{+\infty} \frac{\text{sen}x}{x} dx = -\frac{1}{2i}(-i\pi + 0) = \frac{\pi}{2} \quad (\text{E.16})$$

Provamos, assim, que

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 x}{x^2} dx = \pi$$

Para $x = x(\omega) = (\omega_0 - \omega) \frac{t}{2}$, temos

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 x}{x^2} d\omega = \int_{-\infty}^{+\infty} \phi(\omega) d\omega = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\text{sen}^2 \left[(\omega_0 - \omega) \frac{t}{2} \right]}{\left[(\omega_0 - \omega) \frac{t}{2} \right]^2} d\omega = \frac{2\pi}{t} \quad (\text{E.17})$$

No nosso caso (fig.E.2), estimamos $t = 10^{-12}$ s (ordem de grandeza do tempo de excitação $p \rightarrow k$ da molécula aceitadora) e $\omega_{pk} = \frac{2\pi}{c\lambda} = 6,283 \cdot 10^{15}$ rad/s (onde $\lambda \approx 300$ nm, que corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente do laser). O comportamento de $\phi(\omega)$ é ilustrado na fig.(E.3).

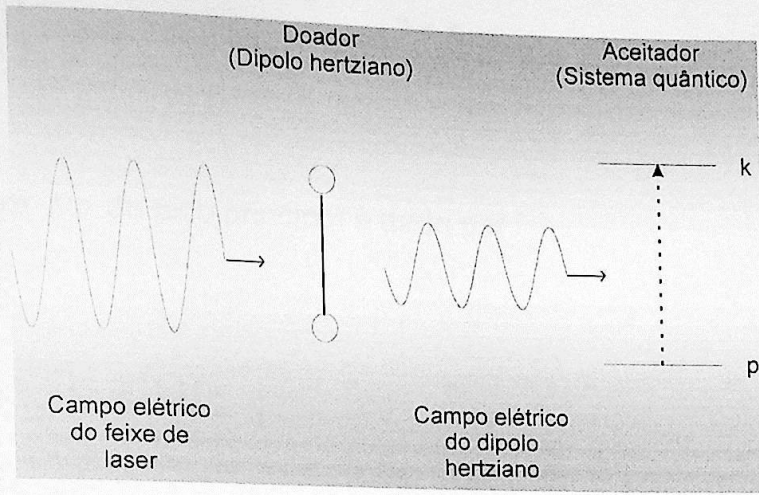


Fig.(E.2). Processo de excitação da molécula doadora através de FRET.

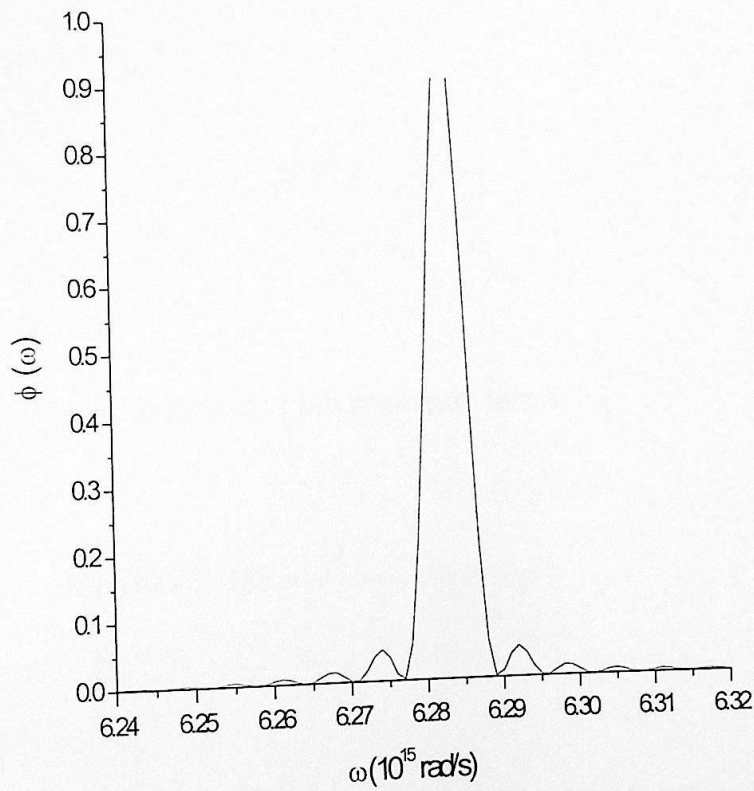


Fig.(E.3). Gráfico da função $\phi(\omega)$, para $\omega_{pk} = 6,283 \cdot 10^{15} \text{ rad/s}$ e $t = 10^{-12} \text{ s}$.

Os zeros da função $\phi(\omega)$ ocorrem para

$$(\omega_0 - \omega) \frac{t}{2} = n \pi \Leftrightarrow \omega(n) = \omega_0 - \frac{2 n \pi}{t}, \quad n \in \mathbb{Z}^* \quad (\text{E.18})$$

A largura $\Delta\omega$ do pico principal é dada por

$$\Delta\omega = \omega(-1) - \omega(+1) = \frac{4 \pi}{t} \quad (\text{E.19})$$

Dessa equação obtemos $\Delta\omega = 1,25 \cdot 10^{13} \text{ rad/s}$.

É interessante obter a equação $\Delta\lambda(\Delta\omega)$, que dá a variação de λ com $\Delta\omega$.

Da eq.(E.18) obtemos:

$$\frac{2\pi c}{\lambda(n)} = \frac{2\pi c}{\lambda_{ip}} - \frac{2 n \pi}{t} \Leftrightarrow \lambda(n) = \frac{1}{\frac{1}{\lambda_{ip}} - \frac{n}{ct}} \quad (\text{E.20})$$

Assim, para a largura do pico principal, temos:

$$\Delta\lambda(\Delta\omega) = \lambda(+1) - \lambda(-1) = \frac{1}{\frac{1}{\lambda_{ip}} - \frac{1}{ct}} - \frac{1}{\frac{1}{\lambda_{ip}} + \frac{1}{ct}} \quad (\text{E.21})$$

Através dessa equação estimamos que $\Delta\lambda(1,25 \cdot 10^{13} \text{ rad/s}) = 2,00 \cdot 10^{-10} \text{ m}$.

Caso a função $f(\omega)$ varie pouco num intervalo de algumas unidades de angstrom, a integral

$$I = \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ f(\omega) \operatorname{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right] / \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2 \right\} d\omega \quad (\text{E.22})$$

assume o valor $I \cong f(\omega_{pk})$ devido à filtragem. Esse é o caso do índice de refração $n(\omega)$, contido na eq. (3.1.1.1.2), que dá a probabilidade $|a_k(t)|^2$ de transição eletrônica $p \rightarrow k$ por FRET da molécula doadora:

$$\begin{aligned} |a_k(t)|^2 &= \frac{1}{\hbar^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ \left| \left\langle k \left| -\mathbf{p}_a \cdot \frac{3(\mathbf{p}_d \cdot \hat{\mathbf{r}})\hat{\mathbf{r}} - \mathbf{p}_d}{n^2(\omega)r_{ad}^3} \right| p \right\rangle \right|^2 \frac{\operatorname{sen}^2 \left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]}{\left[\frac{(\omega_{pk} - \omega)t}{2} \right]^2} \right\} t^2 d\omega \cong \\ &\cong \frac{1}{\hbar^2} \left[\frac{\kappa^2 |\mathbf{p}_a|^2 |\mathbf{p}_d|^2}{n^4(\omega_{pk}) r_{ad}^6} \cdot \frac{2\pi}{t} \right] t^2 = \frac{2\pi\kappa^2 |\mathbf{p}_a|^2 |\mathbf{p}_d|^2}{\hbar^2 n^4(\omega_{pk}) r_{ad}^6} t \end{aligned} \quad (\text{E.23})$$

Bibliografia.

1. Andrews, D. L. (1989) A unified theory of radiative and radiationless molecular energy transfer. *Chem Phys.* **135**, 195-201.
2. Andrews, D. L. e Sherborne, B. S. (1987) Resonant excitation transfer: a quantum electrodynamical study. *J. Chem. Phys.* **86**, 4011-4017.
3. Avery, J. S. (1984) Use of the s-matrix in the relativistic treatment of resonance energy-transfer. *Int J. Quant. Chem.* **25**, 79-96.
4. Badea, M. G. e Brand, L. (1971) Time-resolved fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* **61**, 378-425.
5. Belzar, K. J., Dafforn, T. R., Petitou, M., Carrell, R. N. e Huntington, J. A. (2000) The effect of a reducing-end extension on pentasaccharide binding by antithrombin. *J. Biol. Chem.* **275**, 8733-8741.
6. Cantor, C. R. e Schimmel, P. R. (1989) Biophysical chemistry / part II: techniques for the study of biological structure and function. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
7. Cardin, A. D. e Weintraub, H. J. R. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**, 21-32.
8. Cario, G. e Franck, J. (1923) *Z. Phys.* **17**, 202-212.
9. Carrell, R. W., Evans, D. L. e Stein, P. E. (1991) Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis. *Nature (London)* **353**, 576-578.

10. Chuang, Y. J., Swanson, R., Raja, S. M. e Olson, S. T. (2001) Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive centre loop sequence. Evidence for an exocite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14961-14971.
11. Corney, A (1988) Atomic and laser spectroscopy. Clarendon, Oxford.
12. Demas, J. N. (1983) Excited state lifetime measurements. Academic Press, New York.
13. Fasman, G.D. (1996) Circular dichroism and the conformacional analysis of biomolecules. Plenum, New York.
14. Förster, T. (1946) Energiewanderung und fluoreszenz. *naturwissenschaften*, **6**, 166-175.
15. Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.*, **2**, 55-75.
16. Förster, T. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer. In Istanbul Lectures, part III: action of light and organic crystals. O. Sinanoglu, editor. Academic Press, New York, pp.93-137.
17. Griffiths, D. J. (1989) Introduction to electrodynamics. 2^a ed., Prentice Hall, New Jersey.
18. Heald, M.A., Marion, J.B. (1995) Classical electromagnetic radiation. 3^a ed., Saunders College Publishing, Flórida.
19. Hoch, G., Knox, R. S. (1968) Primary processes in photosynthesis. Giese, A. C., ed. Photophysiology. New York, Academic Press, v.3.

20. Hsu, H. P. (1987) Analisis de fourier : teoria y problemas. Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware.
21. Jackson, R. L., Busch, S. J. e Cardin, A. D. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* **71**, 481-539.
22. Jin, L., Abrahams, J. P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R. N. e Carrell, R. W. (1997) The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14683-14688.
23. Kallman, H., London, F. (1928) *Z. Phys. Chem. B*, **2**, 207-43.
24. Lakowicz, J. R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum, New York.
25. Lane, D. A., Denton, J., Flynn, A. M., Thunberg, L. e Lindahl, U. (1984) Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem. J.* **218**, 725-732.
26. Lehninger, A. L. (1984) Princípios de bioquímica. Sarvier, São Paulo.
27. Lehninger, A. L. (1986) Bioquímica / vol.1: componentes moleculares das células. 5ª reimp. Edgard Blücher, São Paulo.
28. Morrison, R., Boyd., R. (1986) Química orgânica. 8ªed., Calouste Gulbenkian, Lisboa.
29. Nyhoff, L., Leestma, S. (1996) FORTRAN 77 for engineers and scientists. 4ª ed., Prentice Hall, New Jersey.

30. Olson, S. T. e Björk, I. (1991) Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects. *J. Biol. Chem.* **266**, 6353-6364.
31. Olson, S. T., Björk, I., Sheffer, R., Craig, P. A., Shore, J. D. e Choay, J..(1992) Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J. Biol. Chem.* **267**, 12528-12538.
32. Olson, S. T., Halvorson, H. R. e Björk, I. (1991) Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and non-specific binding models. *J. Biol. Chem.* **266**, 6342-6352.
33. Perrin, F. (1932) Théorie quantique des transferts d'activation entre molécules de même espèce. Cas des solutions fluorescents. *Ann. Phys. (Paris)*. **17**, 283-314.
34. Perrin, J. (1927) *C. R. Acad. Sci., Paris*. **184**, 1097-1100.
35. Pimenta, C., Nantes, I. L., Souza, E. S., Le Bonniec, B., Ito, A. S., Tersariol, I. L. S., Oliveira, V., Juliano, M. A., Juliano, L. (2002) Interaction of heparin with internally quenched fluorogenic peptides derived from heparin-binding consensus sequences, kallistatin and anti-thrombin III. *Biochem. J.* **366**, 435-446.
36. Provencher, S. W. (1982) A constrained regularization program for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer. Physics. Communications* **27**, 229-242.

37. Provencher, S. W. (1982) A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications* **27**, 229-242.
38. Provencher, S. W. (1984) CONTIN users manual, EMBL Technical Report-DA07, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie.
39. Stryer, L. (1998) Biochemistry. 4^a ed., 5^a reimpressão, W. H. Freeman and Company, New York.
40. Verrecchio, A., Germann, M. W., Schick, B. P., Kung, B., Twardowski, T. e San Antonio, J. D. (2000) Design of peptides with high affinities for heparin and endothelial cell proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **275**, 7701-7707.
41. Waterhous, D. V. & Johnson, W. C. Jr. (1994) Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochemistry* **33**, 2121-2128.
42. Yguerabide, J. (1972) Nanosecond fluorescence spectroscopy of macromolecules. *Methods Enzymol.* **26**, 498-578.