

Universidade de São Paulo

Instituto de Física

**ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA NO
ESTUDO DE SISTEMAS DE INTERESSE
BIOLÓGICO**



Amando Siuti Ito



Tese apresentada ao Instituto
de Física da USP como parte
dos requisitos ao Concurso
de Livre-Docência

maio de 1994

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Espectroscopia de Fluorescência.	01
1.2. Parâmetros de Fluorescência.	02
1.3. Materiais e Métodos.	05

2. PORFIRINAS E DESEXCITAÇÃO NÃO RADIATIVA EM MELANINAS

2.1. O problema das funções da melanina e características de dissipação de energia	07
2.2. Características espectroscópicas das porfirinas- bandas Soret e banda Q, dependência com grupos laterais e metal	10
2.3. Interação com melaninas: modificações no espectro eletrônico das porfirinas e supressão da fluorescência por melanina.	14
2.4. Decaimento da fluorescência de porfirinas e melano-porfirinas.	17
2.5. Formação de complexos no estado fundamental. Determinação das constantes de ligação	19
2.6. Processos de decaimento não radiativo; formação de radicais livres; importância fisiológica.	22

3. TRIPTOFANO E MELANOTROPINAS

3.1. O problema das melanotropinas e da interface água-membrana	25
3.2. Características espectroscópicas do triptofano e dependência com o meio	27
3.3. Melanotropinas em água	29
3.4. Melanotropinas em presença de lipídios	30
3.5. Efeitos da temperatura na interação melanotropinas-lipídios	31
3.6. Determinação de constantes de associação	34
3.7. Efeitos eletrostáticos. Potencial de Gouy-Chapman	36
3.8. Determinação de profundidades de penetração	38
3.9. Cinéticas de decaimento em meio aquoso	46
3.10. Tempos de vida em complexos com lipídios. Mudanças de conformações.	49
3.11. Simulações de transições estruturais.	50

4. TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA E MEDIDAS DE DISTÂNCIAS INTRAMOLECULARES	
4.1. Características espectroscópicas da Abz e da EDDnP: absorção óptica e fluorescência.	56
4.2. Características da Abz-peptídeos	58
4.3. Características da Abz em presença da EDDnP	60
4.4. Taxa de transferência de energia.	62
4.5. Determinação de distâncias Abz-EDDnP	63
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

A espectroscopia de fluorescência, tanto em estado estacionário como com resolução temporal, foi utilizada no estudo de: a) interações entre melaninas e porfirinas; b) hormônios melanotrópicos em meio aquoso e em interação com vesículas de fosfolípidios; c) distâncias intramoleculares em peptídeos da família das bradicininas. Para os diversos sistemas em estudo, foram obtidos resultados típicos da fluorescência como espectros de emissão, intensidades e rendimentos quânticos, anisotropias de polarização e cinéticas de decaimento. A análise dos dados experimentais foi baseada em modelos como os de Stern-Volmer e Perrin para supressão de fluorescência, de Gouy-Chapman para o potencial eletrostático de superfícies carregadas, de independência entre sítios de ligação para formação de complexos, de Forster para transferência de energia, e da dependência rotamérica para decaimentos multiexponenciais em triptofano e para espectros associados ao decaimento. Pôde-se obter e quantificar diversas informações sobre os sistemas estudados: a) formação de complexos não radiativos melanina-porfirinas no estado fundamental; b) inserção de hormônios melanotrópicos em vesículas de fosfolípidios; c) ocorrência de mudanças conformacionais em melanotropinas na passagem de meio aquoso para a fase lipídica; d) verificação de dobras estruturais em posições específicas na sequência de bradicininas.

ABSTRACT

Steady state and time-resolved fluorescence were employed in the study of: a) interaction of melanins with cationic porphyrins; b) melanotropic hormones in aqueous medium and in the presence of lipid vesicles; c) intramolecular distances in bradikinin peptides. Typical results from fluorescence spectroscopy such as emission spectra, intensities and quantum yields, polarization anisotropies and decay kinetics were obtained for the systems under study. Stern-Volmer and Perrin's model for fluorescence quenching, Gouy-Chapman's model for the electrostatic potential of charged surfaces, Forster's model for energy transfer, models of independent binding sites for the formation of complexes and of tryptophan rotamers for multiexponential fluorescence decays in peptides were used for the analysis of the experimental results. Several informations were obtained for the above systems: a) formation of non radiative melanin-porphyrin complexes in the ground state; b) insertion of melanotropic hormones in lipid vesicles; c) occurrence of conformational changes in melanotropins in the passage from the aqueous medium to the lipid phase; d) occurrence of structural turning in specific positions of the bradikinin sequence.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. A Espectroscopia de Fluorescência.

Trata-se de técnica experimental de uso extenso na pesquisa de sistemas biológicos. Seus princípios foram estabelecidos há bastante tempo e baseiam-se na emissão de radiação eletromagnética devido a transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia. Ao longo deste trabalho estaremos falando exclusivamente de fluorescência ótica, em que a radiação emitida corresponde à região visível do espectro eletromagnético.

Algumas considerações de caráter geral podem ser aqui colocadas, embora devamos em seguida nos ater a características específicas relacionadas ao uso da técnica em sistemas biológicos. Em princípio a fluorescência é um processo de desexcitação de estados eletrônicos excitados e, da mesma forma que a absorção de luz, sua ocorrência depende da probabilidade de transição entre dois estados eletrônicos. Essa probabilidade envolve a interação entre a componente de campo elétrico da radiação eletromagnética e o momento de dipolo da transição eletrônica entre o estado excitado e o estado fundamental e é caracterizada pelo termo de probabilidade de emissão espontânea A_{ba} entre o estado excitado b e o estado fundamental a . Em seu retorno ao estado fundamental o elétron permanece em um estado excitado por um tempo da ordem de 10^{-9} segundos. Este é um tempo de ordem tal que a molécula no estado excitado interage com o meio, tornando a emissão de fluorescência um processo fortemente dependente das características das vizinhanças em que ela se encontra. Este aspecto da fluorescência torna-a bastante atraente aos olhos de quem estuda processos e sistemas de interesse biológico pois uma série de fenômenos ocorrem em tempos dessa ordem de grandeza.

Sendo a espectroscopia de fluorescência um assunto bastante extenso, devemos aqui estabelecer algumas subdivisões para tratar do mesmo. Em primeiro lugar as técnicas de detecção da fluorescência subdividem-na em dois tipos de espectroscopias: de estado estacionário, também chamada de fluorescência estática e resolvida no tempo, chamada de fluorescência com resolução temporal. Quanto às informações obtidas, diversos parâmetros fluorescentes são utilizados: intensidade ou rendimento quântico, espectros de

emissão e excitação, anisotropia de fluorescência, cinética de decaimento. Enquanto este último refere-se à espectroscopia com resolução temporal exclusivamente, os demais podem ser discutidos tendo-se em mente os dois tipos de espectroscopia.

Cabem também umas poucas palavras sobre os fluoróforos ou moléculas fluorescentes que serão discutidos ao longo deste trabalho. Tratam-se de moléculas que apresentam interesse biológico e que apresentam fluorescência quando excitadas com luz na região do visível ou do ultravioleta próximo. As transições eletrônicas nessa faixa espectral envolvem elétrons localizados em orbitais π . Aqui serão examinados três moléculas fluorescentes: porfirinas, triptofano e ácido antranílico (aminobenzoil). Em cada caso, informações específicas sobre os sistemas em estudo poderão ser obtidas: no primeiro caso, através da fluorescência de porfirinas, estudaremos pigmentos de melanina e processos não radiativos de desexcitação radiativa; no segundo caso, a fluorescência do resíduo triptofano nos dará informações sobre hormônios melanotrópicos e interações com lipídios; no terceiro caso, a fluorescência do ácido antranílico, uma sonda incorporada a peptídeos da família das bradicininas, permitirá o estudo sobre a determinação de distâncias intramoleculares.

1.2. Os parâmetros de fluorescência.

A consideração inicial sobre dados obtidos experimentalmente diz respeito ao espectro em energia da excitação e da emissão fluorescente. O espectro de excitação da fluorescência reflete as características de absorção da radiação correspondentes às transições eletrônicas permitidas para o sistema em estudo. Por sua vez, o espectro de emissão usualmente espelha as transições que ocorrem entre o estado eletrônico singlete excitado de mais baixa energia e o estado fundamental. Uma comparação direta entre dados experimentais e previsões teóricas sobre os espectros de absorção e fluorescência só é possível em alguns poucos casos. Os cálculos mais exatos referem-se a moléculas pequenas na fase gasosa. Métodos mais poderosos têm permitido cálculos aproximados de estrutura eletrônica em moléculas maiores e normalmente podem ser obtidas estruturas para moléculas de 50 átomos em fase gasosa. Ocorre que a maioria das informações relevantes para sistemas biológicos referem-se a moléculas imersas em meio aquoso ou em solventes orgânicos. Métodos que fazem a simulação do meio têm sido empregados no estudo da dependência entre posição espectral e o meio em que o fluoróforo está imerso.

Apesar das dificuldades em se obter soluções exatas para os níveis de energia eletrônicos em moléculas de interesse biológico, diversos procedimentos encontram justificativa em raciocínios baseados na dependência entre as diferenças nos níveis de

energia e a polaridade do solvente. Do ponto de vista das técnicas óticas, a absorção é menos sensível que a fluorescência aos efeitos do meio, devido ao intervalo de tempo que transcorre nos dois diferentes eventos. Enquanto a absorção ocorre em tempos da ordem de 10^{-15} segundos, a emissão fluorescente ocorre em cerca de 10^{-9} segundos. Dessa forma, no primeiro caso a interação ocorre com solvente e fluoróforo em equilíbrio no estado fundamental, Já no segundo caso, o tempo transcorrido foi suficiente para que houvesse relaxação do solvente em torno da nova disposição eletrônica da molécula no estado excitado. Assim, a polarização do solvente acaba alterando os níveis de energia da molécula, resultando em modificação no espectro de emissão fluorescente. Esse efeito, da dependência do espectro com a polaridade do solvente é particularmente importante quando o fluoróforo muda de meio, como por exemplo quando pode passar da fase aquosa para a bicamada de lipídios, como veremos adiante.

Quanto à intensidade de fluorescência, deveríamos conhecer a probabilidade de emissão espontânea A_{ba} citada anteriormente, e sua relação com a intensidade do sinal. Na realidade a emissão fluorescente é um processo de desexcitação com emissão de radiação, que compete com formas não radiativas de decaimento do estado excitado. Assim, para se compreender uma variação na intensidade de fluorescência é importante conhecer os modos de interação entre o fluoróforo e o meio, que podem aumentar ou diminuir a ocorrência de processos de desexcitação não radiativa. Entre estes processos, que competem com a fluorescência, temos: desexcitação colisional, conversão a modos vibracionais, aquecimento, passagem para estado fosforescente e interação com outras moléculas do meio através de processos que suprimem a fluorescência, como transferência de cargas, transferência de energia, acoplamentos vibracionais, etc. O chamado rendimento quântico da fluorescência (Φ_f), proporcional à intensidade do sinal, nos dá a fração de moléculas no estado singlete excitado que decai por emissão fluorescente:

$$\Phi_f = k_f / (k_f + \sum k_{nr}) \quad (1.1)$$

onde k_f é a taxa de decaimento por emissão fluorescente e k_{nr} representa as taxas de decaimento não radiativo.

Um outro conjunto de informações pode ser obtido experimentalmente a partir de medidas efetuadas com resolução temporal. A chamada cinética de decaimento nos dá o perfil temporal de decaimento por emissão de luz de um fluoróforo, de seu estado excitado para o estado fundamental. Essa emissão, como vimos acima, ocorre a uma taxa k_f e compete com processos não radiativos de volta ao estado fundamental. Em casos mais simples, quando uma espécie fluorescente encontra-se disposta de modo homogêneo em um meio, a desexcitação obedece a uma lei simples de decaimento exponencial. Chamando

de C_b a concentração de espécies no estado excitado singleto, sua variação temporal quando do retorno ao estado fundamental é dada por

$$-d(C_b)/dt = (k_f + \sum k_{nr})(C_b) \quad (1.2)$$

A solução da equação é

$$C_b(t) = C_b(0)e^{-t/\tau_f} \quad (1.3)$$

sendo que $C_b(0)$ é a concentração no instante inicial e τ_f é o tempo de decaimento observado experimentalmente, que é expresso em termos das taxas de desexcitação por:

$$\tau_f = (k_f + \sum k_{nr})^{-1} \quad (1.4)$$

A taxa de fluorescência k_f é uma propriedade intrínseca da molécula fluorescente e equivale à probabilidade de emissão espontânea do estado excitado (A_{ba}), estando por sua vez relacionado a um tempo de vida radiativo intrínseco (τ_R) através de $k_f = A_{ba} = 1/\tau_R$. Com isso, usando (1.1) e (1.4), vem que $\Phi_f = \tau_f/\tau_R$.

Frequentemente verificam-se desvios do comportamento monoexponencial, que podem refletir a ocorrência de diferentes espécies fluorescentes ou heterogeneidades de distribuições de fluoróforos. A análise das cinéticas de decaimento oferece um conjunto adicional de parâmetros representativos da estrutura eletrônica do fluoróforo em estudo e dos processos de interação com as vizinhanças.

Ainda durante o tempo em que a molécula fluorescente permanece no estado excitado podem ocorrer movimentos que levam à desorientação dos dipolos de transição. Nesse caso, havendo incidência de luz polarizada sobre a amostra, pode ocorrer que a radiação emitida contenha componentes polarizadas em direções perpendiculares à incidente. A chamada anisotropia da fluorescência (A) mede o grau de variação na direção emissão de uma radiação polarizada absorvida pela amostra:

$$A = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (1.5)$$

Ela é indicativa do grau de mobilidade de um determinado fluoróforo e depende das restrições impostas pelo meio ao seu movimento. Estudos sobre a anisotropia de fluorescência podem ser esclarecedores sobre o grau de organização do meio em que a molécula fluorescente está inserida. Ela permite, por exemplo, distinguir ambientes como um meio aquoso e uma fase lipídica.

Esse conjunto de parâmetros foi utilizado para os fluoróforos listados anteriormente, dentro dos respectivos sistemas biológicos sobre os quais pretende-se obter informações e cada um deles será apresentado separadamente nos capítulos seguintes. No

estudo da interação entre porfirinas e melaninas (Capítulo 2), aparecem como parâmetros relevantes a posição espectral e a intensidade fluorescência. A supressão da fluorescência e a análise do perfil de decaimento permitiram a formulação de modelo segundo o qual formam-se complexos não fluorescentes no estado fundamental, com a melanina agindo como meio para dissipação não radiativa da fluorescência das porfirinas. Neste caso, as medidas feitas utilizaram-se das propriedades fluorescentes das próprias porfirinas.

No estudo de melanotropinas, apresentado no Capítulo 3, a posição espectral, a intensidade, a anisotropia e os tempos de vida (cinéticas de decaimento) permitem verificar a ocorrência de modificações na vizinhança do resíduo triptofano, compatíveis com sua passagem da fase aquosa para a fase lipídica, associada a mudanças conformacionais. Esta hipótese é reforçada por dados de supressão da fluorescência com o uso do método da paralaxe. Os dados estimularam a modelagem do hormônio por métodos como dinâmica molecular e álgebra matricial. Neste caso fizemos uso da sonda intrínseca triptofano, presente na sequência primária do peptídeo. Em particular há que se considerar que a fluorescência do triptofano representa por si só um campo de pesquisa dentro do qual permanecem em aberto várias questões.

O Capítulo 4 apresenta o estudo de distâncias intramoleculares em peptídeos, no qual o processo de transferência ressonante de energia permitiu, a partir de medidas de intensidade de fluorescência em estado estacionário e com resolução temporal, a determinação de comprimentos de peptídeos, bem como a indicação de ocorrência de dobras na estrutura secundária da classe de peptídeos pertencentes à família das bradicininas. Neste caso, foram necessárias sondas externas, tanto para o fluoróforo como para o receptor de energia.

1.3. Materiais e Métodos

Melanina: a síntese da melanina foi feita através da auto-oxidação de L-3,4-dihidrosifenilalanina (L-Dopa), de acordo com procedimentos padronizados (Sealy, 1984). Em resumo, 50 mg de L-Dopa foram dissolvidos em 100 ml de água bidistilada e o pH da solução foi ajustada a 9.0 pelo acréscimo de NaOH. Após 1 semana sob fluxo de oxigênio obteve-se uma solução preta com pH em torno de 5.0. A solução foi dializada para eliminar moléculas com peso molecular acima de 5000. A solução remanescente foi evaporada, resultando em pó preto solúvel em água a pH's acima de 5.0.

Porfirinas: De acordo com o método de Fleischer (1962) foram preparadas as porfirinas catiônicas meso-tetraquis(1-metilpiridinium-4il)-porfirina (TMPyP) e zinco (II) meso-tetraquis(1-metilpiridinium-4il)-porfirina (ZnTMPyP). Meso-tetraquis(1-metilpiridi-

nium-4il)-porfirina. (TBzPyP) foi preparada por alquilação de meso-tetraquis(4-piridil)-porfirina (TPyP) com cloreto de benzila em dimetilformamida ou misturas cloroformio:etanol. Zinco (II) meso-tetraquis(1-metilpiridinium-4il)-porfirina Zn(TBzPyP) foi obtida por alquilação de zinco(II) meso-tetraquis(4-piridil)-porfirina (ZnTPyP) com cloreto de benzila em mistura cloroformio-etanol. As preparações foram realizadas por G.C.Azzellini, do Instituto de Química da USP.

Hormônios peptídeos: estas moléculas foram obtidas a partir de colaborações mantidas com outros laboratórios. Assim, os hormônios melanotrópicos foram preparados no laboratório do Prof. V. Hruby da Universidade do Arizona, e peptídeos da família das bradicininas foram preparados no laboratório do Prof. L. Juliano, da Escola Paulista de Medicina.

Lipídios. Os diversos lipídios empregados, inclusive os lipídios marcados com grupos supressores de fluorescência foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, Birmingham, Al (USA).

Equipamentos: Diversos equipamentos foram utilizados nos trabalhos aqui apresentados. Utilizamos os espectrofotômetros Varian DMS200 ou HP . As medidas de fluorescência de estado estacionário foram efetuadas em espectrofluorímetros SLM-Aminco 8000C ou Hitachi 3010. Os experimentos de fluorescência com resolução temporal foram executados em equipamento Edimburgh FL900 ou em sistema montado pelo Prof. A. G. Szabo do National Research Council Canada, baseado em excitação por laser pulsado de argônio Spectra Physics operando a 825 kHz, com dobrador de frequência, e detecção em placa microcanal Hamamatsu 1564U-01. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram realizadas em espectrômetro Varian E 109 do Instituto de Física e Química de São Carlos - USP.

CAPÍTULO 2

PORFIRINAS E DESEXCITAÇÃO NÃO RADIATIVA EM MELANINAS

Ilustramos neste capítulo o caso em que a fluorescência pode ser utilizada para caracterizar a interação entre moléculas. Os fluoróforos em consideração são diferentes tipos de porfirina e, aqui, mudanças espectrais e de intensidade, típicas do fenômeno de supressão da fluorescência, servem como indicadores da formação de complexos entre melaninas e porfirinas catiônicas. O tipo de supressão é determinado a partir de medidas de fluorescência com resolução temporal. Os resultados demonstram a importância da melanina na desexcitação de moléculas sensibilizadoras, através de modos vibracionais estendidos na melanina.

2.1. O problema das funções da melanina e características de dissipação de energia.

A denominação "melaninas" é apenas operacional e refere-se a moléculas de composição e estrutura não muito bem definidas, mas que resultam de precursores fenólicos como tirosina e dopamina, que sofrem reações de oxidação e redução, concomitantes a um processo de polimerização. O polímero resultante não contém uma unidade monomérica única, mas apresenta também moléculas intermediárias que surgem nas reações de oxidação-redução. As próprias melaninas, por sua vez, são classificadas em grupos conforme o precursor de onde se origine, sendo que o grupo mais freqüente e melhor estudado é denominado eumelanina e compreende polímeros de indol-quinonas. Uma característica macroscópica da eumelanina é sua cor escura, como a encontrada em diversas espécies animais (Prota, 1980).

A síntese de pigmentos de melanina ocorre sobre uma matriz proteica dentro do melanossomo, uma organela subcelular circundada por uma membrana lipídica e localizada no interior do melanócito, a célula na qual ocorrem eventos relacionados à pigmentação epidérmica (Jimbow et al., 1982). A organela intacta não tem sido muito estudada (Bridelli et al., 1986) mas, devido a sua aparência compacta, admite-se que seu comportamento esteja mais próximo a cadeias de polímeros que de moléculas isoladas em

solução. Nesse contexto, um modelo derivado do comportamento do pigmento em estado sólido pareceria ser mais adequado. Todavia é necessário levar em conta que o pigmento dentro do melanossomo não se encontra isolado, ressaltando-se a importância do estudo das interações com outras moléculas.

Espectroscopias ópticas e de ressonância paramagnética têm fornecido diversas informações sobre o pigmento: Medidas de absorção óptica evidenciam o caráter absorvedor de luz UV/visível, relacionado por sua vez ao papel fotoprotetor do sistema pigmentar. Quanto à fluorescência, as melaninas são moléculas com baixo rendimento quântico de emissão fluorescente. A desexcitação de estados eletrônicos excitados se faz predominantemente por processos não radiativos, envolvendo dissipação por vibrações da rede, conforme verificado por espectroscopia fotoacústica (Crippa & Viappiani, 1990). Outros processos de dissipação envolvem estados excitados tripleto e formação de radicais livres, como verificado por ressonância paramagnética eletrônica (Sealy et al., 1980).

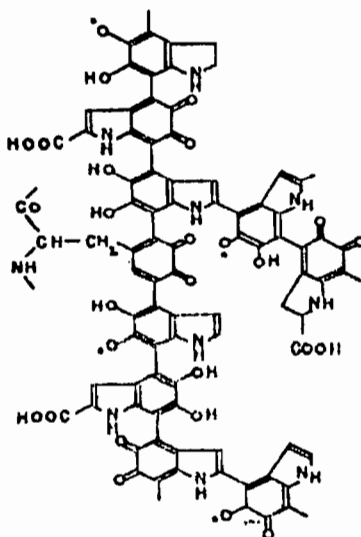


Fig.2.1- Modelo estrutural para a melanina

As melaninas têm sido estudadas tanto na sua forma natural como na forma sintética. A síntese mais comumente empregada envolve oxidação da molécula precursora dihidroxifenilalanina (L-dopa) e propriedades ópticas da melanina de L-dopa reproduzem em linhas gerais o comportamento do pigmento extraído do tecido natural. O polímero formado é heterogêneo (Figura 2.1), contendo unidades quinonas e hidroquinonas em equilíbrio (Sealy et al., 1980). A presença de unidades semiquinona, segundo cálculos de orbitais moleculares (Galvão & Caldas, 1988), faz com que a estrutura eletrônica do

polímero possa aprisionar elétrons em orbitais ligantes presentes em estados de ponta. Dessa forma o paramagnetismo intrínseco da melanina pode ser associado à existência de formas semiquinona no polímero. É importante notar que as propriedades eletrônicas do polímero dependerão do estado físico no qual ele se encontra; quando em estado sólido, os orbitais moleculares se estenderão para uma estrutura de bandas em que tornam-se importantes fenômenos como promoção de elétrons para banda de condução e recombinações com vacâncias. O comportamento típico de semicondutor amorfo foi observado para amostras de melanina natural e sintética (Kawamura, 1986; Crippa et al., 1978).

Por sua vez, para moléculas do polímero dispersas em solução, tornam-se importantes os efeitos resultantes de interações com moléculas vizinhas, tanto no escuro como sob iluminação. Podem-se citar, por exemplo, que no escuro ocorre a mediação da melanina na oxidação de NADH (NAD, nicotinamide adenine dinucleotide) e na redução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (Gan et al., 1974, 1976), bem como sua interação com o metabólito neurotóxico MPP^+ (methylphenylpyridine), com consequências relevantes relacionadas ao parkinsonismo (D'Amato et al., 1986). Sob iluminação, podem ser citados os efeitos de irradiação UV e da presença de BSA (bovine serum albumine) na oxidação de NADH mediada pela melanina (Crippa & Mazzini, 1983, Ito & Crippa, 1986). Sabe-se também que a melanina interage com O_2 , levando à produção de superóxido e, sob iluminação, originando peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Sarna et al., 1980; Korytowski et al., 1987). Em nosso laboratório tem sido pesquisada a interação melaninas-proteínas (Kawamura, 1986; Pascutti & Ito, 1992) e os resultados tendem a mostrar que a função biológica do pigmento é mais complexa que a sugerida por um simples papel passivo de proteção frente à radiação luminosa. Mais ainda, efeitos de fotosensibilização, como um aumento da concentração de radicais livres fotoinduzidos na melanina, foram observados quando o pigmento foi irradiado na presença de corantes como Rosa de Bengala (Sealy et al., 1984; Sarna et al., 1985). Se, por um lado a melanina pode suprimir estados excitados de porfirinas catiônicas como (4-N,N,N,N-trimetil-anilinium)porfirina (Bielec et al., 1986), a interação com flavinas através de efeitos hidrofóbicos, não resulta em supressão do estado singleto excitado do corante (Kozik et al., 1991). Face a resultados dessa ordem, admite-se que, ao se avaliar a fotoproteção pela melanina, deva ser levada em conta a interação do pigmento com agentes fotoprotetores ou fotosensibilizadores (Kollias et al., 1991).

Por sua vez, porfirinas naturais têm sido utilizadas como sensibilizadores em terapia fotodinâmica, particularmente protoporfirina IX e derivados de hematoporfirinas. (Girotti, 1979; Jori & Perria, 1985; Ho et al., 1988). Pouca atenção tem sido dedicada ao

uso de derivados de porfirinas sintéticas que apresentam a vantagem de poderem ser preparadas com diferentes hidrofobicidades, cargas e coordenação a metais. Devido ao grande interesse nas porfirinas em terapia fotodinâmica, também tem sido estudada a interação das mesmas com melaninas, tendo sido verificada a ocorrência de ligação entre melanina e a porfirina catiônica tetra(4-N,N,N,N-trimetil-anilinium)porfirina, com a supressão de estados excitados da porfirina. (Bielec et al., 1986.). Usando a espectroscopia de fluorescência, investigamos a interação de melaninas sintetizadas de L-dopa e um grupo de 4 porfirinas catiônicas: meso-tetraquis(1-metilpiridinium-4il)-porfirina (TMPyP), meso-tetraquis(1-benzilpiridinium-4il)-porfirina (TBzPyP) e os seus respectivos derivados contendo zinco, ou seja, zinco(II)meso-tetraquis(1-metilpiridinium-4il)-porfirina (ZnTMPyP) e zinco(II) meso-tetraquis(1-metilpiridinium-4il)-porfirina (ZnTBzPyP) (Figura 2.2).

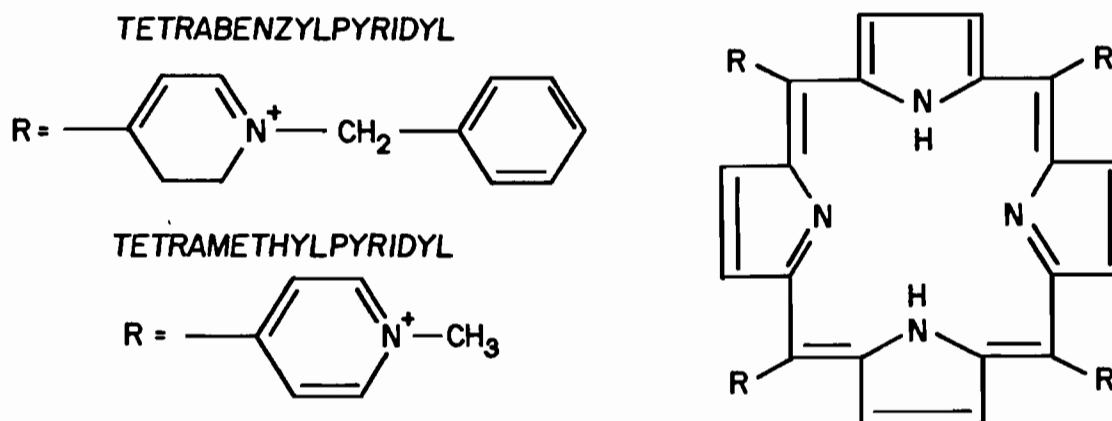


Fig. 2.2. Estrutura esquemática das porfirinas catiônicas.

2.2. Características espectroscópicas das porfirinas: bandas Soret e banda Q, dependencia com grupos laterais e metal.

As propriedades de absorção e fluorescência das porfirinas estudadas, assim como das porfirinas de um modo geral, resultam dos orbitais π que compõem a estrutura eletrônica do macrociclo contendo 4 anéis pirrólicos. Nas porfirinas de base livre (sem metal), dois átomos de hidrogênio ligam-se a nitrogênios do centro do anel, normalmente opostos entre si, resultando em estrutura planar com grupo de ponto de simetria D_{2h} . É característica das porfirinas base livre uma intensa banda de absorção na região próxima a

400 nm, denominada banda Soret (ou banda B), e quatro bandas na região entre 500 nm e 650 nm, denominadas banda Q, com intensidade de uma a duas ordens de grandeza mais fracas que a banda Soret (Figura 2.3).

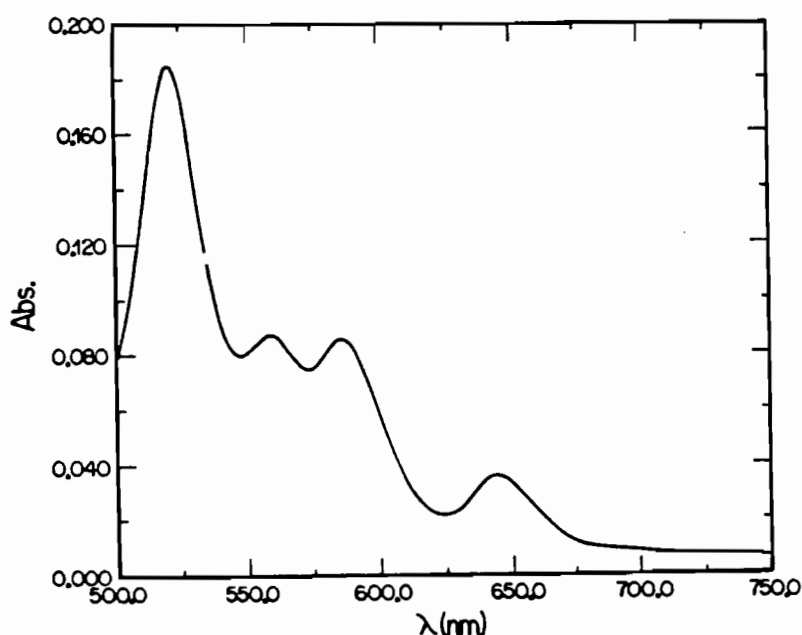


Fig.2.3. Espectro de Absorção Óptica da TMPyP em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0, concentração 10 μ M, na região da banda B.

Em metaloporfirinas, o metal ocupa posição central no anel, coordenado aos quatro átomos de nitrogênio. Com isso, a simetria da estrutura sobe de D_{2h} para D_{4h} e as quatro bandas Q reduzem-se a duas. Uma evidência adicional de que a absorção óptica das metaloporfirinas tem origem no mesmo cromóforo está na pouca dependência de seus espectros eletrônicos com o metal central. Admite-se que as duas bandas Q correspondam, uma, à transição fundamental $Q(0,0)$, e a outra, ao seu ramo vibracional $Q(0,1)$. Nas porfirinas de base livre, existem duas transições fundamentais $Q_x(0,0)$ e $Q_y(0,0)$, cada uma com seus ramos vibracionais $Q_x(0,1)$ e $Q_y(0,1)$ (Gouterman, 1978).

As porfirinas catiônicas que estudamos apresentam o padrão espectral que acabamos de descrever, com bandas Soret bastante intensas e o aparecimento de duas bandas Q nas zinco porfirinas e quatro bandas Q nas porfirinas de base livre. A troca do grupo lateral metila pelo grupo benzil não altera significativamente as posições nem as intensidades das bandas. Modificações mais significativas são observadas quando da coordenação com o zinco, a qual provoca o deslocamento espectral da banda B para o vermelho, afetando igualmente tanto a TMPyP quanto a TBzPyP (Tabelas 2.1 e 2.2).

Tabela 2.1. Posições espectrais das bandas de absorção das porfirinas (em nm), medidas em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0. a) transição Q(0,1); b) transição Q(0,0)

porfirina	B(0,0)	Q _y (0,1)	Q _y (0,0)	Q _x (0,1)	Q _x (0,0)
TMPyP	422	519	557	586	643
TBzPyP	427	521	558	587	643
ZnTMPyP	437	565 ^a	607 ^b		
ZnTBzPyP	440	566 ^a	609 ^b		

Tabela 2.2. Coeficientes de extinção (10^5Mcm^{-1}) das bandas de absorção das porfirinas, medidas em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0. a) transição Q(0,1); b) transição Q(0,0)

porfirina	B(0,0)	Q _y (0,1)	Q _y (0,0)	Q _x (0,1)	Q _x (0,0)
TMPyP	2.4	0.15	0.056	0.064	0.015
TBzPyP	1.9	0.14	0.062	0.064	0.027
ZnTMPyP	2.1	0.175 ^a	0.056 ^b		
ZnTBzPyP	1.7	0.15 ^a	0.062 ^b		

Excitação das porfirinas TMPyP, TBzPyP, ZnTMPyP e ZnTBzPyP, tanto na banda Soret como nas bandas Q resultaram em emissão fluorescente na região entre 600 nm. e 800 nm (Figura 2.4). Da mesma forma que na Absorção Ótica, espectros de emissão diferentes foram obtidos para as bases livres, comparadas às porfirinas metálicas, devido às diferentes simetrias dos compostos, sendo o máximo de emissão das porfirinas de base livre deslocado em direção ao vermelho (Tabela 2.3). A coordenação com o metal tem consequências mais importante na estrutura eletrônica que o tipo de ligante pendurado no anel pirrólico, mostrando que a estrutura depende fortemente da simetria do anel e menos drasticamente da deslocalização eletrônica resultante da ligação dos grupos laterais. Os rendimentos quânticos das porfirinas catiônicas foram determinados por comparação com padrão de TPP utilizado como referência, resultando em valores relativamente baixos, entre 0.02 e 0.04 (Tabela 2.3).

Verificou-se a possibilidade de formação de dímeros, acompanhando-se a dependência entre a absorbância nos espectros de A.O. e intensidade de fluorescência em função da concentração de porfirinas, verificando-se comportamento linear no intervalo de concentrações de 4×10^{-8} a $2 \times 10^{-4} \text{M}$ (Figura 2.5). Essa linearidade indica que não ocorreu formação de agregados nesse intervalo de concentrações, não sendo possível observar evidências de formação de dímeros.(Brokfield, 1985).

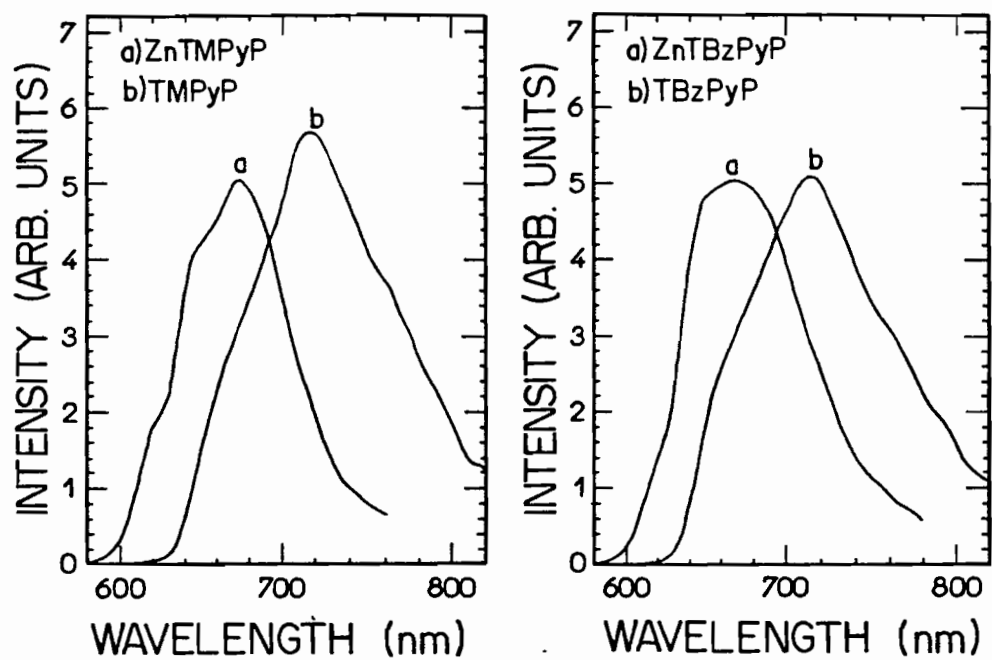


Fig. 2.4. Espectros de fluorescência das porfirinas em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0. concentração $6 \times 10^{-6}M$, excitação 520 nm para as bases livres e 565 para as zinco-porfirinas.

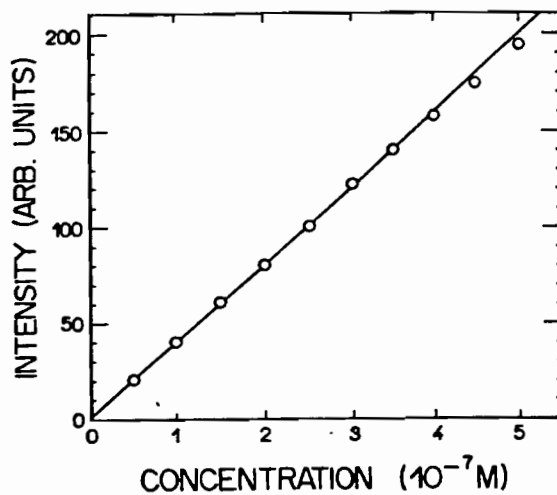


Fig. 2.5. Dependência entre a intensidade de fluorescência e a concentração de TMPyP em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0. Excitação em 420 nm.

2.3. Interação com melaninas: modificações no espectro eletrônico das porfirinas e supressão da fluorescência por melanina.

Alterações nas estruturas eletrônicas das porfirinas foram verificadas com a presença de melanina no meio. O acréscimo de melanina resultou no deslocamento do espectro, tanto da banda B como das bandas Q, para o vermelho, com redução da intensidade e alargamento das bandas. (Figura 2.6) Deve-se notar que nenhuma mudança espectral devido à presença de melanina foi observada na porfirina aniônica tetrasulfonatofenilporfirina (TPPS). Acredita-se que na estrutura heterogênea das melaninas ocorram várias formas aniônicas de grupos fenólicos e carboxílicos. A presença de carga residual positiva nas porfirinas é um requisito necessário para que ocorra interação, sugerindo que nela estejam envolvidos átomos de nitrogênio dos grupos piridil das porfirinas e cargas negativas dos grupos quinona, semiquinona, hidroquinona e carboxila das melaninas. Estes resultados configuram uma evidência adicional do caráter aniônico dos polímeros de L-Dopa melanina.

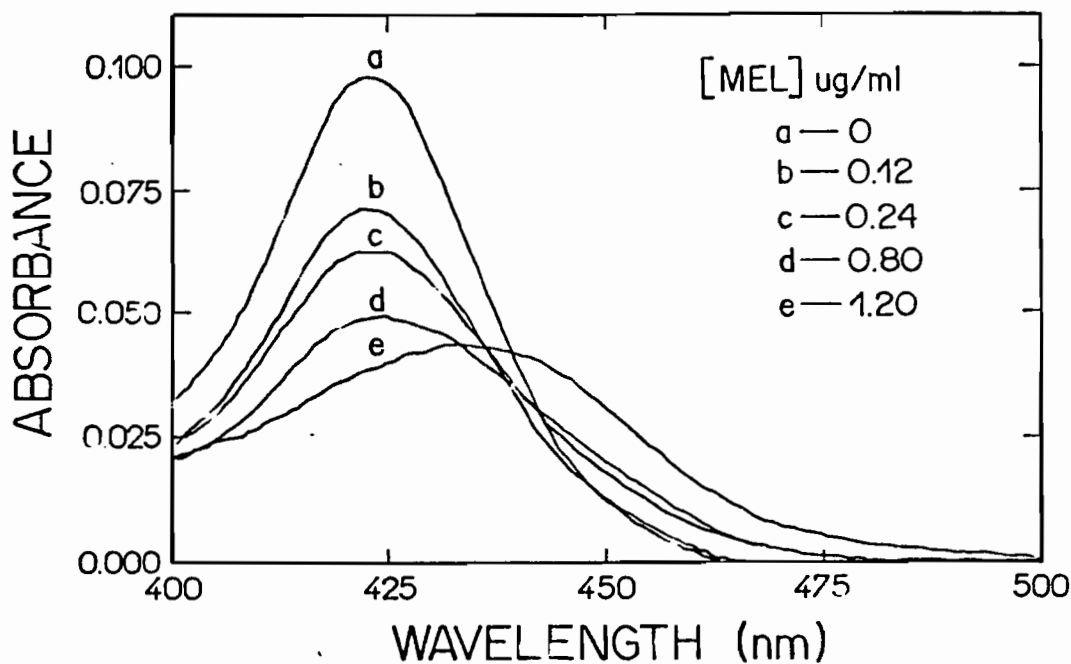


Fig. 2.6. Variação do espectro de absorção óptica da TBzPyP devido à presença de melanina. Concentração de porfirina $6 \times 10^{-6} M$, tampão fosfato 0.01 M, pH 7.0.

A interação não altera a simetria do macrociclo central, uma vez que ficaram mantidos os números de duas bandas Q nas zincoporfirinas e quatro bandas nas porfirinas de base livre. As modificações espectrais, deslocamento para o vermelho, diminuição de intensidade e alargamento da banda são similares ao verificado na formação de complexos entre TMPyP e compostos aromáticos como PFL⁺ (cation proflavina 3,6-dimetilacridínio) e AQS⁻ (9,10-antraquinona-2-sulfonato) (Kano et al., 1987). De acordo com Gouterman (1961), podem-se atribuir as mudanças observadas a uma maior deslocalização dos orbitais π e a uma intensificação relativa das componentes vibracionais das bandas Q, indicando um maior acoplamento entre os estados S₁ e S₂.

Espectros de fluorescência de porfirinas catiônicas apresentaram redução de intensidade com o acréscimo de melanina, sem mudanças na posição espectral (Figura 2.7). A excitação ocorreu em comprimentos de onda em que nos quais a absorbância manteve-se constante, de modo que a supressão não foi produto de efeitos como o de filtro interno.

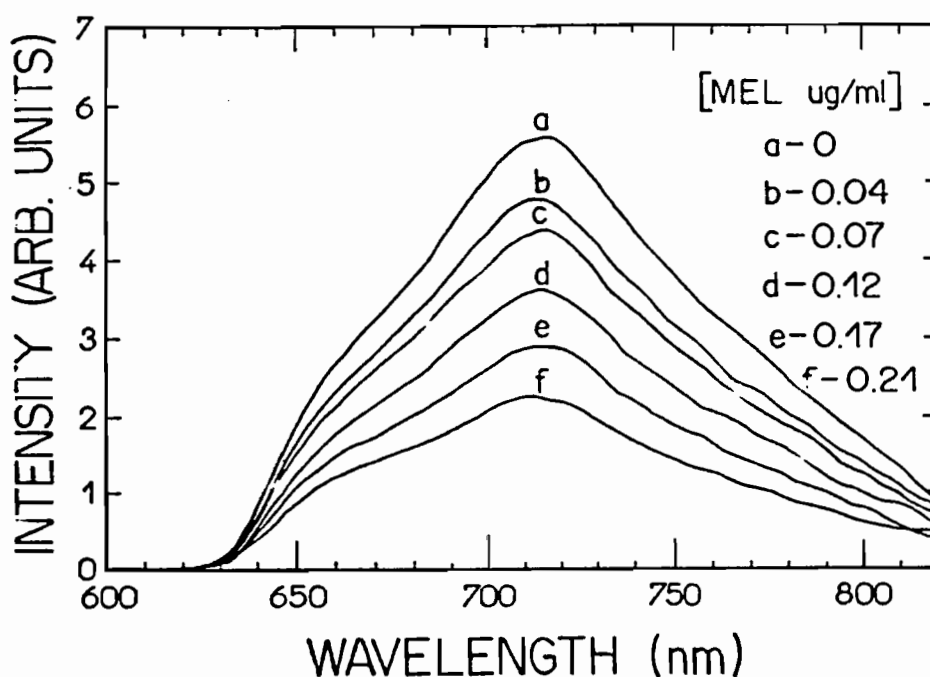


Fig. 2.7. Espectros de fluorescência da TBzPyP em presença de melanina. Concentração 6×10^{-6} M, tampão fosfato 0.01 M, pH 7.0, excitação em 425 nm.

Uma descrição da supressão pode ser dada pela chamada equação de Stern-Volmer. A intensidade de fluorescência de um fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado [F*]. Sob iluminação contínua, haverá uma população

constante de fluoróforos excitados, de modo que $d[F^*]/dt = 0$. As equações diferenciais que relacionam $[F^*]$ na ausência e na presença de supressor são

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - \Gamma[F^*]_0 = 0 \quad (2.1)$$

$$\frac{d[F^*]}{dt} = f(t) - (\Gamma + k_q[Q])[F^*] = 0 \quad (2.2)$$

onde $f(t)$ é a função constante de excitação, Γ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência de supressor, $[Q]$ é a concentração de supressor e k_q é a constante de supressão bimolecular. Esta constante depende da frequência colisional do fluoróforo com o supressor e da eficiência de supressão. A eficiência de supressão é a fração de encontros colisionais que são efetivos para a supressão, podendo variar de 0 a 1.

A combinação das equações (2.1) e (2.2) leva a

$$\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{\Gamma + k_q[Q]}{\Gamma} \quad (2.3)$$

ou,
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q] \quad (2.4)$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de supressor, respectivamente. Esta última equação é a chamada equação de Stern-Volmer. Espera-se dessa equação uma dependência linear entre a razão F_0/F e a concentração $[Q]$ da molécula supressora.

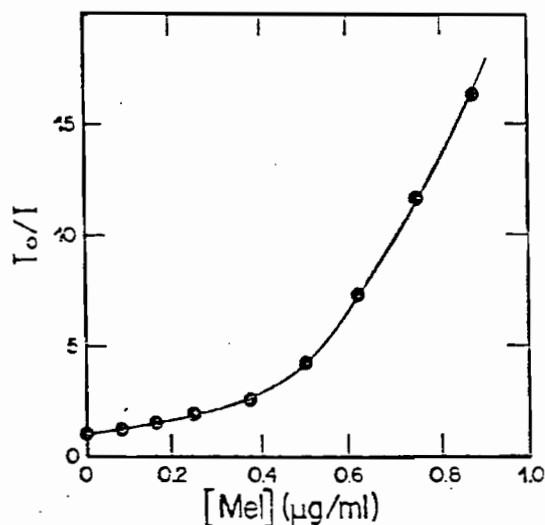


Fig. 2.8. Plot de Stern-Volmer para TMPyP em presença de melanina (em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0, concentração 10 µM, excitação 586 nm).

Quando ocorre formação de complexos entre fluoróforo e supressor, a constante de Stern-Volmer tem o significado de constante de associação, na suposição de um equilíbrio de reação do tipo $P + M \leftrightarrow PM$. No caso da supressão na fluorescência da porfirina provocada pela melanina, não ocorre essa dependência linear, verificando-se o chamado desvio positivo da equação de Stern-Volmer (Figura 2.8). Utilizaremos informações obtidas das medidas de cinética do decaimento da fluorescência para a análise da supressão da fluorescência das porfirinas.

2.4. Decaimento da fluorescência de porfirinas e melano-porfirinas

Tempos de vida da fluorescência das porfirinas foram medidos com excitação na banda Q, em 580 nm para zinco porfirinas e 586 nm para as porfirinas de base livre. Foi examinado o decaimento em vários comprimentos de onda de emissão, observando-se decaimento multiexponential, sendo que uma componente próxima a 5 ns é predominante para as porfirinas base livre e a fluorescência das zinco porfirinas é quase que totalmente devida à componente de cerca de 1.2 ns. Componentes mais rápidas, com tempos de vida na faixa de picosegundos também puderam ser detetadas, porém com pequena contribuição para a fluorescência total das porfirinas (Tabela 2.3). A ocorrência de espécies com tempos de vida na faixa de 1.5 ns nas porfirinas de base livre pode ser devido à presença de contaminantes na preparação.

A supressão da fluorescência pela melanina deve ser interpretada analisando-se conjuntamente os dados de estado estacionário e de resolução temporal. Examinou-se, para cada porfirina estudada, o decaimento fluorescente a várias concentrações de melanina. Observou-se, de maneira geral, que os tempos de vida ficaram praticamente constantes, independente da concentração de melanina, o que permitiu que se fizesse uma análise global dos dados obtidos a diferentes concentrações de melanina, obtendo-se os resultados mostrados na Tabela 2.4. Os dados dessa tabela podem ser comparados com os da Tabela 2.3, verificando-se que os tempos de decaimento não são significativamente modificados com o acréscimo de melanina, ocorrendo apenas algumas alterações menores nas populações relativas. Houve também o aparecimento de contribuições de espécies de tempo muito curto, devido a um aumento no espalhamento, associado à formação de composto menos solúvel que acabava por sedimentar após algum tempo de repouso.

O resultado importante a ser considerado é a constância do tempo de vida, que deve ser confrontada com a grande diminuição da intensidade de fluorescência. Podemos interpretar o processo de supressão como originário da formação de complexos melanina-porfirina no estado fundamental e, sendo os complexos não fluorescentes, a emissão observada é proveniente de moléculas de porfirinas não complexadas, cuja concentração diminui com o acréscimo de melanina ao meio. Por outro lado, os resultados indicam que a melanina dissipa a energia de excitação eletrônica da porfirina por processos não radiativos.

Tabela 2.3. Propriedades de fluorescência das porfirinas ($10^{-5}M$), em tampão fosfato 10 mM, pH 7.0. Dados de tempo de vida resultaram de análise global em conjunto de comprimentos de onda entre 610 e 730 nm

Porfirinas	Quantum yield	Tempo de vida (ns)			Contrib. frac. (%)			Emissão (nm)
		τ_1	τ_2	τ_3	F_1	F_2	F_3	
TMPyP	0.024	5.06	1.56	0.026	94.7	4.6	0.7	640
					97.6	2.4	-	700
TBzPyP	0.040	4.32	1.94	0.039	90.4	8.6	1.0	640
					90.5	11.6	-	700
ZnTMPyP	0.022	1.29	0.33		98.5	1.5	-	640
ZnTBzPyP	0.031	1.17	0.026		99.0	1.0	-	640

Tabela 2.4. Parâmetros de fluorescência resolvida no tempo para porfirinas ($10^{-5}M$) em presença de melanina. Dados resultaram de análise global de conjunto de concentrações de melanina entre zero e o valor máximo de $[M]$ apresentado na tabela.

Porfirinas	$[M]_{max}$ ($\mu g/ml$)	Tempo de vida (ns)			Contrib. frac. (%)			Emissão (nm)
		τ_1	τ_2	τ_3	F_1	F_2	F_3	
TMPyP	6.0	5.00	1.33	0.008	90.1	9.3	0.6	675
TBzPyP	7.2	4.10	1.44	0.005	90.2	9.4	0.4	675
ZnTMPyP	7.2	1.30	0.62	0.008	94.9	4.1	1.0	640
ZnTBzPyP	6.0	1.20	0.72	0.003	92.3	6.1	1.6	640

Cabe observar que o padrão de modificações introduzidas pela melanina em porfirinas catiônicas não é observado em porfirinas aniônicas como a tetrasulfonatofenilporfirina, cuja fluorescência foi apenas ligeiramente modificada pelo pigmento. Além disso, em presença de micelas de sódio dodecil sulfato (SDS) o efeito de supressão pela melanina também era bastante reduzido. Neste caso, as micelas constituíam-se em envoltório carregado negativamente em torno das porfirinas (Kano et al, 1987), reduzindo sensivelmente a interação entre as porfirinas catiônicas e a melanina, evidenciando a

importância de efeitos eletrostáticos na interação. A melanina é um polímero heterogêneo, no qual cargas negativas podem ser estabilizadas, tanto nos grupos fenol ou carboxila presentes na molécula (Sealy et al., 1980), como em níveis para aprisionamento de elétrons na estrutura eletrônica do polímero (Galvão e Caldas, 1988). Dessa forma, a formação de complexos entre porfirinas e melaninas pode ocorrer a razões estequiométricas diferentes de um, como aliás sugerem também os desvios positivos do plot de Stern-Volmer, que fazem supor uma interação envolvendo uma molécula de porfirina e n moléculas de melanina. Essas considerações serão levadas em conta na determinação das constantes de ligação entre porfirinas e melaninas.

2.5. Formação de complexos no estado fundamental. Determinação das constantes de ligação

Supondo que o processo de formação de complexos melanina-porfirinas obedece à relação



na qual uma molécula de melanina interage com n moléculas de porfirina, formando o complexo MP_n , e também que o processo envolva n sítios de ligação independentes, pode-se definir a constante de dissociação no equilíbrio, K_d , como

$$K = \frac{[P_f][M_f]}{[PM_n]} \quad (2.6)$$

onde $[P_f]$ é a concentração de porfirina livre, $[M_f]$ é a concentração de melanina livre e $[PM_n]$ é a concentração de moléculas do complexo melanina-porfirina, com a suposição de que os sítios de ligação são independentes entre si. A expressão pode ser modificada para a forma usual do plot de Scatchard:

$$\frac{X}{[P_f]} = \frac{n}{K_d} - \frac{X}{K_d} \quad (2.7)$$

sendo $X = [P_b]/[M]$ a razão entre a concentração de porfirina ligada e a concentração de melanina.

Lembrando que, com a formação de complexos, a fluorescência remanescente era devido à emissão por parte de porfirinas não complexadas, foi possível utilizar a

espectroscopia de fluorescência para a determinação da fração de porfirinas livres no meio e, conseqüentemente, a concentração de porfirinas ligadas a moléculas de melanina. Nas relações acima, trabalhou-se com a hipótese de que a concentração de porfirina era baixa, comparada à de melanina. Adotou-se então o procedimento de se adicionar alíquotas conhecidas de porfirina a uma dada quantidade de melanina presente em excesso no meio, em relação à concentração de porfirina. A intensidade de fluorescência nessas condições foi medida e comparada com a intensidade emitida por uma mesma quantidade de porfirina, na ausência de melanina. O resultado dessa comparação correspondia à concentração de porfirina livre presente no meio e, através desta era obtida também a concentração de porfirina complexada à melanina. Com estes dados, procedeu-se à construção dos gráficos de Scatchard segundo a equação (2.7).

Os gráficos mostraram que ocorre desvio da linearidade prevista na equação (2.7), apresentando comportamento que sugere a existência de mais de uma classe de sítios de ligação independentes na melanina para interação com as porfirinas. Foram feitas simulações numéricas para o modelo de ligação com duas classes de sítios independentes, resultando em bom ajuste com os dados experimentais (Figura 2.9).

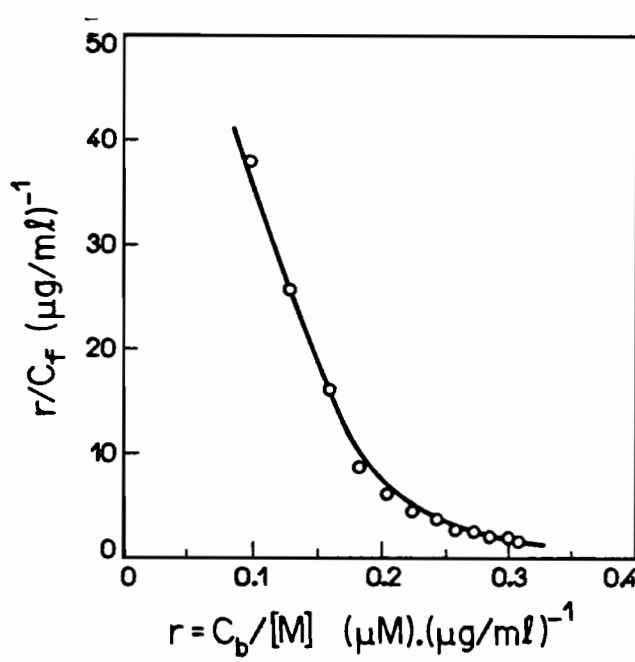


Fig. 2.9. Plot de Scatchard para a formação de complexos ZnTMPyP-melanina em tampão fosfato 0.01M, pH 7.0. Concentração de melanina 1.0 $\mu\text{g/ml}$, concentrações de porfirina no intervalo de 0.1 a 0.6 μM . O parâmetro r refere-se a concentração de porfirina ligada (μM) por concentração unitária de melanina ($\mu\text{g/ml}$). C_f é a concentração de porfirina livre (μM).

A existência de duas classes de sítios de ligação foi também observada nos estudos sobre a interação entre melanina e flavinas. Os valores de K_d e n para a ligação melanina-porfirina dependem, tanto da natureza dos grupos laterais como da presença do metal coordenado no centro do anel (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Constantes de dissociação (K_{dij}) e concentração (n_j) de porfirina ligada por unidade de concentração ($\mu\text{g/ml}$) de melanina.

Complexos	K_{d1} (10^{-8}M)	K_{d2} (10^{-8}M)	n_1 (μM)	n_2 (μM)
TMPyP	0.34 ± 0.01	3.5 ± 0.1	0.17 ± 0.01	0.24 ± 0.1
TBzPyP	0.68 ± 0.03	4.6 ± 0.2	0.24 ± 0.01	0.44 ± 0.2
ZnTMPyP	0.19 ± 0.01	2.4 ± 0.2	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.1
ZnTBzPyP	0.24 ± 0.02	2.7 ± 0.2	0.22 ± 0.01	0.30 ± 0.1

As zinco porfirinas apresentam valores menores de K_d que as porfirinas de base livre, implicando em associação mais forte entre zinco porfirinas e melanina. Sabe-se que diferentes metais como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , ligam-se a melaninas formando quelatos através de grupos carboxila ou semiquinona (Sealy et al, 1980). Embora os átomos de zinco já estejam tetracoordenados ao anel da porfirina, é ainda possível uma quinta coordenação com grupos negativos na melanina atuando como ligantes axiais perpendiculares ao plano da porfirina. Este arranjo estrutural leva a constantes de dissociação mais baixas para zinco porfirinas, comparadas às bases livres, mas ao mesmo tempo restringe o número de possíveis sítios de interação na melanina, com consequentes valores mais baixos do parâmetro n , representativo do número de porfirinas interagindo com a melanina.

A natureza dos substituintes laterais também afeta a ligação entre porfirinas e melaninas. As porfirinas com o grupo benzil apresentam valores mais elevados de K_d e, portanto, menor afinidade que as porfirinas com grupo metil. Ainda comparando os dois tipos de porfirinas, aquelas com benzil apresentam valores de n_j maiores. Existem muitas evidências experimentais de que os inúmeros grupos ionizados no polímero de melanina, responsáveis pelo caráter eletrostático da interação com as porfirinas carregadas positivamente, encontram-se distribuídos de forma heterogênea. Ademais, cálculos de estrutura eletrônica sobre o polímero derivado de L-dopa (Galvão e Caldas, 1988) sugerem que as cargas negativas na melanina localizam-se preferencialmente nas extremidades do polímero. Podemos então supor que a distribuição de grupos carregados dentro da melanina possa originar regiões com características hidrofóbicas, ocasionando maior número de possíveis sítios para interação com porfirinas de caráter mais hidrofóbico. Portanto, valores maiores de n_j são obtidos para benzoporfirinas, comparado

às metilporfirinas, ao mesmo tempo em que são registrados valores menores para constantes de associação, devido à menor intensidade das interações de natureza hidrofóbica.

Dessa forma, a espectroscopia de fluorescência associada à absorção ótica, permitiu a caracterização dos mecanismos de interação entre melaninas e porfirinas. De um lado, ressalta-se a natureza heterogênea do polímero de melanina, com a estabilização de cargas negativas em sua estrutura. Por outro lado, o complexo formado apresenta características distintas da porfirina isolada, com o aparecimento de caminhos para a dissipação da energia absorvida da radiação, através de processos não radiativos, conforme discutido a seguir.

2.6. Processos de decaimento não radiativo; formação de radicais livres; importância fisiológica.

Merecem atenção dois aspectos da interação melanina-porfirina: um, relacionado à natureza da interação, e outro relativo ao destino da energia absorvida da radiação, quando da exposição do complexo à luz UV-visível. No primeiro caso, ressalta-se a origem eletrostática da interação entre o pigmento de melanina e as porfirinas. Quando estas são neutras ou aniônicas, não se observam as mudanças espectrais verificadas com as porfirinas catiônicas. Além da interação eletrostática, existem também efeitos hidrofóbicos e de coordenação com metais, como pode ser verificado a partir da análise dos resultados dos cálculos das constantes de associação, reafirmando a natureza complexa do polímero de L-dopa melanina.

O outro aspecto diz respeito aos mecanismos através dos quais a energia pode ser dissipada. Uma possibilidade é a formação de radicais transientes que poderiam ser detetados por Ressonância Paramagnética Eletrônica. Apesar da dificuldade de caracterização de um sinal de radical livre sem estrutura como o observado nas melaninas, podem ser inferidas algumas informações sobre os mesmos a partir de medidas de saturação progressiva.

Como observado por espectroscopia ótica, a interação com melaninas altera a estrutura eletrônica de porfirinas catiônicas. Por sua vez, nos pigmentos de melanina altera-se o equilíbrio entre unidades quinona e semiquinona, levando a um aumento na concentração de radicais livres estáveis no polímero (Tabela 2.6). A saturação na indução de radicais livres ocorre a razões [porfirinas]/[melanina] diferentes da saturação nas modificações espectrais, evidenciando a natureza heterogênea do pigmento e a existência de mais de um sítio para a interação entre melaninas e porfirinas. As porfirinas de base

livre são mais suscetíveis a modificações na população de radicais livres, indicando que a coordenação de ocorre em sítios dentro do polímero de melaninas, que não interferem no equilíbrio de radicais livres. Como metilpiridinium porfirinas são mais eficientes na promoção de mudanças em radicais livres que as belzilpiridinium, fica a sugestão que interações hidrofóbicas estão relacionadas a sítios que não alteram a concentração de radicais livres no equilíbrio (Ridente & Ito, 1993).

Tabela 2.6. Intensidade relativa do sinal de RPE de melaninas em presença de porfirinas. I^l é a intensidade do sinal da melanina sob iluminação. I_p^l é a intensidade em presença de porfirina e sob iluminação e I_p^d é a intensidade em presença de porfirina e no escuro.

Porfirina	O ₂			N ₂		
	I^l	I_p^d	I_p^l	I_l	I_p^d	I_p^l
TMPyP	1.14	2.0	2.6	1.05	1.8	1.2
TBzPyP	1.15	1.7	2.3	1.05	1.7	1.2
ZnTMPyP	1.13	1.6	2.1	1.05	1.3	1.12
ZnTBzPyP	1.13	1.6	2.0	1.05	1.15	1.13

A existência de diversos centros para interação mostra que nem todos estão envolvidos com a produção de radicais livres. Todavia os resultados obtidos por RPE mostram que os mesmos complexos que participam do aumento do sinal no escuro participam em reações no estado excitado. A formação de radicais livres pode estar relacionada aos processos não radiativos de desexcitação, embora a extensão dessa fotoprodução seja pequena comparada ao total de supressão que se observa por métodos óticos. Dessa forma, uma das vias para a desexcitação não radiativa das porfirinas nos complexos com melanina, passa pela produção de radicais livres. Esta fotoindução de radicais pode ser importante em células, contribuindo para uma fototoxicidade em condições de iluminação.

Cabe ressaltar ainda que, mesmo que a fotoprodução de radicais livres não seja a principal via de desexcitação, é importante verificar a conexão entre o aumento de concentração de radicais livres e o consumo de oxigênio associado à produção de superóxido no processo de supressão de estados excitados na porfirina, evidenciando a possibilidade de participação de espécies ativas de oxigênio na interação de complexos de porfirina com a luz visível e ultravioleta.

Note-se finalmente que uma outra possibilidade para a dissipação não radiativa da energia de excitação eletrônica envolve modos vibracionais da melanina. Nesse sentido a espectroscopia fotoacústica pode fornecer informações acerca das características de dissipação não radiativa no complexo. Recentemente (Losi et al., 1993) mostraram-se, por

espectroscopia fotoacústica, evidências da presença de uma espécie fosforescente no complexo L-dopa melanina-ZnTBzPyP. Essa espécie, com tempo de vida longo, resulta de um aumento na taxa de cruzamento intersistema originado da ligação entre melanina e porfirina, embora não se possa discernir se o estado de vida longa foi criado na melanina ou na porfirina. De qualquer maneira, também aqui a presença do oxigênio aumenta significativamente a criação dessa espécie intermediária no decaimento do complexo melanina-porfirina.

CAPÍTULO 3

TRIPTOFANO E MELANOTROPINAS

3.1. O problema das melanotropinas e da interface água-membrana.

O processo de melanogênese é complexo, envolvendo o próprio material genético dos organismos. Todavia sabe-se que fatores externos podem promover ou inibir a melanogênese. Situações patológicas podem levar a hiperpigmentação (como melanomas) ou hipopigmentação (como vitiligo) e agentes físicos podem induzir mudanças na pigmentação (como o bronzeamento causado pela radiação solar). No nível do melanócito, foi de fundamental importância a verificação da ação de hormônios em processos que promovem alterações na pigmentação celular em diversos animais, como o hormônio melanócito estimulante (MSH), que leva ao escurecimento da epiderme, ou o hormônio concentrador de melanina (MCH), que provoca o clareamento da epiderme (Castrucci et al., 1990). Clinicamente, peptídeos melanotrópicos podem ser usados no tratamento de alterações pigmentares e na detecção e erradicação de melanomas (Hruby et al., 1984, Hadley et al., 1985). Para a compreensão do processo de melanogênese, é indispensável o estudo sobre a estrutura desses hormônios e de seus análogos sintéticos, e dos mecanismos pelos quais exercem atividade biológica.

Em geral acredita-se que os hormônios endógenos atuem através de interações com receptores específicos nas membranas das células. Ademais, mostra-se em diversos casos que a interação de hormônios peptídeos com a parte lipídica da membrana tem um papel fundamental na seletividade hormonal, sendo que a bicamada funcionaria como um importante catalisador da interação peptídeo-receptor. Dentro deste contexto, realizou-se uma investigação sobre a interação entre os hormônios citados e vesículas de fosfolípidios, utilizando as espectroscopias de absorção óptica e fluorescência.

A ação dos hormônios melanotrópicos passaria, então, através da ativação de processos ligados a um receptor que atua no nível da membrana do melanócito. Com efeito, a presença de α -MSH leva à ativação da adenilato ciclase, com aumento de níveis intracelulares de AMP cíclico (Hadley and Castrucci, 1988; Sawyer et al., 1988; Hruby et al., 1984). Agindo como segundo mensageiro, o mononucleotídeo desencadeia uma

casca de fosforilações, levando a desrepressão de gens específicos, com aumento na atividade da tirosinase, a enzima responsável pelas etapas iniciais da síntese da melanina. Como o hormônio em solução aquosa apresenta estrutura bastante flexível, é razoável supor que a bicamada de lipídios apresente restrições conformacionais ao peptídeo de modo a favorecer sua interação com um receptor específico, conforme verificado para diversos hormônios peptídeos (Sargent & Schwyzer, 1986). Dessa forma torna-se essencial o estudo da interação entre peptídeos e lipídios para se saber do papel da fase lipídica na ação biológica do hormônio. Além disso, como os hormônios melanotrópicos possuem carga residual positiva, devem-se levar em conta efeitos eletrostáticos na interação com lipídios carregados. Nesse caso, o formalismo desenvolvido por Gouy-Chapman (McLaughlin, 1977) permite o cálculo dos potenciais elétricos nas vizinhanças das membranas com o que se podem determinar as constantes de associação para o processo.

Dentre as melanotropinas, o principal hormônio que atua na regulação da pigmentação em vertebrados é o hormônio melanócito estimulante (α -MSH). É um tridecapeptídeo cuja sequência de amino-ácidos é Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ e que deriva da proteína precursora pro-opiomelanocortina. A substituição da Met⁴ por Nle e utilização do D-Phe resulta no análogo [Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH, a partir daqui chamado de MSH-I, que apresenta maior potência e atividade prolongada, comparado ao hormônio nativo (Sawyer et al., 1980). Análogos lactâmico cíclicos também foram sintetizados (Al-Obeidi et al., 1989 a), sendo que o peptídeo Ac-[Nle⁴,Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹⁰]- α -MSH(4-10)-NH₂, denominado MSH-II, tem potência biológica cerca de 90 vezes maior que o α -MSH (Al-Obeidi et al., 1989 b).

Ensaio de atividade biológica mostraram ainda que a sequência mínima para a ação biológica é His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹. Essa sequência inclui o triptofano, cujas propriedades fluorescentes permitem seu estudo como uma sonda intrínseca, a partir da qual procuramos extrair informações sobre o peptídeo. Dessa forma, utilizamos a espectroscopia de fluorescência estática e com resolução temporal para, através das propriedades do resíduo triptofano, estudar, as propriedades do α -MSH e de seus análogos MSH-I e MSH-II, tanto nomeio aquoso como em interação com vesículas de lipídios neutros (DMPC-dimiristoil fosfatidil colina) e lipídios negativamente carregados (DMPG-dimiristoil fosfatidil glicerol, DMPS-dimiristoil fosfatidil serina e POPS-palmitoil oleil fosfatidil serina).

3.2. Características espectroscópicas do triptofano e dependência com o meio.

As proteínas e diversos peptídeos apresentam sondas fluorescentes intrínsecas, que são os resíduos triptofano, tirosina e fenilalanina. Dentre eles, o triptofano apresenta características particularmente favoráveis que o tornam bastante adequado à utilização como meio para se obter informações acerca da macromolécula à qual pertence. A primeira transição eletrônica do triptofano caracteriza-se por uma banda em torno de 280 nm, estendendo até cerca de 300 nm. Isso possibilita a excitação seletiva do triptofano, um vez que tanto a fenilalanina como a tirosina apresentam transições eletrônicas em comprimentos de onda menores. Além disso, o rendimento quântico, e, portanto, a intensidade de emissão fluorescente do triptofano é a maior dentre os três resíduos, permitindo maior precisão nas medidas experimentais. Mais ainda, o triptofano apresenta dependência acentuada do espectro e da intensidade de emissão com a polaridade do meio, o que permite obter diversas informações sobre as vizinhanças do local onde se encontra.

A fluorescência do triptofano origina-se de transições envolvendo o anel indol do amino ácido. Cálculos de estrutura eletrônica do grupo indol mostram a ocorrência de dois primeiros estados excitados bastante próximos, de modo que na banda de absorção observada em 280 nm, estão envolvidas duas transições, denominadas L1a e L1b (Yamamoto & Tanaka, 1972; Pill-Soon & Kurtin, 1979; Callis, 1991). Os momentos de dipolo dessas transições apresentam orientações diferentes no anel indol, como observado em experimentos de polarização da fluorescência (Valeur & Weber, 1977). Diversas características da estrutura eletrônica típicas do anel indol são mantidas no triptofano, bem como em alguns derivados do indol, sendo que as distribuições de níveis de energia são pouco modificadas pela presença de diferentes grupos laterais. Dessa forma os espectros de emissão e excitação de moléculas como triptofano, NATA (n-acetiltriptofanoamida), e outras, guardam semelhanças, como por exemplo, a localização da primeira transição na região de 280 nm e do máximo de emissão em torno de 350 nm quando a molécula encontra-se em meio aquoso. Por outro lado, os grupos laterais influenciam fortemente os processos de desexcitação não radiativa, de modo que o rendimento quântico (e, portanto, a intensidade do sinal) dos diferentes derivados do indol podem ser bastante distintos. As semelhanças espectrais permitem que o rendimento quântico do triptofano nos peptídeos seja calculado a partir da comparação das intensidades dos sinais com aquele proveniente do NATA, que apresenta rendimento quântico conhecido, e é utilizado como padrão para essa medida.

A posição do máximo de emissão pode informar sobre a polaridade das vizinhanças do triptofano. Em meio apolar, os efeitos de estabilização de níveis eletrônicos

são menores que os verificados quando o ambiente é constituído de solvente polar. Com isso a diferença em energia entre o estado fundamental e o nível a partir do qual ocorre a transição responsável pela fluorescência é maior em meio apolar. Dessa forma, o máximo de emissão fluorescente fica deslocado para energias maiores, ou comprimentos de onda menores, quando o triptofano está imerso em meio de menor polaridade. Em presença de meio apolar e também de vesículas de fosfolípidios, espectros de fluorescência do triptofano, seja livre, seja fazendo parte de cadeias peptídicas, mostram o deslocamento para o azul característico da passagem de um ambiente polar como a água para ambiente de menor polaridade, como solventes apolares ou bicamada de lípidios (Lakowicz, 1986; Jain et al., 1985; Surewicz & Eppand, 1984; Yamashita et al., 1989; Chung et al., 1992; McKnight et al., 1991, Cavatorta et al, 1989).

O deslocamento espectral na passagem do triptofano de um meio aquoso para um meio apolar ocorre simultaneamente a um aumento na intensidade de fluorescência. Esta intensidade é uma medida do rendimento quântico, que expressa a razão entre o processo de emissão fluorescente e a soma das razões de todos os processos de decaimento do estado excitado. Assim o aumento de intensidade reflete a diminuição da ocorrência de desexcitação por processos colisionais com moléculas de água.

Outro parâmetro relevante é a anisotropia da fluorescência. Nesse caso examina-se a extensão da despolarização de uma radiação polarizada incidente sobre o sistema em estudo. Se a molécula tem movimentação restrita, o grau de despolarização da radiação incidente é menor que no caso em que há grande liberdade de movimento. A anisotropia do triptofano livre em solução aquosa e em temperaturas desde próximo a zero até 50°C é praticamente igual a zero, significando que a molécula movimenta-se livremente no meio durante o tempo em que permanece no estado excitado. Por outro lado, quando o triptofano é parte de uma macromolécula, o valor da anisotropia é maior, devido a restrições ao seu movimento. Quando o meio é ainda mais restritivo, como a bicamada de lípidios, a anisotropia pode chegar a valores ainda mais próximos ao limite de fluoróforo imobilizado, de modo que este parâmetro também é utilizado na caracterização das vizinhanças do triptofano.

Por fim, cabe citar que a cinética de decaimento da fluorescência do triptofano oferece outro conjunto de parâmetros empregado na análise do meio no qual se insere. Apesar das semelhanças espectrais com moléculas como NATA e 3-metilindol a cinética de decaimento do triptofano apresenta características bem distintas. Em lugar do decaimento monoexponencial das outras duas moléculas, o triptofano pode apresentar dois tempos de vida em pH's alcalinos, sendo comum a observação de decaimento triexponencial quando ele faz parte de peptídeos e proteínas (Beechem and Brand, 1985,

Cavatorta et al., 1991). Supõe-se que processos de transferência de elétrons entre o anel e grupos amina ou carboxila promovam desexcitação, e que os mesmos dependam da disposição espacial do anel em relação a estes grupos. Dessa forma, supõe-se que decaimento multiexponencial da fluorescência estejam relacionados a diferentes estruturas paa a cadeia peptídica nas vizinhanças do resíduo triptofano.

3.3. Melanotropinas em água.

Em solução aquosa a fluorescência do triptofano de todos os peptídeos estudados é similar à do N-acetiltriptofanoamida (NATA). Com excitação em 295 nm, os espectros de emissão apresentam máximo em torno de 350 nm (Figura 3.1). Os valores do quantum yield em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.0, ficaram por volta de 0.1 (Tabela 3.1), típicos do triptofano em peptídeos. Registre-se também que as anisotropias de fluorescência dos peptídeos em meio aquoso estão próximas de zero.

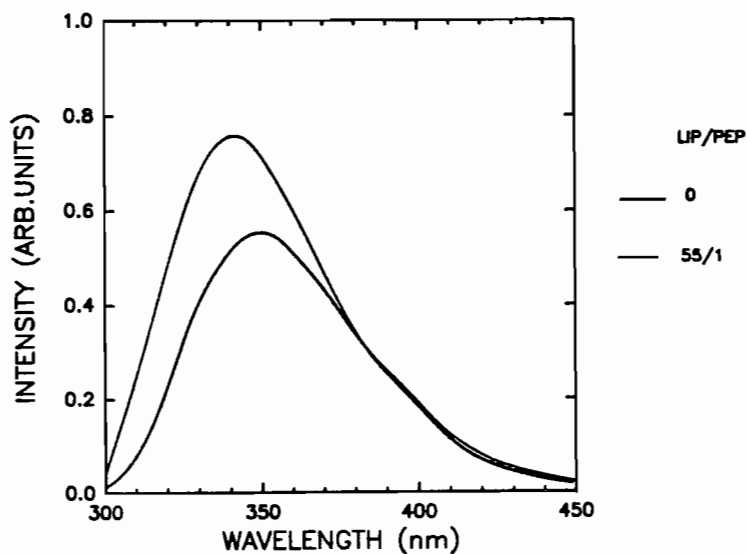


Figura 3.1. Espectros de fluorescência do α -MSH em meio aquoso e na presença de vesículas de DMPS. Concentração de α -MSH, $1 \times 10^{-5} \text{M}$, tampão fosfato 0.01M, pH 7.0.

Tabela 1.1. Rendimentos quânticos das melanotropinas em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.0; os valores foram obtidos usando-se como padrão o rendimento quântico da NATA igual a 0.14 a 20°C.

peptídeo	rendimento quântico		
	20°C	30°C	40°C
α -MSH	0.100	0.083	0.078
MSH(7-10)	0.084	0.071	0.065
MSH-I	0.105	0.089	0.083
MSH-II	0.095	0.082	0.080

3.4. Melanotropinas em presença de lipídios

Em presença de lipídios com carga residual negativa, três efeitos foram observados na fluorescência das melanotropinas: deslocamento espectral para o azul, aumento na intensidade do sinal e aumento na anisotropia de fluorescência (Figura 3.1). Os valores das modificações não são os mesmos para os diferentes peptídeos (Tabela 3.2).

Tabela 2. Modificações na intensidade de fluorescência, deslocamento espectral e anisotropia de fluorescência de melanotropinas, em presença de vesículas e micelas. Medidas em tampão fosfato 0.01 M, pH 7,0. Valores relativos às medidas sem vesículas.

	α -MSH	MSH(7-10)	MSH-I	MSH-II
	Intensidade de fluorescência			
MML	1.93	2.10	1.92	nd
POPS(20°C)	1.30	nd	1.44	1.77
DMPG(30°C)	1.18	1.22	1.16	1.06
DMPS(40°C)	1.35	1.80	1.40	1.72
Deslocamento espectral				
MML	9.0	10.0	6.5	nd
POPS(20°C)	7.0	nd	9.0	13.0
DMPG(30°C)	12.0	11.0	10.0	10.0
DMPS(40°C)	9.0	13.0	7.0	13.0
Anisotropia de fluorescência				
MML	0.088	0.063	0.087	nd
POPS(20°C)	0.072	nd	0.085	0.093
DMPG(30°C)	0.097	nd	nd	0.102
DMPS(40°C)	0.090	0.050	0.079	0.110

Os resultados da Tabela 3.2 foram obtidos com concentrações de peptídeos no intervalo de 1 a 2×10^{-5} M e as concentrações de lipídios estavam na região em que ocorria saturação dos efeitos em observação. A ocorrência do aumento da intensidade de fluorescência e o deslocamento espectral é representativa da passagem do resíduo triptofano dos peptídeos, da fase aquosa para a fase lipídica das vesículas e micelas. Nenhuma mudança foi observada em presença de vesículas de DMPC, nem em misturas de DMPC/DMPS (80:20), nas quais a anisotropia de fluorescência também era igual a zero. Estas observações permitem concluir que uma carga residual negativa nos lipídios é condição essencial para a formação de complexos peptídeos-vesículas de lipídios. No caso das micelas, a ausência de estruturas organizadas na superfície ou no interior das mesmas, permitiria a interação dos peptídeos com os lipídios internos através de efeitos hidrofóbicos.

A anisotropia de fluorescência do triptofano também reflete a interação entre os peptídeos e a fase lipídica das vesículas. O aumento significativo da anisotropia mostra que o triptofano passa para um ambiente que impõe maiores restrições a seu movimento. Poder-se-ia esperar que a anisotropia fosse ainda maior se o triptofano estivesse completamente imobilizado no meio lipídico, caso em que a anisotropia de fluorescência estaria refletindo as rotações das próprias vesículas, que seriam lentas na escala de tempo da fluorescência. Os resultados sugerem que o resíduo triptofano apresenta ainda alguma flexibilidade no complexo peptídeo-lipídio.

3.5. Efeitos da temperatura na interação peptídeo-lipídio

Os resultados apresentados anteriormente foram obtidos a temperaturas acima da transição de fase dos lipídios que constituem as vesículas. Realizou-se um estudo da dependência entre os três parâmetros de fluorescência descritos acima e a temperatura dos complexos peptídeos-lipídios. Foi observada uma correlação direta entre a transição de fase das vesículas de fosfolipídios e a intensidade de fluorescência, o máximo de emissão e a anisotropia de fluorescência (Figuras 3.2a, 3.2b e 3.2c). Esses dados indicaram uma transição de fase próxima a 36°C para DMPS e perto de 10°C para POPS. É de se notar que a fase e a estrutura dos lipídios controlam o grau de interação, sendo que mesmo em temperaturas abaixo da transição os dados indicam que os peptídeos encontram-se ligados aos lipídios. Isto sugere que na forma gel o triptofano fica mais exposto ao meio aquoso, como resultado da extrusão da região lipídica, devido ao ordenamento e aumento da rigidez das vesículas (Yamashita et al., 1989). Quando a estrutura lipídica fica mais fluida

e menos ordenada, o resíduo triptofano pode ser capaz de penetrar mais profundamente no interior da bicamada lipídica.

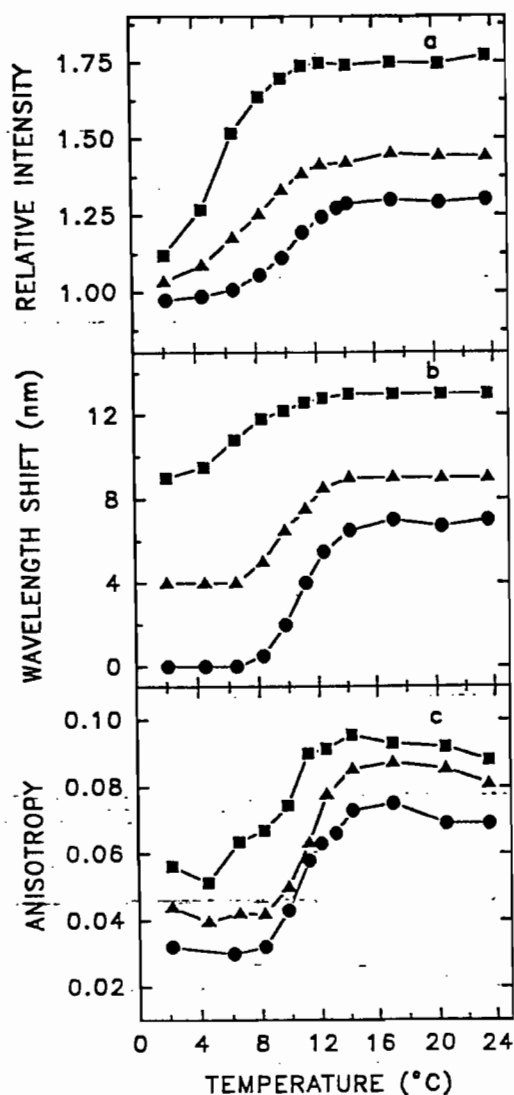


Figura 3.2. Dependência com a temperatura, de parâmetros fluorescentes do α -MSH (●), MSH-I (Δ) e MSH-II (□). a) Intensidade relativa de fluorescência comparada com o meio aquoso; b) deslocamento espectral comparado com o meio aquoso; c) anisotropia de fluorescência. Excitação em 295 nm, concentração de peptídeo 1×10^{-5} M.

Os resultados de dependência com a temperatura mostraram também, de maneira mais clara, observações já contidas nas tabelas 3.1 e 3.2, de que a extensão das interações com lipídios não é a mesma para os diferentes peptídeos. Para o α -MSH, os gráficos da figura 3.2 mostram que na fase gel o resíduo triptofano permanece exposto ao meio aquoso, apesar do peptídeo estar ligado às vesículas. Prosseguindo nesse raciocínio, temos que para o MSH-I, o resíduo triptofano está parcialmente exposto enquanto o MSH-II encontra-se menos exposto ao meio aquoso e, assim, com penetração maior no interior da

bicamada de lipídios na fase gel. Da mesma forma, na fase líquido cristalina a extensão da interação é maior para o MSH-II, seguido do MSH-I, sendo que a interação com α -MSH é a mais fraca dentre os peptídeos estudados. Uma melhor apreciação dessas diferenças pode ser obtida da determinação de constantes de ligação da melanotropinas com vesículas de fosfolipídios.

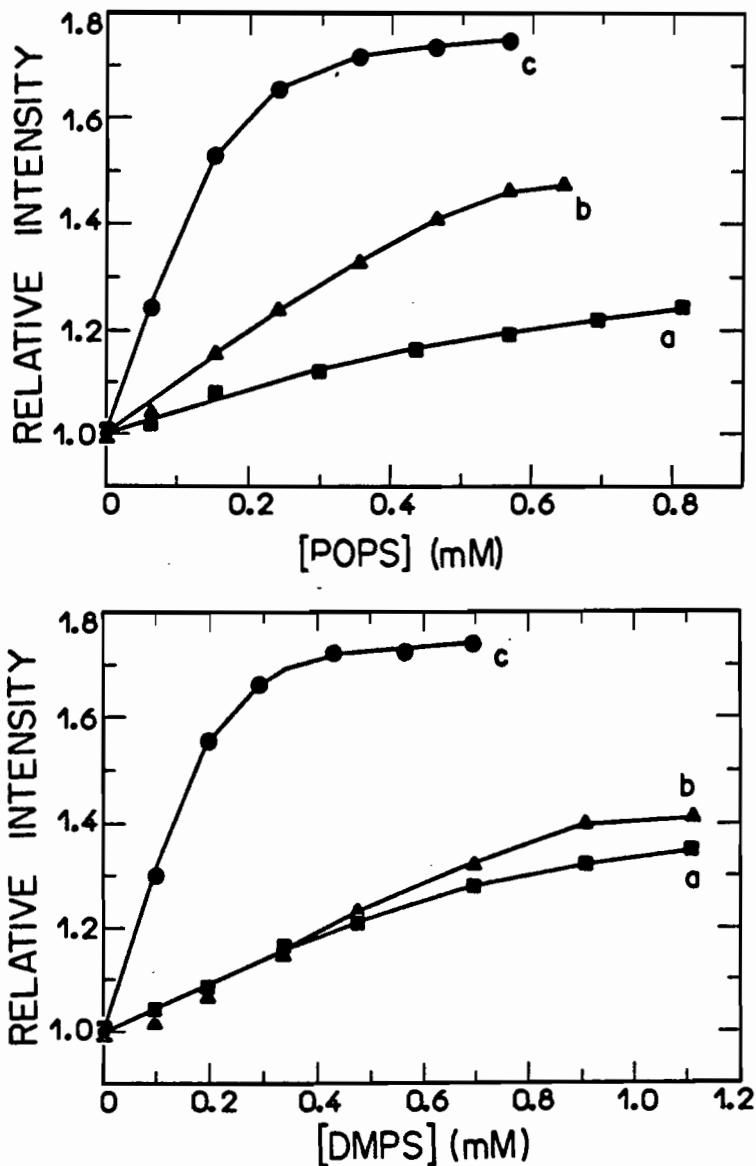


Figura 3.3. Aumento relativo da intensidade da fluorescência de α -MSH (\bullet), MSH-I (Δ) e MSH-II (\square), com o acréscimo de lipídios. (a) vesículas de POPS, 20°C; (B) vesículas de DMPS, 40°C. Concentração de peptídeo, 10^{-5} M.

3.6. Determinação de constantes de associação

A titulação da formação de complexos peptídeos lipídios foi realizada através da medida das intensidades relativas em função da concentração de lipídios adicionados ao meio (Figura 3.3). Supondo que uma molécula de peptídeo (P) forma um complexo (PL_n) com n moléculas do lipídio (L), dentro do modelo de sítios de ligação independentes, o equilíbrio de ligação pode ser descrito por uma isoterma de ligação convencional (Surewicz & Epan, 1984, Jain et al., 1985)

$$X = \frac{[P_f]}{(K_d + n[P_f])} \quad (3.1)$$

onde $X = [P_b]/[L_T]$ é o número de moles de peptídeos ligados por mol de lipídio total (L_T), $[P_f]$ é a concentração de peptídeos livres e K_d a constante de dissociação.

Os valores de P_b e P_f foram determinados a partir de curvas de titulação como as da Figura 3.3, sendo que quando a intensidade relativa vale 1.0, todos os peptídeos estão livres, quando a intensidade relativa está na saturação todos os peptídeos estão ligados e, nas intensidades intermediárias, o sinal é composto de contribuições de peptídeos livres e ligados.

Os valores de n e K_d foram determinados empiricamente a partir de gráficos recíprocos e de gráficos de Scatchard conforme a relação

$$\frac{X}{[P_f]} = \frac{1}{K_d} - \frac{nX}{K_d} \quad (3.2)$$

Na figura 3.4a ilustra-se o gráfico de Scatchard para a ligação entre MSH-I e vesículas de POPS, que é típico dos dados de interação entre as diferentes melanotropinas e os lipídios estudados. Em vários casos o ponto no gráfico referente à menor razão $[L_T]/[P_T]$ desviou-se da linearidade com os demais pontos. Isto pode ser devido ao fato de que o número de moléculas de lipídios era menos que n , com uma estequiometria diferente da apontada acima, ou com neutralização significativa da distribuição de cargas negativas na superfície da vesícula devido à alta concentração local de peptídeos. Os valores de K_d e n obtidos dos gráficos de Scatchard e as energias livres para ligação dos peptídeos estão mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Parâmetros de ligação de hormônios melanotrópicos em lipídios, a partir de gráficos de Scatchard. (POPS, 20°C; DMPS, 40°C; MML, 20°C)

	POPS			DMPS			MML		
	n	$K_d(\mu\text{M})$	$-\Delta G$ kcal/M	n	$K_d(\mu\text{M})$	$-\Delta G$ kcal/M	n	$K_d(\mu\text{M})$	$-\Delta G$ kcal/M
α -MSH	46	95	5.5	39	147	5.5	20	189	5.1
MSH-I	51	22	6.3	46	28	6.6	14	278	4.8
MSH-II	19	8.9	6.9	20	15	6.9	nd	nd	
MSH(7-10)	nd	nd	nd	64	58	6.1	23	200	5.0

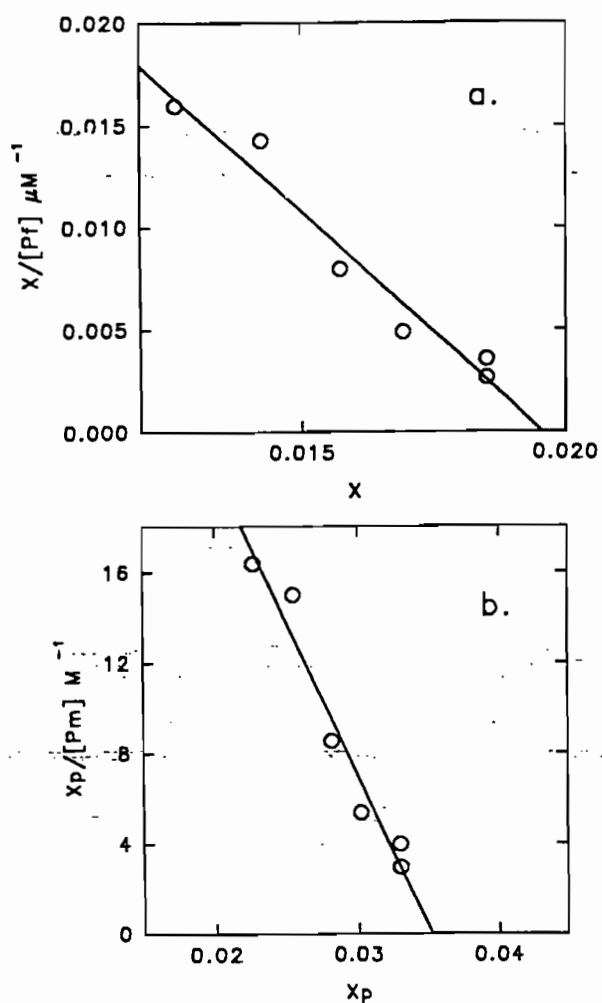


Figura 3.4. Plots de Scatchard para a interação entre MSH-I e vesículas de POPS a 20°C. (a) análise convencional. (b) análise com potencial de Gouy-Chapman.

Como não se observam evidências de ligação entre os peptídeos melanotrópicos e lipídios neutros, devemos levar em conta que efeitos eletrostáticos devem ter um papel important na interação. A superfície da vesícula, negativamente carregada, atrai os peptídeos carregados positivamente até as vizinhanças da vesícula, aumentando a concentração de peptídeo livre próximo à interface água-lipídio. A incorporação dos peptídeos na matriz lipídica altera a densidade superficial de carga, o que por sua vez, modifica a atração dos hormônios para a camada vizinha à vesícula. Com o aumento da quantidade de peptídeo incorporado, haverá diminuição na inserção de novas moléculas de peptídeo. Se os efeitos eletrostáticos forem desprezados, teremos obtidos apenas os valores aparentes dos parâmetros de ligação, que aparecem na Tabela 3.3. Fizemos então uso do formalismo desenvolvido por Gouy-Chapman para levarmos em conta os efeitos eletrostáticos.

3.7. Efeitos eletrostáticos, potencial de Gouy-Chapman.

A distribuição de cargas na superfície das vesículas origina um potencial elétrico conhecido como potencial de Gouy-Chapman. A neutralização parcial dos lipídios carregados negativamente, resulta em uma diminuição do potencial de Gouy-Chapman. A densidade superficial de carga (S) na superfície da vesícula é dada por (McLaughlin, 1977)

$$S = \frac{e_o(z_L X_L + z_p X_b)}{[A_L(1 + X_b A_p / A_L)]} \quad (3.3)$$

onde e_o é a carga elementar, X_L é a fração molar de lipídios carregados com carga z_L , z_p é a carga do peptídeo, A_L e A_p são as áreas das superfícies do lipídio e do peptídeo, respectivamente. X_b vale $X/0.56$ e leva em conta o fato de que apenas a superfície externa da membrana está envolvida com a atração eletrostática, sendo que o fator 0.56 deriva da concentração fracional de lipídios na superfície externa de vesículas com diâmetro de 1000 Å (Beschiaschvili & Seelig, 1990; Cullis & Hope, 1985). Adotou-se para A_L o valor 60 Å² (Cullis & Hope, 1985) e para A_p o valor 200 Å² (Seelig & MacDonald, 1989; Beschiachvili & Seelig, 1990). A carga líquida dos peptídeos e lipídios é +1 e -1, respectivamente.

A variação na densidade superficial de cargas provoca mudanças no potencial de Gouy-Chapman ψ_o de acordo com a relação

$$S = \left\{ \left(2000 e_R e_o RT \sum c_i \left[\exp(-z_i F_o - \psi_o / RT - 1) \right] \right) \right\}^{1/2} \quad (3.4)$$

onde ϵ_a é a constante dielétrica da água, ϵ_0 é a permissividade do espaço livre, R é a constante universal dos gases, F_0 é a constante de Faraday, c_i é a concentração do i^{a} eletrólito na fase aquosa (em moles/litro) e z_i é o sinal atribuído à i^{a} espécie. O potencial de Gouy-Chapman impõe a existência de diferentes populações de moléculas carregadas no meio, relacionadas, no equilíbrio, pela equação

$$[P_M] = [P_{eq}] \exp(-\psi_0 z_p F_0 / RT) \quad (3.5)$$

onde $[P_M]$ é a concentração dos peptídeos carregados adjacentes à superfície da membrana e $[P_{eq}]$ ou $[P_f]$ é a concentração na solução.

Utilizou-se então o valor de $[P_M]$ no lugar de $[P_f]$ na isoterma de equilíbrio e no gráfico de Scatchard para a determinação de constantes de associação que, agora, refletem a interação entre os lipídios da bicamada e os peptídeos acumulados por efeitos eletrostáticos próximos à superfície. A forma do gráfico de Scatchard não é significativamente alterada (Figura 3.4b), mas os valores de K_d obtidos com a correção de Gouy-Chapman são três ordens de grandeza maiores que os calculados de forma convencional (Tabela 3.4). Isso significa que a interação pode ocorrer mesmo com vesículas neutras, porém as concentrações de lipídios necessárias para a observação de efeitos similares aos obtidos com vesículas carregadas deverão ser 10^3 vezes maiores. Os valores de n reduzem-se a cerca da metade do obtido sem correção, caso em que provavelmente estão incluídos os lipídios que contribuem para a formação do potencial atrativo às cargas positivas dos peptídeos.

Tabela 3.4. Parâmetros de ligação de hormônios melanotrópicos em lipídios, a partir de gráficos de Scatchard, com correção eletrostática pelo potencial de Gouy-Chapman. (POPS, 20°C; DMPS, 40°C)

	POPS			DMPS		
	n	K_d (mM)	$-\Delta G$ kcal/M	n	K_d (mM)	$-\Delta G$ kcal/M
α -MSH	25	96	1.4	20	153	1.2
MSH-I	29	20	2.3	25	26	2.3
MSH-II	10	7.8	2.9	10	15	2.7
MSH(7-10)	nd	nd	nd	36	59	1.8

Possivelmente os valores maiores das constantes de dissociação em vesículas de DMPS comparados aos das vesículas de POPS sejam devido às maiores temperaturas no experimentos com DMPS. Os dados da ligação com MML mostram que a interação com

micelas não é específica e podem estar refletindo associações hidrofóbicas das micelas e peptídeos. A partir dos parâmetros de ligação podemos comparar as afinidades dos diferentes peptídeos pelas vesículas de lipídios negativamente carregados. A associação relativa dos peptídeos obedece à ordem MSH-II > MSH-I > α -MSH. Este resultado é consistente com o das modificações na intensidade de fluorescência, posição espectral e anisotropias, apresentados anteriormente, em que as maiores mudanças foram verificadas com MSH-II.

Parece haver uma forte correlação entre a atividade biológica dos peptídeos e os parâmetros de ligação. O análogo MSH-II é 90 vezes mais potente e o MSH-I é 5 vezes mais potente que α -MSH, e ambos possuem atividade prolongada. A correlação sugere que a intensidade da interação do peptídeo com a fase lipídica da membrana celular tenha um papel importante na resposta hormonal mediada por um receptor. Isto é consistente com o conceito de Schwyzer de que o peptídeo interaja inicialmente com a superfície da membrana através de atração eletrostática e, por interação hidrofóbica, seja incorporado à membrana, interagindo então com o receptor, transmitindo a resposta biológica observada (Sargent & Schwyzer, 1986).

A associação do pequeno peptídeo MSH(7-10) às vesículas de DMPS foi significativamente menor que a dos análogos MSH-I e MSH-II. Isto pode ter sido devido, tanto ao seu tamanho pequeno, como à incapacidade de adotar uma conformação favorável à interação, que existiria para os outros dois análogos. Mostrou-se por NMR (Sugg et al., 1986) que MSH-I adota como conformação predominante uma estrutura β . Por sua vez, MSH-II é um análogo cíclico em que a estrutura β pode estar sendo forçada a se manter devido à ligação lactâmica formada entre os resíduos Asp⁵ e Lys¹⁰. É também significativamente menor o número de lipídios associados ao MSH-II, comparado aos outros peptídeos e os resultados sugerem que MSH-II liga-se mais fortemente às vesículas de fosfolipídios porque seu tamanho menor e sua estrutura mais compacta permitiriam uma penetração mais profunda no meio lipídico. Veremos a seguir como a questão da penetração dos peptídeos na bicamada lipídica pode ser estudada por fluorescência.

3.8. Determinação de profundidades de penetração.

a) Supressão por acrilamida e KI

Uma das maneiras de se testar a suposição de que o hormônio penetra na bicamada, baseia-se na interação entre o hormônio e supressores de fluorescência. Iodeto e acrilamida são conhecidos supressores de fluorescência que exercem sua ação através de

mecanismos de supressão colisional. Neste caso, a intensidade de fluorescência de determinado fluoróforo é diminuída em presença do supressor em processo que depende da aproximação das duas moléculas e, portanto, governado pela difusão das mesmas no meio. Uma descrição da supressão é dada pela equação de Stern-Volmer, que foi discutida no capítulo anterior. Como visto, esta equação prevê que a razão entre F_0 (intensidade de fluorescência na ausência de supressor) e $F([Q])$ (intensidade de fluorescência na presença de supressor) é proporcional à concentração $[Q]$ de supressor:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q] \quad (3.6)$$

onde K_D é a constante de Stern-Volmer.

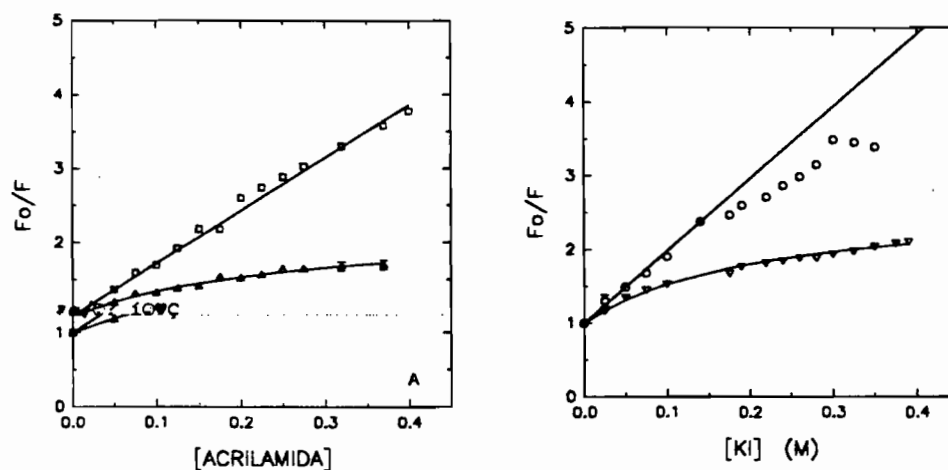


Figura 3.5. Gráficos de Stern-Volmer para supressão por acrilamida em tampão fosfato, pH 7.0 (\square) e na presença de vesículas de DMPG (Δ) e para supressão por KI em tampão (o) e na presença de DMPS (∇). $[\text{lipídio}]/[\text{peptídeo}] = 75$.

Medidas de supressão da fluorescência do α -MSH em meio aquoso por acrilamida resultaram em gráficos de Stern-Volmer lineares. Já as medidas com iodeto de potássio deram gráficos lineares até concentração de supressor da ordem de 150 mM, após o que observa-se desvio da linearidade (Figura 3.5). O acréscimo de KI a concentrações acima de 0.1 M pode introduzir alterações devido a aumento da força iônica do meio, uma vez que esta era mantida constante graças à presença de NaCl à concentração de 0.1 M. Isto significa que a interpretação da parte não linear do gráfico de Stern-Volmer não pode ser feita apenas com base no formalismo que levou à dedução desta última equação. Vamos aqui nos restringir à parte linear do gráfico. Os valores da constante de Stern-Volmer obtidos do ajuste à região linear estão mostrados na Tabela (3.5). A constante de Stern-

Volmer para a supressão com o iodeto é maior que a da acrilamida. Os valores de K_{SV} dependem dos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor. Como este coeficiente para o iodeto é maior que para a acrilamida, resulta que o iodeto apresenta maior eficiência na supressão, refletida no maior valor de K_{SV} .

Na presença de vesículas de fosfolipídios, observa-se uma curvatura no gráfico de Stern-Volmer, indicativa da menor eficiência de supressão da fluorescência do α -MSH, tanto para a acrilamida como para o KI (Figura 3.5). Estes resultados sugerem que, quando vesículas de fosfolipídios estão presentes no meio, uma parcela de fluoróforo torna-se inacessível ao supressor. Admitindo-se que haja inserção de parte do hormônio na bicamada, e sabendo que a supressão ocorre por processos colisionais, torna-se lícito supor que essa parcela inserida na bicamada não tem sua fluorescência suprimida pelas moléculas de acrilamida e iodeto presentes no meio aquoso. Um modelo simples para a descrição dessa situação parte da equação de Stern-Volmer, acrescida da hipótese de que existem duas populações de fluoróforos, uma acessível ao supressor e outra inacessível. Desse modo, a fluorescência total na ausência de supressor é dada por

$$F_o = F_{oa} + F_{ob} \quad (3.7)$$

onde o índice a refere-se à fluorescência da fração f_a de moléculas acessíveis ao supressor e o índice b refere-se à fração inacessível f_b . Na presença do supressor, apenas a fração f_a terá sua fluorescência diminuída conforme a equação de Stern-Volmer. Tem-se, portanto

$$F = \frac{F_{oa}}{1 + K[Q]} + F_{ob} \quad (3.8)$$

onde K é a constante de Stern-Volmer para a fração acessível e $[Q]$ é a concentração da molécula supressora.

Das duas equações acima temos que

$$\Delta F = F_o - F = F_{oa} \frac{K[Q]}{1 + K[Q]} \quad (3.9)$$

Como $f_a = F_{oa}/(F_{oa} + F_{ob})$, segue que

$$\frac{F_o}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K[Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (3.10)$$

Esta equação de Stern Volmer modificada permite a determinação de K e de f_a a partir do gráfico de $F_o/\Delta F$ em função de $1/[Q]$. Os gráficos de Stern-Volmer modificados, para a supressão de fluorescência do α -MSH em presença de vesículas de DMPC, estão ilustrados na Figura 3.6. Os valores para a constante de Stern-Volmer e fração acessível ao supressor são mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros do modelo de Stern-Volmer modificado para supressão de fluorescência do α -MSH por acrilamida e KI, em meio aquoso e em presença de vesículas de DMPG, na proporção [DMPG]/[MSH] igual a 75.

$K_{SV}(M^{-1})$ f_a	Acrilamida		Iodeto	
	sem vesículas	com vesículas	sem vesículas	com vesículas
$K_{SV}(M^{-1})$	7.3 ± 0.4	7.5 ± 0.8	9.8 ± 0.3	12 ± 2
f_a	1.04 ± 0.02	0.58 ± 0.03	1.02 ± 0.02	0.63 ± 0.07

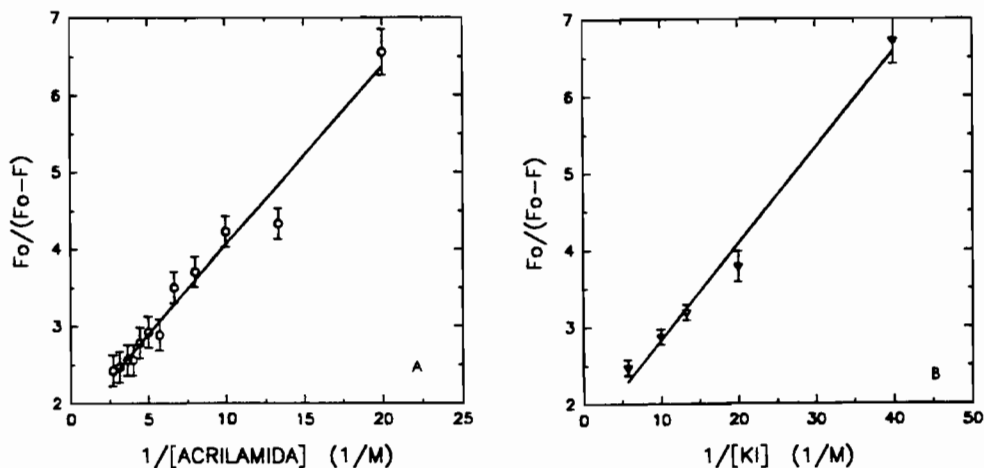


Figura 3.6. Gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão da fluorescência de α -MSH por acrilamida e KI, na presença de vesículas de DMPG

Observa-se na Tabela 3.5 que os valores de K_{SV} são os mesmos, tanto na presença como na ausência de vesículas, sugerindo que apenas as moléculas de hormônio presentes na solução aquosa têm a sua fluorescência suprimida. Parcela considerável dos resíduos triptofano não apresenta interação com os supressores, quando vesículas de DMPG estão presentes no meio. Estes resultados constituem uma evidência adicional de que as mudanças espectrais na fluorescência do triptofano quando o peptídeo está na presença de vesículas de fosfolípidios resultam da inserção do peptídeo na fase lipídica da bicamada. Todavia, com a razão lípidio/peptídeo utilizada, seria de se esperar que a fração acessível fosse menor que o valor encontrado. Cabe notar que o formalismo de Stern-Volmer apresenta limitações, como por exemplo a de se considerar que a supressão ocorra apenas após contato entre fluoróforo e supressor, sem levar em conta que poderia estar havendo supressão desde que o peptídeo não penetrasse muito profundamente na bicamada. Desse modo examinamos novamente a interação do hormônio com os lípidios, levando-se em conta interações de alcance mais longo e colocando-se o próprio supressor na bicamada,

em posições supostamente conhecidas. A determinação da distância entre o triptofano e o supressor foi determinada pelo chamado método da paralaxe.

b) Método da paralaxe

A profundidade de penetração do resíduo triptofano em bicamadas lipídicas, pode ser determinada a partir da comparação entre as eficiências de supressão de sua fluorescência por marcadores nitróxidos incorporados aos lipídios a diferentes distâncias da superfície da bicamada. (McKnight et al., 1991). Supõe-se que nesse caso a supressão seja estática, uma vez que a difusão lateral dos lipídios em bicamadas é suficientemente lenta para que o fluoróforo e supressor mantenham distância fixa durante o tempo de vida do estado excitado. A avaliação quantitativa da posição do fluoróforo em relação à superfície da bicamada é feita a partir dos dados de supressão por supressores localizados em duas posições diferentes na cadeia hidrocarbônica (Chattopadhyay et al., 1987).

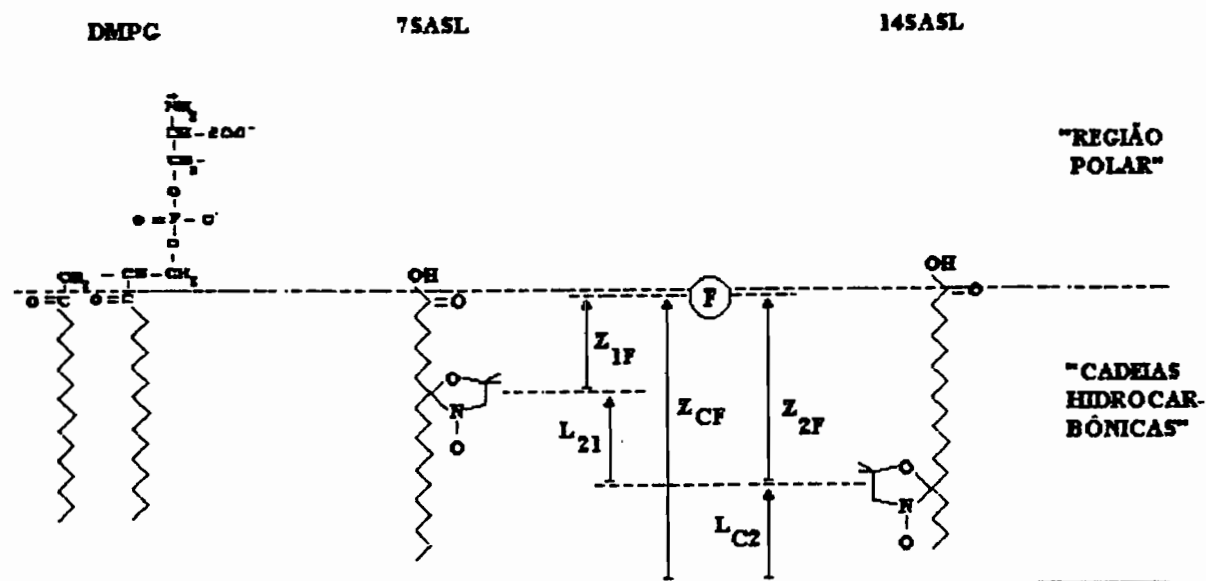


Figura 3.7. Diagrama esquemático descrevendo posições relativas de fluoróforo e lipídios marcados (7SASL e 14 SASL) na metade externa de uma bicamada de lipídios. A linha horizontal inferior representa o centro da bicamada

A equação de Perrin para a supressão, utilizada para analisar a supressão estática para fluoróforos e supressores distribuídos aleatoriamente em um plano, como a superfície de uma membrana biológica, pode ser estendida à análise da supressão no interior da bicamada (London, 1982). A equação de Perrin para a supressão estática bidimensional é escrita

$$F/F_0 = \exp \left[-C \int_0^{\infty} 2\pi r (1 - [f(r)/f_0]) dr \right] \quad (3.11)$$

onde $f(r)/f_0$ é a razão entre a intensidade de fluorescência de um fluoróforo na presença de um supressor à distância r e a fluorescência na ausência do supressor. F/F_0 é a razão entre a fluorescência de todos os fluoróforos na presença e na ausência de de supressores e C é a concentração de supressor, em moléculas por unidade de área.

Na aproximação de esfera rígida (Birks, 1970), a supressão aparece como uma função degrau, em que a razão $f(r)/f_0$ vale zero para $r \leq R_c$ e vale um quando $r \geq R_c$. Nessas condições chega-se a

$$F/F_0 = \exp \left[-C \int_0^{R_c} 2\pi r dr \right] = \exp(-\pi R_c^2 C) \quad (3.12)$$

A expressão πR_c^2 representa um círculo em torno de cada supressor, dentro do qual a fluorescência é completamente suprimida. Para determinar a profundidade de penetração do fluoróforo, é necessário resolver o caso em que fluoróforo e supressor estão localizados em diferentes planos, separados por uma distância $(z^2 + x^2)^{1/2}$, onde z é definida como a distância vertical ou profundidade e x é a distância lateral. Desse modo, a distância $(z^2 + x^2)^{1/2}$ passa a ser a menor distância de aproximação entre o fluoróforo e o supressor, tornando-se o limite inferior da integral na equação (3.12). Isto leva a uma nova expressão para a supressão, na aproximação de esfera rígida:

$$F/F_0 = \begin{cases} \exp(-\pi R_c^2 C + \pi z^2 C + \pi x^2 C), & \sqrt{z^2 + x^2} \leq R_c \\ 1, & \sqrt{z^2 + x^2} > R_c \end{cases} \quad (3.13)$$

Conhecendo-se os valores de x e R_c é possível resolver a equação para z . Na ausência desses números, uma alternativa é comparar os resultados de experimentos com supressores a distâncias diferentes, com o que se eliminam tanto a distância lateral x , como o parâmetro R_c . A razão entre a intensidade de fluorescência (F_1) com o supressor mais superficial (1) e a intensidade (F_2) com o mais profundo (2) é dada por

$$\begin{aligned} \frac{F_1}{F_2} &= \frac{F_1/F_0}{F_2/F_0} = \frac{\exp(-\pi R_c^2 C + \pi z_{1F}^2 C + \pi x^2 C)}{\exp(-\pi R_c^2 C + \pi z_{2F}^2 C + \pi x^2 C)} \\ &= \exp \left\{ \pi C [z_{1F}^2 - z_{2F}^2] \right\} \end{aligned} \quad (3.14)$$

onde z_{1F} é a diferença de profundidade entre o supressor 1 e o fluoróforo e z_{2f} é essa diferença, mas entre o supressor 2 e o fluoróforo. Estando os supressores ligados à cadeia hidrocarbônica em posições conhecidas, sabe-se também o valor de L_{21} , a diferença de profundidade entre os dois supressores (ver Figura 3.7). Substituindo z_{2F} por $L_{21} + z_{1F}$, obtém-se

$$z_{1F} = \frac{\left(-\frac{1}{\pi C} \ln \frac{F_1}{F_2} - L_{21}^2 \right)}{2L_{21}} \quad (3.15)$$

Finalmente, tendo sido determinada a distância z_{1F} , pode-se calcular a distância entre o fluoróforo e o centro da bicamada (z_{CF}) a partir de

$$z_{CF} = z_{1F} + L_{C1} \quad (3.16)$$

onde L_{C1} é a distância entre o centro da bicamada e o supressor 1.

Supressor muito próximo ao centro da bicamada. Um tratamento especial deve ser dado no caso em que um dos supressores encontra-se muito próximo ao centro da bicamada. Nesta situação, supressores na metade oposta da bicamada também podem atuar sobre o fluoróforo. Impondo que o supressor 1 ocupe posição próxima à superfície da membrana e que o supressor 2 esteja próximo ao centro da bicamada, a razão entre as fluorescências F_1 e F_2 , será

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{\exp(-\pi R_c^2 C + \pi z_{1F}^2 C + \pi x^2 C)}{\exp(-\pi R_c^2 C + \pi z_{2F}^2 C + \pi x^2 C) \exp(-\pi R_c^2 C + \pi z_{2f}^2 C + \pi x_{2f}^2 C)} \quad (3.17)$$

Este cálculo não é aplicável à situação em que os dois supressores estejam muito próximos ao centro da bicamada. O índice t refere-se aos valores relacionados com o supressor localizado na camada oposta da membrana, em relação ao fluoróforo. A aproximação lateral mínima, x_{2f} , é zero, pois não há restrição para a aproximação lateral no caso de camadas opostas. A distância entre o fluoróforo e o supressor localizado na camada oposta, z_{2f} , é igual a $2L_{c2} + z_{2F}$, onde L_{c2} é a distância entre o supressor mais profundo e o centro da bicamada. Dessa forma a equação (3.17) pode ser reescrita como

$$z_{1F} = \frac{\left(-\frac{1}{\pi C} \ln \frac{F_1}{F_2} - L_{21}^2 \right)}{2L_{21}} \quad (3.18)$$

O conhecimento de R_c é necessário para o cálculo de z_{1F} . Este valor situa-se geralmente entre 10 e 12 Å (London et al., 1981a).

A profundidade de penetração do α -MSH em vesículas de DMPG e DMPS foi determinada usando os lipídios marcados n-SASL (ácido n-doxil esteárico, n = 7, 9 ou 14) e n-PCSL (1-palmitoil-2-(n-Doxil)estearoil-fosfatidilcolina), nos quais o grupo doxil age como supressor de fluorescência. Os cálculos com os pares 7SASL/14SASL e 5PCSL/12PCSL foram efetuados usando a equação (3.18), que trata do caso particular em que um dos supressores encontra-se próximo ao centro da bicamada. No cálculo com o par 5PCSL/10PCSL, que está em uma região limite, utilizaram-se tanto a equação (3.18) como a equação (3.15), obtendo-se resultados semelhantes. Devido à exigência de que um dos supressores seja superficial, não foram feitos cálculos com os pares 9SASL/14SASL e 10PCSL/12PCSL, casos em que ambos encontram-se relativamente próximos ao centro da bicamada.

Foram adotados ainda os valores de 12 Å para R_c , e 70 Å² para a área superficial de uma molécula de lipídio. A distância entre dois carbonos da cadeia alifática foi considerada igual a 0.9 Å e a separação entre o último carbono e o centro da bicamada foi considerado igual a 0.45 Å (Oldfield et al., 1978; Zaccai et al., 1979; Caffrey et al., 1981; Lewis et al., 1983). A concentração de supressores, em moléculas por unidade de área, é dada pela relação (fração molar de lipídios marcados)/(área de um lipídio). Na Tabela (3.6), apresentamos os resultados obtidos. Os experimentos foram conduzidos com vesículas de DMPG e DMPS em concentrações nas quais ocorria saturação nas titulações, sendo que os lipídios marcados estavam presentes na proporção de 10% da concentração total de lipídios. Os valores das intensidades de fluorescência na presença de supressores (F) foram comparados às intensidades de fluorescência na presença de vesículas sem supressores (F_0) e as razões F_0/F foram utilizadas para o cálculo da distância z_{CF} (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Valores da distância entre o triptofano do α -MSH e o centro da bicamada, calculada para diversos pares de supressores.

	DMPG	DMPS
7SASL/14SASL	8.7 Å	9.4 Å
7SASL/9SASL	7.0Å	9.0Å
5PCSL/10PCSL	7.8Å	-
5PCSL/12PCSL	8.8Å	-

Estes resultados mostram claramente a penetração do α -MSH na fase lipídica de vesículas de DMPG e DMPS. Esta penetração, localizando o resíduo triptofano a cerca de 8.0 Å do centro da bicamada, não é muito profunda, correspondendo à região próxima aos

carbonos 5-6 da cadeia alifática. Os resultados portanto dão suporte à interpretação de que as mudanças espectrais observadas nas melanotropinas em presença de vesículas de fosfolípidos originam-se da inserção dos peptídeos no interior lipídico das vesículas.

3.9. Cinéticas de decaimento em meio aquoso

As medidas de tempo de vida mostraram que o decaimento da fluorescência do triptofano em melanotropinas é descrito por cinética de decaimento multiexponencial, sendo que, em todos os casos, os melhores ajustes aos dados experimentais foram obtidos com três exponenciais. Este comportamento é similar ao encontrado para outros peptídeos pequenos contendo o resíduo triptofano em solução aquosa (Cavatorta et al., 1991, Willys & Szabo, 1992).

Na tabela 3.7 estão listados os parâmetros de decaimento da fluorescência para os peptídeos melanotrópicos em tampão fosfato (pH 7.0), a diferentes temperaturas.

Tabela 3.7. Parâmetros de decaimento da fluorescência de peptídeos melanotrópicos ($10^{-5}M$, tampão fosfato 0,01 M), excitação em 295 nm. Os dados resultam de análise global de várias curvas de decaimento obtidas a diversos comprimentos de onda de emissão. Tempos de vida em nanosegundos.

temp(°C)	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3
α-MSH						
20	3.22	1.49	0.33	0.47	0.35	0.18
30	2.58	1.37	0.35	0.48	0.31	0.21
40	2.13	1.29	0.33	0.36	0.43	0.21
MSH(7-10)						
20	2.32	1.11	0.12	0.55	0.30	0.15
30	2.04	1.40	0.31	0.32	0.52	0.16
40	2.08	1.24	0.26	0.36	0.52	0.12
MSH-I						
20	3.21	1.36	0.23	0.45	0.37	0.18
30	2.76	1.50	0.35	0.38	0.41	0.21
40	2.20	1.27	0.30	0.33	0.47	0.20
MSH-II						
20	3.94	1.73	0.40	0.27	0.46	0.27
30	3.30	1.58	0.42	0.25	0.48	0.28
40	2.75	1.35	0.38	0.21	0.53	0.26

A 20°C todos os peptídeos mostraram um tempo de vida longo, entre 2.32 e 3.94 ns, um tempo intermediário, entre 1.11 e 1.73 ns, e um tempo curto, entre 0.12 e 0.40 ns. Para cada peptídeo, o tempo de vida longo diminuiu com o aumento da temperatura, enquanto os outros dois tempos de vida não variaram muito com a temperatura. A

existência de decaimento multi-exponencial tem sido atribuída a diferentes conformações rotacionais do anel indol em torno da ligação C_{α} - C_{β} da cadeia lateral alanil (Willis & Szabo, 1992; Ross et al., 1992). Acredita-se que orientações diferentes do anel indol fazem com que ele interaja de maneiras diversas com o esqueleto peptídico de proteínas e peptídeos, e, a proximidade ou o alinhamento com o dipolo amida carbonil seja responsável pela modificação do tempo de vida do estado excitado singleto de um rotâmero particular. Voltaremos a essa discussão quando da apresentação de resultados de modelagens realizadas com o peptídeo.

Os experimentos com resolução temporal foram realizados mantendo-se o comprimento de onda de excitação constante e obtendo-se o perfil de decaimento a diferentes comprimentos de onda de emissão. Para cada peptídeo, os tempos de decaimento permaneceram constantes ao longo do espectro de emissão fluorescente, e dessa forma foi realizada uma análise global dos conjuntos de dados medidos a diferentes comprimentos de onda de emissão. Com isso foram gerados espectros associados ao decaimento (DAS, decay-associated spectra, Knutson et al., 1983), dos quais as figuras 3.8 e 3.9 são exemplos típicos.

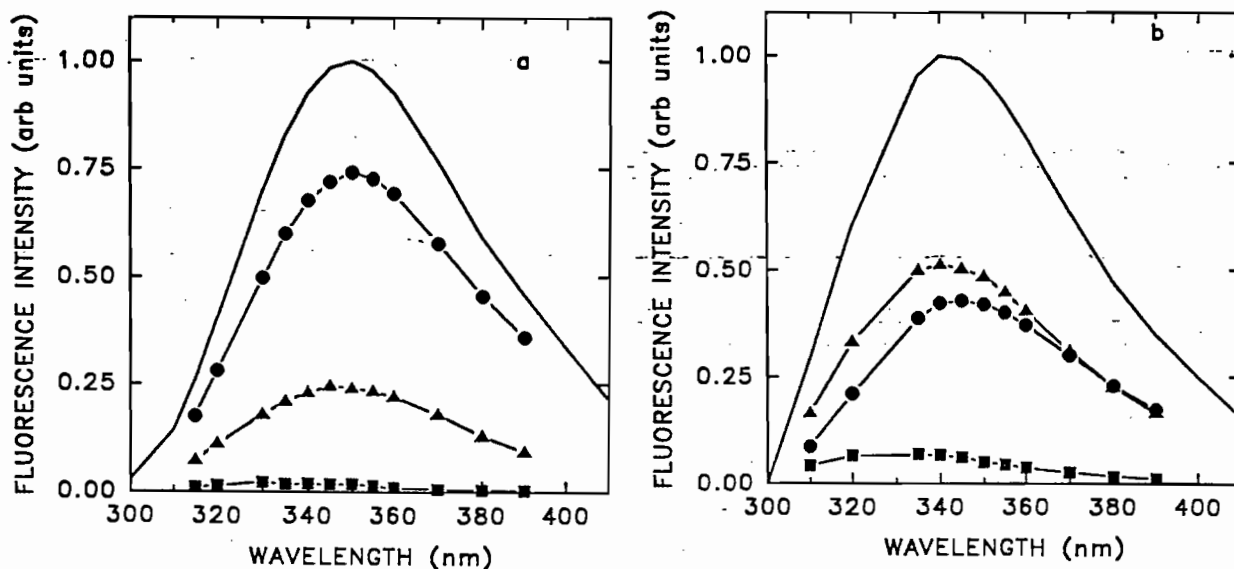


Figura 3.8. Espectro associado de decaimento (DAS) para o MSH-I a 20°C. (a) em meio aquoso, pH 7.0: (●) componente 3.21 ns; (Δ) componente 1.36 ns; (□) componente 0.23 ns; linha contínua - espectro de estado estacionário. (b) em complexos com POPS, [L]/[P] = 75: (●) componente 5.25 ns; (Δ) componente 1.93 ns; (□) componente 0.38 ns.

Na figura 3.8a temos o DAS para MSH-I a 20°C e o mesmo na Figura 3.9a, para a temperatura de 40°C. À temperatura mais baixa a componente longa de decaimento tem

intensidade duas vezes maior que a componente intermediária, enquanto à temperatura mais alta as intensidades das duas componentes estão próximas entre si. Em ambas as temperaturas a componente mais rápida dá apenas uma pequena contribuição à fluorescência total. A 20°C, todos os peptídeos estudados, à exceção do MSH-II, apresentam contribuições relativas das tres componentes nas faixas 72-78: 21-25: 1-3. No caso do MSH-II esses valores são bastante diferentes: 54:40:6, indicando diferenças estruturais relevantes em relação aos outros peptídeos.

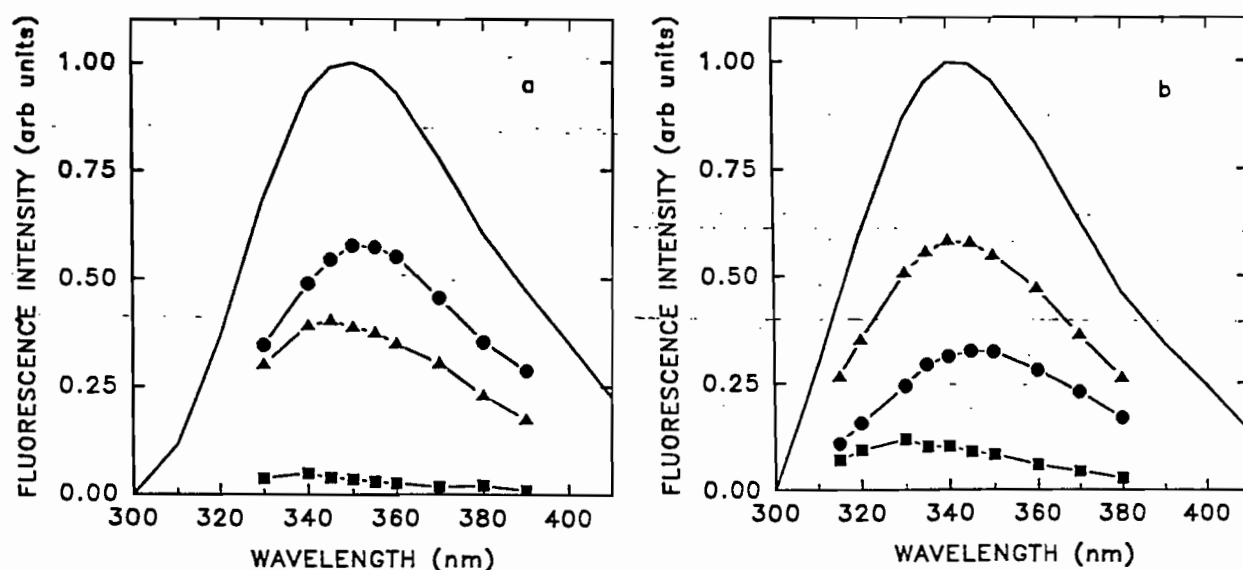


Figura 3.9. Espectro associado de decaimento (DAS) para o MSH-I a 40°C. (a) em meio aquoso, pH 7.0: (●) componente 2.20 ns; (Δ) componente 1.27 ns; (□) componente 0.30 ns; linha contínua - espectro de estado estacionário. (b) em complexos com POPS, [L]/[P] = 75: (●) componente 4.53 ns; (Δ) componente 1.70 ns; (□) componente 0.42 ns.

As áreas integradas de cada componente nos espectros associados de decaimento são proporcionais às concentrações relativas de cada conformação e os termos pre-exponenciais normalizados refletem esses valores (Willis & Szabo, 1992). Para o α -MSH e MSH-I, essas populações relativas são 45-47, 35-37 e 18, para as componentes longa, intermediária e curta, respectivamente (Tabela 3.7). Para o MSH-II, a componente intermediária é mais populada, e os valores relativos são 27,46 e 27. Esta diferença sugere que o MSH-II existe em uma conformação significativamente diferente da dos outros peptídeos, provavelmente originada na ligação lactâmica cíclica entre Asp⁵ e Lys¹⁰. Essa ligação impõe ainda restrições conformacionais à estrutura do peptídeo, compatível com a observação de que as populações relativas das componentes de decaimento mantenham-se praticamente constantes no intervalo de temperaturas estudado. Por outro lado possivelmente os outros peptídeos apresentem menores restrições conformacionais. A

distribuição de rotâmeros do triptofano em PTH (para-thyroid hormone) e peptídeos análogos, quando em estrutura aleatória, apresenta populações relativas das tres componentes de tempo de vida igual a 48, 38 e 14, (Willis & Szabo, 1992), valores próximos aos registrados para o α -MSH e MSH-I a 20°C, sugerindo assim estrutura aleatória para os mesmos. Neste caso, a observação de mudanças na distribuição dos tempos de vida com o aumento da temperatura, pode estar relacionada a modificações na distribuição estrutural dos peptídeos.

3.10. Tempos de vida em complexos com lipídios. Mudanças de conformações.

Na tabela 3.8 estão apresentados os parâmetros obtidos das medidas de fluorescência com resolução temporal para os vários peptídeos em complexos com vesículas de fosfolipídios, realizadas em razões lipídio/peptídeo correspondentes às regiões do plateau das curvas de titulação

Tabela 3.8. Parâmetros de decaimento da fluorescência de peptídeos melanotrópicos ($10^{-5}M$) em presença de lipídios, excitação em 295 nm. Os dados resultam de análise global de várias curvas de decaimento obtidas a diversos comprimentos de onda de emissão. Tempos de vida em nanosegundos.

peptídeo/lipí dio (temp.)	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3
<i>α-MSH</i>						
MML(20)	5.10	2.09	0.43	0.33	0.44	0.23
POPS(20)	4.56	2.16	0.55	0.29	0.48	0.23
DMPG(30)	4.13	1.81	0.46	0.16	0.49	0.35
DMPS(40)	3.75	1.55	0.37	0.14	0.55	0.30
<i>MSH(7-10)</i>						
MML(20)	4.58	1.86	0.38	0.27	0.49	0.24
DMPG(30)	3.64	1.54	0.43	0.14	0.53	0.33
DMPS(40)	3.83	1.46	0.36	0.16	0.38	0.27
<i>MSH-I</i>						
MML(20)	5.19	1.93	0.38	0.31	0.42	0.27
POPS(20)	5.25	2.28	0.53	0.18	0.52	0.29
DMPG(30)	4.77	1.93	0.49	0.14	0.47	0.39
DMPS(40)	4.53	1.70	0.42	0.10	0.52	0.37
<i>MSH-II</i>						
POPS(20)	5.66	2.43	0.54	0.14	0.48	0.37
DMPG(30)	4.88	1.74	0.41	0.08	0.46	0.45
DMPS(40)	4.76	1.83	0.43	0.14	0.44	0.42

A comparação dos dados das tabelas 3.7 e 3.8 mostra que os tempos de vida de decaimento fluorescente dos peptídeos melanotrópicos aumentaram em ambiente lipídico. Este fato é consistente com a localização do anel indol na bicamada de lipídios, com diminuição de processos de desexcitação não radiativa por colisões com moléculas do solvente. O tempo mais longo obtido nos experimentos refere-se ao MSH-II em presença de vesículas de POPS e tal fato, juntamente com os dados de fluorescência no estado estacionário e de constantes de associação sugerem que o MSH-II, o peptídeo de maior atividade biológica, é aquele que penetra mais profundamente na matriz lipídica.

O exame das tabelas permite observar também que as populações relativas das diferentes espécies fluorescentes muda após interação com as vesículas de lipídios. Na suposição de que as populações refletem arranjos estruturais distintos, os resultados indicam a ocorrência de alterações estruturais devido à interação entre os peptídeos e a bicamada de lipídios. O análogo MSH-II apresenta diminuição na população relativa da componente mais longa, e aumento da componente mais curta, em todos os complexos formados com os lipídios. O análogo MSH-I, que apresentava estrutura aleatória em meio aquoso, quando em presença de lipídios, mostra populações relativas próximas à do MSH-II, observação que é mais acentuada nos complexos com DMPG e DMPS do que com POPS. O análogo MSH-II, devido à ligação lactâmica entre Asp⁵ e Lis¹⁰, é estruturalmente estrangido a uma dobra na sequência His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹, que supõe-se assumira uma conformação de dobra β (Sugg et al., 1986; Al-Obeidi et al., 1989). Os resultados de fluorescência sugerem então que o MSH-I, quando da interação com lipídios, adote uma configuração estruturalmente restrita, similar à do MSH-II. Por sua vez, o hormônio nativo α -MSH não adota a mesma conformação dos outros dois análogos, a não ser quando associa-se ao DMPS a 40°C, caso em que as populações relativas das componentes de decaimento ficam similares às do MSH-II. À temperatura de 20°C em presença de POPS, a estrutura do peptídeo é diferente daquela em meio aquoso à mesma temperatura, sem no entanto assumir a estrutura de dobra β . Cabe mencionar ainda que, em micelas de MML, as proporções relativas das componentes do decaimento não diferem muito das obtidas em meio aquoso, porém com predominância da componente de tempo intermediário, mostrando que a estrutura β não é adotada pelos peptídeos nas micelas.

3.11. Simulação de transições estruturais.

A origem do decaimento multiexponencial da fluorescência do triptofano em proteínas e peptídeos tem sido atribuída à existência de diferentes rotâmeros do anel indol.

Por outro lado, os resultados de fluorescência com resolução temporal para os peptídeos melanotrópicos apontam para a existência de transições estruturais na passagem dos peptídeos da fase aquosa para a fase lipídica. Uma vez que os peptídeos em geral são bastante flexíveis, supõe-se que existam famílias conformacionais para os mesmos e que, na mudança entre ambientes diferentes como a água e a bicamada de lipídios, ocorram transições entre famílias estruturais ao invés de transições entre conformações únicas. Realizou-se então um estudo de simulação para a busca de famílias conformacionais para o α -MSH em função dos possíveis rotâmeros para o anel indol no peptídeo, na suposição de que diferentes rotâmeros possam gerar conformações distintas do peptídeo. Além disso, na questão das transições entre diferentes meios, admitiu-se a ocorrência de uma hierarquia de interações, considerando-se interações intramoleculares como predominantes sobre interações com o ambiente. Com isso foi possível a realização de uma análise conformacional a partir de um algoritmo matricial usando potenciais de fase gasosa, como complemento aos dados de espectroscopia de fluorescência do α -MSH em ambientes aquoso e lipídico.

O método empregado fez uso da operação matricial

$$M_n = M_1 \otimes O_2 \otimes O_3 \otimes \dots \otimes O_n \quad (3.19)$$

para a obtenção das famílias conformacionais (Jacchieri & Jernigan, 1992). As energias de interação ΔE_j do resíduo j , necessárias para se calcular os elementos de matriz $\exp(-\Delta E_j/RT)$, foram determinadas com o potencial de fase gasosa de ECEPP/2 (Gibson & Scheraga, 1987). Para verificar a ocorrência de conflitos estéricos na geração de conformações, na presente análise os cálculos efetuados com o algoritmo matricial são seguidos por uma minimização de energia das conformações mais estáveis pertencentes a cada uma das famílias geradas.

Com base nos dados de fluorescência, foi feita uma escolha inicial para os ângulos representativos da cadeia polipeptídica e dos rotâmeros dos grupos laterais de interesse. Foram consideradas cinco possibilidades para os rotâmeros da cadeia principal: α ($\varphi=-57$, $\psi=-47$, $\omega=180$); β ($\varphi=-139$, $\psi=135$, $\omega=180$); γ ($\varphi=-60$, $\psi=-30$, $\omega=180$); δ ($\varphi=-90$, $\psi=0$, $\omega=180$) e ϵ ($\varphi=70$, $\psi=-60$, $\omega=180$). Além disso admitiu-se que o máximo intervalo de interação foi $v_{\max} = 6$ (Jacchieri & Jernigan, 1992). Com estas escolhas para os ângulos diedrais da cadeia principal, são geradas conformações conhecidas para a cadeia, como hélice- α , β strand, reverse turns do tipo I e tipo III e volta γ . As conformações rotaméricas de todas as cadeias laterais com exceção do triptofano foram aquelas mais populadas conforme Ponder & Richards (1987). Levando-se em conta os dados de fluorescência, foram feitos cálculos com três rotâmeros para o triptofano, cujos valores do ângulo χ_1 foram iguais a -60, 180 e 60, correspondentes às conformações rotaméricas

gauche menos, trans e gauche mais, respectivamente. Foram geradas pela equação (3.19), 56 conformações da cadeia principal, para cada conformação rotamérica do triptofano 9. Toda a cadeia foi então submetida a mil passos de minimização de energia com o programa Discover.

As conformações mais estáveis encontradas no intervalo de interações do resíduo 2 até o resíduo 11, bem como as respectivas energias de interação e os valores minimizados de energia estão apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Conformações mais estáveis da cadeia principal encontradas no intervalo de interações dos resíduos 2 a 11 e energias minimizadas das conformações. O intervalo de interações foi crescendo passo a passo de $v=2$ até $v=6$.

Resíduo	configuração	ΔE (kcal/mol) ^b	E (kcal/mol) ^c	E'(kcal/mol) ^d
Tyr ²	$\beta\delta^a$	13840	61499	
Ser ³	$\beta\delta\gamma$	5992	67441	
Met ⁴	$\beta\delta\gamma\gamma$	8483	75924	
Glu ⁵	$\beta\beta\gamma\alpha\gamma$	2557	83541	
His ⁶	$\beta\beta\gamma\alpha\gamma\delta$	-490	100600	
Arg ⁸	$\gamma\alpha\beta\delta\delta\delta$	-41186	76807	
Trp ⁹ (a) ^e	$\alpha\beta\delta\delta\delta\epsilon$	5785	82474	344130
Trp ⁹ (b)	$\alpha\beta\delta\delta\delta\gamma$	3360	80050	356063
Trp ⁹ (c)	$\alpha\beta\delta\delta\beta\beta$	16030	102630	347902
Gly ¹⁰ (a)	$\gamma\alpha\beta\delta\delta\epsilon$	3791	92729	
Gly ¹⁰ (b)	$\beta\delta\delta\delta\gamma\gamma$	3352	83380	
Gly ¹⁰ (c)	$\beta\delta\delta\beta\beta\epsilon$	4111	106150	
Lys ¹¹ (a)	$\delta\delta\delta\beta\alpha\delta$	40706	136080	
Lys ¹¹ (b)	$\delta\delta\delta\gamma\gamma\epsilon$	43819	127200	
Lys ¹¹ (c)	$\delta\delta\beta\beta\alpha\gamma$	42627	149610	

^a os símbolos correspondem à conformação, na cadeia, de cada resíduo no intervalo de interação; ^b energia de interação com resíduos anteriores no intervalo de interação, calculada com potencial ECEPP/2; ^c energia interna do intervalo de interação calculada com potencial ECEPP/2; ^d energia interna de toda a cadeia com minimização de energia usando potenciais Byosim; ^e cadeia lateral de Trp⁹ nas conformações gauche menos (a), trans (b) e gauche mais (c).

Uma análise das estruturas conformacionais correspondentes aos resultados da tabela 1 mostra que a energia de interação bastante negativa da Arg⁸ é devido à formação de uma ponte salina formada entre este resíduo e Glu⁵. Esta ponte, formada nas estruturas em que a cadeia lateral do Trp⁹ apresenta conformações rotaméricas gauche menos e trans, acaba sendo rompida quando a conformação rotamérica é gauche mais, uma vez que neste caso as conformações mais estáveis dos intervalos de interação de Trp⁹ e Arg⁸ não são as mesmas, como pode ser vista na Tabela 3.9. As estruturas obtidas para as três

conformações rotaméricas do Trp⁹ após a minimização de energia são mostradas na Figura 3.10, sendo que a ponte salina Glu⁵-Arg⁸ é vista nas Figuras 3.10a e 3.10b.

Os dados de fluorescência com resolução temporal mostraram que o Trp⁹ apresenta três tempos de vida, tanto em meio aquoso como na presença de vesículas de lipídios, sendo que as populações relativas se modificam quando da mudança de meio (Tabelas 3.7 e 3.8). Verificou-se na presente simulação que diferentes conformações da cadeia principal são encontradas para os diferentes rotâmeros do resíduo Trp⁹. O rotâmero gauche menos corresponde à estrutura com menor energia. A estrutura correspondente ao rotâmero gauche mais tem energia ligeiramente superior, sendo que o rotâmero trans gera a estrutura de energia mais elevada. Embora não existam até o momento explicações detalhadas sobre os mecanismos fundamentais dos processos de decaimento não-radiativo do triptofano, nem isolado, nem participando de cadeias peptídicas, os resultados obtidos mostram que estruturas bastante diferenciadas são produzidas pelos diferentes rotâmeros do triptofano, dando suporte à racionalização corrente acerca da dependência entre decaimentos multiexponenciais e rotâmeros do triptofano.

As estruturas obtidas podem também ser analisadas do ponto de vista das condições que devem ser preenchidas por um peptídeo para uma interação estável com membranas biológicas. Em princípio, um peptídeo com uma superfície altamente hidrofóbica segregada de outra hidrofílica, favorece a interação. As três estruturas obtidas para o α -MSH preenchem esta condição. Além disso, as estruturas representadas nas Figuras 3.10a e 3.10b mostram a ocorrência de uma ponte salina estável Arg⁸-Glu⁵, sendo que 3.10a é energeticamente bastante mais estável que 3.10b. Assim, uma estrutura como a representada na Figura 3.10a, posicionada na interface água-lipídio, deve ter a ponte salina Arg⁸-Glu⁵ na região aquosa e os resíduos Phe⁷, Trp⁹ e Val¹³ interagindo com a bicamada lipídica. Mais ainda, como mostrado pelo código de cores da Figura 3.10, a região hidrofóbica da cadeia é seguida por uma região carregada positivamente, em arranjo espacial adequado para uma interação com vesículas ácidas, como de fato foi observado experimentalmente.

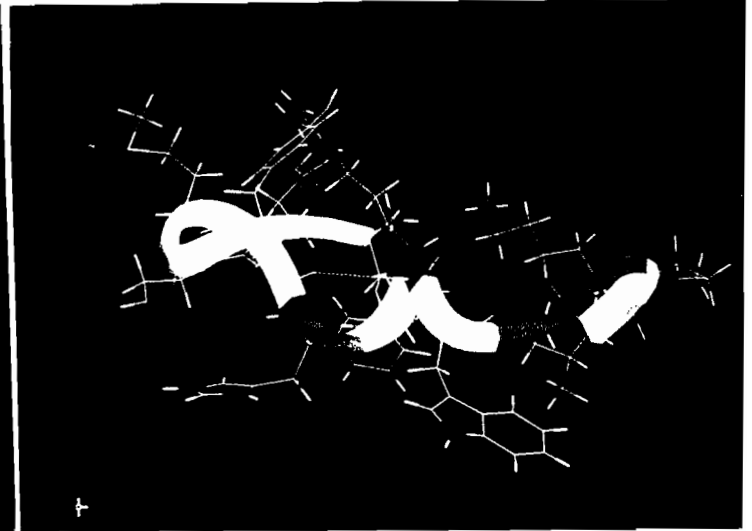
As considerações acima levam a se considerar que a conformação da cadeia correspondente ao rotâmero gauche menos do Trp⁹ é aquela com maior probabilidade de interação com vesículas de lipídios, relacionada assim à espécie mais populada na presença de lipídios, caracterizada pelos tempos de decaimento fluorescente intermediários mostrados na Tabela 3.8. Essa conformação para o hormônio α -MSH deve ser a que apresenta maior semelhança estrutural com o análogo MSH-II que possui uma ligação lactâmica cíclica entre os resíduos Asp⁵ e Lis¹⁰, e mostra a maior associação com as

vesículas, concomitante com a maior atividade biológica. A presente análise conformacional completa um quadro coerente entre a interpretação dos dados de fluorescência do triptofano em melanotropinas, a importância da fase lipídica na modulação das estruturas mais adequadas à uma interação com receptores localizados na membrana e os resultados de medidas da atividade biológica dos hormônios melanotrópicos.

Figure 3.10



(a)



(b)



(c)

CAPÍTULO 4

TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA E MEDIDAS DE DISTÂNCIAS INTERMOLECULARES.

O processo de transferência de energia fluorescente representa um caso à parte nas observações de sistemas que apresentam supressão de fluorescência. A transferência de energia contém informações moleculares diferentes daquelas reveladas por reações de estado excitado, relaxação do solvente, supressão de fluorescência ou polarização da fluorescência e que abordamos nos dois capítulos anteriores. Estas últimas propriedades espectrais revelam principalmente as interações com outras moléculas na camada de solventes adjacente. Diferentemente dos exemplos citados anteriormente, em a que supressão ocorria por interação direta entre a molécula fluorescente e a molécula supressora, temos aqui uma interação à distância, em que a excitação é transferida de uma molécula a outra através de interação de natureza dipolar. Em consequência desse fato, a taxa de transferência de energia depende de r^{-6} sendo r a distância entre a molécula fluorescente e a molécula supressora. A formulação da teoria sobre o processo foi inicialmente elaborada por Forster, e diversos resultados experimentais confirmaram a expectativa da dependência com r^{-6} (Lakowicz, 1986).

A transferência de energia tem sido uma importante ferramenta em ensaios de atividade de enzimas proteolíticas (Yaron et al., 1979). Essas enzimas têm a importante função de quebrar ligações em proteínas permitindo a separação de fragmentos peptídicos que podem apresentar, inclusive, ação hormonal. Por exemplo, o α -MSH é um peptídeo derivado de uma proteína precursora, a pro-ópio melanocortina e sua separação da cadeia principal deve ocorrer por ação de uma enzima proteolítica. Como condição para utilização da transferência de energia é necessário uma molécula fluorescente ou doadora de energia e uma outra para a qual a energia é transferida, ou aceitadora. Como doadora, utilizamos o ácido o-amino benzoico (Abz) e como aceitadora, a molécula N-(2,4,dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnP) (Figura 1). Os peptídeos estudados foram sintetizados com a Abz ligada ao terminal amino e a EDDnP no terminal carboxila. Dada a proximidade existente entre os dois grupos quando estão incorporados a um peptídeo, a fluorescência da Abz fica bastante reduzida. Se houver hidrólise no peptídeo em presença da enzima proteolítica, os grupos doadores e receptores separam-se e ocorre o aumento da fluorescência, sendo o ensaio bastante sensível para se medir a atividade hidrolítica da

enzima, bem como a afinidade entre o substrato e a enzima (Chagas et al., 1991; Juliano et al., 1990).

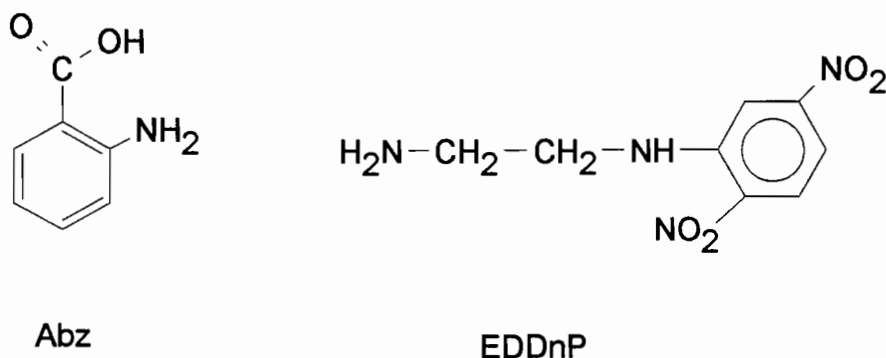


Figura 4.1. Representação esquemática das estruturas do ácido amino-benzoil (Abz) e da N-(2,4,dinitrofenil)-etilenodiamina (EDDnP).

Os estudos apresentados aqui, referem-se a peptídeos da família da bradicinina, um hormônio de tecido que aumenta a permeabilidade vascular, a dor e a inflamação, tendo sido associada a sintomas de resfriado comum (Lee et al., 1990), e cuja sequência de amino ácidos é Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Os peptídeos estudados (listados na Tabela 4.2) atuam como substrato para uma série de enzimas proteolíticas como as Kallikreinas e T-Kininogenases (Chagas et al., 1991), evidenciando a importância da presença das sequências Arg-Pro, no terminal amino, e Phe-Arg, no terminal C, para a ação proteolítica e liberação das bradicininas.

Nosso objetivo ao estudar o sistema foi de outra natureza: procuramos explorar a possibilidade de se medir distâncias entre os grupos Abz e EDDnP nos peptídeos, fazendo uso da dependência conhecida entre a taxa de transferência e a distância entre doador e aceitador. Apresentamos a seguir as propriedades espectrais do fluoróforo e do aceitador, que permitem a utilização do modelo de transferência de energia para a análise da supressão da fluorescência.

4.1. Características espectroscópicas da Abz e da EDDnP: absorção ótica e fluorescência.

As moléculas de Abz e EDDnP (Figura 4.1) apresentam estruturas eletrônicas distintas, refletidas em suas diferentes propriedades de absorção ótica e fluorescência. Um conjunto de parâmetros espectroscópicos das duas moléculas é apresentada na Tabela 4.1.

A Abz apresenta o primeiro máximo de absorção em 310 nm, enquanto para o EDDnP esse máximo ocorre em 352 nm (Figuras 4.2 e 4.3).

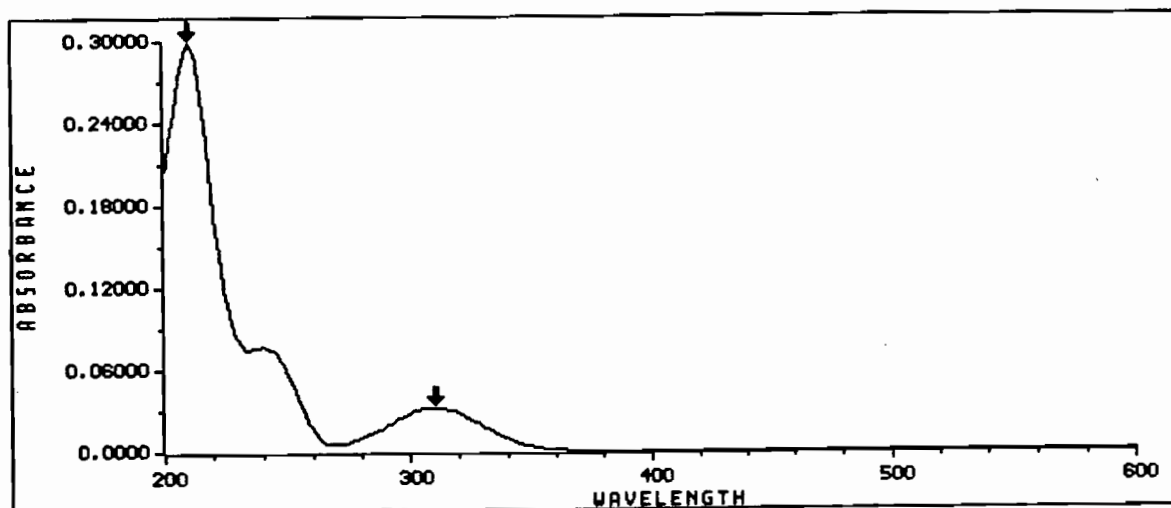


Figura 4.2. Absorção óptica da Abz ($10^{-5}M$) em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4.

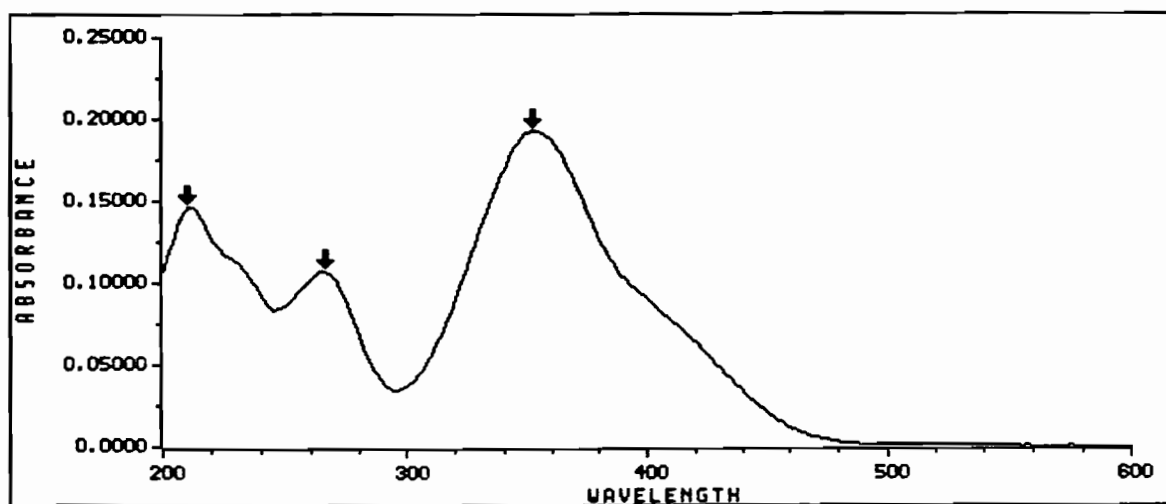


Figura 4.3. Absorção óptica da EDDnP ($10^{-5}M$) em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4.

Por outro lado, a Abz é altamente fluorescente, com rendimento quântico próximo a 0.6 em solventes como etanol e benzeno (Melhuish, 1961). Este valor não é significativamente alterado em meio aquoso. Como estivemos trabalhando sempre em meio aquoso, todos os dados espectrais que obtivemos estarão se referindo à água como solvente. O máximo da emissão fluorescente da Abz ocorre próximo a 400 nm, sendo que seu espectro de emissão apresenta superposição espectral com o espectro de absorção da

EDDnP. Esse fato preenche uma das condições para a ocorrência de transferência de energia entre as duas moléculas. O EDDnP por sua vez, não apresenta fluorescência e, em interação com a Abz, atua como eficiente supressor da fluorescência.

Obtivemos também a curva de decaimento fluorescente da Abz, que é praticamente monoexponencial, com tempo de vida igual a 8.30 ns, comparável ao valor 8.4 obtido em tampão tris por Chen et al. (1967). Uma componente mais curta, com tempo de vida 1.36 ns também foi observada, com termo pré-exponencial negativo, possivelmente devido a uma reação de estado excitado e com pequena contribuição para a emissão fluorescente total.

Tabela 1. Parametros de absorção ótica e fluorescência da Abz e EDDnP em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.0, a 22°C.

	λ_{max}^a	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})^b$	λ_{max}^c	Φ^d	$\tau(ns)^e$
Abz	310	3×10^3	397	0.60	8.30
EDDnP	353	1.9×10^3	-	0.0	-
Abz-FRPR-NH ₂	315	3×10^3	418	0.55	7.79
Abz-P-NH ₂	290		398	0.03	0.16
Abz-PLG-NH ₂	298		436	0.06	2.32

^acomprimento de onda do primeiro máximo de absorção; ^bcoeficiente de extinção no máximo de absorção; ^ccomprimento de onda do máximo de emissão fluorescente; ^drendimento quântico; ^etempo de vida da componente principal.

4.2. Características da Abz-peptídeos.

A Abz pode ligar-se a peptídeos através da ligação entre seu grupo carboxílico e o terminal amina do peptídeo. Procuramos verificar se as propriedades espectroscópicas do Abz são alteradas em função dessa ligação. Espectros de absorção ótica da Abz-FRRPR-NH₂ e Abz-FRPR-NH₂ mostram o primeiro máximo de absorção em 310 nm, similar à Abz sozinha. A ligação peptídica provoca aumento acentuado da absorção na região UV, como pode ser observado na Figura 4.4, sem que se altere significativamente o coeficiente de extinção na banda em 310 nm (Tabela 4.1).

A emissão fluorescente da Abz em peptídeos é ligeiramente modificada, com pequena diminuição no rendimento quântico. A cinética de decaimento torna-se definitivamente monoexponencial, com tempo de vida de emissão fluorescente igual a 7.79 ns, um pouco abaixo do valor para a Abz isolada (Tabela 4.1). Registra-se também um deslocamento de aproximadamente 20 nm no máximo de emissão fluorescente, em direção ao vermelho (Figura 4.5). Este conjunto de características está também presente em diversos peptídeos nos quais o resíduo adjacente ao Abz não é a prolina. A suposição é de

que a presença do amino, junto com a carboxila, seja determinante para as propriedades óticas da Abz. Nos peptídeos, a carboxila forma uma ligação análoga à ligação peptídica, mantendo as propriedades básicas da Abz. Na Abz-prolina, ocorre a formação de uma estrutura rígida, que altera sensivelmente as propriedades óticas da Abz.

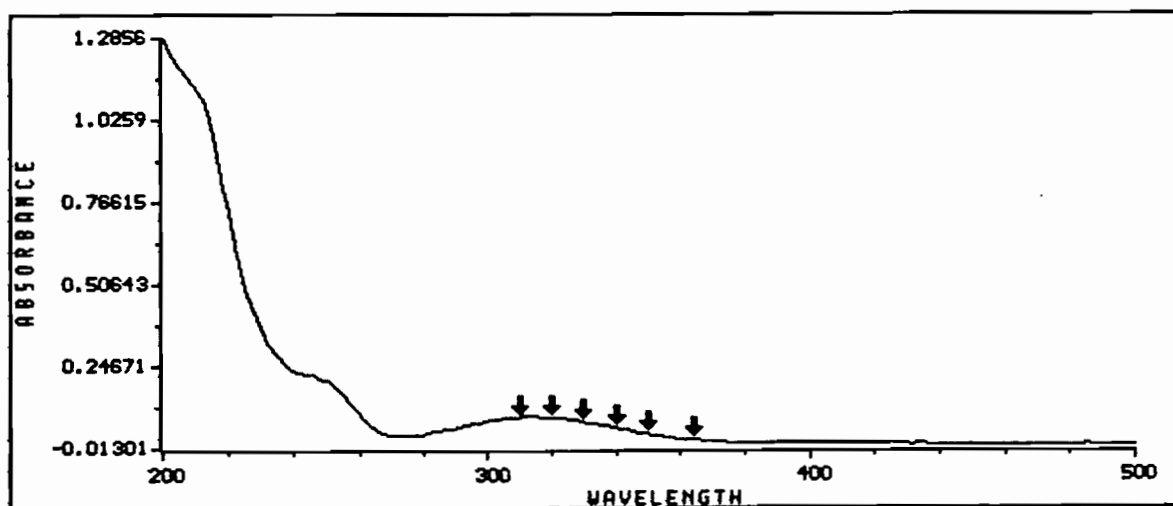


Figura 4.4. Absorção ótica da Abz-FRPR-NH₂ (10⁻⁵M) em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4.

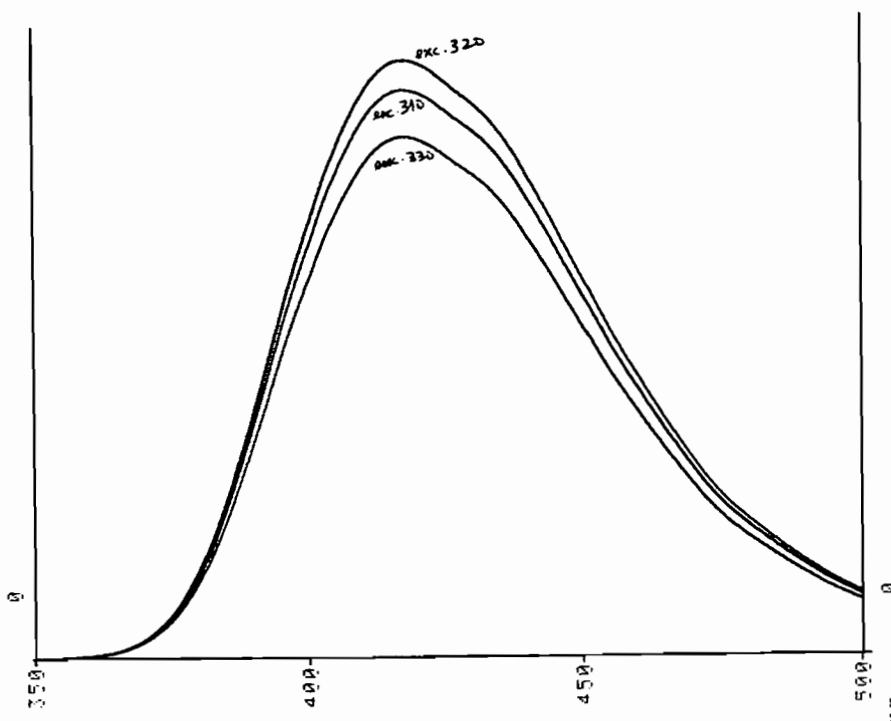


Figura 4.5. Espectro de fluorescência da Abz-FRPR-NH₂ (10⁻⁵M) em tampão fosfato, pH 7.0, excitação em 310 a 330 nm.

Quando a Abz está diretamente ligada a um resíduo prolina, o primeiro máximo de absorção desloca-se para o UV, sendo igual a 290 nm. Por sua vez, a fluorescência da Abz-Pro-NH₂ fica drasticamente alterada, com redução considerável do rendimento quântico. Pela diminuição no tempo de vida, seria de se esperar uma redução de mesma ordem no rendimento quântico, supondo que a tempo de decaimento intrínseco não se modifique. Todavia esse fator ficou em 20 para o rendimento quântico, enquanto foi de 50 no tempo de vida. Note-se porém que na medida de decaimento, observou-se a presença de uma componente de 8.3 ns (90% da emissão total), que podemos atribuir à presença de Abz não ligada à Pro. Assim, a emissão no estado estacionário contaria com a contribuição dessa população de Abz, responsável, não apenas pelo valor elevado de rendimento quântico em confronto com o esperado, mas também pelo fato de que a banda de emissão tem seu máximo em 398 nm, o mesmo valor obtido para a Abz isolada. Considerando que apenas 10% da emissão total seja devido à população de Abz-Pro-NH₂, o tempo de vida intrínseco do estado fluorescente seria de 53 ns.

Foram efetuadas também medidas em Abz-PLG-NH₂, peptídeo no qual a Pro é o primeiro resíduo, mas o terminal amino fica afastado do Abz. Neste caso, o deslocamento espectral na absorção ótica é de 10 nm, com o máximo de absorção em 300 nm. A cinética de decaimento é monoexponencial, com tempo de vida de 2.32 ns (redução de um fator de 3.5), com rendimento quântico diminuindo para 0.06 (diminuição de um fator de 10). Isto significa que houve mudança na taxa de decaimento radiativo, com aumento no tempo de vida intrínseco de decaimento radiativo, que passa a 38.7 ns. Os dados indicam que a alteração na estrutura eletrônica devido ao resíduo prolina leva a um aumento no tempo de vida do processo radiativo de decaimento. Dessa forma, a diminuição na intensidade de fluorescência deve ser atribuída a um aumento nas taxas dos processos não radiativos de decaimento. A importância da posição relativa do grupo NH₂ fica bastante evidente desses resultados.

4.3. Características da Abz em presença do EDDnP

Quando moléculas de Abz e EDDnP estão em meio aquoso, não há interferências mútuas nos espectros de absorção ótica, de modo que o espectro resultante é simplesmente uma superposição dos espectros individuais. Por sua vez ocorre atenuação no espectro de emissão fluorescente, de modo que a concentrações equimolares de Abz e EDDnP, a intensidade de fluorescência é cerca de 80% da emissão da Abz. Essa supressão tem origem em processos de transferência de energia (Yaron et al., 1979) e, portanto,

depende da distância de separação entre as duas moléculas. Quando Abz e EDDnP estão incorporadas em peptídeos nos quais o resíduo adjacente à Abz não é a prolina, o espectro de absorção ótica é, em linhas gerais, semelhante ao caso das moléculas dispersas no meio aquoso: o espectro resultante é também igual à superposição dos espectros de Abz-peptídeos e de EDDnP (Figura 4.6).

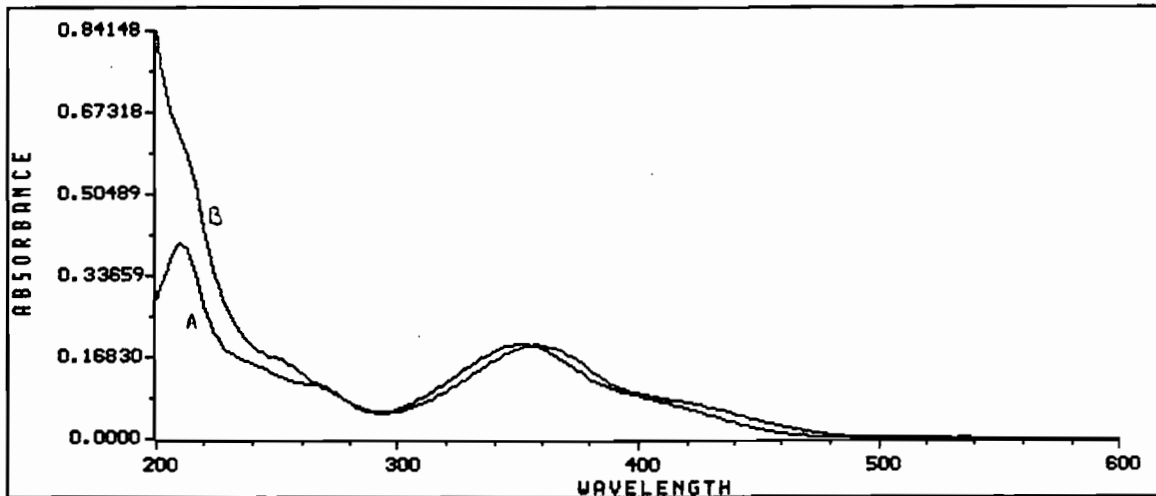


Figura 4.6. Absorção ótica da Abz-bradicinina-EDDnP (10^{-5} M) em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4.

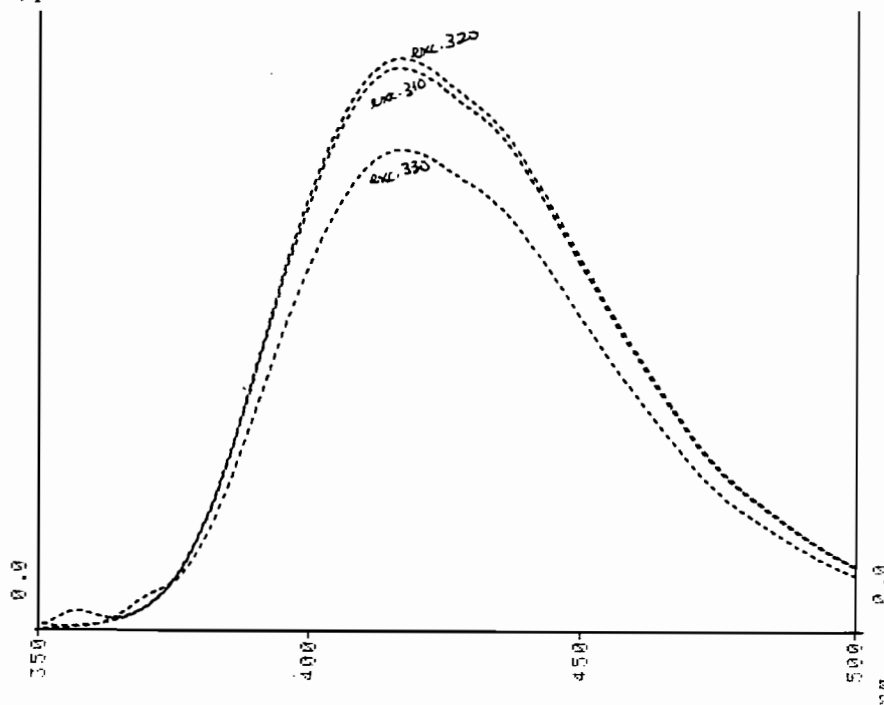


Figura 4.7. Espectro de fluorescência da Abz-bradicinina-NH₂ (10^{-5} M) em tampão fosfato, pH 7.0, excitação em 310 a 330 nm.

O fato marcante nos peptídeos contendo Abz e EDDnP é a manutenção da forma do espectro de emissão fluorescente, (Figura 4.7), que é semelhante ao mostrado na Figura 4.5, porém com grande redução na intensidade de fluorescência, devido à proximidade existente entre as duas moléculas. Uma análise do processo de supressão fluorescente devido à transferência de energia permite a determinação da distância entre a Abz e o EDDnP.

4.4. Taxa de transferência de energia.

A transferência de energia de excitação é um processo que se origina da interação entre os momentos de dipolo de transição do doador e do receptor. O modelo para explicação do fenômeno foi inicialmente formulado por Förster e mostra-se que a taxa de transferência de energia é dada por

$$k_t = \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 \phi_d}{128 \pi^4 n^4 N_0 \tau_d r^6} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \epsilon_a(\nu) d\nu}{\nu^4} \quad (4.1)$$

onde ϕ_d , τ_d e F_d são, respectivamente, o rendimento quântico, o tempo de vida e a intensidade de fluorescência (normalizada para intensidade total igual a 1) do doador, ϵ_a é o coeficiente de extinção do aceitador, ν o número de onda, n o índice de refração do meio, N_0 o número de Avogadro, r a distância entre doador e aceitador e κ é o chamado termo de orientação, dado por

$$\kappa^2 = (\cos\theta_t - 3\cos\theta_d \cos\theta_a)^2 \quad (4.2)$$

sendo que θ_t é o ângulo entre o dipolo de emissão do doador e o dipolo de absorção do aceitador, e θ_d e θ_a são os ângulos entre esses dipolos e o vetor que liga o doador e o aceitador.

A expressão para a taxa de transferência de energia traz a dependência com r^{-6} , que é explicitada na relação

$$k_t = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (4.3)$$

onde R_0 é a chamada distância de Förster, englobando todos os termos da equação (1), exceto o tempo de vida τ_d e a distância r . Dessa maneira a distância R_0 é dada, em Å, por

$$R_0 = 9.79 \times 10^3 (\kappa^2 n^{-4} \phi_d J)^{1/6} \quad (4.4)$$

sendo que em J aparece a integral de superposição espectral, dada em função do comprimento de onda λ , pela equação

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (4.5)$$

Uma eficiência na transferência de energia pode ser definida como a razão entre a taxa de transferência e a somatória de todos os processos de decaimento do estado excitado, ou seja

$$E = \frac{k_t}{\sum k_i} = \frac{k_t}{k_t + \Gamma_d} \quad (4.6)$$

onde Γ_d inclui todos os processos de desexcitação do doador na ausência do aceitador. Como $(\Gamma_d)^{-1} = \tau_d$, a equação (4.3) pode ser re-escrita como

$$E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} = 1 - \frac{F_{da}}{F_d} \quad (4.7)$$

na qual τ_{da} e F_{da} são o tempo de vida e a intensidade de fluorescência na presença do aceitador.

Por outro lado, dada a dependência de k_t com r e R_0 mostrada na equação (4.3), a eficiência na transferência pode ser também escrita

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (4.8)$$

Dessa forma, juntando-se as equações (4.7) e (4.8), ficamos com a seguinte dependência entre a distância r e as intensidades de fluorescência na ausência (F_d) e na presença de aceitador (F_{da}):

$$r^6 = \frac{R_0^6 (F_{da}/F_d)}{1 - F_{da}/F_d} \quad (4.9)$$

A partir das informações espectrais pudemos calcular a distância R_0 e medindo-se as intensidades de fluorescência para uma série de peptídeos, pudemos fazer a determinação da distância r de separação entre Abz e EDDnP nesses peptídeos.

4.5. Determinação de distâncias Abz-EDDnP

Foi examinada uma série de peptídeos da família das bradicininas, relacionados na Tabela 4.2. Os dois primeiros peptídeos serviram como referência para as determinações das propriedades de fluorescência da Abz (doador) na ausência de EDDnP (receptor):

tempo de vida, rendimento quântico, espectro de emissão. A integral de superposição J foi calculada usando também o espectro de absorção do EDDnP em tampão fosfato 0.01M, pH 7.4. O índice de refração utilizado foi igual a 1.4. Para o uso da equação (4), necessita-se ainda o conhecimento do fator de orientação κ , que pode variar desde 0 até 4, conforme a equação (4.2). Considerando que os doadores e receptores estejam ocupando todas as orientações possíveis, que não mudam durante o tempo de vida do estado excitado é obtido um valor médio para κ igual a 0.476 (Steinberg, 1971). Dessa forma, a partir da equação (4.4) obtém-se para a distância R_o o valor de 32.5 Å.

A partir dos espectros de fluorescência de cada um dos peptídeos, determinou-se a intensidade de fluorescência F_{da} , de modo que, a partir da equação (4.9), foi determinada a distância r entre doador e receptor. Estes valores estão indicados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Peptídeos da família das bradicininas, medidos em tampão fosfato 0.01 M, pH 7.4. concentração de peptídeos, 10^{-5} M.

peptídeo	F_{da}/F_d	r (Å)
Abz-FRPR-NH ₂	1	-
Abz-FRRPR-NH ₂	1	-
Abz-FRSSRQ-EDDnP	0.0116	18.0
Abz-FRSSRE-EDDnP	0.0145	18.6
Abz-GFSPFRSSRQ-EDDnP	0.0389	22.0
Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnP	0.091	25.0
Abz-RPPGFSPFRSSRQ-EDDnP	0.072	24.7

Observa-se imediatamente da Tabela (4.2) que a dependência entre a distância doador-receptor e o número de resíduos que compõem a cadeia peptídica não é linear. Essa distância reflete a separação entre o resíduo inicial e o resíduo terminal da cadeia, que não pode aumentar linearmente devido às interações intramoleculares que levam à estrutura secundária do peptídeo. Note-se que o peptídeo representativo da bradicinina (RPPGFSPFRQ) apresenta 25 Å como distância ponta a ponta. Essa distância é de 18 Å para os peptídeos compostos de apenas 6 resíduos (FRSSRQ ou FRSSRE) que apresentam a sequência FRS, que é clivada originando o ramo terminal C da bradicinina. Esses peptídeos possuem, portanto, uma estrutura bem mais estendida que a bradicinina. Por outro lado, essa mesma sequência acrescida de quatro resíduos da sequência da bradicinina (GFSPFRSSRQ) tem a distância aumentada para apenas 22 Å, sugerindo um dobramento da estrutura. Observe-se por fim que o peptídeo mais longo, que contém a sequência da bradicinina e o grupo clivado no terminal C, tem distância entre as

extremidades igual a 24.7 Å. Esses resultados sugerem que a sequência estendida clivada por kallikreinas, apresenta dobramento quando completada com os amino-ácidos que completam a sequência da bradicina em direção ao terminal N.

Estudos por espectroscopia Raman indicam que na bradicinina em meio aquoso coexistem estruturas ordenadas e desordenadas, observando-se uma dobra estrutural, sem que se possa estabelecer conclusivamente se ela é da forma β ou γ (Fok et al., 1982). Em estudos por NMR de fragmentos de bradicinina contendo os 5 ou 6 primeiros amino-ácidos, encontram-se evidências de dobra β na sequência Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵ (Dive et al., 1982). Experimentos de NMR conduzidos em peptídeos contendo o terminal C completo da bradicinina, sugerem a ocorrência de dobra β envolvendo a sequência Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸, que possivelmente conteria uma ligação H entre o oxigênio carbonil da Ser⁶ e o hidrogênio amida do resíduo Arg⁹ (Lee et al., 1990).

Apesar de não permitirem uma determinação direta das estruturas dos peptídeos, os dados que obtivemos dos experimentos de transferência de energia são consistentes com a sugestão de que a região central do peptídeo completo, contendo os resíduos FSPF, podem estar relacionados à ocorrência de dobra na estrutura. A ocorrência dessa dobra é coerente com o comportamento que obtivemos para a distância ponta a ponta dos peptídeos que estudamos e que cobrem tanto a região de terminal C como a do terminal N da bradicinina.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Apresentamos neste trabalho diversos aspectos de uma técnica específica, a espectroscopia de fluorescência, quando utilizada no estudo de sistemas biológicos. Além dessa característica que acabamos de apontar, os estudos aqui descritos tiveram em comum o emprego de modelos e da metodologia desenvolvidas pela Física para uma tentativa de descrição da própria Física envolvida em fenômenos de interesse biológico.

Um aspecto bastante explorado foi o da supressão da fluorescência, no qual modelos fenomenológicos como o de Stern-Volmer ou o de Perrin foram utilizados na tentativa de se caracterizar a interação entre uma molécula fluorescente e outras moléculas presentes no meio. Todavia a supressão não pode ser vista apenas como uma simples diminuição de fluorescência, uma vez que diversos processos podem atuar simultaneamente resultando no decréscimo da intensidade de fluorescência. Assim, informações obtidas com experimentos de estado estacionário foram combinados com informações de resolução temporal para interpretação adequada dos resultados.

Com esse procedimento, foi possível estabelecer um modelo para a interação entre melaninas e porfirinas catiônicas, mostrando que formam-se complexos no estado estacionário e que esses complexos dissipam a energia de excitação através de vias não radiativas para o decaimento do estado excitado. Levando-se em conta a participação, tanto da melanina como das porfirinas, em processos de interação com a luz UV-visível, os resultados mostraram que uma das características do pigmento consiste não apenas na sua capacidade de dissipação da energia absorvida diretamente da radiação, mas também na adequação de sua estrutura para a supressão de estados singleto excitados de outros fotossensibilizadores como as porfirinas.

Com base nos modelos físico-químicos para a caracterização da formação de complexos, foi possível a verificação de que a melanina possui mais de um sítio para a interação com as porfirinas catiônicas, confirmando as hipóteses sobre o caráter heterogêneo do pigmento, bem como sobre a contribuição de diferentes tipos de interações (eletrostática, hidrofóbica, coordenação com metais) na formação dos complexos melanina-porfirina (Ito et al., 1992, Ridente et al., 1993)

A análise de modelos para supressão permitiu também a verificação inequívoca da inserção de resíduos triptofano constituintes de melanotropinas em bicamadas de lipídios,

além da determinação de profundidades de penetração (Macedo, 1993). Essa inserção foi sugerida pelos resultados combinados de deslocamento espectral, variação de intensidade de fluorescência e mudanças na anisotropia de polarização de melanotropinas em presença de vesículas de fosfolípidios. Nesse caso, utilizaram-se modelos sobre a dependência entre a estrutura eletrônica do triptofano e a polaridade do meio em que se encontra, e entre a despolarização da emissão fluorescente e o grau de restrições que o meio impõe ao movimento do fluoróforo, para demonstrar a ocorrência de interação entre as melanotropinas e vesículas de fosfolípidios.

Foi verificado que a interação era observada apenas quando as cabeças polares dos fosfolípidios apresentavam carga residual negativa. Dado que as melanotropinas apresentam carga residual positiva a pH neutro, foi necessário o emprego do modelo de Gouy-Chapman para descrição da contribuição eletrostática à interação. Também aqui, modelos físico-químicos permitiram determinar constantes de associação e variações de energia livre para o processo de inserção de peptídeos na fase lipídica de bicamadas, mostrando que esses parâmetros estão correlacionados à atividade biológica dos análogos de melanotropinas (Ito et al., 1993).

Os dados de fluorescência com resolução temporal foram analisados segundo o modelo que associa diferentes tempos de vida de fluorescência do triptofano a diferentes rotâmeros em torno da ligação $C_{\alpha}-C_{\beta}$, que estariam relacionados a diferentes estruturas para os peptídeos. Dentro desse quadro, a passagem das melanotropinas da fase aquosa para a fase lipídica ocorreria juntamente com a mudança de estrutura dos peptídeos. Os resultados deram suporte à suposição de que a fase lipídica exerce uma importante função como catalizadora de modificações conformacionais para hormônios peptídeos. A associação entre rotâmeros para o triptofano e conformações do peptídeo encontrou confirmação, para o α -MSH, por estudos de simulação empregando métodos de álgebra matricial (Jacchieri and Ito, 1994).

Finalmente, os resultados de fluorescência de peptídeos contendo um grupo fluorescente exógeno cuja emissão apresenta superposição espectral com a absorção de uma outra molécula, foram analisados segundo o modelo de Forster para transferência de energia. Isso possibilitou a determinação de distâncias entre as extremidades de peptídeos da família das bradicininas, confirmando sugestões originadas de trabalhos com outras técnicas espectroscópicas, da ocorrência de conformações com dobras em posições específicas na sequência dos peptídeos.

A delimitação precisa dos contornos que definem uma área de pesquisa nem sempre é possível de se realizar e essa dificuldade é ainda maior em uma área multidisciplinar como a Biofísica. Todavia, uma generalização aceita nas pesquisas em

Biofísica é a necessidade do uso de diversas técnicas espectroscópicas para a compreensão dos sistemas e processos de interesse biológico em estudo. Emerge dos diversos trabalhos apresentados, a adequação da espectroscopia de fluorescência à obtenção de informações acerca de diversos problemas. Jamais poderá ser pensada como única fonte de informações, mas sua utilização combinada a outras técnicas e métodos, tanto experimentais quanto teóricos, será capaz de oferecer explicações relevantes sobre a Física de fenômenos de interesse biológico.

REFERÊNCIAS

- Al-Obeidi, F., Hadley, M.E., Pettitt, B.M. and Hruby, V.J. (1989a) *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3413-3416.
- Al-Obeidi, F., Castrucci, A.M.L., Hadley, M.E., and Hruby, V.J. (1989b) *J. Med. Chem.*, 32, 2555-2561
- Beechem, J.M. and Brand, L. (1985) *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 43-71.
- Beschiaschvili, G. and Seelig, J. (1990) *Biochemistry*, 29, 52-58.
- Bielec, J., Pilas, B., Sarna, T. and Truscott, T.G. (1986) *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 82, 1469.
- Birks, J. B. (1970) *Photophysics of Aromatic Molecules*. Wiley-Interscience, London.
- Bridelli, M.G., Deriu, A. and Ito, A.S. (1986) *Hyperf. Inter.*, 29, 1395-1398, .
- Brokfield, R.L., Ellul, H. and Harriman, A. (1985) *J. Photochem. Photobiol.*, 31, 97.
- Caffrey, M. and Feifenson, G. W. (1981) *Biochemistry* 20, 1949.
- Callis, P.R. (1991) *J. Chem. Phys.*, 95, 4230-4240.
- Castrucci, A.M de L., Sawyer, T.K., Al-Obeidi, F., Hruby, V.J. and Hadley, M.E. (1990). *Drugs of the future*, 15, 41-55, .
- Cavatorta, P., Spisni, A., Szabo, A.G., Farruggia, G., Franzoni, L. and Masotti, L. (1989) *Biopolimers*, 28, 441-463.
- Cavatorta, P., Sartor, G., Neyroz, P., Farruggia, G., Franzoni, L., Szabo, A.G., and Masotti, L. (1989) *Biopolimers*, 31, 653-661.
- Chagas, J.R., Hirata, I.Y., Juliano, M.A., Xiong, W., Wang, C., Chao, J., Juliano, L., and Prado, E.S. (1992) *Biochemistry*, 31, 4969-4974.
- Chattopadhyay, A. and London, E. (1987) *Biochemistry*, 26, 39-45.
- Chen, R., Vurek, G. G., and Alexander, N. (1967) *Science*, 156, 949-951.
- Chung, L.A., Lear, J. D. and DeGrado, W.F. (1992) *Biochemistry*, 31, 6608-6616.
- Crippa, P.R. & Viappiani, C. (1990) *Eur. Biophys. J.*, 17, 299.
- Crippa, P.R., Cristofolletti, V. & Romeo, N. (1978) *Bioch. Biophys. Acta*, 538, 164.
- Crippa, P.R. & Mazzini, A. (1983) *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, 15, 51.
- Cullis, P.R. and Hope, M.J. (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes* (Vance, D.E. and Vance, J.E., Eds.) pp 25-72, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- D'Amato, R.J., Lipman, Z.P. and Snyder, S.H. (1986) *Science*, 231, 987.

- Dive, V., Lintner, K., Fermandjian, S., St.Pierre, S. and Regoli, D. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 123, 179-190.
- Fox, J.W., Vavrek, R.J., Tu, A.T. and Stewart, J.M. (1982) *Peptides*, 1, 193-198.
- Galvão, D. and Caldas, M. J. (1988) *J. Chem. Phys.*, 88, 4088.
- Gan, E.V., Haberman, H.F. and Menon, I.A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 370, 62-69.
- Gan, E.V., Haberman, H.F. and Menon, I.A. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, 173, 666.
- Gibson, K. and Scheraga, H. A. (1987) *J. Comput. Chem.* 8, 826.
- Girotti, A. (1979) *Biochemistry*, 18, 4403.
- Gouterman, M. (1961) *J. Mol. Spectrosc.*, 6, 138.
- Hadley, M.E. and Castrucci, A.M.L. (1988) *The Melanotropic Peptides* (Hadley, M.E., ed.) Vol III, pp 15-25, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hadley, M.E., Abdel-Malek, Z.A., Mewan, M.M., Kreutzfeld, K.L. and Hruby, V.J. (1985) *Endocrinol. Res.*, 11, 157-160.
- Ho, Y.K., Pandey, R.K., Missort, J.R., Bellnier, P.A. and Dougherty, T.J. (1988) *Photochem. Photobiol.*, 48, 445.
- Hruby, V.J., Wilkes, B.C., Cody, W.L., Sawyer, T.K. and Hadley, M.E. (1984) *Peptide and Protein Reviews* (Hearn, M.T.W., Ed.) Vol. 3, pp 1-64, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ito, A.S. and Crippa, P.R. (1985) *Physiol. Chem. and Phys. and Med. NMR*, 17, 205-209, .
- Ito, A.S., Azzellini, G.C., Silva, S.C., Serra, O. and Szabo, A.G. (1992) *Biophys. Chem.*, 45, 79-89.
- Ito, A.S., Castrucci, A.M.L., Hruby, V., Hadley, M.E., Krajcarski, D.T. and Szabo, A.G. (1993) *Biochemistry*, 32, 12264-12272.
- Jacchieri, S.G. and Jernigan, R. L. (1992) *Biopolimers* 32, 1237.
- Jacchieri, S.G. and Ito, A.S. (1994) Sanibel Simposium, USA.
- Jain, M.K., Rogers, J., Simpson, L, and Gierasch, L.M. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 846, 153-162.
- Jimbrow, M., Kanoh, H. & Jimbow, K. (1982) *J. Invest. Dermat.*, 79, 97.
- Jori, G. and Perria, C. (1985) *Photodynamic therapy of tumors* Libreria Progetto, Padova.
- Juliano, L., Chagas, J.R., Hirata, I.Y., Carmona, E., Sucupira, M., Oliveira, E.S., Oliveira,E.B. and Camargo,A.C.M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 173, 647-652.

- Kano, K., Nakajima, T., Takei, M. and Hashimoto, S. (1987) *Bull. Chem. Soc. Japan*, 60, 1281.
- Kano, K., Nakajima, T. and Hashimoto, S. (1987) *J. Phys. Chem.*, 91, 6614.
- Kawamura, M.R. (1986) Tese de Doutorado, *IFUSP*.
- Knutson, J.R., Beechem, J.M. and Brand, L. (1983) *Chem. Phys. Lett.*, 102, 501-507.
- Kuchinka, E. and Seelig, J. (1989) *Biochemistry*, 28, 4216-4221.
- Kollias, N., Sayre, R.M., Zeise, L. and Chedekel, M.R. (1991) *J. Photochem. Photobiol. B*, 9, 135-160.
- Korytowski, W., Pilas, B., Sarna, T. and Kalyanaraman, B. (1987) *Photochem. Photobiol.*, 45, 185.
- Kozik, A., Korytowski, W., Sarna, T. and Bloom, A.S. (1990) *Biophys. Chem.*, 38, 39.
- Lakowicz, J.R. (1986) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York and London.
- Lee, S.C., Russell, A.F. and Laidig, W.D. (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35, 367-377.
- Lewis, P.A. and Engelman, D. (1983) *J. Mol. Biol.*, 166, 24.
- London, E. (1982) *Mol. and Cell Biochem.*, 45, 181.
- London, E. and Feigenson, G. W. (1981) *Biochemistry*, 20, 1932.
- Losi, A., Bedotti, R., Brancaleon, L. and Viappiani, C. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B*, 21, 69-76.
- Macedo, Z.S., (1993) Dissertação de Mestrado, *IFUSP*.
- MacKinnon, A.E., Szabo, A.G. and Miller, D.R. (1977) *J. Phys. Chem.*, 81, 1564-1570.
- McKnight, C. J., Rafalski, M. and Gierasch, L. (1991) *Biochemistry*, 30, 6241.
- McLaughlin, S. (1977) *Curr. Top. Membr. Transp.*, 9, 71-144.
- Melhuish, W.H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. (1961) 65, 229-235.
- Oldfield, E., Meadows, M., Rice, D. and Jacobs, R. (1978) *Biochemistry*, 17, 2727.
- Pascutti, P.G. and Ito, A.S. (1992) *J. Photochem. Photobiol. B*, 16, 257-266.
- Pill-Soon, S. and Kurtin, W.E. (1969) *Photochem. Photobiol.*, 9, 175-177.
- Ponder, J. W. and Richards, F. M. (1987) *J. Mol. Biol.* 193, 775.
- Prota, G. (1980) *J. Invest. dermatol.*, 75, 122.
- Ridente, Y., Azzellini, G.C. and Ito, A.S. (1993) *Pigm. Cell Research* 6, 134-139.

- Ross, J.B.A., Wyssbrod, H.R., Porter, R.A., Schwartz, G.P., Michaels, C.A. and Laws, W.R. (1992) *Biochemistry*, 31, 1585-1594.
- Sargent, D.F. and Schwyzer, R. (1986) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, 83, 5774-5778.
- Sarna, T., Duleska, A., Korytowski, W. and Swartz, H. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 200, 140.
- Sarna, T., Menon, I.A. and Sealy, R.C. (1985) *Photochem. Photobiol.*, 42, 529.
- Sawyer, T.K., Sanfillipo, P.J., Hruby, V.J., Engel, M.H., Heward, C.B., Burnett, K.B. and Hadley, M.E. (1980) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, 77, 5754-5758.
- Sawyer, T.K., Hadley, M.E., Wilkes, B.C. and Hruby, V.J. (1988) *The Melanotropic Peptides* (Hadley, M.E., ed) Vol III, pp 59-74, CRC Press, Boca Raton.
- Seelig, A. and Mac Donald, P.M. (1989) *Biochemistry*, 28, 2490-2496.
- Sealy, R.C., Felix, C.C. Hyde, J.S. and Swartz, H.M. (1980) *Free Radicals in Biology*, 4, 209.
- Sealy, R.C., Sarna, T., Wanner, E.J. and Reszka, K. (1984) *Photochem. Photobiol.*, 40, 453.
- Steinberg, I.Z. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 83-114.
- Sugg, E.E., Cody, W.L., Abdel-Malek, Z., Hadley, M.E. and Hruby, V.J. (1986) *Biopolimers*, 25, 2029-2042.
- Surewicz, W.K. and Epand, R.M. (1984) *Biochemistry*, 23, 6072-6077.
- Valeur, B. and Weber, G. (1977) *Photochem. Photobiol.*, 25, 441-444.
- Willis, K.J. and Szabo, A.G. (1992) *Biochemistry*, 31, 8924-8931.
- Yamamoto, Y. and Tanaka, J. (1972) *Bull. Chem. Soc. Japan*, 45, 1362-1366.
- Yamashita, S., Szabo, A.G., Krajcarski, D.T. and Yamasaki N. (1989) *Bull. Chem. Soc. Japan*, 62, 3075-3080.
- Yaron, A., Carmel, A. and Katchalski-Katzir, E. (1979) *Anal. Biochem.*, 95, 228.
- Zaccai, G., Buldt, G., Seelig, A. and Seelig, J. (1979) *J. Mol. Biol.*, 134, 693.