



Efeitos estruturais das fenotiazinas sobre membranas enriquecidas de Na^+, K^+ -ATPase

Elmer Augusto Cueva Guevara
Justo Vladimir Tuñoque Gutiérrez
Luis Enrique Tuñoque Gutiérrez
Jara Hernán Prada Marchena
Martin Augusto Delgado Wong

ColloQUIUM

Editorial - Centro de Formación



Elmer Augusto Cueva Guevara

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
<https://orcid.org/0000-0001-8618-4362>
ecuevag@unprg.edu.pe

Docente adscrito al departamento de Física de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Licenciado en Física por la UNPRG, Maestría en Física en la Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) y Doctorado en Física en PUC-RJ. Actualmente docente nombrado en la UNPRG.



Justo Vladimir Tuñoque Gutiérrez

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
<https://orcid.org/0000-0003-0076-4257>
jtunoqueg@unprg.edu.pe

Docente adscrito al departamento de Física de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Licenciado en Física por la UNPRG, Maestría en Ciencias con Mención en Docencia Universitaria e Investigación Educativa en Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (EPG-UNPRG). Actualmente docente nombrado en la UNPRG.



Luis Enrique Tuñoque Gutiérrez

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
<https://orcid.org/0000-0002-7670-9396>
ltunoqueg@unprg.edu.pe

Docente adscrito al departamento de Estadística de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Licenciado en Estadística por la UNPRG, Maestría en Administración en la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote y Estudios de Maestría en Estadística Aplicada a la Investigación en la Universidad San Pedro de Chimbote. Actualmente docente nombrado en la UNPRG.



Jara Hernán Prada Marchena

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
<https://orcid.org/0000-0001-6326-807X>
jpradam@unprg.edu.pe

Docente adscrito al departamento de Física de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Licenciado en Física por la UNPRG, Maestría en Docencia y Gestión Educativa en la Universidad Cesar Vallejo de Chiclayo. Actualmente docente nombrado en la UNPRG.



Martin Augusto Delgado Wong

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
<https://orcid.org/0000-0001-9358-4911>
mdelgado@unprg.edu.pe

Docente adscrito al departamento de Física de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Licenciado en Física por la UNPRG, Maestría en Ingeniería Ambiental escuela de Posgrado UNPRG. Actualmente Docente Principal en la UNPRG, y Jefe de Laboratorio de Física-UNPRG.

Efeitos estruturais das fenotiazinas sobre membranas enriquecidas de Na⁺,K⁺-ATPase

Elmer Augusto Cueva Guevara
Justo Vladimir Tuñoque Gutiérrez
Luis Enrique Tuñoque Gutiérrez
Jara Hernán Prada Marchena
Martin Augusto Delgado Wong

Collo**QUIUM**

Editorial - Centro de Formación

Efeitos estruturais das fenotiazinas sobre membranas enriquecidas de Na⁺,K⁺-ATPase

Elmer Augusto Cueva Guevara
Justo Vladimir Tuñoque Gutiérrez
Luis Enrique Tuñoque Gutiérrez
Jara Hernán Prada Marchena
Martin Augusto Delgado Wong

Editado por Colloquium
ISBN: 978-9942-600-28-8
Primera edición 2022

La obra fue revisada por pares académicos antes de su proceso editorial, en caso de requerir certificación debe solicitarla a: sbores@colloquium-editorial.com.

Quedan rigurosamente prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o almacenamiento total o parcial de la presente publicación, incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico, como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia, sin la autorización de los titulares del copyright.

Ecuador 2022

Índice

Introdução	9
O sistema biológico	10
Antipsicóticos derivados de fenotiazina	12
Clorpromazina (CPZ)	14
Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)	17
Membrana Biológica	18
Modelo de mosaico fluido	18
A Enzima Na^+ , K^+ - ATPase	20
Características Estruturais da Na^+ , K^+ - ATPase	20
Características funcionais	23
Sondas fluorescentes	25
DPH (1,6 – difenil - 1,3,5 - hexatrieno)	27
FITC (fluoresceína isotiocianato – isômero I)	28
Conceitos básicos de espectroscopia	28
Espectroscopia de absorção	29
Lei de Beer - Lambert	30
O princípio de Frank-Condon	31
Espectroscopia de fluorescência	32
Medidas de fluorescência estacionária	33
Fluorescência resolvida no tempo	35
Tempos de vida do estado excitado	35
Arranjo experimental	38
Supressão de fluorescência	40
Anisotropia de fluorescência	42
Decaimento de Anisotropia de Fluorescência	46
Frações de membranas - Na^+ , K^+ - ATPase	49
Reagentes	49
Sondas fluorescentes	49
Instrumentação	50
Absorção óptica	51
Fluorescência estacionária	51
Anisotropia de fluorescência estacionária	52
Marcação da Na^+ , K^+ - ATPase com FITC	52
Fluorescência com resolução temporal	54
Decaimento da Anisotropia	55
Interações das fenotiazinas com os fragmentos de membranas Na^+ , K^+ - ATPase	58
Resultados da interação de CPZ com membranas - Na^+ , K^+ - ATPase	58
Supressão da intensidade de fluorescência	59
Tempos de vida de fluorescência de DPH	61

Anisotropia - fluorescência estacionária	64
Interação de TFP com membranas - Na^+ , K^+ - ATPase Supressão da intensidade da fluorescência	65
Decaimento de fluorescência	66
Anisotropia - fluorescência estacionária	69
Decaimento de anisotropia de DPH – cinética e ordem dos lipídios	70
Efeitos das fenotiazinas no decaimento de anisotropia de DPH	71
Anisotropia de fluorescência de DPH em membranas de crustáceo normal e adaptado	74
Anisotropia - fluorescência estacionária	74
Efeitos estruturais na Na^+ , K^+ -ATPase devido às fenotiazinas	76
Interação da TFP com a Na^+ , K^+ -ATPase	76
Irradiação no UVB da TFP em presença da Na^+ , K^+ -ATPase	80
Interação da CPZ com a Na^+ , K^+ -ATPase marcada com FITC	81
Conclusão	84
Referências	85

Prologue

A Na^+ , K^+ - ATPase é uma bomba cátions responsável pelo transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ e está presente em quase todas as células eucarióticas superiores. O livro permite mostrar trabalhos desenvolvidos em membranas para caracterizar os efeitos das fenotiazinas nas frações de membranas enriquecidas de Na^+ , K^+ -ATPase, permitindo-nos obter informações dos efeitos estruturais destas drogas em regiões específicas das membranas lipídicas

Estudando as interações com membranas contendo a enzima Na^+ , K^+ -ATPase, mostrou-se que as fenotiazinas alteram a estrutura lipídica da membrana, já que aumentam a anisotropia de fluorescência da sonda de membrana DPH. Os resultados da interação das fenotiazinas com resíduos de triptofano da proteína mostraram supressão de fluorescência de mais da metade dos triptofanos, sem transferência de energia. A estrutura local do sítio de ATP na proteína Na^+ , K^+ -ATPase, marcado com a sonda fluorescente FITC, não foi afetada pela interação com as fenotiazinas, sugerindo que a localização do sítio de ligação das fenotiazinas com a enzima fica longe do sítio de ATP.

Abreviações

AO	antroil-oubaína
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
CPZ	clorpromazina
DPH	1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
FPZ	flufenazina
FITC	fluoresceína isotiocianato
LDI	ionização por dessorção a laser
Pi	fosfato inorgânico
PZ	promazina
TFP	trifluoperazina
UV	ultravioleta

Introdução

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma bomba de cátions responsável pelo transporte ativo de íons Na^+ e K^+ contra o gradiente eletroquímico. A enzima utiliza a energia química da hidrólise da ATP para convertê-la em trabalho mecânico, e por meio de mudanças conformacionais transporta os íons de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática (Jorgensen, 1982; Swedner e Donnet, 2001). Encontramos que um fotoproduto da CPZ liga-se covalentemente na proteína (Guevara et al., 2007). O sítio de ligação da CPZ tem uma mesma estrutura local tanto na conformação E_1 quanto na E_2 , já que a reação foi independente do estado conformacional da proteína. Usando o marcador fluorescente derivado da ouabaína, a antroilouabaína, avaliamos os efeitos estruturais da CPZ sobre o sítio de ouabaína. A CPZ torna o sítio de ouabaína mais hidrofóbico e o sítio de ligação da CPZ se localiza próximo ao sítio da ouabaína (Guevara et al., 2007).

DPH é uma sonda fluorescente hidrofóbica usada principalmente para estudos de propriedades dinâmicas e estruturais das membranas lipídicas (Kaiser e London, 1998). FITC é uma sonda fluorescente que marca a Na^+ , K^+ -ATPase perto do sítio de ATP. Esta sonda é usada para estudar efeitos estruturais locais no sítio do ATP (Amler et al., 1992; Jorgensen et al., 2003).

Neste trabalho, caracterizamos os fotoprodutos fluorescentes de CPZ, FPZ e TFP criados por irradiação UV, em condições controladas, por meio da técnica de fluorescência. As interações destas fenotiazinas e de seus fotoprodutos (por meio da irradiação UV) com membranas enriquecidas em Na^+ , K^+ -ATPase foram estudadas com o fim de investigar o mecanismo de ação dos derivados de fenotiazinas. A CPZ, devido a seu caráter anfifílico, intercala-se entre os lipídios das bicamadas lipídicas e associa-se preferencialmente a grupos negativos localizados na superfície da membrana (Louro et al., 1998). Para estudar as mudanças nas propriedades dinâmicas e estáticas das membranas lipídicas por efeito dos derivados de fenotiazinas empregou-se a sonda DPH. Para estudar o efeito estrutural local do sítio de ATP foi utilizada a sonda FITC. A localização mais precisa das fenotiazinas nas membranas biológicas pode ser investigada conhecendo as localizações de FITC e de DPH na proteína e na membrana, respectivamente. O comportamento das proteínas de membranas parece ser também modulado indiretamente pela alteração da estrutura, termodinâmica ou propriedades dinâmicas da membrana lipídica (Cantor et al., 1999; Sutherland et al., 1988). Este efeito estrutural indireto sobre a proteína pode ser analisado usando as propriedades de fluorescência dos resíduos de triptofano.

O sistema biológico

Moléculas Biológicas

Os organismos vivos são constituídos por entidades químicas, que podem ou não formar estruturas poliméricas. No entanto, é sob a forma de polímeros que o seu papel é mais significativo na dinâmica da vida. Entre os polímeros que caracterizam um organismo salientam-se os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Além destas macromoléculas, encontramos outros compostos, igualmente responsáveis pela construção dos organismos biológicos. Trata-se dos lipídios, por exemplo, os fosfolipídios (Fig. 2.1 A), componentes essenciais das membranas biológicas, e dos nucleotídeos, como o transportador principal da energia química na célula, a adenosina-5'-trifosfato (ATP) (Fig. 2.1 B). (Ricardo e Teixeira, 1983)

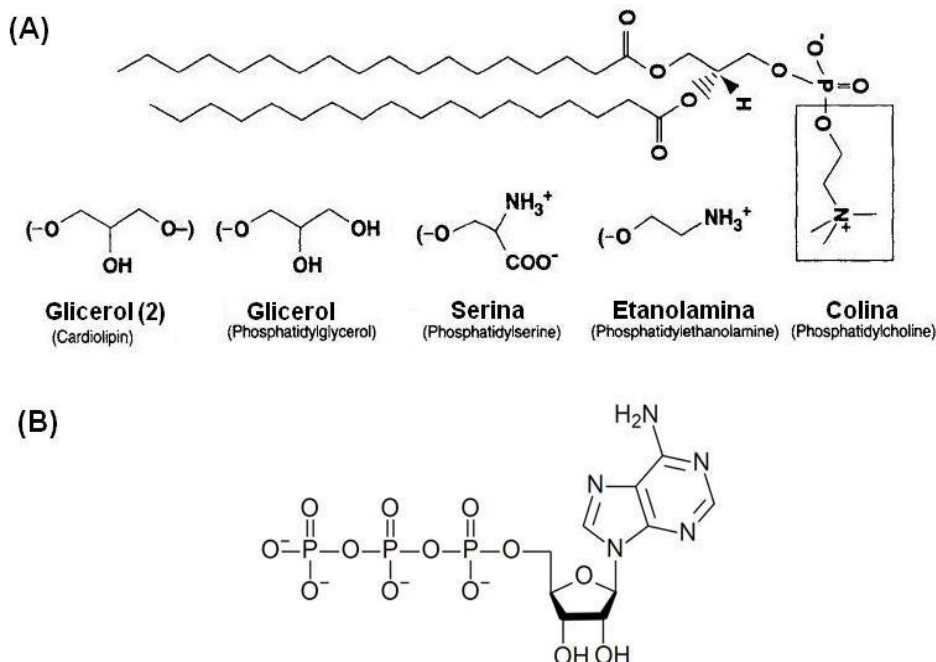


Figura 2.1. Estrutura química de fosfolipídios (A) e da molécula de ATP (B) (modificado de Dowhan et al., 2008).

Os lipídios são moléculas insolúveis ou de reduzida solubilidade em água em virtude da sua natureza não polar, apresentando, no entanto, grande solubilidade nos solventes orgânicos. Os lipídios polares são chamados anfipáticos porque contêm domínios hidrofóbicos, que não interagem com a água, e domínios hidrofílicos, que interagem com a água. Quando misturados com a água, formam espontaneamente agregados lipídicos microscópicos em uma fase separada de sua vizinhança aquosa, agrupando-se com suas porções hidrofóbicas adjacentes e seus grupos hidrofílicos interagindo com o meio aquoso ao redor. Interações hidrofóbicas entre moléculas de lipídios são direcionadoras da formação e a manutenção desses agregados. Dependendo das condições e da natureza dos lipídios, vários tipos de agregados lipídicos podem-se formar, dentre eles, micelas, bicamadas lipídicas e lipossomos (Fig. 2.2). A formação de micelas é

favorecida quando a área transversal dos grupos carregados é maior do que a da(s) cadeia(s) de acila(s) lateral(is). A formação da bicamada lipídica ocorre mais facilmente quando as áreas transversais dos grupos cabeça e das cadeias acilas laterais são semelhantes. (Dowhan et al., 2008; Nelson et al., 2002).

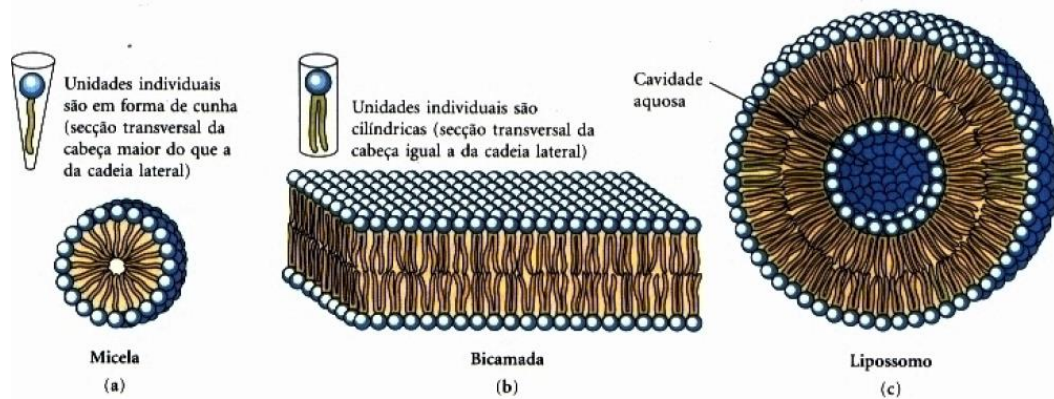


Figura 2.2. Agregados lipídicos anfipáticos que se formam na água (Nelson et al., 2002).

As proteínas desempenham um papel crucial na estrutura e função dos seres vivos. Apesar das suas múltiplas funções, as proteínas apresentam uma estrutura básica comum: são constituídas por longas cadeias poliméricas de subunidades ligadas entre si (aminoácidos). Estes aminoácidos estão associados entre si através de ligações covalentes (ligações peptídicas) entre o grupo carboxila (COOH) de um aminoácido e o grupo amina (NH₂) de outro. A sequência de aminoácidos que constitui uma cadeia polipeptídica tem a designação de **estrutura primária**.

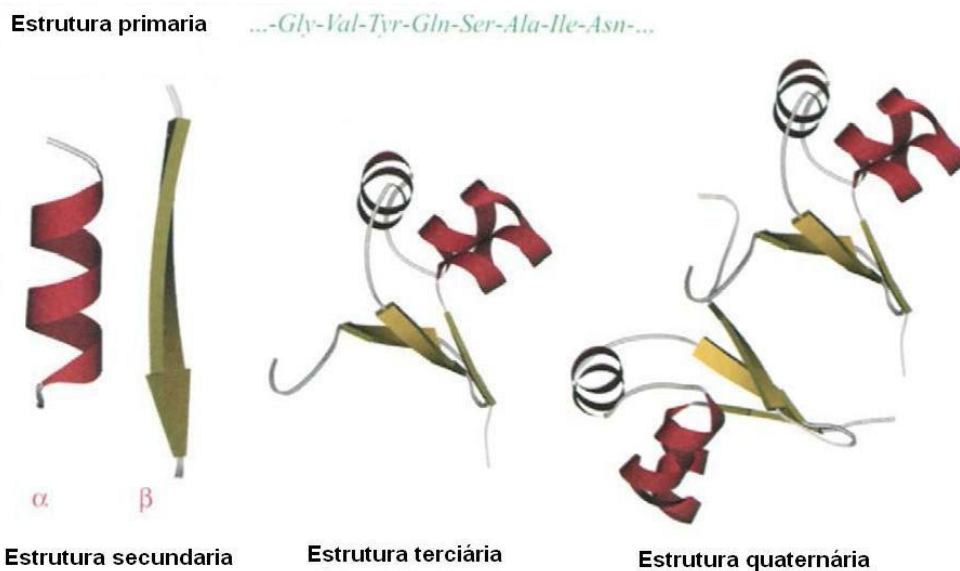


Figura 2.3. Níveis de organização estrutural da proteína: estrutura primária (sequência de aminoácidos), estrutura secundária (hélice- α e folha- β), estrutura terciária de uma proteína globular, e estrutura quaternária de uma proteína oligomérica formada, nesse exemplo, por duas cadeias (modificado de Finkelstein et al., 2002).

A configuração desenovelada das proteínas é pouco comum *in vivo*, sendo as configurações globulares ou alongadas, resultantes de processos de

enovelamento ou torção, as mais comuns. Cada um dos radicais dos polipeptídios interage com os radicais vizinhos, formando pontes de hidrogênio. Devido a estas interações, as cadeias polipeptídicas tendem a dobrar-se espontaneamente em forma de folha ou em espiral, originando configurações particularmente estáveis em determinadas regiões da cadeia polipeptídica, formando a estrutura secundária.

Uma das características das proteínas é a sua interação com as moléculas de água. A tendência é que as regiões não polares da cadeia polipeptídica se agreguem, minimizando a ruptura das pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Esta agregação provoca uma alteração da estrutura secundária da cadeia polipeptídica, originando configurações complexas e compactas do tipo globular, constituindo o que habitualmente se designa por estrutura terciária da proteína.

Frequentemente as proteínas mais complexas são formadas por diferentes subunidades, as quais, associadas, constituem uma unidade funcional com propriedades específicas. Proteínas de maiores dimensões podem ser constituídas por duas ou três subunidades tomando, então, a designação de dímeros ou trímeros. A estas proteínas que apresentam uma estrutura particular, formada por várias subunidades, convencionou-se designar estrutura quaternária. A Fig. 2.3 mostra os quatro níveis de organização estrutural das proteínas.

Dentro do grupo das proteínas encontramos uma classe especial de moléculas, as enzimas, que facilitam certas reações químicas. A energia química necessária para que estas moléculas desenvolvam a sua ação catalítica específica é fornecida através da hidrólise das moléculas de ATP (Finkelstein et al., 2002; Mathews et al., 1990).

Antipsicóticos derivados de fenotiazina

Antipsicóticos do grupo das fenotiazinas são uma classe de fármacos heterocíclicos derivados de amina que, como muitos outros com essas características, apresentam importante ação contra várias disfunções. Os antipsicóticos ou neurolépticos fenotiazínicos se caracterizam por sua ação psicotrópica, com efeitos sedativos e psicomotores. Além de se constituírem como fármacos preferencialmente usados no tratamento sintomático das psicoses, principalmente a esquizofrenia, também são utilizados em outros distúrbios psíquicos e mesmo como anestésicos. Atualmente existem diferentes derivados de fenotiazina que apresentam atividade neuroléptica.

As fenotiazinas possuem uma estrutura química formada por três anéis onde dois anéis benzênicos estão unidos por um átomo de nitrogênio e um de enxofre como se mostra na Fig. 2.4.

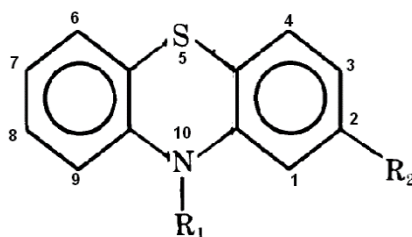


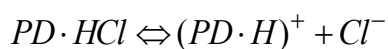
Figura 2.4. Estrutura química de um derivado da fenotiazina.

A cadeia lateral R_1 , localizada na posição 10, ligada ao nitrogênio do anel tiazina (médio) e o grupo substituinte na posição 2, R_2 , explicam as variações entre os compostos de fenotiazinas. Em termos da estrutura da cadeia lateral, as fenotiazinas são geralmente sub-classificadas da seguinte forma:

- **compostos aminoalquílicos**, como a clorpromazina;
- **compostos piperazínicos**, como a trifluoperazina e a flufenazina.
- **compostos piperidínicos**, como a tioridazina.

Os derivados de fenotiazinas existem na forma de bases e sais livres. Os sais livres como as fenotiazinas hidrocioradas são substâncias cristalinas de cor branca, que são muito solúveis em água e solventes orgânicos. Esta propriedade depende do tipo de substituintes.

Os derivados de fenotiazinas (PD) dissociam-se em soluções aquosas como segue:



Eles reagem como ácidos muito fracos. Os valores de pK_a para a protonação da fenotiazina no nitrogênio (posição 10, Fig. 2.4) varia de 4.5 a 7.8 dependendo principalmente do substituinte nessa posição. Os grupos aminos terciários em R_1 (Fig. 2.4) têm valores de pK_a acima do pH fisiológico, mas não muito, e consequentemente nesse pH há espécies carregadas e não carregadas. Lin et al. (2003) encontraram dois valores de pK_a para CPZ (para N do anel e para a amina de R_1) e três para TFP e FPZ (para N do anel e para os dois Ns da piperazina em R_1), mas a técnica utilizada por eles dá, em geral, valores de pK acima dos encontrados por outros autores.

Os anéis aromáticos são responsáveis pela absorção significativa e, em muitos casos, pelas propriedades de fluorescência que, variando seu estado de protonação e o ambiente local da droga podem ser usados como sondas fluorescentes na interação com membranas. A biodistribuição seletiva de uma droga iônica em tecidos e membranas depende de suas propriedades de agregação e de interações complexas com seu entorno molecular, já que a formação de agregados influencia as propriedades fotofísicas das fenotiazinas (Karpinska et al., 1996; Caetano et al., 2000).

A atividade farmacológica das fenotiazinas é em geral dependente da sua concentração, e os efeitos sobre as propriedades físicas das membranas diferem em concentrações baixas e altas (Welti et al., 1984). Mudanças na estrutura das fenotiazinas não somente mudam sua atividade neuroléptica, mas também

mudam o espectro e a intensidade dos efeitos colaterais. A exigência estrutural para a atividade neuroléptica das fenotiazinas inclui uma substituição na posição 2 (R_2 na Fig. 2.4) (Garcia et. al., 2005).

Os derivados de fenotiazinas têm sido foco de estudos biológicos, químicos, físico-químicos e fotoquímicos, devido a suas propriedades farmacêuticas e aplicações. Particularmente, o comportamento fotoquímico de fenotiazinas tem ganhado interesse, já que causa efeitos fotossensíveis em pacientes submetidos a terapia com estas drogas (Rodrigues et. al., 2006). A fotossensibilização pode ser através de fototoxicidade ou fotoalergia. A resposta fototóxica é essencialmente uma reação exagerada à queimadura do sol, enquanto a fotoalergia é uma reação de hipersensibilidade atrasada. Tanto na pele como nos olhos foram encontrados efeitos colaterais fototóxicos e fotoalérgicos nos pacientes que ingeriram estas drogas. Entre as fenotiazinas, a CPZ tem sido amplamente estudada para poder esclarecer os mecanismos associados aos seus efeitos fototóxicos. Além disso, é bem conhecido que a fototoxicidade de uma droga é frequentemente devida à ação simultânea de moléculas intactas, espécies intermediárias reativas e fotoprodutos estáveis formados durante a irradiação; por isso é muito importante avaliar qual é o papel que estas espécies têm na fototoxicidade (Robert, 1984; Miolo et al., 2006; Chignell et al., 1985).

Sob irradiação, as fenotiazinas passam ao primeiro estado excitado singlete S_1 ou a S_n , dependendo da energia de excitação e do solvente. O decaimento dos estados excitados acontece via conversão interna ($S_n \rightarrow S_1$ e $S_1 \rightarrow S_0$ e liberação de calor), fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$ com emissão de luz), e cruzamento intersistema ($S_1 \rightarrow T_1$ ou $S_2 \rightarrow T_2$ e $T_2 \rightarrow T_1$, via conversão interna). O decaimento do primeiro estado tripleto T_1 pode ocorrer com emissão de luz, via fosforescência. Derivados de fenotiazinas mostram valores baixos de rendimento quântico de fluorescência, mas seus rendimentos quânticos de fosforescência são sempre mais altos. Além da fosforescência, dois mecanismos podem desativar o estado tripleto: a transferência de energia para o oxigênio molecular, que conduz à geração de 1O_2 (oxigênio molecular singlete), e os processos de foto-ionização (Rodrigues et al., 2006).

Clorpromazina (CPZ)

A clorpromazina (Fig. 2.5) é principalmente um agente antipsicótico, mas também era usado para evitar vômitos e como anti-hipertensivo quando administrado por meio intravenoso.

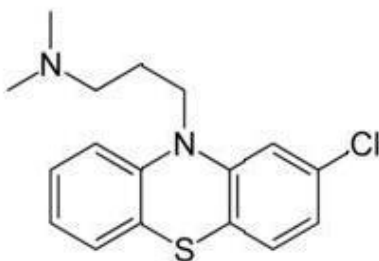


Figura 2.5. Estrutura molecular da clorpromazina (CPZ).

A clorpromazina é um derivado aromático de cadeia lateral alifática. A natureza do radical na posição 10 (N) tem influência na atividade farmacológica do fenotiazínico e a presença de grupos capazes de retirar elétrons na posição 2 aumenta a eficácia do neuroléptico (Silva, 2001). A CPZ em pH fisiológico está protonada no nitrogênio da cadeia lateral, já que possui um pK_a de 9.3 (Lee, 1978).

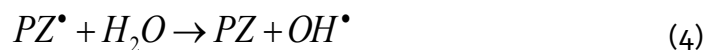
A clorpromazina é uma molécula que se fotodegrada em outras espécies moleculares quando é irradiada com luz UV. A luz UV rompe ligações na molécula da CPZ permitindo formar diferentes classes de radicais livres. Os radicais livres são espécies com um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron desemparelhado frequentemente dá como resultado espécies altamente instáveis. Estes, por serem muito instáveis, começam a se ligar rapidamente a outras moléculas que se encontram muito perto, para assim alcançar o equilíbrio químico formando novas espécies mais estáveis. Os radicais livres podem ser classificados como redutores (doando um elétron a um aceptor) e oxidantes (aceitando um elétron de um doador) (Buettner et al., 2000).

As reações fotoalérgicas e fototóxicas de CPZ em humanos, assim como sua capacidade de induzir danos cromossômicos em células mamárias que foram irradiadas com luz UV, são atribuídas à formação de radicais livres (Miolo et al., 2006). Na literatura encontra-se que a CPZ se liga fotoquimicamente a proteínas e inibe enzimas fotossensíveis. Irradiação UVB sobre a CPZ em presença da proteína Na^+ , K^+ -ATPase deram como resultado a ligação covalente de CPZ a um sítio perto do sítio principal de inibição da atividade da proteína (Kochevar et al., 1983; Guevara et al., 2007).

A irradiação ultravioleta na CPZ produz uma variedade de radicais, tais como o radical cátion (via foto ionização), o radical promazinil neutro e um átomo de cloro ($Cl^\bullet$) (via ruptura homolítica), e um radical peroxil centrado no enxofre. A desclorinação seguida de fotorredução ou substituição, a última dependente do solvente, é o principal caminho para se obter fotoprodutos de fenotiazinas, no caso de Cl na posição 2 (Miolo et al., 2006).

Chignell et al. (1985) descrevem a fissão homolítica da CPZ para obter o radical $Cl^\bullet$ e o radical promazinil ($PZ^\bullet$), que em presença de água forma a PZ e 2-OH-PZ, como se segue:

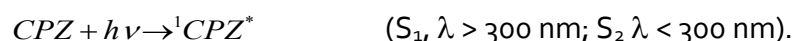




O radical promazinil é um provável candidato como espécie fototóxica *in vivo* e *in vitro*. Além disso, esse radical pode reagir covalentemente com proteínas e macromoléculas para produzir antígenos que poderiam ser responsáveis pela resposta fotoalérgica à clorpromazina (Chignell et al, 1985). Esse radical é capaz de reagir com outro radical promazinil ou com a própria CPZ para formar dímeros ou polímeros grandes. Esses produtos têm sido observados, particularmente em soluções mais concentradas (Motten et al., 1985).

O processo de fotoionização para obter o radical cátion foi descrito por Buettner et al. (1989), da seguinte forma:

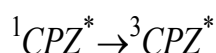
Depois da absorção inicial de um fóton,



Este estado singlete poderia se fotoionizar diretamente (monofotônico),

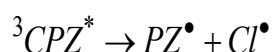


ou, relaxar para um estado triplete,



O estado triplete poderia:

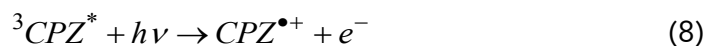
(a) desclorinar,



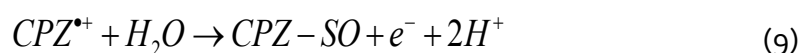
(b) foto ionizar diretamente,



ou, (c) foto ionizar pela absorção de outro fóton (bifotônico),



As fenotiazinas são também sensíveis à oxidação por mecanismos químicos, fotoquímicos e metabólicos. O processo de oxidação na CPZ poderia acontecer assim:



Tem-se reportado que mais da metade de CPZ encontrada no plasma humano está em forma de sulfóxido (Buettner et al., 1986).

Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)

A flufenazina (Fig. 3.6) tem ações antipsicóticas e neurolépticas e é 50-70 vezes mais potente que a CPZ na terapia de esquizofrenia. Sua cadeia lateral piperazínica, responsável pelas ações extrapiramidais, possui dois sítios de protonação, com valores de pK_a 7.2 e 3.4 (Tsakovska, 2003). Então, cerca de 40% das moléculas de TFP encontram-se protonadas na cadeia piperazínica em pH fisiológico (7.4).

Além das propriedades antipsicóticas, a FPZ é dotada de ações citotóxicas (produção de oxigênio singlete) e antimicrobianas (Elisei et al., 2002).

Estudos de fotólise com luz UVA em meio aquoso mostraram que derivados trifluorometil (CF_3), como a FPZ, em soluções irradiadas não formam radicais via fissão na posição 2. No entanto, encontraram-se dois fotoprodutos (F_1 e F_2 na Fig. 2.6) de FPZ formados por ataque nucleofílico ou por oxidação do nitrogênio na cadeia piperazínica (Miolo et al., 2006).

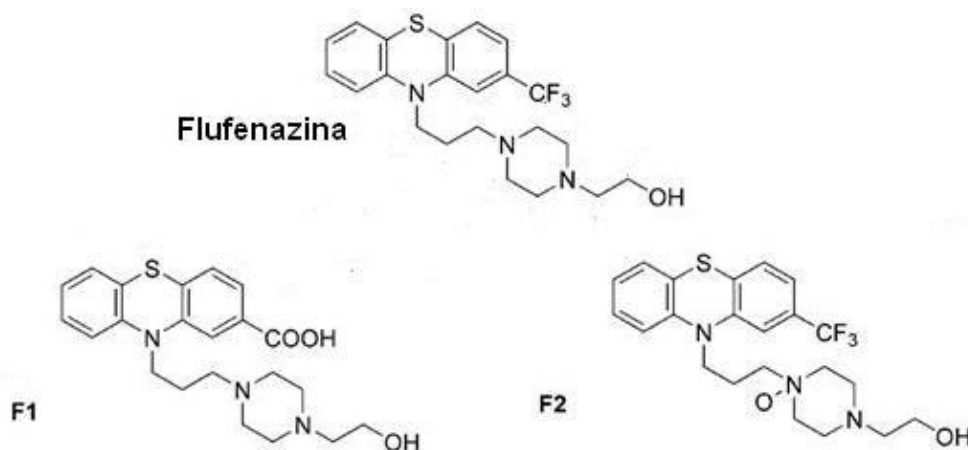


Figura 2.6. Estrutura molecular da flufenazina e dois possíveis foto produtos (F_1 e F_2) conseguidos sob irradiação UVA em meio aquoso por Miolo et al. (2006).

A TFP (Fig. 2.7) é conhecida por ser uma droga muito potente do ponto de vista terapêutico em psicoses, 20 vezes mais potente que a CPZ no tratamento da esquizofrenia. Foi largamente empregada como antipsicótico por via oral, nas fases aguda e crônica da esquizofrenia. A TFP possui dois valores de pK_a , 8.1 e 4.0, para os dois sítios de protonação na cadeia lateral piperazínica (Malheiros et al., 1998; Post, et al., 1980). Então, cerca de 83% das moléculas de TFP encontram-se protonadas na cadeia piperazínica em pH fisiológico (7.4).

Também para a TFP foram encontrados indícios de formação de fotoprodutos por irradiação UV. Rodrigues et al. (2006) concluíram que estados excitados tripleto de monômeros de TFP e FPZ formam radicais cátions que reagem com o oxigênio molecular, conduzindo à formação de fotoprodutos oxidados de TFP, como os derivados sulfóxidos.

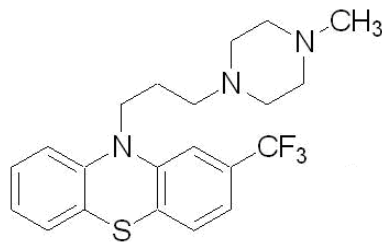


Figura 2.7. Estrutura química de trifluoperazina.

Membrana Biológica

Toda célula é caracterizada por uma membrana plasmática, que encapsula o citoplasma e cria compartimentos internos. Além de seu papel como barreira física que mantém a integridade da célula, a membrana plasmática fornece funções necessárias para a sobrevivência da célula, incluindo exclusão de substâncias em desuso ou tóxicas, aquisição de nutrientes e fontes de energia, reprodução, locomoção e interações com componentes no ambiente. Tipicamente a membrana biológica contém lipídios, proteína e carboidratos em razões que variam com o tipo de membrana. Quase sempre o carboidrato está covalentemente associado com a proteína (glicoproteína) ou com o lipídio (glicolipídio e lipopolisacarídeos). Assim, a membrana pode ser considerada como uma matriz lipídio - protéica onde as proteínas realizam funções específicas, enquanto que os lipídios são responsáveis pela barreira de permeabilidade e integridade estrutural da membrana.

Modelo de mosaico fluido

O modelo de membrana biológico conhecido como mosaico fluido (mosaico porque incluem proteínas, colesterol e outros tipos de moléculas além dos fosfolipídios) é o aceito atualmente (Fig. 2.8). As bicamadas de lipídios são fluidas, onde fosfolipídios se difundem rapidamente por toda a superfície bidimensional da membrana. Os fosfolipídios podem mover-se lateralmente, numa membrana de célula bacteriana, em uns poucos minutos à temperatura ambiente. Proteínas de membranas se difundem pela membrana da mesma forma, mas em um ritmo mais lento devido a seu grande tamanho (um fosfolipídio pode ter cerca de 650 Da e uma proteína de tamanho médio pode ter cerca de 100.000 Da). De vez em quando um fosfolipídio faz um "flip-flop" atravessando a membrana para o lado oposto, mas isto não é comum. Isto requer que a cabeça hidrofílica do fosfolipídio passe inteiramente através do interior altamente hidrofóbico da membrana e que as caudas hidrofóbicas estejam expostas ao ambiente aquoso.

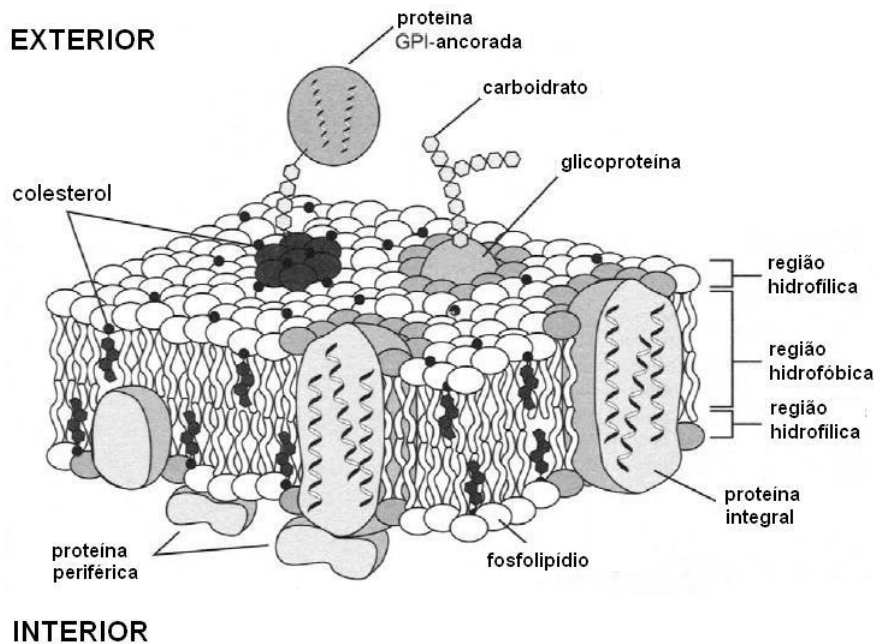


Figura 2.8. Modelo para a estrutura de uma membrana biológica: modelo de mosaico fluido (modificada de Dowhan et al., 2008).

O colesterol é um componente importante das membranas biológicas. O colesterol quebra as interações de Van der Waals e diminui o empacotamento das caudas dos fosfolípidios. Este rompimento torna a membrana mais fluida. Consequentemente, um modo de a célula controlar a fluidez de sua membrana é regulando seu nível de colesterol. Outra maneira para a célula controlar a fluidez de sua membrana é regular o grau de saturação das cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolípidios. Os hidrocarbonetos saturados são cadeias extendidas, somente com ligações simples ("saturadas" com hidrogênio), e os hidrocarbonetos insaturados têm uma ou mais ligações duplas (não "saturadas" com hidrogênio). Fosfolípidios com hidrocarbonetos saturados se compactam muito juntos aumentando as interações de Van der Waals, que prendem os fosfolípidios. As cadeias de fosfolípidios insaturados impedem que os fosfolípidios consigam se aproximar muito, diminuindo as interações de Van der Waals.

Nas membranas celulares são encontrados dois tipos gerais de proteínas: as proteínas periféricas e as proteínas integrais.

As **proteínas periféricas** estão inteiramente fora da membrana, mas são ligadas a ela por forças moleculares fracas (ligações iônicas, pontes de hidrogênio ou forças de Van der Waals) e podem ser dissociadas da membrana por agentes que rompem estas ligações (altas concentrações de sais, EDTA ou uréia).

As **proteínas integrais** são encaixadas na bicamada lipídica. Muitas delas estão estendidas dum lado ao outro da membrana e são chamadas proteínas transmembranares. Elas, frequentemente, têm três domínios diferentes, dois hidrofílicos e um hidrofóbico. O domínio hidrofóbico, transmembranar, insere-se na bicamada lipídica porque é feito de aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica. Por causa da interação dos lipídios com estes domínios transmembranares, as proteínas integrais não podem ser isoladas e purificadas

sem prévia dissolução com detergentes, que afastam os lipídios (Dowhan et al., 2008).

A Enzima Na^+ , K^+ - ATPase

A enzima Na^+ , K^+ - ATPase é uma bomba de cátions de sódio e potássio que pertence à família de enzimas denominadas ATPases tipo P. O estado atual do conhecimento sobre sua estrutura e mecanismos relacionados à sua função aparece bem descrito em alguns artigos de revisão (Jorgensen et al., 2003; Kühlbrandt, 2004) e está descrito também na dissertação de mestrado (Guevara, 2005). As ATPases tipo P são uma grande família de mais de 50 proteínas de membranas, que são responsáveis pelo transporte ativo de uma variedade de cátions através da membrana. A translocação de cátions contra o gradiente de potencial eletroquímico é conseguido por utilizar a energia de hidrólise do ATP (Kühlbrandt et al., 2004).

Todas as ATPases tipo P são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares, com massas moleculares de 70-150 kDa. As enzimas desta classe de família criam e mantêm o potencial de membrana nas células animais e vegetais, resultante das diferentes concentrações iônicas em cada lado da membrana. Este gradiente de concentração iônica é um dos atributos mais indispensáveis das células vivas e aciona o transporte secundário de açúcar e aminoácidos, assim como de outras pequenas moléculas e íons (Kühlbrandt et al., 2004; Jorgensen et al., 1982; Sweadner et al., 2001).

Em um trabalho clássico, a Na^+ , K^+ - ATPase foi descrita por Skou em 1957, onde se estudou uma ATPase que era estimulada pela presença simultânea de Na^+ e K^+ em uma fração de membrana de nervos de pata de caranguejo. Normalmente a enzima é isolada em forma associada à membrana de tecidos ricos nesta proteína, como órgãos de peixe elétrico (Brotherus et al., 1980), rim de mamíferos (Jorgensen et al., 1971; Kyte, 1981; Kunihiro et al., 1993), como também de glândula salina de tubarão (Esmann et al., 1985).

Características Estruturais da Na^+ , K^+ - ATPase

A estrutura oligomérica da enzima consiste de duas subunidades de proteínas α , β ligadas não-covalentemente (Fig. 2.9). Além dessas duas subunidades existe uma pequena subunidade γ (Cornelius et al., 1991; Andersen et al., 1996).

O heterodímero de subunidades protéicas α e β (Fig. 2.8), ligadas não covalentemente, constitui a unidade funcional mínima capaz de hidrolisar ATP e sustentar a transição entre os estados conformacionais E_1 e E_2 que ocorrem durante o ciclo catalítico.

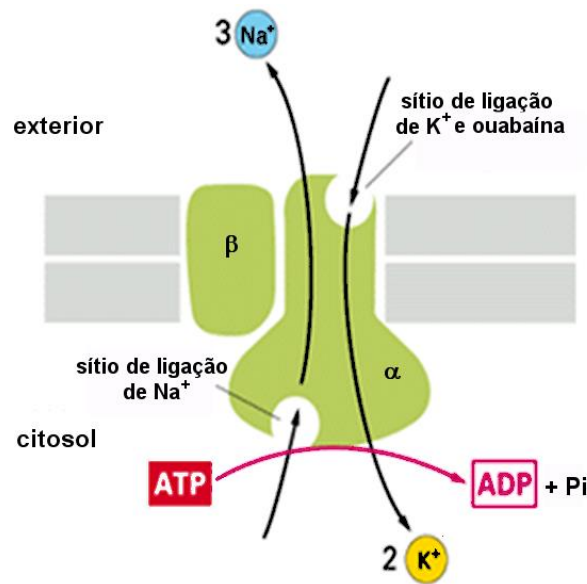


Figura 2. 9 Modelo da estrutura de um heterodímero (α - β) da Na^+ , K^+ - ATPase.
Modificada de [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail5.htm)

Subunidade α : a subunidade catalítica α é um polipeptídeo grande com uma sequência de aminoácidos conhecida (1020 resíduos) e tem um peso molecular de 110 kDa. Dados bioquímicos e espectroscópicos mostram que as transições entre as principais conformações, E_1 e E_2 , na subunidade α são importantes para as interações entre os domínios citoplasmáticos (A, N e P) e os sítios de cátions no domínio transmembranar (M), mostrados na Fig. 2.10. Esta subunidade contém os sítios de ligação para um inibidor específico da enzima, a ouabaina (Jorgensen et al., 2003; Keenan et al., 2005).

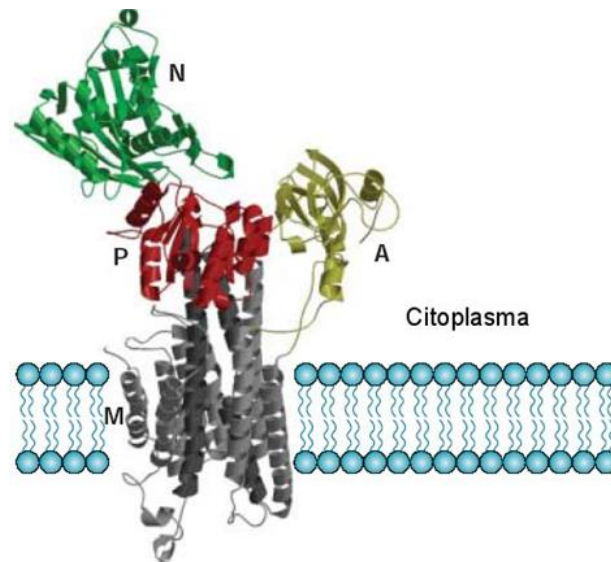


Figura 2. 10 Modelo da subunidade α de ATPase tipo P, mostrando os domínios citoplasmáticos N (de ligação do nucleotídeo), P (de fosforilação) e A (atuador), bem como o domínio membranar (M). (Kühlbrandt, 2004).

Domínios da subunidade "α"

Os quatro domínios bem definidos da subunidade α , mencionados anteriormente como P, N, A e M, são conservados em toda família de ATPases tipo P (Kühlbrandt, 2004). O domínio citoplasmático N contém o sítio de ligação do ATP; no domínio P estão os sítios para o fosfato e Mg^{2+} ; o domínio A terminal - amino não contém sítios de ligação, mas sim sítios de ruptura triptica e o domínio M, com 10 subdomínios transmembranares (hélices - α), contém os sítios dos cátions Na^+ e K^+ (Pedersen et al., 1998; Kühlbrandt, 2004).

O **Domínio "P"** é o sítio de fosforilação aproximadamente esférico. A inserção do domínio N expõe o sítio de ligação do Mg^{2+} e o resíduo invariante de aspartato que durante a hidrólise do ATP se torna fosforilado por transferência do fosfato- γ do ATP (Fig. 2.9).

O **Domínio "N"** é o sítio de ligação do nucleotídeo (Fig. 2.9), que contém os sítios de ligação de ATP e se estende desde o sítio de fosforilação Asp369 à dobra do terminal carboxílico 586-DPPR. O sítio de ligação para a base adenina do ATP encontra-se num bolso hidrofóbico de resíduos invariantes.

O **Domínio "A"**, domínio atuador, é o domínio citoplasmático menor da subunidade "α" da Na^+, K^+ - ATPase, consistindo no segmento terminal-N e o laço entre os segmentos M2 e M3. Na Lys30 encontra-se um sítio de ruptura triptica bem definido. Esta parte do domínio "A" interage com o domínio "N" no estado conformacional $E_2[K]$. Apesar de não conter sítios de ligação para íons ou cofatores, há uma sequência invariante que se põe em contato com o sítio de fosforilação na conformação E_2-P , confirmando seu importante papel no mecanismo molecular (Fig. 2.9).

O **Domínio "M"**, membranar, consiste de 10 hélices "α" transmembranares (M1-M10) ou 5 pares de hélices inseridas do lado citoplasmático (Fig. 2.9), que cercam os sítios de ligação dos íons na membrana, assim como curtos laços conetivos na superfície membranar exterior. A Fig. 2.11 mostra um modelo de homologia (com a Ca^{2+} -ATPase) para essas hélices. As hélices M2, M4, e M5 são estendidas, com várias voltas no lado citoplasmático, onde elas se conectam com os domínios citoplasmáticos.

As regiões transmembranares de ATPases tipo P diferem das de canais iônicos pela ausência dum trajeto óbvio de transporte, na forma de canal aberto preenchido por água. Presumivelmente, isto reflete a diferença entre os mecanismos de transporte ativo e passivo e a necessidade de oclusão dos cátions nas bombas de íons.

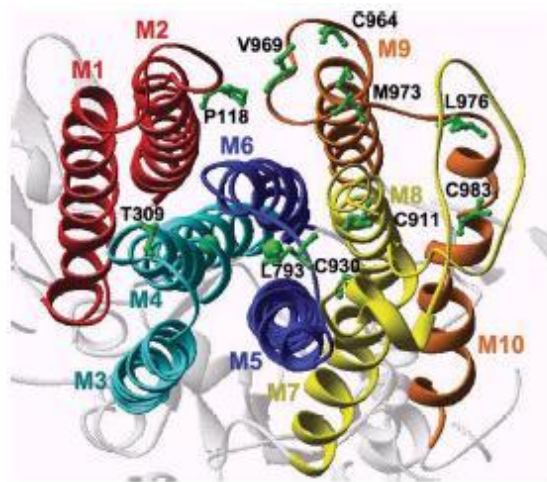


Figura 2. 11 Um modelo de homologia da Na^+ , K^+ - ATPase com hélices transmembranares, visto do lado extracelular. Observam-se os resíduos destacados nos laços extracelulares, particularmente L9/10. (Jorgensen et al., 2003).

Subunidade “ β ”: é uma glicoproteína com peso molecular ~ 35 kDa que, juntamente com os açúcares, pode atingir a ~ 55 kDa. Ela é uma proteína integral que possui um único segmento transmembranar. A subunidade “ β ” é importante na biogênese da enzima, parecendo desempenhar um papel na formação e maturação da holoenzima, na translocação e incorporação à membrana plasmática, na regulação da estabilidade conformacional e na atividade da subunidade “ α ”. Além disso, ela pode estar envolvida na modulação da afinidade da enzima por Na^+ e K^+ (Shan Ping Yu, 2003; Kawakami et al., 1988; Kawakami et al., 1985; Guynn et al, 2002).

Subunidade “ γ ”: forma parte da família de proteínas FXYD, que é uma pequena família de proteínas curtas, com um domínio transmembranar que contém a sequência FXYD (Kühlbrandt, 2004). Algumas proteínas FXYD conhecidas regulam a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase em tecidos como o de coração, músculo esquelético e rim. Esta subunidade é um pequeno polipeptídeo (~ 10 kDa), denominado primeiramente como “componente proteolípídica”, e foi identificada em algumas preparações purificadas da enzima. Esta componente parece não ser essencial para a maturação estrutural ou funcional da Na^+ , K^+ - ATPase (Lowndes et al., 1984; Béguin et al., 1997), mas outras evidências sugerem que pode alterar a afinidade da Na^+ , K^+ - ATPase por Na^+ (Béguin et al., 1997; Therien et al., 1997).

Características funcionais

Destacam-se como importantes funções fisiológicas da enzima a sua influência sobre (Skou, 1988):

- O potencial de membrana: a enzima é responsável pela manutenção do gradiente transmembranar de Na^+ e K^+ que gera o potencial de repouso ou fornece energia para o potencial de ação de células excitáveis;

- A manutenção de altas concentrações de íon K^+ intracelular: altas concentrações de íon K^+ intracelular são de importância para que aconteça um número de reações enzimáticas dentro das células;
- A regulação osmótica: com um potencial de membrana negativo a concentração intracelular de ânions capazes de se difundir é menor que a extracelular. Isto compensa o efeito osmótico de ânions intracelulares que não podem passar através da membrana;
- O transporte ativo: o gradiente de Na^+ é usado como energia livre para o co-transporte de outras substâncias como açúcares, aminoácidos, e para conter o transporte de Ca^{2+} ou H^+ contra gradiente através da membrana celular.

Múltiplos mecanismos podem regular a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase, influenciando os papéis funcionais da enzima em diferentes condições, tornando a proteína vulnerável a ataques patológicos. Esses mecanismos reguladores também tornam a enzima alvo potencial para tratamentos terapêuticos. Além de sua dependência em ATP, a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase é regulada pelo estado de fosforilação, por substâncias endógenas como a ouabaína, por neurotransmissores como a dopamina (inibidor) e norepinefrina (estimulador), e por hormônios como a insulina (Yu, 2003).

Segundo o mecanismo de reação de Albert-Post para a hidrólise de ATP pela enzima (Fig. 2.12), a proteína de membrana possui dois estados conformacionais E_1 e E_2 durante cada ciclo catalítico.

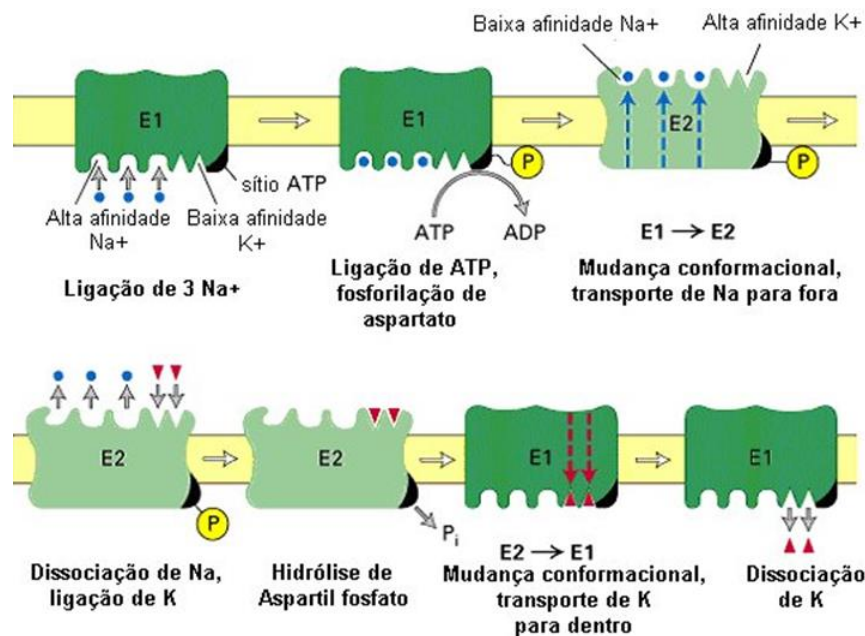
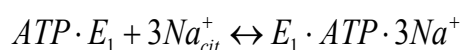


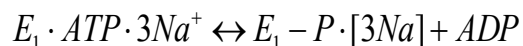
Figura 2. 12 Esquema simplificado de Post-Albers (1969) do ciclo da bomba de sódio. E_1 e E_2 são as conformações da enzima com os sítios de ligação.

Os passos do mecanismo de transporte iônico são (Jorgensen et al. 2003):

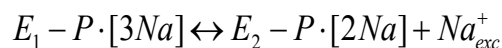
- a. Ligação de três íons Na^+ em sítios orientados para o citoplasma.



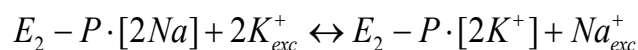
- b. Fosforilação dependente de Na^+ citoplasmático, a partir do ATP, e oclusão de três íons Na^+ .



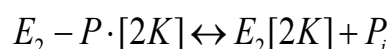
- c. O transporte de três íons Na^+ para a região extracelular, acoplado à transição conformacional $E_1 - \text{P} \leftrightarrow E_2 - \text{P}$.



- d. Ligação de dois íons de K^+ aos sítios orientados para a região extracelular.



- e. Desfosforilação ativada por K^+ extracelular e oclusão de dois íons K^+ .



- f. ATP agindo com baixa afinidade acelera o transporte para o interior de dois íons K^+ , acoplado à transição conformacional $E_2[2\text{K}] \leftrightarrow E_1$.



Nos esquemas acima, cit e exc referem-se a citoplasma e a região extracelular, respectivamente. A enzima no estado E_1 tem alta afinidade por Na^+ e ATP, porém baixa afinidade por K^+ . Este estado intermediário muda para E_2 , formando $E_2\text{P}$. No estado E_2 a enzima tem alta afinidade para K^+ , mas baixa afinidade para Na^+ e ATP. Desse jeito, as mudanças conformacionais permitem que os íons Na^+ escapem para o meio externo e íons K^+ se liguem à enzima e passem para o interior da célula. Na Na^+ , K^+ - ATPase de rim de porco, o equilíbrio $E_1 - \text{P} \leftrightarrow E_2 - \text{P}$ é fortemente inclinado a favor da forma $E_2 - \text{P}$ (Jorgensen et. al. 2003)

Sondas fluorescentes

Uma sonda fluorescente é compreendida como um fluoróforo preparado para responder a um estímulo específico ou localizar-se em uma determinada região de uma espécie biológica.

As principais vantagens do emprego de sondas ligadas à técnica de fluorescência são: (a) a **sensibilidade**, pode-se estudar materiais fluorescentes em quantidades de picogramas, (b) **seletividade**, derivada em parte pelos comprimentos de onda de excitação e de emissão de fluorescência que são característicos de cada composto e, (c) a **variedade de possibilidades** em que as amostras podem ser rapidamente estudadas, ou seja, em soluções diluídas ou concentradas, em suspensões (meio micelar) ou em superfícies de sólidos.

As sondas fluorescentes podem ser divididas dentro de 3 classes: (1) **sondas intrínsecas**, como o triptófano nas proteínas (absorve em torno de 295 nm e

emite em 350 nm em água); (2) **sondas extrínsecas ligadas** covalentemente; e (3) **sondas extrínsecas associadas** (Valeur B., 2002).

Antroil-ouabaína e a ouabaína

A ouabaína pertence a uma classe de fármacos, os glicosídeos cardíacos, que são encontrados em certas plantas e animais. A ouabaína, esteróide cardiotônico, é inibidor específico da Na^+ , K^+ - ATPase que, por sua vez, é o único receptor fisiológico conhecido para a ouabaína. Seu sítio de ação está localizado na subunidade "α", do lado extracelular da proteína integral. Fármacos deste tipo possuem ação específica e poderosa sobre o miocárdio, por isso é muito utilizado em tratamentos de insuficiência cardíaca congestiva (Rang H. P. et al., 1993). A ouabaína tem alta afinidade pelo complexo $\text{MgE}_2\text{-P}$ da Na^+ , K^+ - ATPase, portanto é necessário a presença de Mg^{+2} no solvente para iniciar a conversão da conformação $\text{E}_1\text{-P}$ a $\text{E}_2\text{-P}$ (Jorgensen P. L. et al. 2003)

A antroil-ouabaína (AO) é um derivado fluorescente da ouabaína, tendo como fluoróforo o antraceno ligado ao açúcar, para minimizar a perturbação à alta afinidade inibitória, que depende principalmente da parte esteróide do glicosídeo (Fortes P. A., 1977) (Fig. 2.13). Esta sonda fluorescente é usada em vários estudos de Na^+ , K^+ - ATPase, como em cinética de ligação dos glicosídeos cardíacos, em estrutura e mudanças conformacionais (Lee J. A. et al., 1986; Amler et al., 1992; Amler et al., 1996), assim como para detecção de estados intermediários fosforilados da enzima (Fortes P. A. et al., 1984).

A especificidade da AO pela Na^+ , K^+ - ATPase e a sensibilidade da técnica de fluorescência fazem desse marcador uma importante ferramenta para estudo da enzima, permitindo a utilização de concentrações baixas, semelhantes às fisiologicamente relevantes. A especificidade do marcador faz com que a purificação da enzima não seja um fator primordial para obtenção de resultados confiáveis.

Hellen et al., (1997) mediram as constantes cinéticas de associação e dissociação da AO à Na^+ , K^+ - ATPase fosforilada. A cinética de interação da ouabaína com a Na^+ , K^+ - ATPase é relativamente lenta e a da AO é semelhante. Isso permite que estudos de cinética sejam realizados a partir de fluorescência no estado estacionário.

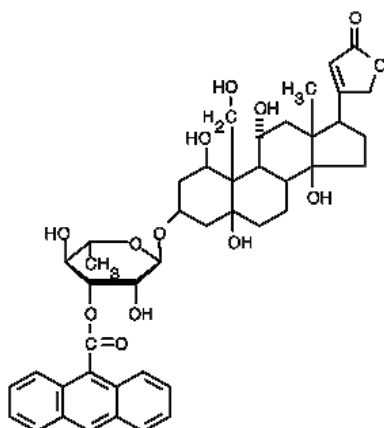


Figura 2. 13 Estrutura química da antroil-ouabaína.

DPH (1,6 – difenil - 1,3,5 - hexatrieno)

DPH é uma sonda usada frequentemente para estudos de propriedades dinâmicas e estruturais das membranas e também para estimar a fluidez da membrana. Esta sonda fluorescente é ideal para tais experimentos visto que exibe um forte aumento de fluorescência quando em meio lipídico e responde à ordem de orientação dos fosfolipídios, já que sua emissão é muito sensível à anisotropia do ambiente local.

A DPH, mostrada na Fig. 2.14, é considerada uma molécula cilíndrica com seu dipolo de transição aproximadamente alinhado com seu eixo molecular. Consequentemente, a polarização de sua fluorescência é alta na ausência de movimento de rotação e é muito sensível à reorientação ao longo do eixo molecular, resultado das interações com os lipídios vizinhos na bicamada. A molécula de DPH dentro da bicamada de lipídios é geralmente orientada paralelamente ao eixo da cadeia do lipídio, mas pode também localizar-se no centro da bicamada de lipídios paralela à superfície. Essas propriedades têm conduzido a seu uso extensivo para medições de fluidez em membranas.

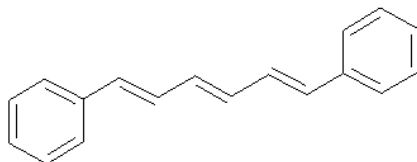


Figura 2. 14 Estrutura química da sonda DPH.

As medições de fluidez são feitas pelo processo despolarização da fluorescência. Quando as moléculas de DPH inseridas na bicamada de lipídios absorvem energia da luz polarizada verticalmente, por exemplo, emitem luz a partir do primeiro estado excitado singlete, depois de um tempo médio caracterizado pelo tempo de vida do estado excitado. Quando as moléculas dos lipídios da membrana estão em repouso, as moléculas de DPH permanecem orientadas verticalmente na bicamada e a luz emitida também é polarizada. Se as moléculas dos lipídios têm

mobilidade grande, os eixos moleculares da DPH mudam de direção durante o tempo de vida do estado excitado, e a direção de polarização da luz emitida também muda aleatoriamente. Assim, é possível associar a perda de polarização com a mobilidade dos lipídios.

FITC (fluoresceína isotiocianato – isômero I)

A FITC (Fig. 2.15 B) é a molécula original de fluoresceína (Fig. 2.15 A) acrescida com um grupo funcional isotiocianato ($-N = C = S$). Este derivado de fluoresceína é capaz de unir-se a proteínas, reagindo com os grupos aminas. A Na^+ , K^+ - ATPase, na subunidade, α , é covalentemente marcada com a sonda FITC no aminoácido Lis 501 (lisina). Este aminoácido está localizado perto do sítio da ATP (ADP) em Lis 480 (Lis 492), e é utilizada para estudar efeitos estruturais locais nesse sítio (Amler et al., 1992; Jorgensen et al., 2003).

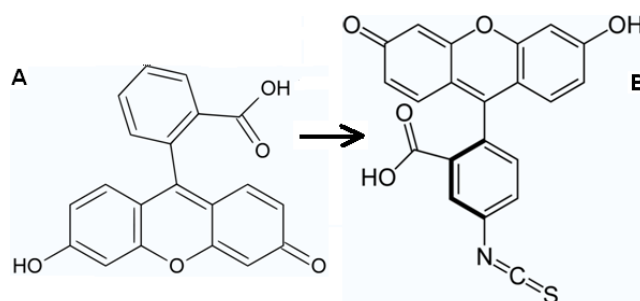


Figura 2. 15 Estrutura química da fluoresceína (A) e FITC (B)

A Espectroscopia de fluorescência tem sido desde muito tempo uma das técnicas mais utilizadas nos estudos de estrutura e função de moléculas biológicas, em particular proteínas e biomembranas. A fluorescência é um método muito sensível para estudos de mudanças conformacionais, interações e localização de sítios de ação de moléculas de interesse biológico em macromoléculas e biomembranas.

A espectrometria de massas foi também usada em nosso trabalho, sobretudo na identificação das massas moleculares das espécies (ou fotoprodutos) formadas na fotodegradação.

Descrevemos brevemente neste capítulo os princípios físicos em que estão baseadas nossas medidas. As seções referentes a fluorescência foram escritas com base nos excelentes textos escritos por Lakowicz (2006), Valeur (2005) .

Conceitos básicos de espectroscopia

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação com a matéria, consistindo na absorção, emissão ou espalhamento da radiação por átomos ou moléculas. A

luz é uma radiação eletromagnética, numa faixa restrita de comprimentos de onda (~ 180 nm, ultravioleta, a ~ 900 nm, infravermelho). As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por uma frequência (ν) e um comprimento de onda (λ), sendo essas grandezas físicas relacionadas pela equação $\lambda\nu = c$, onde c é a velocidade da luz para um determinado meio.

As ondas eletromagnéticas também possuem propriedades de partícula e se comportam como partículas (fótons) com energia bem definida $E=h\nu$, onde h é a constante de Planck. Portanto, uma radiação eletromagnética de comprimento de onda λ é formada de fótons com energia $E = hc/\lambda$.

Muitos dos processos físico-químicos que acontecem no mundo microscópico das moléculas só são explicados com base na mecânica quântica. Ela nos dá informações sobre os estados de energia que uma molécula pode ocupar e os mecanismos pelos quais uma molécula pode mudar de um estado de energia a outro. O estado de uma molécula ou sistema quântico é descrito por meio de uma função de onda ψ que é, em geral, função das coordenadas espaciais e dos spins dos elétrons e núcleos, e dos campos externos. Esta função de onda nos dá uma distribuição de probabilidade ($|\Psi|^2$ é a densidade de probabilidade).

A mecânica quântica mostra que uma molécula só pode ter energias num conjunto discreto de valores. Estas quantidades são chamadas níveis de energia da molécula. Os níveis principais de energias são determinados pelas possíveis distribuições espaciais dos elétrons e são chamados **níveis eletrônicos de energia**; esses níveis são desdobrados em **níveis vibracionais**, que indicam os vários modos de vibração da molécula. Há ainda subdivisões menores chamadas de **níveis rotacionais**. O nível de mais baixa energia é chamado de estado fundamental e nele as energias eletrônica e dos movimentos internos têm seus valores mínimos. Os outros estados de energia da molécula são chamados de estados excitados.

Geralmente as moléculas se encontram em seu estado fundamental e, ao serem irradiadas, podem ser excitadas até outro nível energético quando a energia da radiação incidente corresponde exatamente à diferença de energia entre os dois níveis. Podemos excitar a molécula submetendo-a a um campo externo, por exemplo, o campo elétrico da radiação incidente, que interage com as partículas carregadas da molécula. O potencial elétrico externo é capaz de ocasionar uma probabilidade de transição entre os estados da molécula. Esta pode ser descrita em função do operador dipolo elétrico da molécula (que descreve a distribuição de carga de uma molécula) e da amplitude do campo elétrico oscilante da luz. A amplitude da probabilidade de transição é o momento de dipolo da transição, descrevendo a habilidade da luz em distorcer uma molécula obrigando-a a fazer uma transição para outro estado (Hollas, 2004).

Espectroscopia de absorção

Em geral, uma transição eletrônica consiste em promover um elétron de um orbital de uma molécula no estado fundamental para um orbital desocupado por absorção de um fóton. As transições eletrônicas de orbitais mais externos correspondem à espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível. O orbital molecular σ é formado por dois orbitais atômicos s ou de um orbital atômico p e um orbital atômico s . O orbital molecular π se forma por dois orbitais atômicos p . O orbital molecular n consiste de elétrons não ligantes localizados em heteroátomos tais como oxigênio ou nitrogênio. Para ilustrar os níveis de energia de uma molécula e as transições entre os três tipos de orbitais moleculares, a Fig. 3.2 mostra o formaldeído como exemplo.

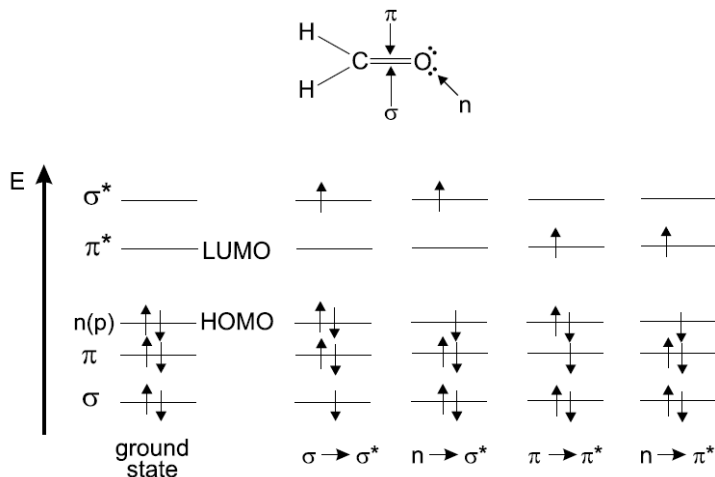


Figura 3.1. Níveis de energia de orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (Valeur, 2001).

Na espectroscopia de absorção e fluorescência de uma molécula, são importantes os seguintes orbitais: o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e o orbital molecular desocupado mais baixa energia (LUMO). Por exemplo, no formaldeído, o HOMO é o orbital n e o LUMO é o orbital π^* .

As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ podem ser observadas em todos os compostos insaturados, em geral aparecendo na faixa do espectro com $\lambda > 220$ nm até o infravermelho próximo. Se não forem proibidas por regras de seleção de spin ou simetria, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ têm altos coeficientes de absorção molar (extinção), aproximadamente $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As transições $n \rightarrow \pi^*$ têm coeficientes de absorção menores, cerca de $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e, frequentemente, aparecem como "ombro" na faixa de comprimentos de onda maiores nos espectros de absorção. Para medidas em solução, as transições $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ e $\sigma \rightarrow \pi^*$ são geralmente escondidas pela absorção do solvente (< 190 nm).

Lei de Beer - Lambert

A lei de Beer - Lambert relaciona a quantidade de luz absorvida por uma amostra com sua espessura e concentração, expressa da seguinte forma:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}$$

onde I é a intensidade da luz transmitida, I_0 é a intensidade de luz incidente, c é a concentração da amostra em mols por litro, l é a espessura da amostra em cm e ϵ é o coeficiente de absorção molar, que é um parâmetro característico de cada espécie molecular num dado solvente e comprimento de onda observado.

A razão I/I_0 é a fração de luz incidente que é transmitida, e é chamada transmitância (T). A absorbância (A) é dada por

$$A = \log(I_0 / I) \quad 3.2$$

Logo,

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad 3.3$$

Densidade óptica é a absorbância para uma espessura da amostra igual a 1 cm. A falha em obedecer à dependência linear da absorbância com a concentração, segundo a lei de Beer-Lambert, pode ser devida a altas concentrações, à formação de agregados ou à presença de outras espécies absorvedoras.

O princípio de Frank-Condon

Os movimentos dos elétrons são muito mais rápidos do que os do núcleo, muito mais pesado. Assim, quando há uma transição eletrônica para um estado excitado por absorção de um fóton (duração de $\sim 10^{-15}$ s), que é muito rápida comparada com tempos associados a vibrações moleculares ($10^{-10} - 10^{-12}$ s), os núcleos não têm tempo de se reacomodar na nova posição de equilíbrio (aproximação de Born-Oppenheimer). Esta observação é a base do princípio de Franck-Condon: uma transição eletrônica em geral ocorre sem mudança nas posições dos núcleos tanto da molécula que absorveu o fóton quanto das moléculas vizinhas. O estado resultante é chamado estado de Franck-Condon, e a transição é chamada de transição vertical, como se observa na Fig. 3.2, onde as curvas de energia potencial em função da configuração nuclear (ou distância internuclear, no caso de uma molécula diatômica) são apresentadas como potenciais de Morse.

Na Fig. 3.2 são observadas, além da transição eletrônica pura, o – o, outras transições vibrônicas cujas intensidades dependem da posição relativa e da forma das curvas de energia potencial.

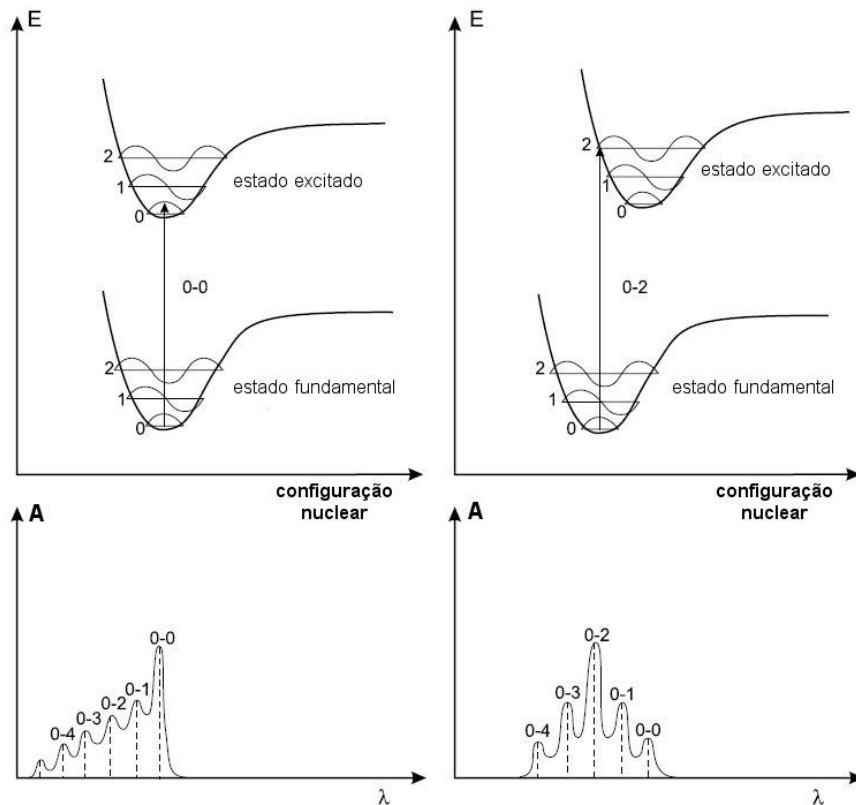


Figura 3.2 Acima: diagrama da energia potencial com transições eletrônicas verticais (princípio de Franck-Condon); abaixo: forma das bandas de absorção (linhas tracejadas, observadas em vapor; linhas contínuas, espectro alargado esperado em solução. (modificado de Valeur, 2001).

Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é um fenômeno que envolve a perda de energia de uma molécula no estado excitado por emissão de luz. Quando a molécula absorve um fóton de luz, por exemplo, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Ocorre então, um relaxamento para o nível vibracional fundamental do estado excitado através da conversão interna (processo não radiativo) e, então, o retorno para o estado eletrônico fundamental com emissão de luz. A Fig. 3.3 (Diagrama de Jablonski) mostra, competindo com a emissão, vários outros processos com diferentes constantes de velocidade (k) que contribuem para a perda de energia do estado excitado.

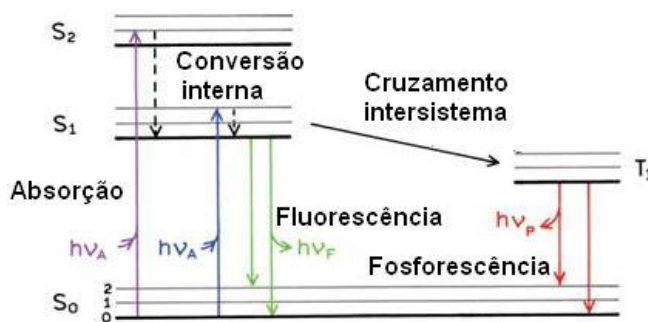


Figura 3. 3 Diagrama de Jablonski (modificado de Lakowicz, 2006).

Os processos não radiativos de relaxamento que competem com a fluorescência (k_F) são: conversão interna (k_{IC}); cruzamento intersistema (k_{IS}) e supressão de vários tipos [$k_q(Q)$]. Portanto a fração que representa a desexcitação através da fluorescência é dada por:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q[Q]} \quad 3.4$$

onde a fração Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência. Podemos observar desta equação que, se todos os processos não radiativos fossem infinitamente desprezíveis então $\Phi_F = 1$, ou seja, o rendimento quântico de fluorescência seria 100%, isto é, o único mecanismo de relaxamento seria a fluorescência.

Uma propriedade importante da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão é geralmente observado, independente do comprimento de onda de excitação. Na excitação, a molécula vai para níveis vibracionais mais altos de um determinado nível eletrônico, o excesso de energia é rapidamente dissipado, levando o fluoróforo para o nível vibracional fundamental do singleto excitado, S_1 . Por causa desta relaxação rápida, ao redor de 10^{-12} s, é que o espectro de emissão é independente do comprimento de onda de excitação, e que todos os espectros de fluorescência estarão deslocados para comprimentos de onda maiores (menor energia) do que os da banda de absorção. A banda de emissão será aproximadamente uma imagem especular da banda de absorção cujo máximo está centrado em comprimentos de onda maiores que o da banda de absorção. Este deslocamento é conhecido como deslocamento de Stokes.

Medidas de fluorescência estacionária

Espectros de excitação: o espectro de excitação representa as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda da luz de excitação, e é obtido mantendo-se o detector num único comprimento de onda, em geral no pico de emissão. No caso de uma solução homogênea de um cromóforo, o espectro de excitação corrigido corresponderá ao espectro de absorção desde que o relaxamento radiativo ocorra do nível vibracional fundamental do estado eletrônico excitado. Este parâmetro irá mudar se a energia potencial relativa entre os estados excitado e fundamental for modificada por alguma perturbação.

Espectros de emissão: o espectro de emissão representa as intensidades da fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, e é obtido fixando-se o comprimento de onda da luz de excitação. Ele representa a transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 .

Rendimento quântico: o rendimento quântico, ϕ_F , é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos. As medidas de ϕ_F nos podem dar idéia da contribuição da fluorescência para reações do estado excitado, enquanto que o espectro de absorção fornece informações principalmente sobre reações do estado fundamental.

Arranjo experimental: a Fig. 3.4 mostra um diagrama esquemático de um espectrofluorímetro para medidas de fluorescência. Da forma como está configurado, o espectrofluorímetro pode ser usado de duas maneiras: se variarmos o monocromador de emissão mantendo-se fixo o monocromador de excitação, temos um espectro de emissão. Por outro lado, podemos ter fixo o monocromador de emissão e o monocromador de excitação variando, para produzir o espectro de excitação.

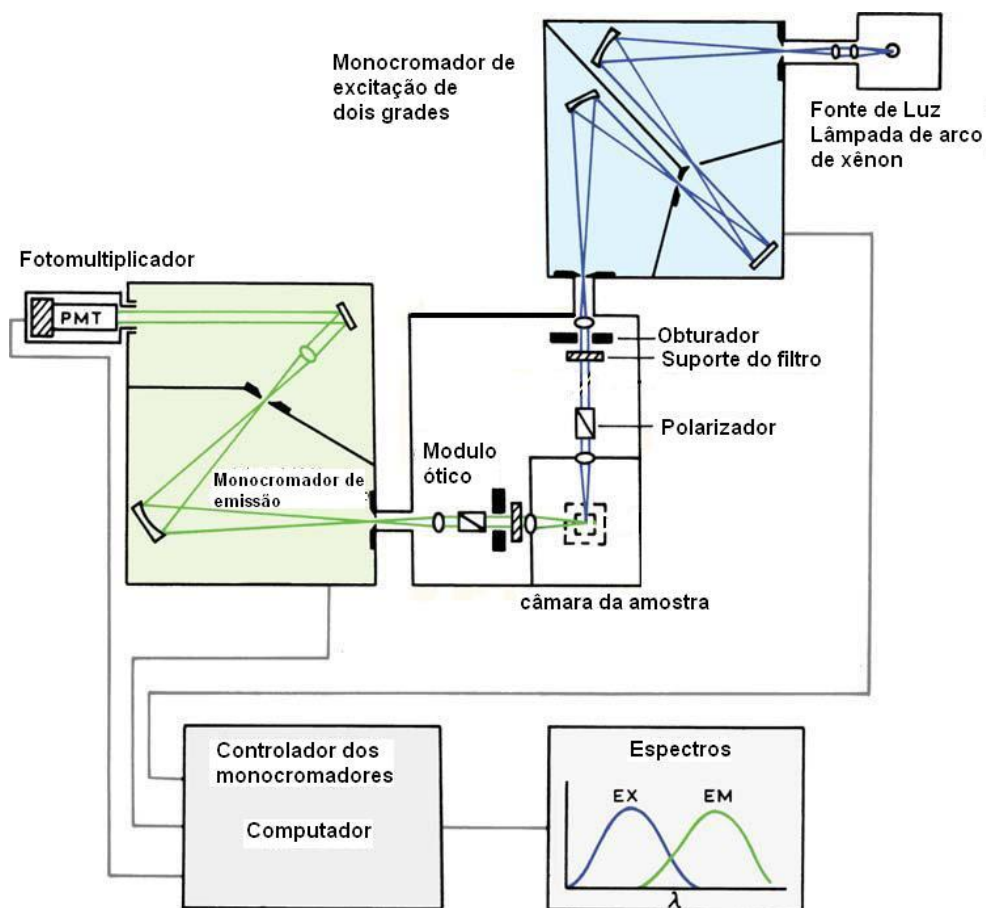


Figura 3. 4 Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro com geometria perpendicular para excitação e emissão (Lakowicz, 2006).

A emissão molecular fluorescente apresenta vantagens como ferramenta analítica quando comparada com outros métodos de espectroscopia, pois possui elevada sensibilidade às vizinhanças da molécula, a gama linear de análise é maior

e o erro inerente à medição é praticamente constante ao longo de toda a gama de resposta. A sensibilidade da fluorescência é uma consequência do longo tempo que as moléculas permanecem no estado excitado antes do relaxamento. Na fluorescência, um singleto permanece no estado excitado cerca de 10^{-9} s. Nesse tempo vários tipos de processos podem ocorrer, tais como reações de protonação ou desprotonação, mudanças conformacionais locais de proteínas e interações de diversas drogas com sistemas biológicos.

A principal vantagem da fluorescência, sua dependência de fatores ambientais, resulta muitas vezes em desvantagem. A fluorescência pode ser reduzida (supressão) através dum processo de desativação, resultante da interação entre o composto fluorescente e outra substância presente no sistema, por luz ultravioleta, por efeito de temperatura, por efeito de filtro interno, oxigênio e impurezas existentes na solução. Além disso, para concentrações elevadas pode ocorrer a formação de compostos constituídos por várias moléculas fluorescentes, dímeros ou polímeros maiores, o que origina a diminuição da eficiência quântica e a alteração dos espectros de absorção e emissão, resultando numa diminuição da intensidade de fluorescência. Podemos ainda nos referir ao fenômeno de fotodecomposição, onde a luz incidente alterando as propriedades químicas da molécula fluorescente a converte numa outra espécie, mudando também o espectro inicial de absorção e emissão.

Em soluções consideravelmente diluídas (absorbâncias muito pequenas), a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de fluoróforo. Para concentrações suficientemente baixas (absorbância < 0.1) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cubeta. À concentração alta, uma parte significativa da luz incidente é absorvida antes de chegar ao ponto onde a luminescência é observada (efeito de filtro interno) e uma parte significativa da luz emitida também é reabsorvida antes de sair da célula (efeito de filtro interno secundário). O efeito de filtro interno vai levar a um aparente decréscimo da intensidade de fluorescência observada por absorção da fluorescência. A intensidade de fluorescência observada vai depender da densidade óptica do fluoróforo no comprimento de onda de excitação e emissão. Consequentemente a intensidade de fluorescência de um composto é proporcional à concentração apenas para uma gama restrita de densidades ópticas. Em algumas situações é necessário aplicar fatores de correção (Lakowicz, 2006).

Fluorescência resolvida no tempo

Tempos de vida do estado excitado

O tempo de vida τ , equivale ao inverso da constante de velocidade ou taxa do processo envolvido numa relaxação eletrônica (k^{-1}). A absorção de um fóton no ultravioleta leva aproximadamente 10^{-15} s, enquanto que o tempo de relaxação de moléculas em solventes orgânicos é aproximadamente de 10^{-11} s. Por outro

lado a fosforescência caracteriza-se por tempos de vida longos que variam desde 10^{-4} s até valores na faixa de segundos.

O estudo de tempos de vida do estado excitado é amplamente usado em espectroscopia de fluorescência e pode oferecer informações sobre reações intermoleculares tais como: formação de dímeros, excímeros, transferência de energia, distâncias moleculares e difusão rotacional. A natureza do decaimento de fluorescência pode revelar detalhes sobre o microambiente do fluoróforo. Por exemplo, múltiplas constantes de decaimento podem ser atribuídas a um fluoróforo em microambientes diferentes ou a processos de estado excitado. O tempo de vida estabelece a janela temporal durante a qual outros processos de estado excitado (difusão rotacional e translacional, transferência de energia, relaxamento dipolar) podem alterar a emissão e serem detectados.

Há dois métodos utilizados para medir o tempo de vida de fluorescência de um dado fluoróforo: o método pulsado e o harmônico ou de modulação de frequência. Neste trabalho o método utilizado foi o pulsado e o detalharemos a seguir.

Método Pulsado: suponhamos que uma amostra contendo um fluoróforo é excitada com um pulso de luz infinitamente curto resultando em uma população inicial N_0 de fluoróforos no primeiro estado excitado singleto. A população no estado excitado decai com uma taxa $k_r + k_{nr}$ de acordo a equação

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr}) \cdot N(t) \quad 3.5$$

onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas no tempo t , k_r é a taxa radiativa (fluorescência ou fosforescência), e k_{nr} é a taxa de decaimento não radiativa. A emissão é um evento aleatório, e cada fluoróforo tem a mesma probabilidade de emitir num dado período de tempo. Integrando a equação 3.5, obtemos um decaimento exponencial da população excitada, da seguinte forma

$$N = N_0 \cdot \exp(-t / \tau) \quad 3.6$$

Como a intensidade radiativa (I) é proporcional a $N(t)$ a podemos expressar também como

$$I = \alpha \cdot \exp(-t / \tau) \quad 3.7$$

sendo $\tau = (k_r + k_{nr})^{-1}$ o tempo de vida e α a intensidade no tempo zero.

O tempo de vida de fluorescência é o tempo necessário para a intensidade decair para 63,2%, ou $(1-1/e)$, de seu valor inicial. Comumente, o tempo de vida é determinado do coeficiente angular do gráfico $\log I(t)$ versus t (Fig. 3.5).

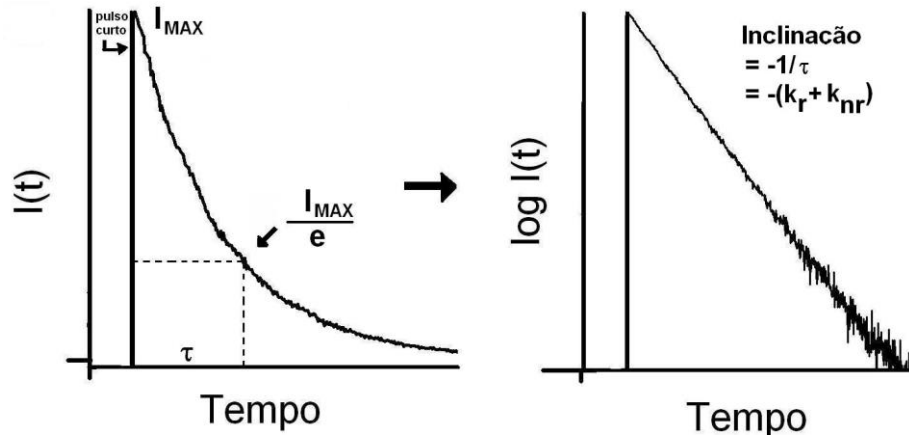


Figura 3.5 Descrição esquemática de uma curva de decaimento de fluorescência utilizando o método de pulsado.

Para um decaimento multiexponencial com n componentes, a $I(t)$ é representada por:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \exp(-t / \tau_i) \quad 3.8$$

A intensidade fracionária da componente i , ou contribuição fracionária da componente i para a intensidade estacionária, é

$$f_i = \frac{\int_0^{\infty} I_i(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} I(t) \cdot dt} = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i} \quad 3.9$$

Com $\sum_{i=1}^n f_i = 1$.

No caso de decaimentos de fluorescência multiexponenciais, podemos calcular o tempo de vida médio como

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot I(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} I(t) \cdot dt} \quad 3.10$$

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i} = \sum_{i=1}^n f_i \cdot \tau_i \quad 3.11$$

Nesta definição, cada tempo de decaimento é ponderado pela intensidade fracionária. Esta média é chamada de tempo de decaimento com média nas intensidades.

Outra possibilidade é o uso das amplitudes (fatores pré-exponenciais) como peso:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} = \sum_{i=1}^n a_i \cdot \tau_i \quad 3.12$$

onde a_i são as amplitudes fracionárias

$$a_i = \frac{\alpha_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} \quad 3.13$$

Esta média é chamada de tempo de decaimento com média nas amplitudes.

A definição usada depende do fenômeno estudado. Por exemplo, o tempo de decaimento com média nas intensidades deve de ser usado para calcular uma constante colisional média, enquanto, em experimentos de transferência de energia ressonante, o tempo de decaimento com média nas amplitudes deve de ser usado em cálculos de eficiência de transferência de energia (Lakowicz, 2006).

Arranjo experimental

O equipamento de fluorescência resolvida no tempo empregado nosso trabalho para as medidas de tempo de vida de fluorescência (ou parâmetros de decaimento) foram baseadas no método de contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC - Time Correlated Single Photon Counting). Fig. 3.6 mostra um diagrama de um fluorímetro de contagem de fóton único. O princípio deste método se baseia no fato de que a probabilidade de detectar um fóton único no tempo t depois de um pulso de excitação é proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo. Após a sincronização e gravação de fótons únicos, depois de um grande número de pulsos de excitação, a curva de decaimento da intensidade de fluorescência é reconstruída.

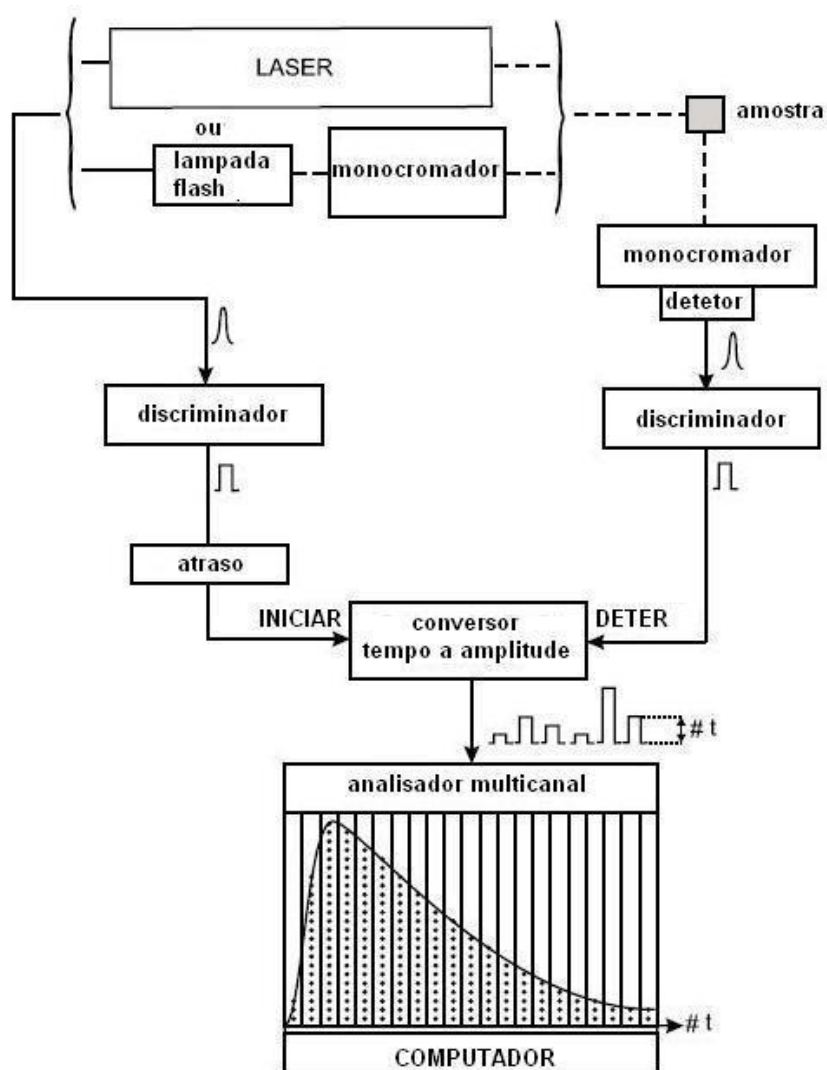


Figura 3.6. Diagrama esquemático de um fluorímetro de contagem de fóton único (Valeur, 2001).

A fonte de excitação pode ser uma lâmpada de flash ou laser. Um pulso elétrico associado com o pulso ótico é gerado e encaminhado – através de um discriminador – para a entrada INICIAR do conversor tempo-amplitude. Por outro lado, a amostra é excitada pelo pulso ótico e emite fluorescência. Os sistemas óticos são ajustados de modo que o fotomultiplicador detecte não mais de um fóton por cada pulso de excitação. O pulso elétrico correspondente é encaminhado – através de um discriminador – para a entrada de DETER do conversor tempo-amplitude. Este último gera um pulso de saída cuja amplitude é diretamente proporcional ao intervalo de tempo entre os pulsos INICIAR e DETER. O intervalo de tempo é convertido a um valor digital por meio de um conversor analógico-digital. O analisador multicanal aumenta de um o conteúdo do canal de memória correspondendo ao valor digital do pulso detectado. Depois de um grande número de eventos de excitação-deteccção, forma-se o histograma dos fótons detectados, que representa a curva de decaimento de fluorescência. Obviamente, quanto maior o número de eventos melhor é a precisão da curva de decaimento.

Geralmente, as fontes luminosas disponíveis fornecem pulsos de diferentes intervalos de duração. Como consequência, o decaimento de fluorescência observado deve de ser corrigido pela largura do pulso da lâmpada. Este procedimento é geralmente denominado de deconvolução espectral. Quando a deconvolução é necessária, o perfil temporal da lâmpada do pulso de excitação é gravado sob as mesmas condições por substituição da amostra por uma solução dispersante. Esta dificuldade causada pela largura (duração) do pulso pode ser minimizada pelo uso de lasers com pulsos de curta duração (picosegundos).

Supressão de fluorescência

Denomina-se supressão de fluorescência, qualquer processo que diminui a intensidade de fluorescência de uma dada espécie. Estes processos podem ser: reações no estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia, formação de complexos (supressão estática) e supressão por colisão (supressão dinâmica). Tanto para a supressão de fluorescência dinâmica quanto estática se requer um contacto entre o fluoróforo e o agente supressor e, consequentemente, estes tipos de supressão nos fornecem informações importantes sobre o fluoróforo.

Supressão dinâmica de fluorescência: consiste na desativação da fluorescência do estado excitado por colisão do fluoróforo com o agente supressor durante o tempo de vida do estado excitado. Geralmente, após o contacto entre ambos, o fluoróforo regressa ao estado fundamental sem emissão de fóton e sem qualquer alteração química das moléculas envolvidas. A supressão de fluorescência dinâmica, ou colisional, é descrita pela equação de Stern - Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad 3.14$$

onde F_0 e F representam, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, k_q é a constante bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo vida na ausência do agente supressor e $[Q]$ é a concentração do agente supressor. A constante de Stern-Volmer, K_{SV} , é dada por $\tau \cdot k_q$ e representa-se também por K_D . A constante bimolecular reflete a eficiência da supressão ou a acessibilidade do fluoróforo ao supressor.

Supressão estática de fluorescência: consiste na formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Quando este complexo absorve luz, ele imediatamente retorna ao estado fundamental sem emissão de fóton.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad 3.15$$

Note-se que a dependência de F_0/F em relação a $[Q]$ é linear e é idêntica à observada para supressão dinâmica, exceto que a constante de supressão é agora a constante de associação.

Geralmente representa-se graficamente F_0/F em função de $[Q]$ e espera-se que F_0/F varie linearmente com a concentração do supressor. A reta obtida deste

gráfico intercepta o eixo das ordenadas em $F_0/F = 1$ e sua inclinação nos fornece a constante K_{SV} . O valor de $1/K_{SV}$ é a concentração do supressor para a qual $F_0/F = 2$, ou seja, 50% da intensidade é suprimida.

Em geral, um gráfico de Stern-Volmer linear indica uma única classe de fluoróforos ou pelo menos todos igualmente acessíveis ao supressor. Se existir mais de uma classe de fluoróforos, cujas acessibilidades ao supressor são distintas, então o gráfico de Stern-Volmer já não será linear.

É importante observar aqui que apenas o gráfico linear de Stern-Volmer não prova a ocorrência de supressão dinâmica ou estática. A medida de tempos de vida é o método mais definitivo para poder distinguir a supressão estática da dinâmica. A supressão estática remove uma fração dos fluoróforos observados. Fluoróforos complexados não são fluorescentes e observa-se apenas a fluorescência dos fluoróforos não complexados. A fração não complexada não é perturbada, e o tempo de vida vai permanecer constante igual a τ_0 . Portanto para uma supressão estática $\tau/\tau_0 = 1$. Em contraste, a supressão dinâmica é um processo que diminui a população do estado excitado pela adição de uma taxa de decaimento não radiativo, implicando no decréscimo do tempo de vida (Fig. 3.7 A). Este decréscimo é equivalente ao da intensidade de fluorescência: $F_0/F = \tau_0/\tau$ para uma supressão dinâmica.

Por outro lado, tomando em conta o coeficiente de difusão das moléculas, a supressão dinâmica pode ser distinguida da estática. A supressão dinâmica depende da difusão, já que a altas temperaturas os coeficientes de difusão aumentam, e consequentemente espera-se que as constantes de supressão bimoleculares também aumentem. Em contraste, ao incrementar a temperatura é provável que aconteça uma diminuição na estabilidade do complexo, e assim os valores das constantes de supressão estática sejam mais baixos (Fig. 3.7 B).

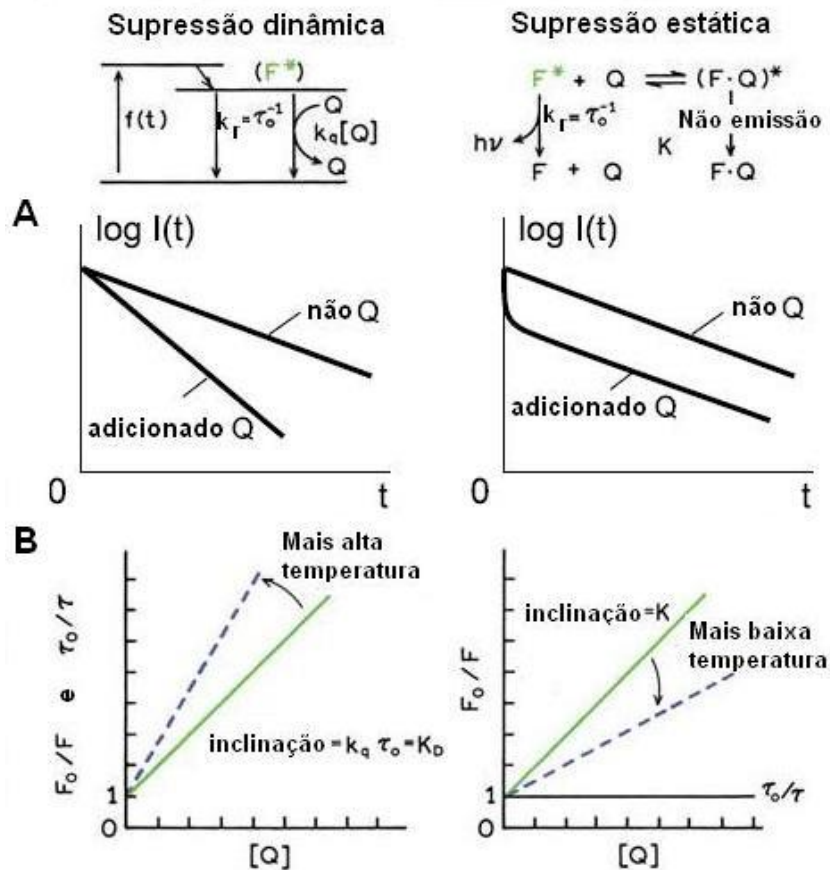


Figura 3.7. Comparação entre supressão dinâmica e estática, mediante medidas de tempo de vida (A) e variações de temperatura (B) (modificado de Lakowicz, 2006).

Outro método adicional para distinguir entre estes dois tipos de supressão de fluorescência envolve a análise dos espectros de absorção das espécies em contato. A supressão de fluorescência dinâmica afeta apenas os estados excitados dos fluoróforos, e assim nenhuma mudança no espectro de absorção é observada, enquanto que na supressão estática a formação do complexo no estado fundamental frequentemente resulta em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo.

Anisotropia de fluorescência

Ao iluminar uma amostra com luz polarizada, geralmente a fluorescência emitida pela amostra é polarizada, podendo ter uma polarização diferente da de excitação. A extensão de polarização de emissão pode ser descrita em função da anisotropia (r_0). A origem deste fenômeno está baseada na existência de momentos de dipolos de transição da absorção e emissão, que estão alinhados ao longo de direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. A Fig. 3.8, mostra dois momentos de dipolo de transição da absorção do antraceno.

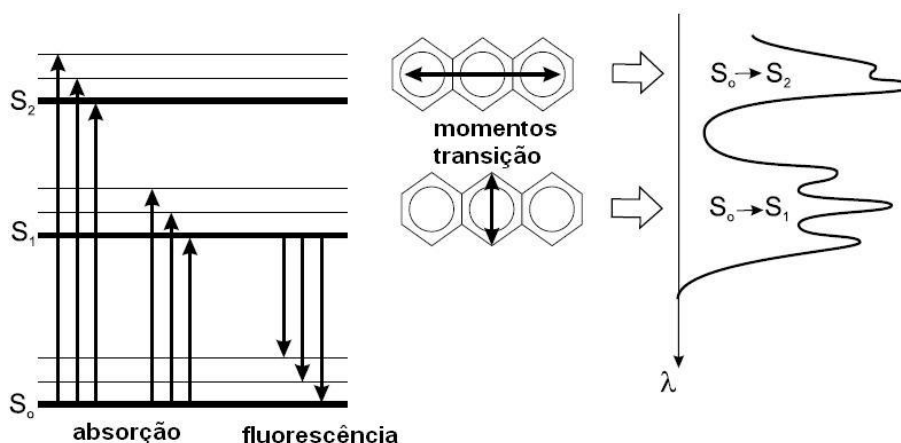


Figura 3.8. Momentos dipolares de transição do antraceno (modificado de Valeur B., 2001).

Em solução homogênea, as moléculas fluorescentes em seu estado fundamental são orientadas aleatoriamente. Quando expostas à luz polarizada, os fluoróforos que têm seus momentos de dipolo de transição orientados numa direção perto da direção do vetor campo elétrico da radiação incidente são preferencialmente excitados. Se a população dos estados excitados não está orientada aleatoriamente, o resultado seria uma emissão polarizada.

Os momentos de dipolo de transição para absorção e para emissão têm orientações fixas em cada fluoróforo e o ângulo entre estes momentos determinam a anisotropia máxima medida (r_0). Porém este valor pode ser diminuído por vários fenômenos cuja importância dependerá da amostra a ser analisada.

A despolarização da fluorescência acontece porque o momento de transição sofre mudanças durante o tempo de vida do estado excitado, causando um decréscimo na anisotropia. A despolarização de fluorescência pode ser causada por vários fenômenos como a difusão rotacional, que é a causa mais comum na despolarização. Medições de anisotropia revelam o deslocamento médio angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton. Este deslocamento angular depende da velocidade e extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Os movimentos de difusão interna, por sua vez, dependem da viscosidade do solvente, do tamanho e da forma das espécies que sofrem difusão.

Para fluoróforos pequenos em solução de baixa viscosidade, a difusão rotacional é mais rápida que a emissão e, conseqüentemente, ela é despolarizada e a anisotropia é próxima de zero.

A medida de anisotropia de fluorescência está ilustrada na Fig. 3.9. Neste caso a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente e o vetor campo elétrico de excitação está orientado paralelo ao eixo z. A intensidade da emissão é medida com o auxílio de um polarizador. Quando este está orientado paralelamente ($\parallel$) à direção da excitação, a intensidade é $I_{\parallel}$. Por outro lado, quando o polarizador está orientado perpendicularmente ($\perp$) à excitação, a intensidade medida é chamada de $I_{\perp}$. A anisotropia de fluorescência é definida por

$$r = \left(\frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \right) \quad 3.16$$

A excitação das moléculas depende do ângulo θ entre o plano da polarização da luz incidente e o momento de dipolo da transição. A probabilidade de ocorrer uma absorção é proporcional ao $\cos^2\theta$. Para a luz completamente polarizada $I_{\perp} = 0$ e $r = 1,0$. Este valor é geralmente encontrado para a luz espalhada (espalhamento de Rayleigh).

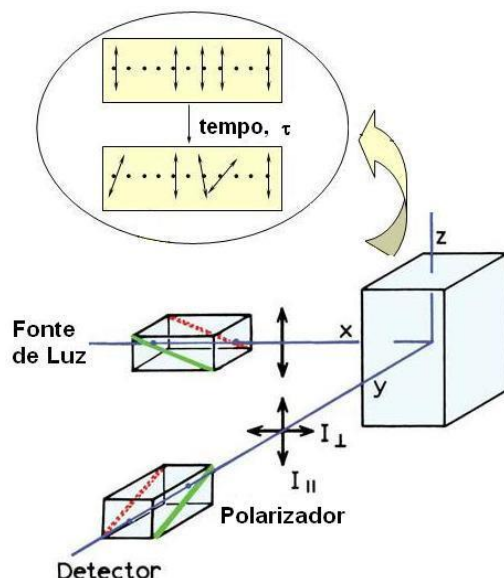


Figura 3.9. Diagrama esquemático para a medida de anisotropia de fluorescência (modificado de Lakowicz, 2006).

Valores de r iguais à unidade, nunca são encontrados para fluoróforos em solução, pois como a amostra não se encontra orientada, a dependência do $\cos^2\theta$ resulta na excitação de um número significativo de moléculas que não têm dipolos de transição alinhados exatamente ao longo do plano de polarização. Essas moléculas não alinhadas, quando emitem, podem ter componentes tanto da luz polarizada paralelamente quanto daquela polarizada perpendicularmente. Portanto r terá sempre um valor menor que a unidade.

Além disto, se os dipolos de absorção e emissão fossem paralelos, estivessem congelados, não houvesse despolarização e a média sobre todos os ângulos θ fosse considerada, a anisotropia teria valores característicos de $r_0 = 0,4$. Geralmente estes dipolos não são paralelos, mas têm um ângulo β em relação ao outro, reduzindo ainda mais os valores de r_0 . Estes valores são chamados de intrínsecos e são dados por:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad 3.17$$

É interessante notar que o valor de r_0 é zero quando $\beta = 54,7^\circ$ e, quando β se torna maior que $54,7^\circ$, a anisotropia se torna negativa, alcançando o valor mínimo de $-0,20$ para $\beta = 90^\circ$.

Na prática, as medidas de anisotropia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo são realizadas, em geral, utilizando-se o método do formato-L. Neste método os fluorímetros usam um único canal de emissão. A Fig. 3.10 mostra o diagrama esquemático do formato-L. Os comprimentos de excitação e emissão são geralmente selecionados por monocromadores. O monocromador de excitação polariza parcialmente a luz incidente. Como resultado, a rotação do polarizador de excitação para as posições horizontal (H) e vertical (V) dá origem a diferentes intensidades da luz incidente. Similarmente, o monocromador de emissão tem eficiência diferente para transmissão da luz polarizada horizontalmente e verticalmente. Consequentemente, a rotação do polarizador de emissão muda a sensibilidade efetiva do canal de emissão. O objetivo é medir as intensidades $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ independentemente do sistema de detecção, ou seja, os valores reais de $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$.

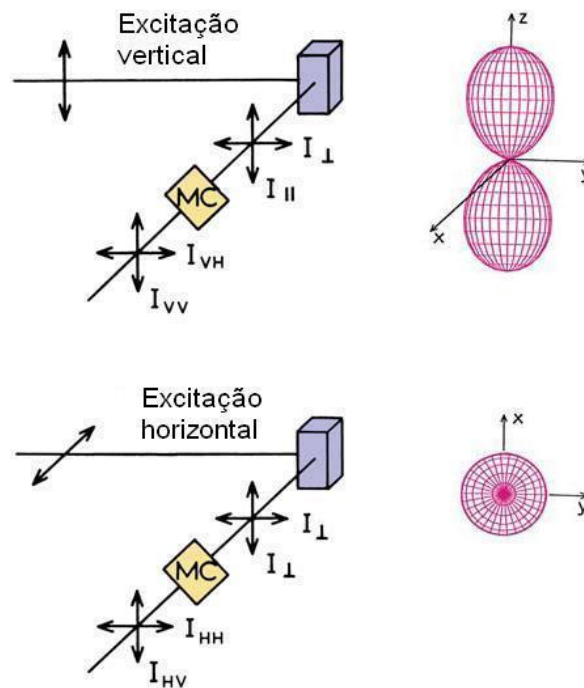


Figura 3.10. Diagrama esquemático para a medida de anisotropia de fluorescência utilizando-se o método de formato-L. MC monocromador. Os gráficos ao lado são as distribuições das populações do estado excitado (modificado de Lakowicz, 2006).

Utilizando as letras H e V para denotar orientação horizontal e vertical, respectivamente, teríamos, por exemplo, a notação I_{HV} correspondente à intensidade da emissão obtida com o monocromador de excitação posicionado horizontalmente e o de emissão posicionado verticalmente. Sendo S_V e S_H a sensibilidade vertical e horizontal do canal de emissão, respectivamente, para excitação polarizada verticalmente, observamos intensidades polarizadas iguais a:

$$I_{VV} = k S_V I_{\parallel} \quad 3.18$$

$$I_{VH} = k S_H I_{\perp} \quad 3.19$$

Sendo k a constante de proporcionalidade que leva em conta o rendimento quântico do fluoróforo e outros fatores instrumentais. Dividindo-se a equação 3.18 pela equação 3.19 temos:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{||}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{||}}{I_{\perp}} \quad 3.20$$

Para calcular a razão entre as intensidades $I_{||} / I_{\perp}$ é preciso calcular G que é a razão entre as sensibilidades S_V e S_H .

Este fator G é facilmente medido utilizando-se a excitação polarizada horizontalmente. Quando isto é feito, ambas componentes polarizadas verticalmente e horizontalmente são proporcionais a $I_{\perp}$. Isto se deve a que estas orientações são perpendiculares à polarização da excitação ou que o eixo de polarização da excitação é um eixo de simetria. Disto decorre que:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad 3.21$$

Conhecendo G , pode-se calcular $I_{||}/I_{\perp}$ por:

$$\frac{I_{||}}{I_{\perp}} = \frac{1}{G} \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \quad 3.22$$

A anisotropia, então, pode ser calculada por:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad 3.23$$

Decaimento de Anisotropia de Fluorescência

Vamos supor que um fluoróforo é excitado com um pulso curto de luz polarizada verticalmente e que ele tem um único tempo de correlação rotacional. O decaimento de anisotropia é determinado pela medida dos decaimentos das componentes da emissão polarizadas verticalmente ($||$) e horizontalmente ($\perp$). Se os momentos de transição de absorção e emissão são colineares, $r_0=0,4$. Assumindo que $r_0>0$, o pulso de excitação polarizado verticalmente, produz uma população de fluoróforos enriquecida na orientação paralela. O decaimento resultante da diferença entre $I_{||}(t)$ e $I_{\perp}(t)$, quando propriamente normalizado pela intensidade total, é o decaimento de anisotropia.

A interpretação do decaimento de anisotropia é bem entendida em termos das componentes individuais. Os decaimentos das componentes da emissão paralela ($||$) e perpendicular ($\perp$) são dados por:

$$I_{||} = \frac{1}{3} I(t) [1 + 2r(t)] \quad 3.24$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{3} I(t) [1 - r(t)] \quad 3.25$$

sendo $r(t)$ o decaimento de anisotropia. Geralmente $r(t)$ pode ser descrito como um decaimento multiexponencial:

$$r(t) = r_0 \sum_j g_j \exp(-t/\tau_{c_j}) = \sum_j r_{0j} \exp(-t/\tau_{c_j}) \quad 3.26$$

sendo $r_0 = \sum_j r_{0j}$ a anisotropia na ausência de difusão rotacional, os τ_{c_j} os tempos de correlação rotacional individuais, e g_j são as amplitudes fracionárias associadas a cada tempo de correlação no decaimento de anisotropia ($1 = \sum_j g_j$).

Similarmente à anisotropia estática, o decaimento de anisotropia é obtido como:

$$r(t) = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{//}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{//}(t) - I_{\perp}(t)}{I(t)} \quad 3.27$$

onde $I(t)$ é a intensidade total no tempo t , igual a $I_{//}(t) + 2I_{\perp}(t)$.

Sob iluminação constante, a anisotropia medida é a estacionária r_S . Usando a definição geral para calcular a média de uma quantidade, com a intensidade de fluorescência normalizada, obtemos:

$$r_S = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad 3.28$$

Em medidas de anisotropia realizadas em condições estáticas, o valor de r_S pode ser interpretado em termos da microviscosidade η , aplicando-se a equação de Perrin para decaimentos monoexponenciais:

$$r_S = \frac{r_0}{1 + \tau/\tau_c} \quad 3.29$$

sendo r_0 o valor máximo da anisotropia de fluorescência em ausência de qualquer movimento de rotação, τ é o tempo de vida da fluorescência e, τ_c o tempo de correlação rotacional do fluoróforo, que é função de η , da temperatura absoluta T e do volume hidrodinâmico da molécula esférica fluorescente V , conforme se mostra na equação de Stokes-Einstein:

$$\tau_c = \eta V / RT \quad 3.30$$

Leis do Decaimento de Anisotropia: dependendo do tamanho e da forma do fluoróforo e do meio em que está disperso, uma grande variedade de tipos de decaimentos de anisotropia pode ser obtida. Não obstante, os decaimentos de anisotropia podem ser mais complexos se os fluoróforos não forem esféricos ou se uma molécula não esférica está localizada em ambiente anisotrópico. Outra origem de decaimentos complexos de anisotropia é a flexibilidade interna de um fluoróforo dentro de uma macromolécula como uma proteína.

Se uma molécula não é esférica, podemos imaginar a rotação da molécula em torno de cada um de seus eixos. Por exemplo, uma molécula tipo perileno, que

tem a forma de um disco, deve rodar em seu plano de simetria muito mais rápido do que fora dele. Isto se deve ao fato de que fora do plano a quantidade de moléculas de solvente que o fluoróforo deve deslocar é maior. Moléculas como estas são conhecidas como rotores anisotrópicos (Fig. 3.11).

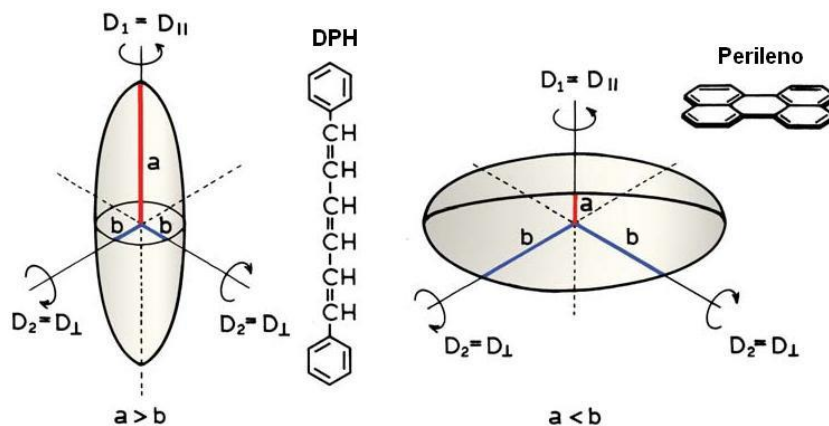


Figura 3.11. Representação geométrica das sondas fluorescentes DPH e perileno, Os coeficientes de difusão rotacional são representados pela letra D (modificado de Lakowicz, 2006).

Decaimentos de anisotropia podem ser complexos mesmo quando o fluoróforo comporta-se como rotor isotrópico, se estas moléculas estão em um meio anisotrópico. Por exemplo, para o DPH, o dipolo de emissão é orientado aproximadamente ao longo do eixo molecular mais longo. As rotações que decorrem deste dipolo devem ser isotrópicas devido a que a molécula é aproximadamente simétrica em torno deste eixo. Entretanto, quando o DPH está em membrana, usualmente encontra-se um decaimento de anisotropia de fluorescência complexo. Os movimentos rotacionais do DPH são impedidos e sua anisotropia não decai para zero. Devido a este impedimento, a faixa angular do movimento rotacional é limitada. Nestes casos, uma anisotropia limite (r_∞) é observada com tempo longo quando comparado ao tempo de vida de fluorescência. Geralmente, em membranas lipídicas, $r(t)$ pode ser aproximado a uma única exponencial que decai para um valor finito e é descrito como:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \exp(-t/\tau_c) + r_\infty \quad 3.31$$

O termo constante r_∞ é interpretado como o resultado de uma barreira de energia que impede a difusão rotacional do fluoróforo além de certo ângulo. O parâmetro r_∞ serve também para medir a ordem orientacional dos fluoróforos no interior da membrana. A sonda fluorescente DPH é uma molécula conhecida por estar localizada profundamente na bicamada lipídica e orientar-se paralelamente à cadeia do lipídio. Portanto, esta sonda fluorescente detecta a ordem orientacional das cadeias. Identificando o parâmetro de ordem da sonda identificamos o parâmetro de ordem dos lipídios.

A anisotropia estacionária, em membrana lipídica, r_s pode ser expressa em função de dois termos, como mostra a seguinte expressão:

$$r_S = \frac{r_0}{1 + \tau/\tau_c} + r_\infty \quad 3.32$$

O primeiro termo representa a contribuição cinética e o segundo a contribuição estrutural. O parâmetro τ_c nos informa sobre as propriedades cinéticas tais como a viscosidade η . Em membranas lipídicas, usando a equação 3.32, viu-se que a contribuição cinética da r_S de DPH não é maior do que 3 %. Isto significa que a ordem lipídica da membrana pode ser avaliada pela anisotropia estacionária, r_S (Jähnig, 1979).

Frações de membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase

Para o estudo das membranas e da proteína Na⁺, K⁺-ATPase, foram utilizadas frações de membranas ricas em Na⁺, K⁺ - ATPase obtida de rim de porco. Esta proteína Na⁺, K⁺-ATPase tem uma massa molecular de aproximadamente 150 kDa. A atividade aproximada das amostras era de 4 unidades / mg^[22] ($\mu\text{M Pi} / \text{mg}^{[22]}\cdot\text{min}^{[22]}$). As suspensões de membranas possuíam concentrações de proteína de 4,2 mg/ ml.

Também foram utilizadas frações de membranas ricas em Na⁺, K⁺- ATPase de crustáceo de água doce (espécie normal) e adaptada em água salgada (espécie adaptada). As suspensões de membranas tinham concentrações de proteína de 0,68 mg/ml para a espécie normal e 0,78 mg/ml para a espécie adaptada.

A relação em massa entre os lipídios e a proteína nas frações de membranas foi considerada como 1.5, conforme determinações feitas em várias membranas purificadas em Na⁺, K⁺- ATPase. As alíquotas contendo as frações de membranas eram armazenadas a -15°C e descongeladas no mesmo dia do experimento para preparar as amostras.

Reagentes

Os derivados de fenotiazinas clorpromazina, flufenazina e trifluoperazina foram adquiridos da Sigma. Prepararam-se estoques de 5 mM de fenotiazinas em etanol. As soluções eram cobertas com papel metálico para evitar alguma fotodegradação durante o armazenamento.

Foram utilizados os tampões fosfato pH 7,4 e citrato - fosfato em diferentes valores de pH. Nos experimentos usando a sonda FITC utilizou-se o tampão Tris 50 mM, pH 9,0 no processo de marcação. O tampão Tris 10 mM a pH 7,4 foi utilizado no experimento com DPH. Foi utilizada água milli-Q em todas as preparações.

Sondas fluorescentes

Todas as sondas fluorescentes utilizadas neste trabalho foram adquiridas de Sigma:

- **FITC** (Fluoresceína isotiocianato – isômero I): marcador de proteínas via grupo amina (especialmente lisina). Em Na^+ , K^+ - ATPase marca especialmente a lisina perto do sítio de ligação do ATP, onde se produz a fosforilação. Preparou estoque de 5 mM de FITC (Sigma) em solvente de DMSO e utilizou-se no mesmo dia.
- **DPH** (1,6 – diphenyl - 1,3,5 - hexatriene): muito utilizado como sonda do interior de membranas. A intercalação de DPH em membranas é acompanhada de forte aumento da fluorescência. A polarização da fluorescência é alta na ausência de movimento rotacional e é muito sensível à reorientação, o que permite sua utilização em medidas de fluidez de membranas. Preparou-se estoque de 1 mM de DPH (Sigma) em tetrahidrofurano (THF). Para as medidas de anisotropia da fluorescência estacionária foram utilizadas concentrações da ordem de 2,4 μM a 4,0 μM .
- **1,8-ANS** (1 – anilinonaphthalene – 8 - sulfonic acid): o rendimento quântico de fluorescência do ANS é dependente das vizinhanças e particularmente sensível à presença de água (perto de 0.4 em EtOH, 0.2 em MeOH e 0.004 em água).

Instrumentação

Espectrofotômetro, espectrofluorímetro estacionário e resolvido no tempo

As medidas de absorção óptica foram realizadas na faixa de 200-800 nm à temperatura ambiente no espectrofotômetro com detecção por arranjo de diodos e resolução de 2 nm, modelo HP 8452^a. Os espectros foram medidos utilizando-se um tempo de integração igual a 1 s.

As medidas de fluorescência foram feitas utilizando o sistema de fluorescência no estado estacionário PTI – QMI, sob agitação magnética.

Medidas de tempo de vida e tempo de correlação rotacional (anisotropia de fluorescência) foram realizadas no sistema de fluorescência resolvida no tempo Horiba-Jobin Ivon-IBH, que utiliza o método de contagem de fóton único (Laboratório multiusuário FLIRT, Departamento de Física da PUC–Rio). A fonte de luz usada para a excitação foi um nanoLED N-16, com taxa de repetição máxima de 1 MHz, emitindo em 330 nm com uma duração de pulso nominal de 1,0 ns.

Para as medidas de absorção e fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de seção transversal 10 × 10 mm ou 10 × 4 mm, capacidade volumétrica de 3 ml ou 1 ml, respectivamente.

As medições de pH foram feitas usando o pH metro Cole-Parmer Chemcadet 5986-25 com um eletrodo combinado semimicro Ag/AgCl.

Absorção óptica

As medidas de absorção dos sistemas moleculares em estudo são realizadas medindo-se primeiramente o “branco” que é automaticamente subtraído dos espectros de absorção das amostras. Para obter as concentrações adequadas assim como comprimentos de onda adequados à excitação da fluorescência de uma amostra, analisam-se os comprimentos de onda dos picos de absorção e seus coeficientes de absorção molar. Para evitar efeitos de filtro interno a absorbância no comprimento de onda de excitação não deve ser maior do que 0,1.

Fluorescência estacionária

Os espectros de fluorescência são obtidos depois de selecionar o intervalo de varredura e o comprimento de onda de excitação para certa amostra, os espectros de fluorescência foram registrados com taxa de varredura de 1 nm/s. Procurou-se trabalhar com concentrações e comprimentos de onda de excitação onde o valor da absorbância era menor que 0,1.

Os dados dos espectros obtidos foram analisados com o programa Origin, Microcal. Para obter gráficos de fluorescência, em dado comprimento de onda λ , em função do parâmetro variável, escolhia-se no espectro um pequeno intervalo de comprimentos de onda centrado em λ e tomava-se a média das intensidades de fluorescência nesse intervalo. O tamanho do intervalo escolhido dependia do ruído associado ao espectro e da variação da fluorescência em torno do λ escolhido para análise. A intensidade de fluorescência foi corrigida pela diluição, quando necessário. A correção do filtro interno para a intensidade de fluorescência é feita para absorbâncias maiores do que 0.1 utilizando para o fator de correção f_{fi} a seguinte expressão (Lakowicz, 2006):

$$f_{fi} = 10^{(A_{exc} \ell_{exc} + A_{em} \ell_{em}) / 2}$$

onde A_{exc} , ℓ_{exc} e A_{em} , ℓ_{em} são as absorbâncias e caminhos óticos nos comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente.

Para as medidas de fotodegradação, as amostras de fenotiazinas foram iluminadas com a fonte de luz do espectrofluorímetro (lâmpada de Xe) em 310 nm. Ajustando as larguras das fendas de excitação e os intervalos de tempo (em média 6 min) podemos dosar a energia incidente nas amostras. Teve-se precaução de que as fenotiazinas não fossem iluminadas, a não ser que se

estivesse medindo um espectro ou irradiando com a lâmpada. Isto evita um tempo não contabilizado de fotodegradação. Além do mais, todas as amostras foram agitadas magneticamente misturando as regiões irradiadas com as não irradiadas, uniformizando em todo momento a solução aquosa.

A variação dos espectros de absorção e de fluorescência com a irradiação das fenotiazinas é analisada da seguinte maneira: observa-se o deslocamento nos máximos e o aparecimento de picos característicos de alguma espécie de fenotiazina; a formação de pontos isosbéticos nos informa se ocorre transição entre duas espécies.

Nas medidas de fluorescência de amostras contendo suspensões de membranas- Na^+ , K^+ - ATPase, em que todas as titulações foram realizadas a concentração constante de membrana, observou-se espalhamento considerável nos espectros. O espectro referência obtido na ausência de fluoróforo era subtraído posteriormente das outras medidas.

Anisotropia de fluorescência estacionária

Membranas- Na^+ , K^+ -ATPase foram marcadas com DPH em condições ambientais, incubadas entre 2 e 3 horas para conseguir que DPH se inserisse completamente entre os lipídios. Medições de anisotropia de fluorescência da DPH foram realizadas em dois tipos diferentes de Na^+ , K^+ -ATPase, de rim porco e de crustáceo. Manteve-se a relação entre as concentrações de DPH e lipídios a 1/50, que é suficientemente pequena para perturbar pouco a membrana.

Para as medidas de fluorescência, as moléculas de DPH são excitadas em seu pico de absorção em 352 nm. Sabendo que as fenotiazinas absorvem em comprimentos de onda menores de 352 nm, evitamos que estas se fotodegradem.

Polarizadores de excitação e emissão foram usados para medir a anisotropia do DPH. As amostras são excitadas com luz polarizada verticalmente. As intensidades de fluorescência polarizadas verticalmente e horizontalmente são medidas para calcular a anisotropia usando a seguinte equação:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (4.1)$$

onde G é o fator de correção instrumental dado por $G = I_{HV}/I_{HH}$. G foi determinado medindo-se as intensidades de fluorescência I_{HV} e I_{HH} usando luz de excitação polarizada horizontalmente.

Marcação da Na^+ , K^+ - ATPase com FITC

Para estudar as interações das fenotiazinas com o sítio de ligação do ATP da Na^+K^+ -ATPase, marcou-se a enzima com FITC, 120 μl da solução de membranas (~0,5 mg de proteína $\approx$ 3 nmol) em TRIS 50 mM (a pH 9.0) contendo FITC (7,5 nmol). A solução foi agitada por 1h 30min em ambiente escuro. Em seguida,

dialisou-se a amostra por um tempo de 12 horas, com a finalidade de separar as moléculas de FITC que não se ligaram à proteína. O meio externo da membrana foi o mesmo tampão TRIS. Todo o sistema foi agitado durante o processo. A Fig. 4.3 mostra esquematicamente o processo de separação ou diálise realizada nesse trabalho.

A Fig. 4.4 mostra a localização da FITC na proteína, que seria o sítio de maior afinidade de ATP na subunidade α e conformação E_1 da proteína (αE_1) (Linnertz et al., 1998). A distância do sítio da AO e da ErITC (eritrosina isotiocianato) para a FITC é de 7,2 nm e 6,5 nm, respectivamente. A ErITC se encontra localizada no sítio de menor afinidade do ATP no estado αE_2 da proteína. As distâncias foram medidas pelo método de transferência de energia de Föster entre estes marcadores fluorescentes.

Depois de finalizada a diálise, a solução contendo a FITC - Na^+ , K^+ -ATPase foi colocada na cubeta de fluorescência, medindo-se os espectros de excitação e emissão da FITC como controle. Avaliou-se em seguida a fluorescência da FITC - Na^+ , K^+ -ATPase tratada com diferentes alíquotas de fenotazinas.

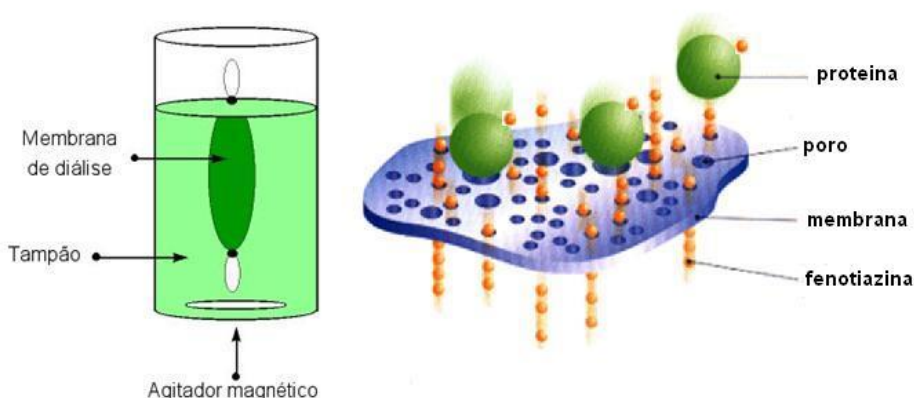


Figura 4.1. Esquema do processo de diálises para separar as moléculas de FITC que não ligaram à Na^+ , K^+ -ATPase.

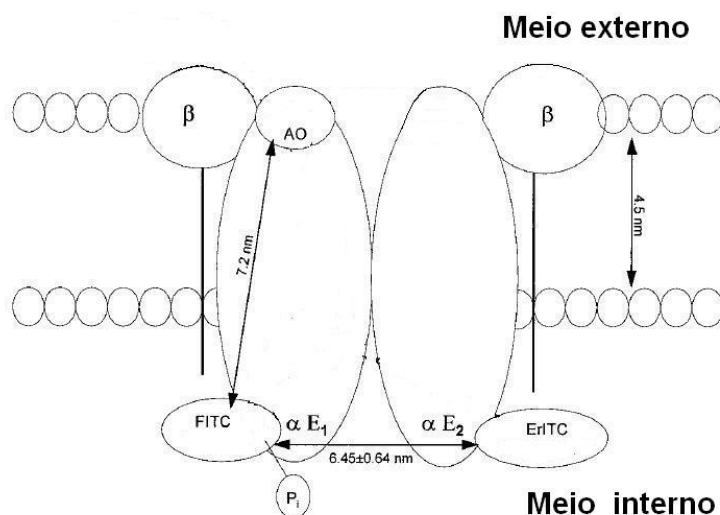


Figura 4.2. Esquema do dímero ($\alpha\beta$)₂ da Na⁺, K⁺-ATPase e localizações dos sítios de alta (conformação αE_1) e baixa afinidade (conformação αE_2) do ATP. As medidas das distâncias relativas dos marcadores fluorescentes (AO, FITC e ErITC) são obtidas por transferência de energia de Föster (Linnertz et al., 1998).

Fluorescência com resolução temporal

Medidas do decaimento da fluorescência e do decaimento da anisotropia foram feitas em um espectrofluorímetro com resolução temporal, baseado no método de contagem de fótons únicos correlacionada no tempo: *time-correlated single-photon counting* (TCSPC). O método baseia-se na excitação da amostra com pulsos de luz, onde os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. TCSPC é uma técnica digital que conta fótons correlacionados temporalmente em relação ao pulso de excitação.

Em cada experimento, os dados foram adquiridos até alcançar um máximo de 10 000 contagens no canal do pico. Para cada curva de decaimento de fluorescência da amostra, um correspondente perfil de lâmpada (LED) usando uma solução espalhadora foi medido. O decaimento da intensidade de fluorescência é representado por uma soma de exponenciais:

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad 4.2$$

onde $I(t)$ é a intensidade de fluorescência, α_i é o fator pre-exponencial, e τ_i é o tempo de vida de fluorescência da componente i . O bom ajuste foi avaliado por χ^2 e resíduos. Para um bom ajuste o valor de χ^2 deve ser perto de 1, mas valores entre 0,8 e 1,2 são considerados adequados. A Fig. 4.6 mostra os resultados de uma medida experimental (pontos) e seu ajuste (curva contínua). A intensidade fracionária ou amplitude relativa, f_i , de cada componente do decaimento foi determinada por $f_i = \alpha_i \tau_i / \sum \alpha_j \tau_j$ e o tempo de vida médio é definido como $\langle \tau \rangle = \sum f_i \tau_i$.

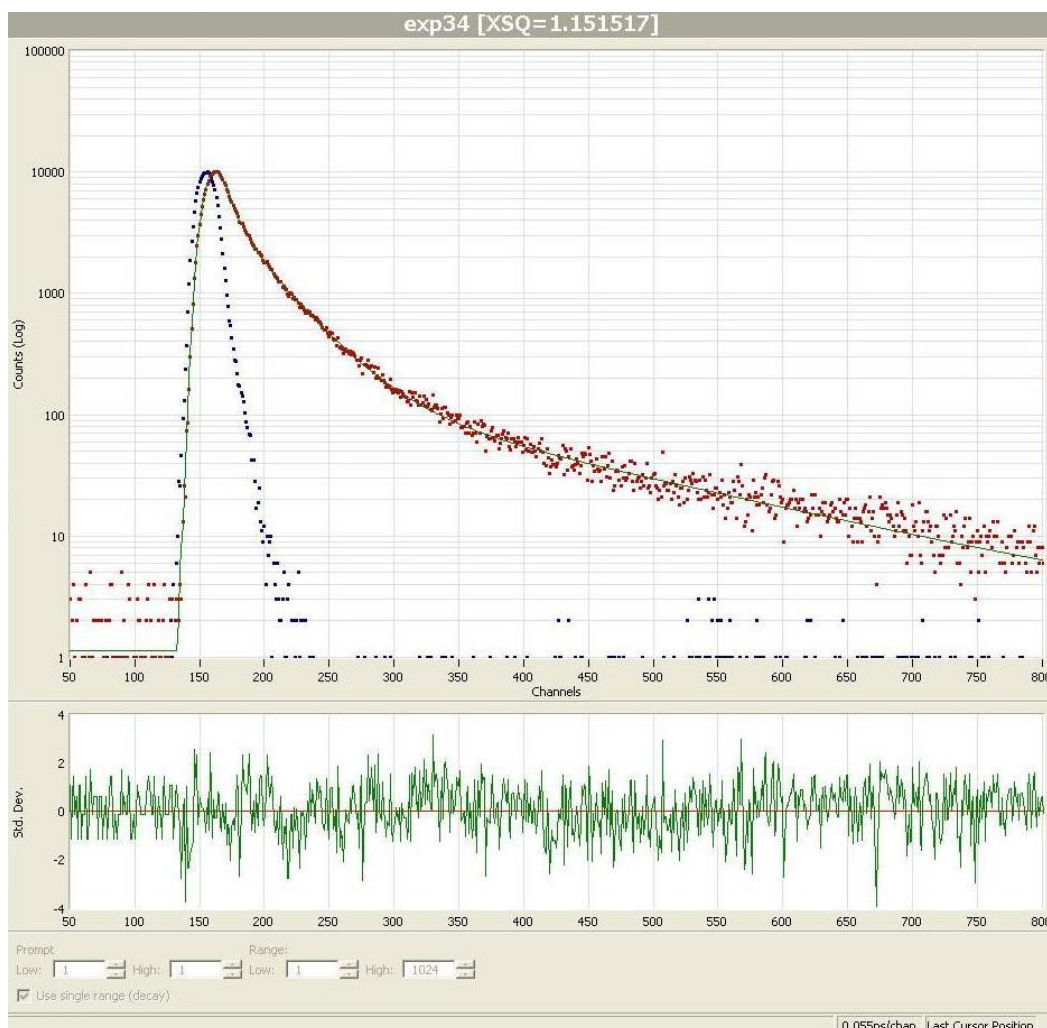


Figura 4.3. Ajuste do decaimento da intensidade da fluorescência de uma medida usando o programa de análise de decaimentos de fluorescência fornecido por HORIBA Jobin Yvon IBH. A parte superior mostra o perfil do LED (pontos não ajustados) e os pontos experimentais ajustados com 3 exponenciais (curva contínua) originando os seguintes tempos: 0,38 ns (41%), 1,8 ns (50%), 9,7 ns (9 %). A parte inferior mostra os resíduos do ajuste. A amostra usada foi a CPZ previamente irradiada (excitação em 330 nm e emissão em 450 nm).

Decaimento da Anisotropia

O decaimento de anisotropia de fluorescência foi medido incorporando-se polarizadores nos monocromadores de excitação e emissão. O decaimento da anisotropia foi gerado da medição do decaimento das intensidades de fluorescência I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} e I_{HH} usando a equação 4.1, onde $G = I_{HV}/I_{HH}$. Para analisar os dados a fim de obter os parâmetros de decaimento de anisotropia, utilizaram-se dois métodos: o método direto de análise e o método com reconvolução. No método direto, os decaimentos são analisados usando um modelo exponencial, em termos de um número de componentes, superposto a uma anisotropia residual (r_{∞}). Este método é muito popular porque é muito rápido, direto, e dá

uma excelente inspeção visual. A Fig. 4.6 mostra uma análise direta de decaimento de anisotropia. No segundo método, a análise (reconvolução) é dividida em duas partes: análise da soma $I_S = (I_{VV} + 2 G I_{VH})$ seguida de análise da diferença $I_D = (I_{VV} - G I_{VH})$. Para obter os parâmetros de decaimento de anisotropia, devemos ajustar I_D com o resultado da reconvolução de I_S . Para a análise de nossas medidas empregamos ambos os métodos.

Para explicar o decaimento da anisotropia nas membranas se utilizou o modelo de movimento dentro de um cone. De acordo com este modelo, o fluoróforo é considerado estar num ambiente limitado e seu movimento orientacional na membrana é descrito como confinado dentro de um cone ao redor da normal à superfície da membrana. O decaimento da anisotropia de fluorescência do fluoróforo na membrana é representado por

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)e^{-t/\tau_c} + r_\infty \quad 4.3$$

onde r_0 é a anisotropia em $t=0$, r_∞ é a anisotropia residual e τ_c é o tempo de correlação rotacional para a difusão do fluoróforo dentro do cone. A relação entre o ângulo do cone, θ_c , e a anisotropia residual é dada por

$$r_0 / r_\infty = \frac{1}{4} [\cos \theta_c (1 + \cos \theta_c)]^2 \quad 4.4$$

A taxa $1/\tau_c$ e a amplitude dos movimentos rotacionais θ_c nos dão informação dinâmica e estática, respectivamente, sobre a sonda.

Quando as moléculas de DPH incrustadas na bicamada de lipídios da membrana absorvem energia de luz polarizada verticalmente, elas retornam ao estado fundamental emitindo também luz polarizada. Quando as moléculas dos lipídios na membrana estão na fase gel, as moléculas de DPH permanecem orientadas e a luz emitida tem uma grande componente paralela à polarização da luz incidente (I_{VV}). Se as cadeias lipídicas movimentam-se, mudando de orientação, os eixos moleculares de DPH também mudam de direção aleatoriamente, e os fótons são emitidos com polarização aleatória. Este processo é chamado de despolarização de fluorescência ou decaimento da anisotropia.

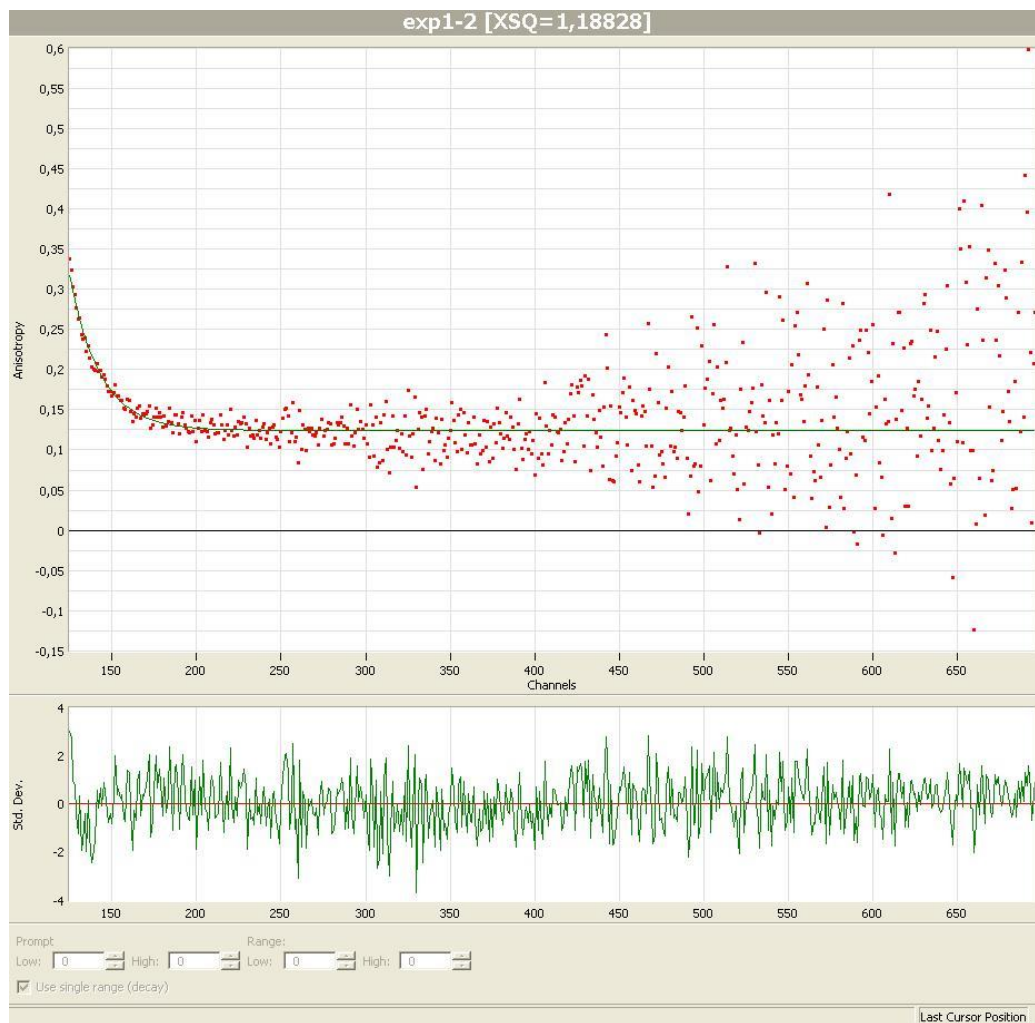


Figura 4.4. Exemplo de análise direta dos dados de decaimento de anisotropia da fluorescência de DPH em frações de membrana enriquecidas de Na^+, K^+ -ATPase, usando o programa de análise de decaimento de fluorescência fornecido por HORIBA-Jobin Yvon-IBH. Os pontos experimentais são ajustados a uma exponencial (curva contínua) originando os seguintes parâmetros: $\tau_c = 1,98 \text{ ns}$, $r_0 = 0,32$, $r_\infty = 0,13$. A parte inferior mostra os resíduos do ajuste. A excitação em 372 nm e emissão em 427 nm.

Interações das fenotiazinas com os fragmentos de membranas

Na⁺, K⁺ - ATPase

Os detalhes dos mecanismos moleculares da ação dos anestésicos estão longe de ser completamente compreendidos. Segundo a regra de Meyer e Overton, segundo a qual a potência da droga se correlaciona fortemente com sua solubilidade no ambiente lipídico, assume-se que os lipídios de membranas são o alvo dos compostos anestésicos. Outros trabalhos têm sugerido que as drogas se ligam diretamente a proteínas, cuja conformação subsequentemente alterada determina a ação dos anestésicos (Ioffe et al., 2007).

Tem-se observado que a atividade de muitas proteínas periféricas e intrínsecas (integrais) de membranas depende da composição dos lipídios vizinhos e do estado físico geral em que se encontram os lipídios nas membranas. Por exemplo, a atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase tem sido diretamente relacionada com a fluidez da membrana. Durante as últimas décadas tem-se chegado geralmente a aceitar uma ação indireta das drogas sobre as proteínas via perturbações da bicamada de lipídios. As perturbações incluem separação de fase, mudança no parâmetro de ordem, curvatura, pressão lateral, etc. (Ioffe et al., 2007; Cantor, 1997; Urban, 2002; Eckenhoﬀ, 1998).

Hendrich et al. (2003), através de cálculos teóricos dos coeficientes de partição octanol / água, acharam que a hidrofobicidade das fenotiazinas depende do grupo substituinte na posição 2 do anel heterocíclico, sendo que a hidrofobicidade cresce na seguinte ordem H– < Cl– < CF₃–. De acordo com os cálculos dos coeficientes de partição os fenotiazínicos devem se intercalar entre os lipídios das bicamadas. Isso está de acordo com resultados experimentais de fluorescência, calorimetria, spins marcadores, NMR. Por exemplo, existe evidência de que a fenotiazina anfifílica, CPZ, encaixa-se na região lipídica causando assim mudanças na fluidez e permeabilidade da membrana (Hueck et al, 2000; Ioffe et al, 2007).

Neste trabalho estudamos os efeitos estruturais das fenotiazinas nas frações de membranas enriquecidas em Na⁺, K⁺ - ATPase (membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase) utilizando para isso as sondas fluorescentes de membrana DPH e ANS, e a sonda fluorescente de proteína FITC.

Resultados da interação de CPZ com membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência de DPH em etanol são mostrados na Fig. 6.1. O comprimento de onda de 352 nm corresponde ao máximo de emissão; esse comprimento de onda foi utilizado para excitar a fluorescência do DPH em todo o trabalho.

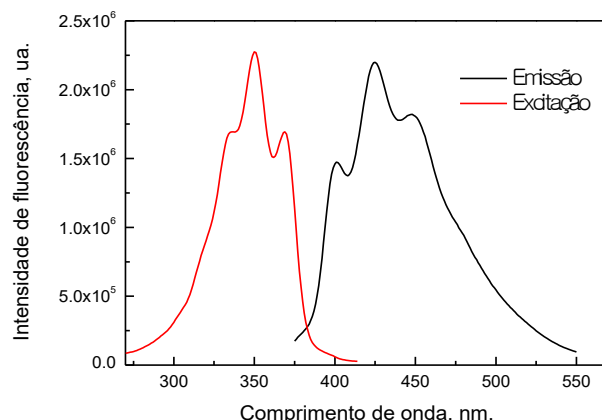


Figura 6.1. Espectros de emissão (excitação em 352 nm) e excitação (emissão 425 nm) de DPH (1,3 μ M) em metanol (cubeta 3 ml).

Estudos anteriores mostraram que a fluorescência das moléculas de DPH em meio aquoso é suprimida facilmente pelas moléculas adjacentes de água. Mas quando o DPH é incubado com frações de membranas se observou um aumento de sua intensidade de fluorescência em função do tempo até chegar à saturação (tempo de difusão às regiões hidrofóbicas da membrana). Por isso, para realizar as medidas de fluorescência de DPH em membranas, espera-se um tempo de incubação de 3 horas.

Supressão da intensidade de fluorescência

A supressão de fluorescência pode ser dinâmica ou estática. Se a distância entre a sonda fluorescente e o supressor é constante, a supressão é estática. A supressão dinâmica (ou colisional) depende da difusão. Para analisar a supressão empregam-se curvas de Stern–Volmer, dependência de F_0/F (razão entre fluorescência na ausência e na presença do supressor), em função da concentração do supressor (CPZ, no caso).

O espectro de emissão de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase (Fig. 6.2 A) sofre um decréscimo, sem deslocar-se, causado pelo tratamento com CPZ. Não foi observado recobrimento espectral entre o espectro de emissão da CPZ e o espectro de absorção de DPH, indicando que a supressão não é devida à transferência ressonante de energia. A Fig. 6.2 B mostra o gráfico de Stern-Volmer para supressão da fluorescência de DPH por CPZ à temperatura ambiente de 25°C. A reta representa o ajuste por mínimos quadrados usando a equação de Stern-Volmer, cuja constante aparente de supressão, K_{SV} , apresentou o valor de $3,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

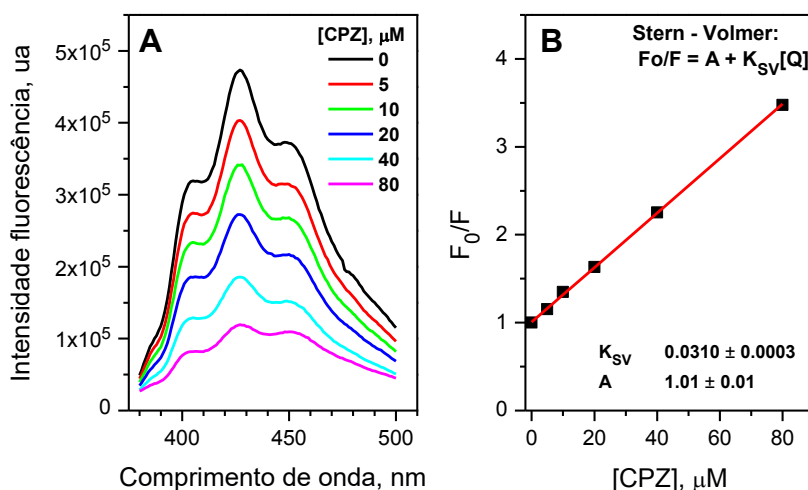


Figura 6.2. (A) Espectros de emissão da DPH em membrana - Na⁺, K⁺-ATPase a diferentes concentrações de CPZ. (B) Gráfico de Stern - Volmer para a supressão da fluorescência de DPH. A análise da supressão foi feita no pico de emissão em 426 nm (excitação em 352 nm). A concentração de DPH é de 2,4 μM.

O gráfico linear de Stern - Volmer nos indica que as moléculas de DPH são igualmente acessíveis ao supressor. A supressão de fluorescência de DPH por CPZ pode resultar da formação de complexo não fluorescente (supressão estática) ou/e por colisões diretas (supressão dinâmica). É possível distinguir entre os dois processos através da medida do tempo de vida na ausência e na presença do supressor, como será mostrado na seção 6.1.2.

Para interpretar a supressão observada é necessário levar em conta a concentração de CPZ na membrana e na fase aquosa, considerando o coeficiente de partição (Lakowicz, 2006). O coeficiente de partição é dado pela seguinte expressão:

$$P = \frac{[CPZ]_m}{[CPZ]_w} \quad 6.1$$

onde $[CPZ]_m$ é a concentração de CPZ na membrana e $[CPZ]_w$ a concentração de CPZ na água.

A concentração total de CPZ ($[CPZ]_T$) é dada por:

$$[CPZ]_T V_T = [CPZ]_m V_m + [CPZ]_w V_w \quad 6.2$$

onde V_m e V_w representam o volume das fases membrana e aquosa, respectivamente. Definindo a fração de volume da fase membrana como:

$$\alpha_m = \frac{V_m}{V_T} \quad 6.3$$

Obtém-se a concentração de CPZ na fase membrana a partir das equações 6.1, 6.2 e 6.3:

$$[CPZ]_m = \frac{P[CPZ]_T}{P\alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad 6.4$$

O volume da suspensão de membrana usada nesta experiência foi de 18,0 µl, com concentração de 4 mg/ml, o que corresponde a um volume de membrana de $7,2 \times 10^{-2}$ µl, se considerarmos que a densidade da membrana é aproximadamente igual à da água. O volume total de água foi 1,25 ml. Isto nos dá $\alpha_m = 5,8 \times 10^{-5}$. O valor do coeficiente de partição da CPZ em vesículas de DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina) é $8,0 \times 10^4$ segundo Parry et al. (2007). Conhecendo α_m e P, podemos obter a $[CPZ]_m$ para cada concentração total de CPZ, da equação 6.4, $[CPZ]_m = 1,4 \times 10^4 [CPZ]_T$. Isto indica que a CPZ fica bem mais concentrada dentro fase lipídica.

Para corrigir a equação de Stern-Volmer, a $[CPZ]_T$ é substituída pela concentração de CPZ na fase membranar $[CPZ]_m$, ficando esta equação como:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{K_{SV} \cdot P \cdot [CPZ]_T}{P \cdot \alpha_m + (1 - \alpha_m)} \quad 6.5$$

ou:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + 1,4 \times 10^4 \cdot K_{SV} \cdot [CPZ]_T \quad 6.6$$

Disto podemos ver que a constante aparente de Stern-Volmer é da ordem de $10^4 K_{SV}$. Então a K_{SV} corrigida por efeito do particionamento da CPZ entre a fase membranar e aquosa, ficaria com um valor bem menor, da ordem de M^{-1} .

Tempos de vida de fluorescência de DPH

Com a finalidade de determinar a natureza da supressão (estática ou dinâmica) de fluorescência da DPH por CPZ, realizamos medidas de decaimento de fluorescência em diferentes concentrações de CPZ (Fig. 6.3).

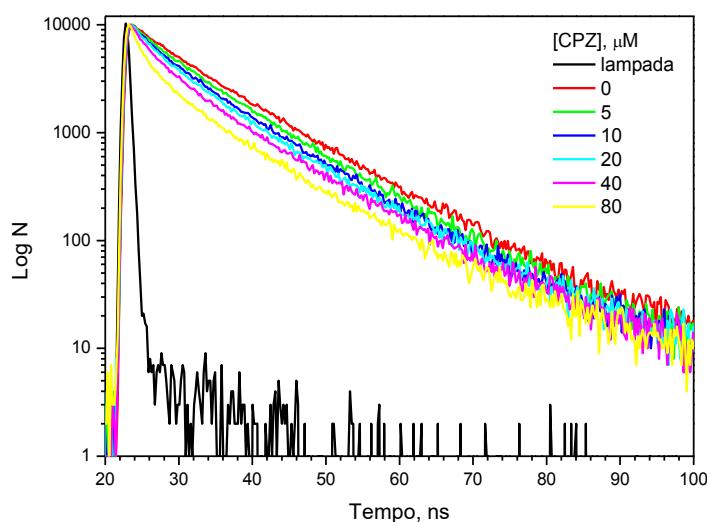


Figura 6.3. Curvas de decaimento da intensidade de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase a diferentes concentrações de CPZ. [DPH] = 2,4 μM, concentração de proteína na membrana 60 μ/ml. A curva preta é o perfil de emissão do LED de 372 nm. Emissão em 427 nm.

Na Fig. 6.3 observa-se que o decaimento da fluorescência de DPH é modificado pela CPZ. À primeira vista, em tempos mais longos, as curvas de decaimento mantêm a mesma inclinação. Isto indica a existência de uma componente com tempo de vida quase igual em todas as concentrações de CPZ.

A análise dos decaimentos foi feita utilizando o modelo de múltiplas exponenciais. A fração de fótons associados a um determinado tempo de vida τ_i (determinada espécie) é representada por f_i . Para três exponenciais, os valores de χ^2 foram adequados ($0.8 < \chi^2 < 1.2$), mas observou-se que apenas dois tempos de vida tinham contribuições relevantes. O menor tempo de vida ($\tau \sim 0,5 - 0,8$ ns) correspondeu à menor fração de fótons ($\sim 1,8 - 14$ %) e pode ser uma contribuição das moléculas de CPZ na fase aquosa (CPZ em solução aquosa possui tempo de vida nessa mesma faixa de tempo). Os decaimentos foram então analisados com duas exponenciais, sem levar em conta o perfil da lâmpada de excitação, considerando tempos a partir dos quais a contribuição da lâmpada era menor do que dez fótons. Os resultados são mostrados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Tempos de vida e amplitudes relativos obtidos dos ajustes bi-exponenciais dos decaimentos de fluorescência de DPH – membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com diferentes

$$\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$$

concentrações de CPZ. Tempo médio de decaimento,

[CPZ] μM	τ_1 (ns)	f_1 %	τ_2 (ns)	f_2 %	$\langle \tau \rangle$ (ns)	χ^2
0	5,4	12	11,5	88	10,8	1,10
5	5,4	15	11,1	85	10,3	1,14
10	5,4	19	11,1	81	10,0	1,06

20	4,8	21	11,1	79	9,8	1,16
40	4,1	18	11,0	82	9,8	1,05
80	3,2	14	10,8	85	9,7	1,12

Konopasek et al. (1998) também encontraram decaimentos bi-exponenciais para DPH em bicamadas lipídicas em pH 7 (com tempos de vida ~8.5 e 2.3 ns). Eles associaram a componente com menor tempo de vida à população de DPH localizada na interface membrana-água e a de maior tempo de vida à população em região mais hidrofóbica. Isso estava de acordo com resultados de transferência de energia e resultados prévios de difração de nêutrons. Sugerimos então que as frações f_1 e f_2 da Tabela 6.1 estejam relacionadas a duas populações de moléculas de DPH localizadas em diferentes regiões da membrana: na interface lipídio-água e no interior, respectivamente. É razoável esperar que a maior população de DPH (molécula hidrofóbica) procure regiões de menor polaridade, como o núcleo da membrana, o que está de acordo com a maior fração associada ao tempo de vida mais longo (Tabela 6.1). Observa-se que a adição de CPZ à solução não ocasiona mudanças significativas no tempo de vida da componente, f_2 , em comparação com a componente, f_1 , que foi a mais alterada.

Gratton et al. (1995), encontraram que o tempo de vida de DPH muda ao modificar-se o ambiente de membrana. Valores típicos de tempo de vida na fase gel da bicamada estão na faixa de 10 - 11 ns e no estado líquido cristalino, na faixa 6 - 9 ns. A Tabela 6.1, também mostra o tempo de vida médio para cada concentração de CPZ, que não muda de forma significativa, de 10,8 a 9,7 ns. O valor do tempo de vida, em ausência de CPZ está mais próximo do tempo de vida achado por Gratton et al. para a fase gel da bicamada lipídica, e está de acordo com Sutherland et al. (1988) para membranas - Na⁺, K⁺ - ATPase de duas espécies, 8,5 e 9,8 ns.

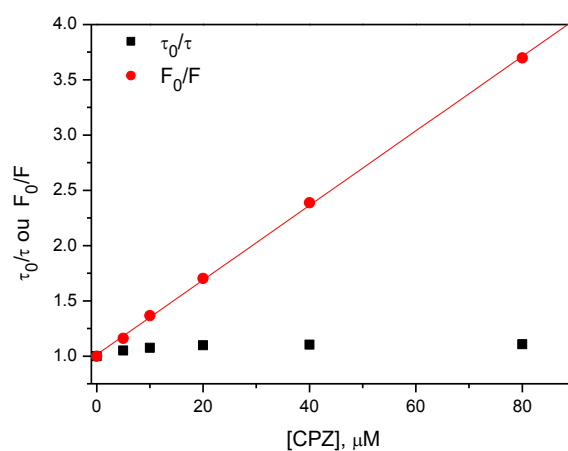


Figura 6.4. Decrescimento da intensidade fluorescência e o tempo médio de decaimento da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase causado pela supressão da CPZ.

A Fig. 6.4 mostra gráficos de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência (F_0/F) e para o tempo de vida (τ_0/τ) de DPH em membrana tratada com CPZ. Numa supressão dinâmica, a intensidade de fluorescência e o tempo de vida diminuem na mesma proporção. Esta equivalência não foi observada em nossas medidas, como mostra a Fig. 6.4. Pode-se dizer que a CPZ suprime a fluorescência de DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase ($K_{SV} = 3,38 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) sem modificar significativamente o tempo de vida médio, indicando supressão estática.

Sabemos (Konopasek et al., 1998) que em solventes orgânicos os dois tempos de vida de DPH são maiores quanto menor for a constante dielétrica do solvente. Sabendo que o valor da constante dielétrica decai de $\epsilon = 70$ na superfície a $\epsilon = 5$ no núcleo da membrana pode-se dizer que a diminuição do tempo de vida de DPH superficial pode ser ocasionada pelo efeito estrutural que a CPZ faz na membrana, induzindo mais microambientes polares possivelmente perto da superfície. Isto aumentaria ainda mais a permissividade dielétrica relativa na região de membrana perto da superfície e aumentaria um pouco mais a população de moléculas perto da superfície em condições polares e com tempo de vida curto.

Anisotropia - fluorescência estacionária

DPH é uma molécula assimétrica que sofre rotação anisotrópica dentro de uma membrana e se encontra principalmente no núcleo da bicamada lipídica. A anisotropia de fluorescência no estado estacionário de DPH tem sido amplamente usada na literatura para avaliar a fluidez da membrana. O conceito de fluidez obtido mediante anisotropia estacionária de DPH é expresso em termos de ordem orientacional das cadeias lipídicas da membrana. Por exemplo, quanto maior o valor da anisotropia estacionária maior seria a ordem na membrana, associada a um menor movimento médio dos lipídios na bicamada como consequência do aumento na rigidez da membrana.

Na Fig. 6.5 A, mostra-se a anisotropia estacionária de DPH em membrana, em função do comprimento de onda. Observa-se que em menores comprimentos de onda (perto da luz de excitação) os valores de anisotropia são maiores, ocasionados principalmente pelo espalhamento devido aos fragmentos de membrana. De fato, amostras biológicas como as suspensões de membranas são frequentemente turvas, o que ocasiona espalhamento da luz incidente e dos fótons emitidos. A luz incidente espalhada pode vir a ser detectada como fluorescência. A luz espalhada vai ser altamente polarizada quando a luz incidente é polarizada, chegando a aumentar o valor da anisotropia. Em menor grau, a formação de agregados de CPZ em concentração alta possivelmente contribui ao espalhamento.

A Fig. 6.5 B, mostra a variação da anisotropia em função da concentração de CPZ (a análise foi feita em 426 nm, pico de DPH e pouca influência do espalhamento). O aumento de 26 % na anisotropia indica decréscimo na mobilidade dos

lipídios (aumento na ordem da membrana), ou seja, aumento da rigidez na membrana. Ioffe et al. (2007), utilizando DPH para estudar o efeito da CPZ no estado estrutural de membranas lipídicas (lipossomas), encontraram também um aumento na anisotropia de DPH. Eles argumentaram que o resultado é um efeito de condensação da droga na parte hidrofóbica da bicamada lipídica. Uma possível explicação desse efeito é que os anéis da molécula de CPZ (parte tricíclica), localizados na parte hidrofóbica da membrana, fazem ficar mais rígidas as caudas das moléculas lipídicas. Isto causaria uma redução na mobilidade aumentando o empacotamento dos lipídios. Essa alteração na propriedade da membrana traz como consequência restrições na rotação de DPH dentro da membrana.

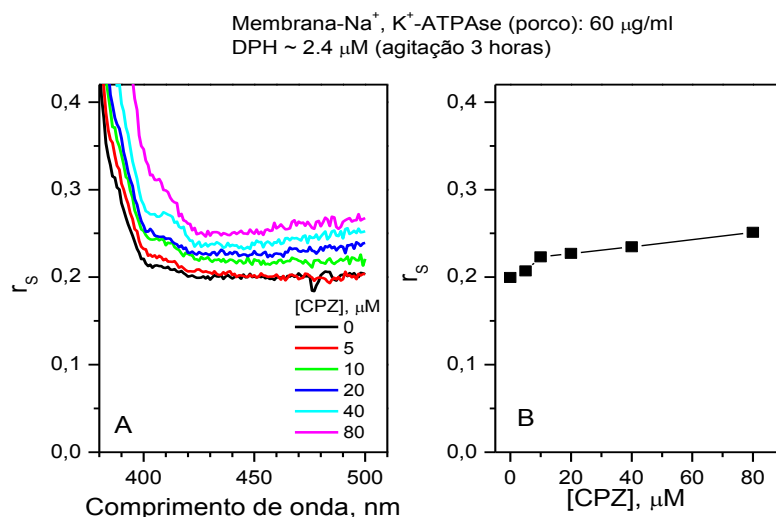


Figura 6.5. Anisotropia de Fluorescência estacionária da DPH - membrana - Na^+ , K^+ - ATPase ([DPH] = 2,4 μM) em função do comprimento de onda (A) e a diferentes concentrações de CPZ (B). O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml) e a excitação é em 352 nm.

Interação de TFP com membranas - Na^+ , K^+ - ATPase

Supressão da intensidade da fluorescência

A Fig. 6.7 mostra o gráfico de Stern – Volmer para a supressão de fluorescência de DPH em membrana – Na^+ , K^+ -ATPase por TFP. Da curva ajustada (curva vermelha) obteve-se para K_{SV} o valor de $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, constante de supressão aparente maior que a de CPZ. Parece que a TFP ingressa mais facilmente que a CPZ na região hidrofóbica da membrana.

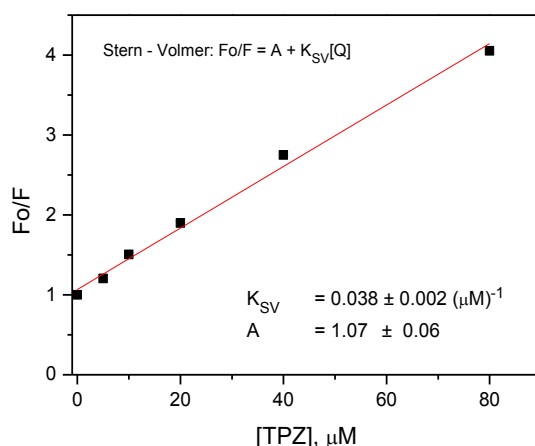


Figura 6.6. Supressão de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺-ATPase pela TFP. O analises de supressão foi feita no pico de emissão 424 nm e a excitação das amostras em 352 nm.

Decaimento de fluorescência

A Fig. 6.8 mostra o decaimento da fluorescência de DPH intercalada nos lipídios de membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase para diferentes concentrações de TFP. Em tempos maiores, como aconteceu com CPZ, são observados decaimentos com a mesma inclinação, ou seja, com um mesmo tempo de vida. Vimos na seção anterior que TFP tem constante de supressão aparente maior que a CPZ. Esse efeito parece se refletir no decaimento da fluorescência de DPH, que foi mais alterado que com CPZ.

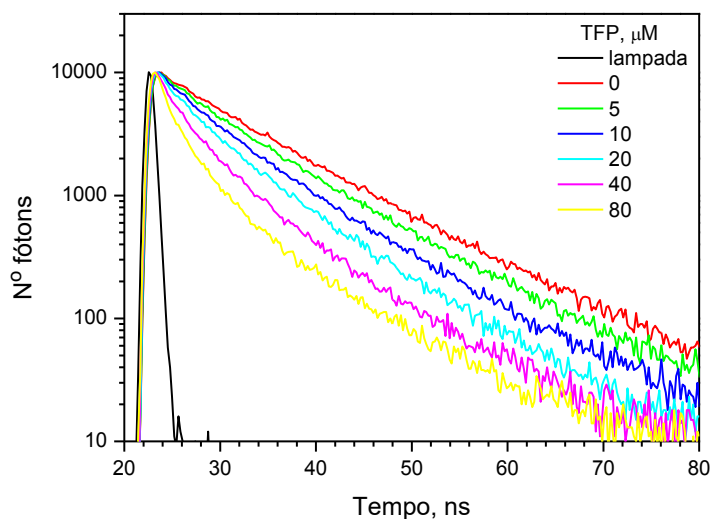


Figura 6.7. Curvas de decaimento da intensidade de fluorescência da DPH - membrana - Na⁺, K⁺-ATPase a diferentes concentrações de TFP. A curva preta é o perfil da lâmpada de diodo led de 372 nm. Concentração de proteína = 60 μg/ml. A emissão foi medida em 427 nm.

A Tabela 6.2 mostra o resultado de análises dos decaimentos da Fig. 6.7 usando o modelo de duas exponenciais, sem levar em conta o perfil da lâmpada de excitação, como com CPZ, considerando tempos a partir dos quais a contribuição da lâmpada era menor do que dez fótons. Vemos, dos resultados da Tabela 6.2, que os fragmentos de membrana utilizados na TFP têm características estruturais diferentes que as membranas utilizadas nos experimentos com CPZ, conforme mostram as diferentes contribuições de tempos de vida DPH. Aqui, a contribuição de moléculas de DPH localizadas perto da interface membrana – água (menor componente) praticamente dobrou em relação ao resultado da Tabela 6.1. No entanto, na presença de TFP, obteve-se o mesmo comportamento que com CPZ, com a maior componente, que tende a ser mais estável que a menor componente; no entanto, parece que a TFP altera mais o tempo de decaimento da menor componente.

A Tabela 6.2 também mostra o tempo de vida médio de DPH. Em média, o tempo de vida da DPH na bicamada lipídica é igual, dentro do erro, para os fragmentos de membrana usados no experimento com CPZ (10,8 ns) e com TFP (10,5 ns), embora as populações das duas componentes de DPH sejam diferentes na membrana. Isto nos diz que DPH tem um entorno lipídico médio nos fragmentos de membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com tempo de vida da ordem de 11 ns. Observamos também que esse tempo de vida decai mais com TFP do que com CPZ, tendendo logo à estabilidade.

Tabela 6.2. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste bi-exponencial dos decaimentos de fluorescência de DPH – membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase com diferentes

concentrações de TFP. Tempo médio de decaimento, $\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$.

[TFP] μM	τ_1 (ns)	f_1 %	τ_2 (ns)	f_2 %	$\langle \tau \rangle$ (ns)	χ^2
0	7,6	38	12,1	62	10,5	1,22
5	6,4	32	11,2	68	9,7	1,14
10	4,9	27	9,8	73	8,5	0,92
20	4,5	35	9,5	65	7,7	1,13
40	3,8	38	9,4	62	7,3	1,13
80	3,2	35	10,0	65	7,6	1,10

A Fig. 6.8 mostra gráficos de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência (F_0/F) e para os tempos de vida (τ_0/τ) de DPH em membrana tratada com TFP. Assim como com CPZ, tampouco com TFP foi vista equivalência na razão de decaimento.

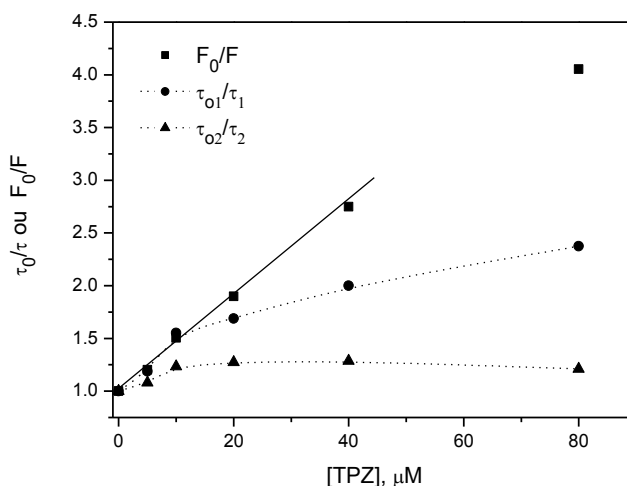


Figura 6.8. Decréscimo da intensidade fluorescência e do tempo médio de vida da DPH - membrana - Na^+ , K^+ - ATPase causado por supressão por TFP.

A quase estabilidade do tempo de vida τ_2 da DPH, vista também com a CPZ, nos diz que a interação das fenotiazinas com DPH dentro das membranas - Na^+ , K^+ - ATPase são principalmente produzidas por supressão estática. No entanto, esse tipo de supressão está associado principalmente à componente 2, mais abundante. O tempo de vida da componente 1 é mais afetado, indicando possivelmente supressão tanto estática como dinâmica. Já que esta menor componente é representada por moléculas localizadas perto da superfície, é propícia a supressão colisional com as moléculas da fase aquosa.

Hendrich et al. (2003), estudando a supressão de fluorescência de N - fenil - 1 - naftilamina (NPN) e de DPH por fenotiazinas em lipossomas de fosfatidilserina, acharam que fenotiazinas com grupo CF_3 - na posição 2 suprimem mais do que as que possuem Cl - nessa posição. Observaram que este efeito é menos pronunciado em DPH. Esses resultados estão em concordância com o diferente grau de supressão entre TFP e CPZ encontrado em nosso trabalho, onde TFP suprimiu um pouco mais que CPZ (Figs. 6.2 e 6.7). Parece então que TFP (e, consequentemente, FPZ) tem maior lipofilicidade que CPZ, perturbando mais a estrutura da membrana.

A NPN é uma sonda fluorescente que se localiza perto da interface apolar-polar da bicamada lipídica e é por isso que tem sua fluorescência suprimida e deslocada para o vermelho pelas fenotiazinas, resultado este que indica também aumento na polaridade de seu microambiente (Hendrich et al., 2003). A mesma localização na membrana foi encontrada para a componente de DPH com menor tempo de vida (Van der Heide et al., 1996; Konopasek et al., 1998). Dos resultados de decaimento, a TFP altera mais do que a CPZ o tempo de vida da menor componente, causando maior perda de estrutura da bicamada e trazendo, como consequência, maior intercalação de moléculas polares da fase aquosa na membrana. Isto aumentaria a polaridade no microambiente superficial da membrana causando diminuição no tempo de vida da menor componente (Konopasek et al., 1998).

Anisotropia - fluorescência estacionária

A Fig. 6.9 apresenta a anisotropia de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase em função da concentração de TFP. A anisotropia de DPH em membranas lipídicas é um pouco aumentada com TFP, indicando diminuição no movimento médio dos lipídios da bicamada. A anisotropia de DPH foi pouco aumentada por TFP (no máximo 17 %, em menor grau que por CPZ, 26 %).

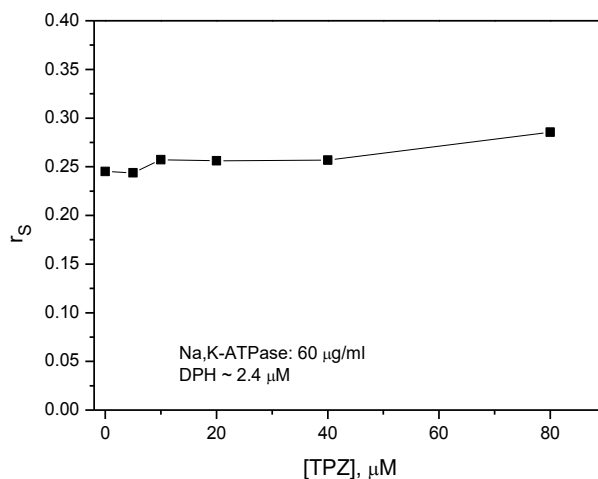


Figura 6.9. Anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase (DPH, 2,4 μM) com diferentes concentrações de TFP. O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml) e a excitação foi em 352 nm.

Wesolowska et al. (2004) encontraram também que derivados de fenotiazinas que possuem o grupo CF_3 na posição 2 aumentam a anisotropia de DPH no interior de lipossomas de fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC).

A alta afinidade de CPZ por fosfolipídios carregados negativamente faz com que a PS seja um receptor adicional para CPZ na superfície de membranas celulares. Tem-se mostrado também que CPZ se liga não só à superfície, mas também que se intercala no interior da membrana entre as cadeias lipídicas (Parry et al., 2007). TFP e FPZ parecem ter o mesmo mecanismo de interação com membranas que CPZ, já que possuem resultados similares para interação com DPH. Mas o maior grau de supressão de TFP (e FPZ) indica maior alcance às moléculas de DPH localizadas no núcleo da membrana. Estes resultados de TFP (e FPZ), em grau distinto à CPZ, parece envolver o substituinte na posição 2.

Os dois anéis benzênicos presentes nas fenotiazinas conferem suficiente solubilidade lipídica às drogas para penetrar na membrana. No entanto, o substituinte na posição 2 também contribui à lipoficidade da molécula. Grupos de trifluorometil contribuem mais à hidrofobicidade que o grupo $-\text{Cl}$. É também possível que a cadeia lateral das fenotiazinas se incline para o anel devido a interações de Van der Waals entre a cadeia lateral e o subsequente na posição 2. Estas interações são mais favoráveis para fenotiazinas de grupo $-\text{CF}_3$ /piperazina (TFP) que para as de grupo Cl /alkilamino (CPZ) (Albini and Fasani, 1998; Hendrich

et al., 2003). Esta disposição geométrica da estrutura da TFP poderia desestruturar mais os lipídios na membrana.

Em pH fisiológico, CPZ e TFP podem estar em duas formas, protonada e não protonada, presentes em diferentes porcentagens. Isto afeta o coeficiente de partição das moléculas e a formação de agregados. Caetano e Tabak (2000) estudaram as características de ligação da CPZ e TFP em micelas de SDS (aniônicas) usando espectroscopia de absorção e fluorescência. O ambiente lipídico da membrana pode alterar o estado de protonação das moléculas. Além do mais, as moléculas neutras penetram mais na membrana do que as carregadas. Como o pK da CPZ é 9,3 e o da TFP é 7,0, em pH 7,0 há mais moléculas neutras de TFP do que de CPZ. Isso concorda com nossos resultados de supressão da fluorescência de DPH, que indicaram maior grau de supressão para TFP do que para CPZ.

Dos resultados de anisotropia estacionária, Caetano e Tabak (2000) também encontraram que CPZ e TFP tornam mais rígidas as micelas de SDS e que a CPZ se localiza em regiões mais polares que a TFP. Isso também concorda com nossos resultados de supressão. Parece que a CPZ, em pH 7,0, se localiza prioritariamente mais perto da interface lipídio-água que do núcleo da membrana. Sua forma protonada, em maior quantidade, favorecerá esta localização, já que a cadeia lateral carregada positivamente se posicionaria na vizinhança das cabeças polares dos fosfolipídios. Enquanto a TFP apresenta a forma predominante neutra, o que facilita o ingresso no núcleo da membrana.

Decaimento de anisotropia de DPH – cinética e ordem dos lipídios

O decaimento da anisotropia de fluorescência em membranas lipídicas pode ser descrito como a soma de duas componentes, uma de decaimento rápido e um termo constante:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \exp(-t/\tau_c) + r_\infty \quad 6.7$$

onde r_0 é a anisotropia inicial, τ_c é o tempo de correlação rotacional e r_∞ é o valor assintótico de $r(t)$ para um tempo muito longo (Jahnig et al., 1979).

Em membranas lipídicas com ou sem colesterol e em membranas celulares, o decrescimento de $r(t)$ para um valor r_∞ , diferente de zero, dá a entender que a distribuição final de dipolos emissores deve ser anisotrópica. Assim r_∞ fornece informação sobre a ordem estrutural nas membranas. A sonda DPH dentro da membrana, ao orientar-se paralelamente às cadeias dos lipídios, detecta a

ordem. Então, podemos identificar a ordem da sonda com a ordem dos lipídios. Para o caso do momento de dipolo de absorção e emissão localizados ao longo do eixo do fluoróforo, r_∞ pode ser escrito em função do quadrado do parâmetro de ordem da sonda fluorescente ou parâmetro de ordem dos lipídios. Então pelas medidas de decaimento de anisotropia de fluorescência de DPH nós podemos por meio r_∞ analisar o efeito estrutural das fenotiazinas em membranas.

Em meios anisotrópicos como a membrana lipídica, a anisotropia estacionária, r_s , pode ser escrita em função de τ_c , τ e r_∞ da seguinte maneira:

$$r_s = \frac{r_0 - r_\infty}{1 + \tau/\tau_c} + r_\infty \quad 6.8$$

Na equação 6.8 o primeiro termo representa a contribuição cinética e o segundo a estrutural. A equação de Perrin (Eq. 3.29) é obtida se a parte estrutural r_∞ é desprezível. Kawato et al. (1978), estudando as propriedades de fluorescência de DPH em certas membranas, encontraram uma relação entre r_s e r_∞ , assumindo como valor médio $\tau / \tau_c = 8$ para DPH na fase lipídica e $r_0 = 0,39$ (Lackowicz, 2006):

$$r_\infty = \frac{9}{8} r_s - \frac{1}{20} \quad 6.9$$

A equação 6.9 mostra que a ordem dos lipídios em membranas pode ser analisada com boa aproximação das medidas de anisotropia de fluorescência estacionária.

Efeitos das fenotiazinas no decaimento de anisotropia de DPH

A Fig. 6.10 apresenta os dados experimentais (símbolos pretos) de decaimento da anisotropia de fluorescência de DPH em membrana - Na^+, K^+ - ATPase. A curva ajustada mostra claramente que a sonda sofre um movimento restrito nas membranas.

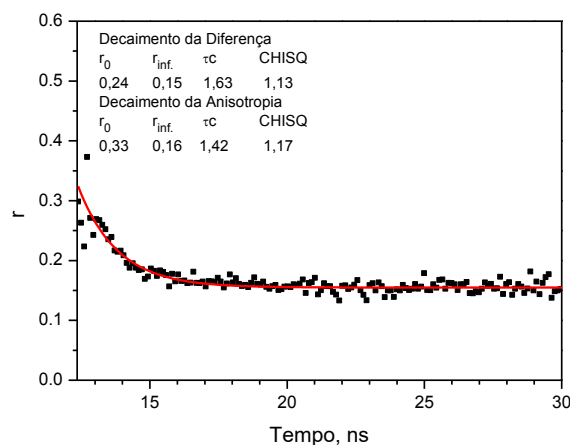


Figura 6.10. Curva decaimento da anisotropia de fluorescência de DPH em membrana - Na^+ , K^+ - ATPase. A curva representa o ajuste exponencial. Excitação em 372 nm e emissão em 427 nm (Tampão Tris 10 mM pH 7,4; 1,8 mg/ml proteína; [DPH] 80 μM ; cubeta de 1 mm de espessura).

Da curva ajustada na Fig. 6.10 obtém-se $r_\infty = 0,16$ e $\tau_c = 1,4$ ns. Estes parâmetros são muito parecidos com os encontrados por Koyama et al. (1990), que acharam para a anisotropia de DPH em fragmentos de membranas - Na^+ , K^+ - ATPase de r_∞ os valores 0,14 e 1,5 ns para r_∞ e τ_c , respectivamente.

A seguir mostraremos os resultados de medidas de $r(t)$ na presença de fenotiazinas. Os efeitos cinéticos e estruturais são relacionados com os parâmetros τ_c e r_∞ , respectivamente. A Figura 6.11, mostra $r(t)$ de DPH em membranas - Na^+ , K^+ - ATPase tratadas com CPZ. Os valores de τ_c e r_∞ foram 1,0 ns e 0,20, respectivamente. A anisotropia limite, r_∞ , fica maior que a encontrada em ausência de CPZ, indicando aumento na ordem orientacional dos lipídios. Já o tempo de correlação rotacional τ_c teve seu valor diminuído, sugerindo maior mobilidade dos lipídios.

A Figura 6.12, mostra o decaimento de anisotropia de fluorescência de DPH para membranas tratadas com TFP 20 μM . Os valores para τ_c e r_∞ foram 0,68 ns e 0,26, respectivamente. Os parâmetros são alterados na mesma forma que a CPZ, mas em maior grau.

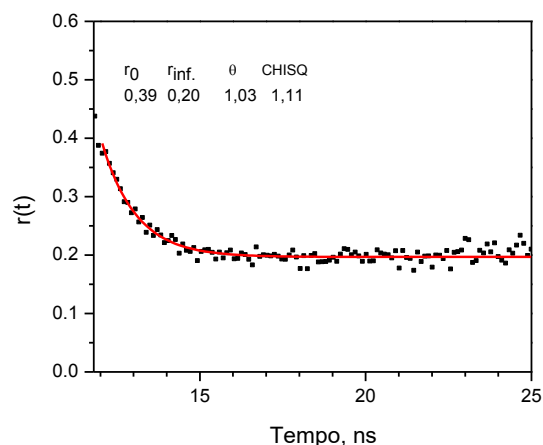


Figura 6.11. Anisotropia resolvida no tempo de DPH em membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 μ M) tratada com CPZ 20 μ M. Tampão Tris 10 mM pH 7.4 (cubeta 1 ml). Excitação em 352 nm e emissão em 426 nm.

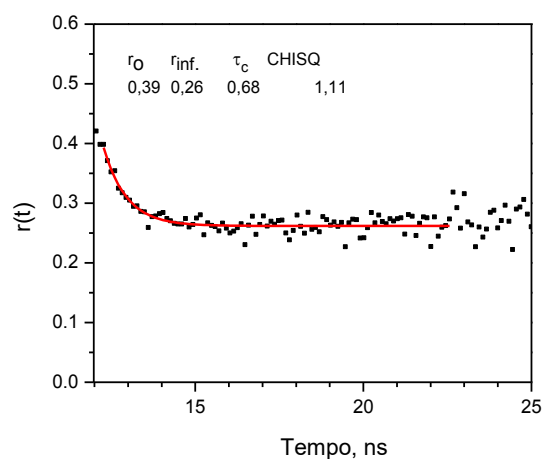


Figura 6.12. Anisotropia resolvida no tempo da DPH - membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (DPH, 2,4 mM) para 20 μ M de concentração de TFP. O tampão utilizado foi Tris 10 mM a pH 7.4 (cubeta 1 ml). Excitação em 352 nm e emissão em 426 nm.

Os efeitos das fenotiazinas na ordem dos lipídios da membrana, deduzidos a partir das medições de anisotropia estacionária, coincidiram com os resultados para a anisotropia limite, obtidos das medições resolvidas no tempo (Figs. 6.5 e 6.11; 6.9 e 6.12). Isto quer dizer que r_s serve para analisar com boa aproximação os efeitos estruturais das fenotiazinas (Jahnig et al., 1979).

Os parâmetros r_s e r_∞ aumentaram de valor em presença das fenotiazinas. Nas medidas de decaimento de anisotropia a TFP afetou mais a ordem dos lipídios do que a CPZ, já que aumentou mais o valor de r_∞ .

Em tempos da ordem 10^{-8} s, moléculas de lipídios podem também mover-se por difusão lateral em distâncias da ordem de angstroms. A anisotropia de fluorescência, que envolve processos dentro desse tempo curto, detecta parâmetros de ordem local devido a essa difusão lateral. Os parâmetros de ordem local representam a ordem orientacional relativa a um eixo médio local que em geral não coincide com a normal à membrana. O parâmetro de ordem medido

pela anisotropia de fluorescência seria a média de todos esses parâmetros de ordem locais. Um aumento na ordem dos lipídios obtido pela anisotropia de fluorescência demanda um aumento na ordem dos lipídios ao redor dos eixos locais (Jahnig et al., 1979).

CPZ e TFP causam aumento no r_{∞} indicando um incremento na ordem dos lipídios. Por outro lado, observou-se diminuição no tempo de correlação rotacional. O decrescimento de τ_c indicaria diminuição da microviscosidade. O grau de diminuição de τ_c depende da forma como interagem as fenotiazinas com a bicamada lipídica. Da supressão de fluorescência de DPH e tempos de vida associados ao interior ou à superfície da membrana, a CPZ parece não afetar o núcleo da membrana, enquanto a TFP parece afetar tanto o núcleo quanto a superfície. O mecanismo exato de interação das fenotiazinas com os lipídios, ou com a estrutura lipídica, ainda é incerto. Na superfície tanto a CPZ como a TFP podem interagir por atração elétrica com grupos das cabeças polares dos lipídios, e seus anéis hidrofóbicos podem se intercalar entre os lipídios de tal forma que alterem o estado estrutural dos lipídios. Por outro lado, o grau de protonação das fenotiazinas CPZ e TFP dentro das membranas pode ser diferente para cada uma (Caetano e Tabak, 2000).

Anisotropia de fluorescência de DPH em membranas de crustáceo normal e

adaptado

As propriedades físicas dos lipídios em membranas biológicas são sensíveis às mudanças ambientais como consequência da adaptação das espécies. Foram utilizadas membranas de crustáceo enriquecidas em Na^+ , K^+ -ATPase para investigar (em nível molecular) as propriedades dessas membranas, quando o crustáceo muda de um ambiente menos salino (normal de rio de água - doce) a outro mais salino e mais frio (adaptada em mar).

Anisotropia - fluorescência estacionária

A Fig. 6.13 mostra a anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana de crustáceo normal e adaptado, e de rim de porco.

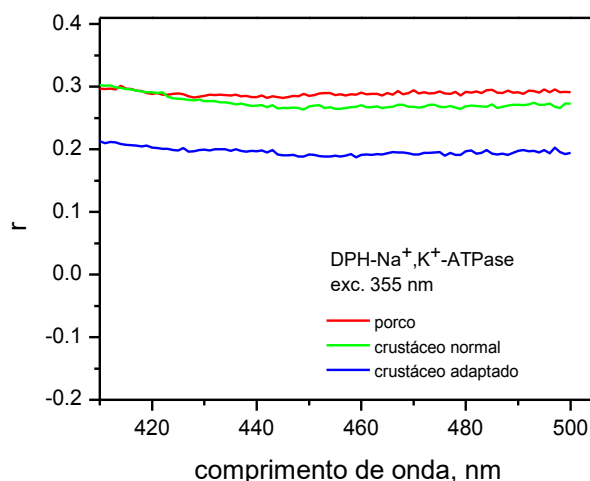


Figura 6.13. Anisotropia de fluorescência estacionária de DPH em membrana - Na^+ , K^+ -ATPase de crustáceo normal (verde) e adaptado (azul). Excitação em 355 nm. A análise foi feita utilizando a máxima emissão em 427 nm. A curva vermelha é de membrana de rim de porco.

Observa-se uma diferença significativa no valor da anisotropia para a espécie normal e adaptada do crustáceo. A anisotropia estacionária no crustáceo adaptado diminui 30 % em relação ao crustáceo normal. Este resultado indica que a bicamada lipídica do crustáceo normal tem menor mobilidade/mais ordem do que a de crustáceos adaptados. Parece que o crustáceo adaptado teve que aumentar a fluidez de sua membrana celular para se adaptar a um ambiente mais salino e frio.

Parece uma coincidência que as membranas de crustáceo normal e de rim de porco tenham o mesmo valor de anisotropia.

Medidas de anisotropia de fluorescência estacionária em membranas - Na^+ , K^+ -ATPase de hepatócitos de peixe dourado *Sparus auratus* L. aclimatados a 17° C (Hernandez et al., 2002) resultaram em aumento de ordem ou diminuição de fluidez dos componentes lipídicos quando se baixa a temperatura de aclimação em água até ~7° C. Esta compensação para preservar suas propriedades físicas, de fluidez, ordem ou outras, frente a distúrbios térmicos foi denominada adaptação homeoviscosa (Logue et al., 1995). Parece que o crustáceo para adaptar-se no mar teve que baixar a ordem/aumentar a mobilidade dos lipídios na membrana celular.

Efeitos estruturais na Na^+ , K^+ -ATPase devido às fenotiazinas

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma proteína integral que tem como função principal transportar íons de sódio e potássio contra um gradiente eletroquímico. O mecanismo de bombeamento é baseado na mudança conformacional principalmente de sua subunidade α . O transporte destes íons está associado com a oscilação da proteína entre seus dois principais estados conformacionais (E_1 e E_2), os quais têm diferentes afinidades por ATP. Os efeitos estruturais gerais e locais em certos sítios de importância funcional numa proteína podem ser estudados usando sondas fluorescentes extrínsecas, como a FITC, ou intrínsecas, como os resíduos triptófanos da própria proteína. A FITC é um marcador fluorescente da subunidade α da Na^+ , K^+ -ATPase que inibe a atividade desta proteína, bloqueando o sítio de alta afinidade de ATP, no aminoácido lisina 501, na conformação E_2 (Ward D. et al., 1998; Linnertz H. et al., 1998).

A fluorescência intrínseca de uma proteína deve-se aos três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. A alta sensibilidade do triptofano ao seu entorno local pode ser uma vantagem para estudos de transições conformacionais, desnaturação, etc. Para proteínas com um ou poucos triptofanos é mais fácil interpretar os dados espectrais. Geralmente as proteínas contêm vários resíduos de triptofanos expostos em ambientes distintos, mostrando espectros de emissão mais complexos.

Mudanças no estado conformacional de uma proteína conduzem também a mudanças na acessibilidade relativa dos triptofanos, e as podemos ver refletidas nas características de supressão. Por exemplo, aparecem deslocamentos nos espectros de emissão e os gráficos de Stern - Volmer são complexos. Isto é devido à supressão seletiva dos triptofanos expostos ao supressor e aqueles internos à proteína. O estado estrutural tridimensional de uma proteína ligada a membrana e sua inserção na bicamada lipídica também são fatores determinantes na acessibilidade de moléculas supressoras aos resíduos de triptofanos.

Neste capítulo, empregando as frações de membranas - Na^+ , K^+ - ATPase daremos ênfase ao estudo dos efeitos estruturais na proteína Na^+ , K^+ - ATPase provocados pelas fenotiazinas, sem deixar de lado os possíveis efeitos colaterais que a bicamada lipídica possa ocasionar por efeito também das interações das fenotiazinas com as membranas.

Interação da TFP com a Na^+ , K^+ -ATPase

A Fig. 7.1 (A) mostra os espectros de emissão da proteína em diferentes concentrações de TFP. As medidas foram feitas em meio anaeróbico para evitar que a TFP fotodegrade no tempo de iluminação da medida. Os resíduos de triptofanos da Na^+ , K^+ - ATPase excitados em 284 nm, produzem emissão em

330 nm. A emissão em 474 nm corresponde às moléculas de TFP, que possuem absorbância significativa em 284 nm.

Observa-se que, para a faixa concentrações pequenas de TFP, a diminuição de fluorescência dos triptofanos é maior. Nota-se também da Fig. 7.1 (A), que tanto o máximo de emissão dos triptofanos (330 nm) como da TFP (474 nm) não estão sofrendo deslocamento. Pode estar havendo transferência de energia dos resíduos de triptofano para a TFP, já que há superposição do espectro de emissão dos triptofanos com o de absorção da TFP (Fig. 5.1).

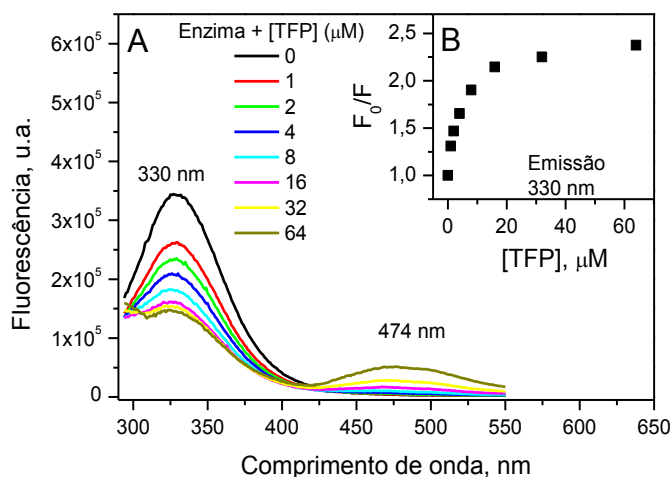


Figura 7.1. (A). Espectros de emissão da Na⁺,K⁺-ATPase (corrigidos para efeito de filtro interno) para diferentes concentrações de TFP, excitação em 284 nm. (B) Gráfico de Stern – Volmer em 330 nm (emissão do triptofano). Tampão TRIS 30 mM, Tris-fosfato 5 mM, EDTA 0,2 mM, e MgCl₂ 5 mM a pH 7,4 (para estabilizar a conformação E₂).

A Fig. 7.1 (B) mostra o gráfico de Stern-Volmer, onde observamos um efeito não linear para concentrações de TFP maiores que 8 μM, indicando que nem todos os resíduos de triptofano são acessíveis à TFP.

Medidas de fluorescência da TFP (excitada também em 284 nm) foram realizadas paralelamente em ausência e em presença da proteína. A Fig. 7.2 mostra os resultados dessas medidas, em presença da membrana - Na⁺, K⁺ - ATPase (A) e na ausência (B). Observa-se que o pico de emissão da TFP não se desloca em presença da proteína, porém sua intensidade fica maior.

A Fig. 7.3 mostra a intensidade de fluorescência da TFP nos casos (A) e (B) em função da concentração. Depois de ajustar os dados a uma reta achamos, por meio do coeficiente angular, que a fluorescência em (A) é quase 2,4 vezes maior que em (B), já considerando o fator de correção de filtro interno devido ao espalhamento, que foi de 1,53. Mesmo considerando que este pode estar superestimado, concluímos que a intensidade de fluorescência da TFP em membrana é maior do que em tampão por um fator f tal que $1,7 < f < 2,4$.

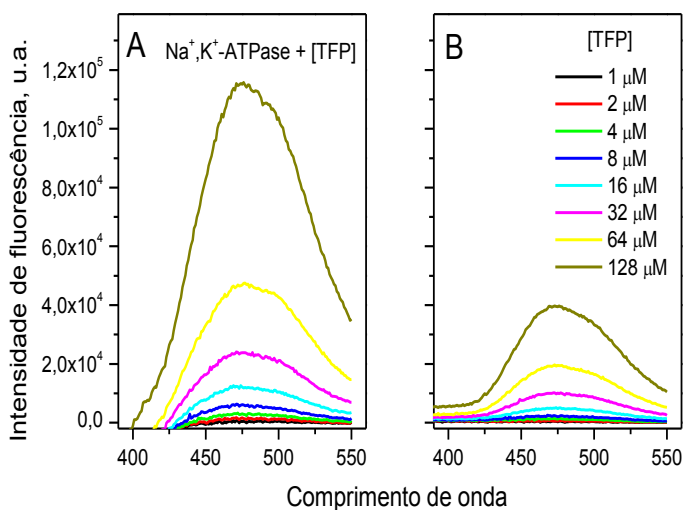


Figura 7.2. Espectros de emissão da TFP, excitada em 284 nm (corrigidos para efeito de filtro interno) em concentrações crescentes de TFP: (A) na presença e (B) ausência de membranas ricas em Na⁺,K⁺-ATPase. Em (A) subtraiu-se o espalhamento devido à membrana.

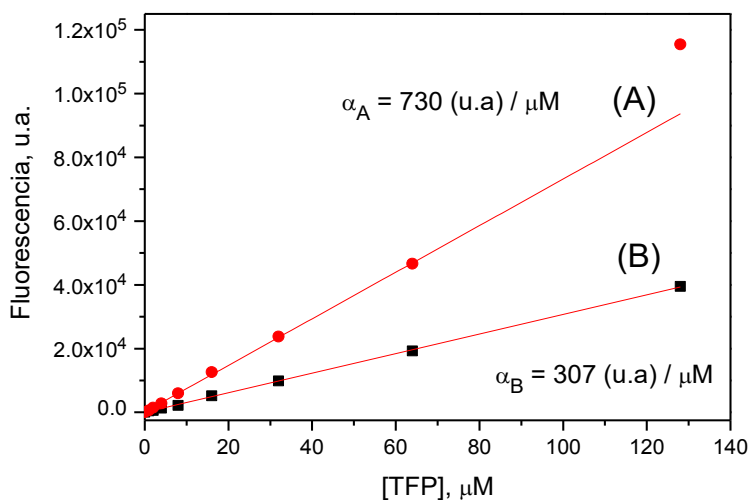


Figura 7.3. Emissão de fluorescência da TFP (A) na presença da Na⁺,K⁺-ATPase e (B) em sua ausência. A emissão foi em 474 nm e a excitação em 284 nm. Os valores de α_A e α_B representam os coeficientes angulares das retas.

A Fig. 7.4 apresenta o gráfico de Stern - Volmer modificado considerando duas populações de resíduos de triptofano, uma acessível à TFP e a outra inacessível ou embutida na proteína, sendo K_a a constante de supressão de Stern-Volmer da população acessível.

Observamos que o grau de acessibilidade depende da faixa de concentração da TFP. A concentrações menores do que 8 μ M a fração de resíduos de triptofano f_a e a constante de supressão K_a foram 53% e $8,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. E para concentrações maiores f_a e K_a foram 60 % e $4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. O parâmetro f_a indica que nem toda a fluorescência de triptofano é suprimida por

TFP, em média suprime-se cerca de 56%. Conforme se vai aumentando a concentração de TFP (maior de 8 μM), a população que era antes inacessível parece tornar-se parcialmente acessível, modificando as características de supressão.

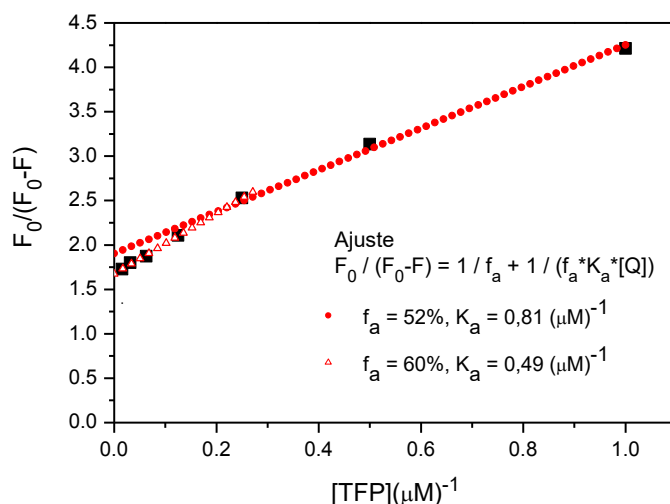


Figura 7.4. Gráfico de Stern - Volmer modificado da $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (excitação 284 nm). f_a é a fração acessível do total de triptofano e K_a é a constante de Stern – Volmer de supressão para os resíduos de triptofano acessíveis.

A fluorescência dos resíduos de triptofanos da $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ não é completamente suprimida, aparentemente a metade dos triptofanos parece ser afetada pela TFP (Fig. 7.1). Adhikary et al. (1994) encontraram que a CPZ suprime a fluorescência da $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$, com $f_a = 68\%$ em presença de K^+ e $f_a = 33\%$ em presença de Mg^{+2} . Nossos resultados de supressão pela TFP foram parecidos (60%).

Os resíduos de triptofano de uma proteína podem ser agrupados em quatro tipos de resíduos, com relação a sua emissão (Lakowicz, 2006): resíduos que são completamente expostos ao solvente ($\lambda_{\text{MAX}} \approx 350 \text{ nm}$), resíduos parcialmente expostos, na superfície de uma proteína ($\lambda_{\text{MAX}} \approx 340 \text{ nm}$), resíduos embutidos dentro da proteína, mas interagindo com grupos polares ($\lambda_{\text{MAX}} \approx 315 \text{ nm}$ a 330 nm), e resíduos embutidos completamente num núcleo apolar ($\lambda_{\text{MAX}} \approx 308 \text{ nm}$). O máximo de emissão e o rendimento quântico do triptofano podem variar grandemente entre as proteínas. As moléculas de TFP parecem suprimir os triptofanos mais superficiais. Podemos comentar que a população de triptofano acessível à supressão está distribuída superficialmente ou é mais acessível ao solvente aquoso.

Em maior concentração de TFP, as características de supressão são alteradas (Fig. 7.4). Resíduos de triptofano podem ser encontrados dentro da bicamada lipídica perto da interface membrana e solvente (Yudouski G. et al., 2003). Ao aumentar a concentração de TFP, a droga pode provocar mudanças conformacionais na proteína que deixem outros triptofanos mais acessíveis.

Irradiação no UVB da TFP em presença da Na^+ , K^+ -ATPase

Irradiou-se em 310 nm a TFP em presença da membrana - Na^+ , K^+ - ATPase, em conformação E_2 . A Fig. 7.5 A mostra os espectros de emissão da TFP, com excitação em 310 nm, para diferentes tempos de irradiação. O espectro de emissão da proteína foi subtraído das demais medidas de emissão. Como vimos anteriormente, irradiando-se a TFP, esta começa a se fotodegradar criando outras espécies, como a espécie fluorescente em 410 nm. Aqui, também observamos que, conforme irradiamos a amostra, todo o espectro de emissão aumenta com o tempo. A Fig. 7.5 B mostra os espectros de emissão da TFP da Fig. 7.5 A subtraindo o espectro da TFP intacta em presença da proteína. Observamos facilmente que surge o fotoproduto em 410 nm e outra espécie em 502 nm.

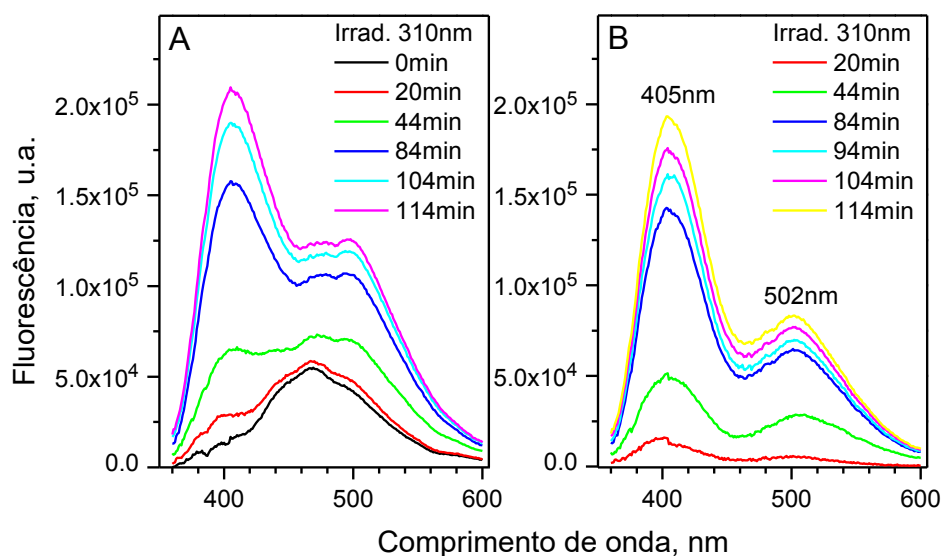


Figura 7.5. (A) Espectros de emissão da TFP (20 μM) excitada e irradiada em 310 nm (0,36 mW), subtraíu-se o espectro da Na^+ , K^+ -ATPase (80 $\mu\text{g/ml}$). (B) Subtraindo-se o espectro sem irradiar (0 min) dos espectros de emissão da parte A. O tampão usado foi TRIS 30 mM, Trisfosfato 5 mM, EDTA 0,2 mM, e MgCl_2 5 mM a pH 7,4 para estabilizar a conformação E_2 da proteína, também se empregou ATP a 0,5 mM.

A Fig. 7.6 mostra a variação da intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda 470, 495 e 410 nm em função do tempo. Observamos que as espécies que fluorescem em 502nm e 470nm parecem ser da mesma espécie já que evoluem da mesma forma no tempo. As espécies fluorescentes formadas por irradiação não saturam no período observado.

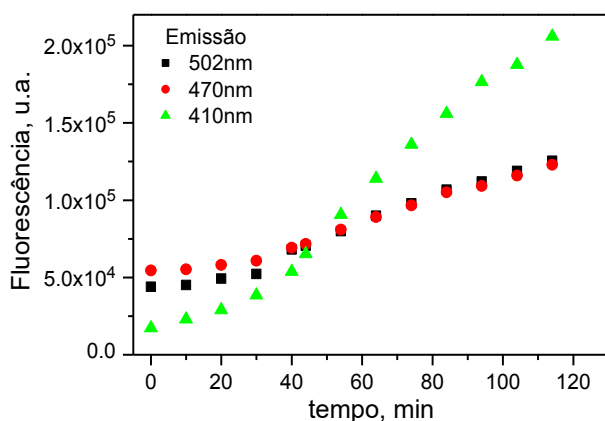


Figura 7.6. Variação da fluorescência da TFP em presença da proteína em função do tempo.

Foi feita a diálise da amostra previamente irradiada, para investigar se houve foto-associação de TFP com a proteína através de ligações covalentes. A Fig. 7.7 mostra os espectros de emissão das medidas de fluorescência estacionária da amostra depois da diálise. A espécie com pico em 494 nm permanece na amostra dialisada e parece ligar covalente a proteína (não se fotodegrada). O fotoproduto fluorescente em 410 nm também é observado em menores quantidades. Parece que a espécie fluorescente em 410 nm não se liga à Na^+ , K^+ - ATPase pois apenas uma pequena fração dessa espécie permaneceu na amostra após a diálise.

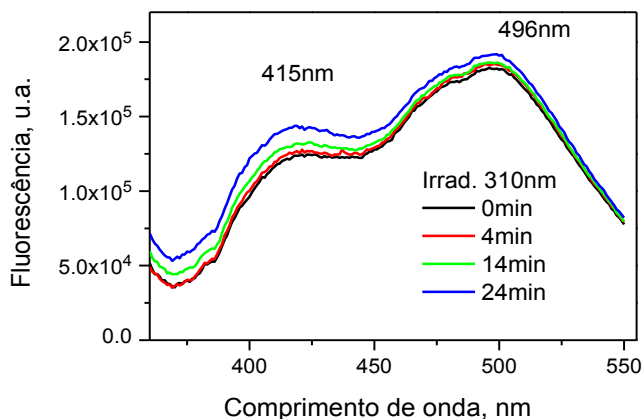


Figura 7.7. Fluorescência da amostra de TFP e Na^+ , K^+ -ATPase irradiada a 114 min e dializada. A amostra foi submetida a novos tempos de irradiação em 310 nm.

Interação da CPZ com a Na^+ , K^+ -ATPase marcada com FITC

A Fig. 7.8 apresenta o espectro de emissão e excitação da sonda fluorescente FITC depois de dialisar a amostra. Os espectros pertencem às moléculas de FITC ligadas à proteína. Seu espectro de excitação mostra dois picos de excitação em 470 nm e 494 nm. Os espectros de fluorescência da FITC são obtidos excitando-o em sua máxima excitação.

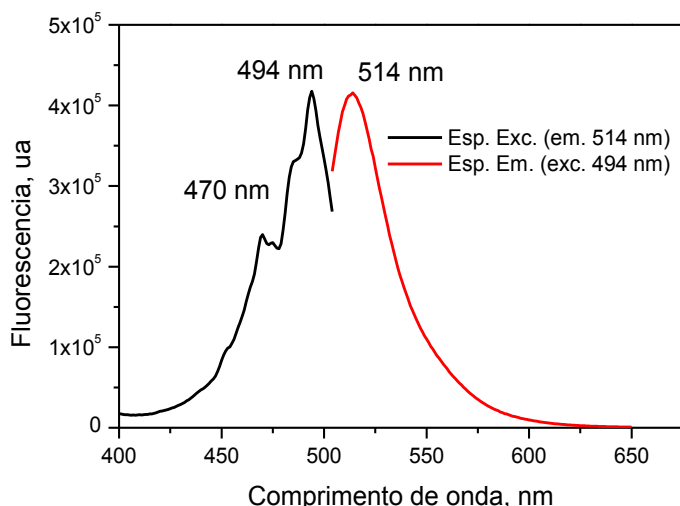


Figura 7.8. Espectros de emissão (curva vermelha) e excitação (curva preta) da FITC ligada à Na^+ , K^+ -ATPase.

Depois do processo de marcação da proteína com a FITC, a proteína foi titulada com CPZ. A Fig. 7.9 A, mostra o espectro de emissão de FITC- Na^+ , K^+ -ATPase para diferentes concentrações de fenotiazina. Observamos que a CPZ não causa nenhuma alteração na intensidade da FITC, sugerindo que a CPZ não altera a estrutura do sítio de ligação da FITC. Resultados obtidos com a sonda fluorescente antroil ouabaína (AO), mostraram que a CPZ liga-se à Na^+ , K^+ -ATPase perto do sítio de ouabaína (Guevara et al., 2007). O sítio de ouabaína (lado extracelular) se encontra longe do sítio de ATP (lado citoplasmático), a uma distância aproximada de 7,2 nm (Linnertz H. et al., 1998). Portanto é razoável que, nesse sítio, o fármaco não altere diretamente o sítio de ATP. No entanto, poderia haver outros sítios de ligação para a CPZ na proteína. Nosso resultado mostra que a CPZ não se liga a sítios próximos de FITC.

A Fig. 7.9 B mostra a fluorescência de FITC- Na^+ , K^+ -ATPase tratada com CPZ para diferentes tempos de irradiação.

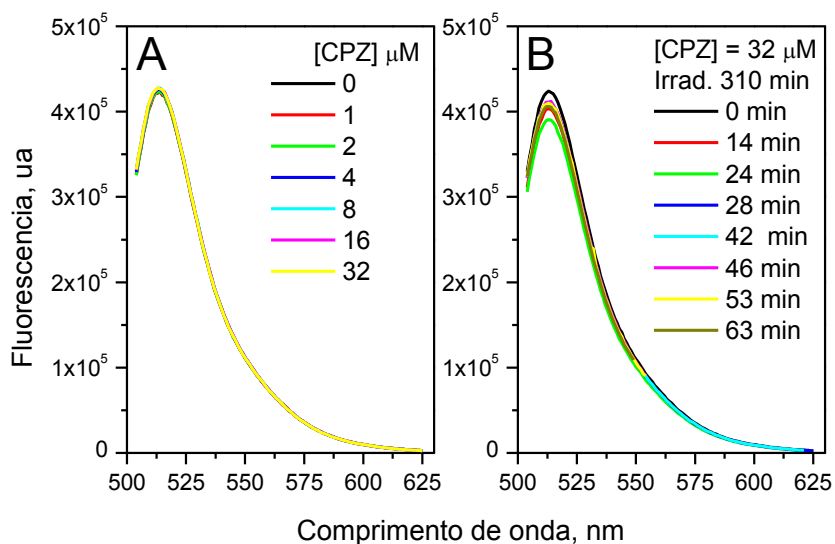


Figura 7.9. Espectro de fluorescência do marcador de fluorescência FITC da Na^+ , K^+ -ATPase a diferentes concentrações de CPZ (A) e a distintos tempos de irradiação da CPZ em 310 nm (B).

O resultado encontrado em Guevara et al. (2007) mostrou que a irradiação da amostra em 310 nm provoca a foto-associação de CPZ à proteína. Usando a AO, como sonda fluorescente da proteína, foi encontrado que o radical criado pela irradiação da CPZ (radical promazinil) liga-se à enzima perto do sítio da ouabaína. Observamos da Fig. 7.9 B que a CPZ, mesmo irradiada, não altera significativamente a intensidade da FITC ligada à proteína. Então parece que os fotoprodutos da CPZ também não afetam significativamente a FITC.

Conclusão

As principais conclusões desse trabalho encontram-se a seguir.

As estratégias desenvolvidas nos trabalhos de membranas permitiram caracterizar os efeitos das fenotiazinas nas frações de membranas enriquecidas de Na^+, K^+ -ATPase, permitindo-nos obter informações dos efeitos estruturais destas drogas em regiões específicas das membranas lipídicas. Das medidas de fluorescência estacionária encontramos que DPH comportou-se adequadamente como sonda fluorescente de membrana, localizando-se em pequenas quantidades na região superficial (componente de menor tempo de vida) e em sua maioria na região hidrofóbica (componente de maior tempo de vida).

Os derivados de fenotiazinas se localizaram tanto na região lipídica das membranas como nas proteínas. Pela anisotropia de fluorescência estacionária de DPH, verificamos que as fenotiazinas afetam a estrutura da bicamada lipídica, alterando a ordem dos lipídios. Encontrou-se que as fenotiazinas diminuem a fluorescência da DPH por supressão estática. A CPZ parece afetar menos o núcleo da membrana do que TFP, já que ela suprimiu menos a fluorescência de DPH, principalmente das moléculas superficiais de DPH, de menor tempo de vida. Já a TFP parece afetar toda a membrana, isto porque esta fenotiazina suprimiu mais a fluorescência de DPH e chegou a alterar os tempos de vida das componentes de DPH. Pelo decaimento da anisotropia, encontramos que a ordem dos lipídios aumenta por efeito das fenotiazinas, mas a taxa de decaimento da anisotropia também aumenta.

A sonda fluorescente de membrana DPH também foi usada para investigar as mudanças físicas dos lipídios de membrana devido à adaptação de uma espécie a um novo habitat. Encontramos para Na^+, K^+ -ATPase do crustáceo diminuição da ordem lipídica de membrana para adaptar-se a um ambiente marinho.

Usamos como sonda intrínseca os resíduos de triptofano da Na^+, K^+ -ATPase para investigar efeitos estruturais e o tipo de supressão de fluorescência que as fenotiazinas possam causar à proteína. Encontrou-se que a fluorescência dos resíduos de triptofano foi suprimida parcialmente pela TFP, onde cerca de 60% dos triptofanos sofreram supressão. Não se encontrou indício de transferência de energia entre TFP e os resíduos de triptofano da proteína.

Referências

- Amler E., Abbott A., Ball W. J. Structural dynamics and oligomeric interactions of Na^+, K^+ -ATPase as monitored using fluorescence energy transfer. *Biophys. J.* 61: 553 – 568 (1992).
- Amler E., Abbott A., Malak H., Lakowicz J., Ball W. J. The carbohydrate moieties of the beta-subunit of Na^+, K^+ -ATPase: their lateral motions and proximity to the cardiac glycoside site. *Biophys. J.* 70: 182 – 193 (1996).
- Andersen J. P., Vilsen B. Primary ion pumps: chapter 1. Principles of medical biology, volume 4. Cell chemistry and physiology: part III, pages 1 - 66. JAI Press Inc. (1996).
- Béguin P., Wang X, Firsov D., Puoti A., Clayes D., Geering, K. The subunit is a specific component of the Na^+, K^+ -ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16: 4250 – 4260 (1997).
- Brotherus J. R., Jost P. C., Griffith O. H., Keana J. F. W., Hokin L. E. Charge selectivity at the lipid-protein interface of membranes Na, K -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 272 – 2723 (1980).
- Buettner G. R.; Schafer F. Q. Free radicals, oxidants, e antioxidants. *Teratology.* 62, 234 (2000).
- Buettner G. R., Motten A. G., Hall R. D., Chignell C. F. Free radical production by chlorpromazine sulfoxide, an ESR spin-trapping and flash photolysis study. *J. Photochem. Photobiol.* 44: 5 – 10 (1986).
- Cantor R. S. Lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anaesthesia. *J. Biochem.* 36: 2339 – 2344 (1997).
- Caetano W., Tabak M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles: electronic absorption and fluorescence studies. *J. Coll. Interf. Sci.* 225: 69 – 81 (2000).
- Chignell, C. F., Motten, A. G., Buettner, G. R. Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines: relationship to phenothiazine-induced photosensitization. *Environ. Health Perspect.* 64: 103 – 110 (1985).
- Cornelius F. Functional reconstitution of the sodium pump. kinetics of exchange reactions performed by reconstituted (Na-K)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 19 – 66 (1991).
- Dowhan W., Bogdanov M., Mileykovskaya E. Functional roles of lipids in membranes. Chapter I. D. E. Vance and J. E. Vance (Eds) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th edition. Elsevier B. V. (2008).
- Eckenhoff, R. G. Do specific or nonspecific interactions with proteins underlie inhalational anesthetic action? *J. Mol. Pharmac.* 54: 610 – 615 (1998).

- Elisei F., Latterini L., Gaetano G., Mazzucato U., Viola G., Miolo G., Vedaldi D., Dall'Acqua F. Excited-state properties and in vitro phototoxicity studies of three phenothiazine derivatives. *J. Photochem. Photobiol.* 75: 11 – 21 (2002).
- Esmann M., Watts A., Marsh D. Spin-label studies of lipid-protein interactions of the (Na⁺,K⁺)-ATPase membranes from rectal glands of *Squalus Acanthias*. *J. Biochem.* 24: 1386 – 1393 (1985).
- Fortes P. A., Lee, J. A. Steady-state levels of phosphorylated intermediates of (Na,K)-ATPase monitored with oligomycin and anthrolyouabain. *J. Biol. Chem.* 259: 11176 – 11179 (1984).
- Finkelstein A., Ptitsyn O. Protein physics: a course of lectures. Academic Press Inc (2002).
- Garcia C., Oyola R., Piñero L., Arce R., Silva J., Sánchez V. Substitution and solvent effects on the photophysics properties of several series of 10-alkylated phenothiazines derivatives. *J. Phys. Chem.* 109: 3360 – 3371 (2005).
- Gratton E., Parasassi T. Fluorescence lifetime distributions in membrane systems. *J. Fluores.* 5: 51 – 57 (1995).
- Guevara E. A. C, Barriviera L., Hassón-Voloch A., Louro S. R. W. Chlorpromazine Binding to Na⁺, K⁺-ATPase and Photolabeling: Involvement of the ouabain site monitored by fluorescence. *J. Photochem. Photobiol.* 83: 914 – 919 (2007).
- Guevara E. A. C. Efeitos de um antipsicótico e um antidepressivo tricíclico sobre a bomba sódio e potássio, Na⁺,K⁺ - ATPase: estudo através de fluorescência. Tese de mestrado em Física. Dep. de Física, Centro Técnico - Científico, Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro (2005).
- Hendrich A. B., Wesołowska O., Motohashi N., Molnar J., Michalak K. New phenothiazine-type multidrug resistance modifiers: anti-MDR activity versus membrane perturbing potency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 260 – 265 (2003).
- Hollas J. M. Modern Spectroscopy. John Wiley and Sons Ltd. 4th edition (2004).
- Hernández A., Companyó M., Morros A., Tort L. Cambios en la fluidez de la membrana en hepatocitos de dorada *Sparus auratus* L., 1758 asociados al descenso térmico. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4): 389-392 (2002).
- Hueck I. S., Hollweg H. G., Schmid-Schonbein G. W., Artmann G. M. Chlorpromazine modulates the morphological macro and microstructure of endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: 873-878 (2000).
- Ioffe V. M., Gorbenko G. P., Zakharenko O. K., Yudintsev A. V. Chlorpromazine-membrane interactions as revealed by pKa and fluorescent probes. *J. Biol. Phys. Chem.* 7: 51 – 57 (2007).
- Jahnig F. Structural order of lipids and proteins in membranes: evaluation of fluorescence anisotropy data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 6361 – 6365 (1979).

- Jorgensen P. L. Mechanism of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ Pump protein structure and conformation of the pure (Na-K)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 694: 27 – 68 (1982).
- Jorgensen P. L. Skou J. C., Solonomson L. P. Purification and characterization of (Na^+ , K^+)-ATPase. II. Preparation of zonal centrifugation of highly active (Na^+ , K^+)-ATPase from the outer medulla of rabbit kidneys. *Biochim. Biophys. Acta* 233: 381 – 394 (1971).
- Jorgensen P. L., Håkansson K. O., Karlsh S. J. D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Ann. Rev. Physiol.* 65: 817 – 849 (2003).
- Karpinska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H. Analytical properties of 2-and 10-disubstituted phenothiazine derivatives. *Analytical Sciences* 12: 161-170 (1996).
- Kaiser R. D., London E. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives with membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37: 8180 - 8190 (1998).
- Kawakami K., Noguchi S., Noda M., Takahashi H., Ohta T., Kawamura M., Nojima H., Nagano K., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S. Primary structure of the α -subunit of *Torpedo californica* ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase deduced from cDNA sequence. *Nature* 316: 733 – 736 (1985).
- Kawakami K., Nagano K. The transmembrane segment of the human Na,K-ATPase β -subunit acts as the membrane incorporation signal. *J. Biochem.* 103: 54 - 60, (1988).
- Kawato S., Kinoshita K. Jr., Ikegami A. Effect of cholesterol on the molecular motion in the hydrocarbon region of lecithin bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques. *Biochemistry* 17: 5026-5031(1978)
- Keenan S. M., DeLisle R. K., Welsh W. J., Paula S., Ball W.J. Jr. Elucidation of the $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{-ATPase}$ digitalis binding site. *J. Mol. Graph. Model.* 23: 465 - 475 (2005).
- Kochevar E. I., Horn J. Photoproducts of chlorpromazine which cause red blood cell lysis. *J. Photochem. Photobiol.* 37: 163 – 168 (1983).
- Konopasek I, Kvasnicka P, Herman P, Linnertz H, Obsil T, Vecer J, Svobodova J, Strzalka K, Mazzanti L, Amler E. The origin of the diphenylhexatriene short lifetime component in membranes and solvents. *Chem. Phys. Letters* 293: 429–435 (1998).
- Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 282 – 295 (2004).
- Kyte J. Purification of the sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J. Biol. Chem.* 246: 4157 – 4165 (1981).
- Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd Edition. Springer Science + Business Media (2006).

- Lee J. A., Fortes P. A. Spatial relationship and conformational changes between the cardiac glycosides site and beta-subunit oligosaccharides in sodium plus potassium activated adenosinetriphosphatase. *J. Biochem.* 25: 8133 – 8141 (1986).
- A.G. Lee Effects of charged drugs on the phase transition temperatures of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 514 (1978) 95-104.
- Lin C.-E., Liao W.-S., Chen K.-H., Lin W.-Y. Influence of pH on electrophoretic behavior of phenothiazines and determination of pK_a values by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 3154–3159 (2003).
- Linnertz H., Urbanova P., Obsil T., Hermani P., Amler E., and Schoner W. Molecular distance measurements reveal an $(\alpha\beta)_2$ dimeric structure of Na^+ , K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 273: 28813 - 28821 (1998).
- Louro S. R. W., Anteneodo C., Wajnberg E. Carboxyl groups at the membrane interface as molecular targets for local anesthetics. *Biophys. Chem.* 74: 35 – 43 (1998).
- Logue J., Tikku P., Cossins A. R. Heat injury and resistance adaptation in fish. *J. Therm. Biol.* 20 (1/2): 191-197 (1995).
- Lowndes J. M., Hokin-Neaverson M., Ruoho R. J. Photoaffinity labeling of (Na^+, K^+) -ATPase with (^{125}I) iodoazidocymarin. *J. Biol. Chem.* 259: 10533 – 38 (1984).
- Malheiros S.V.P., de Paula E., Meirelles N.C. Contribution of trifluoperazine/ lipid ratio and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1373 (1998) 332-340.
- Mathews C. K., Van Holde, K. E. *J. Biochemistry. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. (ed.), Menlo Park (California) (1990).*
- Miolo G., Levoroto L., Gallochio F., Caffieri S., Bastianon C., Zanoni R., Reddi E. In vitro phototoxicity of phenothiazines: involvement of stable UVA photolysis products formed in aqueous medium. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 156 – 163 (2006).
- Motten A. G., Buettner G. R., Chignell C. F. Spectroscopic studies cutaneous photosensitizing agents –VII. a spin-trapping study of light induced free radicals from chlorpromazine and promazine. *J. Photochem. Photobiol.* 42: 9 – 15 (1985).
- Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 3rd edition, Worth Publishers (2002).
- Pedersen P. A., Nielsen J. M., Rasmussen J. H., Jorgensen P. L. Contribution to Tl^+ , K^+ , and Na^+ binding of Asn⁷⁷⁶, Ser⁷⁷⁵, Thr⁷⁷⁴, Thr⁷⁷², and Tyr⁷⁷¹ in cytoplasmic part of fifth transmembrane segment in α -subunit of renal Na,K -ATPase. *J. Biochem.* 37: 17818-17827 (1998).
- Post A., Warren R. J., Zarembo J.E., em *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. 9, editor K. Florey, Academic Press, NY, 1980, pp. 543–581.

- Rang H. P., Dale M. M. Farmacologia. Editora Guabanara Koogan AS 2^a edição 202 – 205 (1993).
- Ricardo, C. P., Teixeira, A. N. Moléculas biológicas - estrutura e propriedades. Didáctica (Ed.) Lisboa 3^a edition (1983).
- Rodrigues T., dos Santos G., Riposati A., Barbosa L. R. S., Mascio P.D., Itri R., Baptista M. S., Nascimento O. R., Nantes I. L. Photochemically generated stable cation radical of phenothiazine aggregates in mildly acid buffered solutions. *J. Phys. Chem.* 110: 12257 – 12265 (2006).
- Robert J. E. The photodynamics effect of chlorpromazine, promazine, and hematoporphyrin on lens protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 25 (1984).
- Saldanha R. J. D., Ananda S., V. B. M., Made G. N. M. Oxidation of psychotropic drugs by Chloramine – T in acid medium: a kinetic study using spectrophotometry. *J. Molec. Struct.* 606 (2002) 147 - 154.
- Silva, D. Estudo da interação da clorpromazina e da hemina com albumina sérica através da espectroscopia de fluorescência. Teses de Mestrado em Biologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2001).
- Skou J. C. The identification of the sodium pump. *Bioscience Reports* 18 No. 14 (1998).
- Sweadner K. J., Donnet C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca^{2+} - ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* 356: 685 – 704 (2001).
- Sutherland E., Dixon B. S., Leffert H. L., Skally H., Zaccaro L., Simon F. R. Biochemical localization of hepatic surface-membrane Na^+, K^+ -ATPase activity depends on membrane lipid fluidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8673 – 8677 (1988).
- Tsakovska I. QSAR and 3D QSAR of phenothiazine type multidrug resistance modulators in P388/ADR cells. *Bioorg. Med. Chem.* 11:2889-2899 (2003).
- Therien A. G. Goldshleger R., Karlsh S.J., Blostein R. Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 32628 – 32634 (1997).
- Urban, B. W. Current assessment of targets and theories of anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* 89: 167–183 (2002).
- Valeur B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Wiley - VCH Verlag GmbH (2002).
- Van der Heide U. A., Van Ginkel G., Levine Y. K. DPH is localised in two distinct populations in lipid vesicles. *Chem. Phys. Lett.* 253: 118-122 (1996).
- Ward D., Cavieres J. Photoactivation of fluorescein isothiocyanate modified Na, K-ATPase by 2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)8-azidoadenosine 5'-Diphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 1477-14284 (1998).
- Wesolowska O., Hendrich A. B., Motohashi N., Kawase M., Dobryszyccki P., Ozyhar A., Michalak K. Presence of anionic phospholipids rules the

ColloQUIUM

Editorial - Centro de Formación

ISBN: 978-9942-600-28-8

