

### **3. Técnicas Experimentais**

O presente trabalho experimental foi desenvolvido basicamente pela aplicação de técnicas espectroscópicas, em particular, de espectroscopia de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo. 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).

#### **3.1. 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 ( $\sim 180$  nm, ultravioleta, a  $\sim 900$  nm, infravermelho). As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por uma frequência ( $\nu$ ) e um comprimento de onda ( $\lambda$ ), 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  $\lambda$  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  $\psi$  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).

### 3.2. 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  $\sigma$  é formado por dois orbitais atômicos  $s$  ou de um orbital atômico  $p$  e um orbital atômico  $s$ . O orbital molecular  $\pi$  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.

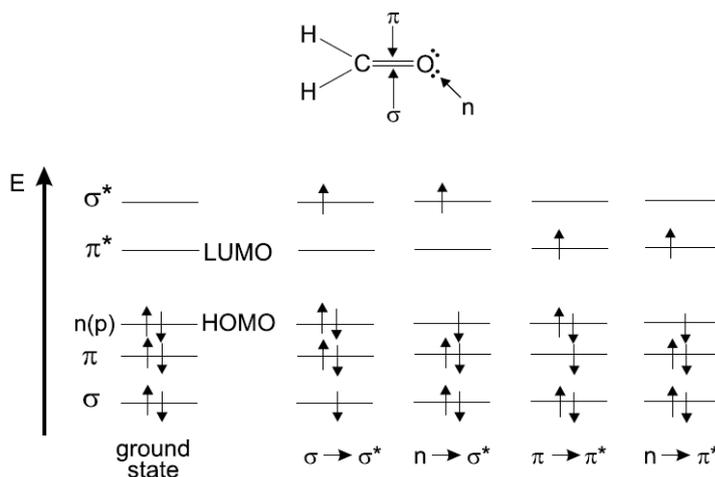


Figura 3.1. Níveis de energia de orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) (Valeur, 2001).

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  $\pi^*$ .

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 ( $< 190 \text{ nm}$ ).

### 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:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad 3.1$$

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  $\varepsilon$  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,

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

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  $\sim 10^{-15} \text{ s}$ ), que é muito rápida comparada com tempos associados a vibrações moleculares ( $10^{-10} - 10^{-12} \text{ s}$ ), 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, 0 – 0, outras transições vibrônicas cujas intensidades dependem da posição relativa e da forma das curvas de energia potencial.

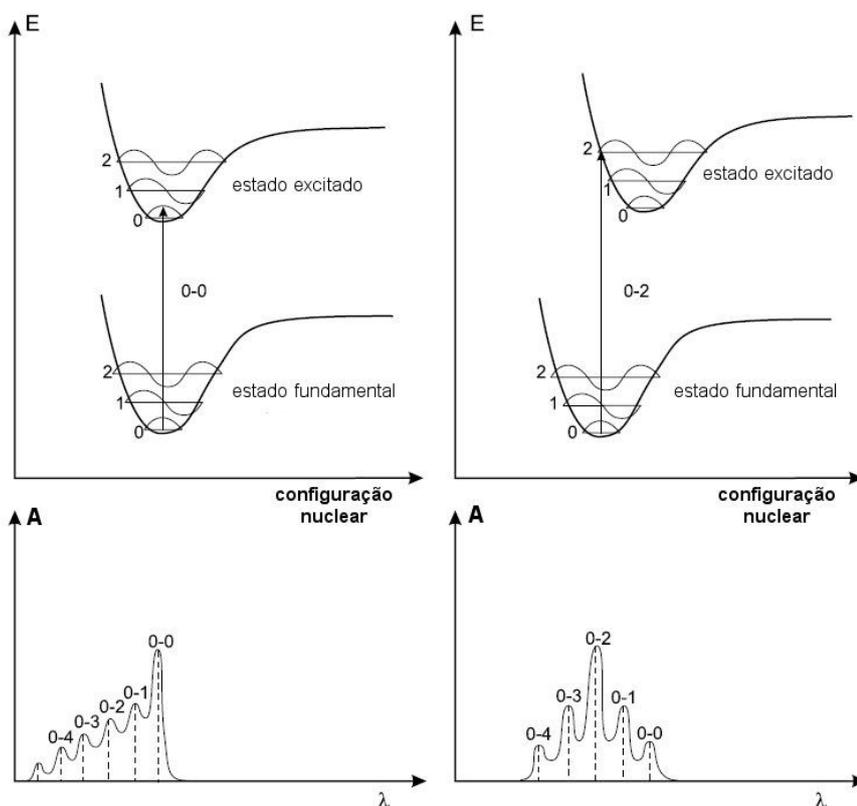


Figura 3.2 Acima: diagrama da energia potencial com transições eletrônicas verticais (princípio de Franck-Condon); abaixo: forma das bandas de absorção (linhas tracejadas, observadas em vapor; linhas contínuas, espectro alargado esperado em solução. (modificado de Valeur, 2001).

### 3.3. 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.

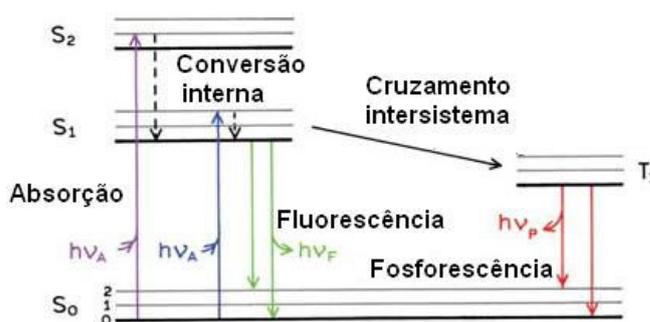


Figura 3.3 Diagrama de Jablonski (modificado de Lakowicz, 2006).

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  $\Phi_F$  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 singlete excitado, S<sub>1</sub>. 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.

### 3.3.1. 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,  $\phi_F$ , é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos. As medidas de  $\phi_F$  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.

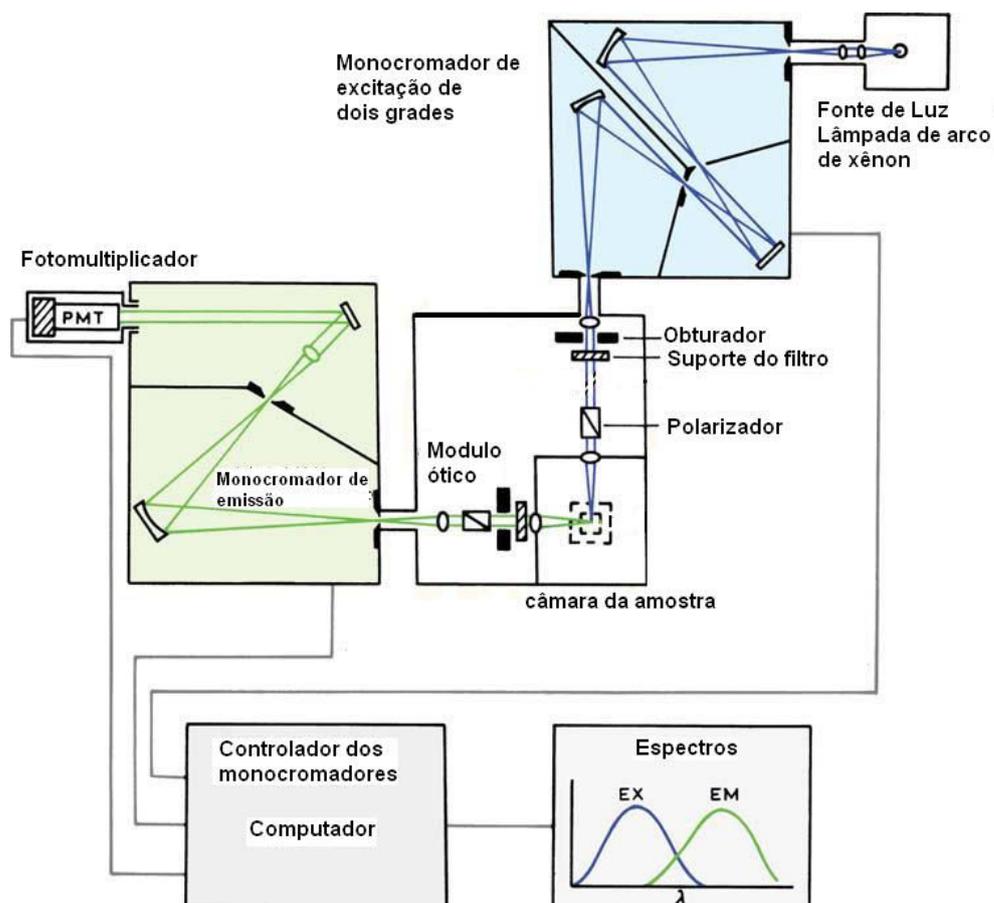


Figura 3. 4 Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro com geometria perpendicular para excitação e emissão (Lakowicz, 2006).

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 singlete 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).

### **3.3.2. Fluorescência resolvida no tempo**

#### **Tempos de vida do estado excitado**

O tempo de vida  $\tau$ , 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 singlete. 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  $\alpha$  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).

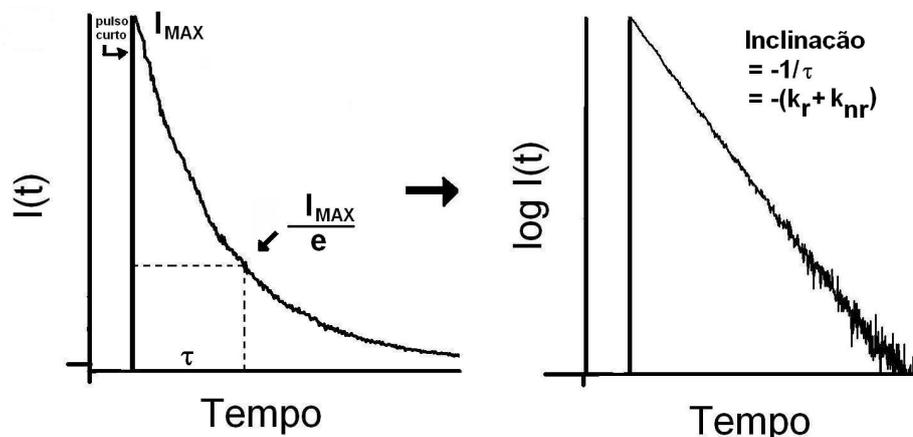


Figura 3.5 Descrição esquemática de uma curva de decaimento de fluorescência utilizando o método de pulsado.

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

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

$$\text{Com } \sum_0^n f_i = 1.$$

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.

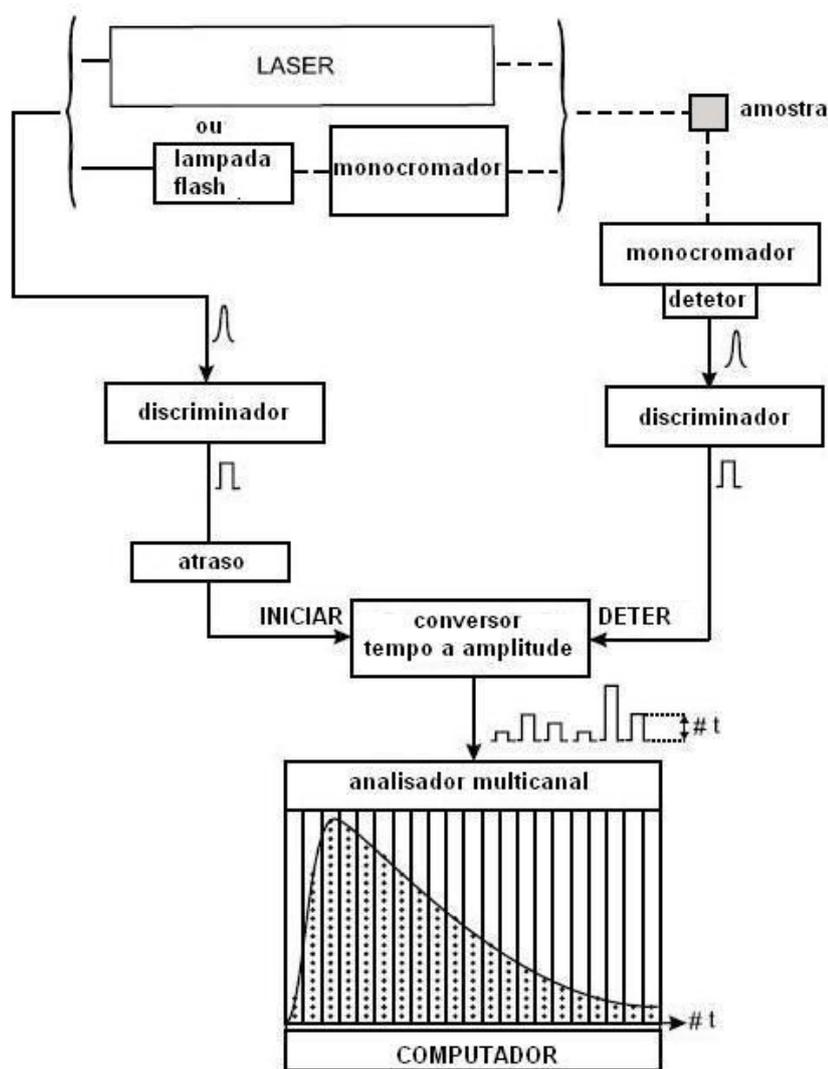


Figura 3.6. Diagrama esquemático de um fluorímetro de contagem de fóton único (Valeur, 2001).

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-deteção, 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).

### 3.3.3. 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, conseqüentemente, 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,  $\tau_0$  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  $\tau_0$ . 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 conseqüentemente 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).

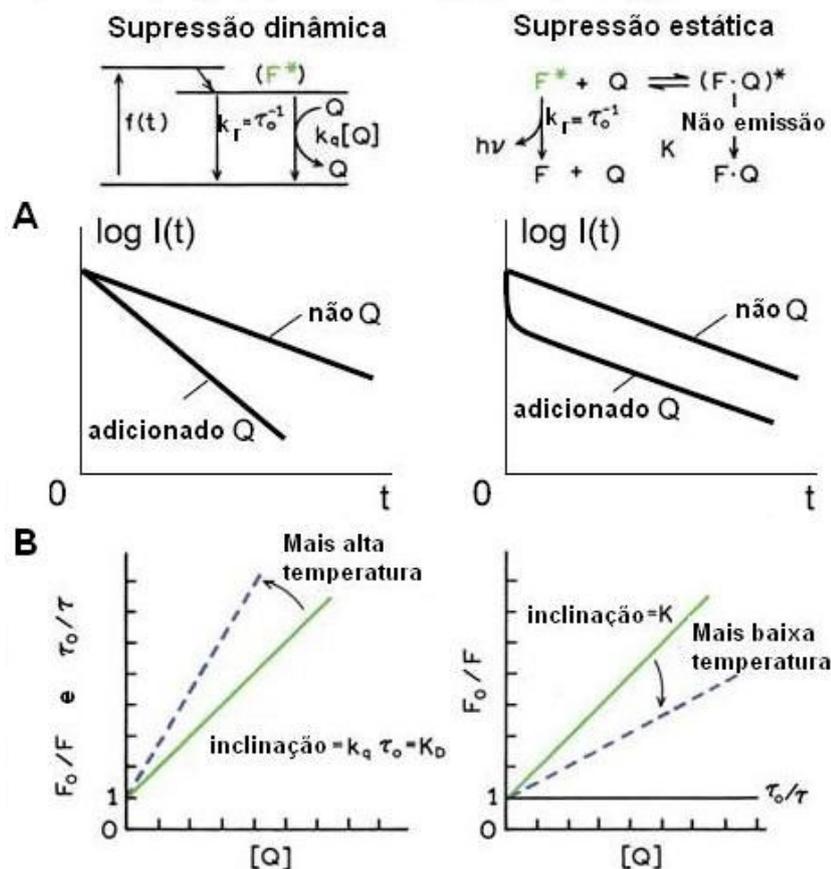


Figura 3.7. Comparação entre supressão dinâmica e estática, mediante medidas de tempo de vida (A) e variações de temperatura (B) (modificado de Lakowicz, 2006).

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.

### 3.3.4. 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.

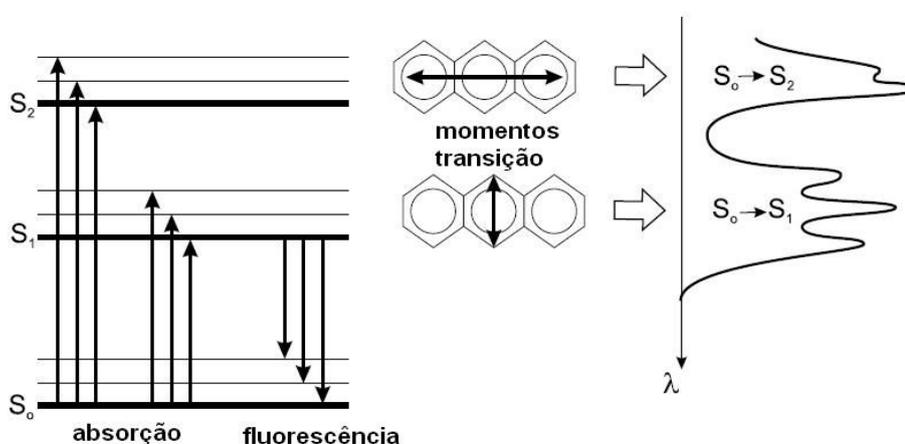


Figura 3.8. Momentos dipolares de transição do antraceno (modificado de Valeur B., 2001).

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 esta 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

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

A excitação das moléculas depende do ângulo  $\theta$  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).

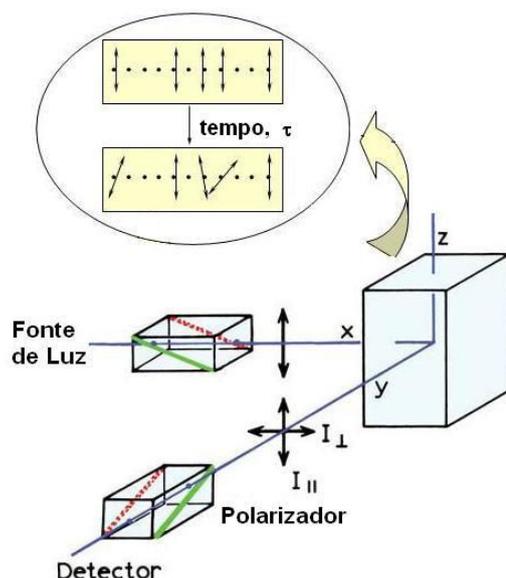


Figura 3.9. Diagrama esquemático para a medida de anisotropia de fluorescência (modificado de Lakowicz, 2006).

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  $\theta$  fosse considerada, a anisotropia teria valores característicos de  $r_0 = 0,4$ . Geralmente estes dipolos não são paralelos, mas têm um ângulo  $\beta$  um 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  $\beta$  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  $I_{\perp}$ .

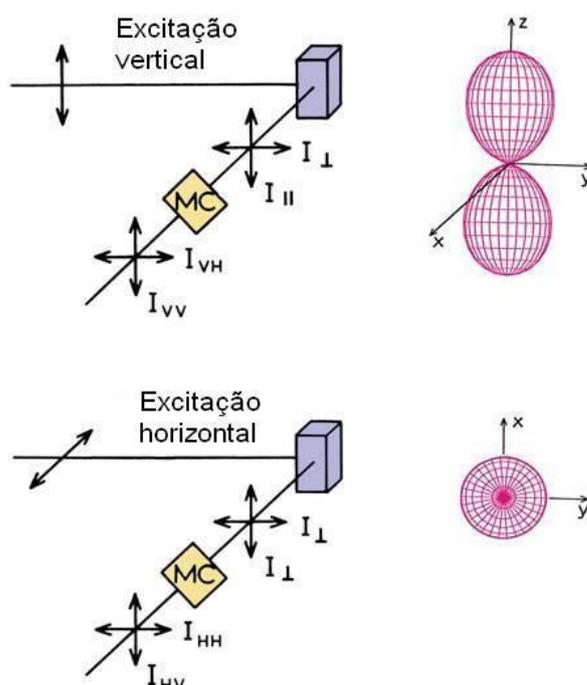


Figura 3.10. Diagrama esquemático para a medida de anisotropia de fluorescência utilizando-se o método de formato-L. MC monocromador. Os gráficos ao lado são as distribuições das populações do estado excitado (modificado de Lakowicz, 2006).

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:

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

Para calcular a razão entre as intensidades  $I_{\parallel} / I_{\perp}$  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  $I_{\parallel}/I_{\perp}$  por:

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

A anisotropia, então, pode ser calculada por:

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

### **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 ( $\parallel$ ) 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  $I_{\parallel}(t)$  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 ( $\parallel$ ) e perpendicular ( $\perp$ ) são dados por:

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

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

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  $\tau_{c_j}$  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:

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

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

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  $\eta$ , aplicando-se a equação de Perrin para decaimentos monoexponenciais:

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

sendo  $r_0$  o valor máximo da anisotropia de fluorescência em ausência de qualquer movimento de rotação,  $\tau$  é o tempo de vida da fluorescência e,  $\tau_c$  o tempo de correlação rotacional do fluoróforo, que é função de  $\eta$ , 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).

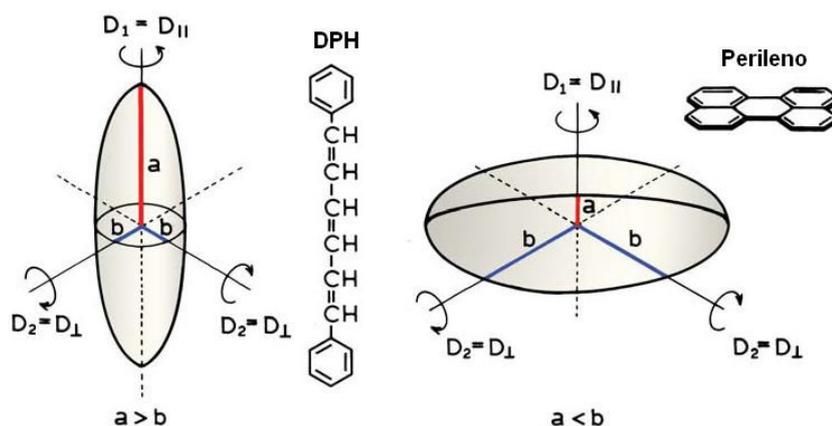


Figura 3.11. Representação geométrica das sondas fluorescentes DPH e perileno, Os coeficientes de difusão rotacional são representados pela letra  $D$  (modificado de Lakowicz, 2006).

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 ( $r_\infty$ ) 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  $r_\infty$  é interpretado como o resultado de uma barreira de energia que impede a difusão rotacional do fluoróforo além de certo ângulo. O parâmetro  $r_\infty$  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  $\tau_c$  nos informa sobre as propriedades cinéticas tais como a viscosidade  $\eta$ . 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).

### 3.4. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica micro analítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. É uma técnica destrutiva. A espectrometria de massa é capaz de fornecer informação sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular e a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas. O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa. O alcance e a utilidade do método de espectrometria de massa são dependentes do processo de ionização. A forma do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado.

O espectrômetro de massa é um instrumento que utiliza um campo magnético ou elétrico para separar íons que se deslocam mais ou menos rapidamente segundo sua relação massa-carga. A Fig. 3.12 mostra os principais componentes dos espectrômetros de massa.

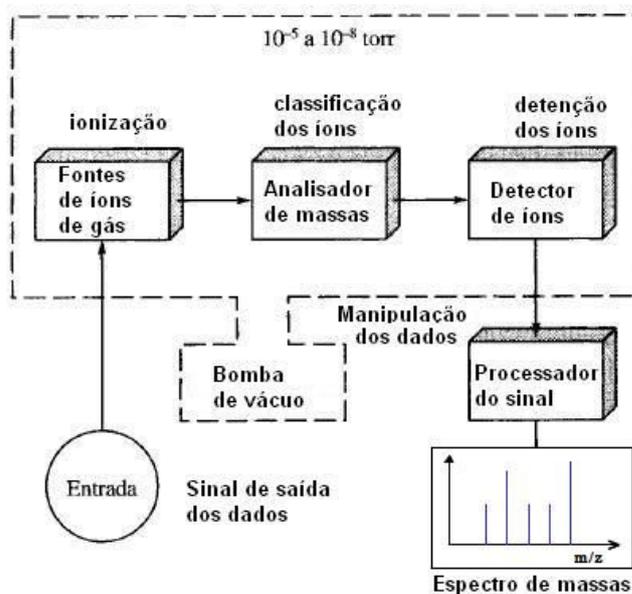


Figura 3.12. Componentes de um espectrômetro de massa (modificado de Skoog et al. 2001).

O objetivo do sistema de entrada é introduzir uma quantidade muito pequena (microgramas) de amostra na fonte de íons, onde os componentes da amostra se convertem em íons gasosos mediante o bombardeio com elétrons, fótons, íons ou moléculas. O sinal de saída da fonte de íons é um fluxo de íons positivos ou negativos gasosos que são acelerados no analisador de massa. A

função do analisador de massa é análoga à de um monocromador de um espectrofotômetro ótico. No primeiro caso, no entanto, a dispersão se realiza em função da relação massa-carga dos íons da amostra, em vez de no comprimento de onda dos fótons. Finalmente o detector recebe os íons, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados num computador. Os espectrômetros de massa requerem um complexo sistema de vácuo para manter uma baixa pressão em todos os componentes, exceto no sistema de processamento do sinal e leitura (Skoog et al, 2001).

Os analisadores não dependem apenas da massa, mas também da aceleração dos íons, por isso os separam de acordo com a relação massa-carga. As três principais características de um analisador são: o limite de massa, a transmissão iônica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais alto de massa que pode ser medido; é geralmente expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária, i.e,  $z = 1$ . A transmissão é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena (Rodrigues, 2003).

Uma variedade de técnicas de ionização é usada para a espectrometria de massa. A maioria das técnicas de ionização excita a molécula neutra da amostra (M) a qual então libera um elétron para formar um radical cátion ( $M^+$ ). Outras técnicas de ionização envolvem reações químicas entre íons e moléculas neutras (M) que produzem a adição de  $H^+$  às moléculas neutras ( $MH^+$ ). Na Fig. 3.14 apresenta-se um resumo geral das técnicas de ionização utilizadas em espectrometria de massa molecular juntamente com algumas características. A tabela da Fig. 3.13 mostra que estas técnicas subdividem-se em dois grupos segundo o estado da amostra: no primeiro caso a amostra já se encontra em fase gasosa e no segundo produz-se dessorção iônica a partir da fase condensada (sólida ou líquida) da amostra.

Tipo Básico	Nome	Agente Ionizante
Fase gasosa	- Impacto de elétrons (EI)	Elétrons energéticos
	- Ionização química (CI)	Íons de um gás reagente
	- Ionização por campo elétrico (FI)	Eletrodo em potencial elétrico alto
	- Luz síncrotron	Fótons
Dessorção	- Dessorção por campo elétrico (FD)	Eletrodo em potencial elétrico alto
	- Ionização por Electrospray (ESI)	Campo elétrico intenso
	- Ionização/dessorção por laser, assistido por uma matriz (MALDI)	Feixe de laser (UV)
	- Dessorção de plasma (PDMS)	Fragmentsos de fissão do $^{252}\text{Cf}$ (MeV)
	- Bombardeamento por átomos rápidos (FAB)	Feixe de átomos energéticos ( $\approx 5$ KeV)
	- Emissão de íons secundários (SIMS)	Feixe de íons energéticos (5-15 KeV)
	- Ionização térmica [thermospray] (TS)	Temperatura alta
	- Impacto de íons pesados (HIMS)	Feixe de íons de aceleradores (MeV)

Figura 3.13. Técnicas de ionização para espectrometria de massa molecular.

Em continuação, se mencionará brevemente o tipo de analisador de massa que se utilizou em nossas medidas de espectrometria de massa, o analisador de massa de tempo de voo.

**O analisador de massa de tempo de voo.** Nestes instrumentos os íons se produzem periodicamente mediante o bombardeio da amostra com pulsos curtos de elétrons, íons secundários ou fótons gerados por laser. Estes pulsos podem ter frequências de 10 a 50 kHz e um tempo de vida de 0.25  $\mu\text{s}$ . Os íons produzidos dessa maneira são acelerados por um campo elétrico, mediante um pulso de  $10^3$  a  $10^4$  V, com a mesma frequência que o pulso de ionização, mas defasado. As partículas aceleradas passam ao tubo analisador de aproximadamente um metro de comprimento e sem campo algum (Fig. 3.14). Devido a que todos os íons que ingressam no tubo têm idealmente a mesma energia cinética, suas velocidades dentro do tubo devem variar inversamente com a raiz quadrada de suas massas, as partículas mais leves chegando ao detector antes do que as mais pesadas. Os tempos de voo habituais são de 1 a 30  $\mu\text{s}$ .

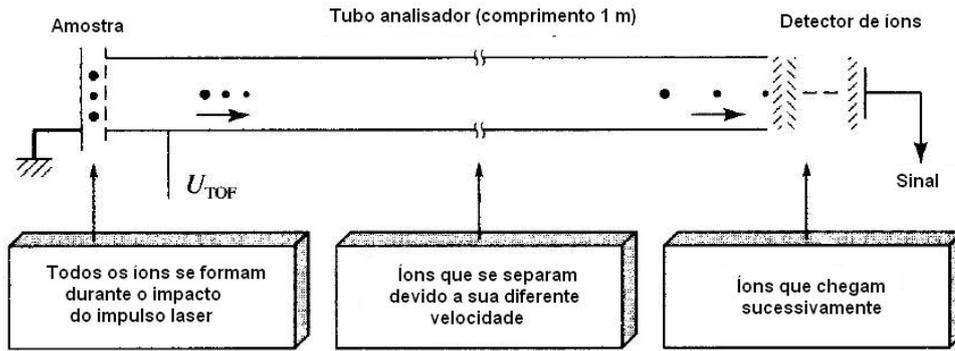


Figura 3.14. Diagrama de um espectrômetro de massa de tempo de vôo. Um feixe de íons produzido por um laser é acelerado em direção do tubo analisador, onde se produz a separação (modificado de Skoog et al. 2001).