

8

Resultados e Discussão III - Interação dibucaína-membrana e tetracaína-membrana

8.1

Espectros de Fluorescência Estacionária da Dibucaína em Membrana

Soluções aquosas de Dib em pH 7.4, com concentração fixa de $10 \mu\text{M}$, foram tituladas com membranas - enriquecidas com proteínas (Na^+ , K^+) ATPase na concentração de 10 mg/ml em proteína - em concentrações crescentes. Espectros de fluorescência estacionária foram registrados para estas soluções com a excitação em 330 nm. Os resultados aparecem na Fig. 8.1.

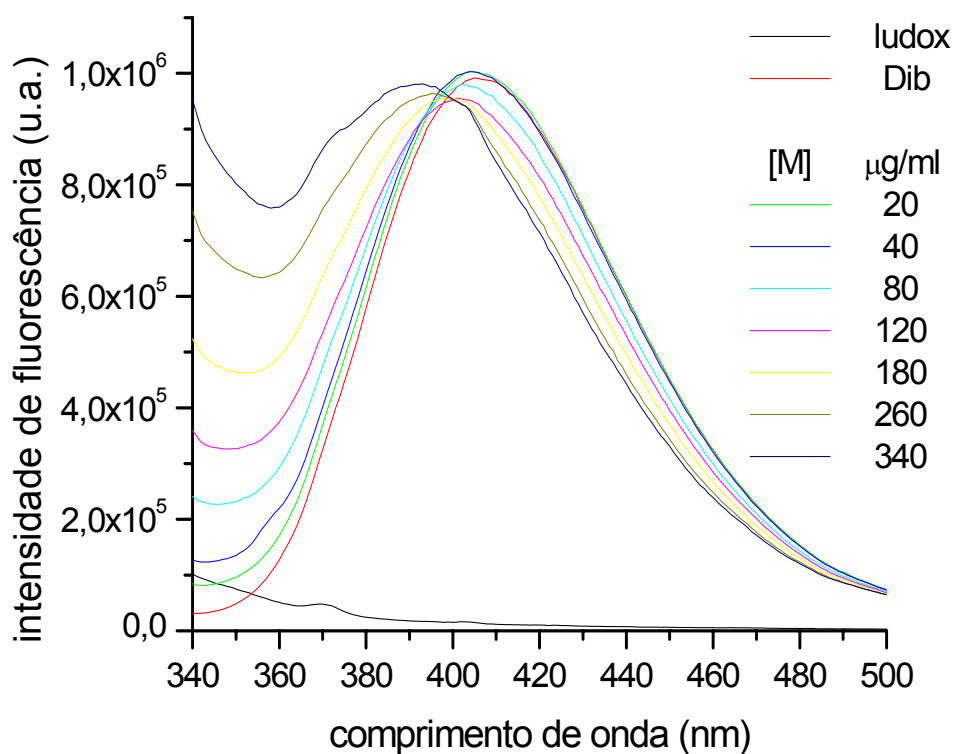


Figura 8.1 - Espectros de fluorescência da Dib ($10 \mu\text{M}$) em pH 7.4 titulada com membrana na faixa de concentração de $20 \mu\text{g/ml}$ a $340 \mu\text{g/ml}$.

Abaixo, temos os resultados da correção da primeira contribuição do espalhamento realizados com o uso da equação 5.2.

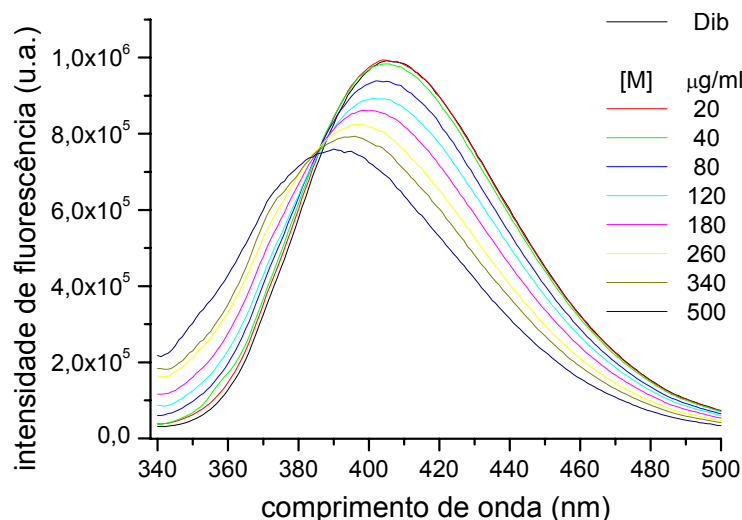


Figura 8.2 - Espectros de fluorescência da Dib ($10 \mu\text{M}$) em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de $20 \mu\text{g/ml}$ a $500 \mu\text{g/ml}$ após correção da primeira contribuição do espalhamento.

Com o objetivo de corrigir as outras contribuições do espalhamento - perda de intensidade de fluorescência devido à atenuação da luz de excitação; perda de intensidade e aparente deslocamento do pico de fluorescência devido à atenuação da luz emitida - utilizamos a equação (5.3). Os espectros resultantes dessa segunda correção são apresentados na Fig. 8.3. O resultado desta correção se mostrou superestimado. O que, por fim, nos pareceu natural, dado que este método não leva em consideração o fato de que a luz espalhada pode excitar moléculas fora do feixe de excitação, e que a emissão destas, por sua vez, possa chegar ao detector.

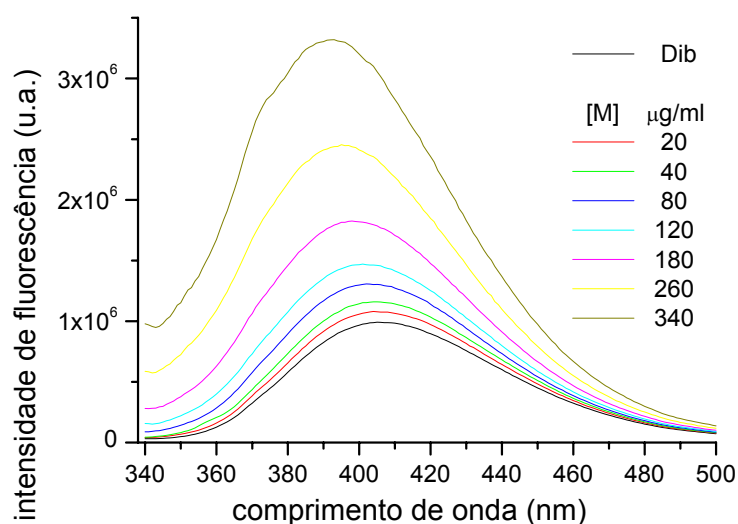


Figura 8.3 - Espectros de fluorescência da Dib ($10 \mu\text{M}$) em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de $20 \mu\text{g/ml}$ a $340 \mu\text{g/ml}$ com correção da primeira e segunda contribuição do espalhamento.

Soluções aquosas de Dib em pH 7.4, em concentração fixa de $10 \mu\text{M}$, foram tituladas com membranas em concentrações crescentes. Espectros de fluorescência estacionária foram registrados na presença de polarização HV. Os resultados aparecem na Fig. 8.4.

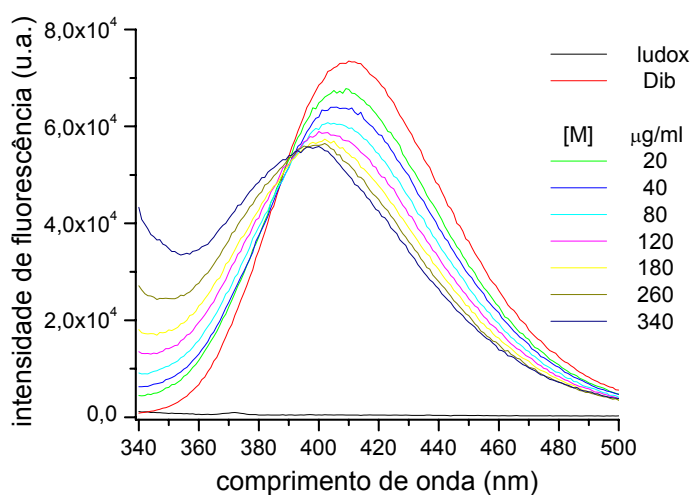


Figura 8.4 - Espectros de fluorescência da Dib ($10 \mu\text{M}$) em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de concentração de $20 \mu\text{g/ml}$ a $340 \mu\text{g/ml}$ com polarização transversal HV.

Com o objetivo de corrigir a primeira contribuição do espalhamento utilizamos o mesmo método de correção, ou seja, a equação 5.2. Os resultados da correção são apresentados na Fig. 8.5.

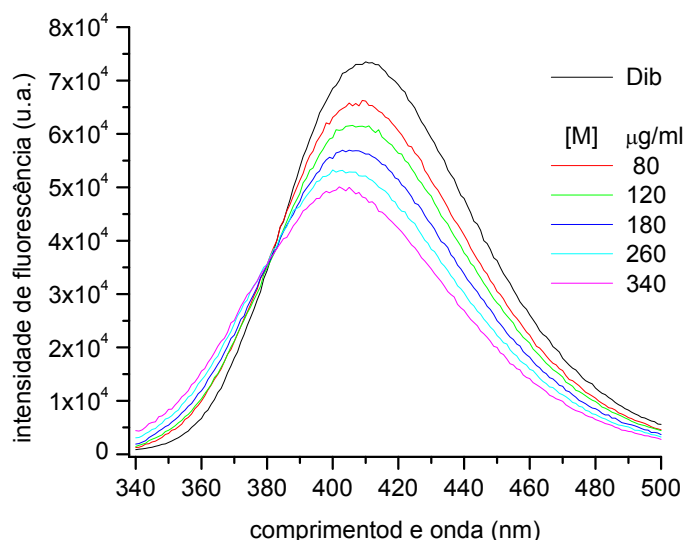


Figura 8.5 - Espectros de fluorescência da Dib ($10 \mu\text{M}$) em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de $80 \mu\text{g/ml}$ a $340 \mu\text{g/ml}$ com polarização transversal HV e correção da primeira contribuição do espalhamento.

O uso combinado da polarização transversal HV e da correção para a primeira contribuição do espalhamento permitiu eliminar os efeitos espúrios derivados da contribuição direta da luz espalhada na direção do detector. O mesmo não ocorreu com as medidas sem polarização, onde houve apenas uma atenuação destes efeitos.

Soluções aquosas de TTC em pH 7.4, em concentração fixa de $10 \mu\text{M}$, foram tituladas com membranas - enriquecidas com $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase na concentração de 10 mg/ml em proteína - em concentrações crescentes. Espectros de fluorescência estacionária foram registrados para estas soluções. Os resultados aparecem na Fig. 8.6.

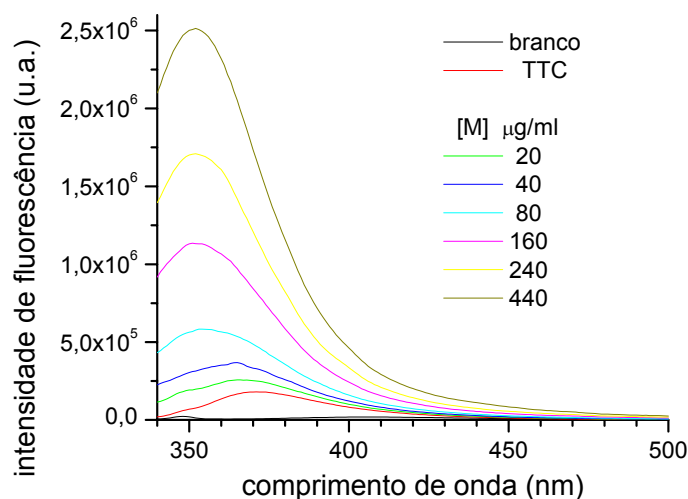


Figura 8.6 - Espectros de fluorescência da TTC (10 μM) em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 440 $\mu\text{g/ml}$.

Com o objetivo de corrigir a primeira contribuição do espalhamento utilizamos a equação (5.2). Os resultados da correção são apresentados na Fig. 8.7.

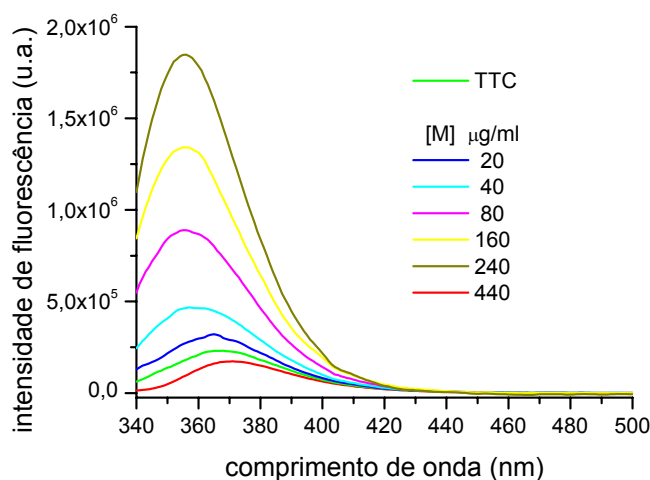


Figura. 8.7 - Espectros de fluorescência da TTC (10 μM) em pH 7.4 com titulação de membrana na faixa de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 500 $\mu\text{g/ml}$ após correção da primeira contribuição do espalhamento.

Nota-se uma diferença entre o comportamento na fluorescência da Dib e da TTC ao associar-se ao meio lipídico. O rendimento quântico da Dib diminui à medida que sua incorporação à membrana aumenta. Já o rendimento da TTC aumenta. Alguns autores afirmam que a diferença do rendimento quântico da Dib

em relação à TTC pode ser explicada se considerarmos a natureza dos estados eletrônicos de emissão e o efeito do solvente sobre ela (Mondal et al., 2003).

8.2

A determinação da constante de dissociação da Dib e TTC em membrana

A incorporação de fármacos nas membranas lipídicas pode ser monitorada pela determinação da concentração dos fármacos incorporados na membrana e fármacos livres em solução. Neste sentido, aplicamos o modelo de um sítio de ligação de Bashford e Smith, dado pela equação (5.10), para analisar a incorporação da Dib e TTC na membrana e determinar as suas respectivas constantes de dissociação e, por conseguinte, de associação.

Soluções de Dib foram tituladas, em concentração constante de 10 μM , com concentrações crescentes de membrana para se obter a mudança na intensidade de fluorescência até a saturação, ou seja, até a concentração “infinita” de membrana quando todos os fármacos estariam incorporados. O resultado da aplicação deste modelo, tomando-se como referência a mudança na intensidade de fluorescência em 420 nm, para as medidas sem polarização (Fig. 8.3) e com polarização HV (Fig. 8.5), aparecem abaixo, nas Figs. 8.8 e 8.9.

Nota-se que houve uma significativa diferença entre o valor da constante de dissociação da Dib determinado a partir dos espectros obtidos sem polarização, $K_d = 1.10 \text{ mM}$ e com polarização, $K_d = 0.73 \text{ mM}$, sendo esta última mais confiável. Cabe salientar que a configuração transversal de polarização poderia estar privilegiando a fluorescência de moléculas em água, pois estas giram mais rapidamente do que as localizadas em membrana. Neste sentido, caso isto tivesse ocorrido, teríamos um valor maior para a constante de dissociação. No entanto, não foi o que aconteceu.

Soluções de TTC foram tituladas, em concentração constante de 10 μM , com concentrações crescentes de membrana para se obter a mudança na intensidade de fluorescência até a saturação, ou seja, até a concentração “infinita” de membrana quando todos os fármacos estariam incorporados. O resultado, tomando-se como referência a mudança na intensidade de fluorescência em 452

nm , 372 nm (medidas sem correção de espalhamento) e 356 nm (com correção de espalhamento), aparece na Fig. 8.10.

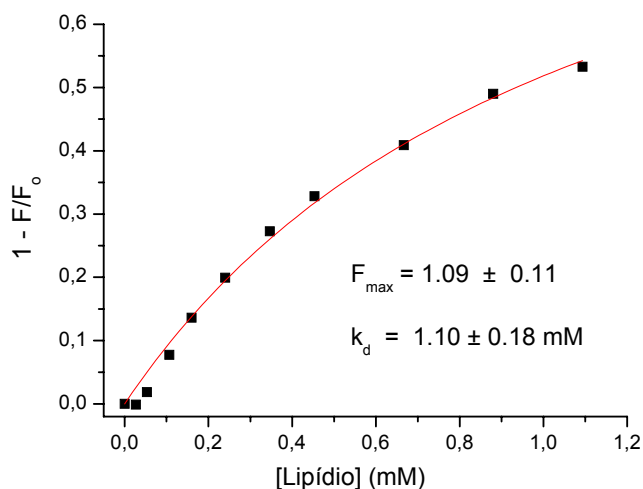


Figura 8.8 - Variação da fluorescência da Dib em função da concentração de lipídeos da membrana tomando como referência a mudança na fluorescência em 420 nm. A curva corresponde ao ajuste através do modelo de um único sítio de ligação. A fluorescência máxima e a constante de dissociação aparecem ao lado da curva.

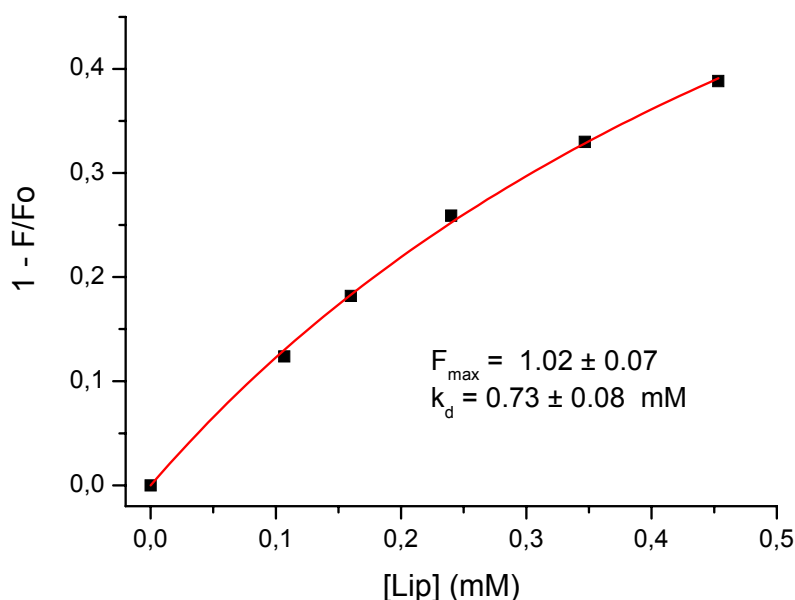


Figura 8.9 - Variação da fluorescência da dibucaína em função da concentração de lipídeos da membrana tomando como referência a mudança na fluorescência em 420 nm nas medidas realizadas com polarização HV. A curva corresponde ao ajuste através do modelo de um único sítio de ligação. A fluorescência máxima e a constante de dissociação aparecem ao lado da curva.

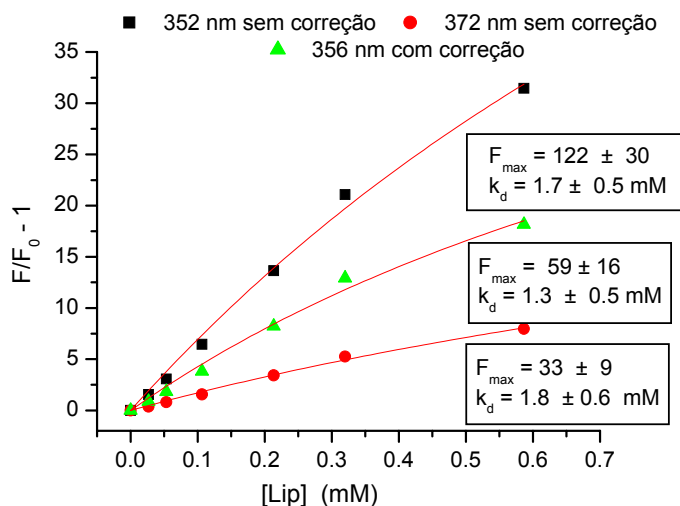


Figura 8.10 - Variação da fluorescência da TTC em função da concentração de lipídeos da membrana. As curvas correspondem ao ajuste através do modelo de um único sítio de ligação tendo-se como base os espectros sem e com a correção para a primeira contribuição de espalhamento. As constantes de dissociação aparecem ao lado de cada curva.

Coefficientes de partição, P , de anestésicos locais em diferentes fases orgânicas têm sido determinados por diversos autores. Estes coeficientes foram determinados para Dib e TTC, além de outros anestésicos, no sistema de vesículas multilamelares de fosfatidilcolina em meio aquoso (Malheiros et al., 2004). Para a forma catiônica da Dib e da TTC o valor encontrado foi de $P_{dib^+} = (18 \pm 5) \times 10^2$ e $P_{ttc^+} = (14 \pm 5) \times 10$, respectivamente. Nota-se que este coeficiente de partição encontrado para a Dib é uma ordem de grandeza maior do que para a TTC.

Como vimos no capítulo quatro, podemos determinar a constante de associação, K_b , de um fármaco a partir de seu coeficiente de partição com o uso da Equação (4.43). Note também que a constante de associação, K_b , pode ser obtida simplesmente pelo inverso da constante de dissociação, K_d . Neste sentido, temos na Tabela 8.1 as constantes de associação obtidas a partir desses coeficientes (Malheiros et al., 2004) e as constantes oriundas dos ajustes descritos em nosso trabalho.

Tabela 8.1 – Constantes de associação da Dib e TTC obtidas pelos coeficientes de partição (Malheiros et al., 2004), K_b^* , e pelos ajustes do modelo de um único sítio de ligação das Figs. 8.9 e 8.10, K_b .

ANESTÉSICO LOCAL	$K_B^* (10^3 \text{ M}^{-1})$	$K_B (10^3 \text{ M}^{-1})$
Dib	1.34 ± 0.41	0.91 ± 0.15
TTC	0.11 ± 0.04	0.77 ± 0.20

A constante de associação para a Dib, encontrada a partir do coeficiente de partição, é uma ordem de grandeza maior do que para a TTC. O que significa que a Dib associa-se mais facilmente às vesículas multilamelares de fosfatidilcolina do que a TTC. Por outro lado, as constantes de associação encontradas em nosso trabalho são da mesma ordem de grandeza. O que significa que a Dib e a TTC associam-se igualmente à membrana enriquecida com $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase.

8.3

Fluorescência resolvida no tempo da dibucaína em membrana

Soluções aquosas de Dib em pH 7.4, em concentração fixa de $10 \mu\text{M}$, foram tituladas com membranas - enriquecidas com $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase na concentração de 10 mg/ml em proteína - em concentrações crescentes. Curvas de decaimento de tempo de vida de fluorescência, com excitação em 330 nm e emissão em 405 nm, foram registradas para estas soluções. As curvas de decaimento de fluorescência para cinco concentrações de membrana e ajustes realizados ao longo de toda faixa de concentração aparecem na Figs. 8.11 A e 8.11 B.

Os valores de χ^2 obtidos, em torno de 1.4. Isto foi devido ao ruído oscilatório que entra no detector através do cabo (ver resíduos, na Fig. 8.10), o qual procuramos minimizar em outras medidas. Não obstante esta interferência, temos que os valores de χ^2 obtidos mostram-se satisfatórios. A seguir temos os resultados dos ajustes realizados a partir da análise individual, considerando um modelo de três exponenciais, para soluções de dibucaína ($10 \mu\text{M}$) tituladas com membrana, sem polarização e com polarização HV - Tabela 8.2.

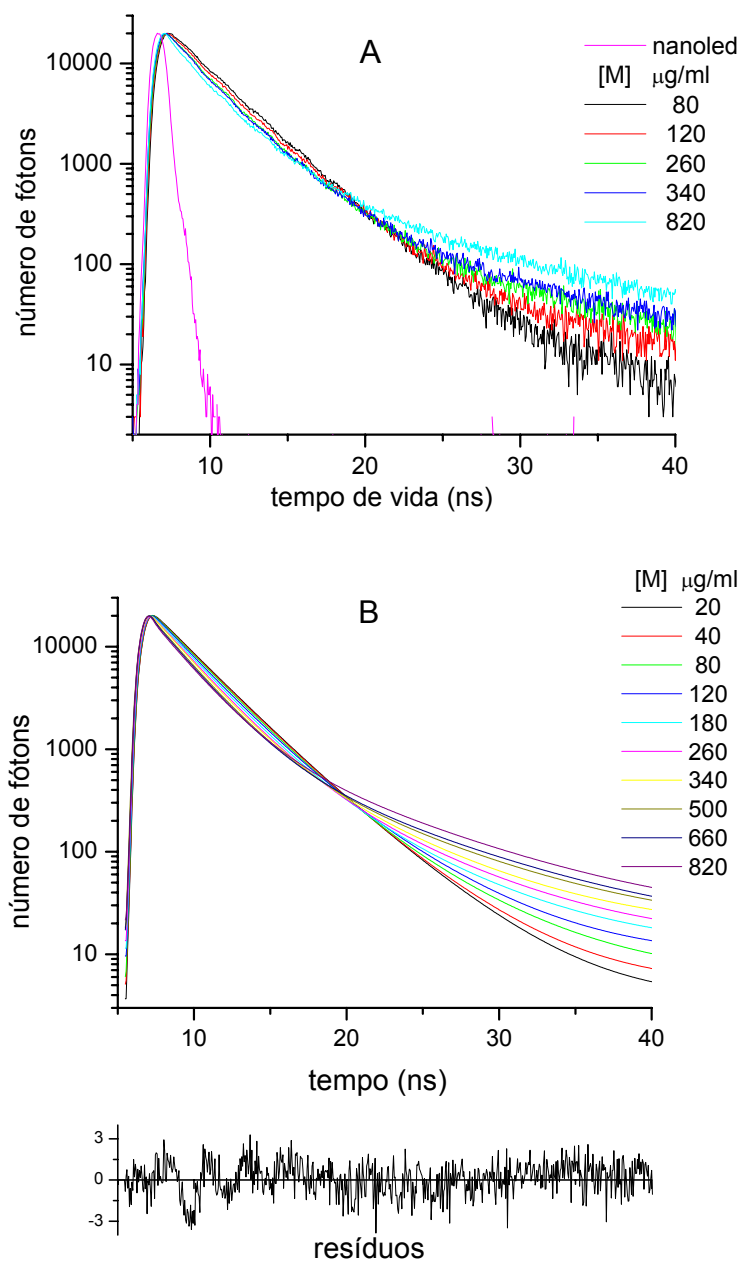


Figura 8.10 – Curvas de decaimento de fluorescência (Fig. A) e ajustes realizados ao longo de toda faixa (Fig. B), da Dib (10 µM) em pH 7.4, para titulação com membrana na faixa de 20 µg/ml a 820 µg/ml. Excitação em 330 nm e emissão 405 nm.

Tabela 8.2 - Resultados da análise individual tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da Dib (10 μ M) para titulação com membrana na faixa de 20 μ g/ml a 820 μ g/ml obtidos com τ_0 fixo em 0.1ns. A última linha corresponde à medida realizada com polarização HV (*).

$[M]$ $\mu\text{g/ml}$	α_0 (10^{-2})	f_0 (%)	τ_1 (ns)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (ns)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
20.0	3.75	1.90	2.74	6.38	80.8	4.38	0.85	17.3	1.50
40.0	3.68	1.90	2.74	6.52	83.6	4.69	0.66	14.5	1.50
80.0	5.76	2.90	2.74	6.80	87.5	5.75	0.35	9.50	1.50
120.0	4.85	2.60	2.60	6.53	81.5	5.21	0.63	15.9	1.40
180.0	6.97	3.70	2.60	6.59	84.3	6.20	0.39	11.9	1.40
260.0	8.71	4.80	2.50	6.45	81.6	6.46	0.41	13.6	1.40
340.0	10.25	5.70	2.42	6.41	78.6	6.39	0.48	15.7	1.40
500.0	14.78	8.40	2.38	6.15	75.9	7.27	0.41	15.6	1.40
660.0	18.50	10.7	2.36	5.92	73.4	7.78	0.38	15.9	1.40
820.0	18.97	10.8	2.31	5.81	69.8	7.75	0.48	19.4	1.40
820.0*	16.30	9.0	2.36	5.56	66.4	8.24	0.59	24.7	1.20

A partir da análise individual não foi possível encontrar um conjunto único de tempos τ_0 , τ_1 e τ_2 ao longo de toda a faixa de concentração de membrana. A amplitude relativa associada ao τ_0 mantido fixo em 0.1 ns, aumentou em torno de 10% na faixa de 20 μ g/ml a 820 μ g/ml de membrana.

Para τ_1 , temos uma diminuição de 2.74 ns para 2.31 ns com uma amplitude relativa diminuindo de 80.8 % para 69.8 % à medida que a concentração de membrana vai aumentando. Estes valores limites correspondem aos tempos de vida das espécies protonada e neutra da Dib, encontradas anteriormente. À medida que concentração de membrana aumenta e, portanto, mais moléculas do anestésico se incorporam à membrana, o tempo de vida diminui. Isto sugere que o tempo de vida da Dib incorporada à membrana é menor.

Para τ_2 , temos um aumento de 4.38 ns para 7.75 ns com uma amplitude relativa aumentando de 17.3 % para 19.4 %. Os parâmetros encontrados para a medida realizada com polarização HV (última linha da Tabela 8.2) diferem muito pouco dos valores encontrados para a medida sem polarização. Assim, não vimos necessidade de realizar todas as medidas de fluorescência resolvida do tempo com

polarização. Abaixo, os resultados dos ajustes realizados a partir da análise individual, considerando um modelo de três exponenciais, para soluções de membrana pura em duas concentrações, sem polarização e com polarização HV.

Tabela 8.3 - Resultados da análise individual tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da membrana pura em solução aquosa sem polarização e com polarização HV (*), obtidos com τ_0 fixo em 0.1ns.

$[M]$ $\mu\text{g/ml}$	α_0 (10^{-2})	f_0 (%)	τ_1 (ns)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (ns)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
20.0	6.56	30.64	1.86	0.31	24.72	8.61	0.12	44.6	1.08
40.0	33.4	30.62	1.86	1.40	21.71	8.40	0.68	47.6	1.16
40.0*	46.7	29.20	2.01	1.82	21.01	8.77	0.99	49.7	1.20

Os resultados obtidos mostram dois tempos, τ_1 em torno de 2 ns com uma amplitude relativa em torno de 23 % e τ_2 em torno de 9 ns com uma amplitude relativa em torno de 50 %. Nota-se que τ_2 corresponde ao valor de τ_2 obtido na última medida da Tabela 8.2, sugerindo que este está associado à membrana.

Com o objetivo de fixar um conjunto único de tempos de vida que descreva o nosso sistema optou-se por realizar a análise global – Tabela 8.4. A inspeção dos parâmetros obtidos pela análise individual (Tabelas 8.2 e 8.3) nos indica um modelo quatro exponenciais para o nosso sistema. Neste modelo τ_0 estaria associado ao espalhamento da luz de excitação, τ_1 à dibucaína incorporada à membrana, τ_2 à dibucaína protonada em solução e τ_3 à membrana pura.

A partir da análise global encontramos um conjunto único de tempos τ_0 , τ_1 , τ_2 e τ_3 ao longo de toda a faixa de concentração de membrana com um χ^2 médio de 1.3. A amplitude relativa do espalhamento, f_0 , aumentou 5 % na faixa de 20 $\mu\text{g/ml}$ a 340 $\mu\text{g/ml}$ de membrana. Para τ_1 , obtivemos um valor de 1.78 ns com uma amplitude relativa aumentando de 11.5 % para 29.3 %. Para τ_2 , obtivemos um valor de 3.14 ns com uma amplitude relativa diminuindo de 86.6 % para 63.3 %. Para τ_3 , obtivemos um valor de 13.3 ns com uma amplitude relativa aumentando de 0.06 % para 0.46 %.

Tabela 8.4 - Resultados da análise global quadri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da Dib (10^{-5} M) para titulação com membrana na faixa de 20 μ g/ml a 340 μ g/ml.

τ_0 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
0.11	1.78	3.14	13.3	1.3

$[M]$ $\mu\text{g/ml}$	α_0 (10^{-2})	f_0 (%)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	α_3 (10^{-4})	f_3 (%)	χ^2
20	3.36	1.8	1.39	11.5	5.91	86.6	1.38	0.06	1.40
40	4.33	2.3	1.50	12.6	5.73	85.0	1.92	0.09	1.40
80	6.60	3.7	1.83	15.5	5.39	80.8	2.97	0.14	1.40
120	1.00	0.6	2.30	20.4	5.03	78.8	4.32	0.21	1.40
180	3.45	1.9	2.69	24.6	4.53	73.1	5.68	0.29	1.30
260	6.31	3.7	3.01	28.5	4.03	67.3	7.31	0.38	1.20
340	11.63	6.8	3.09	29.3	3.78	63.3	8.78	0.46	1.20

Nota-se que os valores encontrados para τ_2 e τ_3 são os mesmos dos valores encontrados no Capítulo 5 para as espécies neutra e protonada da Dib, sugerindo tempos de vida semelhantes entre moléculas neutra e incorporada à membrana. As amplitudes relativas f_1 e f_2 nos informam que houve uma incorporação em torno de 20% da dibucaína na membrana para a concentração de 340 μ g/ml. Este resultado nos fornece uma constante de associação, k_b , de $0.55 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, compatível com o resultado apresentado na Tabela 8.1.

Mondal, Chakrabarti e Basak (Mondal et al., 2003) realizaram medidas de fluorescência resolvida no tempo modelo de membrana constituído por micelas reversas de AOT - (sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate/ água/ isooctano). Através de um modelo de ajuste de duas exponenciais os autores determinaram dois tempos de vida médios para a dibucaína em solução aquosa e em micelas. Em água os tempos médios foram de 3 ns e 1ns, com amplitudes relativas de 80 % e 20 %, respectivamente. Em micelas, com a razão entre as concentrações de água e micelas, $w_0 = [H_2O]/[AOT]$, variando de 2 a 50 vezes, ambas as componentes diminuíram para 2.6 ns e 0.8 ns, mantendo as mesmas amplitudes relativas. Os autores observaram ainda uma diferença entre o comportamento da fluorescência

da Dib e da TTC em água e em micelas. O rendimento quântico da Dib em micelas é 40 %-70 % menor do que em água, enquanto que o da TTC é de 30 a 100 vezes maior.

Tabela 8.5 – Tempos de vida médios de fluorescência (Mondal et al., 2003) da Dib (10 μ M) e TTC (4 μ M) em solução aquosa (pH = 6.5) e em micelas, $w_0 = [H_2O]/[AOT]$.

MEIO	$\langle \tau_{DIB} \rangle$	$\langle \tau_{TTC} \rangle$
Micelas, $w_0 = 2$	2.1	1.25
Água	2.7	< 0.02

Nota-se que os valores dos tempos médios encontrados pelos autores para a dibucaína estão próximos dos valores de τ_1 e τ_2 obtidos em nossas análises. A passagem do anestésico através da membrana citoplasmática é uma condição para a ação anestésica. De fato, nossas medidas demonstram a natureza anfipática destas moléculas. Apesar de sua semelhança estrutural e funcional, a interação das formas catiônicas com fragmentos de membrana provocou decréscimo do rendimento quântico da Dib e forte aumento do da TTC. O tempo de vida de fluorescência da Dib diminuiu enquanto o da TTC aumentou. Essas propriedades serão utilizadas para sondar a interação dos anestésicos com a enzima inserida na membrana através de transferência ressonante de energia ou supressão entre os resíduos de triptofano e o anestésico. As medidas realizadas com as amostras da TTC não forneceram resultados satisfatórios. A TTC possui um tempo de vida muito curto (Tabela 8.5) em solução aquosa (<0.02 ns), de modo que não pôde ser medido com o equipamento.

8.4

Supressão de fluorescência e transferência de energia - interação da Dib com resíduos de triptofano em membrana

8.4.1

Fluorescência Estacionária

Soluções aquosas de Na,K-ATPase (4.2 mg/ml em proteína, atividade 4 u/mg), em pH 7.4 (tampão TRIS), com concentração fixa em 28 $\mu\text{g/ml}$ (20 $\mu\text{l}/3\text{ml}$), foram tituladas com Dib em concentrações crescentes na faixa de 1 μM a 37 μM . Com o objetivo de analisar a ocorrência de transferência de energia de resíduos de triptofano para a Dib e/ou da supressão de fluorescência de triptofano por Dib, espectros de fluorescência estacionária foram registrados para estas soluções. Os resultados aparecem na Fig. 8.11.

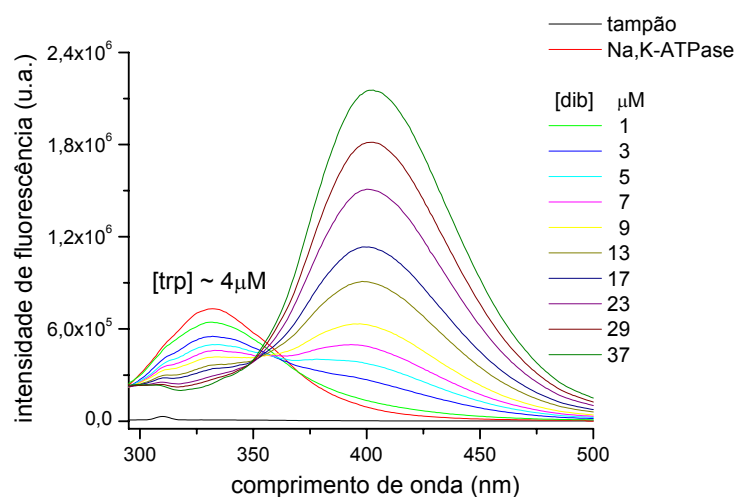


Figura 8.11 – Espectros de fluorescência de Na,K-ATPase (28 $\mu\text{g/ml}$, [trp] $\sim$ 4 μM) titulada com Dib na faixa de concentração de 1 μM a 37 μM (pH 7.4). Excitação em 283 nm. Os picos em 330 e 405 nm correspondem aos resíduos de triptofano e à Dib, respectivamente.

Como podemos observar na Fig. 8.11 houve uma significativa diminuição na intensidade de fluorescência do triptofano à medida que a concentração da Dib foi aumentando. Por outro lado, podemos observar um aumento na intensidade da fluorescência da Dib em função da concentração. Contudo, dado que a intensidade de fluorescência é proporcional à intensidade da luz de excitação, efeitos de filtro

interno deverão ser considerados na análise. Tais efeitos podem provocar uma diminuição na intensidade da luz de excitação ou uma diminuição da fluorescência observada devido à absorção da luz emitida pela amostra. A importância relativa de cada processo depende da densidade ótica da amostra nos comprimentos de onda de excitação e emissão.

O efeito de filtro interno devido à absorção da luz pela Dib pode diminuir a intensidade de fluorescência aparente e, portanto, distorcer os dados obtidos. Com o objetivo de corrigir as medidas da Fig. 8.11, fizemos uso da Eq. 5.4. Os resultados da correção e a comparação com os espectros da Dib pura nas mesmas condições de excitação e concentração são apresentados na Fig. 8.12.

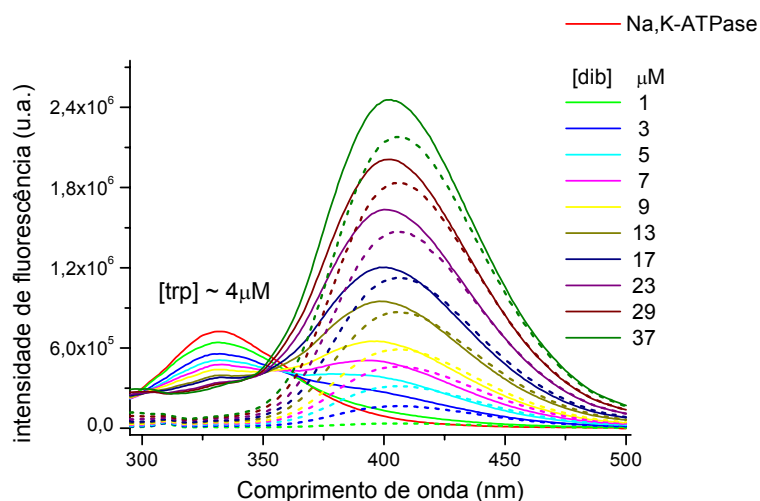


Figura 8.12 – Espectros de fluorescência de Na,K-ATPase (28 $\mu\text{g/ml}$, $[\text{trp}] \sim 4 \mu\text{M}$) titulada com Dib na faixa de concentração de 1 μM a 37 μM (pH 7.4), depois da correção do efeito de filtro interno (linhas contínuas). Espectros de fluorescência da Dib pura nas mesmas condições (linhas tracejadas). Excitação em 283 nm.

Como podemos observar na Fig. 8.12, a intensidade de fluorescência do triptofano vai diminuindo com o aumento de concentração da Dib, indicando supressão. Essa supressão pode ser causada por choques, supressão dinâmica, ou por formação de complexo, supressão estática. Para estes dois processos denominamos de supressão propriamente dita. Outro ponto a ressaltar, é a bem conhecida capacidade de grupos amina de atuar como supressores. Por outro lado, como o espectro de emissão do triptofano se sobrepõe ao de absorção da Dib (pico em 330 nm), devemos considerar a possibilidade de transferência de energia, que também provoca a diminuição da fluorescência do doador. A fluorescência da Dib

(pico em 405 nm) pode ter uma contribuição da excitação direta (283 nm) e outra devido à transferência de energia. Para separar essas duas contribuições, obtivemos a fluorescência de Dib pura, excitando em 283 nm. Os resultados aparecem como linhas tracejadas na Fig. 8.12.

Comparando as linhas contínuas e tracejadas, constata-se uma diferença entre os espectros da Dib pura e desta interagindo com a membrana nas mesmas condições. Em toda a faixa de concentração, os espectros em membrana apresentaram um aumento na intensidade e um deslocamento para o azul, devido à incorporação à membrana. Contudo, não fica claro se o aumento de intensidade é devido à transferência de energia de triptofano para a Dib ou se é simplesmente uma consequência de alteração de vizinhança. Com o objetivo de analisar esta alteração, espectros de fluorescência foram registrados para as mesmas soluções, mas com a excitação em 330 nm, na qual não há possibilidade de transferência de energia. Os resultados aparecem na Fig. 8.13. Portanto, como podemos observar, apesar de não haver a possibilidade de transferência de energia, em toda a faixa de concentração os espectros da Dib em membrana apresentaram o aumento na intensidade de fluorescência e o deslocamento para o azul. Por exemplo, para a $[Dib] = 17 \mu M$, tal deslocamento ficou em torno de 4 nm para ambas as medidas. Com o intuito de comparar a diferença entre as intensidades de fluorescência observadas nas Figs. 8.12 e 8.13, fizemos os gráficos da fluorescência em 440 nm em função da concentração de Dib, usando a $[Dib] = 17 \mu M$ para normalizar as intensidades. O resultado aparece na Fig. 8.14.

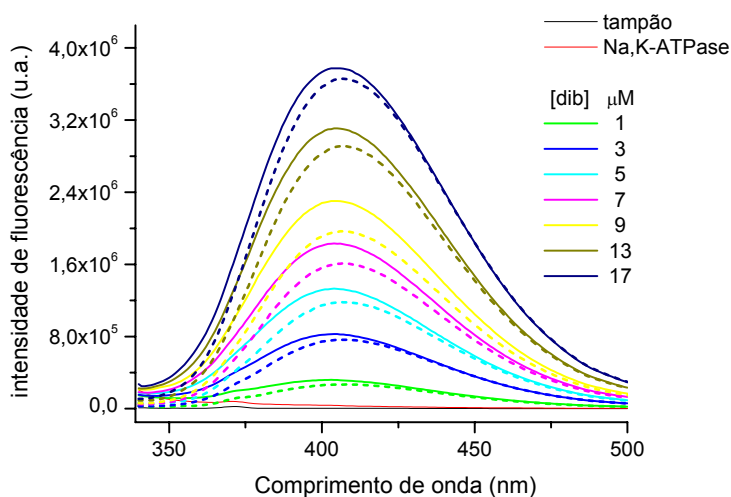


Figura 8.13 - Espectros de fluorescência de Na,K-ATPase (28 µg/ml, [trp] ~ 4 µM) titulada com Dib na faixa de concentração de 1 µM a 17 µM (pH 7.4). Espectros de fluorescência da Dib pura nas mesmas condições (linhas tracejadas). Excitação em 330 nm.

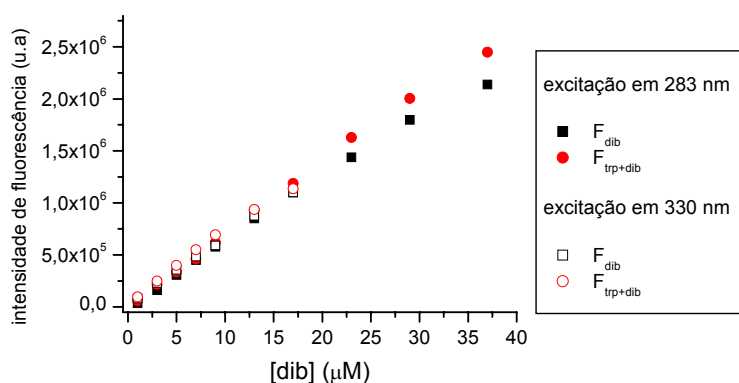


Figura 8.14 - Intensidade de fluorescência da Dib em 440 nm ($F_{440 \text{ nm}}$) em função da concentração. ■ - $F_{440 \text{ nm}}$ pura com excitação em 283nm. ● - $F_{440 \text{ nm}}$ em membrana com excitação em 283nm. □ - $F_{440 \text{ nm}}$ pura com excitação em 330 nm. ○ - $F_{440 \text{ nm}}$ em membrana com excitação em 330 nm.

Como podemos observar na Fig. 8.14, a fluorescência da Dib com excitação em 283 nm e em 330 nm apresentou comportamento semelhante, demonstrando que a transferência de energia dos resíduos de triptofano para as moléculas de Dib não é apreciável. Deste modo, podemos concluir que o aumento na intensidade de fluorescência da Dib em membrana se deve apenas à alteração da vizinhança. Já a diminuição da intensidade de fluorescência do triptofano se deve à supressão propriamente dita, causada pela a Dib.

8.4.2

Acessibilidade dos resíduos de triptofano – equação de Stern - Volmer modificada

A proteína Na,K-ATPase possui em torno de 23 resíduos de triptofano distribuídos em diferentes regiões. Cada resíduo ou conjunto de resíduos pode ter uma acessibilidade distinta ao supressor - que em nosso caso é a Dib. Para este caso, temos que a equação de Stern-Volmer apresentará uma forma modificada, devido à diferença de acessibilidade dos resíduos. O uso da supressão como forma de análise de acessibilidade dos resíduos de triptofano em proteínas é muito comum. Neste sentido, supõem-se duas populações de fluoróforos, uma composta pelos resíduos acessíveis e outra pelos resíduos não acessíveis. Para este sistema temos que a fluorescência total na ausência do supressor (F_0) é dada pela 5.23. Nota-se que esta forma modificada da equação de Stern-Volmer nos permite determinar a capacidade de supressão dada por K_a e as frações dos resíduos de triptofano acessíveis e inacessíveis, dadas por f_a e $1 - f_a$. Basta, para isso, ajustar a curva de $(F_0 - F)$ em função da concentração de supressor, assumindo que $f_a = F_{0a}/F_0$. O resultado aparece na Fig. 8.15. De acordo com o ajuste, podemos concluir que cerca de 90% dos resíduos de triptofano estão acessíveis à dibucaína e que a constante de Stern-Volmer é $7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Comparando este valor com os valores encontrados para a constante de associação nas figuras 8.8 e 8.9, observamos que a constante de Stern-Volmer é de uma a duas ordens de grandeza maior que a constante de associação da Dib à membrana.

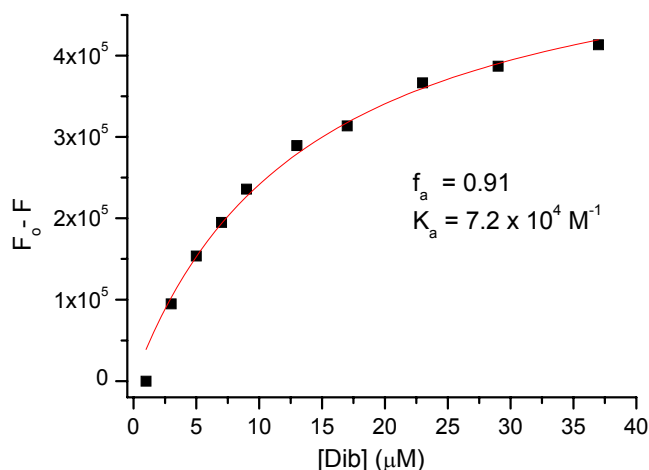


Figura 8.15 – Variação da fluorescência em 330 nm ($F_0 - F$) em função da concentração da Dib. A curva contínua é o ajuste da equação (5.23) aos dados experimentais. Com os parâmetros $f_a = 0.91$ e $K_a = 7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

8.4.3

Fluorescência Resolvida no Tempo

Suspensões de Na,K-ATPase em membrana, em pH 7.4, com concentração fixa de $28 \mu\text{g/ml}$ em proteína, foram tituladas com Dib em concentrações crescentes na faixa de $1 \mu\text{M}$ a $37 \mu\text{M}$. Curvas de decaimento de fluorescência foram registradas para membrana pura, Dib pura e membrana titulada com Dib. As curvas de decaimento de fluorescência de triptofano (excitação em 283 nm) com emissão em quatro comprimentos de onda distintos para suspensão de membrana pura aparecem na Fig. 8.16 e os ajustes nas Tabelas 8.6 e 8.7.

Os resultados para as amplitudes relativas (f_i) das Tabelas 8.6 e 8.7 indicam que em 320 nm, comprimento de onda associado ao interior hidrofóbico da membrana, existe predominância de tempos de vida τ_1 e τ_2 , em torno de 0.8 e 3.0 ns, respectivamente. Já em 365 nm, comprimento de onda associado à região hidrofílica da proteína, existe predominância dos tempos de vida τ_2 e τ_3 , em torno de 3.0 e 7.5 ns, respectivamente.

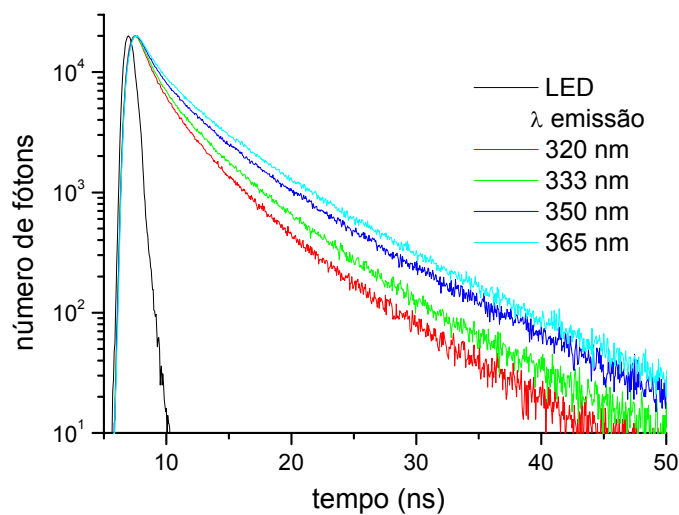


Figura 8.16 - Curvas de decaimento de fluorescência do Triptofano (excitação em 283 nm) de Na,K-ATPase em membrana, com emissão em quatro comprimentos de onda distintos.

Tabela 8.6 - Resultados da análise global tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência do triptofano em membrana com excitação em 283 nm e emissão em comprimentos de onda distintos.

τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
0.70	2.85	7.33	1.3

$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	α_3 (10^{-2})	f_3 (%)	χ^2
320	6.81	27.7	3.18	52.9	0.45	19.3	1.50
333	5.92	22.0	3.20	48.5	0.75	29.5	1.20
350	5.09	16.1	3.02	38.9	1.36	45.0	0.90
365	4.16	12.0	3.00	35.3	1.74	52.7	1.40

Tabela 8.7 - Resultados da análise global tetra-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência do triptofano em membrana com excitação em 283 nm e emissão em quatro comprimentos de onda distintos.

τ_0 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
0.11	0.92	3.21	7.59	1.04

λ (NM)	α_0 (10^{-2})	f_0 (%)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	α_3 (10^{-2})	f_3 (%)	χ^2
320	10.6	6.2	5.29	28.3	2.66	49.7	0.36	15.8	0.99
333	8.48	4.5	4.81	23.5	2.72	46.4	0.64	25.6	1.09
350	6.93	3.1	4.27	17.7	2.63	38.0	1.20	41.0	0.95
365	4.47	1.8	3.88	14.7	2.61	34.6	1.56	48.9	1.12

As curvas de decaimento de fluorescência do triptofano, com a excitação em 283 nm e emissão em 330 nm, para as soluções de membrana em concentração fixa de 28 $\mu\text{g/ml}$ tituladas com Dib em concentrações crescentes na faixa de 1 μM a 37 μM aparecem na Fig. 8.17 e os parâmetros dos ajustes com três exponenciais, nas Tabelas 8.8 e 8.9.

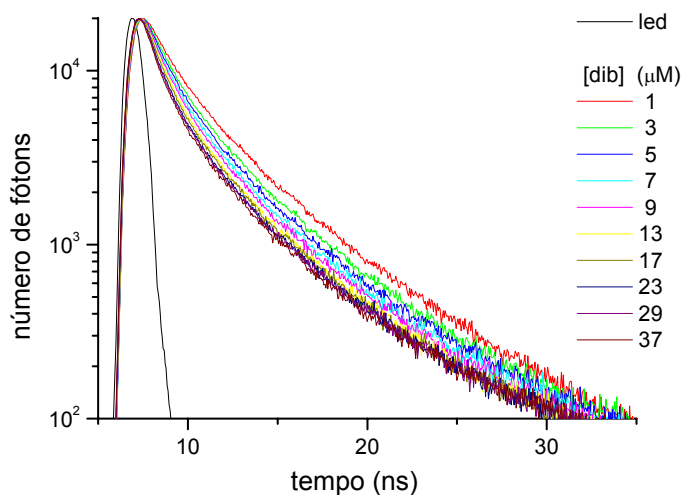


Figura 8.17 – Curvas de decaimento de fluorescência do triptofano, com excitação em 283 nm e emissão em 330 nm, para Na,K-ATPase em membrana, em concentração fixa de 28 $\mu\text{g/ml}$ ([trp]~4 μM), titulada com Dib em concentrações crescentes na faixa de 1 μM a 37 μM em pH 7.4.

Tabela 8.8 – Resultados da análise individual tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência, com excitação em 283 nm e emissão em 330 nm, do sistema de triptofanos da Na,K-ATPase em membrana titulada com Dib.

$[Dib]$ (μM)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
1	0.68	2.61	6.68	1.20
3	0.72	2.73	7.25	1.21
5	0.57	2.40	6.86	1.15
7	0.57	2.40	6.99	1.26
9	0.56	2.15	6.34	1.25
13	0.41	1.82	5.71	1.23
17	0.33	1.57	5.12	1.33
23	0.30	1.62	5.38	1.34
29	0.36	1.85	5.84	1.23
37	0.27	1.60	5.30	1.31

Tabela 8.9 – Resultados da análise individual tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência, com excitação em 283 nm e emissão em 330 nm, do sistema de triptofanos da Na,K-ATPase em membrana titulada com Dib.

$[Dib]$ (μM)	τ_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (10^{-2})	f_2 (%)	τ_3 (10^{-4})	f_3 (%)	χ^2
1	3.92	12.7	3.82	47.5	1.25	39.7	1.20
3	4.92	18.5	3.66	51.7	0.79	29.8	1.21
5	5.48	16.9	3.95	51.3	0.85	31.8	1.15
7	5.89	19.0	3.81	51.6	0.74	29.3	1.26
9	5.88	18.9	3.85	47.8	0.90	33.2	1.25
13	6.99	17.8	4.06	45.43	1.05	36.8	1.23
17	7.95	16.1	4.32	42.21	1.31	41.7	1.33
23	9.82	18.8	4.05	42.48	1.11	38.64	1.34
29	9.62	22.5	3.62	43.46	0.90	34.01	1.23
37	12.15	21.3	3.86	41.14	1.06	37.57	1.31

A Fig. 8.18, abaixo, apresenta o gráfico dos tempos de vida τ_1 , τ_2 e τ_3 em função da concentração de Dib. Como podemos observar, há uma tendência de diminuição para todos os três tempos de vida τ_1 , τ_2 e τ_3 . Isto sugere que a supressão de fluorescência observada na Fig. 8.12 é dinâmica, ou colisional. Com o objetivo de comparar, mesmo que em ordem de grandeza, a constante de

supressão da fluorescência estacionária (Fig. 8.15) com a constante de supressão obtida através da fluorescência resolvida no tempo, fizemos uso da equação de Stern-Volmer (Eq. 2.27) considerando os tempos de vida na ausência e na presença do supressor. O resultado aparece na Fig. 8.19.

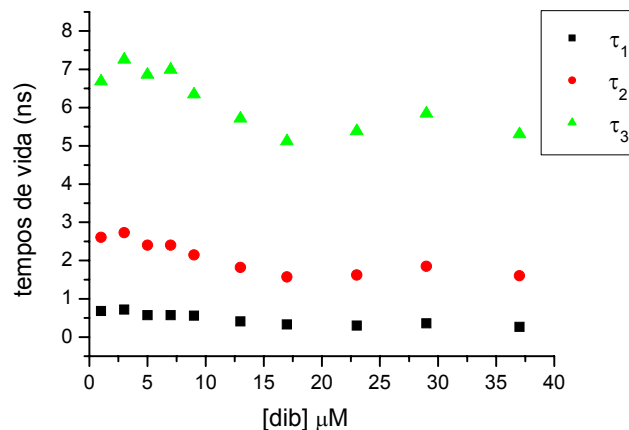


Figura 8.18 – Tempos de vida de fluorescência da Tabela 8.8 em função da concentração de Dib.

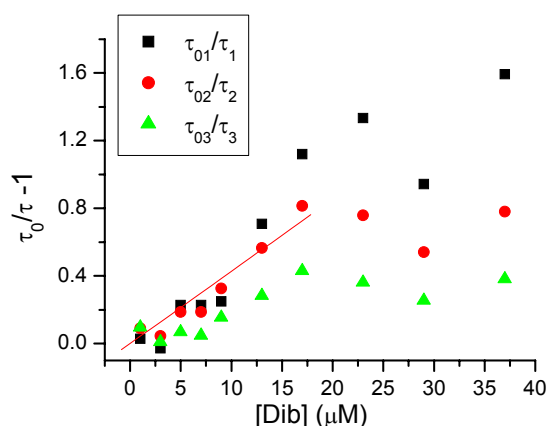


Figura 8.19 – Fração entre os tempos de vida de fluorescência, τ_0/τ , em função da concentração de Dib. A linha em vermelho é o ajuste linear aos dados experimentais para se obter o valor da constante de supressão em ordem de grandeza.

O valor aproximado para a constante de supressão dinâmica (coeficiente angular da reta na Fig. 8.19) foi de $K_q = 4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, o que é compatível, em ordem de grandeza, com o valor encontrado no ajuste realizado nos resultados de fluorescência estacionária, na Fig. 8.15, $K_a = 7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.