3.
Técnicas Experimentais

Muito do nosso atual conhecimento acerca da estrutura da matéria é baseado em investigações espectroscópicas. Informações sobre a estrutura molecular e sobre a interação de moléculas com seus vizinhos podem ser derivadas de diversos modos a partir dos espectros de emissão e absorção gerados quando a radiação interage com os átomos ou moléculas da matéria. Apresentamos aqui uma breve descrição sobre os processos de absorção e de fluorescência sob condições foto-estacionárias (excitação com uma fonte contínua).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

3.1
Conceitos básicos

A luz, em seu aspecto ondulatório, é uma onda eletromagnética, que consiste de campo elétrico e magnético mutuamente perpendiculares que oscilam senoidalmente. Quando uma onda deste tipo encontra uma molécula, ela pode ser espalhada (sua direção de propagação muda) ou absorvida (sua energia é transferida à molécula). A probabilidade relativa de cada processo é uma propriedade da molécula particular encontrada. Se a energia eletromagnética da luz é absorvida, a molécula passa a um estado excitado. Uma molécula ou sua parte que pode ser excitada por absorção é chamada cromóforo. Esta energia de excitação é usualmente convertida em calor (energia cinética) pela colisão da molécula excitada com outra molécula (molécula do solvente). Em algumas moléculas é re-emitida em fluorescência. Em ambos casos, a intensidade da luz transmitida por um conjunto de cromóforos é menor que a intensidade da luz incidente.

Uma molécula possui um conjunto de quantidades discretas (quanta) de energia, descritas pelas leis da mecânica quântica. 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; sobre estes estão superpostos níveis vibracionais,

que indicam os vários modos de vibração da molécula. Há ainda subdivisões menores chamados níveis rotacionais. O nível eletrônico mais baixo é chamado estado fundamental e os outros são os estados excitados (Freifelder, 1982).

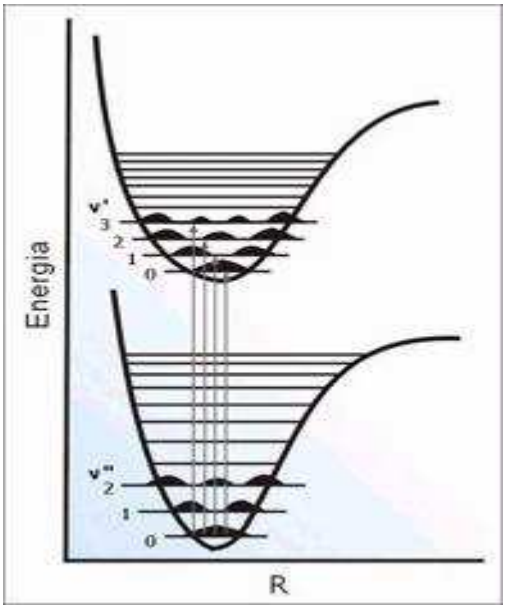

Figure 3.1 Esquemas para as probabilidades de transição de uma molécula envolvendo os estados vibracionais de dois estados eletrônicos, sendo R a distância internuclear. O mínimo de energia corresponde à distância de equilíbrio em cada estado eletrônico (www.chemkeys.com).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

Espectro molecular

Podemos expressar a energia total de excitação de uma molécula, com boa aproximação, como a soma das energias de excitações parciais dos níveis eletrônico, vibracional e rotacional mencionadas acima:

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (3),$$

onde os subscritos *el*, *vib* e *rot* significam eletrônica, vibracional e rotacional, respectivamente.

As Figuras 3.1 e 3. ilustram os níveis vibracionais e rotacionais em dois estados eletrônicos de uma molécula, I e II, e as possíveis transições entre eles.

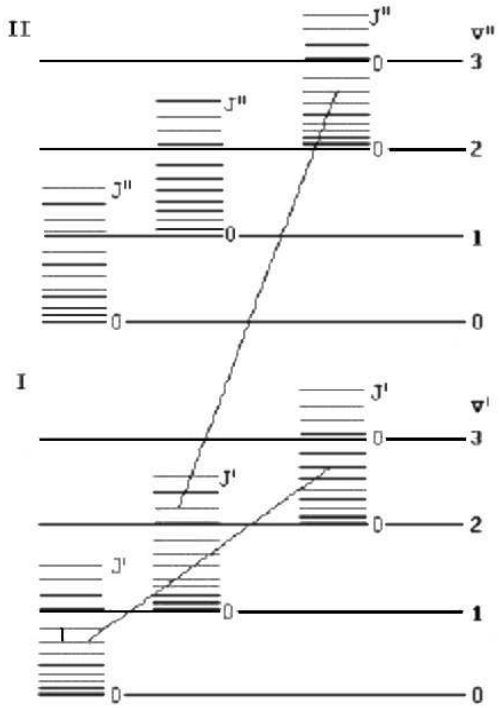

Figure 3.2 Níveis vibracionais (v) e rotacionais (J) de dois estados eletrônicos de uma molécula denotados por **I** e **II**. As três setas indicam (da esquerda para a direita) transições rotacional, vibracional e eletrônica da molécula (Alcantara Jr., 2002).

As transições obedecem a regras de seleção que satisfazem o princípio de Franck-Condon e podemos distinguir entre três tipos de espectros ópticos:

Espectros rotacionais: são transições entre os níveis rotacionais de um dado nível vibracional em um estado eletrônico particular. Somente o número quântico rotacional J muda nessas transições. Estes espectros estão na região de microondas ou no infravermelho distante. Eles consistem tipicamente de um grande número de linhas espectrais aproximadamente eqüidistantes. Os espectros rotacionais também podem ser observados por meio de espectroscopia Raman.

Espectros rotacionais-vibracionais consistem de transições dos níveis rotacionais de um certo estado vibracional para os níveis rotacionais de um outro estado vibracional no mesmo termo eletrônico. O estado de excitação eletrônica, assim, permanece inalterado. Mudam os números quânticos J e v, onde v caracteriza os níveis vibracionais quantizados. Estes espectros se encontram na região do infravermelho. Eles consistem de um número de "bandas" que são grupos de linhas estreitamente espaçadas, denominadas de linhas de banda. Eles

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

podem ser observados com espectroscopia Raman, assim como espectroscopia infravermelha.

Espectros eletrônicos consistem de transições entre os níveis rotacionais dos vários níveis vibracionais de um estado eletrônico e os níveis rotacionais e vibracionais de um outro estado eletrônico. Isto é chamado de sistemas de bandas. Ele contém todas as bandas vibracionais da transição eletrônica em observação, cada uma das quais com sua estrutura rotacional. Em geral todos três números quânticos mudam nessas transições: J e v, e mais aquele que caracteriza o estado eletrônico (n, l, m_l ou j e m_j) (Alcantara, 2002).

3.2
Espectroscopia de Absorção

O intervalo de energia entre os estados rotacionais-vibracionais mais baixos do estado eletrônico fundamental e do primeiro estado eletrônico de uma molécula simples é, tipicamente, de 3,5 eV (~80 kcal/mol). Esta energia é muito maior do que a energia térmica à temperatura ambiente, de 0,025 eV (0,6 kcal/mol). Conseqüentemente, para toda finalidade prática, na ausência de radiação que possa excitar uma transição, todas as moléculas numa solução estão no estado eletrônico fundamental. O intervalo de energia entre níveis vibracionais é da ordem de 0,4 eV (~10 kcal/mol). Esta energia também é maior que a energia térmica. Assim, ao menos aproximadamente, podemos considerar que somente o nível vibracional mais baixo está apreciavelmente povoado. Entretanto, diferenças entre energias rotacionais são somente de 0,04 eV (1 kcal/mol) ou menos e, conseqüentemente, muitos níveis rotacionais são povoados (Cantor e Schimmel, 1998).

A absorção de radiação visível ou ultravioleta (UV) próximo corresponde à excitação dos elétrons mais externos. Existem três tipos de transição eletrônica que podem ser considerados:

a. Transições envolvendo elétrons n, σ e π

Absorção de radiação visível e ultravioleta em moléculas orgânicas é restrita a certos grupos funcionais da molécula que contêm elétrons de valência de baixa energia de excitação.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

Transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Um elétron num orbital ligante σ é excitado ao correspondente orbital antiligante σ^*. A energia requerida é grande. Por exemplo, o metano (que tem somente ligações C-H e pode somente se submeter a transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$) mostra um máximo de absorbância em 125 nm. O pico de absorção, devido a estas transições, não é visto no espectro típico do ultravioleta e visível (200-700 nm).

Transições $n \rightarrow \sigma^*$

Compostos saturados contendo átomos com pares solitários (elétrons não ligantes) são capazes de transições $n \rightarrow \sigma^*$. Estas transições usualmente necessitam menos energia que as transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Podem ser iniciadas pela luz cujos comprimentos de ondas estão no intervalo 150-250 nm. O número de grupos funcionais orgânicos com picos $n \rightarrow \sigma^*$ na região ultravioleta é pequeno.

Transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$

A maioria da espectroscopia de absorção de compostos orgânicos é baseada em transições de elétrons n ou π para o estado excitado π^*. Isto se deve a que os picos de absorção para estas transições caem numa região experimentalmente conveniente do espectro (200 – 700 nm). Estas transições necessitam um grupo insaturado na molécula para fornecer os elétrons π. As absorções molares de transições $n \rightarrow \pi^*$ são relativamente baixas e estão em intervalos de 10 a 100 $M^{-1}cm^{-1}$. Transições $\pi \rightarrow \pi^*$ normalmente dão absorções molares entre 10^3 a 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$.

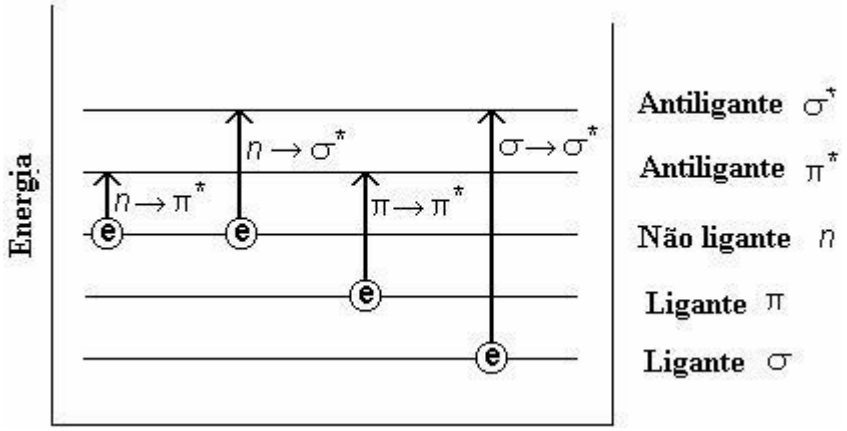

Figura 3.3 Esquema de energias correspondentes a transições eletrônicas (SHU - School of Science and Mathematics: www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

O solvente no qual os cromóforos são dissolvidos têm também um efeito no espectro das espécies. Os picos resultantes das transições $n \rightarrow \pi^*$ são deslocados a comprimentos de ondas mais curtos ("blue shift") com o incremento da polaridade do solvente. Isto se origina da solvatação incrementada do par solitário, que abaixa a energia do orbital n. Freqüentemente, mas não sempre, o reverso ("red shift") é visto para transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Isto é causado por forças atrativas de polarização entre o solvente e o cromóforo, que abaixam os níveis de energia dos estados excitados e não excitados. Este efeito é maior para o estado excitado, e assim a diferença de energia entre o estado não excitado e o excitado é fortemente reduzida - tendo por resultado um "red shift" pequeno. Este efeito também influencia transições $n \rightarrow \pi^*$ mas é sobrepujado pelo "blue shift" resultante da solvatação dos pares solitários.

b. Transições envolvendo elétrons por transferência de carga.

Muitas espécies orgânicas mostram absorção por transferência de carga e são chamados complexos de transferência de carga. Para um complexo demonstrar comportamento de transferência de carga, um de seus componentes deve ter propriedades de doador e o outro aceptor de elétrons. Absorção de radiação então envolve a transferência de um elétron do doador a um orbital associado a um aceptor.

Absorções molares associadas a transferência de carga são grandes (maiores que 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$) (S.H.U. School of Science and Mathematics: www.shu.ac.uk/ schools/sci/chem/tutorials/).

Em condições normais de temperatura (ambiente ou próxima dela) as moléculas estão no estado vibracional de menor energia do estado fundamental eletrônico. Deste modo, a absorção do fóton de radiação irá excitar as moléculas para um estado eletrônico maior e para os diversos níveis vibracionais e rotacionais deste estado eletrônico. O espectro de absorção será, portanto, composto por um conjunto de bandas, associadas às diversas transições vibracionais e rotacionais possíveis dos dois estados eletrônicos envolvidos na transição, e dependerá das regras de seleção espectroscópicas válidas para cada caso. Já que o espaçamento entre os estados rotacionais é muito pequeno, normalmente estas transições não aparecem em forma de bandas resolvidas.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

3.2.1
Intensidade de absorção

Se a luz da intensidade I_0 passa através de uma substância de espessura b (em cm) e concentração molar c (M ou mol.L^{-1}), a intensidade I da luz transmitida obedece à lei de Beer-Lambert:

$$I = I_o \cdot 10^{-\varepsilon b c} \quad \text{ou} \quad \log(I_o / I) = \varepsilon c b$$

Onde ε é o coeficiente de absorção molar. Os dados de absorção são reportados como transmitância ($T = I / I_o \cdot 100\%$) ou, mais usualmente, como a absorbância, $A = \log(I_o / I)$. Quando b = 1 cm, A é chamado de densidade óptica, OD_λ. A densidade óptica é mais conveniente porque é igual a ε c.

O coeficiente de absorção molar é característico de uma substância em condições definidas de comprimento de onda, solvente e temperatura. Tem unidades $M^{-1}cm^{-1}$.

A lei de Beer-Lambert tende a sofrer limitações devidas a certos desvios.

Desvios químicos**,** que são resultados de alterações químicas associadas com a mudança de concentração, já que em soluções relativamente concentradas (> 0,01 M) a distância média entre as moléculas diminui e as interações entre as mesmas começam a afetar as distribuições de cargas. Isto pode alterar a habilidade das espécies absorverem num dado comprimento de onda e em alguns casos, quando c é alto, ε aparece ser uma função de c. Muitas moléculas, em algumas soluções, formam dímeros ou polímeros maiores à medida que a concentração aumenta, ocasionando certos problemas já que o espectro dos dímeros pode diferir daquele dos monômeros. Outro efeito em concentrações altas é a agregação; isto conduz freqüentemente ao espalhamento da luz, decrescendo a quantidade de luz transmitida. Outra causa do desvio da lei de Beer é a desnaturação de proteínas em baixas concentrações.

Desvios e limitações instrumentais**:** dependem do equipamento e da forma como a medição é feita.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

3.2.2
Espectrofotômetro

Um espectrofotômetro é formado por um conjunto de componentes do seguinte tipo:

Fontes de radiação.

São lâmpadas que emitem feixes de radiação eletromagnética na região do espectro denominado óptico. Uma fonte ideal é aquela que apresenta uma intensidade aproximadamente constante em toda faixa de comprimento de onda de operação, com pouco ruído e longo período de estabilidade. As fontes mais comuns nos espectrofotômetros que operam na região espectral do UV-Visível são: as lâmpadas de deutério (tempo de vida: 1 000 h) para excitação na região do ultravioleta ($\lambda < 350$ nm) e de tungstênio ou tungstênio-halogênio ($\lambda > 350$ nm; tempo de vida 10 000 h) para excitação na região do visível e infravermelho próximo.

Componentes ópticos.

Dependendo do tipo de componentes ópticos, os espectrofotômetros são classificados em: dispersivos e interferométricos. Elementos dispersivos são aqueles que difratam a luz, como os prismas e grades de difração. Elementos interferométricos são aqueles que produzem processos de interferência da radiação eletromagnética, como por exemplo o interferômetro de Michelson.

No caso dos espectrofotômetros de absorção na região Ultravioleta - Visível - Infravermelho próximo, os instrumentos são sempre dispersivos e normalmente são grades de difração. A grade é um componente óptico que contém uma série de ranhuras, que são os elementos responsáveis pela difração da radiação eletromagnética baseada na lei de difração de Bragg. Dependendo do número de ranhuras por milímetro, haverá maior ou menor resolução dos espectros.

Detectores

Duas grandes classes de espectrofotômetros estão disponíveis: os que utilizam como sistema de detecção um tubo fotomultiplicador e os que utilizam arranjo de diodos.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

Um tubo fotomultiplicador é constituído por um tubo de vidro ou de quartzo sob vácuo, no qual existe um conjunto de placas metálicas interligadas. Quando a radiação incide sobre estas placas metálicas elas induzem uma corrente elétrica, segundo a teoria do efeito fotoelétrico proposto por Einstein. A qualidade do material do catodo determina a sensibilidade espectral do tubo.

O segundo tipo de detector comum mais usado é o arranjo de diodos. Um arranjo de diodos consiste em uma série de fotodiodos detectores posicionados lado a lado num cristal de silício de modo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto deste arranjo, e conseqüentemente um detector. Este detector permite que a absorbância de uma amostra em todos os comprimentos de onda seja determinada de modo simultâneo. Outro fator importante para estes detectores é que têm sensibilidades diferentes para diferentes comprimento de onda, de modo que é necessário que se especifique em que região do espectro se vai trabalhar, mas a resolução espectral depende do tipo e do número de diodos que compõe o arranjo (de Andrade e Custodio, 1996).

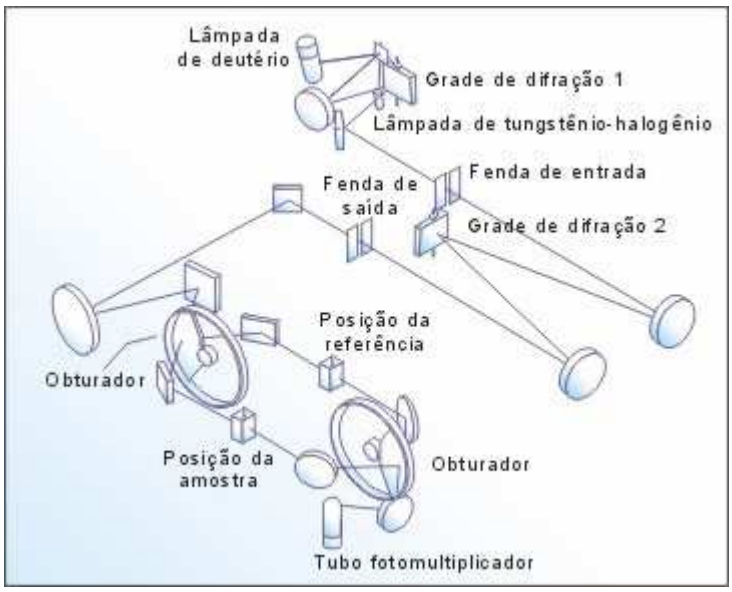

Figura 3.4 Esquema óptico de um espectrofotômetro de duplo feixe (www.chemkeys.com).

Os parâmetros geralmente medidos na espectroscopia de absorção são a densidade óptica ou ε e o comprimento de onda correspondente ao pico de absorção chamado λ_{MAX}, e é neste comprimento que ε é geralmente medido.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

Algumas das bandas de absorção consistem de picos múltiplos e os comprimentos de onda correspondentes aos picos que têm coeficientes de absorção molar menores são freqüentemente registrados. Por exemplo:

Aminoácido	**$\lambda_{MAX\,(nm)}$**	**$10^{-3}\,\varepsilon\,(M^{-1}\,cm^{-1})$**
Triptofano	280	5,6
	219	47
Tirosina	274	1,4
	222	8,0
	193	48
Fenilalanina	257	0,2
	206	9,3
	188	60
Histidina	211	5,9
Cisteína	250	0,3

O espectro de absorção dum cromóforo é principalmente determinado pela estrutura química da molécula. Entretanto, um número grande de fatores ambientais produz mudanças detectáveis em λ_{MAX} e ε. As características gerais destes efeitos ambientais são os seguintes:

Efeitos de pH. O pH do solvente determina o estado de ionização dos cromóforos ionizáveis.

Efeitos de polaridade. Para cromóforos polares, o valor de λ_{MAX} para transições $n \rightarrow \pi*$ ocorre em comprimentos de onda mais curtos em solventes polares (água, álcoois) do que em solventes não polares. Esta mudança dá-se em direção a comprimentos de onda maiores para transições $\pi \rightarrow \pi*$. Esta última transição é a mais comum para moléculas biológicas. Exceções são os aminoácidos que são geralmente usados em análises de conformação (Freifelder, 1982).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

3.3
Espectroscopia de Emissão

A fluorescência é um tipo de luminescência que consiste no processo de emissão envolvendo estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin (estados eletrônicos singletes). Tais transições na mecânica quântica são "permitidas" e as taxas emissão são tipicamente perto de 10^8 seg^{-1}. Estas altas taxas de emissão dão como resultado um tempo de meia-vida de fluorescência perto a 10^{-8} s ou 10 ns. Certas substâncias que apresentam fluorescência significativa, como por exemplo a antroil-ouabaína (Figura 2.11), geralmente têm elétrons deslocalizados presentes nas ligações duplas conjugadas.

O diagrama sugerido por A. Jablonski para os níveis de energia ilustra o processo de absorção e emissão de luz (Figura 3.5).

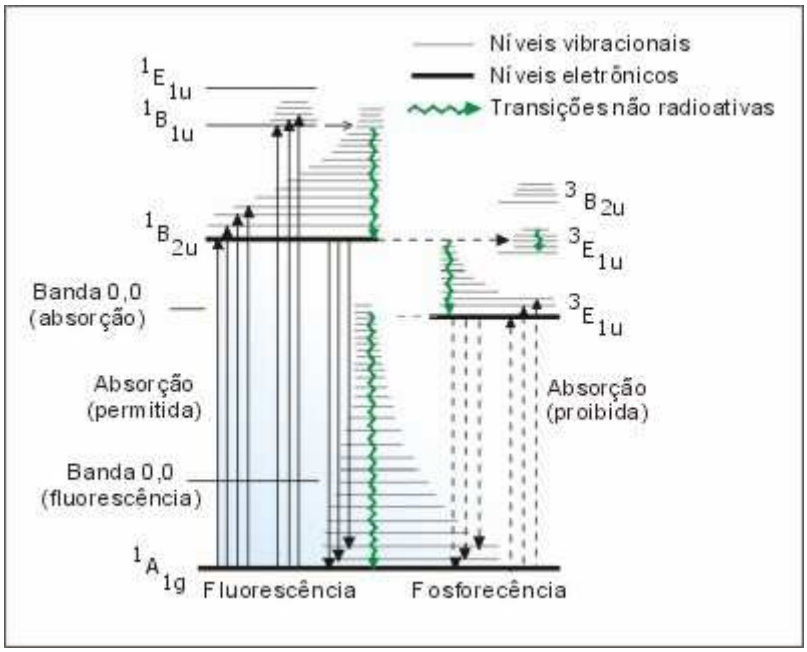

Figura 3.5 Diagrama de Jablonski para o sistema de níveis de energia para a molécula de benzeno (www.chemkeys.com).

Na Figura 3.5, os diferentes tipos de processos para a desativação molecular dos estados eletrônicos e vibracionais excitados, estão representados por: transições radiativas permitidas por multiplicidade de spin (setas contínuas, →); transições radiativas proibidas por multiplicidade de spin (setas tracejadas, ⇢); as transições não radiativas (setas onduladas, ⇝), como no processo de relaxação

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

vibracional, que ocorrem dentro de um mesmo nível eletrônico e envolvem a desativação por liberação de calor através dos modos normais de vibração. Além destas transições outras podem ocorrer na molécula como: cruzamento intersistemas, que representa transições não radiativas, isoenergéticas, envolvendo estados de multiplicidades de spin diferentes; conversão interna, associada a transições isoenergéticas que ocorrem em 10^{-12} s envolvendo estados de mesma multiplicidade de spin (Atvars e Martelli, 2002).

No processo de absorção de luz há uma transição eletrônica que ocorre em 10^{-15} s, tempo demasiado curto para um deslocamento significativo do núcleo (princípio Franck-Condon); isto é devido a que a massa de um núcleo é muito maior do que a do elétron. Por isso é que na Figura 3.5 as transições entre os vários níveis eletrônicos são verticais.

Uma diferença entre os espectros de absorção e emissão é que o espectro de absorção reflete os níveis vibracionais dos estados excitados eletronicamente e o espectro de emissão reflete os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental (Lakowicz, 1983).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

3.3.1 Espectrofluorímetros

Existem duas classes de espectrofluorímetros: os fotoestacionários e os pulsados. Os espectrofluorímetros que operam em condições fotoestacionárias excitam as espécies em modo contínuo, obtendo-se os espectros eletrônicos de emissão e de excitação. Os espectrofluorímetros pulsados excitam as espécies por meio de pulsos de radiação, obtendo-se os tempos de decaimento do estado eletrônico excitado e os espectros resolvidos no tempo.

O espectrofluorímetro utilizado em nosso trabalho é um espectrofluorímetro fotoestacionário, já que tem uma fonte de excitação que emite de modo contínuo e conseqüentemente origina uma população constante de espécies no estado eletrônico excitado.

Os espectrofluorímetros estacionários

Um espectrofluorímetro é geralmente composto por dois monocromadores, um de excitação e um de emissão, um sistema de excitação e um sistema de detecção.

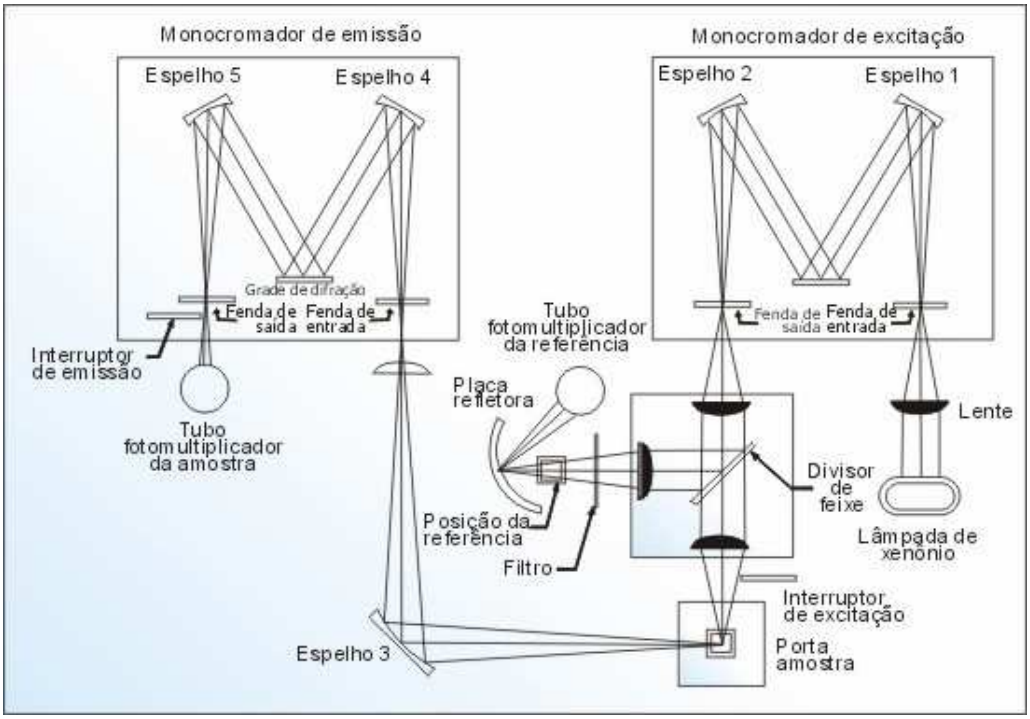

Figura 3.6 Esquema óptico de um espectrofluorímetro modelo SLM-500 Aminco (www.chemkeys.com).

Um espectrofluorímetro se diferencia de um espectrofotômetro nos seguintes elementos :

Monocromador: composto por um arranjo óptico no qual uma fonte de luz policromática incidente se descompõe em seus diferentes comprimentos de onda através de uma grade de difração. Os comprimentos de onda para a excitação da amostra são selecionados pelo monocromador de excitação, e a radiação emitida é analisada pelo monocromador de emissão, sendo a intensidade da radiação emitida determinada pelo tubo fotomultiplicador, como nos espectrofotômetros.

Fontes de radiação: nos instrumentos comerciais mais comuns a fonte de radiação é uma lâmpada de emissão contínua, que pode ser de xenônio e mercúrio. A lâmpada de xenônio emite praticamente em toda a região visível e ultravioleta ($250\ nm < \lambda < 800\ nm$) e a de mercúrio emite, nesta mesma região, na forma de linhas. A lâmpada de xenônio oferece maior número de comprimentos de onda possíveis para a excitação da amostra, enquanto que a lâmpada de mercúrio oferece maior intensidade nos comprimentos de onda que emite.

Um detalhe importante no espectrofluorímetro é que a radiação emitida pela amostra é focalizada na entrada do monocromador de emissão em um ângulo de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

90° em relação à radiação incidente. Esta geometria é diferente daquela de um espectrofotômetro de absorção no qual a luz que emerge da amostra e vai para o detector tem a mesma direção da luz incidente. Isto se deve ao fato de que a intensidade de emissão é muito menor do que a intensidade da radiação de excitação, e conseqüentemente o sinal de emissão, se analisado na mesma direção da excitação, ficaria mascarado (Atvars e Martelli, 2002).

3.3.2
Fluorescência em proteínas

Quase todas as proteínas contêm fluoróforos naturais, já que os aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano e fenilalanina são fluorescentes e contribuem à fluorescência (ultravioleta). A fluorescência intrínseca de proteína é geralmente excitada na máxima absorção perto de 280 nm, ou em comprimentos de ondas maiores. A fenilalanina não é excitada na maioria de situações experimentais. Além disto, o rendimento quântico da fenilalanina em proteínas é pequeno.

A absorção de proteínas em 280 nm é devida a resíduos de tirosina e triptofano. Em comprimentos de ondas maiores do que 295 nm, a absorção é devida principalmente ao triptofano. A emissão da tirosina em água ocorre em 303 nm e é relativamente insensível à polaridade do solvente. O pico de emissão do triptofano em água ocorre em 348 nm e é muito dependente da polaridade (Lakowicz, 1983).

Algumas regras empíricas para interpretar o espectro de fluorescência de proteínas:

1. Toda a fluorescência de uma proteína é devida ao triptofano, tirosina e fenilalanina, a menos que a proteína contenha outro componente fluorescente.
2. O λ_{MAX} de emissão do espectro de fluorescência do triptofano muda para comprimentos de ondas mais curtos e a intensidade de λ_{MAX} incrementa à medida que a polaridade do solvente decresce.
    a. Se λ_{MAX} é mudado a comprimentos de onda mais curtos quando a proteína está num solvente polar, o triptofano deve estar num ambiente interno e não polar.
    b. Se λ_{MAX} é mudado a comprimentos de ondas mais curtos quando a proteína esta num meio não polar, o triptofano está na superfície da

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

proteína ou o solvente induz uma mudança de conformação que o leva à superfície.

3. Se uma substância conhecida como supressor (suprime a fluorescência do aminoácido livre), tal como o iodeto, nitrato, ou íons de césio, suprime a fluorescência da tirosina ou do triptofano, o aminoácido deve estar na superfície da proteína. Se não fizer assim, existem varias razões:
   a. O aminoácido pode estar no interior.
   b. O aminoácido pode estar numa fenda cujas dimensões são muitas pequenas para que o supressor entre.
   c. O aminoácido pode estar numa região altamente carregada e a carga pode repelir o supressor.
4. Se uma substância que não afeta o rendimento quântico do aminoácido afeta a fluorescência de uma proteína, ela deve produzir uma mudança conformacional na proteína (Freifelder, 1982).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

3.3.3
Fluorescência em membranas

As propriedades de membranas comumente estudadas por técnicas de fluorescência incluem aspectos dinâmicos, estruturais e organizacionais. Aspectos dinâmicos incluem a taxa de movimento das cadeias lipídicas, a região da cabeça polar dos fosfolipídios e outros componentes lipídicos e proteínas de membranas. Aspectos organizacionais incluem a distribuição de lipídios em ambos lados da membrana, no plano da membrana (separações de fase) e através da bicamada (assimetria na composição de fosfolipídios), assim como distâncias da superfície ou profundidade na bicamada. Finalmente, existem propriedades das membranas que pertencem à superfície tal como a carga superficial e as propriedades dielétricas. Técnicas de fluorescência têm sido amplamente usadas em estudos de membranas principalmente já que a escala de tempo de tempo vida de fluorescência coincide com a escala de tempo de interesse para o movimento do lipídio e já que existe um amplo número de sondas fluorescentes disponíveis, que podem ser usadas para produzir informação específica sobre propriedades da membrana.

Um número de estudos tem tirado vantagem do fato que proteínas de membranas contêm um ou mais resíduos de triptofano, cuja fluorescência pode ser

usada para determinar a conformação da proteína ou sua posição na membrana. Por suposto, a informação é limitada pelo número de resíduos de triptofano e pelo fato de que um triptofano não pode ser posicionado na região de interesse da proteína (Lakowicz, 1983).

3.4
Associação de ligantes a macromoléculas

Um evento comum nos sistemas vivos é a ligação não covalente de uma ou mais moléculas a uma macromolécula simples. Uma molécula ligada a uma macromolécula é chamada ligante. Existem muitos tipos de ligação. Por exemplo, uma molécula pode ter só um sítio de ligação simples ou pode haver muitos sítios. Os sítios podem ser idênticos ou diferentes e eles podem ser apenas para uma classe de moléculas ou diversas moléculas distintas. Além disso, múltiplos sítios podem ser interdependentes, no sentido em que a ocupação de um sítio por uma molécula ligante pode afetar a afinidade de outros sítios para seus ligantes.

3.4.1
Macromoléculas com um sítio de ligação

Considera-se uma molécula *P* que tem um sítio de ligação para uma molécula *A*. Na saturação, um mol de *P* combina-se com um mol de *A* para formar um complexo *PA*.

$$P + A \leftrightarrow PA \qquad (1)$$

A constante de dissociação K_D para essa reação é definida como:

$$K_D = \frac{[P][A]}{[PA]} \qquad (2)$$

Definindo-se *r* como o número de moles de moléculas ligadas a um mol de macromoléculas, então:

$$r = \frac{[A]_{LIGADA}}{[P]_{TOTAL}} = \frac{[PA]}{[P]+[PA]} \qquad (3)$$

A maioria das equações que descrevem ligação são expressas em termos de K_D e *r*. Para avaliar *r*, uma concentração particular [*A'*] de ligantes é somado a uma conhecida concentração [*P'*] das macromoléculas e então a concentração de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

ligantes ligados [*PA*] ou de ligantes não ligados [*A*] são medidos. Onde: [*A'*] = [*A*] + [*PA*] e [*P'*] = [*P*] + [*PA*] . Combinando as equações 2 e 3:

$$\frac{1}{r} = \frac{K_D}{[A]} + 1 \qquad (4)$$

Usando esta equação, o gráfico de 1/*r* contra a 1/[*A*] é uma linha reta cujo coeficiente angular é K_D.

3.4.2
Macromoléculas com vários sítios de ligação.

Muitas macromoléculas biológicas têm mais de um sítio de ligação. Por exemplo, uma típica molécula de proteína pode algumas vezes ligar vários centros de íons de H^+. Ademais, os sítios de ligação não sempre são idênticos.

Múltiplos sítios de ligação podem ser independentes ou interativos, no caso em que a ocupação de um sítio influi na ligação de um segundo sítio. Discutiremos aqui sítios de ligações independentes.

Ligações fortes

No caso de ligações firmes, assume-se que cada molécula ligante está ligada se o número total de moléculas ligantes adicionadas for menor que o número total de sítios de ligações na solução. Também, se a quantidade de ligante adicionado excede ao número *n* de sítios de ligação na solução, cada um dos sítios *n* é ocupado e os ligantes adicionais permanecem sem ligar. A partir da concentração de ligante na qual algumas moléculas ficam sem ligar, o número de sítios de ligação pode ser medido, isto é, a concentração na qual a quantidade de moléculas ligadas alcança um máximo.

Ligações fracas

Sítios de ligação fracos independentes e idênticos:

Se todos os sítios são idênticos e independentes vamos ter a seguinte equação:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{K_D}{n[A]} \qquad (5)$$

na qual K_D é uma constante de dissociação média. Quando a equação (5) é usada, um gráfico 1/*r* em função de 1/[*A*] nos dá uma linha reta. Se os sítios de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA

ligação não são idênticos e independentes nos dará uma curva.

Macromoléculas com sítios de ligação diferentes mas independentes para o mesmo ligante:

Muitas macromoléculas têm distintos sítios para o mesmo ligante e, freqüentemente, cada um tem uma constante de ligação diferente.

Se os sítios de ligações são independentes, o tratamento teórico é simples; entretanto, a extração de informação dos experimentos é dificultosa, a menos que o número de classes de sítios de ligação seja pequeno e os valores de K_D difiram grandemente para cada classe.

Considera-se uma molécula tendo várias classes de sítios de ligações denotadas por 1, 2, 3, ... Quando um ligante é adicionado, a ligação pode ocorrer a qualquer sítio, e aqueles sítios com maior afinidade para o ligante serão preenchidos primeiro. Para qualquer concentração particular de ligantes, cada classe terá um valor particular de r (r_1, r_2, ..) que será determinado pela constante de dissociação para essa classe. Experimentalmente r, o número médio de moléculas ligantes por macromolécula, é medido e igual a $r_1 + r_2 + r_3 + ...r_n$.

Se existem n_x sítios de classe x, e assim por diante:

$$r = \frac{n_1[A]}{K_{D,1} + [A]} + \frac{n_2[A]}{K_{D,2} + [A]} + ... \qquad (6)$$

3.4.3
Métodos experimentais para determinação da constante de ligação

Para medida da constante de ligação se usa o método indireto, no qual a ligação se pode medir observando uma mudança na propriedade física da macromolécula ou do ligante, isto é, induzida pela ligação, como por exemplo mudanças espectrais. Procedimentos espectroscópicos são executados facilmente sempre que o espectro da macromolécula ou do ligante mude significativamente. A mudança espectral pode ser um deslocamento no máximo de absorção, um incremento ou decrescimento na absorbância, uma mudança na intensidade de fluorescência. Se o espectro na ausência de ligação e o espectro em saturação são conhecidos, e se a mudança espectral é linear com a concentração do ligante, o grau de ligação em estágios intermediários podem ser medidos (Freifelder, 1982).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0321568/CA