

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

“Técnicas de fluorescência no monitoramento de
membranas modelo”

Cássia Alessandra Marquezin

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

“Técnicas de fluorescência no monitoramento de
membranas modelo”

Cássia Alessandra Marquezin

Orientação: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

M321t

Marquezin, Cássia Alessandra

Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo. Ribeirão Preto, 2008.

95 f. : il. ;

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

Orientador: Ito, Amando Siuiti

1. Fluorescência. 2. 2-Amino-*N*-hexadecil-benzamida. 3. Sonda Lipofílica. 4. Transferência de Energia. 5. Membranas modelo.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Pedro e Eulina, e à minha irmã Monica, que
sempre estiveram ao meu lado, e sempre estarão.*

Agradecimentos

Ao prof. Amando, pela orientação, amizade, paciência e ENORME compreensão que teve comigo nestes últimos ‘dias de tese’. Pela confiança; pelo conhecimento compartilhado nesses anos todos, inclusive em campos fora da física. Pelos livros emprestados (ainda estou com Abril Despedaçado) e dicas sobre tantos outros. Pelos muitos momentos divertidos e por muito mais.

Ao prof. Iouri Borissevitch e à prof^a Galina, pelo carinho enorme com o qual cuidam de todos nós. Pelas sessões de cinema russo com tradução simultânea; pelo conhecimento repassado sobre a incrível história russa e pelo compartilhamento dessa enorme experiência de vida que vocês têm! Agradecimentos especiais ao prof. Iouri pelas recentes colaborações.

Ao prof. Richard Ward, do Depto de Química da FFCLRP – USP, por disponibilizar o fluorímetro estático de seu laboratório.

Ao prof. Pietro Ciancaglini, do Depto de Química da FFCLRP – USP, por disponibilizar o refratômetro de seu laboratório e pelas dúvidas esclarecidas.

Ao prof. Giuseppe Chirico (Giberto), que disponibilizou seu laboratório durante seis meses para que eu pudesse realizar um doutorado sanduíche. Pela enorme atenção que teve desde o início; pelas discussões sobre os resultados estranhos que obtivemos e pela confiança depositada.

À prof^a Maddalena, ao prof. Giancarlo Baldini e à Laura D’Alfonso.

À prof.^a Karin Riske, pelos experimentos com vesículas gigantes; pelo ‘empréstimo’ dos fosfolípidios e do espaçador de teflon; pelas muitas dúvidas esclarecidas via mail e, é claro, pela amizade e confiança.

À amiga e prof^a. Teresa, do grupo de Biofísica e Física Médica do IFUSP, pela amizade, discussões científicas, dúvidas esclarecidas, pelo imenso apoio nos ‘últimos tempos’, pelas conversas e experiência de vida compartilhada.

À Paula, por ter-me ‘salvado’, literalmente, nesses últimos meses; por me fazer olhar para mim mesma; por me amparar no difícil momento de romper o casulo...

À Luciana, pela amizade, pela companhia na ‘salinha dos bons’, por me ouvir tantas e tantas vezes; por me acolher em sua casa nos momentos em que sozinha eu não teria dado conta!

À Marina Pires, minha tia preferida, amigona do coração; pela acolhida em momentos particularmente difíceis e pelas boas risadas que demos juntas.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Fotobiofísica: Prof. Luciano, Andréia, Érika, Ernando (pelas discussões científicas e filosóficas), Leila e Wagner. Agradecimentos especiais ao Pudimm, pela iniciativa em ‘revolucionar’ o grupo, pelo cafezinho, pelo companheirismo e à Marina Berardi, pela valiosíssima ajuda com os experimentos de supressão.

Ao Pablo, que não pertence mais ao grupo, mas que sempre ajudou quando gritei por socorro; agradeço pela amizade, confiança e pelas colaborações recentes.

Aos ex-companheiros de grupo, que me ajudaram e apoiaram enquanto ainda estavam por aqui: Fábio, Lucimara, Moisés e Nasser. Agradecimentos especiais ao Marcelo, pela força em momentos difíceis.

Ao amigo Eduardo Sérgio Souza, pelo treinamento com o CONTIN, pelo socorro prestado mesmo via-mail e pela amizade que dura até hoje.

À Lisiane e ao Rodnei, pela preciosa ajuda que poucos teriam dado num momento de apuros.

Às secretárias, Nilza e Daniela.

Aos técnicos Leonardo, Carlão, Serginho e Élcio. Agradecimentos especiais ao Aziani, pela prontidão em atender nossos pedidos.

À Giusi, pela amizade, pelo carinho, confiança e respeito mútuo; pelo enorme apoio que sempre me deu; pela leitura de Dante, pelo italiano, pelos almoços, jantares e ‘lanchinhos’, sempre deliciosos... *Mi sei molto cara, lo sai!!!*

À Lygia, pela acolhida nos momentos difíceis, pelas boas gargalhadas, pelas tantíssimas caronas.

Aos amigos Vera Henriques, Giulia, Marco Antônio, Márcia, Cida, Júlio e Andréia, Rond, Gesline, Adélia, Prof^a Mariângela, Andréia Galina, Laura (Lally), Nella, Laura Sironi (*per le belle chiacchierate! Che ridere, lo zione!*), Chiara (*per le montagne*), Valentina (*per Firenze*), Michele (*per mi aver presentato Fabrizio de Andrè e Paolo Conte*). Agradecimentos especiais à Marina Ness, pelo apoio e pelos diálogos.

À Hellen e ao Lincoln, pela amizade bonita e sincera; pela hospedagem em Milão e pelo carinho e paciência que tiveram comigo... *Ma di chi è questo bambino??!!*

À Bia, uma grande amiga e ao Dagoba, pela amizade sincera e pelo apoio valiosíssimo nos últimos tempos.

À Simone, sempre amiga, mesmo distante, hein tia?? Pelo apoio, pela amizade, pelo carinho.

Aos meus pais Pedro e Eulina, que sempre me apoiaram; sempre acreditaram em mim e com os quais sei que sempre poderei contar; agradeço muito pelo carinho e pela confiança e por tudo que fizeram, e ainda fazem por mim até hoje.

À minha irmã Monica, que me ajudou de modo particular na finalização deste trabalho. Não fosse por ela.... Agradeço pela ótima amizade que temos, pelo enorme apoio e pela prontidão em ajudar sempre que necessário. Que ótima irmã!

E principalmente a Deus, que sempre me deu oportunidades para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradecimentos também à FAPESP, pela bolsa concedida; à CAPES, pela bolsa de estágio de doutorado no exterior; e ao CNPq.

*Que sei eu do que serei
eu que não sei o que sou?
Ser o que penso? Mas penso tanta coisa!
E há tantos que pensam ser a mesma coisa
que não pode haver tantos!*
(Fernando Pessoa)

Resumo

Apresentamos os resultados de estudos sobre a utilização de técnicas baseadas no fenômeno de fluorescência para a investigação de processos relacionados a membranas modelo. Nessa investigação, estão envolvidas medidas de propriedades espectrais de absorção e emissão de luz por cromóforos adequados, determinação experimental de perfis de decaimento temporal da fluorescência e correlação temporal de emissão fluorescente, bem como a utilização apropriada de metodologias para análise e interpretação dos dados experimentais.

Foram utilizados diversos compostos que apresentam absorção e emissão na região ultravioleta/visível, como as sondas lipofílicas 2-Amino-*N*-hexadecil-benzamida (Ahba), 6-lauryl-2-dimethylaminonaphthalene (Laurdan), *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) (NBD), em diferentes condições: meio aquoso homogêneo, suspensões de micelas de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) e 3-(Dodecyl-Dimethyl-Ammonio)-propane-sulfonate (DPS) e vesículas de fosfolipídios, como o 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphocholine (DMPC), o 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycerol-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)](Sodium Salt) (DMPG) e o 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphocholine (POPC).

Supressores alquilpiridínicos de diferentes comprimentos da cadeia alquila e, portanto, diferentes afinidades por agregados anfílicos, foram utilizados em experimentos de supressão da fluorescência da sonda Ahba. Usando o formalismo que descreve fenômenos de supressão dependente de colisões entre fluoróforo e supressor, observamos que as taxas de supressão são maiores em presença de agregados anfílicos carregados negativamente: micelas de SDS e vesículas de DMPG; em micelas *zwitteriônicas* o processo é mais eficiente quando a hidrofobicidade do supressor é grande, o que ocorre quando a cadeia alquila é mais longa.

Realizamos experimentos de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) onde o grupo fluorescente da sonda lipofílica Ahba atuou como doador. Como aceitadores utilizamos os compostos Acridina Laranja, *N*-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (Eddnp) e o NBD ligado a fosfolipídios. Fizemos uso do programa CONTIN para análise de dados experimentais de perfis de decaimento da fluorescência em sistemas em que ocorre transferência de energia e obtivemos distribuições de distâncias para os pares

Ahba/Eddnp e Ahba/NBD-fosfolipídios na presença de vesículas de fosfolipídios. Para este último par, verificou-se que a distribuição de distâncias depende da temperatura do sistema, ou seja, da fase da bicamada, da concentração de aceitador e da posição onde o NBD está ligado ao fosfolipídio.

Analisamos a utilização da sonda Laurdan em presença de vesículas de DMPC e POPC, em experimentos de espectroscopia de correlação de fluorescência. Embora tenha apresentado sinal elevado de fluorescência, a sonda é fotodegradável. Os mesmos experimentos de correlação de fluorescência foram realizados com o Ahba que, apesar de ter se mostrado bastante fotoestável, revelou não ser uma sonda adequada para uso em tal técnica. O espectro de excitação a dois fótons foi obtido para esta sonda, com máximo de absorção em 695 nm. Em experimentos de microscopia de fluorescência, o Ahba mostrou ser um bom marcador fluorescente para membranas lipídicas, ao possibilitar a aquisição de imagens de fluorescência de vesículas gigantes marcadas.

Abstract

In this work we showed results from studies about the use of fluorescence spectroscopy techniques as a tool to investigate amphiphilic aggregates, used as a model of the cell membrane. We performed measurements on the spectral properties of light absorption and emission of adequate chromophors, registered the experimental time-resolved decay of fluorescence and time correlated fluorescence emission of the probes and used also adequate methodologies for the analysis and interpretation of experimental data.

Several compounds presenting absorption and emission in the UV/visible spectral range were employed: the lipophilic probes 2-Amino-*N*-hexadecyl-benzamida (Ahba), 6-lauryl-2-dimethylaminonaphthalene (Laurdan), *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) (NBD), in different environment: homogeneous aqueous medium, micelles of surfactants like Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) and 3-(Dodecyl-Dimethyl-Ammonio)-propane-sulfonate (DPS) and phospholipid vesicles of 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC), 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-glycerol)](Sodium Salt) (DMPG) and 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (POPC).

Alkylpyridinium halides with different alkyl chain length were employed fluorescence quenchers of the Ahba probe. Using the Stern-Volmer model to describe the quenching phenomena dependent on fluorophor/quencher collision, we observed that higher quenching rates were obtained in the presence of negatively charged amphiphilic aggregates: SDS micelles and DMPG vesicles; in the presence of zwitterionic vesicles the quenching efficiency was more efficient when the quencher hydrophobicity was high (long alkyl chain).

We performed Förster resonance energy transfer (FRET) experiments where the fluorescent moiety of the probe Ahba was the energy donor. As acceptors molecules we used Acridine Orange, Ethylene-diamine-dinitrophenyl (Eddnp) and NBD-labeled phospholipids. The computational package CONTIN was adapted to analyze the experimentally obtained fluorescence decay profiles of the donor in the presence of the acceptor, in order to determine the distance distribution between the Ahba/Eddnp and Ahba/NBD-phospholipids pairs in the presence of lipid vesicles. For the Ahba/NBD

pair, the distances were dependent on the temperature of the system (or the phase bilayer behavior), the acceptor concentration and the NBD position in the phospholipid.

We observed that the Laurdan probe can be used in studies about DMPC vesicles diffusion using fluorescence correlation spectroscopy techniques. Investigation about the use of the probe Ahba with this technique had shown that its maximum absorption for two photon excitation occurs near to 695 nm, but it is not an appropriated probe to FCS experiments due to its very low brightness. On the other hand, Ahba can be used as a membrane fluorescent label in membrane fluorescence microscopy, as we can see in the fluorescence imaging experiments with giant vesicles labeled with Ahba.

Sumário

Capítulo 1. Introdução	13
1.1 Fluorescência em biofísica	13
1.2 Fluorescência em agregados anfífilicos	15
1.3 Objetivos	17
Capítulo 2. Técnicas Experimentais	20
2.1 Fluorescência com resolução temporal.....	20
2.2 Análise do decaimento da intensidade da fluorescência	22
2.3 Transferência de energia.....	23
2.4 Distribuição de distâncias	26
2.5 CONTIN – Programa de ajuste	28
2.6 Supressão de fluorescência	29
2.7 Espectroscopia de correlação de fluorescência	31
2.8 Excitação a fóton único e excitação multi-fótons.....	33
Capítulo 3. Material e Métodos	36
3.1 Equipamentos.....	36
3.2 Sondas utilizadas	38
3.3 Preparação das amostras	41
Capítulo 4. Resultados e Discussões	45
4.1 Supressão colisional.....	45
4.2 Transferência de energia.....	51
4.2.1 Transferência de energia - grupo aceitador: Acridina Laranja (AO).....	51
4.2.2 Transferência de energia - grupo aceitador: Etileno diamino dinitrofenil (Eddnp).....	54
4.2.3 Transferência de energia – grupo aceitador: NBD ligado a fosfolipídios	60
4.2.4 Distribuição de distâncias: Ahba/NBD-fosfolipídios em vesículas	67
4.3 Espectroscopia de correlação de fluorescência, microscopia de fluorescência e excitação multi-fótons	74

Capítulo 5. Conclusões	85
Capítulo 6. Referências Bibliográficas.....	86
Apêndice A – Análise da autocorrelação	91

Capítulo 1: Introdução

A membrana plasmática em uma célula é de fundamental importância para a sua existência e seu funcionamento, regulando a entrada e saída de íons, permitindo ou proibindo a passagem de proteínas ou polipeptídeos, enzimas, hormônios e outras macromoléculas. Considerando a complexidade de uma membrana natural, é importante descobrir tanto a afinidade de várias moléculas por diferentes tipos de agregados anfífilos (utilizados como modelos de membrana lipídica) como a natureza das modificações que ambos, molécula e agregado, sofrem ao interagirem entre si.

Através de técnicas experimentais envolvendo o fenômeno da fluorescência, estudamos interações entre moléculas específicas e agregados anfífilos e interações de diferentes moléculas entre si, mediadas pela presença de agregados anfífilos e mostraremos neste trabalho, os resultados obtidos.

1.1 Fluorescência em Biofísica

Diversos processos e sistemas de interesse biológico envolvem moléculas que absorvem e emitem radiação na faixa UV-visível. O tempo característico envolvido no processo de emissão fluorescente, da ordem de 10^{-9} s, é compatível com eventos relacionados à interação com o meio circundante, tornando as técnicas de fluorescência particularmente atraentes para o estudo de diversos fenômenos relacionados às propriedades biofísicas de moléculas biológicas^{1,2}. Experimentos de fluorescência no estado estacionário dão informações sobre posição espectral das bandas, rendimento quântico dos fluoróforos e anisotropia estática e medidas com resolução temporal fornecem perfis de decaimento da intensidade e da anisotropia de fluorescência. Esses dados dependem das interações com o meio, que resultam em duas classes de efeitos: efeitos gerais de solvente, descritos por grandezas macroscópicas como constante dielétrica, polaridade e índice de refração, e efeitos específicos oriundos de interação com espécies presentes no meio como prótons (efeitos de pH), íons ou outros grupos moleculares. Alterações na fluorescência também podem ser moduladas por fatores ainda mais gerais como os efeitos térmicos e de mudanças na viscosidade do meio ou na concentração de íons (força iônica).

Uma ferramenta muito utilizada no estudo da fluorescência em sistemas biológicos é a supressão da fluorescência. Este fenômeno envolve qualquer processo que diminua a

intensidade de fluorescência de uma amostra. Uma variedade de interações moleculares pode resultar em supressão, como reações de estado-excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão por colisões com moléculas do solvente ou moléculas supressoras específicas.

A supressão pode ser (1) colisional (chamada dinâmica), no caso em que o fluoróforo no estado excitado colide com o supressor, decaindo para o estado fundamental sem a emissão de fluorescência, ou (2) estática, onde ocorre a ligação entre fluoróforo e supressor, formando um complexo não fluorescente. Ambos os processos requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor; essa necessidade de contato resulta em várias aplicações da supressão, como por exemplo, a obtenção de informações acerca da acessibilidade de fluoróforos a determinados supressores localizados em sítios específicos de uma proteína ou no interior de uma bicamada lipídica.

Experimentos de supressão em membranas lipídicas permitem determinar a partição de supressores na membrana, a acessibilidade de sondas a supressores lipossolúveis e aquossolúveis, a localização de sondas em relação à interface lipídio-água e também a medida do coeficiente de difusão lateral.

Outra ferramenta poderosa utilizada no estudo de propriedades estruturais estáticas e dinâmicas de macromoléculas em solução é a transferência de energia por ressonância de Förster (FRET). Este fenômeno caracteriza-se pela transferência de energia de um fluoróforo doador para um cromóforo aceitador, através de interações dipolo-dipolo de longo alcance, que ocorrem num intervalo de 10 a 100 Å, comparável às dimensões de muitas macromoléculas biológicas.

Förster³ tratou este processo e mostrou que a taxa para a transferência de energia depende principalmente da superposição entre os espectros de emissão do doador e absorção do aceitador, da orientação relativa dos dipolos de transição do doador e do aceitador e da distância entre as duas moléculas. A taxa para o decaimento por transferência de energia é da ordem da taxa para o decaimento por fluorescência; portanto, a transferência de energia pode suprimir a fluorescência.

O fenômeno de FRET ocorre mesmo que os pares doador/aceitador 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.

A dependência com a distância faz com que a transferência de energia seja utilizada para medir a distância entre doador e aceitador, permitindo, por exemplo, a medida da distância entre determinados sítios de peptídeos e proteínas, utilizando sondas fluorescentes intrínsecas ou extrínsecas. Considerando pares doador/aceitador livres em meio homogêneo ou na presença de agregados macromoleculares, é possível também a obtenção de uma distribuição de distâncias entre o par.

1.2 Fluorescência e agregados anfífilos

Agregados de moléculas anfífilas, como fosfolipídios, têm sido utilizados como modelos para estudos de membranas biológicas. Dada a complexidade da membrana natural, o estudo com sistemas simplificados como vesículas de fosfolipídios pode fornecer informações relevantes para a compreensão de fenômenos relacionados à membrana celular.

Métodos baseados em fluorescência desempenham um papel importante na elucidação da estrutura de membranas lipídicas uma vez que são sensíveis, versáteis e, o mais importante, bastante apropriados para monitorar a dinâmica de moléculas bem como sua organização em diversas escalas de distâncias. Medidas de supressão de fluorescência e de FRET oferecem meios para a investigação das relações espaciais entre moléculas, num intervalo de distâncias que vai de alguns décimos de nanômetros até dezenas de nanômetros. Essas escalas de distâncias são extremamente relevantes para monitorar as interações moleculares.

A técnica de FRET se tornou uma ferramenta importante para a análise das interações entre macromoléculas biológicas^{4,7} e também para estudo das aplicações biológicas de biosensores⁸. Diversos procedimentos têm sido descritos para a medida da eficiência da transferência de energia ou da quantidade relativa de complexos doador/aceitador, baseados na análise do tempo de vida de fluorescência do doador⁹⁻¹⁵ ou na resolução espectral¹⁶⁻²¹.

Estudos conformacionais em peptídeos empregam esta metodologia na determinação de distâncias intramoleculares. Ligado a peptídeos, o ácido *orto*-aminobenzóico (*o*-Abz), por exemplo, tem sido empregado, juntamente com a molécula de N-(2,4,dinitrofenil)-etilenodiamina (Eddnp) ligada ao terminal carboxila do mesmo peptídeo, em estudos sobre a atividade de enzimas proteolíticas²²⁻²⁵.

O par doador-aceitador interage por processos de transferência de energia, permitindo a determinação de distâncias intra-moleculares bem como a realização de estudos sobre a dinâmica conformacional de bradicininas²⁶ e sobre alterações conformacionais em peptídeos em interação com heparinas²⁷. Também o α -MSH e seu análogo mais potente (NDP- α MSH), marcados em seu terminal amino com o grupo Abz, foram estudados, observando-se a transferência de energia do resíduo Trp para o Abz, que atuou como aceitador. A distribuição de distâncias é bastante ampla para o hormônio nativo em solução, indicando flexibilidade em sua estrutura, enquanto que seu análogo mostrou uma estrutura mais compacta, apresentando três populações de distâncias bem definidas²⁸.

Neste trabalho, utilizaremos FRET para pares doador/aceitador em presença de membranas modelo. Na literatura, há estudos sobre FRET entre moléculas interagindo com sistemas micelares^{29,30} e, principalmente, com membranas fosfolipídicas³¹. Fosfolipídios marcados com sondas fluorescentes podem atuar como doadores ou aceitadores de energia, obedecendo ao modelo de Förster. Os marcadores fluorescentes são ligados covalentemente ao fosfolipídio, em diferentes posições da cadeia de ácidos graxos, ou mesmo à cabeça polar, permitindo a localização em diferentes profundidades da bicamada lipídica. A alta sensibilidade da técnica de FRET em nanoescalas é usada também em estudos de polidispersão e de empacotamento de domínios em membranas lipídicas³², mostrando que o tamanho de tais domínios lipídicos, bem como seu grau de ordenamento, podem ser determinados com exatidão significativa³³⁻³⁵. Microheterogeneidades em membranas lipídicas³⁶⁻³⁸, dimensões de domínios lipídicos^{32,37,39,40} e comportamento de fase⁴¹⁻⁴³ são características que têm sido amplamente estudadas por FRET, além de interações entre a membrana e peptídeos ou proteínas⁴⁴⁻⁴⁷.

Outra técnica que tem sido amplamente utilizada em estudos envolvendo membranas lipídicas é a Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS); é um dos diferentes modos de análise de biomoléculas (em concentrações extremamente baixas) com alta resolução espacial e temporal. Nesta técnica, o parâmetro primário de interesse não é a intensidade de emissão em si, mas sim as flutuações espontâneas na intensidade. A técnica determina diretamente concentrações locais, coeficientes de mobilidade e

constantes características de taxas de reações inter/intramolecular de biomoléculas marcadas com sondas fluorescentes em concentrações da ordem de nanomolar.

Devido à quantidade de moléculas e macromoléculas presentes em membranas naturais e no ambiente ao redor destas, as flutuações no sinal de fluorescência não podem ser atribuídas a uma única população de moléculas fluorescentes, comprometendo a qualidade do sinal e interpretação dos resultados; outro ponto relevante é o fotoclareamento, freqüentemente observado em experimentos envolvendo microscopia de fluorescência: devido à quantidade de moléculas presentes nas membranas naturais, sua difusão é mais lenta e há ainda a formação de complexos macromoleculares que permanecem praticamente imóveis na superfície lipídica. A baixa mobilidade dessas moléculas faz com que permaneçam mais tempo no volume focal, sob irradiação, causando assim a sua fotodegradação e, conseqüentemente, o fotoclareamento da imagem.

Diante disso, modelos de membranas celulares (vesículas de fosfolipídios) são ideais para serem estudados em experimentos de FCS, pois esta técnica envolve microscopia de fluorescência. Em membranas modelo, podemos escolher qual fluoróforo queremos observar e as interações entre moléculas se tornam controláveis. Comumente são usadas membranas do tipo unilamelares gigantes (GUV), observáveis ao microscópio. Estudos em sistemas como esse são feitos principalmente para monitorar o deslocamento lateral de proteínas ou macromoléculas fluorescentes sobre a membrana lipídica⁴⁸, bem como a formação de domínios lipídicos⁴⁹⁻⁵¹. Em estágio sanduíche realizado no exterior, foram realizadas medidas de espectroscopia de correlação de fluorescência de diversos fluoróforos, livres em solução e em presença de micelas e vesículas do tipo LUV e GUV.

1.3 Objetivos

Diante do exposto, exploramos técnicas baseadas no fenômeno de fluorescência para o estudo de processos relacionados a membranas modelo. Agregados moleculares e sistemas auto-organizados foram investigados através da medida de espectros de absorção e emissão e perfis de decaimento da fluorescência de sondas lipofílicas como Ahba, Laurdan e NBD-fosfolipídios em diferentes condições (tampão, micelas, vesículas).

Explorando técnicas baseadas nos processos de supressão colisional (utilizando supressores alquilpiridínios) e transferência de energia (doador: Ahba; aceitadores:

Acridina Laranja, Eddnp e NBD) determinar a localização das sondas em micelas e vesículas e monitorar interações peptídeos marcados/vesículas com sondas lipofílicas.

Fazendo uso do programa CONTIN, que recupera distribuições de distâncias a partir de perfis de decaimento da fluorescência em sistemas em que ocorre transferência de energia, determinar distâncias entre moléculas inseridas em membranas lipídicas. Monitorar parâmetros de difusão em ligações fluoróforos-vesículas por espectroscopia de correlação de fluorescência e, através de imagens de fluorescência, estudar a aplicação do Ahba como marcador fluorescente para membranas em microscopia de fluorescência com excitação a dois fótons.

O capítulo 2 desta tese trata da descrição das principais técnicas experimentais utilizadas no desenvolvimento de todo o trabalho: fluorescência com resolução temporal, espectroscopia de correlação de fluorescência, excitação a fóton único e excitação multi-fótons. São descritos ainda os modelos teóricos aplicados na análise dos dados: modelo de Stern-Volmer para supressão de fluorescência; formalismo de Förster para transferência de energia por ressonância (FRET); funcionamento do programa CONTIN, utilizado para gerar funções de distribuição de distâncias.

No capítulo 3, é feita a descrição dos equipamentos utilizados e dos compostos fluorescentes e agentes supressores. É discutida a preparação das amostras e a montagem dos experimentos.

No capítulo 4 é feita a discussão e apresentação dos resultados obtidos. Neste trabalho, mostramos resultados de medidas realizadas com a sonda fluorescente Ahba (2-Amino-N-hexadecil-benzamida) em interação com supressores de fluorescência da família dos alquilpiridínios e com grupos aceitadores de energia como a Acridina Laranja, o Eddnp puro e ligado a peptídeos e o NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) ligado à fosfolipídios. Os alquilpiridínios, dependendo do tamanho de sua cadeia alquila, têm afinidade por macromoléculas hidrofóbicas. Atuam como agentes supressores da fluorescência do Ahba, sobretudo quando em presença de agregados anfifílicos. O NBD é um cromóforo fluorescente, que absorve energia na mesma região espectral onde se observa a emissão fluorescente do Ahba. Ligado covalentemente a diferentes fosfolipídios, em diferentes posições da cadeia de ácido graxo ou mesmo na cabeça polar, garante diferentes localizações (em relação à profundidade) em uma bicamada lipídica,

constituindo assim um aceitador interessante, sendo usado com o doador Ahba em experimentos de FRET.

Experimentos de supressão da fluorescência do Ahba pelos compostos alquilpiridínios mostraram que os supressores (carregados positivamente) interagem fortemente com agregados anfífilos carregados negativamente: micelas de SDS e vesículas de DMPG; em micelas de SDS as taxas de supressão de fluorescência foram bem maiores que aquelas obtidas em DMPG, devido à maior proximidade entre fluoróforo e supressor.

Os experimentos de FRET mostraram que existe a transferência de energia entre o Ahba e os aceitadores Acridina Laranja, Eddnp e NBD. A função de distribuição de distâncias foi obtida para os pares Ahba/Eddnp e Ahba/NBD-fosfolipídios. Para este último par, verificou-se que a transferência de energia varia com a temperatura do sistema (mudança de fase das bicamadas de fosfolipídios), com a concentração de aceitador e com a posição onde o NBD está ligado ao fosfolipídio.

Foi obtido o espectro de excitação a dois fótons para o Ahba, resultando em um máximo de absorção por volta de 695 nm; para a excitação linear (um fóton), o máximo de absorção do Ahba é observado em 335 nm em solução aquosa e 325 nm em etanol⁵².

Foram realizadas ainda medidas da correlação de fluorescência de sondas como o Laurdan e a Rodamina 6G, em laboratório com instrumentos e técnicas avançadas em espectroscopia de fluorescência. No mesmo laboratório, foram obtidas imagens de fluorescência onde o Ahba atua como marcador fluorescente para membranas lipídicas.

Finalmente, o capítulo 5 traz as conclusões resultantes do trabalho e o capítulo 6, as referências bibliográficas. No apêndice A mostramos a dedução da equação de autocorrelação ajustada às curvas obtidas em experimentos de correlação de fluorescência.

Capítulo 2: Técnicas Experimentais

2.1 Fluorescência com Resolução Temporal¹

O tempo de vida de fluorescência de uma substância geralmente representa um valor médio de tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental. Medidas do tempo de vida são freqüentemente necessárias na espectroscopia de fluorescência. Esses dados podem revelar a taxa de transferência de energia e a taxa de reações no estado excitado. A natureza precisa do decaimento fluorescente pode revelar detalhes sobre as interações dos fluoróforos com sua vizinhança.

Medições do tempo de vida fluorescente são difíceis, pois esses tempos se encontram tipicamente na faixa de nanosegundos, fazendo-se necessário o uso de dispositivos eletrônicos de alta velocidade e detectores adequados. Existem três métodos amplamente usados para medir tempos de vida de fluorescência: o método de pulsos, o método estroboscópico e o método harmônico ou de modulação de fases. No método de pulsos, que utilizamos neste trabalho, a amostra é excitada com um breve pulso de luz e é medido o intervalo de tempo transcorrido entre a absorção e a emissão do pulso de fluorescência.

Na excitação de um fluoróforo com um pulso de luz infinitamente curto, resultando em uma população inicial (N_0) de fluoróforos no estado excitado, a taxa de decaimento da população inicialmente excitada é:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\gamma + k)N(t) \quad (2.1)$$

onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas em um tempo t seguinte a excitação; γ é a taxa emissiva, e k é a taxa de decaimento não radiativo. Lembrando que $N(t) = N_0$ em $t = 0$, a integração da equação (2.1) fica:

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.2)$$

onde $\tau = (\gamma + k)^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado. Como consequência, esperamos que a intensidade de fluorescência $F(t)$, que é proporcional à população no estado excitado [$F(t) = \gamma N(t)$], decaia exponencialmente.

O tempo de vida também pode ser considerado o valor médio de tempo que um fluoróforo permanece no estado excitado. Essa média é dada por:

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i t_i N_i(t)}{\sum_i N_i(t)} \quad (2.3)$$

Para um grande número de fluoróforos e pequenos intervalos de tempo, essa soma fica:

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^\infty t N(t) dt}{\int_0^\infty N(t) dt} = \frac{\int_0^\infty t e^{-\frac{t}{\tau}} dt}{\int_0^\infty e^{-\frac{t}{\tau}} dt} \quad (2.4)$$

O denominador é igual a τ . Seguindo com a integração por partes, o numerador é igual a τ^2 . Daí, para um decaimento exponencial, o tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado é igual ao tempo de vida:

$$\langle t \rangle = \tau \quad (2.5)$$

É importante notar que a equação (2.5) não é verdadeira para leis de decaimento muito complexas, tais como decaimentos multi-exponenciais ou não-exponenciais. Na maioria das vezes, os decaimentos observados são multi-exponenciais, sendo ajustados por uma soma de exponenciais do tipo:

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.6)$$

onde τ_i é o tempo de vida da componente i do decaimento e α_i o correspondente fator pré-exponencial. Assim, o tempo de vida médio é dado por:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (2.7)$$

2.2 Análise do Decaimento da Intensidade da Fluorescência¹

O objetivo de se medir os perfis de decaimento da fluorescência é determinar a função $F(t)$. Tal objetivo seria plenamente atingido, caso a excitação se desse através de um pulso infinitamente estreito, ou cuja largura fosse muito menor do que o tempo de decaimento da amostra. Infelizmente a largura dos pulsos freqüentemente é comparável aos tempos de decaimento. Devido à largura do pulso de excitação, o tempo zero não é definido, de forma que não podemos simplesmente encontrar o ponto $1/e$ para determinar os tempos de vida. Além do mais, a emissão dos compostos aqui estudados não é muito bem representada por um decaimento mono-exponencial, limitando o significado do ponto $1/e$.

Geralmente, mede-se a distribuição temporal $L(t)$ do pulso em uma experiência separada. O sinal detectado como pulso de excitação é chamado IRF (instrument response function) e é obtido a partir de uma solução espalhadora de luz. Podemos considerar o pulso de excitação como um grande número de pulsos estreitos a cada tempo t_i , com larguras iguais Δt , onde Δt é muito menor do que o tempo de decaimento observado. Cada pulso individual gera outro pulso como resposta:

$$R_i(t) = L(t_i) \Delta F(t - t_i) \quad (t > t_i) \quad (2.8)$$

O tempo $(t - t_i)$ serve para nos lembrar que o tempo de decaimento é relativo em relação ao tempo da excitação, que é t_i . Para $t < t_i$, subentende-se que $R_i(t) = 0$. O total do decaimento é somado sobre todos os pulsos:

$$R(t) = \sum_{i=0}^{t=\Delta t} L(t - \mu) F(\mu) \Delta \mu \quad (2.9)$$

onde $\mu = t - t_i$. Conforme Δt tende a zero, tal soma torna-se uma integral de convolução:

$$R(t) = \int_0^t L(t - \mu) F(\mu) d\mu \quad (2.10)$$

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

2.3 Transferência de Energia¹

Em moléculas fluorescentes, parte da energia luminosa absorvida é liberada através da emissão de fótons. Alguns processos, que ocorrem no intervalo de tempo entre a absorção e a emissão, podem alterar o espectro de fluorescência. Um destes processos é conhecido como Transferência de Energia. Em tal processo, a energia absorvida por um dado cromóforo, chamado de doador (d), é transferida, sem a emissão de fótons, para outro cromóforo, chamado de aceitador (a). Esse fenômeno pode ser intramolecular, quando há um grupo separador entre o grupo doador e o grupo aceitador, ou pode ser intermolecular, quando o doador e o aceitador são independentes.

Essa transferência de energia ocorre devido à interação eletromagnética entre as nuvens eletrônicas dos dois grupos. Considerando esta interação na aproximação de dipolo, conforme será descrito adiante, a taxa de transferência de energia, para uma dada distância r fixa entre as moléculas, é dada por:

$$k_T = \frac{1}{\tau_d r^6} \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \Phi_d}{128 \pi^5 n^4 N_0} \int F_d(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.11)$$

onde Φ_d e τ_d são, respectivamente, o rendimento quântico e o tempo de vida do doador na ausência do aceitador; n é o índice de refração do meio e N_0 é o número de Avogadro. $F_d(\lambda)$ é o espectro normalizado de emissão do doador e $\epsilon_a(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador. A taxa de transferência de energia é dada em s^{-1} . A dependência com as orientações dos momentos de dipolo das duas moléculas é dada por κ^2 , quantidade esta chamada de fator orientacional e é dada por:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_{da} - 3\cos\theta_d\cos\theta_a)^2 \quad (2.12)$$

onde θ_{da} é o ângulo entre os dipolos de emissão do doador e de absorção do aceitador; θ_d e θ_a são os ângulos entre o vetor \vec{r} , que une esses dipolos, e os respectivos dipolos do doador e do aceitador, conforme ilustrado na figura 2.1 a seguir:

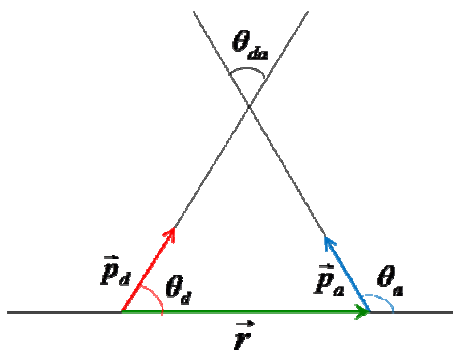


Figura 2.1: Orientação dos momentos de dipolo do doador e do aceitador.

A integral que aparece na equação 2.11 é a integral de superposição espectral e representa a intensidade da ressonância entre o estado excitado do grupo doador e o estado fundamental do aceitador. A figura 2.2 a seguir ilustra a superposição espectral:

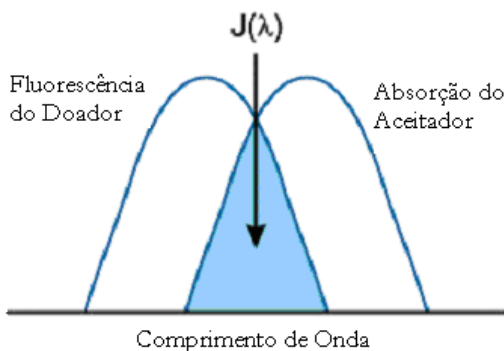


Figura 2.2: Superposição espectral do par doador/aceitador.

A integral de superposição espectral será definida como J e pode ser escrita como:

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.13)$$

Podemos notar que a taxa para o processo de transferência de energia (equação 2.11) apresenta uma dependência com a distância de separação entre o grupo doador e o grupo aceitador (r). Esta dependência permite que se obtenham informações acerca da estrutura das moléculas que estão sendo estudadas. Existe ainda a dependência com o

tempo de vida do doador; o tempo de vida fornece a unidade correta para a taxa de transferência de energia. Assim, separando-se a dependência de τ_d e de r^6 , os termos restantes (equação 2.11) têm unidade de distância elevada à sexta potência. Definimos essa distância na equação a seguir:

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} (\kappa^2 n^{-4} \phi_d J) \quad (2.14)$$

Desse modo, a equação 2.11 fica:

$$k_T = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.15)$$

Analisando essa equação, verificamos que, quando a distância de separação r entre o grupo aceitador e o grupo doador for igual a R_0 , a taxa para o decaimento por transferência de energia se iguala à taxa do decaimento por fluorescência do doador. Quando a distância r for muito maior que R_0 , a taxa para transferência de energia será muito menor que a taxa de fluorescência e, portanto, a maioria dos doadores decairá por fluorescência. Para $r \ll R_0$, a maioria dos doadores decairá por transferência de energia, comprometendo os experimentos de fluorescência; essa proximidade entre doador e aceitador compromete também o modelo de Förster, que está baseado na interação dipolar entre os dois grupos. A distância R_0 é chamada de *Distância Crítica de Förster*.

Definiremos na equação a seguir a eficiência da transferência de energia E , em função das taxas de decaimento por fluorescência k_f , decaimento por FRET k_T e decaimento por processos não radiativos k_n :

$$E = \frac{k_T}{k_f + k_T + k_n} \quad (2.16)$$

Relacionando a eficiência da transferência com o rendimento quântico ϕ_{da} e com o tempo de vida τ_{da} do doador em presença do aceitador, podemos obter:

$$\frac{\tau_{da}}{\tau_d} = \frac{\phi_{da}}{\phi_d} = \frac{k_f + k_n}{k_f + k_T + k_n} \quad (2.17)$$

Somando e subtraindo $k_f + k_n$ na equação 2.16 e combinando o resultado com a equação 2.17, obtemos:

$$E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad (2.18)$$

$$E = 1 - \frac{\phi_{da}}{\phi_d} \quad (2.19)$$

Com essas equações, é possível obter a eficiência da transferência de energia experimentalmente. É possível também escrever a eficiência da transferência em função da distância r . Multiplicando e dividindo o lado direito da equação 2.16 por τ_d , obtemos o seguinte resultado:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.20)$$

Para obtermos r , é necessário conhecer E e R_0 . Mas R_0 é dado pela equação 2.14 e nesta expressão, só não é possível obter experimentalmente κ^2 . No entanto, utiliza-se 2/3 como valor de κ^2 , que é o valor médio para os casos em que o aceitador e o doador estão livres para assumir todas as orientações possíveis durante o processo de transferência de energia. Neste caso, r pode ser obtido experimentalmente através da equação 2.20, pois E também pode ser determinado pelas equações 2.18 e 2.19.

2.4 Distribuição de Distâncias¹

Devemos lembrar que a taxa k_T dada na expressão 2.15 foi obtida considerando-se um único par doador/aceitador com distância de separação fixa. Em solução e em modelos de membranas temos muitos pares doador/aceitador e cada par está separado por determinada distância, que não é fixa. Assim, o valor de r obtido por este método não reflete a realidade. Vamos tratar este problema considerando a curva de decaimento da intensidade de fluorescência. Para simplificar o tratamento vamos considerar que o doador possui um único tempo de vida e que o aceitador não é fluorescente. Portanto, o decaimento da fluorescência do doador na ausência do aceitador é dado por:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_d}\right) \quad (2.21)$$

e na presença é:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{da}}\right) \quad (2.22)$$

Combinando as expressões para o tempo de vida do doador na presença e na ausência do aceitador resulta em:

$$\frac{1}{\tau_{da}} = k_r + \frac{1}{\tau_d} \quad (2.23)$$

Substituindo a expressão 2.15 nesta última expressão resulta:

$$\frac{1}{\tau_{da}} = \frac{1}{\tau_d} + \frac{R_0^6}{\tau_d r^6} . \quad (2.24)$$

Substituindo a expressão 2.24 na 2.22 resulta:

$$I(t) = I_0 \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_d} - \frac{R_0^6}{\tau_d r^6} \right) t \right] \quad (2.25)$$

O decaimento da intensidade de fluorescência de cada doador obedecerá a expressão 2.25 e, mesmo na presença do aceitador, continua sendo mono-exponencial.

Considerando que há um aceitador para cada doador e que cada par está separado por uma distância r_i , o decaimento de fluorescência será uma soma sobre todos os pares. Como todos os pares cuja distância de separação for a mesma, contribuirão com $f(r_i)$ para o decaimento, teremos:

$$I(t) = I_0 \sum_i f(r_i) \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_d} - \frac{R_0^6}{\tau_d r_i^6} \right) t \right] \quad (2.26)$$

Para uma distribuição contínua $f(r)$ de distâncias e para um caso genérico em que o decaimento do doador não é mono-exponencial teremos:

$$I(t) = \sum_i a_i I_0 \int_0^{\infty} f(r) \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_{di}} - \frac{R_0^6}{\tau_{di} r^6} \right) t \right] dr \quad (2.27)$$

onde a_i é a amplitude do decaimento com o tempo de vida τ_{di} .

Esta expressão fornece a relação entre o decaimento da intensidade de fluorescência e a distribuição de distâncias entre os pares doador/aceitador na solução. Se considerarmos que no intervalo de tempo em que ocorre a transferência de energia as

moléculas permanecem fixas, poderemos obter a distribuição de distâncias $f(r)$ comparando o decaimento da intensidade de fluorescência obtido experimentalmente com o dado pela expressão 2.27. Para fazermos esta comparação temos que determinar qual é a função $f(r)$ que temos que colocar no lado direito da expressão 2.27 de tal modo que este lado da equação se iguale ao lado esquerdo que obtivemos experimentalmente. Para isto utilizamos um programa (CONTIN) para inversão de equações integrais lineares do tipo que aparece na expressão 2.27.

2.5 CONTIN – Programa de Ajuste

Para obtermos a função distribuição de distâncias $f(r)$, definida na expressão 2.27, utilizamos o programa CONTIN, desenvolvido por Provencher⁵³. O programa inverte equações integrais lineares do tipo

$$y(t_k) = \int_a^b F(r, t_k) f(r) dr + \sum_{j=1}^{N_L} L_{kj} \beta_j, \quad k = 1, \dots, N_y \quad (2.28)$$

em que a função $F(r, t_k)$ e os pontos experimentais $y(t_k)$ para cada t_k são conhecidos e $f(r)$ é a função a ser obtida. No segundo termo do lado direito da equação 2.28 L_{kj} é conhecido e β_j é determinado pelo programa; este termo permite, por exemplo, que uma constante β_1 seja incluída fazendo $N_L = 1$ e todos os $L_{k1} = 1$.

Em nosso estudo, $y(t_k)$ é a intensidade $I(t_k)$ nos pontos t_k , que obtivemos experimentalmente. A função $F(r, t_j)$ é a exponencial que aparece na integral da equação 2.27 e que está reescrita na equação 2.29 a seguir:

$$F(r, t_j) = \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_d} - \frac{R_0^6}{\tau_d r^6} \right) t_j \right] \quad (2.29)$$

Finalmente $f(r)$ é a distribuição que queremos obter. Com a somatória pode-se corrigir a contribuição para o decaimento de algum fluoróforo presente no sistema, mas que não participe do processo de transferência de energia. Pode-se fazer isso escrevendo:

$$L_{kj} = e^{-\frac{t_k}{\tau_j}} \quad (2.30)$$

onde τ_j é o tempo de vida do fluoróforo.

O programa foi aplicado aos decaimentos da intensidade de fluorescência do Ahba em presença de vesículas de DMPC e dos aceitadores Eddnp, FRSSRQ_Eddnp e NBD. Na expressão de $F(r, t_k)$ (equação 2.29, pares doador/aceitador separados por distâncias r quaisquer) foi acrescentado o perfil da lâmpada (*Instrument Response Function*). Se considerarmos o fato de que o decaimento do doador não é monoexponencial (como acontece com o Ahba), a expressão para $F(r, t)$ fica:

$$F(r, t) = \sum_{i=1}^N a_i \int_0^t L(t-t') \exp\left[\left(-\frac{1}{\tau_{di}} - \frac{R_0^6}{\tau_{di} r^6}\right)t'\right] dt' \quad (2.31)$$

onde a_i e τ_{di} são, respectivamente, os fatores pré-exponenciais e os tempos de vida do decaimento do doador na ausência do aceitador e $L(t)$ é o perfil da lâmpada. Modificamos o programa para estabelecer esta expressão para $F(r, t)$.

2.6 Supressão de Fluorescência¹

A supressão da fluorescência é uma ferramenta que permite obter informações sobre processos bioquímicos envolvendo moléculas, macromoléculas e agregados supramoleculares; pode ser denominada estática ou dinâmica e, em ambos os processos, é necessário o contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Essa necessidade de contato entre as moléculas resulta em várias aplicações da supressão.

Uma das aplicações está no estudo da acessibilidade do fluoróforo ao supressor. Seja um fluoróforo ligado a uma proteína ou a uma membrana. Se a proteína ou a membrana é impermeável ao supressor, e o fluoróforo está localizado em seu interior, então nem supressão colisional nem estática serão observadas. Por esta razão, estudos de supressão podem ser usados para revelar a localização de fluoróforos em proteínas e membranas e a permeabilidade de proteínas e membranas a um determinado supressor. Além disso, a taxa de supressão colisional pode ser usada para determinar o coeficiente de difusão de determinado supressor.

No caso da supressão colisional (também denominada dinâmica), supressor e fluoróforo colidem durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Sob contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental, sem a emissão de fóton. No caso da

supressão estática, um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor e este complexo não é fluorescente.

A supressão colisional da fluorescência é descrita em termos da equação de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2.32)$$

onde I_0 e I são, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor; τ_0 e τ são, respectivamente, o tempo de vida da sonda fluorescente na ausência de supressor e na presença deste; k_q é a constante de supressão bimolecular e $[Q]$ é a concentração de supressor na solução. A constante de supressão de Stern-Volmer é dada por $k_q\tau_0$; se a supressão é dinâmica, a constante de Stern-Volmer será representada por K_D .

Os dados de supressão normalmente são mostrados em gráficos de τ_0/τ em função de $[Q]$. Um gráfico de Stern-Volmer linear é geralmente indicativo de uma única população de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao supressor. Se duas populações de fluoróforos estão presentes, e uma delas não está acessível ao supressor, então os gráficos de Stern-Volmer desviam da linearidade. Esse resultado é freqüentemente encontrado na supressão da fluorescência do triptofano em proteínas por supressores polares ou carregados. Essas moléculas supressoras não penetram o interior hidrofóbico das proteínas, e somente aqueles resíduos de triptofano localizados na superfície da proteína têm sua fluorescência suprimida.

É importante observar que um gráfico de Stern-Volmer linear não prova que tenha ocorrido supressão colisional de fluorescência. A supressão estática também resulta em gráficos de Stern-Volmer lineares.

Desse modo, as supressões estática e dinâmica poderiam ser distinguidas pela sua diferente dependência com a temperatura e viscosidade, ou preferencialmente pelas medidas de tempo de vida. Neste último caso, a supressão estática não diminui o tempo de vida do fluoróforo, pois nestes experimentos somente é observada a fluorescência de moléculas que não formaram complexos com o supressor e, portanto, não apresentam mudanças em seus valores de tempos de vida ($\tau_0 = \tau$).

Da equação 2.32, freqüentemente se obtém o valor da constante de supressão bimolecular (k_q), que pode refletir a eficiência da supressão ou a acessibilidade dos fluoróforos ao supressor. Valores menores de k_q podem significar a blindagem do fluoróforo, e valores aparentes maiores de k_q usualmente indicam interações mais fortes, envolvendo algum tipo de ligação.

2.7 Espectroscopia de Correlação de Fluorescência⁵⁴

A Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS) é um dos diferentes modos de análise de biomoléculas (em concentrações extremamente baixas) com alta resolução espacial e temporal. Em contraste com outras técnicas fluorescentes, aqui o parâmetro primário de interesse não é a intensidade de emissão em si, mas sim as flutuações espontâneas na intensidade, causadas por pequenos desvios no equilíbrio térmico de um determinado sistema. Em geral, todos os parâmetros físicos que dão origem às flutuações no sinal da fluorescência são acessíveis pela FCS. A técnica determina diretamente concentrações locais, coeficientes de mobilidade e constantes características de taxas de reações inter/intramolecular de biomoléculas marcadas com sondas fluorescentes em concentrações da ordem de nanomolar.

A FCS foi desenvolvida nos primeiros anos da década de setenta como um caso especial de análise de relaxação. Métodos clássicos de relaxação requerem determinados tipos de perturbações externas como saltos na temperatura ou na pressão do sistema e recolhem informação sobre os parâmetros cinéticos envolvidos a partir do modo como o sistema volta para o equilíbrio. O novo conceito de FCS em relação a essas técnicas clássicas é tirar vantagem das pequenas flutuações espontâneas dos parâmetros físicos que são, de algum modo, refletidos pela emissão fluorescente das moléculas. Tais flutuações estão ocorrendo incessantemente em temperatura ambiente e, geralmente, são representadas como ruído de fundo (indesejado) padrão do sinal medido. Podem ser quantificadas em sua força e duração, através da autocorrelação temporal do sinal de intensidade gravado, um procedimento matemático que dá nome à técnica. A análise da autocorrelação fornece uma medida para a auto-similaridade de uma série de sinais no tempo e, conseqüentemente, descreve a persistência da informação carregada por estes sinais. Assim, informações essenciais sobre processos que governam dinâmicas

moleculares podem ser obtidas do padrão temporal através do qual as flutuações na fluorescência aumentam e diminuem.

Em sua primeira aplicação⁵⁵ a FCS foi utilizada para medir a difusão e dinâmica química da intercalação de drogas com o DNA. Este primeiro trabalho foi seguido por certo número de outras publicações de diferentes grupos descrevendo tentativas de determinar a concentração de partículas, mobilidade rotacional e translacional em duas e três dimensões, mesmo em ambiente celular ou sistemas de fluxos. No entanto, essas primeiras medidas sofreram com uma relação sinal/ruído muito pobre, causada principalmente pela baixa eficiência na detecção e supressão insuficiente do sinal de fundo.

O conceito básico da FCS é tornar o número de moléculas observadas baixo o suficiente de modo que cada molécula possa contribuir substancialmente para o sinal medido. Somente assim pode-se verdadeiramente executar a análise de flutuações espontâneas, não coordenadas. É óbvio que a técnica funciona somente quando se consegue, de algum modo, reduzir as concentrações e o volume de observação de modo que somente poucas moléculas possam ser simultaneamente detectadas; ao mesmo tempo deve-se aumentar o rendimento fluorescente por molécula única. Assim, uma configuração interessante seria utilizar corantes fluorescentes eficientes para marcar as moléculas de interesse, fontes de luz fortes e estáveis (lasers) e detectores ultra-sensíveis (fotodiodos do tipo *avalanche*, com sensibilidade para fótons únicos). A descoberta final aconteceu em Estocolmo, onde Rigler e seus colaboradores combinaram a técnica de FCS com a detecção confocal. Aqui, o laser de excitação é fortemente focado por uma objetiva de abertura numérica maior que 0,9. Somente poucos fluoróforos dentro da região iluminada são excitados. Para limitar o volume de excitação também na direção axial, um pinhole é introduzido no plano da imagem, bloqueando toda a luz proveniente da região não focal.

A maioria das medidas de FCS é realizada com moléculas fluorescentes (ou marcadas) difundindo livremente em solução aquosa. Devido à limitação do volume de detecção (da ordem de femtolitros), concentrações da ordem de nanomolares são ideais para essas medidas. Sob essas circunstâncias, as flutuações no sinal induzidas por moléculas difundindo dentro ou fora do volume focal são grandes o suficiente para render boas relações sinal/ruído. Durante o tempo que uma partícula permanece no volume focal,

mudanças conformacionais e reações químicas ou fotofísicas podem alterar as características de emissão do fluoróforo e causar flutuações adicionais no sinal detectado.

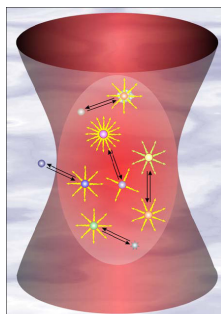


Figura 2.3: Mecanismos moleculares que podem causar flutuações na fluorescência: movimento das partículas, mudanças conformacionais e reações químicas ou fotofísicas.

Às curvas de correlação obtidas experimentalmente, foram ajustadas funções de autocorrelação; no apêndice A descrevemos em detalhes como pode ser obtida tal função de autocorrelação e sua posterior análise.

2.8 Excitação a fóton único e excitação multi-fótons

Em medidas de FCS é importante conseguir um volume focal bastante pequeno e bem limitado. Dependendo da qualidade e diâmetro do feixe de excitação, pode-se inserir um expensor do feixe (*beam expander*) ou uma fibra óptica antes do feixe chegar ao microscópio. Quanto maior o diâmetro do feixe, menor será o volume focal resultante. Preenchendo-se totalmente a abertura traseira da objetiva, obtém-se um ponto de difração limitado, de aproximadamente $0,5\mu\text{m}$ de diâmetro. Quando a excitação é feita por fóton único, a taxa de absorção k das moléculas é dada por:

$$k_1 = \sigma \cdot \varphi_1 \quad (2.33)$$

onde σ é a seção de choque para excitação a um fóton e φ é o fluxo de fótons. Neste caso, a região excitada vai além do plano focal e fluorescência indesejada (proveniente dos planos não-focais) chega ao detector; então, para limitar o volume focal, coloca-se um pinhole no plano da imagem, bloqueando assim qualquer fluorescência proveniente dos planos não focais; essa é a configuração de um microscópio confocal. A figura 2.4 a seguir mostra uma fotografia da região excitada, no caso de absorção de um único fóton pelas moléculas e um esquema de microscópio confocal:

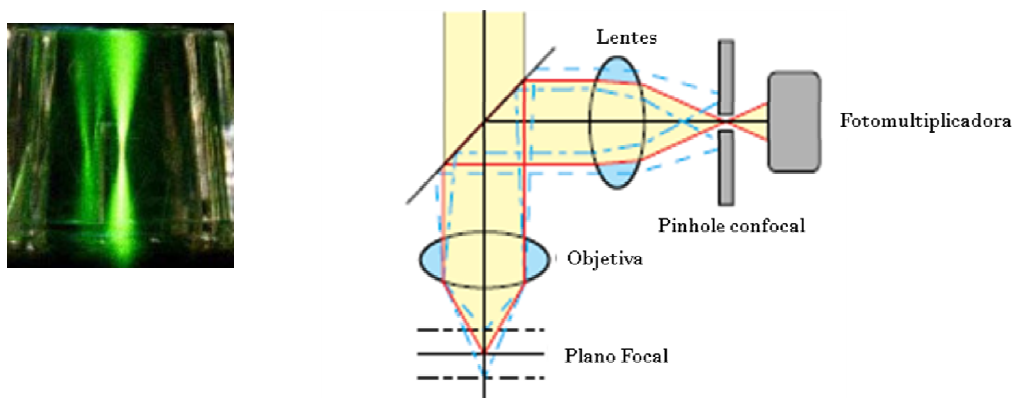


Figura 2.4: Fotografia da região excitada (esquerda), no caso de absorção de fóton único e esquema de um microscópio confocal (direita).

No entanto, pode-se excitar uma amostra incidindo sobre ela luz de comprimento de onda duas vezes maior que seu comprimento de onda característico de absorção por fóton único. Neste caso, dois fótons serão absorvidos para que a molécula possa ir para o estado excitado (ver esquema na figura 2.5) e a taxa de absorção é dada por:

$$k_2 = \delta \cdot [\varphi_2]^2 \quad (2.34)$$

onde δ é a seção de choque para excitação a dois fótons e φ é o fluxo de fótons. Aqui a taxa de absorção varia com o quadrado da potência do laser, o que limita o volume de excitação e o microscópio se torna automaticamente confocal, sem a necessidade de inserção de um pinhole. A figura a seguir mostra um diagrama do processo de absorção por dois fótons e uma fotografia da região excitada:

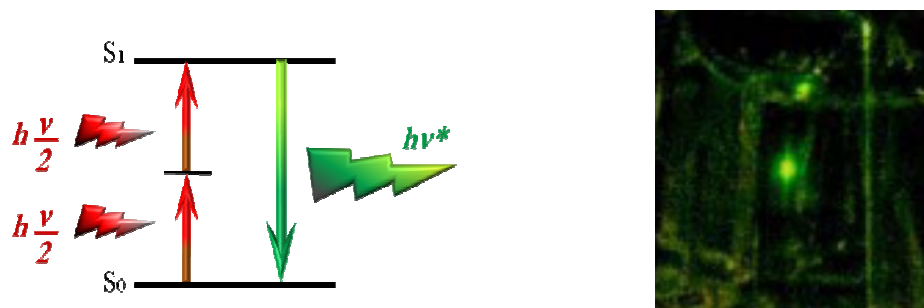


Figura 2.5: Diagrama ilustrando a absorção de dois fótons (esquerda) e fotografia da região excitada, no caso de absorção de dois fótons (direita).

A confocalidade automática do sistema resulta em um menor volume focal, bem delimitado e uma melhor relação sinal/ruído. Desse modo, a excitação a dois fótons tem sido bastante utilizada. Outra vantagem está no fato de que células e tecidos tendem a ser mais tolerantes à radiação infravermelha (em geral, os comprimentos de onda utilizados na excitação a dois fótons estão na região do infravermelho e vermelho) e há menos autofluorescência e espalhamento. Além disso, o efeito de *bleaching* ocorre somente na região focal⁵⁶, enquanto que na excitação por fóton único todos os fluoróforos localizados no duplo cone (acima e abaixo do plano focal) são excitados, sofrendo o efeito de *bleaching* e a discriminação de profundidade dada pelo pinhole torna-se praticamente um efeito artificial, se restringido somente à detecção do sinal.

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos

As medidas de absorção óptica foram feitas em um espectrofotômetro UV-visível ULTROSPEC 2100. Medidas de fluorescência estática foram feitas no espectrofluorímetro SLM AMINCO 8100, disponível no laboratório do Prof. Dr. Richard Ward, no Departamento de Química da FFCLRP - USP.

Medidas do decaimento da intensidade de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de correlação temporal de fótons únicos (TCSPC). O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons da excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra.

O sistema utilizado para excitação consiste de um conjunto de lasers; no início do processo, um laser de diodos, com dois feixes emitindo em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de estado sólido (Nd:YVO₄ - Millennia Xs - Spectra Physics) que emite em 1064 nm; o feixe passa então, por um cristal dobrador de frequências e o feixe final, com potência podendo chegar a 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics); o cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída. Passando por um sistema selecionador de frequências, onde ondas eletromagnéticas estacionárias em um cristal atuam como uma rede de difração, esses pulsos de laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequências entre 0,01 e 8 MHz, que são mais adequadas ao método de contagem de fótons únicos. Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundos e terceiros harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação de nossas amostras, que vai de 280 até 330 nm. O sinal detectado como pulso de excitação, chamado IRF (*instrument response function*), tem largura total a meia altura de 120 ps.

Em todas as medidas de absorção óptica, fluorescência estática e fluorescência temporal, as amostras foram colocadas em cubetas de quartzo, com caminho óptico de

1,0 cm, 0,4 cm ou 0,2 cm. A temperatura foi controlada por um banho térmico (Julabo), e no interior da cubeta a temperatura foi medida com termopar (Minipa).

Para as medidas de correlação de fluorescência (FCS), utilizamos o seguinte arranjo experimental (disponível no Laboratório de Bioespectroscopia da Università Degli Studi di Milano Bicocca, sob responsabilidade do Prof. Giuseppe Chirico):

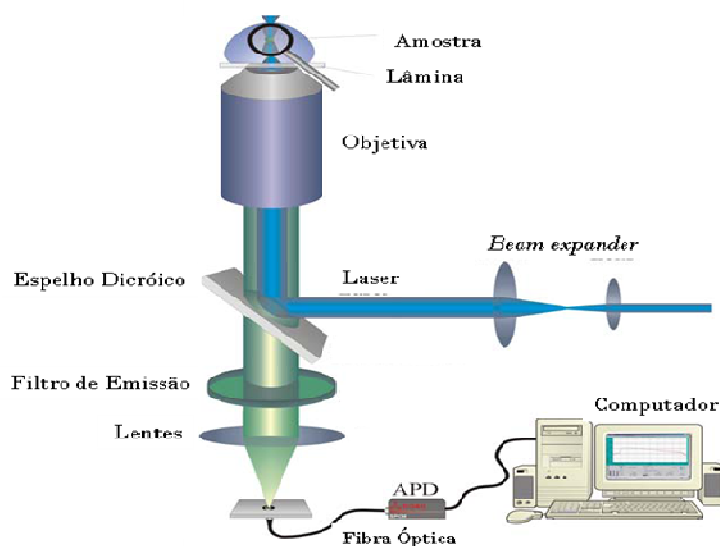


Figura 3.1: Esquema experimental utilizado para medir FCS.

O feixe laser de excitação é direcionado para a objetiva do microscópio através de um espelho dicróico e a seguir é focado na amostra. Como as moléculas de interesse estão dissolvidas em solução aquosa, são utilizadas objetivas de imersão em água com abertura numérica de 1,2. A luz fluorescente proveniente da amostra é coletada pela mesma objetiva e passa através do dicróico e do filtro de emissão. Como a excitação é feita a dois fótons, não há fluorescência proveniente de planos não focais. A luz é então focalizada no detector, constituído de fotodiodos *avalanche* com sensibilidade a fótons únicos. O sinal é registrado por uma placa correlacionadora que gera a função de autocorrelação. Tanto o sinal de fluorescência quanto a curva gerada são mostradas simultaneamente no monitor, facilitando o ajuste e o controle do aparato experimental. Os dados são salvos em formato ASCII e podem ser importados por qualquer outro programa para posterior análise. Os dados de correlação de fluorescência mostrados neste trabalho foram analisados no aplicativo científico Origin 7.0. Quanto ao laser utilizado na excitação, dependendo da qualidade e diâmetro do feixe, utiliza-se um expensor do feixe (*beam expander*), pois,

quanto maior o diâmetro do feixe, menor será o volume focal resultante; por exemplo, se preenchermos totalmente a abertura traseira da objetiva, obteremos um ponto de difração limitado, de aproximadamente 0,5 μm de diâmetro.

O sistema utilizado para excitação a dois fótons é muito semelhante ao utilizado em nossos laboratórios para medidas de fluorescência resolvida no tempo. Como descrito anteriormente, um laser de estado sólido (Milenia – Spectra Physics) bombeia um laser de Titânio/Safira (Tsunami 3960 – Spectra Physics) com pulsos de femtosegundos e frequência de repetição de 80 MHz, com potência na saída do laser em torno de 700 mW para o comprimento de onda de 770 nm.

O microscópio utilizado nessas medidas de FCS foi um Nikon TE300 invertido, com objetiva de imersão em água também da Nikon, com abertura numérica de 1,2. A amostra era acondicionada em pequenos ‘poços’ de acrílico com fundo de vidro e espessura de 0,17 mm. A temperatura da sala era mantida a 23 °C por sistema de refrigeração, sendo monitorada durante os experimentos, apresentando variação de aproximadamente 0,5 °C.

Para a obtenção de imagens por microscopia de fluorescência, utilizamos como sistema de excitação um laser de Titânio/Safira (Mai Tai HP – Spectra Physics). Este laser apresenta exatamente as mesmas características do Tsunami descrito anteriormente, com a diferença de que é alinhado permanentemente e o controle do comprimento de onda é feito através de software da própria Spectra Physics. O sistema tem a vantagem de ser mais estável como um todo, se comparado com o Tsunami. O intervalo espectral vai de 695 nm até 1020 nm. O microscópio utilizado foi um Olympus BX51 com programa de aquisição de imagens Fluoview 5.0.

3.2 Sondas utilizadas

Apresentamos aqui as sondas utilizadas neste trabalho. Nos estudos de supressão de fluorescência e transferência de energia, foram utilizados: o 2-Amino-*N*-hexadecil-benzamida (Ahba); o piridínio, ligado a cadeias alquila de diferentes tamanhos; o Laranja de Acridina (AO); o *N*-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) (NBD) ligado a fosfolipídios e o *N*-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina (Eddnp) puro e ligado a um polipeptídeo, o Phe-Arg-Ser-Ser-Arg-Gln (FRSSRQ-Eddnp). Cada conjunto de três letras representa um

aminoácido: Phe – Fenilalanina, Arg – Arginina, Ser – Serina e Gln – Glutamina. A figura 3.2 a seguir apresenta a estrutura molecular dessas sondas:

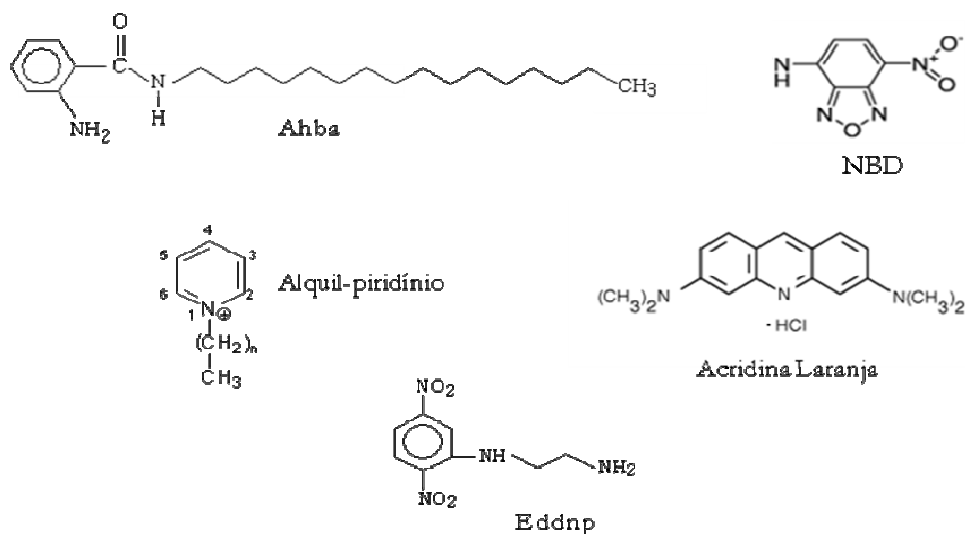
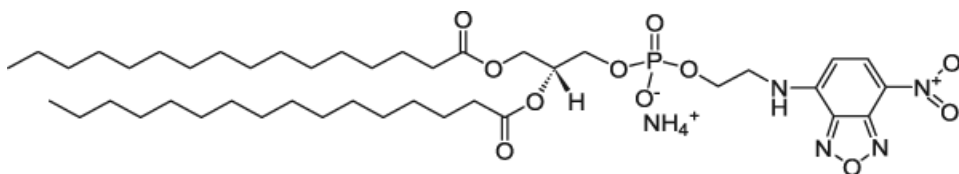
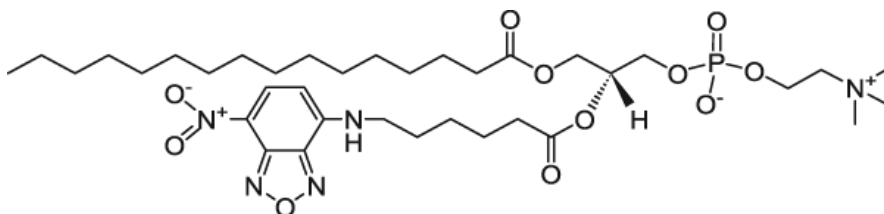


Figura 3.2: Estrutura molecular do Ahba, NBD, Alquil-piridínio, Laranja de Acridina e Eddnp.

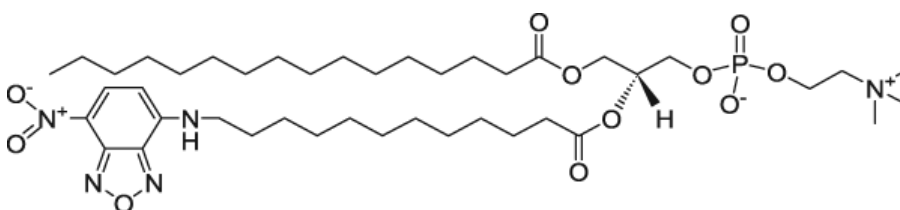
O Ahba, o Eddnp puro e o FRSSRQ-Eddnp foram sintetizados no laboratório do grupo de Biofísica da Escola Paulista de Medicina - Unifesp, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Juliano e da Dra. Isaura Y. Hirata. Os supressores cloreto de etil-piridínio, cloreto de hexil-piridínio e cloreto de dodecil-piridínio foram sintetizados pela Dr. Ana Paula Romani, no Departamento de Química da FFCLRP – USP. O Laranja de Acridina foi adquirida da Sigma-Aldrich. Os diferentes lipídios marcados com o NBD foram adquiridos da Avanti Polar Lipids. A figura 3.3 a seguir mostra a estrutura molecular dos fosfolipídios marcados com a sonda fluorescente NBD:



1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) (Sal de Amônia) (16:0 NBD PE)



1-Palmitoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (16:0-06:0 NBD PC)



1-Palmitoil-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]dodecanoil]-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (16:0-12:0 NBD PC)

Figura 3.3: Estrutura molecular dos fosfolípidios marcados com a sonda NBD.

Nos estudos de espectroscopia de correlação de fluorescência, microscopia de fluorescência e excitação multi-fótons foram utilizadas, além do Ahba, as sondas fluorescentes 6-lauryl-2-dimethylaminonaphthalene (Laurdan) (da Molecular Probes) e Rodamina 6G (da Sigma-Aldrich). A figura 3.4 a seguir mostra a estrutura molecular desses compostos:

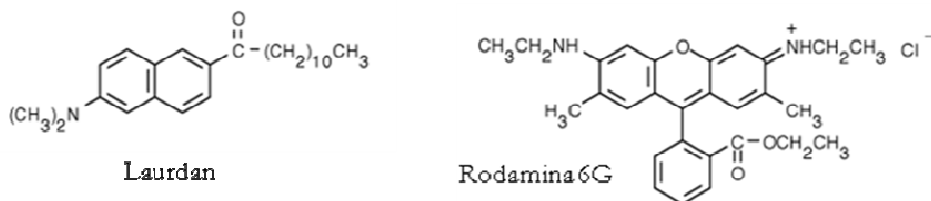


Figura 3.4: Estrutura molecular do Laurdan e Rodamina 6G.

3.3 Preparação das Amostras

O Ahba, por ser altamente hidrofóbico, não dissolve em solução aquosa; assim, os estoques foram preparados em álcool etílico, na concentração de 1.0 mM e em clorofórmio, também a 1.0 mM.

Para as medidas do espectro de excitação a dois fótons do Ahba (utilizando microscopia de fluorescência), colocamos sobre uma lâmina um volume de aproximadamente 20 μl (uma gota) e deixamos evaporar todo o etanol. O ‘filme’ resultante foi colocado para observação no microscópio.

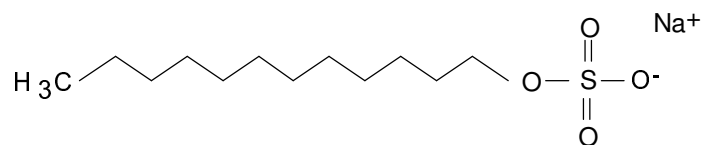
A Rodamina 6G foi dissolvida sempre em etanol, em estoques com concentrações da ordem de 0,1 mM. O Laurdan foi dissolvido em etanol, com estoques na concentração de 1 mM e 0,1 mM. Microesferas fluorescentes [FluoSpheres carboxylated modified microspheres, yellowgreen fluorescent (505/515), diâmetro de 0,1 μm] utilizadas em experimentos de FCS foram dissolvidas em água Milli-Q. As microesferas foram adquiridas da Molecular Probes. Por serem utilizadas somente na calibração dos instrumentos, não houve necessidade de se controlar a concentração dessas amostras.

Os estoques dos fosfolipídios marcados com o NBD foram preparados em etanol (de grau espectroscópico, da Merck) e pequenas alíquotas desses estoques foram adicionadas à cubeta durante o experimento, aumentando gradativamente a concentração do aceitador na solução. Nesses experimentos, a concentração do doador foi sempre de 30 μM e a de fosfolipídios, 1 mM. Em outros experimentos, os NBD-fosfolipídios foram dissolvidos em clorofórmio e adicionados juntamente com os fosfolipídios para formação do filme lipídico, durante o procedimento de preparação das vesículas.

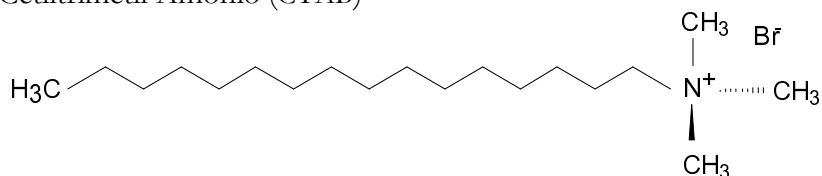
Para a preparação de micelas, utilizamos o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), de carga negativa; o Brometo de Cetiltrimetil Amônio (CTAB), positivamente carregado e o surfactante neutro (*zwitteriônico*) 3-(Dodecil-Dimetil-Amônio)-propano-sulfonato (DPS). A preparação é simples, bastando dissolver o surfactante em água do tipo Milli-Q.

A figura a 3.5 a seguir mostra a estrutura molecular dos surfactantes utilizados:

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)



Brometo de Cetiltrimetil Amônio (CTAB)



3-(Dodecil-dimetil amônio) propano-1-sulfonato (DPS)

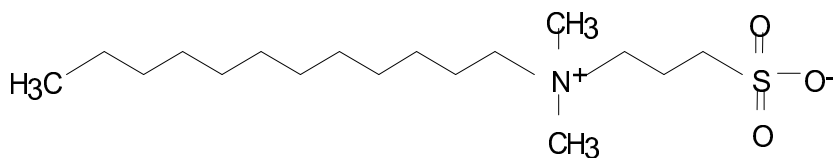


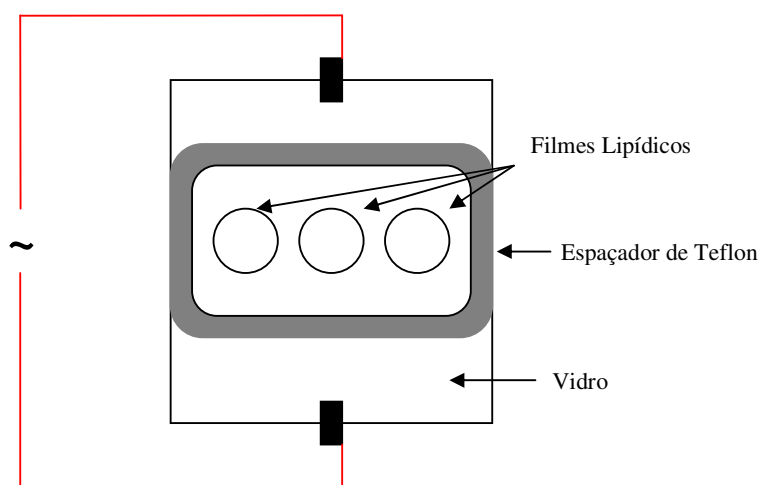
Figura 3.5: Estrutura molecular dos surfactantes utilizados na preparação de micelas.

As vesículas do tipo LUV (do inglês, *large unilamellar vesicles*) utilizadas aqui são preparadas a partir do 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DMPC), um fosfolípido neutro (*zwitteriônico*) e do 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)](Sal de Sódio) (DMPG), negativamente carregado; ambos foram adquiridos da Avanti Polar Lipids. Para o preparo de tais vesículas, utilizamos o método de extrusão⁵⁷. Suscintamente: um filme de lipídios foi formado a partir de lipídios dissolvidos em clorofórmio, onde o solvente foi removido através de um fluxo de N₂; para eliminar todos os traços do solvente, o filme foi deixado em ambiente de pressão reduzida por aproximadamente 5 horas. O passo seguinte consistiu na suspensão desse filme em uma solução tampão Hepes 5 mM de pH 7,4 através de um agitador de tubos. Essa suspensão foi filtrada através de

membranas de policarbonato (da Millipore), com poros de diâmetro de $0,4 \mu\text{m}$, $0,2 \mu\text{m}$ e por último, $0,1 \mu\text{m}$, resultando em vesículas unilamelares com diâmetro de $0,1 \mu\text{m}$.

As vesículas gigantes, GUV (do inglês, *giant unilamellar vesicles*), observáveis em microscópio^{58,59}, foram obtidas através do método de eletroformação. O Eletroformador de Vesículas (figura 3.6) consiste em uma moldura de Teflon, localizada entre duas placas de vidro recoberto com FTO (óxido de estanho dopado com flúor). Entre essas placas é formada uma câmara que é preenchida com solução aquosa. Na superfície do vidro, no interior dessa câmara, forma-se um filme lipídico, que será suspenso depois, pela solução aquosa. Aplicando entre as placas uma diferença de potencial de $1,0 \text{ V}$ (obtida de um gerador de função) (corrente AC e frequência de 10Hz) durante 15 minutos e, em seguida, de $1,5 \text{ V}$ por cerca de três ou quatro horas, é possível obter as vesículas gigantes.

VISTA FRONTAL



VISTA LATERAL

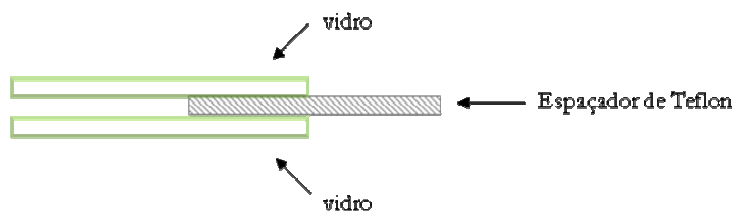
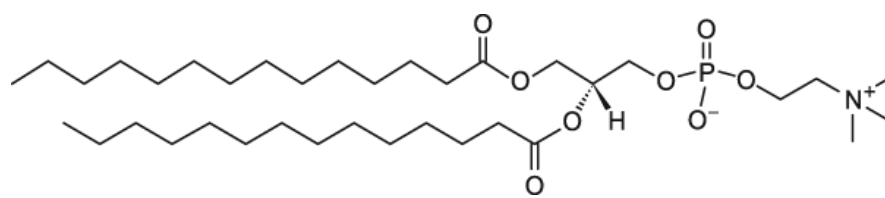


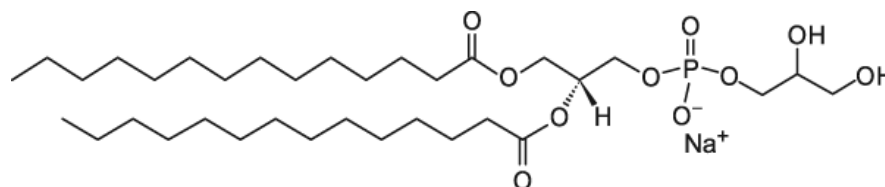
Figura 3.6: Esquema do dispositivo eletroformador de vesículas gigantes. Figura gentilmente cedida pela Dra. Karin do Amaral Riske.

Para visualização em microscópio invertido (comum), os filmes lipídicos foram suspensos em uma solução de sacarose (glicose) 200 mM e a solução obtida foi diluída em glicose (sacarose) 200 mM, de maneira que no interior das vesículas tínhamos sacarose (glicose) e no exterior, glicose (sacarose). A sacarose (glicose), por ser mais (menos) densa, leva as vesículas para o ‘fundo’ (topo) da câmara, onde ficam praticamente imóveis, facilitando o monitoramento visual. No caso da incorporação de sondas fluorescentes, estas são dissolvidas em solvente orgânico, juntamente com os lipídios. O lipídio utilizado para a formação dessas vesículas gigantes foi o 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (POPC), gentilmente cedido pela Dra. Karin do Amaral Riske, da Escola Paulista de Medicina - Unifesp.

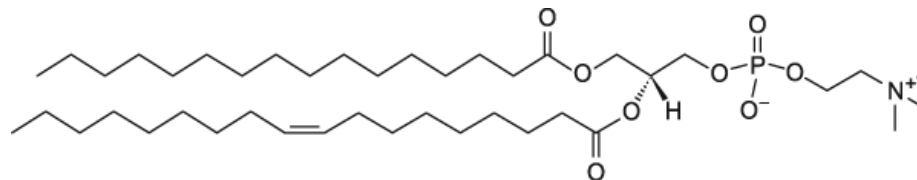
A figura 3.7 a seguir mostra a estrutura molecular dos lipídios DMPC, DMPG e POPC:



1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3- Fosfocolina (DMPC)



1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)](Sal de Sódio) (DMPG)



1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (POPC)

Figura 3.7: Estrutura molecular dos fosfolipídios utilizados na preparação de vesículas.

Capítulo 4: Resultados e Discussões

Neste capítulo são mostrados e discutidos os experimentos realizados e os resultados obtidos. Experimentos de supressão de fluorescência foram feitos com a sonda fluorescente Ahba, sendo agentes supressores compostos do tipo alquilpiridínio. Uma vez que os alquilpiridínios são carregados positivamente e, dependendo do tamanho da cadeia alquila, apresentam alta hidrofobicidade, foram conduzidos experimentos em presença de agregados anfifílicos (sistemas micelares e vesículas de fosfolipídios) neutros (*zwitteriônicos*) e carregados positivamente e negativamente. Estudos de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) foram realizados tendo o Ahba como doador, e diferentes moléculas aceitadoras foram testadas: a Acridina Laranja, o Eddnp puro e ligado a peptídeos e o NBD ligado a fosfolipídios. Esses experimentos de FRET também foram realizados em presença de agregados anfifílicos, uma vez que, tanto o doador quanto os aceitadores são compostos hidrofóbicos com afinidade por micelas e vesículas; dessa maneira foi observada a transferência de energia e, ao final, foi obtida a distribuição de distâncias entre doador e aceitador. Estudos com técnicas avançadas em espectroscopia e microscopia de fluorescência foram realizados envolvendo moléculas fluorescentes como o Laurdan, com grande afinidade por sistemas hidrofóbicos e a Rodamina 6G. Para o Ahba, foram adquiridos espectros de absorção de dois fótons e imagens de fluorescência foram obtidas de membranas marcadas com esta sonda.

4.1 Supressão colisional

Através de experimentos de fluorescência estática e resolvida no tempo, observamos a supressão da fluorescência do Ahba por agentes supressores da família dos alquilpiridínios, pertencentes a uma classe de surfactantes catiônicos contendo o grupo piridínio, já conhecido por sua eficiência em suprimir a fluorescência do resíduo triptofano em proteínas (BSA) e pequenos peptídeos⁶⁰.

Por serem positivamente carregados, os alquilpiridínios têm alta afinidade por agregados anfifílicos de superfície carregada negativamente, como micelas de SDS⁶¹ e vesículas de DMPG. Dependendo do tamanho da cadeia alquila, a hidrofobicidade será maior ou menor, causando redução ou aumento na mobilidade intramicelar/intralamelar e alterando ainda a taxa de troca com a fase aquosa⁶². Diante do exposto, pode-se afirmar

que experimentos de supressão com os alquilpiridínios fornecem informações sobre a localização de fluoróforos ou peptídeos marcados em sistemas microheterogêneos.

Neste trabalho, utilizamos os supressores cloreto de etil-piridínio, cloreto de hexil-piridínio e cloreto de dodecil-piridínio, todos tendo como contra-íon o cloreto e cadeia alquila de dois, seis e doze carbonos, respectivamente.

Apresentamos na figura 4.1 a seguir, gráfico com o tempo de vida médio do Ahba em função da concentração de cloreto de etil-piridínio:

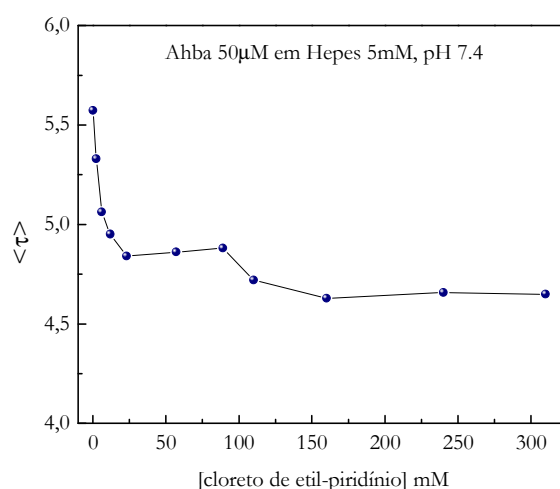


Figura 4.1: Gráfico do tempo de vida médio do Ahba em função da concentração do supressor cloreto de etil-piridínio. Excitação 328 nm e emissão observada em 400 nm.

Na ausência de agregados macromoleculares que possam aproximar sonda fluorescente e supressor, é necessário trabalhar com altas concentrações moleculares para que seja observada a supressão, pois assim a distância média entre cada molécula diminui, promovendo a interação entre elas. Lembrando que o Ahba forma agregados em solução aquosa⁵², teríamos um número ainda menor de sondas fluorescentes no sistema (agregados de sondas fluorescentes), justificando a adição de supressor até a concentração de 300 mM (bastante alta se comparada a valores de concentração molecular comumente usados em experimentos de espectroscopia de fluorescência), como pode ser observado no gráfico anterior. Nesse intervalo de concentração de supressor, foi observada a supressão da fluorescência do Ahba por parte do grupo piridínio, ainda que bastante

pequena, pois o tempo de vida médio do Ahba diminuiu de 5,6 ns na ausência de supressor para 4,6 ns em presença de 300 mM de cloreto de etil-piridínio.

Considerando os agregados de Ahba na solução, após determinada concentração de supressor (25 mM) não mais se observa a diminuição do tempo de vida, indicando que há um número específico máximo de moléculas supressoras para cada agregado de Ahba e a adição de mais supressor já não resulta em aumento na eficiência do processo de supressão. Naquela concentração pode-se estimar uma distância média de 50 Å entre duas moléculas de supressor. Se o coeficiente de difusão for da ordem de 10^{-10} m²/s, um valor razoável pelas suas dimensões, durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo (10 ns) a molécula pode mover-se 45 Å. Assim, naquele intervalo de tempo sempre será possível que uma molécula de etil-piridínio encontre um agregado de Ahba.

O passo seguinte foi colocar ambas as moléculas em presença de micelas de SDS. Como sabemos, o Ahba é solubilizado pelas micelas de SDS, permanecendo com sua cadeia hidrofóbica inserida na região intramicelar⁵², o cloreto de etil-piridínio, sendo carregado positivamente, seria atraído eletrostaticamente para a micela de SDS, que é negativa. O gráfico da figura 4.2 a seguir mostra os resultados obtidos:

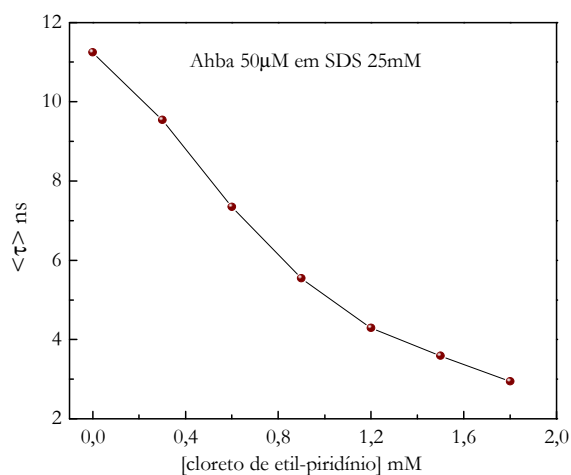


Figura 4.2: Gráfico do tempo de vida médio do Ahba em função da concentração de supressor, em presença de micelas de SDS. Excitação em 328 nm e emissão em 400 nm.

Em presença de micelas, o tempo de vida médio do Ahba aumenta, pois aqui a sonda está em sua forma monomérica, inserida na micela. Por atração eletrostática, temos

uma população de supressores também nas vizinhanças da micela, ou parcialmente inseridos nela; o caráter hidrofóbico do etil-piridínio não é alto, e há uma troca contínua de posição entre o meio aquoso e o interior apolar das micelas⁶². A supressão é tão eficiente que não foi possível obter perfis do decaimento da fluorescência para concentrações maiores que 1,8 mM de supressor, simplesmente por não ser possível detectar sinal fluorescente.

Numa situação de equilíbrio dinâmico, as moléculas de cloreto de etil-piridínio ‘entram e saem’ das micelas; com o aumento da concentração do supressor no meio, haveria maior número de moléculas inseridas ou suficientemente próximas das micelas durante o tempo de vida do estado excitado do Ahba, promovendo o ‘encontro’ da molécula fluorescente e do supressor e permitindo assim, a observação da supressão da fluorescência do Ahba.

O mesmo experimento foi realizado utilizando-se os supressores cloreto de hexil-piridínio e cloreto de dodecil-piridínio; aqui o efeito hidrofóbico tem peso significativo nos mecanismos de interação entre supressor e micela. O gráfico da figura 4.3 a seguir resume os dados obtidos desses experimentos:

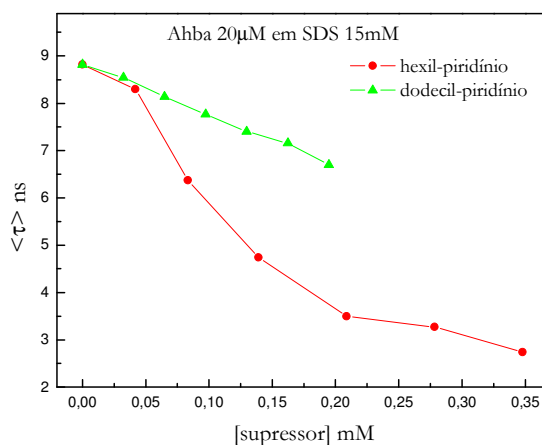


Figura 4.3: Gráfico do tempo de vida médio do Ahba em micelas de SDS, em função da concentração dos supressores hexil-piridínio e dodecil-piridínio.

Neste caso a eficiência do processo de supressão é ainda maior, comparada àquela onde o etil-piridínio é o supressor. A hidrofobicidade desses compostos, somada à atração eletrostática pela superfície da micela, promove uma aproximação ainda maior em relação

à micela e um tempo de permanência mais longo no ambiente apolar, aumentando a interação colisional com o Ahba ali inserido. Com uma concentração dez vezes menor de supressor (em relação ao etil-piridínio) é possível suprimir quase que toda a fluorescência do Ahba.

O mesmo estudo foi realizado em presença de vesículas de DMPC. Os resultados são mostrados no gráfico da figura 4.4 a seguir:

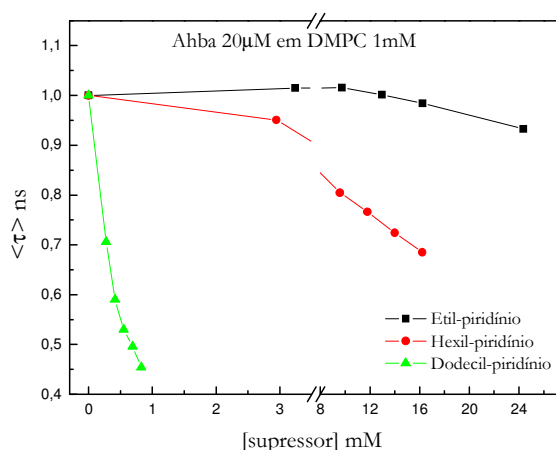


Figura 4.4: Gráfico do tempo de vida médio do Ahba em vesículas de DMPC, em função da concentração de supressores alquilpiridínios.

Observa-se uma grande diminuição do tempo de vida médio do Ahba com apenas 0,8 mM de dodecil-piridínio. Em relação às outras moléculas supressoras, esse valor de concentração é bastante baixo; no entanto, conforme já discutido anteriormente, em termos de concentrações moleculares usadas em estudos de espectroscopia de fluorescência, este valor é alto. O Ahba se localiza na bicamada lipídica, com a cabeça polar na superfície e sua cauda hidrofóbica inserida na bicamada⁵²; na concentração de 20 μM de Ahba, 1 mM de DMPC e 0,8 mM de dodecil-piridínio, temos 50 moléculas de fosfolípido para cada molécula de Ahba e 40 moléculas de dodecil-piridínio para cada molécula de Ahba; se todas as moléculas de supressor estivessem presentes na superfície da bicamada lipídica, seria suficiente uma concentração muito mais baixa de supressor para suprimir totalmente a fluorescência do Ahba. Porém, deve ser levado em conta o fato de que as moléculas de supressor na superfície da bicamada encontram-se a certa distância dos fluoróforos e dependendo desta distância, a supressão pode não ocorrer,

uma vez que a difusão no meio lipídico é menor que no ambiente aquoso, mesmo que o experimento tenha sido realizado à temperatura de 25°C, ou seja, acima da transição de fase do DMPC, num estado de maior fluidez da membrana. De tais fatos, podemos inferir que fluoróforo e supressor interagiriam mesmo sem a necessidade de concentrações tão elevadas; no entanto, com uma concentração 40 vezes maior de supressor, ainda se observava alguma fluorescência do Ahba nos levando a concluir que, mesmo o dodecil-piridínio com doze carbonos em sua cadeia alquila, particiona na fase aquosa.

Por ser o DMPC um fosfolípido *zwitteriônico*, a atração eletrostática entre os supressores e a superfície da bicamada não seria observada, sendo então o efeito hidrofóbico o principal responsável por atrair as moléculas supressoras à superfície da membrana. Por outro lado, em presença de vesículas de DMPG, um fosfolípido carregado negativamente, a componente eletrostática da interação supressor/vesícula tem papel importante, aumentando a concentração de supressor na superfície da vesícula. Nesse caso, o efeito de supressão fica bastante acentuado, e pode ser quantitativamente apreciado dentro do modelo de Stern-Volmer.

A tabela 4.1 resume os resultados obtidos a partir da equação de Stern-Volmer (equação 2.32) aplicada aos dados de tempo de vida, mostrando a importância dos efeitos eletrostáticos no processo, uma vez que as constantes de supressão são significativamente maiores na presença de micelas de SDS ou vesículas de DMPG, sendo de notar que nesses meios o supressor mais eficiente é o hexil-piridínio, que tem tempo intermediário de permanência nos agregados em relação ao etil e dodecil-piridínio. Vemos também a relevância de efeitos hidrofóbicos, expressos nos valores comparativamente elevados das constantes para dodecil-piridínio em presença de micelas de CTAB ou DMPC, comparado com hexil e etil-piridínio. Cabe observar ainda que o processo não é puramente colisional, pois as constantes calculadas dos dados de intensidade de fluorescência são sistematicamente maiores que as obtidas dos dados de tempos de vida.

Meio	Dados de Intensidade de fluorescência ($K_{SV} 10^{-3} M^{-1}$)			Dados de Tempo de vida ($K_D 10^{-3} M^{-1}$)		
	EtilP ⁺	HexilP ⁺	DodecilP ⁺	EtilP ⁺	HexilP ⁺	DodecilP ⁺
Tampão Hepes 5 mM	0,032	0,047	0,004	0,019	0,041	0,027
SDS (20 mM)	0,66	11,4	2,49	0,45	6,71	1,69
CTAB (20 mM)	0,010	0,023	0,54	-0,004	0,006	0,26
DMPC (1 mM)	0,008	0,056	3,55	0,003	0,029	1,46
DMPG (1 mM)	0,28	4,63	1,78	0,26	1,77	1,32

Tabela 4.1: Valores de K_{SV} e de K_D para o Ahba em presença dos supressores alquilpiridínios em solução aquosa e em presença de micelas (SDS e CTAB) e vesículas (DMPC e DMPG).

4.2 Transferência de Energia

Conforme discutido no capítulo 2 deste trabalho, uma das condições necessárias para que ocorra a transferência de energia é a observação da superposição espectral para um dado par doador/aceitador. Com base nessa condição e tendo o Ahba como doador, escolhemos algumas moléculas que poderiam ser potenciais aceptadores. Assim, os primeiros experimentos foram feitos com a Acridina Laranja (AO) como molécula aceptadora. Depois foi estudada a transferência de energia para peptídeo contendo o grupo Etileno-diamino-dinitrofenil (Eddnp) como aceptador. Em seguida o processo foi investigado usando como aceptador o grupo N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) (NBD) ligado a fosfolipídios.

4.2.1 Transferência de energia – grupo aceptador: Acridina Laranja (AO)

A figura 4.5 a seguir, ilustra a superposição espectral do par Ahba/AO em presença de vesículas de DMPC:

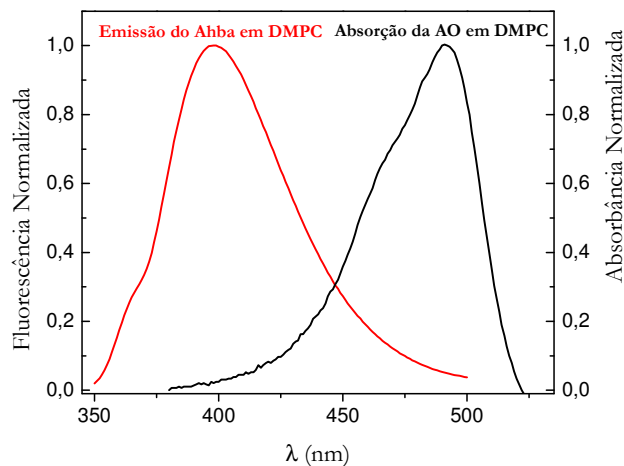


Figura 4.5: Gráfico da superposição espectral do par Ahba/AO em vesículas de DMPC a 1mM.

Com os espectros de absorção da AO e emissão fluorescente do Ahba (ambos normalizados pela área), calculamos a integral de superposição J , através da equação 2.13, obtendo o valor de $3 \times 10^{-14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$. Usando a equação 2.14 e $n=1,334$ (índice de refração do meio, medido experimentalmente), $\phi_D = 0,36$ (calculado a partir do espectro de emissão fluorescente e do valor da absorbância do Ahba em 328 nm, utilizando o rendimento quântico do *o*-Abz em etanol⁶³, 0.6, como referência) e $\kappa^2 = 2/3$, calculamos o raio de Förster:

$$R_0 = \sqrt[6]{8,8 \times 10^{-25} \left(\frac{2}{3} \cdot 1,334^{-4} \cdot 0,36 \cdot 3 \times 10^{-14} \right)} = 35,5 \text{ \AA}$$

Também foram feitos experimentos de fluorescência resolvida no tempo. A temperatura foi mantida a 27 °C durante todo o experimento. Nessa temperatura a membrana encontra-se na fase líquido-cristalina (a transição de fase do DMPC ocorre em torno de 22 °C)⁶⁴. Os decaimentos obtidos são mostrados na figura 4.6 a seguir:

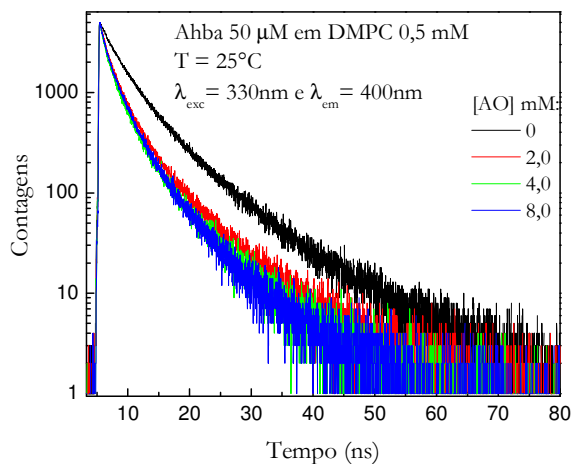


Figura 4.6: Gráfico do decaimento da fluorescência do Ahba em função da concentração de AO, em presença de vesículas de DMPC.

Observa-se que baixas concentrações de AO são suficientes para suprimir a fluorescência do Ahba, e uma saturação é observada. Dos decaimentos obtivemos os tempos de vida e a partir deste, usando a equação 2.18, calculamos a eficiência da transferência de energia; os resultados são mostrados no gráfico da figura 4.7 a seguir:

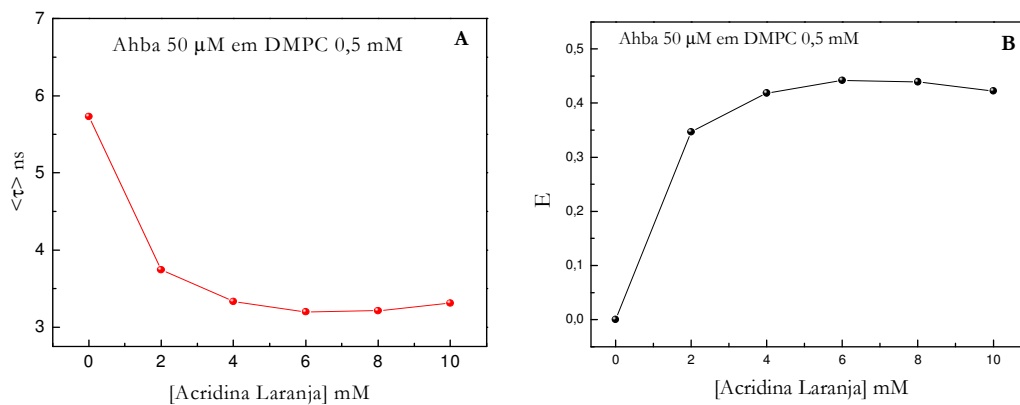


Figura 4.7: Gráficos do tempo de vida do Ahba em função da concentração de AO (A) e da eficiência da transferência de energia (B).

Nota-se que, após acrescentar aproximadamente 5 mM de AO, a eficiência mantém-se constante; é possível que cada doador já tenha seu próprio par aceitador, e o que é acrescentado durante a titulação não estaria interagindo. Para $[AO] = 5$ mM e $[Ahba] = 50$ μ M, a eficiência da transferência é $E = 0,42$ e, através da equação 2.20, obtém-se $r = 37,5$ Å que é a distância entre o doador e o aceitador. Esse cálculo é feito com a suposição de que existe uma única distância entre doador e aceitador; no entanto, no caso de doadores e aceitadores distribuídos na superfície de uma membrana lipídica, o que existe na realidade é uma distribuição de distâncias.

4.2.2 Transferência de energia - grupo aceitador: Etileno-diamino-dinitrofenil (Eddnp)

Depois de experimentos preliminares com o par Ahba/AO, demos continuidade aos estudos de transferência de energia selecionando outra molécula aceitadora: o Eddnp, puro e ligado a peptídeo (FRSSRQ-Eddnp). Começamos por mostrar a superposição espectral do par Ahba/FRSSRQ-Eddnp no gráfico da figura 4.8 a seguir:

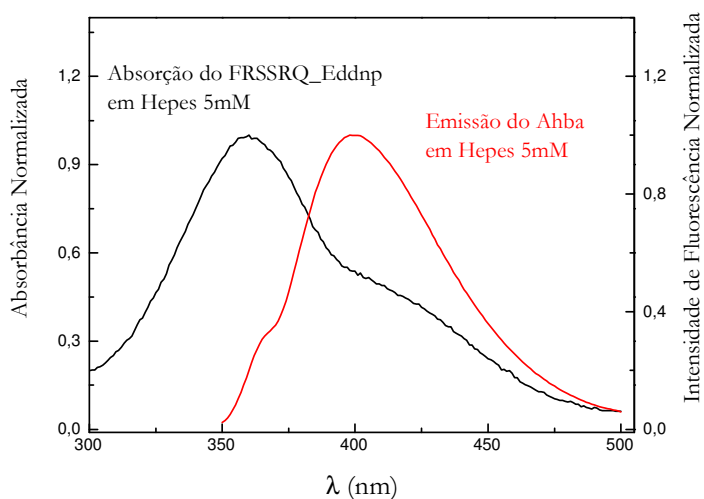


Figura 4.8: Superposição espectral do par Ahba/FRSSRQ-Eddnp.

Observa-se a superposição espectral, condição necessária para a transferência de energia por ressonância. O cálculo da integral de superposição resultou no valor de $2,3 \times 10^{-14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ e foi feito utilizando-se a equação 2.13. Supondo que a equação 2.14 possa ser usada para o caso em que o doador e o aceitador estão livres em solução,

teríamos um raio de Förster igual a 33,9 Å, onde $n = 1,334$ (medido experimentalmente), $\kappa^2 = 2/3$ e $\phi_D = 0,36$.

É importante notar que o comprimento de onda de excitação do doador, 328 nm, excita também o aceitador (o coeficiente de absorção molar (ϵ) do Eddnp em 328 nm é 5124 ± 209); no entanto, o Eddnp não é fluorescente e, portanto, somente a fluorescência do Ahba está sendo detectada. Todavia, parte do feixe incidente é absorvida (efeito de filtro interno), sem excitar o Ahba, prejudicando assim os experimentos de fluorescência estática.

Tal efeito, porém, não interfere no perfil de decaimento da fluorescência, o que nos permite utilizar os resultados de fluorescência resolvida no tempo para aplicar a teoria de FRET. Os gráficos da figura 4.9 a seguir mostram os valores de tempo de vida médio para o Ahba em diferentes micelas, tendo o Eddnp e o FRSSRQ-Eddnp como aceptadores:

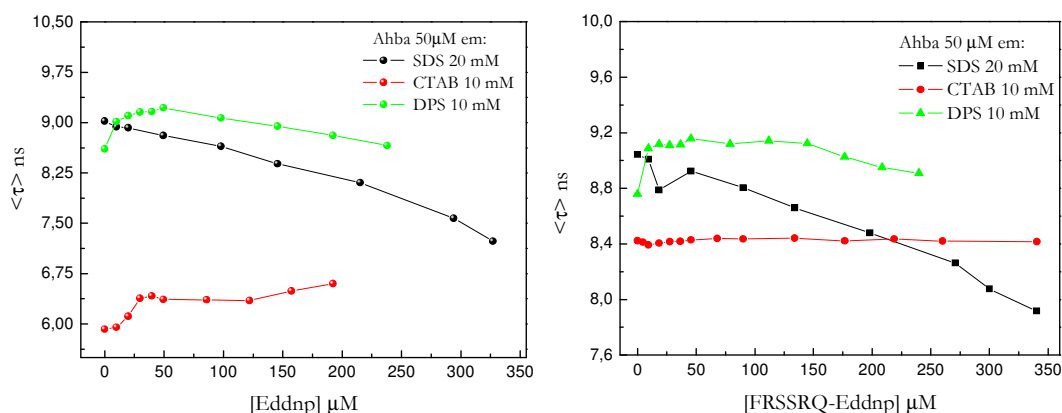


Figura 4.9: Tempo de vida médio do Ahba em diferentes micelas, em função da concentração de Eddnp (gráfico A) e FRSSRQ-Eddnp (gráfico B). Excitação em 328 nm; emissão em 400 nm.

Todos os decaimentos apresentaram três componentes de tempo de vida e o tempo médio foi obtido a partir da equação 2.7. No gráfico A, a princípio, observamos que há interação do Eddnp com todos os tipos de micela. O tempo de vida do Ahba diminuiu em presença de micelas de SDS, mas para micelas de CTAB e DPS, um comportamento inesperado é observado: o tempo de vida aumenta, sobretudo a baixas concentrações de supressor. Sendo o Eddnp neutro, seria o efeito hidrofóbico o

responsável pela interação com as micelas. Embora inesperados esses resultados sugerem que o Eddnp poderia alterar, de algum modo, a estrutura micelar, implicando em aumento no tempo de vida de fluorescência do Ahba. Ou ainda, o Eddnp estaria solubilizando as moléculas de Ahba, atingindo uma situação de equilíbrio dinâmico onde o fluoróforo alternaria sua permanência entre micelas e possíveis agregados de Eddnp.

Já para os resultados mostrados no gráfico B, considerando as diferentes cargas da superfície das micelas e sabendo que o FRSSRQ-Eddnp tem carga líquida positiva, a atração eletrostática promove o encontro entre aceitador e micelas, sendo o efeito hidrofóbico, de importância secundária; a atração eletrostática é maior entre o peptídeo e as micelas de SDS, justamente onde se observam alterações consideráveis no tempo de vida médio. Pode-se inferir que o aceitador encontra-se bastante próximo da superfície da micela e, portanto, próximo à sonda fluorescente. No caso das micelas de CTAB, a repulsão eletrostática manteria o aceitador a uma distância tal que não haveria transferência de energia. Para as micelas de DPS, pode estar ocorrendo repulsão eletrostática devido a efeitos provocados por um dipolo de superfície, já que o monômero de DPS tem cargas positiva e negativa alinhadas na direção radial da micela.

Com o objetivo de estudar as interações entre o Ahba e o Eddnp puro e ligado ao peptídeo em superfícies de membrana, foram conduzidos experimentos de fluorescência resolvida no tempo para o par doador/aceitador em presença de vesículas de DMPC. O gráfico na figura 4.10 a seguir mostra os resultados obtidos dos ajustes feitos aos decaimentos:

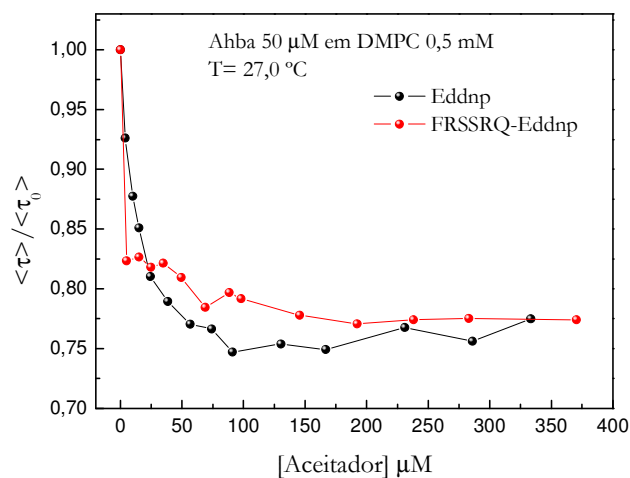


Figura 4.10: Gráfico da relação entre $\langle \tau \rangle$ e $\langle \tau_0 \rangle$ do Ahba em DMPC, em função da concentração de Eddnp e FRSSRQ-Eddnp.

Todas as medidas foram feitas em 27°C , garantindo que as vesículas estivessem na fase fluída. Aqui o tempo de vida médio diminui com o aumento da concentração de Eddnp e FRSSRQ-Eddnp, indicando que há transferência de energia. Calculamos ainda a eficiência da transferência; os resultados são mostrados a seguir:

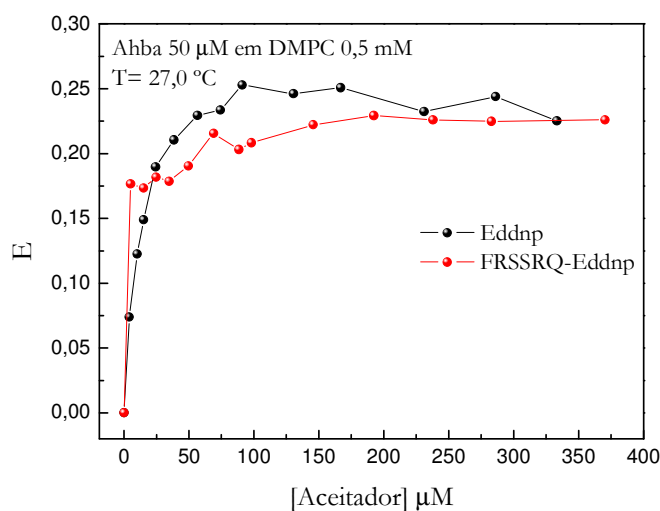


Figura 4.11: Gráfico da eficiência da transferência de energia entre o par Ahba/Eddnp, em presença de vesículas de DMPC.

Embora os fosfolípidios de DMPC sejam neutros eletricamente, a presença do par iônico fosfatidil (negativo)/colina (positivo) formando um dipolo de superfície não exclui a existência de potenciais elétricos na região próxima às cabeças polares. Os aceitadores Eddnp e FRSSRQ-Eddnp estão localizados na superfície da membrana lipídica, ou muito próximos a ela. Aqui o efeito causado pelo dipolo de superfície poderia atrair eletrostaticamente os grupos aceitadores, ou simplesmente podemos considerar que interações hidrofóbicas estariam promovendo a aproximação do par doador/aceitador na ampla superfície da bicamada. Considerando $R_0^6 = 1,53 \times 10^{-39}$ e $E \sim 0,21$, temos $r = 42,8$ Å como sendo a distância entre o doador e o aceitador na membrana lipídica. Esse é um cálculo aproximado, não levando em conta a distribuição espacial de doadores e aceitadores na membrana.

Dessa maneira, e para melhor analisar esses dados e obter valores de r mais reais, utilizamos o programa CONTIN, que gera uma distribuição de distâncias entre doador e aceitador. Os gráficos obtidos são mostrados a seguir:

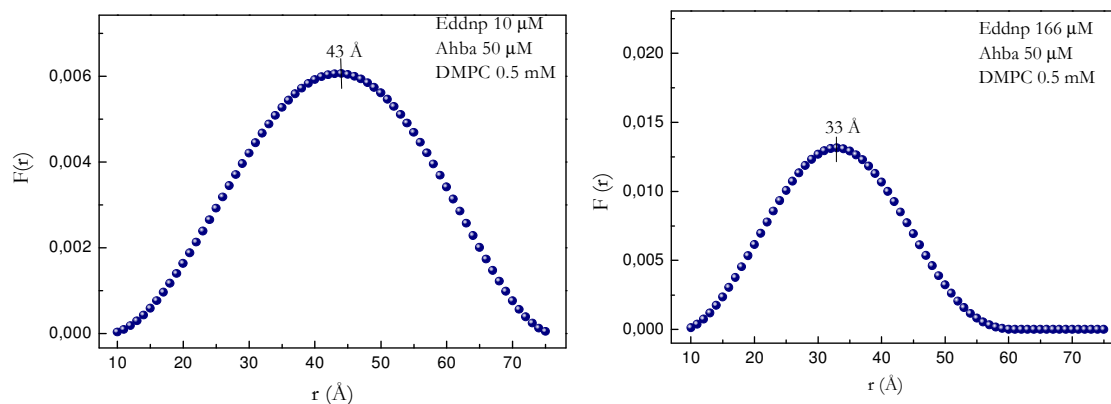


Figura 4.12: Gráficos da distribuição de distâncias entre o par Ahba/Eddnp, em presença de vesículas de DMPC a 27 °C.

Os resultados mostram que há uma distribuição de distâncias com máximo próximo de 44 Å para $[Eddnp] = 10 \mu\text{M}$ e 33 Å para $[Eddnp] = 166 \mu\text{M}$. Um aumento na concentração de Eddnp provoca uma diminuição na distância correspondente ao máximo da distribuição. A seguir os resultados para o par Ahba/FRSSRQ-Eddnp:

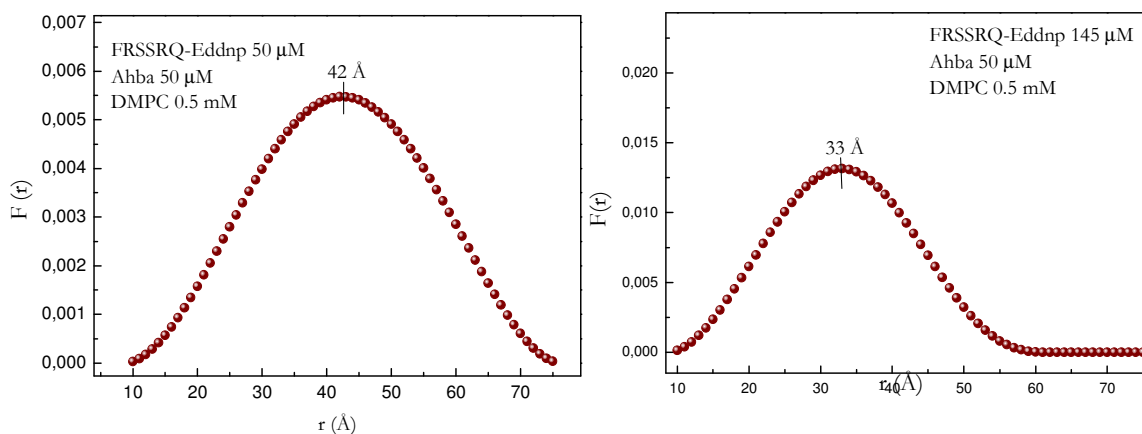


Figura 4.13: Gráficos das distribuições de distâncias entre o par Ahba/FRSSRQ-Eddnp em presença de vesículas de DMPC.

Também aqui se observa uma diminuição de aproximadamente 10 Å no valor do máximo da distribuição com o aumento da concentração do peptídeo. Como observado também nos gráficos da figura 4.12, as distribuições de distância apresentam um único pico, bastante largo, indicando grande dispersão de distâncias entre o par, mas dizendo pouco sobre sítios específicos de localização das moléculas na bicamada.

Como parâmetros de entrada no programa CONTIN, utilizamos os valores de tempos de vida e respectivos fatores pré-exponenciais (normalizados) do doador na ausência do aceitador; perfil do decaimento do doador na presença do aceitador; perfil da lâmpada (resposta do instrumento). Também é utilizado o raio de Förster e, à nossa escolha fica o intervalo de distâncias (por exemplo, de 5 a 50 Å) e o número de canais desejados entre a distância inicial e a final. Em geral, escolhe-se o número de canais de modo que a resolução do histograma seja de 1 Å. As últimas variáveis podem ser alteradas e escolhidas de modo a melhorar a qualidade do ajuste; no entanto deve-se ter o cuidado de escolhê-las de modo sensato; por exemplo, se um peptídeo contendo um par doador/aceitador tem comprimento máximo de 50 Å, a distância final não poderia ultrapassar este valor. No caso de uma membrana fosfolipídica e, considerando que uma das moléculas do par (doadora ou aceitadora) particiona também na fase aquosa, o intervalo de distâncias iria além da espessura da bicamada lipídica (uma bicamada de DMPC tem 34 Å de espessura⁶⁵. Como pode ser visto nos gráficos anteriores,

consideramos um intervalo de distâncias que vai de 10 Å até 80 Å, com 1 Å em cada canal.

Outros intervalos de distâncias similares a estes foram utilizados na tentativa de se obter ajustes de melhor qualidade para os resultados do par Ahba/Eddnp. O fato de que o Eddnp particiona na fase aquosa, bem como o peptídeo FRSSRQ-Eddnp, implica no uso de modelos diferentes que predigam a distribuição de distâncias para o caso de pares doador/aceitador que não estão 100% na fase lipídica da membrana, ou 100% na fase aquosa. Neste trabalho, não prosseguimos com esta análise, e optamos por continuar os estudos de FRET utilizando outro aceitador para o Ahba.

4.2.3. Transferência de energia - grupo aceitador: NBD ligado a fosfolipídios

Assim, com o propósito de evitar moléculas que particionam na fase aquosa nesses experimentos em presença de membranas lipídicas, foram estudados aceitadores ligados covalentemente a fosfolipídios, garantindo sua permanência na bicamada lipídica, podendo se localizar na superfície ou no interior da região hidrofóbica. Esse grupo aceitador foi o *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) ou NBD.

O NBD está ligado a diferentes fosfolipídios e em diferentes posições: NBD-PE, 6-NBD-PC e 12-NBD-PC, conforme discutido no capítulo 3 deste trabalho. A figura 4.14 a seguir mostra a superposição espectral do par Ahba/NBD-PE:

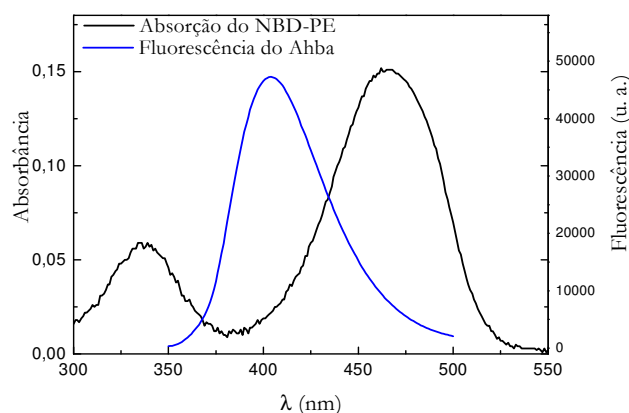


Figura 4.14: Superposição espectral entre o par doador/aceitador Ahba/NBD-PE.

O NBD apresenta o mesmo espectro de absorção, independente do lipídio ao qual está ligado. A partir dos espectros mostrados no gráfico da figura 4.14, calculamos a integral de superposição J utilizando a equação 2.13 e obtivemos $J = 1,053 \times 10^{-14}$. Neste cálculo, $F(\lambda)$ foi normalizada pela área e a unidade do comprimento de onda foi o centímetro, uma vez que o coeficiente de absorção molar é dado em $M^{-1}cm^{-1}$.

Embora a distribuição das moléculas doadoras e aceitadoras na bicamada da membrana lipídica resulte em uma orientação ‘preferencial’ dos momentos de dipolo de tais moléculas, consideramos o valor de κ^2 como sendo $2/3$ (valor utilizado para pares doador/aceitador livres em solução, onde os momentos de dipolo podem assumir qualquer orientação) no cálculo do valor de R_0 (equação 2.14). O índice de refração foi medido para uma solução DMPC 1 mM, temperatura ambiente, resultando no valor de 1,331. O rendimento quântico do Ahba (doador) é 0,36. Desse modo, chega-se ao valor de 34,62 Å para o *raio de Förster* do par Ahba/NBD, bastante próximo ao valor de R_0 obtido para o par Ahba/AO também em membranas lipídicas: $R_0 = 35,5$ Å.

A taxa de transferência de energia depende da orientação relativa entre o dipolo de emissão do doador e o dipolo de absorção do aceitador. Felizmente, para estudos de distribuição de distâncias, o efeito do valor de κ^2 é relativamente pequeno, fazendo com que o uso do valor médio dinâmico $2/3$ seja bastante razoável⁶⁶⁻⁶⁸. O único mecanismo através do qual o valor de κ^2 poderia afetar a distribuição de distâncias seria se a orientação média do par doador/aceitador fosse, de algum modo, correlacionada com a distância entre este par^{66,67}. Isto, de modo geral, é observado em proteínas contendo ambas as moléculas, doador e aceitador; dependendo da conformação assumida, o ângulo entre os dipolos seria diferente, bem como a distância entre o par.

Foram conduzidos experimentos de fluorescência resolvida no tempo para o par Ahba/NBD-fosfolipídios e os resultados obtidos são mostrados nos gráficos da figura 4.15: tempos de vida de fluorescência do doador em ausência e presença do aceitador, nas temperaturas de 16,5 °C e 32,5 °C que estão, respectivamente, abaixo e acima da temperatura de transição de fase do DMPC (~ 22 °C)⁶⁴:

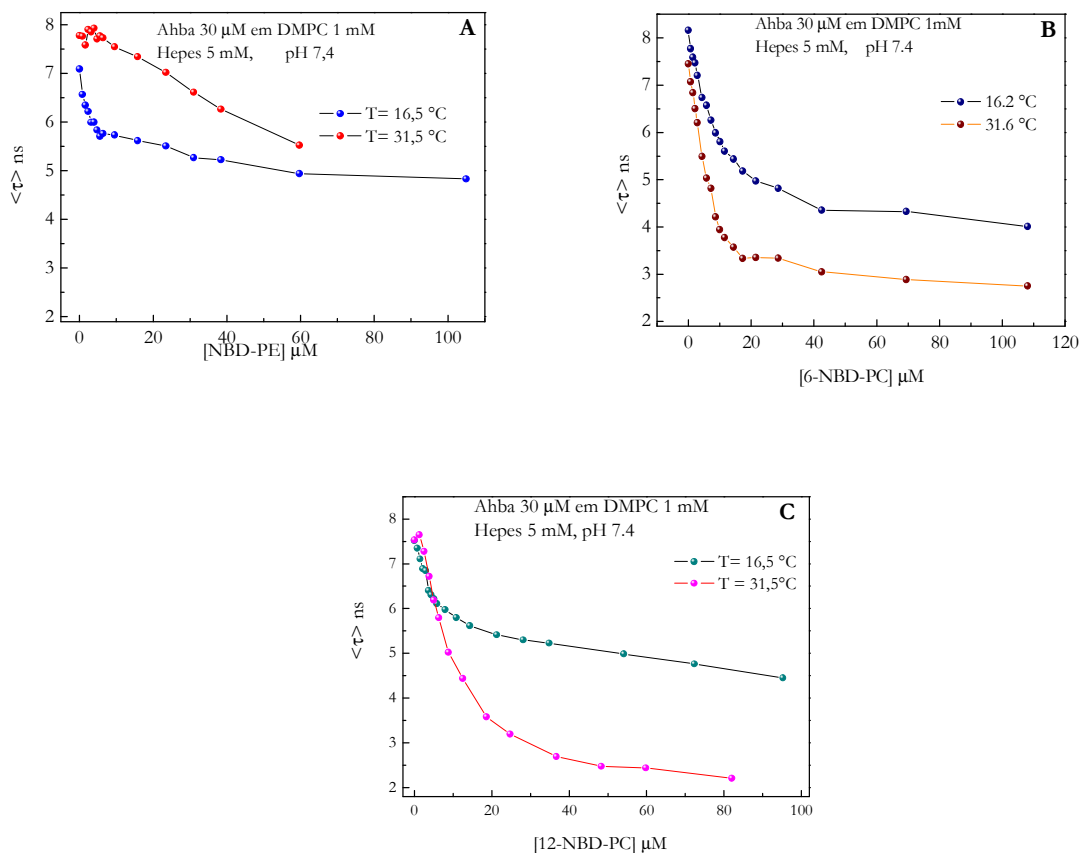


Figura 4.15: Gráficos do tempo de vida médio do Ahba em função da concentração dos aceitadores (A) NBD-PE, (B) 6-NBD-PC e (C) 12-NBD-PC. A excitação foi sempre em 330 nm e a emissão em 400 nm.

De maneira geral, os valores de tempo médio diminuem à medida que a concentração do aceitador aumenta. Ambos, doador e aceitador, estão na bicamada lipídica. O Ahba, conforme já mostrado anteriormente⁵², está localizado na superfície da bicamada. No caso do NBD-PE (gráfico A) na temperatura de 31,5 °C o comportamento da curva é diferente daquele observado nos demais experimentos. O tempo de vida do Ahba diminui mais lentamente (com o aumento da concentração de aceitador) em relação aos outros aceitadores. A interpretação pode ser feita em termos da fluidez da bicamada, assumindo que esta varia com o tipo de NBD-fosfolípido adicionado ao sistema.

Mudanças na fluidez da bicamada lipídica estão intimamente relacionadas com as cadeias de ácidos graxos dos lipídios que as compõem. Neste caso, a membrana é formada por DMPC, o qual contém duas cadeias de ácido mirístico (14 carbonos),

enquanto que o NBD-PE tem duas cadeias de ácido palmítico (16 carbonos) e o 6-NBD-PC e o 12-NBD-PC têm somente uma cadeia de ácido palmítico inteira e o grupo NBD ligado na outra cadeia. Tanto o ácido mirístico quanto o palmítico são saturados. É possível então que o NBD-PE afete pouco a rigidez da membrana por possuir duas cadeias inteiras de ácidos graxos, com pequena interferência no empacotamento das caudas lipídicas; dessa maneira, os resultados observados indicam um aumento da fluidez da bicamada devido à inserção de 6-NBD-PC e 12-NBD-PC, significando que a presença de uma molécula em meio às caudas hidrofóbicas de uma bicamada lipídica, ou mesmo muito próxima da interface lipídio-água aumentaria a fluidez da bicamada. O aumento na fluidez da bicamada possibilitaria maior aproximação entre o par, aumentando a transferência de energia e diminuindo o tempo de vida do doador.

No gráfico B da figura 4.15, observa-se que a partir de 30 μM de 6-NBD-PC o tempo de vida médio não mais diminui, podendo indicar que cada doador ‘encontrou’ seu par aceitador e o aumento da quantidade de aceitador no sistema já não causaria mudanças no tempo de vida médio do doador. O mesmo comportamento pode ser observado nos resultados mostrados no gráfico C, ainda que de maneira mais sutil.

Com os valores de tempo de vida médio, utilizamos a equação $E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d}$ para obter a eficiência (E) da transferência de energia entre os pares (τ_{da} e τ_d são, respectivamente, o tempo de vida médio do doador na presença e ausência do aceitador). No gráfico da figura 4.16 a seguir mostramos o conjunto de valores obtidos:

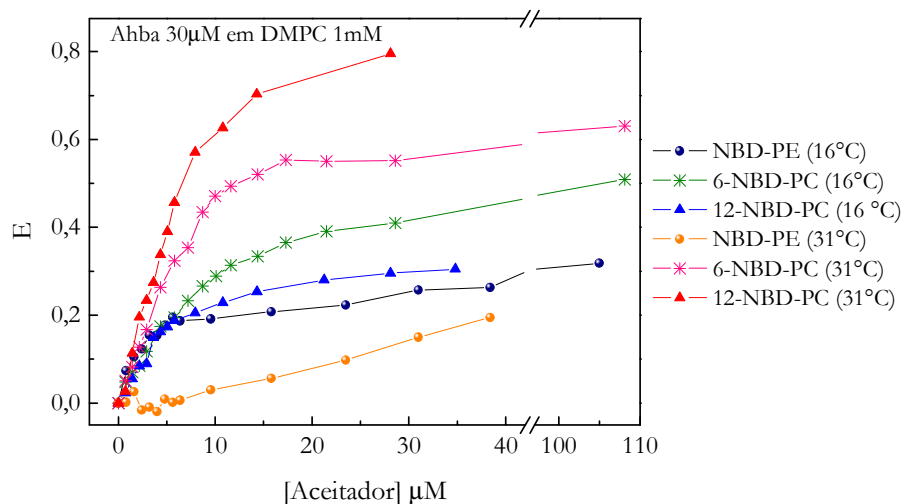


Figura 4.16: Gráfico da eficiência da transferência de energia, em função da concentração de NBD-fosfolipídios, na fase gel e na fase fluída da membrana.

Observa-se o diferente comportamento das curvas de eficiência em função da concentração de aceitador. Para os experimentos realizados em temperatura abaixo da transição de fase do DMPC (ou seja, bicamada lipídica na fase gel) a variação da eficiência é bastante parecida no intervalo de concentrações que vai de zero a cerca de $9 \mu\text{M}$ e, com exceção do NBD-PE, o mesmo pode ser dito dos experimentos realizados a $31,5 \text{ }^\circ\text{C}$. A maior fluidez da bicamada lipídica possibilita maior aproximação entre o par e a eficiência da transferência é maior. Conforme discutido anteriormente, a fluidez da bicamada é maior em presença de 6-NBD-PC e 12-NBD-PC.

A seguir, os gráficos da figura 4.17 mostram a distância r entre o par, obtida a partir da equação 2.20:

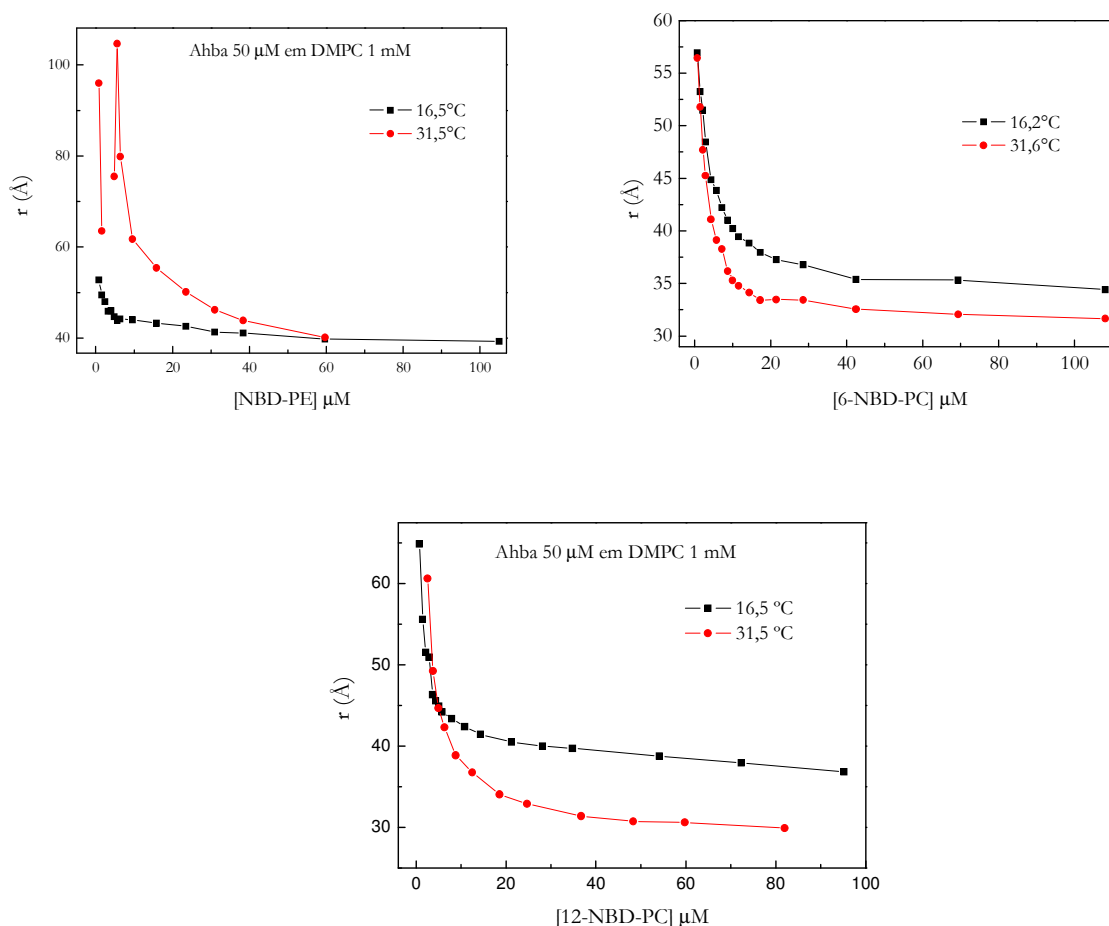


Figura 4.17: Gráficos das distâncias entre o doador Ahba e o aceitador NBD ligado a diferentes fosfolípidios.

Com exceção do NBD-PE a $31,5^\circ\text{C}$, as distâncias estão no intervalo que vai de 30 Å a 65 Å. A distância mais próxima entre o Ahba e o aceitador (~ 27 Å) foi observada na concentração de $28 \mu\text{M}$ de 12-NBD-PC a $31,5^\circ\text{C}$. Curiosamente, neste mesmo gráfico observa-se a maior separação entre o par ($64,9$ Å a $16,5^\circ\text{C}$ e $63,0$ Å a $31,5^\circ\text{C}$) no início do experimento ($0,73 \mu\text{M}$ de aceitador), ou seja, o par que mais dista entre si no início do experimento é o mesmo que mais se aproxima ao final da titulação; isso pode ser justificado por uma ‘mobilidade’ maior das moléculas doadoras na bicamada lipídica, indicando que o 12-NBD-PC altera localmente a estrutura da bicamada, permitindo maior movimentação da sonda fluorescente. É possível que o NBD, ligado ao carbono 12 do ácido palmítico, ‘abra espaços’ entre as cadeias hidrocarbônicas vizinhas, possibilitando

maior aproximação do Ahba. Na fase gel, o 12-NBD-PC atuaria como uma estrutura que enrijece ainda mais a bicamada localmente. É importante considerar que o Ahba, na fase líquido-cristalina, penetra mais na bicamada, como mostraram experimentos onde a fluorescência estática foi observada em função do pH do meio; em presença de vesículas de DMPC⁵² o Ahba protonou mais facilmente na fase gel ($pK = 3.26 \pm 0.05$) do que na fase líquido-cristalina ($pK = 2.98 \pm 0.06$).

No entanto, apenas considerando a estrutura química do 12-NBD-PC, não poderíamos afirmar que o grupo NBD esteja realmente inserido no interior da bicamada lipídica, exatamente na região das cadeias alifáticas. Experimentos de supressão colisional da fluorescência do NBD pelo Co^{2+} em vesículas de DOPC⁶⁹ mostraram que o Co^{2+} não tinha acesso ao NBD do 12-NBD-PC da mesma maneira que tinha ao NBD ligado ao colesterol; este último, certamente localizado na região apolar da bicamada lipídica. A interpretação para este resultado foi de que a cadeia de ácido graxo do 12-NBD-PC que continha o grupo NBD covalentemente ligado a si, estaria se dobrando, fazendo com que o grupo NBD fosse levado próximo à interface lipídio-água. Dessa maneira, o 12-NBD-PC estaria mais próximo da superfície da bicamada do que propriamente em seu interior.

Observando novamente o gráfico da eficiência da transferência E (figura 4.16), podemos ver que E para o 12-NBD-PC na fase gel é menor e aumenta mais lentamente com a concentração de aceitador em relação aos resultados obtidos para o 6-NBD-PC em fase gel e fase fluida. Tal resultado poderia significar que na fase gel a cadeia alifática à qual se liga o NBD no 12-NBD-PC teria mais dificuldade em se dobrar, fazendo com que o grupo NBD permanecesse de fato, inserido no interior da bicamada lipídica.

Voltemos agora aos valores de distância obtidos através da equação 2.20 e mostrados nos gráficos da figura 4.17. Esses valores de r não são precisos do ponto de vista quantitativo, embora reflitam razoavelmente bem o comportamento do doador e do aceitador e a distância entre ambos na membrana lipídica. O modelo do qual resulta a equação 2.20 considera que existe uma única distância entre doador e aceitador o que não é verdade neste caso, onde os pares estão distribuídos em uma bicamada lipídica.

Sabemos que o Ahba (doador) está localizado na superfície da bicamada, assim como o grupo NBD no NBD-PE está na superfície da bicamada e o 6-NBD-PC tem o NBD inserido na região das caudas hidrofóbicas, na altura do carbono 6 da cadeia de ácido graxo. O 12-NBD-PC tem o NBD na ponta da cauda hidrofóbica, na metade da

bicamada lipídica; consideremos ainda que essa cadeia alifática contendo o NBD se dobra, fazendo com que grupo aceitador fique próximo à interface lipídio-água, principalmente na fase fluida da bicamada. A figura 4.18 a seguir ilustra as possíveis localizações do par na bicamada lipídica:

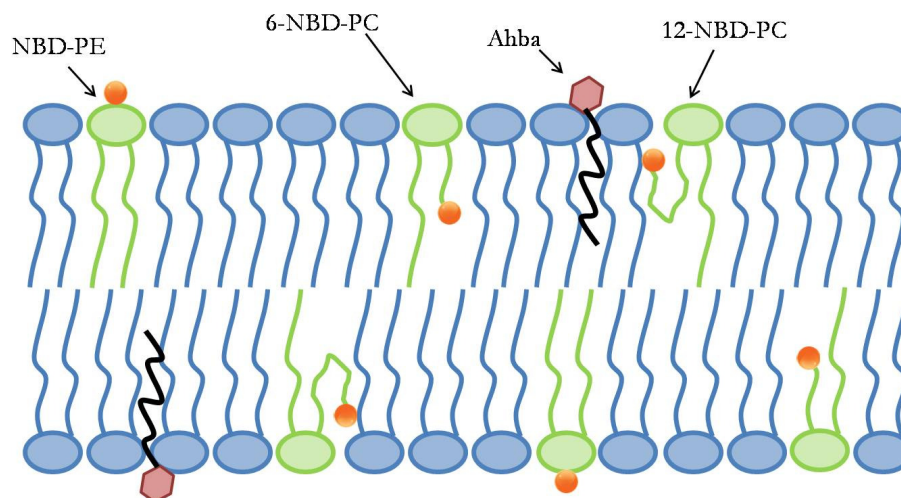


Figura 4.18: Esquema ilustrando o posicionamento do doador Ahba e aceitadores NBD na bicamada lipídica.

Dessa maneira, se faz necessária a utilização de recursos alternativos, capazes de fornecer valores de r considerando a distribuição de distâncias entre doador e aceitador.

4.2.4 Distribuição de distâncias: Ahba –NBD/fosfolipídio em vesículas

O programa CONTIN permite recuperar distribuições de distâncias entre doador e aceitador a partir dos dados de decaimento da fluorescência obtidos experimentalmente. Detalhes da estrutura do programa foram descritos brevemente no capítulo 2 desta tese.

Considerando que a espessura de uma bicamada lipídica de DMPC é de aproximadamente 34 \AA ⁶⁴ e que, para a concentração de doador igual a $30 \mu\text{M}$ (concentração utilizada em nossos experimentos) o ‘raio de ação’ do Ahba está próximo dos 27 \AA , a distância máxima entre uma molécula doadora e outra aceitadora seria de 43 \AA (para o caso do NBD-PE) (ver esquema mostrado na figura 4.19 a seguir), utilizamos um intervalo de distâncias entre 5 \AA e 60 \AA como um dos parâmetros de entrada no CONTIN.

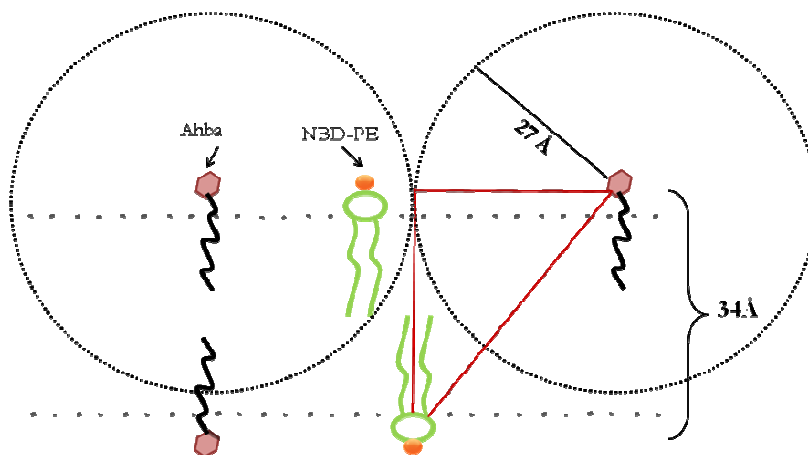


Figura 4.19: Esquema ilustrando máxima distância possível entre um par doador/aceitador.

O CONTIN gera então uma função de distribuição de distâncias dentro do intervalo de distâncias pré-estabelecido. Os gráficos da figura 4.20 a seguir mostram os resultados obtidos para 30 μM de doador em 1 mM de DMPC, para diferentes concentrações de aceitador, em diferentes temperaturas; dessa maneira, garantimos um experimento em fase gel (16,5 $^{\circ}\text{C}$) e outro em fase líquido-cristalina (31,5 $^{\circ}\text{C}$).

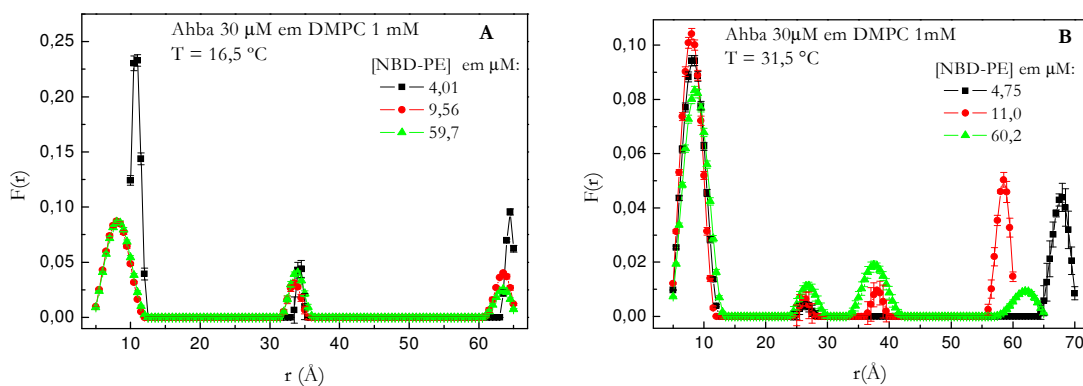


Figura 4.20: Gráficos da distribuição de distâncias entre Ahba e NBD-PE em vesículas fosfolipídicas a 16,5 $^{\circ}\text{C}$ (A) e 31,5 $^{\circ}\text{C}$ (B).

Observa-se um alargamento dos picos de distâncias na fase líquido-cristalina, indicando que a maior mobilidade da membrana lipídica permite maior número de distâncias entre o par. Os picos de distâncias no início e no fim do intervalo estão

invariavelmente presentes, qualquer que seja o intervalo de distâncias pré-estabelecido. Assim, dedicamos maior atenção ao pico central no gráfico A e os dois picos centrais no gráfico B.

Do gráfico A, observa-se um alargamento progressivo, embora pequeno, dos picos à medida que se aumenta a concentração de aceitador. Com relação ao valor central do pico, não há mudança significativa, pois nessas concentrações de aceitador o próprio decaimento da fluorescência do doador não sofreu grandes alterações, como se observa no gráfico da figura 4.21 a seguir:

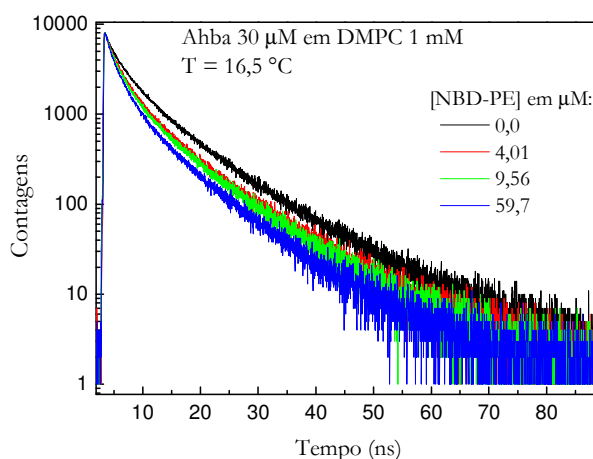


Figura 4.21: Gráfico do decaimento da fluorescência do Ahba em ausência e presença de NBD-PE, na fase gel do DMPC.

No gráfico B (figura 4.20), onde a vesícula está na fase líquido-cristalina, observa-se o aparecimento de um segundo pico, nas concentrações de 11,0 μM e 60,2 μM . Neste caso, o decaimento da fluorescência apresenta diferença considerável quando se muda a concentração do aceitador, como mostra o gráfico da figura 4.22 a seguir:

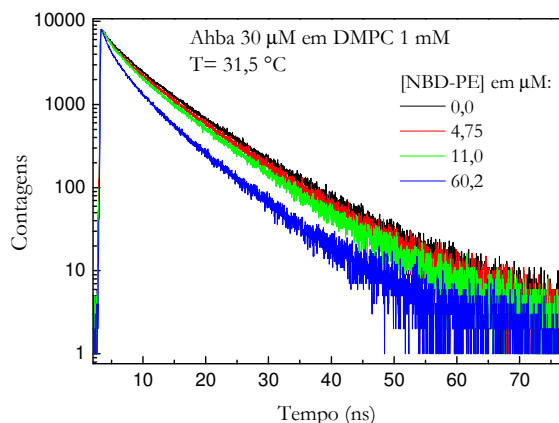


Figura 4.22: Gráfico do decaimento da fluorescência do Ahba em ausência e presença de NBD-PE, na fase líquido-cristalina do DMPC.

A presença de dois picos na região central (entre 20 e 40 Å) era esperada também no experimento a 16,5 °C; o pico referente ao menor valor de r estaria relacionado à distância entre pares localizados na mesma superfície da bicamada, enquanto que o pico das distâncias maiores seria atribuído à configuração doador em uma superfície da bicamada e aceitador na outra. Porém há também a possibilidade de que os dois picos representem diferentes localizações para vizinhos dentro da mesma bicamada.

Na figura 4.23 a seguir são mostrados os resultados obtidos para o Ahba em presença de 6-NBD-PC em diferentes concentrações, em temperaturas abaixo (A) e acima (B) da transição de fase:

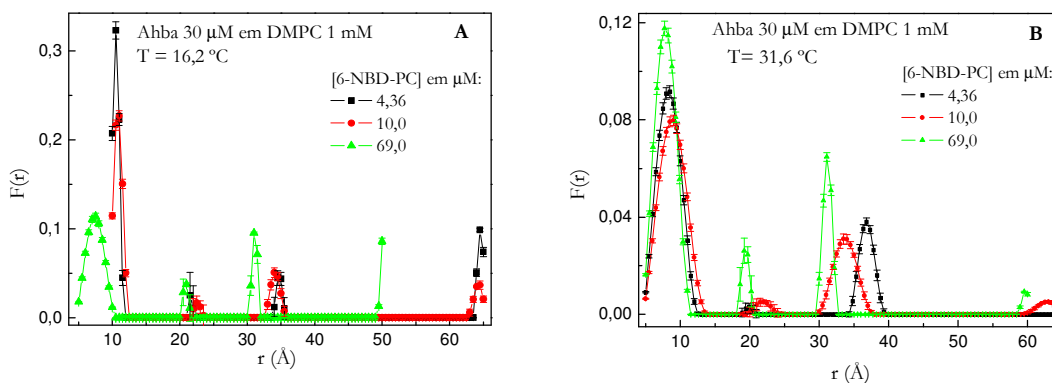


Figura 4.23: Gráficos da distribuição de distâncias entre Ahba e 6-NBD-PC em vesículas fosfolipídicas a 16,2 °C (A) e 31,6 °C (B).

A seguir os decaimentos da fluorescência do Ahba em presença de 6-NBD-PC, abaixo (A) e acima (B) da transição de fase do DMPC:

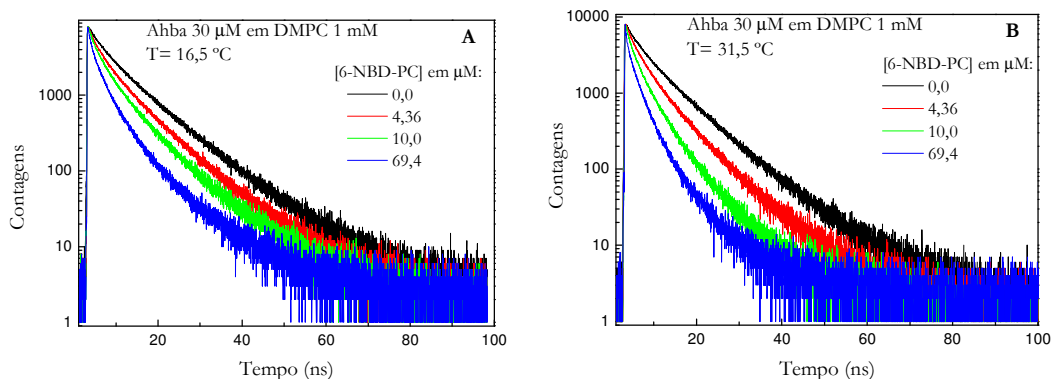


Figura 4.24: Gráficos do decaimento da fluorescência do Ahba em presença de 6-NBD-PC em 1 mM de DMPC, abaixo (A) e acima (B) da temperatura de transição de fase.

Observa-se que na fase fluida a eficiência da transferência de energia é maior, implicando num decaimento mais rápido da fluorescência do Ahba e coincidindo também com os picos centrados em valores ligeiramente menores de r (para 69,4 μM de aceitador) no gráfico B da figura 4.23 é observado ainda o alargamento desses picos de distâncias, em relação aos picos do gráfico A, onde a bicamada está na fase gel.

Finalmente os resultados obtidos para o par Ahba/12-NBD-PC. Nos gráficos da figura 4.25 a seguir, são mostradas as distribuições de distâncias e observa-se que na fase fluida (gráfico B) os valores de r onde estão centrados os picos são menores que aqueles do gráfico A:

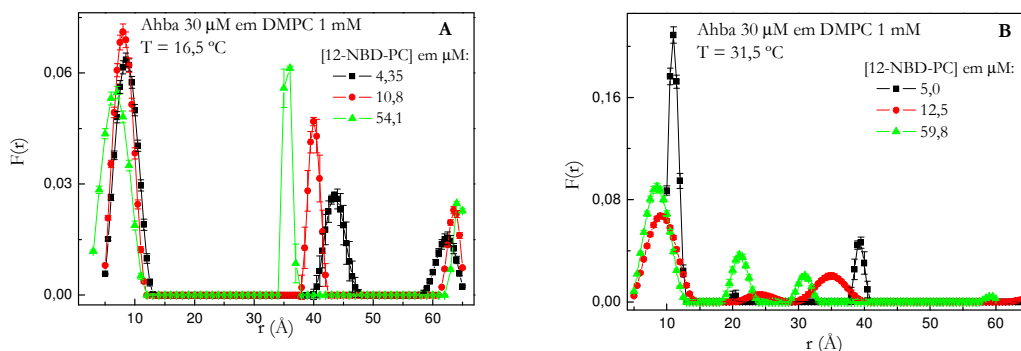


Figura 4.25: Gráficos da distribuição de distâncias para o par Ahba/12-NBD-PC em DMPC na fase gel (A) e líquido-cristalina (B).

A seguir os decaimentos da fluorescência do Ahba em presença de 12-NBD-PC, em diferentes temperaturas e concentrações:

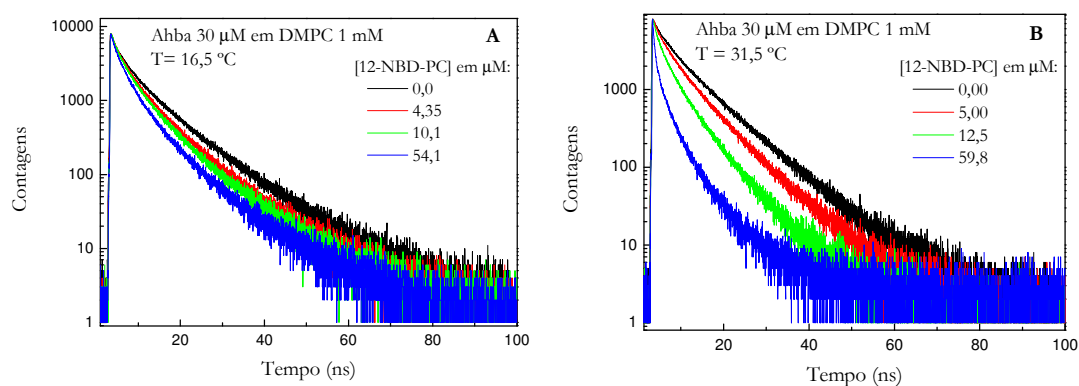


Figura 4.26: Gráficos do decaimento da fluorescência do Ahba em presença de 12-NBD-PC em 1 mM de DMPC, abaixo (A) e acima (B) da temperatura de transição de fase.

Do conjunto de resultados gerados pelo CONTIN para os diferentes aceitadores, invariavelmente a distribuição de distâncias apresenta alargamentos nos picos quando na fase fluida da membrana lipídica, mostrando que, em relação a um mesmo aceitador, há diferença entre a distância intermolecular na fase gel e na fase líquido - cristalina.

Com exceção dos resultados do NBD-PE, verifica-se que os valores de distância correspondentes aos picos da região central diminuem com o aumento da concentração

de um mesmo aceitador, para um mesmo valor de temperatura; tal efeito é nitidamente observado nos picos da direita (valores maiores de r) nos gráficos onde aparecem dois picos de distâncias.

Os valores das distâncias dos máximos dos picos centrais também são menores na fase fluida (devido à maior mobilidade da membrana), com exceção do 6-NBD-PC, onde esses valores praticamente não mudam.

No caso do 12-NBD-PC, conforme discutido anteriormente, o grupo NBD estaria próximo à interface lipídio-água, sobretudo na fase fluida da membrana. Teríamos então menores valores de distâncias entre Ahba e NBD. De fato, se observa um pico centrado em 20 Å e outro em 30 Å, para 59,8 μM de 12-NBD-PC no gráfico B da figura 4.25; esse pico centrado em 30 Å estaria relacionado àqueles grupos NBD localizados na outra face da bicamada. No entanto, o gráfico A, referente à membrana na fase gel, apresenta um único pico de distâncias para cada valor de concentração de aceitador, centrados em 44 Å, 40 Å e 36 Å, respectivamente da menor para a maior concentração de 12-NBD-PC. Se a suposição feita anteriormente de que na fase gel a cadeia de ácido graxo contendo o NBD não se dobra e permanece no interior apolar da bicamada lipídica estivesse correta, então observaríamos uma população de NBD à, pelo menos, uma distância mínima de 17 Å (metade da espessura da bicamada) do Ahba. Nenhum pico de distâncias está centrado em valores próximos a este, sugerindo que ainda na fase gel da membrana o NBD do 12-NBD-PC continua mais próximo da superfície da bicamada do que propriamente em seu interior. A tabela 4.2 a seguir resume os valores de distâncias dos máximos de cada pico encontrado nas distribuições:

Aceitador/Temperatura	distância curta	distância intermediária	distância longa
NBD PE 16,5 ^o C	< 10 Å	33 Å	62 Å
NBD PE 31,5 ^o C	< 10 Å	28 - 40 Å	60-68 Å
6- NBD PC 16,5 ^o C	< 10 Å	21 Å e 30-35 Å	> 60Å
6-NBD PC 31,5 ^o C	< 10 Å	20 Å e 30-38 Å	> 60Å
12-NBD PC 16,5 ^o C	< 10 Å	35 – 45 Å	> 60Å
12-NBD PC 31,5 ^o C	< 10 Å	20 – 35 Å	> 40 Å

Tabela 4.2: Valores de distâncias dos máximos de cada pico, para cada aceitador, em diferentes temperaturas.

Apesar do NBD-PE conter o grupo aceitador na região da cabeça polar, está mais afastado do fluoróforo Ahba, em relação ao aceitador 6-NBD PC. O resultado reflete localização do doador mais próxima das cadeias hidrocarbônicas que da interface com o meio aquoso.

4.3 Espectroscopia de correlação de fluorescência, microscopia de fluorescência e excitação multi-fótons

Dentro da proposta de utilização de técnicas de espectroscopia de fluorescência para caracterizar e monitorar moléculas, macromoléculas e sistemas auto-organizados de interesse biológico, foram realizadas medidas em laboratório de técnicas avançadas em espectroscopia e microscopia de fluorescência: o Laboratório de Bioespectroscopia do Departamento de Física da Università Degli Studi di Milano-Bicocca.

Foram obtidas curvas de correlação de fluorescência do fluoróforo Laurdan em etanol e em presença de sistemas micelares e vesiculares (LUV e GUV) e também da Rodamina 6 G em etanol e de micro esferas fluorescentes em solução tampão. Foram obtidos espectros de excitação a dois fótons do Ahba e Rodamina 6G através de imagens de microscopia de fluorescência.

Foram realizados experimentos básicos, com compostos já bastante conhecidos e utilizados nesta técnica: Rodamina 6G em etanol e micro esferas fluorescentes [FluoSpheres carboxylate-modified microspheres, yellowgreen fluorescent] utilizadas para calibração do sistema. No caso da Rodamina 6G, seu coeficiente de difusão em etanol é conhecido e bem determinado⁷⁰: $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$; é utilizado para calibrar o sistema, ou seja, para se obter a dimensão do volume de excitação (especificamente o diâmetro do feixe no volume focal: ω_0). Daí, conhecendo-se o valor de ω_0 para a configuração que está sendo utilizada, é possível obter o coeficiente de difusão e/ou a concentração de qualquer outra molécula, fazendo-se uso da equação A.13.

Conforme discutido anteriormente, a excitação foi sempre a dois fótons, o que permite obter um menor volume focal e melhor relação sinal/ruído. A Rodamina 6G apresenta boa absorção quando excitada a dois fótons, como se observa no gráfico da figura 4.27 a seguir:

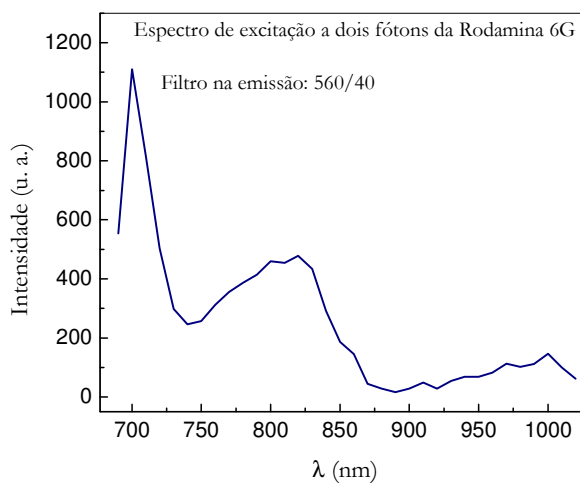


Figura 4.27: Gráfico do espectro de excitação a dois fótons da Rodamina 6G.

Esse espectro foi obtido através de microscopia de fluorescência, onde a excitação foi feita por um laser de Titânio/Safira (Mai Tai HP - Spectra Physics) e a detecção usou fototubos acoplados a um microscópio Olympus BX51. Esse resultado está em ótimo acordo com a literatura⁷¹.

Na figura 4.28 a seguir mostramos um gráfico com a curva de correlação da Rodamina 6G em etanol, na concentração de 10 nM e as respectivas flutuações na intensidade de fluorescência, observadas em dois canais:

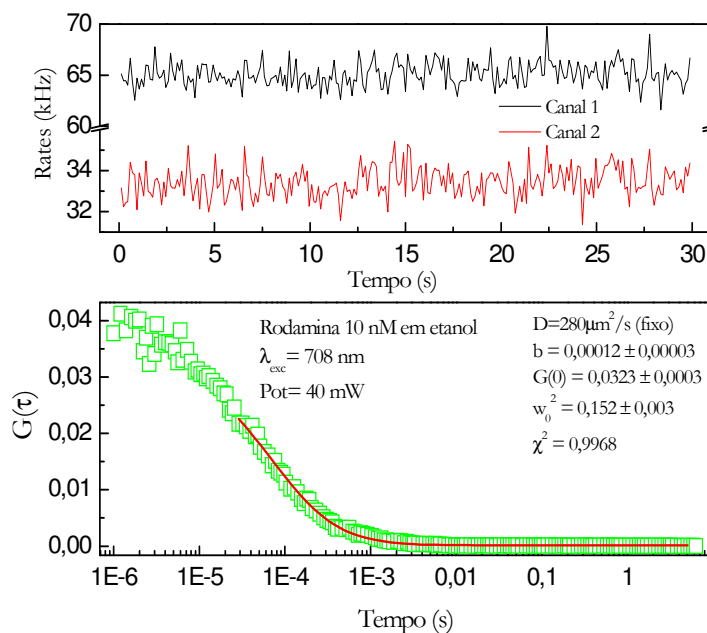


Figura 4.28: Gráfico da curva de correlação da Rodamina 6G em etanol e respectiva flutuação na intensidade de fluorescência.

Da curva ajustada, obtivemos $\omega_0^2 = 0,152 \pm 0,003$ necessário para obtenção do coeficiente de difusão de outras moléculas (em experimentos realizados no mesmo dia). É importante notar que ao longo do experimento, medidas com a Rodamina foram refeitas com a finalidade de controlar o valor de ω_0 . Em geral o sistema se mantinha bastante estável após ser alinhado com a devida precisão. Como a parte inicial da curva corresponde aos efeitos causados pelas transições da molécula para seu estado excitado tripleto, esta não foi considerada em nossas análises.

O gráfico da figura 4.29 a seguir mostra a curva de correlação para uma amostra de micro esferas fluorescentes livres em solução:

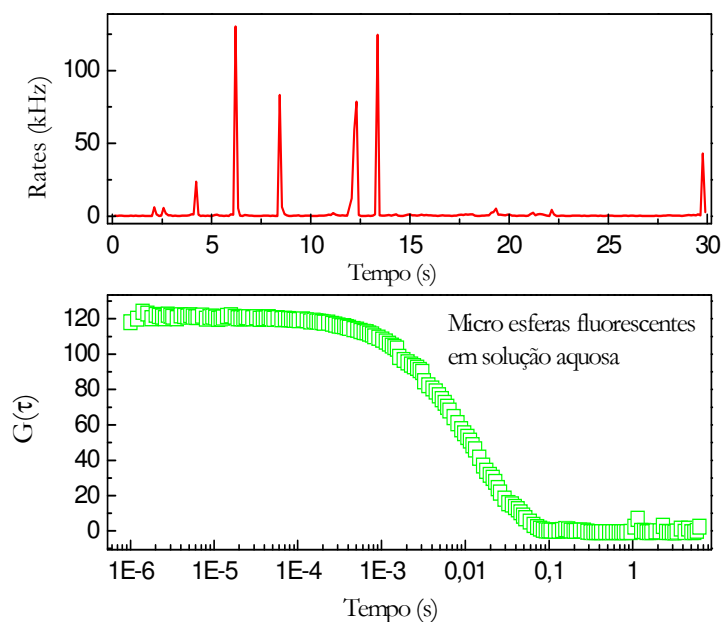


Figura 4.29: Gráfico da curva de correlação de fluorescência de esferas fluorescentes bastante diluídas em solução.

Nessa curva de correlação observa-se somente a difusão da molécula, não estando presentes os efeitos produzidos por transições envolvendo o estado tripleto, como ocorre com a Rodamina e também com o Laurdan. Observando com cuidado as flutuações na fluorescência, percebe-se que, a cada pico no sinal de fluorescência corresponde uma molécula de tamanho diferente passando pelo volume de excitação, dificultando a medida de um coeficiente de difusão verdadeiro para as microsferas.

Com o objetivo de realizar medidas de FCS com o Ahba, começamos por obter seu espectro de excitação a dois fótons, pois até então não havíamos realizado estudos de excitação não linear com esta molécula. Preparamos um “filme” de Ahba (deixando evaporar em uma lâmina uma gota de Ahba em etanol) e colocamos sob observação em um microscópio. Obtivemos uma imagem para cada comprimento de onda de excitação. Então, através do programa de aquisição de imagens (Fluoview 4.0), selecionamos uma região de interesse e o próprio programa forneceu a ‘intensidade’ total dessa região, para cada comprimento de onda. A figura 4.30 a seguir mostra o resultado obtido e também a região por nós escolhida:

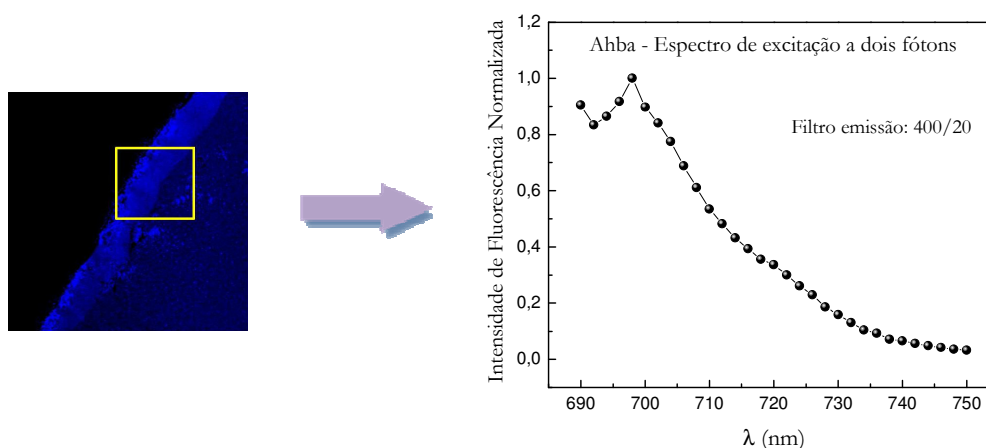


Figura 4.30: Imagem de filme de Ahba e a região selecionada (esquerda) e gráfico do espectro de excitação a dois fótons do Ahba (direita).

Os espectros obtidos foram os mesmos, independente da região escolhida. Como a potência do feixe laser muda para cada comprimento de onda, um medidor de potência foi colocado no caminho do feixe e, com um filtro, a potência foi controlada, de modo que o feixe incidente sobre a amostra apresentasse sempre a mesma potência. Nesse mesmo experimento, testamos a resistência do Ahba à luz e observamos que após 40 minutos a intensidade emitida era exatamente a mesma do início do experimento, o que nos permite concluir que a sonda é bastante fotoestável para este tipo de estudo, diferentemente da Rodamina que fotodegradou antes, com potências bem menores do feixe laser.

Do gráfico, vemos que o máximo de absorção para o Ahba está em torno de 695 nm. No entanto, nos experimentos de FCS utilizamos como laser de excitação o modelo Tsunami da Spectra Physics e o comprimento de onda mínimo atingido (manualmente) foi de 708 nm. Abaixo disso não foi possível trabalhar. O objetivo inicial era fazer medidas com o Ahba em solução (mesmo estando agregado) e em presença de sistemas de membrana modelo. No entanto, não foi possível observar sinal fluorescente do Ahba nos experimentos de FCS, mesmo elevando ao máximo a potência do feixe laser e aumentando consideravelmente a concentração da amostra. Vários filtros foram testados na emissão fluorescente, mas nenhum sinal de fluorescência foi observado.

Do espectro de excitação do Ahba, observa-se que sua absorção em 708 nm é baixa quando comparada com o máximo em 695 nm. Então, nosso próximo passo foi

utilizar nas medidas de FCS o laser Mai Tai HP da Spectra Physics, o mesmo utilizado para a obtenção das imagens; neste caso o comprimento de onda de 695 nm seria facilmente atingido. Assim, o feixe laser proveniente do Mai Tai HP foi levado de uma mesa óptica à outra através de diversos espelhos e foi direcionado para o microscópio onde eram feitas as medidas de FCS.

Fizemos então experimentos com o Ahba em presença de micelas de SDS e vesículas (LUV) de DMPC. Foi observado algum sinal de fluorescência e flutuações em torno de um valor médio, porém não era possível gerar uma curva de autocorrelação, ou seja, as moléculas não correlacionavam.

Realizamos ainda alguns experimentos com vesículas gigantes (GUV) de POPC, tendo o Ahba como sonda fluorescente. As vesículas gigantes permaneciam bastante imóveis sobre a lâmina e, através de microscopia ótica comum, uma determinada vesícula era selecionada para observação. Nesse momento, quando o feixe laser incidia sobre a amostra, foi possível observar um ponto fluorescente azulado proveniente da vesícula, correspondente à fluorescência do Ahba vista a olho nu. No entanto, continuamos a não observar nenhum sinal de fluorescência colocando-se o filtro 400/20. Experimentos com fluorescência estática do Ahba em vesículas resultaram em espectros com máximo de emissão entre 400 e 406 nm. Desse modo foi descartada a possibilidade de estarmos utilizando o filtro errado na emissão (a transmitância desse filtro foi medida: cerca de 80%). O mesmo experimento foi realizado utilizando o Laurdan como sonda fluorescente e fluorescência a olho nu também foi observada; mas um sinal de fluorescência extremamente alto passava através de um filtro 485/30 (correspondente ao intervalo espectral de emissão do Laurdan). Uma possível explicação para isso seria a eficiência diferencial de detecção dos fotodiodos *avalanche* em diferentes comprimentos de onda; no caso, a eficiência seria extremamente baixa (ou nula) até os 400 nm e somente aumentaria com maiores comprimentos de onda.

Uma vez que se constatou a impossibilidade da realização de medidas de FCS com o Ahba, optamos por estudar o Laurdan, já utilizado nesta técnica⁷². A figura 4.31 a seguir mostra a curva de autocorrelação para o Laurdan em etanol e respectivas flutuações no sinal de fluorescência. Aos dados foi ajustada a equação A.13, através do aplicativo científico Origin 7.0:

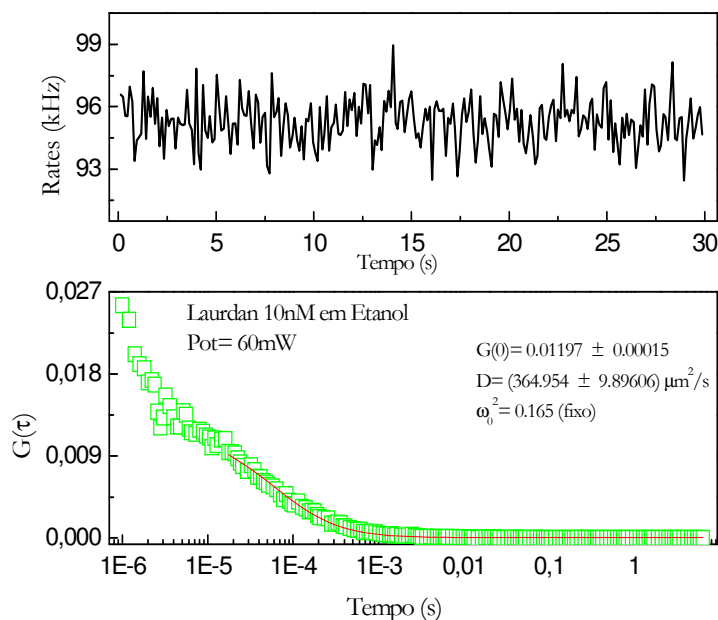


Figura 4.31: Gráfico da curva de autocorrelação do Laurdan em etanol e respectivas flutuações no sinal de fluorescência.

Das medidas de calibração com a Rodamina, foi obtido o valor de ω_0^2 , utilizado na análise dos demais dados. Obtivemos um valor de coeficiente de difusão para o Laurdan em etanol $D=364 \pm 9 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Sabendo que o valor de $G(0)$ é inversamente proporcional ao número N de moléculas no volume de excitação e sabendo que $G(0) = 0,076$ corresponde a uma única molécula no volume, temos $N= 6,3$ moléculas de Laurdan no volume de excitação.

Nota-se que o ajuste aos dados experimentais não considera a primeira parte da curva de autocorrelação, pois este início está relacionado com as transições da molécula para o seu estado excitado tripleto (ver apêndice A) e em nosso trabalho estamos interessados somente na difusão da molécula.

Embora o Laurdan se apresente sob a forma de agregados em solução aquosa, realizamos algumas medidas em meio aquoso. O gráfico a seguir mostra que o sistema não é homogêneo e os agregados parecem ser de diferentes tamanhos (quantidade de monômeros da sonda):

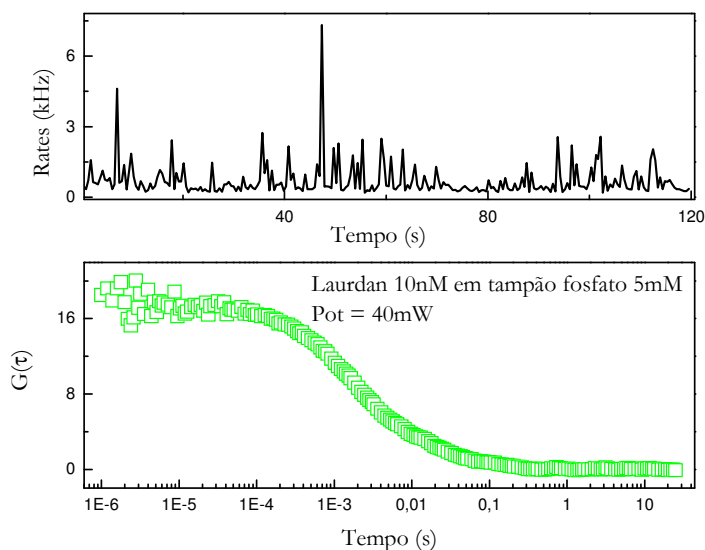


Figura 4.32: Gráfico da curva de autocorrelação do Laurdan em solução aquosa.

A concentração de Laurdan neste experimento foi de 10 nM; considerando-se sua agregação, chega-se a um valor extremamente baixo de agregados fluorescentes, o que pode ser observado no baixo valor do sinal de fluorescência e no alto valor de $G(0)$; os diferentes picos observados são atribuídos a diferentes agregados (tamanhos diferentes) passando pelo volume de excitação. A análise da curva de correlação neste caso é bastante complexa; se houvesse populações bem definidas de agregados muito semelhantes, bastaria ajustar a equação A.14, no entanto, parece haver uma distribuição de agregados com diferentes números de monômeros, o que dificulta a análise dessa curva. Seriam necessários modelos teóricos específicos, capazes de distinguir populações de diferentes dimensões dentro da mesma solução.

Prosseguimos com os experimentos, desta vez com Laurdan em vesículas de DMPC, do tipo LUV. A seguir, na figura 4.33, mostramos o gráfico com algumas curvas de correlação obtidas:

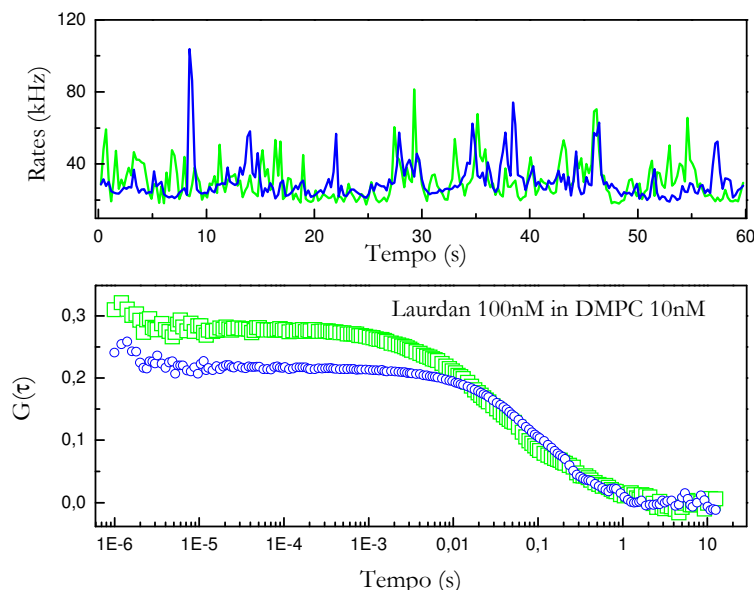


Figura 4.33: Curvas de autocorrelação para o Laurdan em vesículas de DMPC.

A relação entre as concentrações de marcador e vesículas de DMPC foi um critério importante. Nas curvas do gráfico acima temos 100 nM de Laurdan em 10 nM de vesículas de DMPC. Consideramos aqui que uma vesícula unilamelar de DMPC de 0,1 μm de diâmetro contenha em torno de 10^5 lipídios; a partir daí calculamos a concentração de vesículas.

Observa-se que o sistema é altamente heterogêneo, sugerindo diversas possibilidades: presença de Laurdan na fase aquosa; vesículas multi-lamelares (diferentes quantidades de sonda por vesícula); vesículas com diferentes diâmetros. Nos dois últimos casos, a incerteza estaria na preparação das vesículas, durante o processo de extrusão.

Os picos observados nas flutuações do sinal estão relacionados com a passagem das vesículas pelo volume focal; nota-se que são de tamanhos diferentes, conseqüentemente apresentam tempos de difusão diferentes. É importante notar que durante todo o tempo há um sinal de fluorescência presente, que poderia ser atribuído a uma população de Laurdan presente na fase aquosa.

Finalizando os estudos com FCS, conduzimos experimentos com vesículas gigantes (GUV) de POPC. Tais vesículas foram produzidas através do método de

eletroformação, descrito em detalhes no capítulo 3; o resultado é uma distribuição de tamanhos para as vesículas, podendo variar entre 5 e 100 μm de diâmetro, aproximadamente. Como o diâmetro do feixe de excitação no volume focal tem cerca de 0,36 μm para os comprimentos de onda que utilizamos, uma GUV que ali passasse preencheria todo o volume, e somente uma pequena fração da membrana estaria sob observação. Estudos em sistemas como esse são feitos principalmente para se observar deslocamento lateral de proteínas ou macromoléculas fluorescentes sobre uma membrana lipídica⁴⁸, bem como a formação de domínios lipídicos⁴⁹⁻⁵¹.

Através de microscopia óptica comum seleciona-se uma única vesícula; em seguida, direcionando a luz proveniente da amostra para os fotodiodos detectores, obtêm-se as curvas de correlação. A intensidade de fluorescência era bastante alta; porém o Laurdan fotodegrada rapidamente e a curva de correlação gerada não refletiu a dinâmica difusiva da sonda; a intensidade diminuiu com o tempo, pois a sonda ficava exposta tempo demais, estando a vesícula fixa sob o feixe de excitação. Diminuímos ainda mais a concentração de Laurdan: de 0,05% para 0,01% (em mol) em relação à concentração de lipídios de POPC, mas o resultado foi o mesmo, apenas a intensidade de fluorescência diminuiu. A seguir, gráficos dos resultados obtidos:

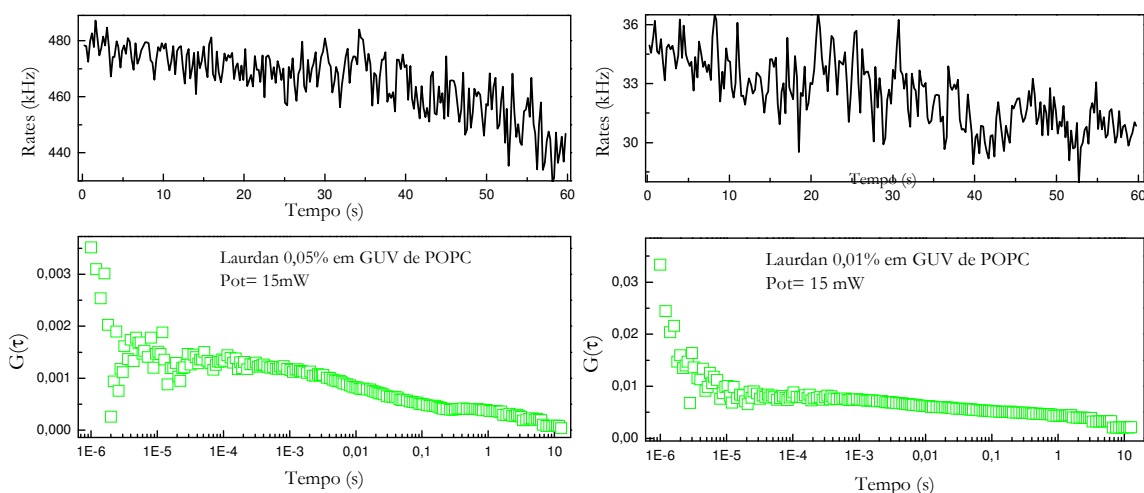


Figura 4.34: Gráficos das curvas de correlação do Laurdan em GUV de POPC e respectivas flutuações na fluorescência.

A diminuição no sinal de fluorescência faz com que as flutuações observadas sejam parecidas com aquelas que seriam observadas para uma macromolécula de dimensões bastante grandes passando muito lentamente pelo volume de excitação.

Como um dos objetivos era utilizar o Ahba como sonda para microscopia de fluorescência, realizamos experimentos para obtenção de imagens de fluorescência utilizando o Ahba como marcador fluorescente. Obtivemos algumas imagens de vesículas gigantes, mostradas a seguir:

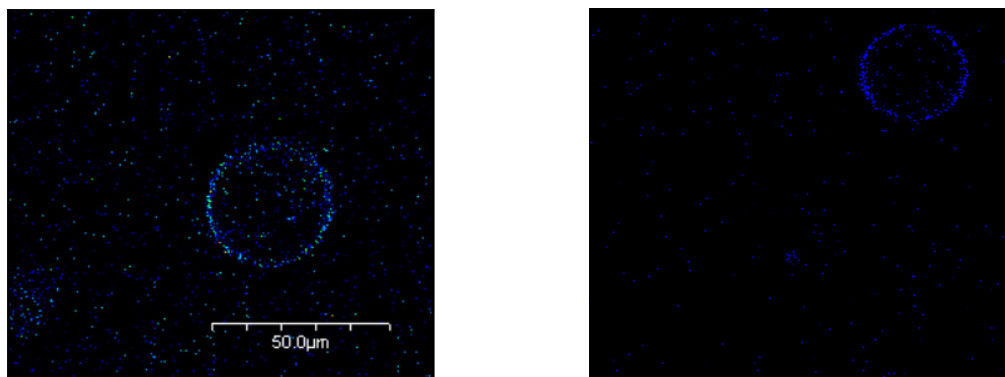


Figura 4.35: Imagens de vesículas gigantes de POPC marcadas com Ahba.

A concentração de Ahba foi de 5% em relação à concentração de POPC. O ideal para esse tipo de medida seria a concentração de 1% de sonda, mas utilizamos 5% para evidenciar o sinal de fluorescência. A excitação foi feita com 695 nm e na emissão foi utilizado o filtro 400/20.

Com a vantagem de ser bastante fotoestável, o Ahba se mostra eficiente como marcador fluorescente para membranas lipídicas observáveis em microscópios.

Capítulo 5: Conclusões

A utilização de sondas fluorescentes no estudo de fenômenos bioquímicos e biofísicos relacionados a modelos de membrana celular depende de propriedades adequadas do fluoróforo e da molécula como um todo.

Dos resultados deste trabalho, foi verificado que o Ahba apresenta transferência de energia para aceitadores como Acridina Laranja, Eddnp e NBD/fosfolipídios; tais aceitadores têm afinidade por regiões hidrofóbicas de agregados anfífilicos. Nos experimentos envolvendo o Eddnp ligado a um polipeptídeo, vimos que é possível utilizar o Ahba para monitorar a interação de peptídeos marcados com membranas modelo.

Para os experimentos envolvendo os aceitadores NBD-PE, 6-NBD-PC e 12-NBD-PC, a análise dos dados de transferência de energia utilizando o programa CONTIN, permitiu a obtenção de funções de distribuições de distâncias entre os pares Ahba/NBD-fosfolipídio na bicamada lipídica; verificamos que a distribuição das sondas na bicamada depende do tipo do doador, de sua concentração na bicamada e do comportamento de fase da membrana.

Foi observada a supressão da fluorescência do Ahba por moléculas da família dos aquilpiridínios, em presença de agregados anfífilicos. Dos resultados, concluímos que o Ahba se localiza de fato, na superfície das micelas e vesículas.

Observamos, finalmente, que é possível a utilização da sonda Ahba em estudos de microscopia de fluorescência, como marcador fluorescente para membranas lipídicas. Também pode ser utilizado em estudos envolvendo excitação por dois fótons, apresentando máximo de absorção em 695 nm. A sonda apresentou grande fotoestabilidade; no entanto, não se mostrou adequada para estudos de FCS.

Capítulo 6. Referências Bibliográficas

1. Lakowicz J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second edition, Kluwer Academic/Plenum Press, (1999).
2. van Holde K.E., *Physical Biochemistry*, 2nd edition, Prentice Hall, (1985).
3. Förster Th. Delocalized excitation and excitation transfer. In: Sinanoglu O., ed. *Modern Quantum Chemistry*. New York, Academic Press, v. 3, (1965).
4. Kaelin W. G., Jr. Pallas D. C., DeCaprio J. A., Kaye F. J., Livingston D. M., *Cell*, **64**, 521-532, (1991).
5. Fields S., Song O., *Nature*, **340**, 245-246, (1989).
6. Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J. M., Adams J. A., Ikura M., Tsien R. Y., *Nature*, **388**, 882-887, (1997).
7. Patterson G., Day R. N., Piston D., *J. Cell Sci.*, **144**, 837-838, (2001).
8. Medintz I. L., *Trends Biotechnol.*, **24**, 539-542, (2006).
9. Gadella Jr. T. W., Jovin T. M., *J. Cell Biol.*, **129**, 1543–1558, (1995).
10. Ng T., Squire A., Hansra G., Bornancin F., Prevostel C., Hanby A., Harris W., Barnes D., Schmidt S., Mellor H., Bastiaens P. I., Parker P. J., *Science*, **283**, 2085-2089, (1999).
11. Tramier M., Gautier I., Piolot T., Ravalet S., Kemnitz K., Coppey J., Durieux C., Mignotte V., Coppey-Moisan M., *Biophys. J.*, **86**, 3570-3577, (2003).
12. Gerritsen H. C., Asselbergs M. A. H., Agronskaia A. V., Van Sark W. G. J. H. M., *J. Microsc.* **206**, 218-224, (2002).
13. Becker W., Bergmann A., Hink M. A., König K., Benndorf K., Biskup C., *Microsc. Res. Tech.*, **63**, 58-66, (2004).
14. Wallrabe H., Periasamy A., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 19-27, (2005).
15. Peter M., Ameer-Beg S. M., Hughes M. K. Y., Keppler M. D., Prag S., Marsh M., Vojnovic B., Ng T., *Biophys. J.*, **88**, 1224-1237, (2005).

16. Gordon G. W., Berry G., Liang X. H., Levine B., Herman B., *Biophys. J.*, **74**, 2702-2713, (1998).
17. Xia Z., Liu Y., *Biophys. J.*, **81**, 2395-2402, (2001).
18. Hoppe A., Christensen K., Swanson J. A., *Biophys. J.*, **83**, 3652-3664, (2002).
19. Karpova T. S., Baumann C. T., He L., Wu X., Grammer A., Lipsky P., Hager G. L., McNally J. G., *J. Microsc.*, **209**, 56-70, (2003).
20. Berney C., Danuser G., *Biophys. J.*, **84**, 3992-4010, (2003).
21. Van Rheenen J., Langeslag M., Jalink K., *Biophys. J.*, **86**, 2517-2529, (2004).
22. Chagas J. R., Portaro F. C., Hirata I. Y., Almeida P. C., Juliano M. A., Juliano L., Prado E. S., *Biochem. J.*, **306**, 63-69, (1995).
23. Del Nery E.; Chagas J. R.; Juliano M. A.; Prado E. S.; Juliano L. *Biochem. J.*, **312**, 233-238, (1995).
24. Chagas J. R., Juliano L., Prado E. S., *Anal Biochem.*, **92**, (2), 419-425, (1991).
25. Juliano L., Chagas J. R., Hirata I. Y., Carmona E., Sucupira M., Oliveira E. S., Oliveira E. B., Camargo A. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**(2), 647-652, (1990).
26. Souza E.S., Hirata I.Y., Juliano L., Ito A.S., *Bioch. Biophys. Acta*, **1474**, 251-261, (2000).
27. Pimenta D.C., Nantes I. L., Souza E. S., le Boniec B., Ito A. S., Tersariol I. L. S., V. Oliveira, Juliano M. A., Juliano L., *Biochem. J.*, **366**, 435-446, (2002)
28. Ito A. S., Souza E. S., Barbosa S. R., Nakaie C. R., *Biophys. J.*, **81**, 1180-1189, (2001).
29. Chatterjee S., Nandi S., Bhattacharya S. C., *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, **173**, 221-227, (2005).
30. Mondal S. K, Ghosh S., Sahu K., Mandal U., Bhattacharyya K., *J. Chem. Phys.*, **125**, 224710, (2006).
31. Jain B., Das K., *Chem. Phys. Lett.*, **433**, 170-174, (2006).

32. Towles K. B., Dan N., *Langmuir*, **23**, 4737-4739, (2007).
33. Pralle A., Keller P., Florin E. L., Simons K., Horber J. K. H., *J. Cell Biol*, **148**, 997-1008, (2000).
34. Pencer J., Mills T., Anghel V., Krueger S., Epand R., Katsaras J., *Eur. Phys. J. E*, **18**, 447-458, (2005).
35. Prior I. A., Muncke C., Parton R. G., Hancock J. F., *J. Cell Biol*, **160**(2), 165-170, (2003).
36. Loura L. M. S., de Almeida R. F. M., Prieto M., *J. Fluoresc.*, **11**(3), 197-209, (2001).
37. Towles K. B., Brown A. C., Wrenn S. P., Dan N., *Biophys. J.*, **93**, 655-667, (2007).
38. Sengupta P., Holowka D., Baird B., *Biophys. J.*, **92**, 3564-3574, (2007).
39. De Almeida R. F. M., Loura L. M. S., Fedorov A., Prieto M., *J. Mol. Biol.*, **346**, 1109-1120, (2005).
40. Frazier M. L., Wright J. R., Pokorny A., Almeida P. F. F., *Biophys. J.*, **92**, 2422-2433, (2007).
41. Zhao J., Wu J., Heberle F. A., Mills T. T., Klawitter P., Huang G., Costanza G., Feigenson G. W., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **1768**, 2764-2776, (2007).
42. Heberle F. A., Buboltz J. T., Stringer D., Feigenson G. W., *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1746**, 186-192, (2005).
43. Leidy C., Wolkers W. F., Jorgensen K., Mouritsen O. G., Crowe J. H., *Biophys. J.*, **80**, 1819-1828, (2001).
44. Nazarov P. V., Koehorst R. B. M., Vos W. L., Apanasovich V. V., Hemminga M. A., *Biophys. J.*, **91**, 454-466, (2006).
45. Stella L., Burattini M., Mazzuca C., Palleschi A., Venanzi M., Coin I., Peggion C., Toniolo C., Pispisa B., *Chem. Biodivers.*, **4**, 1299-1312, (2007).
46. Capeta R. C., Poveda J. A., Loura L. M. S., *J. Fluoresc.*, **16**, 161-172, (2006).
47. Loura L. M. S., Coutinho A., Silva A., Fedorov A., Prieto M., *J. Phys. Chem. B*, **110**, 8130-8141, (2006).

48. Fahey P. F., Webb W. W., *Biochemistry*, **17**, 3046-3053, (1978).
49. Kahya N., Scherfeld D., Bacia K, Poolman B, Schwille P., *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(30), 28109–28115, (2003).
50. Bacia K., Scherfel D., Kahya N., Schwille P., *Biophysical Journal*, **87**, 1034-1043, (2004).
51. Kahya N., Schwille P., *Molecular Membrane Biology*, **23**(1), 29-39, (2006).
52. Marquezin C. A., Hirata I. Y., Juliano L, Ito A. S., *Biophysical Chemistry*, **124**, 125-133, (2006).
53. Provencher S. W., *Computer Physics Communications*, **27**, 213-227, (1982)
54. Schwille P., Haustein E., *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, (Previously published in Biophysics Textbook Online).
55. Magde, D., Elson, E., Webb, W. W., *Phys. Rev. Lett.*, **29**, 705-708, (1972).
56. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W., *Science*, **248**(73), 4951, (1990).
57. Hope M. I., Bally M. B., Weeb G., Cullis P. R., *Biochim Biophys Acta*, **812**, 55-65, (1985).
58. Riske K. A., Dimova R., *Biophys. J.*, **88**, 1143-1155, (2005).
59. Angelova M. I. e Dimitrov D. S., *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 303-311, (1986).
60. Diaz X., Albuin E., Lissi E., *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **155**, 157-162, (2003).
61. Weiss-López B. E., González J. V., Gamboa C., *Langmuir* **12**, 4324-4328, (1996).
62. Romani A. P., Vena F. C. B., Nassar P. M., Tedesco A. C., Bonilha J. B. S., *J. Colloid Interface Sci.* **243**, 463-468, (2001).
63. Melhuish W. H., *J. Phys. Chem. - US*, **65**(2), 229-235, (1961).
64. Katsaras J., Gutberlet T. (Eds.), *Lipid Bilayers: Structure and Interactions*, Springer Verlag, Berlin, (2001).
65. Marsh, D. *Handbook of Lipid Bilayers*; CRC Press: Boca Raton, FL, (1990).
66. Englert A., Leclerc M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 1050-1051, (1978).

67. Wu P., Brand L., *Biochemistry*, **31**, 7939-7947, (1992).
68. Dos Remédios C. G., Moens P. D. J., *J. Struct. Biol.*, **115**, 175-185, (1995).
69. Chattopadhyay A., *Biochim. Biophys. Acta*, **938**, 24-34, (1988).
70. Rigle R., Mets Ü., Widengren J., Kask P., *Eur. Biophys. J.*, **22**, 169-175, (1993).
71. Albota M. A., Xu C., Webb W. W., *Applied Optics*, **37**, 7352-7356, (1998).
72. Sánchez S. A., Gratton E., *Accounts of Chemical Research*, **38**, 469-477, (2005).

APÊNDICE A – Análise da autocorrelação

As flutuações no sinal da fluorescência são quantificadas por autocorrelação temporal do sinal de intensidade gravado. O número de moléculas contidas no volume focal em qualquer tempo é governado por uma distribuição de Poisson. Como consequência, a raiz da média do quadrado das flutuações no número de partículas N é dada por:

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N\rangle)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N\rangle}} \quad (\text{A.1})$$

Uma vez que as flutuações relativas se tornam menores com números crescentes de partículas observadas, é importante minimizar o número das moléculas no volume focal. No entanto, o sinal fluorescente ainda deve ser maior que o ruído de fundo. Se existem poucas moléculas na solução, é possível que em algum momento não haja nenhuma molécula passando pelo foco. Aproximadamente, a média temporal do número de partículas deve estar entre 0,1 e 1000; como o volume focal é da ordem de 1 femtolitro, as concentrações correspondentes estão na região que vai desde alguns micromolares a valores inferiores a 1 nanomolar.

A fluorescência emitida pelas moléculas do volume focal é registrada fóton por fóton. Assumindo que a potência do feixe de excitação seja constante, as flutuações no sinal da fluorescência são definidas como desvios da média temporal do sinal:

$$\begin{aligned} \delta F(t) &= F(t) - \langle F(t) \rangle \\ \langle F(t) \rangle &= \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

Se todas as flutuações são provenientes somente de mudanças na concentração δC local dentro do volume efetivo V_{ef} do ponto focal, as variações podem ser escritas como:

$$\delta F(t) = \kappa \int_V I_{ex}(\underline{r}) \cdot S(\underline{r}) \cdot \delta(\sigma \cdot q \cdot C(\underline{r}, t)) \cdot dV \quad (\text{A.3})$$

Os parâmetros individuais listados acima descrevem principalmente a probabilidade de excitar um fluoróforo dentro do volume focal e de detectar o fóton emitido mais tarde, devido à eficiência final de detecção do arranjo experimental:

κ : eficiência total da detecção;

$I_{\text{ex}}(\underline{r})$: distribuição espacial da energia de excitação com amplitude máxima I_0 ;

$S(\underline{r})$: função de transferência óptica da combinação objetiva-pinhole. Isso determina a eficiência de coleta espacial da configuração experimental e é adimensional;

$\delta\sigma$: flutuações na seção de choque da molécula;

δq : flutuações no rendimento quântico da molécula;

$dC(\underline{r}, t)$: flutuações na concentração local de moléculas em função do tempo, devido ao movimento Browniano.

Determinar todos estes parâmetros experimentalmente é extremamente difícil ou mesmo impossível. Podemos então simplificar a equação A.3 e escrevê-la da seguinte forma:

$$\delta F(t) = \int_V W(\underline{r}) \delta(\eta C(\underline{r}, t)) \cdot dV \quad (\text{A.4})$$

onde $W(\underline{r})$ descreve a distribuição espacial da luz emitida e freqüentemente é aproximada por uma Gaussiana tridimensional, decaindo para $1/e^2$ em r_0 na direção lateral e para $z = z_0$ na direção axial:

$$W(\underline{r}) = e^{-\frac{2x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad (\text{A.5})$$

A função de autocorrelação normalizada é definida por:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (\text{A.6})$$

O sinal é analisado em relação à sua auto-similaridade após um instante τ . A amplitude de autocorrelação $G(0)$ é simplesmente a variância normalizada das flutuações do sinal fluorescente $\delta F(t)$. Assim, substituindo a equação A.4 na equação A.6, temos:

$$G(\tau) = \frac{\iint W(\underline{r}) W(\underline{r}') \langle \delta(\eta \cdot C(\underline{r}, t)) \delta(\eta \cdot C(\underline{r}', t + \tau)) \rangle dV dV'}{\left(\int W(\underline{r}) \langle \delta(\eta \cdot C(\underline{r}, t)) \rangle dV \right)^2} \quad (\text{A.7})$$

Simplificando a equação A.7, podemos considerar somente as partículas que estão difundindo livremente em três dimensões, com coeficiente de difusão D ; e podemos escrever:

$$\langle \delta C(\underline{r}, 0) \delta C(\underline{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} \quad (\text{A.8})$$

e então:

$$G(\tau) = \frac{\iint W(\underline{r}) W(\underline{r}') \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} dV dV'}{\left(\langle C \rangle \int W(\underline{r}) dV \right)^2} = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \frac{\iint W(\underline{r}) W(\underline{r}') \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} dV dV'}{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2}$$

Inserindo mais duas convenções, chegaremos finalmente na expressão para a função de autocorrelação normalizada de difusão tridimensional para espécies únicas em solução: primeiramente considera-se a relação entre o tempo de difusão lateral τ_D que a molécula permanece no volume focal e o coeficiente de difusão D , o qual é independente do arranjo experimental utilizado:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (\text{A.9})$$

utilizando essa relação e a seguinte definição de volume focal efetivo V_{ef} :

$$V_{ef} = \frac{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2}{\int W^2(\underline{r}) dV} \stackrel{\text{equação 3.35}}{=} \frac{\left(\int e^{-\frac{-2x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{-2z^2}{z_0^2}} dV \right)^2}{\int e^{-\frac{-4x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{-4z^2}{z_0^2}} dV} \stackrel{\text{integração no espaço}}{=} \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (\text{A.10})$$

chega-se finalmente à função de autocorrelação de uma única espécie difundindo livremente em solução:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{ef} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{r}{r_0} \right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (\text{A.11})$$

O primeiro termo da equação A.11 é exatamente o inverso do número médio de partículas no volume focal, para $\tau = 0$. Conseqüentemente, conhecendo-se as dimensões r_0 e z_0 obtidas através de medidas de calibração, a concentração local de moléculas fluorescentes pode ser determinada com bastante precisão a partir da amplitude $G(0)$ da curva de autocorrelação:

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{ef} \cdot \langle C \rangle} \Leftrightarrow \langle C \rangle = \frac{1}{V_{ef} \cdot G(0)} \quad (\text{A.12})$$

O coeficiente de difusão pode ser facilmente derivado do tempo de decaimento característico τ_D da função de correlação, como citado anteriormente. Até aqui, assumimos que as propriedades fluorescentes do cromóforo não mudam enquanto o mesmo atravessa o volume focal, ou seja, $\delta\eta=0$. Infelizmente essa suposição não vale para marcadores reais. A causa mais comum para esse “cintilar” na intensidade de fluorescência é a transição da molécula para seu estado excitado tripleto. Como essa transição é proibida pela mecânica quântica, o cromóforo necessita de um tempo comparavelmente maior para voltar ao seu estado fundamental. Durante esse intervalo de tempo a molécula não pode emitir fótons fluorescentes e aparece escura. Certamente podemos imaginar o cruzamento inter-sistema como uma série de intervalos escuros que interrompem a fluorescência contínua da molécula em sua passagem pela região iluminada.

Existem ainda outros processos rápidos que podem aparecer em uma curva de autocorrelação, como por exemplo, movimentos rotacionais. A figura A.1, a seguir, ilustra uma função de autocorrelação e os diferentes processos que podem aparecer:

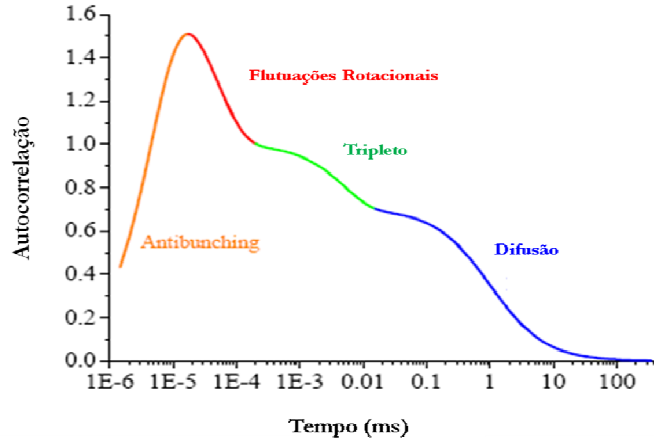


Figura A.1: Escala de tempo dos diversos processos monitorados pela análise da autocorrelação.

No entanto, deve-se ter bastante cuidado ao analisar os primeiros pontos de uma curva de autocorrelação, pois nessas regiões alguns artefatos (por exemplo, o ruído do próprio detector) podem estar presentes. Em nosso trabalho, estamos interessados somente na parte relativa à difusão da molécula. Assim, quando aparecem os efeitos devido às transições para o estado tripleto, simplesmente desconsideramos tal região da curva. Aos nossos dados, ajustamos uma função do tipo:

$$G(\tau) = \frac{G(0)}{\left(1 + \frac{8D\tau}{\beta\omega_0^2}\right) \left[1 + \frac{8D\tau}{\beta\omega_0^2} \left(\frac{\lambda}{\sqrt{2\pi}\omega_0}\right)^2\right]^{1/2}} \quad (\text{A.13})$$

aqui, $\beta=1,15$ é a correção para quando a excitação é feita com dois fótons; ω_0 é a “cintura” do feixe no volume focal e λ é o comprimento de onda de excitação. Para o caso de J espécies (ainda livres em solução) a equação ajustada é simplesmente uma somatória da equação A.13:

$$G(\tau) = \sum_j G_{0j} \frac{1}{\left(1 + \frac{8D_j\tau}{\beta\omega_0^2}\right) \left[1 + \frac{8D_j\tau}{\beta\omega_0^2} \left(\frac{\lambda}{\sqrt{2\pi}\omega_0}\right)^2\right]^{1/2}} \quad (\text{A.14})$$