



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carlos Daniel Figueira Coelho

**CARACTERIZAÇÃO DA FOTOFÍSICA E COMPORTAMENTO
ÁCIDO-BASE DE DERIVADOS DA FLUORESCEÍNA E
RODAMINA**

Efeito da Polaridade do meio e da ligação a Cisteínas da Albumina de
Soro Bovino, aplicações na estabilização de *Nanodroplets*

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, na área de especialização em Química
Avançada e Industrial orientada pela Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira
Moreno Silvestre e pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra

Novembro de 2020

Carlos Daniel Figueira Coelho

**CARACTERIZAÇÃO DA FOTOFÍSICA E COMPORTAMENTO
ÁCIDO-BASE DE DERIVADOS DA FLUORESCÉINA E RODAMINA**

Dissertação apresentada para provas do Mestrado em Química
Área de especialização em Química Avançada e Industrial

Orientação:

Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre
Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura

Novembro de 2020

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Concluída esta etapa tão importante da minha vida académica, considero que este percurso não seria igual sem o contributo das pessoas que estiveram a meu lado, pois foram essas que me apoiaram e motivaram a não desistir em diversas fases fundamentais deste trabalho.

Começo por agradecer à Professora Maria João Moreno, porque foi realmente essencial neste percurso, esclarecendo as minhas dúvidas infinitas, guiando-me e incentivando-me. Obrigada pela sua exigência, dedicação e disponibilidade, foi um privilégio poder contar consigo.

Ao Professor Luís Loura, por todos os esclarecimentos de dúvidas, pela disponibilidade e pela revisão do trabalho.

Ao professor João Paulo, pela forma como me recebeu em Évora, todo o conhecimento lá transmitido e pela ajuda e revisão dos cálculos teóricos.

A todo o grupo de Química Biológica, pelo ambiente criado durante este ano e meio que proporcionou um crescimento tanto a nível científico como pessoal.

Ao Mestre Pedro Cruz pela realização das experiências de RMN. À Doutora Lúcia Silva pelas experiências de citometria de fluxo. À Mestre Maria Inês Mendes pela possibilidade de colaboração em experiências inseridas no seu doutoramento.

Aos meus amigos de Coimbra por estes curtos 6 anos, por me ouvirem e me aconselharem. Aos de Torre de Bera, por desde sempre transmitirem valores essenciais para me tornar uma melhor pessoa e por me ensinarem o que é a amizade. À Alina, por nunca me deixar desistir e por toda a paciência e ternura que sempre demonstrou e principalmente nesta última fase.

E por fim, especial agradecimento à minha família, que sempre me apoiou e incentivou a ir mais longe e superar-me todos os dias. Pela confiança que depositam em mim e por toda a preocupação e carinho que demonstram.

A todos o meu sincero obrigada!

Índice

ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XIX
ÍNDICE DE TABELAS	XXI
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	3
1.1 - SONDAS FLUORESCENTES.....	3
1.1.1 - <i>Fluoresceína e Tetrametilrodamina</i>	5
1.2 - SONDAS REATIVAS PARA MARCAÇÃO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS	8
1.3 - <i>NANODROPLETS</i>	10
1.4 - QUÍMICA COMPUTACIONAL	11
1.4.1 - <i>DFT (Density Functional Theory)</i>	11
1.4.2 - <i>TD-DFT (Time Dependent – Density Functional Theory)</i>	13
1.5 - BASES DE FUNÇÕES	14
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 - LIGAÇÃO DAS SONDAS À CISTEÍNA	19
2.2 - MARCAÇÃO DA ALBUMINA DE SORO BOVINO	20
2.3 - CÁLCULO DE pK_a 'S.....	20
2.4 - FORMAÇÃO DE <i>NANODROPLETS</i>	22
2.5 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ESPECTROSCÓPICA E FOTOFÍSICA.	22
2.5.1 - <i>Espectroscopia de Absorção UV-Vis</i>	22
2.5.2 - <i>Espectroscopia de Emissão de Fluorescência</i>	22
2.5.3 - <i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i>	22
2.5.4 - <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	22
2.6 - MICROSCOPIA CONFOCAL.....	23
2.7 - MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	24
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1 - ESTUDO COMPUTACIONAL.....	27

3.1.1 - Previsão de Espectros de Absorção	27
3.1.2 - Efeito do Solvente	33
3.2 - SÍNTESE DE LIGAÇÃO DAS SONDAS À CISTEÍNA	35
3.2.1 - Caracterização Estrutural e Espectroscópica – RMN e Absorção	35
3.2.2 - Titulação da Cisteína-Fluoresceína (Cys-Flu)	44
3.2.3 - Cálculo de pK_a 's – Cys-Flu	50
3.2.4 - Titulação da Cisteína-Tetrametilrodamina (Cys-Rdm)	52
3.2.5 - Cálculo dos pK_a 's – Cys-Rdm	56
3.3 - MARCAÇÃO DA ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA)	57
3.3.1 - Titulação dos Bioconjugados	60
3.3.2 - Cálculo de pK_a – BSA-Fluoresceína	64
3.4 - EFEITO DO MEIO NO EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE DAS SONDAS	65
3.5 - NANODROPLETS	68
3.5.1 - Citometria de fluxo	71
3.5.2 - Microscopia confocal – Ensaio 1	72
3.5.3 - Microscopia Confocal – Ensaio 2	74
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES	81
BIBLIOGRAFIA	83
ANEXOS	87

Abreviaturas

BSA – Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

Cys-Flu – Fluoresceína ligada covalentemente ao tiol da cisteína

Cys-Rdm – Tetrametilrodamina ligada covalentemente ao tiol da cisteína

BSA-Flu – Fluoresceína ligada covalentemente à BSA

DFT – Teoria do Funcional da Densidade (do inglês *Density Functional Theory*)

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)

FRET – Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

GGA – *Generalized Gradient Approximation*

PCM – Modelo de Polarizabilidade Contínua (do inglês *Polarizable Continuum Model*)

PFP – Perfluorpentano

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TD-DFT – Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (do inglês *Time Dependent – Density Functional Theory*)

TLC – Cromatografia em Camada Fina (do inglês *Thin-Layer Chromatography*)

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

DOL – *Degree of Labelling*

Resumo

Sondas fluorescentes são desde há muito utilizadas para caracterizar vários tipos de sistemas. Este trabalho centra-se no estudo de duas sondas fluorescentes pertencentes à família dos xantenos, a fluoresceína e a rodamina. Os xantenos são sondas fluorescentes muito utilizadas na área da química, biologia e medicina devido ao seu elevado rendimento quântico de fluorescência na região do visível e sensibilidade às propriedades do meio envolvente. Este trabalho tem como objetivo perceber melhor de que maneira o efeito combinado, das interações com o meio e do pH, pode afetar a estabilidade e o equilíbrio das diferentes espécies ácido-base das sondas, principalmente quando ligadas a proteínas.

Neste estudo a fluoresceína e a tetrametilrodamina foram ligadas covalentemente à BSA, através dos resíduos de cisteína. Para melhor compreensão das propriedades das sondas quando ligadas à proteína, efetuou-se previamente a ligação destas ao aminoácido cisteína. O efeito da polaridade do meio nas propriedades destes derivados foi caracterizado mediante o estudo do comportamento em soluções aquosas com diferentes percentagens de etanol. O comportamento ácido-base das sondas foi caracterizado através de variações na sua absorção e fluorescência. Como esperado, observa-se uma estabilização da espécie neutra com a diminuição da polaridade do meio. Estes estudos experimentais foram também acompanhados por cálculos teóricos de previsão de espectros de absorção. A caracterização da fluoresceína ligada à BSA mostra que o meio envolvente apresenta propriedades semelhantes a misturas aquosas com 30 a 40 % de etanol.

Os bioconjugados sintetizados (Fluoresceína-BSA e Rodamina-BSA) foram utilizados para estabilizar *nanodroplets* formadas em misturas aquosas de perfluoropentano, um sistema promissor em aplicações médicas como agente de entrega de fármacos ou agente de contraste para imagiologia. Estes sistemas foram caracterizados relativamente à sua estrutura e dinâmica, utilizando citometria de fluxo e microscopia confocal. A sua potencial utilização como agentes para encapsulação e libertação controlada de agentes bio-ativos foi ainda avaliada mediante a capacidade de incorporação de sondas fluorescentes no seu centro apolar e interface.

Abstract

Fluorescent probes have long been used to characterize various types of systems. This work focuses on the study of two fluorescent probes belonging to the family of xanthenes, fluorescein and rhodamine. Xanthenes are fluorescent probes widely used in the area of chemistry, biology and medicine due to their high quantum fluorescence yield in the visible region and sensitivity to the properties of the environment. This work aims to better understand how the combined effect, of interactions with the environment and pH, can affect the stability and balance of the different acid-base species of the probes, especially when linked to proteins.

In this study, fluorescein and tetramethylrhodamine were covalently linked to BSA through cysteine residues. In order to better understand the properties of the probes when linked to the protein, these properties were previously linked to the amino acid cysteine. The effect of the polarity of the medium on the properties of these derivatives was obtained by studying the behavior in aqueous solutions with different percentages of ethanol. The acid-base of the probes was developed according to the variations in their absorption and fluorescence. As expected, there is a stabilization of the neutral species with a decrease in the polarity of the medium. These experimental studies were also accompanied by theoretical calculations of prediction of absorption spectra. The characterization of BSA-linked fluorescein shows that the environment has properties similar to aqueous mixtures with 30 to 40% ethanol.

The synthesized bioconjugates (Fluorescein-BSA and Rhodamine-BSA) were used to stabilize nanogrooves formed in aqueous mixtures of perflenapent, a promising system in medical applications as a drug delivery agent or contrast agent for imaging. These systems were characterized in terms of their structure and dynamics, using flow cytometry and confocal microscopy. Its potential use as agents for encapsulation and controlled release of bioactive agents was further evaluated by the ability to incorporate fluorescent probes into its nonpolar center and interface.

Índice de Figuras

FIGURA 1.1 - ILUSTRAÇÃO DO DIAGRAMA DE JABLONSKI E DOS POSSÍVEIS FENÓMENOS FOTOQUÍMICOS ENVOLVENDO ESTADOS EXCITADOS. S_N E T_N REPRESENTAM ESTADOS ELETRÔNICOS SINGLETO E TRIPLETO, RESPECTIVAMENTE, E AS LINHAS A PRETO MENOS ESPESAS REPRESENTAM ESTADOS VIBRACIONAIS.	4
FIGURA 1.2 – FIGURA REPRESENTATIVA DA SUPERFÍCIE, A AZUL, PARA AS LISINAS, A VERMELHO, PARA AS CISTEÍNAS E A VERDE O RESTO DA PROTEÍNA BSA. ²²	9
FIGURA 2.1 – MICROSCÓPIO CONFOCAL DE VARRIMENTO A LASER. ⁴⁶	23
FIGURA 3.1 – ESTRUTURAS DA ESPÉCIE F^{2-} À ESQUERDA EM ÁGUA E À DIREITA EM ETANOL AO NÍVEL PCM/B3LYP/6-311+G(D).....	28
FIGURA 3.2 – ESTRUTURAS DA ESPÉCIE R-NEZ À ESQUERDA EM ÁGUA E À DIREITA EM ETANOL AO NÍVEL PCM/B3LYP/6-31G(D).....	30
FIGURA 3.3 – ESTRUTURA OPTIMIZADA EM ÁGUA, À ESQUERDA DA CYS-FLU E À DIREITA DA CYS-RDM, COM PCM/B3LYP/6-31G(D) ..	31
FIGURA 3.4 – ESTRUTURA DA FLUORESCÉINA COM 3 MOLÉCULAS DE ÁGUA EXPLÍCITAS, À ESQUERDA ANTES DE SER OTIMIZADO E À DIREITA DEPOIS DE SER OTIMIZADO AO NÍVEL PCM/B3LYP/6-31G(D).....	33
FIGURA 3.5 – ESPECTRO DE HSQC DA CISTEÍNA OBTIDA A 25 °C EM D ₂ O. O MAPA DE ISOLINHAS MOSTRA A CORRELAÇÃO ENTRE ÁTOMOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO COVALENTEMENTE LIGADOS. OS ESPECTROS DE ¹ H- E ¹³ C-RMN ENCONTRAM-SE RESPECTIVAMENTE NA ABCISSA E NA ORDENADA.	37
FIGURA 3.6 – ESPECTRO DE ¹ H-RMN OBTIDO A 25 °C EM D ₂ O PARA A AMOSTRA A1 (CYS-FLU).	38
FIGURA 3.7 – ESPECTRO DE HSQC DA AMOSTRA A1 (CYS-FLU) OBTIDA A 25 °C EM D ₂ O. O MAPA DE ISOLINHAS MOSTRA A CORRELAÇÃO ENTRE ÁTOMOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO COVALENTEMENTE LIGADOS. OS ESPECTROS DE ¹ H- E ¹³ C-RMN ENCONTRAM-SE RESPECTIVAMENTE NA ABCISSA E NA ORDENADA.....	38
FIGURA 3.8 – ESPECTRO DE HMBC DA AMOSTRA A1 (CYS-FLU) OBTIDA A 25 °C EM D ₂ O. O MAPA DE ISOLINHAS MOSTRA A CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ENTRE ÁTOMOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO. OS ESPECTROS DE ¹ H- E ¹³ C-RMN ENCONTRAM-SE RESPECTIVAMENTE NA ABCISSA E NA ORDENADA.....	39
FIGURA 3.9 – ESPECTRO DE ¹ H-RMN OBTIDO A 25 °C EM CD ₃ OD PARA A AMOSTRA B (CYS-RDM).....	40
FIGURA 3.10 – ESPECTRO DE DOSY OBTIDO A 25 °C EM D ₂ O PARA A CISTEÍNA E PARA A AMOSTRA A1 (CYS-FLU) E EM CD ₃ OD PARA A AMOSTRA B (CYS-RDM). AS ISOLINHAS REPRESENTAM O COEFICIENTE DE DIFUSÃO NA ORDENA CORRESPONDENTE A CADA SINAL DO ESPECTRO ¹ H NAS ABCISSAS.....	42
FIGURA 3.11 – ESPECTROS NORMALIZADOS DE ABSORÇÃO UV-VIS DO PRODUTO DAS REAÇÕES A1 (—, PRETO), B (—, CINZENTO), FLUORESCÉINA LIVRE (—, LARANJA) E DA SONDA RODAMINA LIVRE (—, VERDE) RECOLHIDOS EM TAMPÃO FOSFATO A PH 8.6, 9.6, 8.1, E 8.3 RESPECTIVAMENTE.	43
FIGURA 3.12 – ESPECTROS TEORICOS CALCULADOS AO NÍVEL PCM/THCTHYB/6-311++G(D,P) A TRANSEJADO PARA AS RESPECTIVAS SONDAS LIVRES E A CHEIO PARA AS MESMAS LIGADAS À CISTEÍNA, NORMALIZADO SEGUNDO O ESPECTRO QUE TINHA UMA MAIOR FORÇA DE OSCILADOR (RESULTADOS OBTIDOS NO CAPÍTULO 3.1.1).	43

FIGURA 3.13 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA CYS-FLU DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM ÁGUA 150 MM NaCl. OS ESPECTROS OBTIDOS AOS VALORES EXTREMOS DE pH E A pH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS.	44
FIGURA 3.14 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-FLU DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM ÁGUA 150MM NaCl. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS pH EXTREMOS E A pH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=490$ NM.	45
FIGURA 3.15 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-FLU, NORMALIZADOS PELO O RESPECTIVO MÁXIMO, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM ÁGUA 150MM NaCl. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS pH EXTREMOS E A pH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=490$ NM.	46
FIGURA 3.16 – ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-FLU, NORMALIZADOS COM O RESPECTIVO MÁXIMO, EM ÁGUA 150MM ENTRE pH 3.5 E 1 - $\lambda_{exc}=437$ NM; O ESPECTRO DE EMISSÃO A AZUL CARREGADO (—) FOI RECOLHIDO EM ÁGUA 150MM A pH 4 - $\lambda_{exc}=490$ NM.	47
FIGURA 3.17 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA CYS-FLU DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM 50:50 ETANOL/ÁGUA. OS ESPECTROS OBTIDOS AOS VALORES EXTREMOS DE pH E A pH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS.	48
FIGURA 3.18 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-FLU DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE 50:50 ETANOL/ÁGUA. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS pH EXTREMOS E A pH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=490$ NM.	49
FIGURA 3.19 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-FLU, NORMALIZADOS PELO O RESPECTIVO MÁXIMO, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM 50:50 ETANOL/ÁGUA. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS pH EXTREMOS E A pH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=490$ NM.	49
FIGURA 3.20 – GRÁFICOS DO AJUSTE GLOBAL AO DADOS EXPERIMENTAIS DA ABSORÇÃO, NORMALIZADOS PELA ABSORÇÃO MÁXIMA A 506 NM, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA CYS-FLU EM ÁGUA À ESQUERDA E EM 50:50 ETANOL/ÁGUA À DIREITA. OS GRÁFICOS MOSTRAM COM MARCADORES OS PONTOS EXPERIMENTAIS E AS LINHAS O AJUSTE GLOBAL FEITO A 506 NM (—, AZUL), 491 NM (—, VERMELHO), 450 NM (—, VERDE) E 437 NM (—, ROXO)	51
FIGURA 3.21 – GRÁFICOS DO AJUSTE GLOBAL AO DADOS EXPERIMENTAIS DA FLUORESCÊNCIA, NORMALIZADOS PELA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÁXIMA AO RESPECTIVO COMPRIMENTO DE ONDA, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA CYS-FLU EM ÁGUA À ESQUERDA E EM 50:50 ETANOL/ÁGUA À DIREITA. OS MARCADORES MOSTRAM OS PONTOS EXPERIMENTAIS E AS LINHAS O AJUSTE GLOBAL FEITO A 506 NM (—, LARANJA) E 491 NM (—, AZUL ESCURO).	51
FIGURA 3.22 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA CYS-RDM DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM ÁGUA 150MM NaCl. OS ESPECTROS OBTIDOS AOS VALORES EXTREMOS DE pH ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS. A ZONA EM ZOOM DIZ REPEITO AO PICO A 550 NM SE FORMA A SER MAIS CLARO O DESVIO DO ESPECTRO.	52
FIGURA 3.23 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-RDM DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM ÁGUA 150MM NaCl. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS pH EXTREMOS ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=550$ NM.	53
FIGURA 3.24 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-RDM, NORMALIZADOS COM O RESPECTIVO MÁXIMO, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM ÁGUA 150MM NaCl. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS pH EXTREMOS ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=550$ NM	53

FIGURA 3.25 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA CYS-RDM DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM 50:50 ETANOL/ÁGUA. OS ESPECTROS OBTIDOS AOS VALORES EXTREMOS DE PH ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS. A ZONA EM ZOOM DIZ REPEITO AO PICO A 550 NM SE FORMA A SER MAIS CLARO O DESVIO DO ESPECTRO.	54
FIGURA 3.26 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-RDM DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM 50:50 ETANOL/ÁGUA. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS PH EXTREMOS ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=550$ NM....	55
FIGURA 3.27 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA CYS-RDM, NORMALIZADOS COM O RESPECTIVO MÁXIMO, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM 50:50 ETANOL/ÁGUA. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS PH EXTREMOS ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=550$ NM	55
FIGURA 3.28 – GRÁFICOS DOS AJUSTES AO DADOS EXPERIMENTAIS DA ABSORÇÃO DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA CYS-RDM EM ÁGUA À ESQUERDA E EM 50:50 ETANOL/ÁGUA À DIREITA. OS GRÁFICOS MOSTRAM COM MARCADORES OS PONTOS EXPERIMENTAIS E AS LINHAS OS AJUSTES FEITOS A 555 NM (—, AZUL) E 545 NM (—, VERMELHO)	56
FIGURA 3.29 – GRÁFICOS DOS AJUSTES AO DADOS EXPERIMENTAIS DA FLUORESCÊNCIA DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA CYS-RDM EM ÁGUA À ESQUERDA E EM 50:50 ETANOL/ÁGUA À DIREITA. OS GRÁFICOS MOSTRAM COM MARCADORES OS PONTOS EXPERIMENTAIS E AS LINHAS OS AJUSTES FEITOS A 560 NM (—, LARANJA) E 600 NM (—, AZUL ESCURO).	57
FIGURA 3.30 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO, NORMALIZADOS PARA A BANDA DA Sonda, DOS PRECIPITADOS, SOBRENADANTES, TUBOS ORIGINAIS E RESPECTIVAS SONDAS LIVRES DOS BIOCONJUGADOS EM TAMPÃO.....	59
FIGURA 3.31 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA BSA-FLU EM ÁGUA 150 mM NaCl ENTRE PH 9-4. A LINHA A NEGRITO CORRESPONDE AO ESPECTRO DE ABSORÇÃO A PH 6.1.	60
FIGURA 3.32 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO DLS PARA A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA BSA-FLU EM TAMPÃO. ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS OS DIÂMETROS MÉDIOS DAS PARTICULAS EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO PH.	61
FIGURA 3.33 – REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DA TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA BSA-FLU EM TAMPÃO. NO EIXO DAS ORDENADAS À DIREITA ENCONTRA-SE REPRESENTADO O λ_{ems} E À ESQUERDA A INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA – $\lambda_{exc} = 280$ NM.	62
FIGURA 3.34 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA BSA-FLU DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM TAMPÃO FOSFATO. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS PH EXTREMOS E A PH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=490$ NM.	63
FIGURA 3.35 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA BSA-FLU, NORMALIZADOS PELO O RESPECTIVO MÁXIMO, DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE EM TAMPÃO FOSFATO. OS ESPECTROS CORRESPONDENTES AOS PH EXTREMOS E A PH 7 ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS POR LINHAS ESPESSAS – $\lambda_{exc}=490$ NM.	63
FIGURA 3.36 – GRÁFICOS DOS AJUSTES AO DADOS EXPERIMENTAIS DA FLUORESCÊNCIA DURANTE A TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DA BSA-FLU EM TAMPÃO. OS GRÁFICOS MOSTRAM COM MARCADORES OS PONTOS EXPERIMENTAIS E AS LINHAS OS AJUSTES FEITOS A 560 NM (—, LARANJA) E 600 NM (—, AZUL ESCURO).	65
FIGURA 3.37 – VALORES DOS pK_a 'S CALCULADOS, À ESQUERDA PELA ABSORÇÃO E À DIREITA PELA FLUORESCÊNCIA, PARA A CYS-FLU EM ÁGUA, MISTURAS DE ETANOL/ÁGUA E PARA A BSA-FLU EM TAMPÃO. ENTRE OS VALORES DOS pK_a 'S ESTA TAMBÉM REPRESENTADO ATRAVÉS DA SUA ABREVIATURA QUAL A ESPECIE EM SOLUÇÃO NESSE INTERVALO.	66

FIGURA 3.38 – VALORES DE pK_a 'S CALCULADOS, À ESQUERDA PELA ABSORÇÃO E À DIREITA PELA FLUORESCÊNCIA, PARA A CYS-RDM EM ÁGUA E MISTURAS DE ETANOL/ÁGUA. ENTRE OS VALORES DOS pK_a 'S ESTA TAMBÉM REPRESENTADO ATRAVÉS DA SUA ABREVIATURA QUAL A ESPECIE EM SOLUÇÃO NESSE INTERVALO.	68
FIGURA 3.39 – ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA FLUORESCÉINA EM <i>NANODROPLET</i> , ÁGUA E NA BSA – $\lambda_{exc}=490$ NM.	70
FIGURA 3.40 – GRÁFICO COM OS RESULTADOS PARA A CITOMETRIA DE FLUXO. A BANDA À ESQUERDA MOSTRA A POPULAÇÃO DE <i>NANODROPLETS</i> COM BSA BRANCA E À DIREITA A POPULAÇÃO COM BSA VERDE.	71
FIGURA 3.41 – IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DOS DIFERENTES GRUPOS DE <i>NANODROPLETS</i> . A COR VERDE CORRESPONDE À EMISSÃO PROVENIENTE DA EXCITAÇÃO A 488 NM E A COR VERMELHA À EMISSÃO DA EXCITAÇÃO A 561 NM. AS LINHAS INDICAM SECÇÕES DE CORTE CUJA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA ESTÁ APRESENTADA NA FIGURA 3.42.	72
FIGURA 3.42 – INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA SELECIONADA NAS IMAGENS DA FIGURA 3.37. A VERDE (—) ENCONTRA-SE EMISSÃO REGISTADA PELA EXCITAÇÃO A 488 NM E A VERMELHO (—) PELA EXCITAÇÃO A 561 NM.	73
FIGURA 3.43 – IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DOS DIFERENTES GRUPOS DE <i>NANODROPLETS</i> . A COR VERDE CORRESPONDE À EMISSÃO PROVENIENTE DA EXCITAÇÃO A 488 NM E A COR AZUL À EMISSÃO DA EXCITAÇÃO A 405 NM. AS LINHAS INDICAM SECÇÕES DE CORTE CUJA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA ESTÁ APRESENTADA NA FIGURA 3.44.	74
FIGURA 3.44 – INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA SELECIONADA NAS IMAGENS DA FIGURA 3.43. A VERDE (—) ENCONTRA-SE EMISSÃO REGISTADA PELA EXCITAÇÃO A 405 NM.	75
FIGURA 3.45 – ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA PARA O PIRENO, NAS <i>NANODROPLETS</i> (—, CASTANHO), NA BSA (—, CINZENTO) E EM PFP (—, AMARELO).....	76
FIGURA 3.46 – IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS <i>NANODROPLETS</i> CONTENDO BODIPY. A COR VERMELHA CORRESPONDE À EMISSÃO PROVENIENTE DA EXCITAÇÃO A 506 NM E A COR VERMELHA. AS LINHAS INDICAM SECÇÕES DE CORTE CUJA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA ESTÁ APRESENTADA NA FIGURA DO LADO DIREITO.	76

Índice de Esquemas

ESQUEMA 1 – DIFERENTES ESPÉCIES PROTÓNICAS E RESPETIVOS TAUTÓMEROS DA FLUORESCÉINA.....	6
ESQUEMA 2 – DIFERENTES ESPÉCIES PROTÓNICAS E RESPETIVOS TAUTÓMOS DA TETRAMETILRODAMINA.	8
ESQUEMA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS SONDAS REATIVAS USADAS: (A) 5-iodoacetamida- fluoresceína (B) 5-iodoacetamida- TETRAMETILRODAMINA.	10
ESQUEMA 4 – REAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS SONDAS REATIVAS À CISTEÍNA.....	19
ESQUEMA 5 – ESQUEMA DAS DUAS HIPÓTESES REACIONAIS DO GRUPO REATIVO DAS SONDAS COM A CISTEÍNA.....	36

Índice de Tabelas

TABELA 1 – RESUMO DOS RESULTADOS DE PREVISÃO TEÓRICA DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO S_0-S_1 PARA A FLUORESCÉINA FEITO A VÁRIOS NÍVEIS DE TEORIA.....	29
TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE PREVISÃO TEÓRICA DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO S^0-S^1 PARA A FLUORESCÉINA COM VÁRIOS FUNCIONAIS.	31
TABELA 3 – RESUMO DOS RESULTADOS DE PREVISÃO TEÓRICA DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO S^0-S^1 PARA A CYS-FLU E CYS-RDM COM VÁRIOS FUNCIONAIS.	32
TABELA 4 - RESUMO DOS RESULTADOS DE PREVISÃO TEÓRICA DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO S^0-S^1 PARA O ESTUDO FEITO DA ROTACÃO DO ÂNGULO DIEDRO $C_{17}-C_7-C_5-C_6$ (FIGURA 3.4) NA FLUORESCÉINA. A OTIMIZAÇÃO PARA CADA VARIAÇÃO ÂNGULAR E PARA O CÁLCULO DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO FORAM FEITOS AO NÍVEL PCM/B3LYP/6-31G(D).....	34
TABELA 5 – RESULTADOS DA MARCAÇÃO DA PROTEÍNA BSA COM FLUORESCÉINA IODOACETAMIDA.	58
TABELA 6 – RESULTADOS DA MARCAÇÃO DA PROTEÍNA BSA COM RODAMINA IODOACETAMIDA.	58
TABELA 7 – RESULTADOS DE TAMANHOS E POLIDISPERSÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE <i>NANODROPLETS</i> FORMADOS E ACOMPANHAMENTO DESTES COM O TEMPO.....	69

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Capítulo 1 - Introdução

1.1 - Sondas Fluorescentes

Hoje em dia tanto em investigação fundamental como a um nível com objetivos de aplicações práticas, o estudo de propriedades de sistemas homogêneos mais simples ou até o de sistemas mais complexos como emulsões, micelas, membranas e proteínas é algo imprescindível.

Uma forma de estudar esses sistemas é através da inserção de moléculas (sondas), normalmente pequenas, que não afetando as propriedades do sistema em causa ainda conseguem fornecer direta ou indiretamente informação sobre essas. Um dos métodos para ter acesso à informação proveniente das sondas deve-se à interação destas com a radiação eletromagnética, interação essa que é fortemente dependente do ambiente físico-químico a que a sonda é sujeita.

À estrutura presente neste tipo de moléculas, responsável pela forma como elas interagem com a radiação eletromagnética, dá-se o nome de cromóforo. Durante essa interação, o cromóforo possui a capacidade de absorver energia quantizada na forma de fótons e, conseqüentemente, promover elétrons para estados energeticamente superiores.

Um elétron quando excitado pode perder energia na forma de calor, por colisões com moléculas adjacentes ou emitir fótons. O processo de emissão espontânea de fótons pode ocorrer entre estados com a mesma multiplicidade, fluorescência, ou com diferente multiplicidade, fosforescência. O conjunto de processos que podem acontecer após a excitação encontram-se representados esquematicamente no diagrama de Jablonski, figura 1.1. A fluorescência verifica-se, salvo raras exceções, do estado excitado de mais baixa energia, conhecida como a regra de Kasha, e de acordo com a lei de Stokes a energia de emissão é sempre menor que a energia de excitação, sendo a distância entre estas conhecida como desvio de Stokes.

Introdução

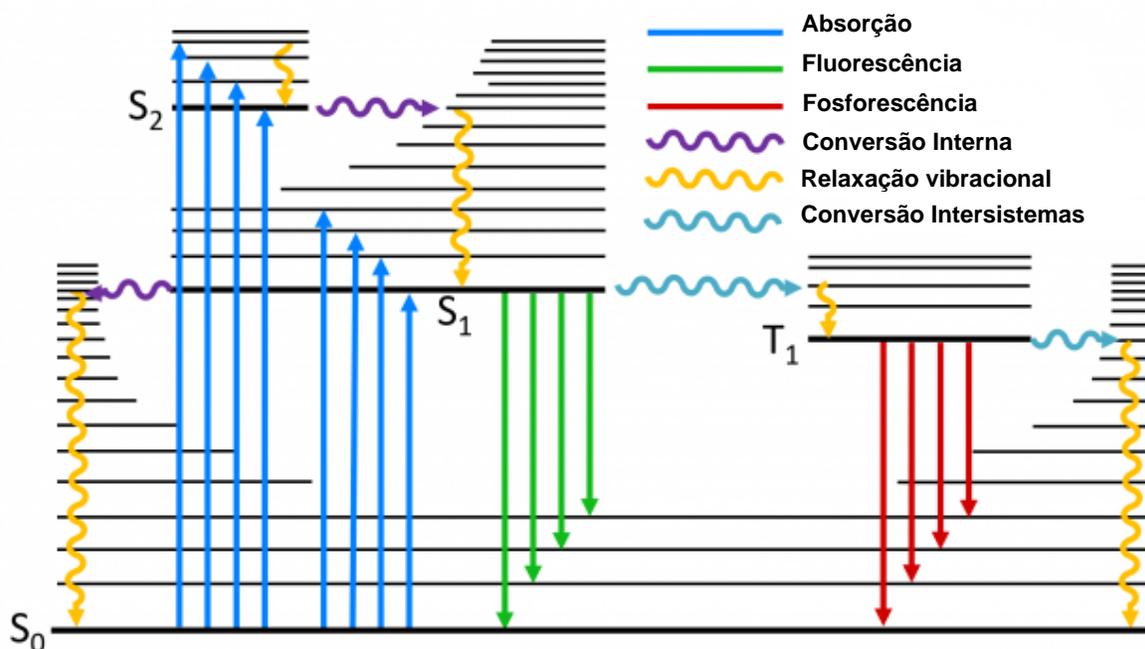


Figura 1.1 - Ilustração do diagrama de Jablonski e dos possíveis fenômenos fotoquímicos envolvendo estados excitados. S_n e T_n representam estados eletrônicos singlete e tripleto, respectivamente, e as linhas a preto menos espessas representam estados vibracionais.

Um bom coeficiente de extinção molar (capacidade de absorver energia) e um rendimento quântico de fluorescência (capacidade de emissão de fluorescência) alto são características fundamentais de um bom fluoróforo. Para além disso, a informação retirada dos ensaios é determinada pelas propriedades da sonda, assim deve-se estudar e escolher as sondas apropriadas para o estudo pretendido.

A maioria das moléculas usados para marcar biomoléculas contém um sistema aromático como fluoróforo. Em geral, quanto maior for o sistema de eletrões π deslocalizado menor será a energia de excitação e conseqüentemente menor será a energia da emissão.

Uma das famílias de moléculas mais usada neste ramo é a que derivada de um sistema de 3 anéis fundidos chamado de xanteno.¹ No próximo capítulo apresentarei um resumo do estado da arte para dois derivados desta família de sondas fluorescentes.

1.1.1 - Fluoresceína e Tetrametilrodamina

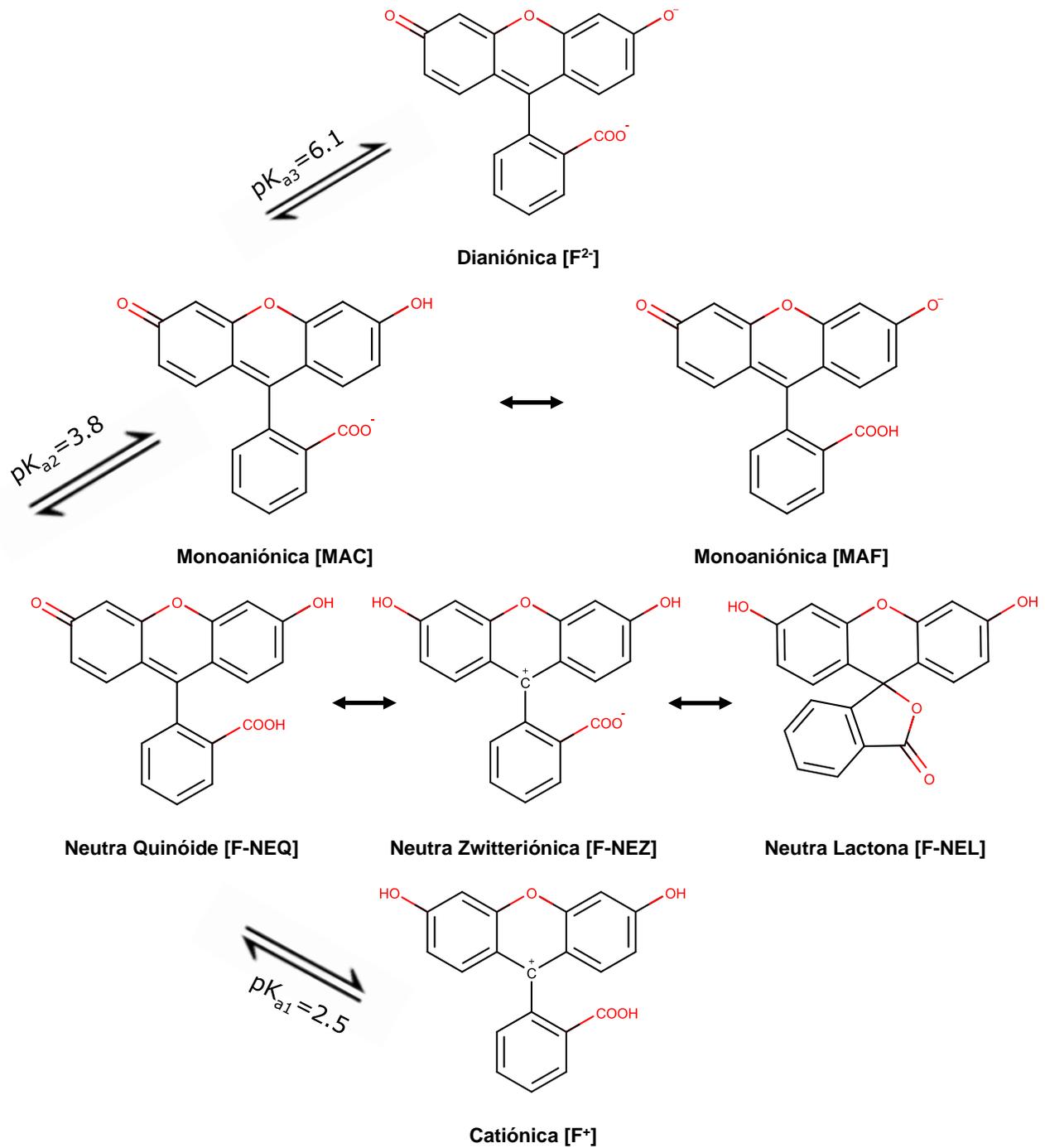
A fluoresceína e a rodamina são sem dúvida os derivados da família dos xantenos com mais aplicações no estudo de propriedades de sistemas. Com os máximos de absorção e fluorescência na região visível do espectro eletromagnético, λ_{abs} 490 nm e λ_{em} 512 nm em água a 0.1 M de NaOH² para a fluoresceína e, λ_{abs} 544 nm e λ_{em} 572 nm em metanol para a tetrametilrodamina. O facto de possuírem estes máximos e terem elevados coeficientes de extinção molar e rendimentos quânticos pertos da unidade torna-as bastante úteis para uso não só em técnicas mais usuais como espectroscopia de absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e de fluorescência bem como para outras como citometria de fluxo e microscopia confocal a laser. Para além disso, estas sondas possuem um bom integral de sobreposição entre o espectro de emissão da fluoresceína e o espectro de absorção da rodamina o que as torna num bom par de sondas para transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET).

A característica espectral destas sondas é dependente do ambiente químico e das suas espécies com diferentes graus de protonação (esquema 2 e 3) o que lhes confere também aplicabilidade como sondas de polaridade e de pH.³

As propriedades espectrais das espécies da fluoresceína e da rodamina têm sido alvo de grande estudo ao longo do tempo aliando métodos experimentais^{2, 4-6} e métodos teóricos.⁷⁻¹⁴ Mas mantêm-se até ao momento algumas questões por esclarecer.

Pensa-se que as espécies mais estáveis da fluoresceína serão uma dianiónica (F^{2-}), uma monoaniónica onde existe a protonação de um hidroxilo no xanteno e o anião permanece no oxigénio do grupo carboxilo do benzoico (MAC), duas neutras, uma quinóide (F-NEQ) e uma lactona (F-NEL) e uma catiónica (F^+), esquema 1. Sendo os seus pK_a de 6.1, 3.8 e 2.5, respetivamente.

Introdução



Esquema 1 – Diferentes espécies protónicas e respetivos tautómeros da fluoresceína.

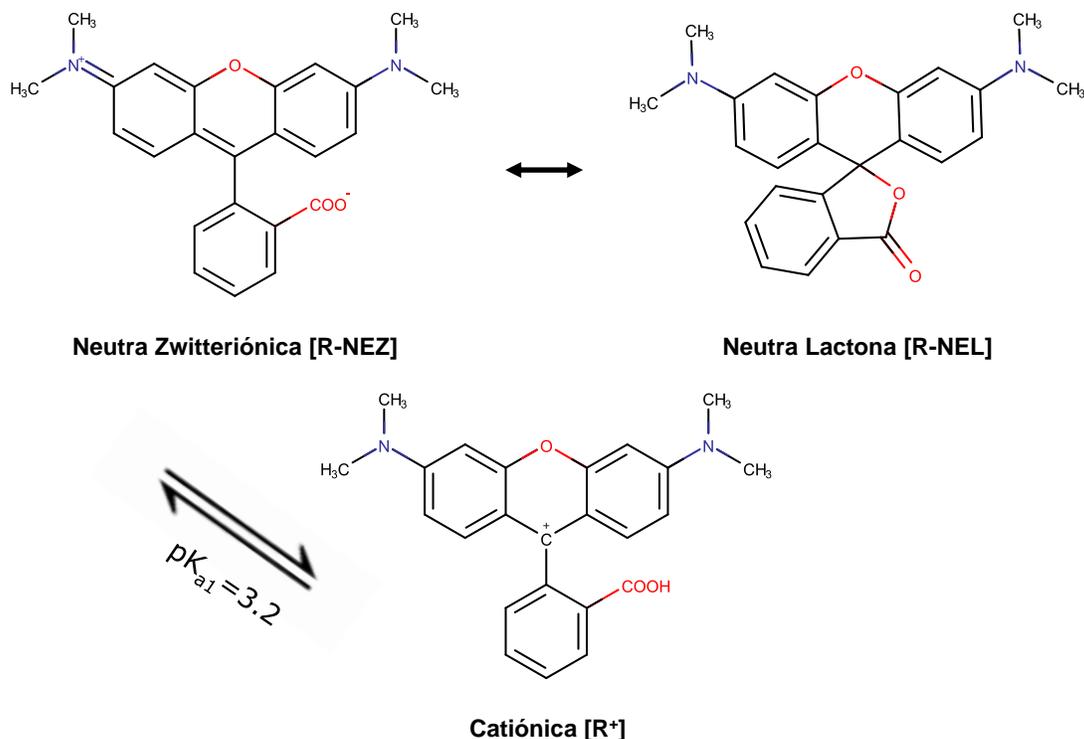
A espécie dianiónica (F^{2-}) é a que possui um maior coeficiente de extinção molar e um rendimento quântico próximo da unidade.² Para além disso, o λ_{abs} é bastante dependente do meio, desviando para 498 nm em etanol e para 513 nm em dimetilsulfóxido (DMSO).⁶

A forma tautomérica da espécie monoaniónica correspondente à migração do protão no xanteno para o benzoico (MAF) é realmente menos estável.¹⁵ O valor de pK_a calculado para o xanteno e para o grupo benzoico difere em 3 unidades pH indicando que esta apenas representa à volta de 0.1% do total da espécie monoaniónica, sendo assim a espécie monoaniónica (MAC) a mais predominante com 99,9% .²

Relativamente às formas neutras diferentes autores referiram que estes tautómeros se encontram como 70% lactona (F-NEL) e 15% de cada um dos outros dois (quinóide (F-NEQ) e zwitteriónica (F-NEZ)) em solução aquosa², etanol e misturas de etanol-água.¹⁵⁻¹⁷ Mais tarde, os mesmo autores e outros, mostraram que não havia evidências da espécie zwitteriónica^{8, 16, 18, 19}, passando a considerar apenas as espécies lactona e quinóide no equilíbrio das espécies neutras. Para além disso, um desses estudos indica que a espécie quinóide mostrou-se favorecida em metanol nos seus estudos experimentais e teóricos, inclusive em Ressonância Magnética Nuclear (RMN).¹⁸ Sendo o equilíbrio destas certamente dependente do solvente.

Na rodamina existem apenas três espécies a considerar, duas neutras, uma zwitteriónica (R-NEZ) e uma lactona (R-NEL) e uma catiónica (R^+), esquema 2, sendo o pK_a deste equilíbrio à volta de 3.22.⁶ Nesta sonda o equilíbrio das formas neutras é bastante dependente do solvente, favorecendo a espécie zwitteriónica colorida (R-NEZ) em solventes polares e dadores de pontes de hidrogénio.²⁰

Introdução



Esquema 2 – Diferentes espécies protônicas e respetivos tautómeros da tetrametilrodamina.

Apesar de estas sondas serem alvo de estudo intenso há muitos anos e o seu comportamento de forma geral seja conhecido, o efeito combinado das interações com o solvente e do valor do pH na sua estabilidade não está bem caracterizado. Este fenómeno é particularmente relevante no caso da fluoresceína pois esta é frequentemente usada como sonda de pH e a sua distribuição nos vários ambientes de um sistema complexo (p.e célula) pode conduzir a interpretações incorretas. Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho é perceber como este efeito combinado afeta a estabilidade das espécies, tanto na fluoresceína como na rodamina. Numa tentativa de melhor interpretação dos resultados experimentais foram também efetuados cálculos teóricos.

1.2 - Sondas Reativas para Marcação de Sistemas Biológicos

A maioria das moléculas usados para marcar biomoléculas são, muitas vezes, desenhadas de forma a conter um grupo reativo na sua estrutura para facilitar a conjugação com biomoléculas. Normalmente, estes grupos reagem não só com os grupos terminais (amina e carboxilo) mas também com cadeias laterais de aminoácidos. Nomeadamente aminoácidos com a presença de grupos amina e tiol são certamente uma boa escolha para a bioconjugação uma vez que possuem

a capacidade de atuar como nucleófilos e permitem obter uma conjugação covalente. Para ligação específica a aminas existem grupos reativos como o isotiocianato e carboxil succinimidil éster. Para a ligação específica a tióis existem os grupos maleimida e o iodoacetamida. ²¹

De forma geral, a marcação de proteínas e sistemas biológicos com sondas derivadas com grupos reativos a aminas possibilita um maior grau de ligação, uma vez que estes possuem uma maior quantidade de aminoácidos com aminas nas cadeiras laterais. Por outro lado, quando é necessária uma marcação mais específica deve-se recorrer à marcação de tióis. Estes como se encontram em menor número e apenas alguns não estão a participar em ligações de dissulfeto torna a marcação bastante específica.

Como é possível ver através da figura 1.2, a Albumina de Soro Bovino possui muito menos aminoácidos com tióis nas cadeiras laterais do que aminas, para além disso, esta possui apenas um resíduo com o tiol livre (resíduo 34) o que faz com que a marcação desta com um derivado de sonda reativo a tióis seja bastante específica para este resíduo.

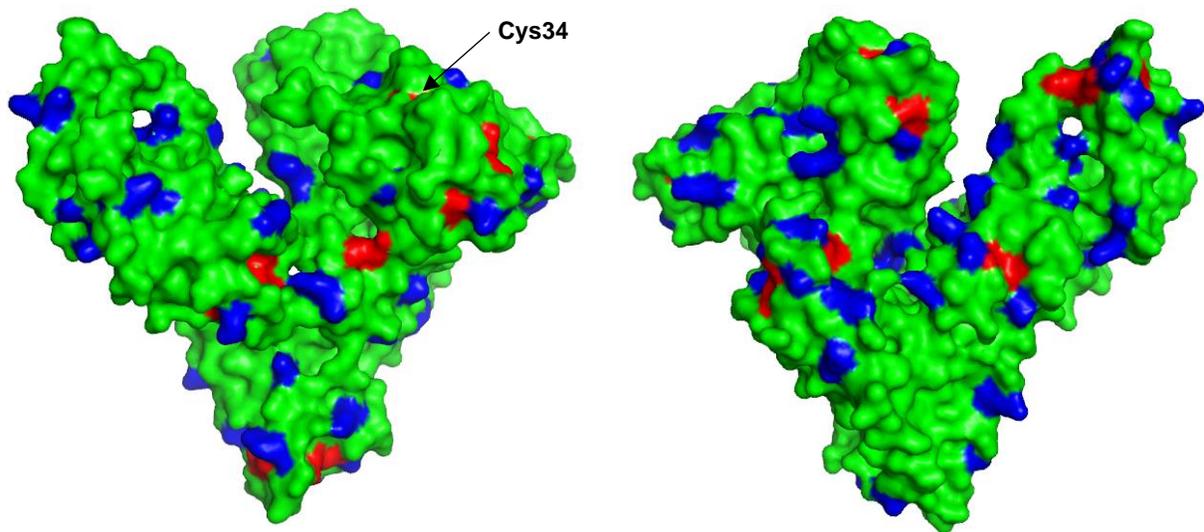
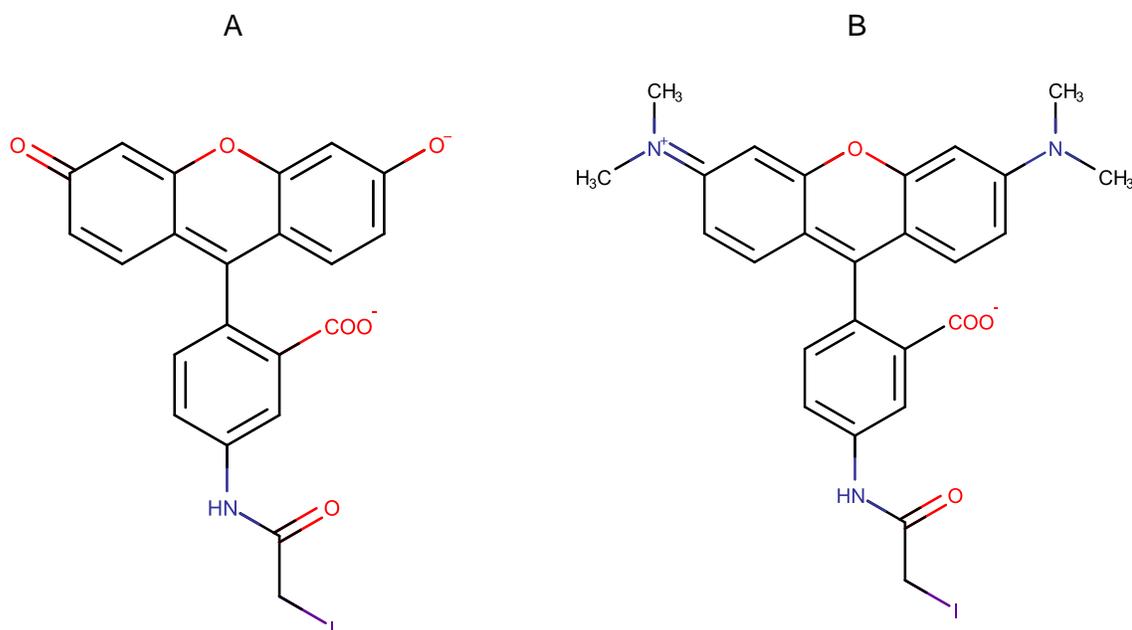


Figura 1.2 – Figura representativa da superfície, a azul, para as lisinas, a vermelho, para as cisteínas e a verde o resto da proteína BSA. ²²

Introdução

No presente estudo serão usados os derivados iodoacetamida da fluoresceína e na rodamina (esquema 3) para a marcação da Albumina de Soro Bovino (BSA).



Esquema 3 – Estrutura química das sondas reativas usadas: (A) 5-iodoacetamida- fluoresceína (B) 5-iodoacetamida-tetrametilrodamina.

O grupo, iodoacetamida, encontra-se na posição 5 do anel benzoico e possui um átomo (iodo) em que a reação de substituição por ataque nucleófilo no carbono onde este se encontra ligado é conhecida ser bastante rápida. Este tem sido usado na marcação covalentemente de proteínas e outras biomoléculas com grupos tióis livres.²³⁻²⁷

1.3 - Nanodroplets

Nanodroplets são pequenas gotas de um líquido dispersas num meio no qual são imiscíveis. Misturas de duas fases imiscíveis dispersas uma na outra, normalmente, uma fase hidrofóbica e outra hidrofílica, são consideradas uma emulsão. Estas misturas podem ser, cineticamente estáveis, mas termodinamicamente são instáveis o que significa que apesar de poder levar algum tempo o sistema estará em constante evolução e acabará eventualmente por se separar novamente. Ao adicionarmos uma molécula anfifílica ao sistema, esta irá maioritariamente para a interface, alterando a sua estrutura diminuindo substancialmente a sua energia livre, e aumentando a estabilidade da emulsão. Sendo assim possível criar sistemas estáveis com uma

cápsula feita de uma molécula anfifílica facilmente solúvel em solução aquosa e um núcleo com uma fase apolar.

O primeiro sistema deste gênero foi aprovado em 1994 pela Food and Drug Administration (FDA), tinha cerca de 4 μM de diâmetro e foi criado apenas através da sonificação de albumina de soro humano que formava uma capsula com ar no seu interior.²⁸ O primeiro sistema a encapsular um meio apolar, perfluorcarbonetos, foi reportado em 1998 como agente de transporte de oxigênio²⁹ e desde então têm sido reportados outro como agentes de entrega de fármacos³⁰⁻³³ e agentes de contraste através da vaporização do conteúdo da nano partícula.³⁴⁻³⁷

Recentemente investigadores dos Estados Unidos da América desenvolveram um nano sistema (*nanodroplet*) constituído por uma cápsula de BSA e por perfluorpentano (PFP) carregado de indocianina verde (ICG) no seu interior. Aquando a irradiação por laser da ICG leva a um aumento local da temperatura conduzindo a uma transição líquido-gás do PFP e a uma onda de pressão capaz de produzir três formas distintas de contraste, duas através do sinal fotoacústico, resultantes da vaporização e da expansão termoelástica e uma através do sinal de ultrassons, resultante do *acoustic backscatter*.³⁸

Quando estes sistemas têm aplicações médicas torna-se imprescindível avaliar o seu tamanho, estabilidade e dinâmica. Para esse fim é relevante a marcação de componentes do sistema com sondas de fluorescência. Esta marcação poderá ser conseguida por dissolução de sondas apolares no PFP, como foi feito no estudo acima referido, ou por marcação da interface. Neste trabalho iremos seguir as duas abordagens, com a tentativa de marcação do centro apolar das nanodroplets e com a utilização de BSA marcada com fluoresceína e/ou rodamina para estabilizar a interface das nanodroplets.

1.4 - Química Computacional

1.4.1 - DFT (*Density Functional Theory*)

Enquanto que a maioria dos métodos *ab initio* depende das coordenadas de todos os eletrões do sistema, a teoria do funcional da densidade é independentemente do tamanho do sistema e depende apenas das três coordenadas espaciais da sua densidade eletrónica. O início da formulação desta teoria é derivado do teorema proposto por Kato, que mostra que é possível em princípio obter a função de onda partindo da densidade eletrónica. Mais tarde, aparece Hohenberg e Kohn mostrando através de dois teoremas que primeiro, para estados fundamentais não degenerados, dois Hamiltonianos diferentes não podem ter a mesma

Introdução

densidade eletrónica e segundo que esta segue também o teorema variacional. Isto é, a densidade eletrónica do sistema será tão mais exata quanto mais baixa for a energia que esta providencie.

Apesar destes avanços, nenhum destes teoremas apresenta um formalismo matemático que associe a densidade eletrónica à energia do sistema. Contudo pouco tempo depois Kohn e Sham³⁹ apresentam baseado no método de Hartree-Fock (HF) um sistema de equações utilizando funcionais da densidade que permitem relacionar a energia total do sistema com a sua densidade eletrónica. Então à semelhança do método de HF, onde não se considera a correlação do movimento dos eletrões, Kohn-Sham hipoteticamente pensaram que, para qualquer sistema S de N-eletrões que interajam em um determinado potencial externo $V_{\text{ext}}(\vec{r})$, há um sistema virtual S_s de N-eletrões com exatamente com a mesma densidade que não interagem:

$$E[n] = T_s[n] + \int d^3r V_{\text{ext}}(\vec{r})n(\vec{r}) + E_H[n] + E_{\text{xc}}[n] \quad (1.1)$$

Onde, $T_s[n]$ corresponde à energia cinética dos eletrões do sistema não interagente, $\int d^3r V_{\text{ext}}(\vec{r})n(\vec{r})$ ao potencial de interação entre os eletrões e o potencial externo, $E_H[n]$ à interpretação clássica do potencial de interação eletrónica e $E_{\text{xc}}[n]$ que para além de conter a contribuição da energia cinética para a interação eletrónica ainda contém todas as contribuições não clássicas da energia potencial. Escrevendo a equação variacional para o funcional da equação 1.1, Kohn-Sham chegaram então às suas hoje conhecidas equações:

$$\left[-\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + V_{\text{ext}}(\vec{r}) + e^2 \int d^3r' \frac{n(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} + V_{\text{xc}}(\vec{r}; [n]) \right] \varphi_j(\vec{r}) = \varepsilon_j \varphi_j(\vec{r}) \quad (1.2)$$

$$n(\vec{r}) = \sum_j |\varphi_j(\vec{r})|^2 \quad (1.3)$$

Onde, $V_{\text{xc}}(\vec{r}; [n]) = \delta E_{\text{xc}}[n] / \delta n(\vec{r})$.

A densidade eletrónica é obtida através das orbitais monoelétrónicas de Kohn-Sham (φ_j), que por sua vez são descritas por combinações lineares de funções de base e otimizadas por um processo iterativo SCF (*Self Consistent Field*).

O grande desafio desta e outras teorias é a consideração do termo $E_{\text{xc}}[n]$, uma vez que até à data não existe expressão analítica para a descrever por isso tem de ser descrito através de modelos aproximados, funcionais aproximados no caso do DFT.

Os primeiros funcionais a aparecerem são do tipo LDA (*Local Density Approximation*) e são baseados na aproximação da densidade eletrônica local, como o próprio nome indica o funcional de troca e correlação depende somente do valor da densidade eletrônica em cada ponto do espaço. Mais tarde surgem funcionais que o seu valor depende não só da densidade em cada ponto do espaço, mas também do seu gradiente, chamados funcionais GGA (*Generalized Gradient Approximation*). Dentro deste grupo, existem ainda os meta-GGA que passam também a incorporar, para além do já considerado nos GGA, o laplaciano da densidade.

Esses funcionais apesar de menos usados hoje em dia, a sua constante inovação e construção torna possível melhorar funcionais híbridos, em que o funcional de troca e correlação inclui para além da troca exata de HF combinação de outros funcionais, em percentagens variáveis.

Os métodos DFT têm sido implementados na previsão de propriedades moleculares de sistemas polieletrônicos, devido ao seu baixo custo computacional, a sua elevada exatidão na previsão de geometrias, energias e espectros de excitação e de emissão. A grande limitação desta teoria é a inexistência de uma metodologia sistemática que garanta uma melhoria nos resultados obtidos.

1.4.2 - TD-DFT (*Time Dependent – Density Functional Theory*)

A TD-DFT⁴⁰ é uma extensão da teoria do funcional da densidade aplicada a fenómenos físicos dependentes do tempo. O seu fundamento matemático deve-se a Runge e Gross⁴¹ que um pouco como nos teoremas derivados por Hohenberg-Kohn estabeleceu que para um dado sistema de eletrões no estado inicial ($t=0$) existe uma correspondência única entre o potencial externo e a densidade eletrônica dependentes do tempo. Assim do mesmo modo que na DFT é possível escrever as equações de Kohn-Sham dependentes do tempo:

$$\left[-\frac{\hbar^2 \nabla^2}{2m} + V_{\text{ext}}(\vec{r}, t) + e^2 \int d^3r' \frac{n(\vec{r}', t)}{|\vec{r} - \vec{r}'|} + V_{\text{xc}}(\vec{r}, t; [n]) \right] \varphi_j(\vec{r}, t) = \epsilon_j \varphi_j(\vec{r}, t) \quad (1.4)$$

$$n(\vec{r}) = \sum_j |\varphi_j(\vec{r}, t)|^2 \quad (1.5)$$

Contudo, nesta teoria o termo V_{xc} não pode ser derivado através do funcional da energia, como é feito no caso independente do tempo (DFT). Pegando numa outra quantidade análoga à energia, Runge e Gross após algumas correções derivaram as equações de Kohn-Sham dependentes do tempo (equações 1.4 e 1.5) mostrando que o potencial V_{xc} pode ser escrito na forma $V_{\text{xc}}(\vec{r}; t) = \delta A_{\text{xc}}[n] / \delta n(\vec{r}, t)$.

Introdução

Através desta teoria é possível ter acesso às energias de excitação verticais e momentos de transição dipolares a partir da resposta do sistema a pequenas perturbações temporais. E recorrendo a programas que fazem um ajuste de uma gaussiana ou lorentziana a estas é possível prever espectros de absorção. Uma vez que esta técnica possui muitos dos fundamentos teóricos que a DFT, partilha as mesmas limitações.

1.5 - Bases de Funções

As funções de base são funções matemáticas usadas para construir as orbitais monoelétrónicas faladas no capítulo 1.3.1. Inicialmente, estas eram funções do tipo STO (Slater Type Orbitals) ⁴², porém estas consumiam muito tempo computacional uma vez que a resolução analítica dos seus integrais é realmente impossível. Mais tarde foram introduzidas funções GTO (*Gaussian Type Orbitals*) ⁴³, estas apesar de descreverem matematicamente pior o comportamento das orbitais, do que as anteriores (STO), são facilmente integráveis e quando combinadas aproximam-se da representação orbital feita pelas STO. O tamanho da base de funções depende de quantas funções do tipo gaussianas são usadas para descrever as orbitais monoelétrónicas.

A bases de funções mais simples a aparecer foram as chamadas *single- ζ* onde é usada apenas uma função GTO para descrever cada orbital monoelétrónica. Mais tarde, apareceram as *double- ζ* onde já são usadas duas funções GTO combinadas linearmente para descrever cada orbital. As primeiras são funções que descrevem orbitais com número quântico de momento angular superior às orbitais de valência do átomo a ser representado. No caso do átomo de hidrogénio, são funções do tipo p. Estas funções adicionam alguma flexibilidade à descrição das orbitais. Por exemplo, a orbital s centrada no átomo de hidrogénio numa molécula pode ter um perfil elipsoide, em vez de esférico, sendo necessário uma função do tipo p para a sua adequada descrição. As segundas são funções que descrevem com maior exatidão as regiões mais afastadas dos núcleos, onde a densidade eletrónica é pequena. Estas funções têm um expoente reduzido, quando comparado com o expoente das funções do cerne ou de valência e, por isso, a sua amplitude decai mais lentamente com o aumento da distância aos núcleos.

Um tipo de bases de funções bastante usadas são as *split-valence* criadas por Pople⁴⁴. Estas são representadas por **X**-**YZG**, onde a letra **X** é o número de gaussianas usadas na base de funções para descrever as orbitais do core dos átomos e letras **Y** e **Z** indicam que as orbitais de valência são descritas por 2 bases de funções, uma com a combinação de **Y** número de gaussianas e outra com **Z** número de gaussianas. A quantidade de números seguintes ao hífen indica se a base de função é *single- ζ* (1 número a seguir ao hífen), *double- ζ* (2 números a seguir ao hífen) e

assim sucessivamente. Neste trabalho serão usadas as bases de função 6-31G(d) e 6-311++G(d,p). As letras entre parênteses dizem respeito às funções de polarização, no caso da primeira, funções de orbitais do tipo d aplicadas aos átomos pesados (todos menos o hidrogénio) e no caso da segunda são adicionadas também funções de polarização aos átomos de hidrogénio. Os dois sinais + representam a adição de duas funções difusas à base de funções.

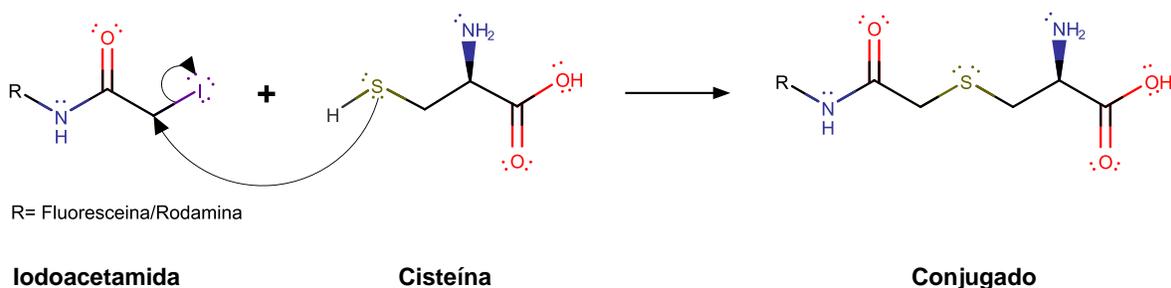
Será também usada um outro tipo de base de funções, def2-TZVPP (*triple-zeta valence with two sets of polarization functions*), criadas por Weigend e Ahlrichs.⁴⁵

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 - Ligação das Sondas à Cisteína

As sondas reativas 5-iodoacetamida-fluoresceína (5-IAF) e 5-iodoacetamida-tetrametilrodamina (5-TMRIA) foram adquiridas à Setareh Biotech e o aminoácido ($C_3H_7NO_2S$) L-cisteína com alta pureza à VWR. O meio de reação foi escolhido conforme o meio usado para marcação de proteínas. Assim, de forma a obter um meio reacional tamponado a pH 8.3 adicionou-se a vinte partes de uma solução de tampão fosfato pH 7.4 uma parte de uma solução com 0.2 M de bicarbonato de sódio ajustada a pH 9 com hidróxido de sódio 2 M. A cisteína foi diretamente dissolvida no meio reacional e a sonda dissolvida em dimetilformamida (DMF) momentos antes de começar a reação. Esta foi adicionada gota a gota com agitação lenta do tubo reacional e incubada a 37 °C, durante 2h com agitação lenta, protegida da luz e seguida por TLC (*Thin-Layer Chromatography*).



Esquema 4 – Reação da ligação das sondas reativas à cisteína.

Nesta reação o grupo tiol da cisteína atua como nucleófilo e segue o mecanismo de substituição nucleofílica biomolecular (SN_2), isto é, a ligação quebrada e a ligação formada ocorrem em simultâneo estando assim a velocidade desta dependente das concentrações dos dois reagentes.

Efetuarão-se 3 diferentes reações com vista a seguir a ligação à cisteína, nomeadamente para avaliar relativamente à especificidade da ligação ao grupo tiol da cisteína e/ou reação com o grupo amina:

- Reação A1 (Cys-Flu) em que se fez reagir a 5-IAF e a cisteína na proporção de 1:1.
- Reação A2 (Cys-Flu) em que se fez reagir a 5-IAF e a cisteína na proporção de 1:10.
- Reação B (Cys-Rdm) em que se fez reagir a 5-TMRIA e a cisteína na proporção 1:1.

Materiais e Métodos

No final da reação, e por evidencia em TLC, usou-se metanol/água (4:1) como eluente em cromatografia numa coluna de sílica RP-18, como método de purificação. O produto foi armazenado protegido da luz a -20 °C.

2.2 - Marcação da Albumina de Soro Bovino

O meio reacional foi gerado igualmente através da mistura da solução de bicarbonato de sódio ao tampão fosfato na proporção de 1:20. A albumina de soro bovino foi previamente conjugada com 4 mM de ácido octanóico ($C_8H_{16}O_2$) de forma a preencher possíveis cavidades de ligação não-covalente. Procedeu-se as reações da marcação da proteína com as duas sondas de forma equimolar durante 2h a 37 °C, com agitação lenta e protegidas da luz.

As eventuais moléculas de sonda livre e sonda hidrolisada foram removidas fazendo passar o produto da marcação por uma coluna Sephadex G-25 de 5 mL. Começou por se equilibrar a coluna com 50 mL de tampão fosfato com uma velocidade de fluxo de 5 mL/min, de seguida injetou-se a amostra baixando o fluxo para 2 mL/min se forma a otimizar a sua separação, o bioconjugado é eluído nas primeiras frações e foi recolhido para vários eppendorfs e armazenado a -20 °C.

No sentido de avaliar a presença e remover sondas ligadas não-covalentemente à proteína, procedeu-se a uma precipitação da proteína em metanol frio. Para isso adicionou-se metanol frio (-20 °C) a uma alíquota do bioconjugado (proporção final solvente aquoso/metanol igual a 1:4 v/v), precipitou-se a proteína por centrifugação (15.000 g, 15 minutos) e retirou-se o sobrenadante. O precipitado corado foi resuspendido em tampão de forma a permitir à albumina adquirir novamente a sua estrutura nativa. O metanol foi evaporado da fração sobrenadante e o resíduo resuspendido em tampão.

O grau de ligação das sondas à proteína foi calculado através da razão entre a concentração da sonda e a concentração da proteína. As concentrações foram calculadas através das respetivas absorções, a 490 nm para a fluoresceína, a 550 nm para a rodamina e a 280 nm para a BSA, em que nesta última se descontou o valor da absorção da sonda ligada.

2.3 - Cálculo de pK_a 's

Em 1917, e através do trabalho inicial de Lawrence Joseph Henderson, Karl Albert Hasselbalch definiu o pK_a como o pH onde as concentrações de ácido e da sua base conjugada são iguais ficando esta relação conhecida por equação de Henderson-Hasselbalch (equação 2.1)

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right) \quad 2.1$$

Neste trabalho foram calculados os diferentes pK_a para as sondas ligadas à cisteína tanto em água como em misturas de etanol/água (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50) e para a sonda ligada à proteína apenas em água. Para isso realizaram-se titulações ácido-base de forma a incluir todas as espécies de protonação existentes para cada sonda. Cada um desses pontos foi seguido por espectroscopia de absorção no UV-Vis e espectroscopia de fluorescência.

Para o ajuste foram calculadas as concentrações de cada espécie através das equações resultantes do seu equilíbrio ácido-base (equações 2.2-2.7). Para esse cálculo foi necessário estimar inicialmente as constantes K_{a1} , K_{a2} e K_{a3} .

Fluoresceína

$$[FH_3^+] = \frac{[FH_2][H^+]}{K_{a1}} \quad 2.2$$

$$[FH_2] = \frac{[FH^-][H^+]}{K_{a2}} \quad 2.3$$

$$[FH^-] = \frac{[F^{2-}][H^+]}{K_{a3}} \quad 2.4$$

$$[F^{2-}] = \frac{K_{a3}K_{a2}K_{a1}}{[H^+]^3 + [H^+]^2K_{a1} + [H^+]K_{a1}K_{a2} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}} \quad 2.5$$

Rodamina

$$[R] = \frac{K_{a1}}{[H] + K_{a1}} \quad 2.6$$

$$[RH^+] = \frac{[R][H^+]}{K_{a1}} \quad 2.7$$

A função de ajuste aos pontos experimentais da absorção e da fluorescência é então gerada pela soma das contribuições de cada espécie para a absorção/fluorescência em cada pH ao comprimento de onda escolhido. Para este cálculo é também necessário estimar um coeficiente de contribuição de cada espécie a cada comprimento de onda. Usou-se a ferramenta solver no

Materiais e Métodos

programa Microsoft Excel para otimizar os valores estimados das constantes (K_{a1} , K_{a2} e K_{a3}) e dos coeficientes de contribuição.

Por fim o pK_a é calculado através da relação $pK_a = -\log K_a$.

2.4 - Formação de *Nanodroplets*

Na formação das *nanodroplets* começou-se por descongelar a proteína BSA marcada, passou-se a proteína por uma coluna Sephadex G-25 de forma a trocar o solvente para água. De seguida, transferiu-se 0.3 mL de PFP para um vial ao qual se adicionou 2.7 mL de proteína marcada com uma concentração de 12 μ M. A solução de PFP e o vial foram mantidos em gelo durante este processo pois o PFP tem um ponto de ebulição de 29 °C. Uma vez feita a mistura, esta foi submetida a vortex durante 15s e logo de seguida a ultrassons por 3 minutos. Uma solução turva é então obtida, a partir da qual foram preparadas duas diluições, na proporção 1:5 e 1:20 em água.

2.5 - Técnicas de Caracterização Estrutural, Espectroscópica e Fotofísica.

2.5.1 - Espectroscopia de Absorção UV-Vis

Os espectros de absorção no UV-Vis realizados neste trabalho foram efetuados num espectrofotómetro Unicam UV530.

2.5.2 - Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência realizados neste trabalho foram efetuados num espectrofotómetro Cary Eclipse.

2.5.3 - Dynamic Light Scattering (DLS)

O diâmetro das *nanodroplets* foi avaliado por DLS num aparelho Malvern Nano ZS.

2.5.4 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de 1H - e ^{13}C -RMN foram recolhidos num espectrofotómetro Bruker-Avance III (400 MHz), operando a uma frequência de 400.13 e 100.61 MHz, respetivamente. Todos os espectros foram efetuados a 25 °C.

2.6 - Microscopia Confocal

Esta técnica foi realizada num microscópio Carl Zeiss no MICC (Microscopy Imaging Center of Coimbra) sediado no CNC (Center for Neuroscience and Cell Biology, Coimbra).

Este tipo de microscopia difere da microscopia convencional devido à presença de um *pinhole* inserido num plano conjugado ao plano da objetiva e ao plano da amostra, nisto resulta que o detetor apenas conseguirá ter acesso à luz que passa pelo *pinhole*. O feixe de luz proveniente do laser é difratado pelo o espelho dicroico e focado num só plano da amostra de cada vez. Toda a restante luz vinda de cima ao abaixo do plano de foco não vai estar em foco com o plano da objetiva e perde-se nas paredes opacas que envolvem o *pinhole*.

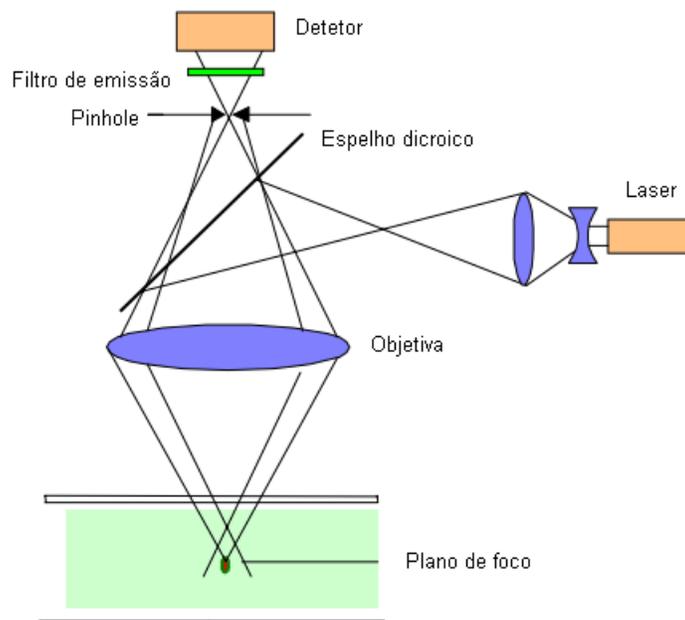


Figura 2.1 – Microscópio confocal de varrimento a laser. ⁴⁶

Para este estudo foram usados os lasers com excitação a 405 nm, 488 nm e 561 nm. As amostras foram observadas numa placa de 8 poços (Ibidi, não tratada) com cerca de 200 μ L de solução. Ainda se testou meter as amostras numa placa de 8 poços (Ibidi, tratada com poli-lisina) mas não se observou diferença para as amostras nos poços não tratados.

Materiais e Métodos

2.7 - Métodos Computacionais

Todos os cálculos computacionais presentes neste trabalho foram realizados no software gaussian16⁴⁷, usando os métodos DFT e TD-DFT. No caso do método de DFT foi usado o funcional híbrido B3LYP.⁴⁸⁻⁵⁰ No método de TD-DFT para a previsão de energias de excitação foram usados os funcionais híbridos B3LYP, PBE0^{51, 52}, M06⁵³ e o funcional meta-GGA tHCTHhyb⁵⁴. Bases de funções usadas foram 6-311+G(d), 6-311++G(d,p) e def2TZVPP.

Os cálculos feitos na presença de solvente, este foi representado pelo o método de PCM (*Polarizable Continuum Model*)⁵⁵⁻⁵⁷. Neste método o solvente é descrito de forma implícita e apenas são consideradas algumas das suas propriedades através da introdução de parâmetros como a sua constante dielétrica, o seu carácter dador-aceitante de ligações de hidrogénio, etc.

Os espectros de absorção foram previstos com base nas energias de excitação calculadas para os primeiros 20 estados eletronicamente excitados no software GaussSum.⁵⁸

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 - Estudo Computacional

Este estudo tinha por objetivo perceber um pouco melhor a influência do meio nos espectros de absorção e fluorescência das sondas, e como estes seriam afetados pela ligação à cisteína. Contudo, o estudo feito na absorção mostrou-se mais complexo do que o previsto, não sendo possível fazer o estudo da fluorescência.

Nos próximos capítulos apresentar-se-ão, num primeiro, resultados referentes à previsão dos espectros de absorção da Cys-Flu (F^{2-}) e Cys-Rdm (R-NEZ) em água e etanol, e num segundo, o estudo feito das interações da fluoresceína (F^{2-}) com o meio e como este pode afetar o seu espectro de absorção.

3.1.1 - Previsão de Espectros de Absorção

Como foi referido a teoria do funcional da densidade não tem uma metodologia sistemática que garanta uma melhoria dos resultados, ou seja, não existe o funcional perfeito, existem sim funcionais que preveem melhor as propriedades de um tipo de moléculas do que outros. Por este facto, experimentaram-se alguns funcionais e algumas bases de funções inicialmente no cálculo do espectro de absorção da fluoresceína livre (F^{2-}) em água e em etanol e, posteriormente, com os funcionais que mostraram melhores resultados avançou-se para a rodamina, e por fim para as sondas ligadas à cisteína. Começou então por se otimizar a estrutura da espécie dianiónica em água e em etanol. A figura 3.1 mostra a estrutura otimizada da F^{2-} à esquerda e à direita, respetivamente, em água e etanol ao nível PCM/B3LYP/6-311+G(d).

Resultados e Discussão

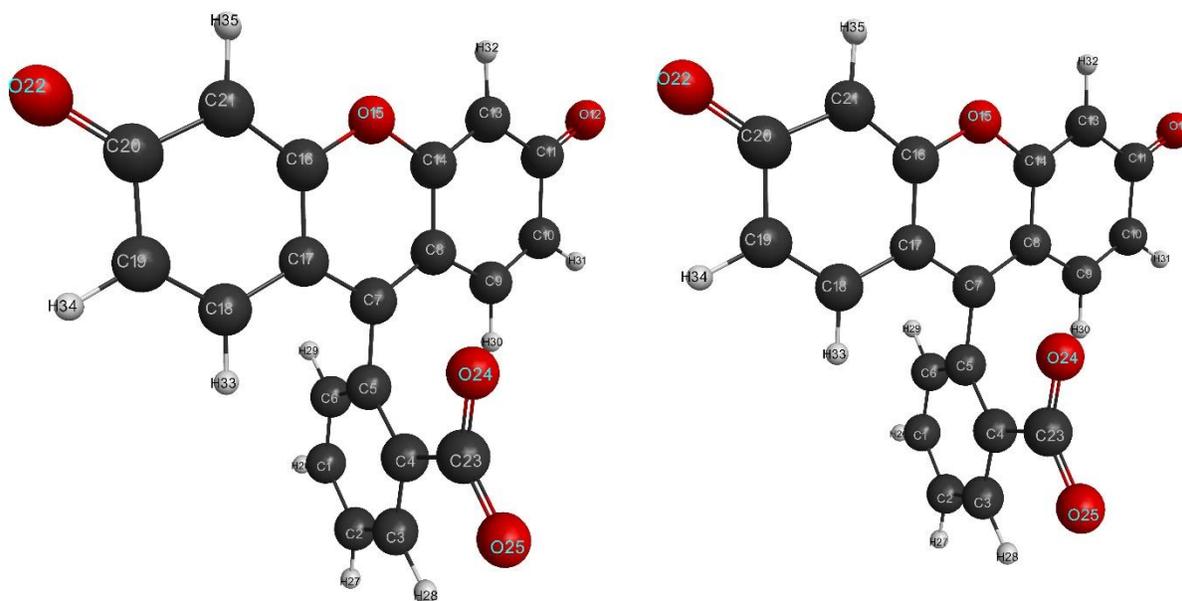


Figura 3.1 – Estruturas da espécie F^{2-} à esquerda em água e à direita em etanol ao nível PCM/B3LYP/6-311+G(d).

Aparentemente as geometrias são iguais. Avaliaram-se dois parâmetros que pudessem interferir na ressonância dos anéis e provocar um desvio do λ_{cal} e conseqüentemente explicar o observado experimental. Um desses parâmetros o ângulo diedro $C_{17}-C_7-C_5-C_6$ sendo em água 84.54° e em etanol 84.29° . Apesar da diferença ser baixa, a estrutura em água apresenta um ângulo entre o plano do xanteno e o plano do benzoico mais perto dos 90° . E o outro foi a distância entre o C_7 e o O_{24} sendo em água 2.628 \AA e em etanol 2.624 \AA . A medição deste último deve-se ao facto de uma aproximação destes átomos pode aproximar a estrutura da F^{2-} da estrutura da F-NEL, sendo que se sabe que a formação da ligação entre estes dois átomos quebra completamente a ressonância do anel do xanteno. Contudo, os valores são idênticos, sendo descartada esta possibilidade.

Uma vez tendo as estruturas otimizadas prosseguiu-se para o cálculo dos seu espectros com vários funcionais (B3LYP, PBE0, M06 e tHCTHhyb) com duas bases de funções diferentes (6-311++G(d,p) e def2-TZVPP).

O resumo do cálculo da previsão da energia de excitação S_0-S_1 feito a diferentes níveis de teoria encontra-se na tabela 1. Nesta pode ser observado que a maioria dos funcionais testados conseguem prever, ainda que ligeiramente, um desvio para o vermelho e um aumento da absorvidade (força do oscilador) quando se muda de água para etanol. Com estes resultados e com base no menor desvio ao valor experimental foi possível selecionar os funcionais B3LYP e tHCTHhyb. Além disso, é possível ver que usando a base de funções 6-311++G(d,p) consegue-se também uma melhor descrição.

Tabela 1 – Resumo dos resultados de previsão teórica da energia de excitação S_0-S_1 para a fluoresceína feito a vários níveis de teoria.

Fluoresceína Livre

Método e base	λ_{cal} (nm)	F.oscilador	Desvio (%)	OM envolvidas
Água PCM ($\lambda_{exp}= 490$ nm) OPT – PCM/B3LYP/6-311+G(d)				
M06/6-311++G (d,p)	436	0.79	-11.14	HOMO->LUMO (98%)
M06/def2-TZVPP	433	0.78	-11.80	HOMO->LUMO (98%)
PBE0/6-311++G (d,p)	433	0.82	-11.79	HOMO->LUMO (98%)
PBE0/def2-TZVPP	431	0.78	-12.17	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/6-311++G (d,p)	437	0.79	-11.00	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/def2-TZVPP	439	0.75	-10.58	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	447	0.75	-8.96	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	443	0.72	-9.80	HOMO->LUMO (98%)
Etanol PCM ($\lambda_{exp}= 498$ nm) OPT – PCM/B3LYP/6-311+G(d)				
M06/6-311++G (d,p)	438	0.80	-11.9	HOMO->LUMO (98%)
M06/def2-TZVPP	436	0.78	-12.3	HOMO->LUMO (98%)
PBE0/6-311++G (d,p)	433	0.84	-12.8	HOMO->LUMO (98%)
PBE0/def2-TZVPP	433	0.79	-12.9	HOMO->LUMO (99%)
B3LYP/6-311++G (d,p)	439	0.80	-11.7	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/def2-TZVPP	441	0.76	-11.4	HOMO->LUMO (99%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	449	0.76	-9.7	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	443	0.73	-10.9	HOMO->LUMO (98%)

Avançou-se então para as otimizações da tetrametilrodamina (R-NEZ) em água e em etanol e posterior cálculo da energia de excitação S_0-S_1 . As estruturas otimizadas em água e em etanol ao nível PCM/B3LYP/6-311+G(d) encontram-se na figura 3.2 e na tabela 2 pode-se ver os cálculos de TD-DFT feitos posteriormente para estas.

Resultados e Discussão

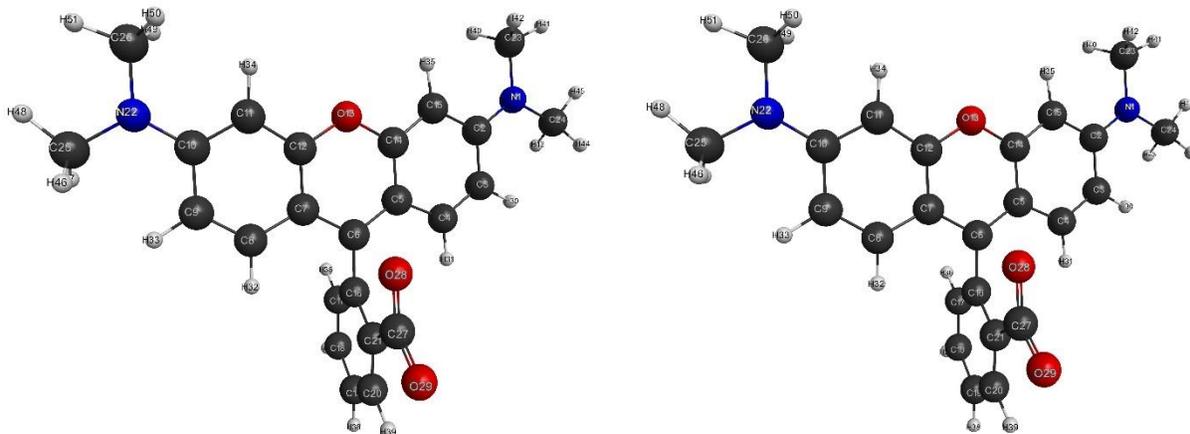


Figura 3.2 – Estruturas da espécie R-NEZ à esquerda em água e à direita em etanol ao nível PCM/B3LYP/6-31G(d).

Para as estruturas na figura 3.2 avaliou-se também os dois parâmetros referidos anteriormente para a fluoresceína. O ângulo diedro, que neste caso é o $C_7-C_6-C_{16}-C_{17}$, sendo 82.06° em água e 80.58° em etanol, também neste caso a estrutura em água parece ter um ângulo mais perto do 90° que a estrutura em etanol. A ligação C_6-O_{28} foi também medida, sendo 2.388 \AA e 2.293 \AA . Assim, para a rodamina é possível ver que em etanol existe uma aproximação do O_{28} ou C_6 , característico de uma estabilização da espécie R-NEL em solventes mais apolares e menores dadores de ligações de hidrogénio.

Através da tabela 2, é então possível ver os resultados dos cálculos da energia de excitação S_0-S_1 para as duas estruturas da figura 3.2. Esta mostra que todos os funcionais anteriormente selecionados preveem para a tetrametilrodamina um afastamento considerável das orbitais HOMO-LUMO quando se passa de água para etanol, apesar de experimentalmente isso não se observar, pode ainda ver-se que mais uma vez o funcional tHCTHhyb foi o que registou um menor desvio ao experimental. A previsão do aumento da energia de excitação pode, em princípio, ser explicado pela aproximação do O_{24} ao C_6 que pode quebrar ligeiramente a ressonância.

Tabela 2 – Resumo dos resultados de previsão teórica da energia de excitação S⁰-S¹ para a fluoresceína com vários funcionais.

Rodamina Livre

Método e base	λ_{cal} (nm)	F.oscilador	Desvio (%)	OM envolvidas
Água PCM ($\lambda_{exp}= 548$ nm)		OPT - B3LYP/6-311+G(d)		
B3LYP/6-311++G (d,p)	457	0.84	-16.6	HOMO->LUMO (99%)
B3LYP/def2-TZVPP	455	0.84	-17.0	HOMO->LUMO (99%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	467	0.80	-14.7	HOMO->LUMO (99%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	465	0.79	-15.2	HOMO->LUMO (99%)
Etanol PCM ($\lambda_{exp}= 547$ nm)		OPT - B3LYP/6-311+G(d)		
B3LYP/6-311++G (d,p)	451	0.82	-17.5	HOMO->LUMO (99%)
B3LYP/def2-TZVPP	449	0.82	-18.0	HOMO->LUMO (99%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	461	0.78	-15.7	HOMO->LUMO (99%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	459	0.78	-16.2	HOMO->LUMO (99%)

Posteriormente otimizou-se as estruturas Cys-Flu (F²⁻) e Cys-Rdm (R-NEZ) em água e em etanol ao nível PCM/B3LYP/6-311+G(d) e calculou-se os seus espectros de absorção com os funcionais e bases de funções anteriores. A figura 3.3 mostra as estruturas otimizadas para a Cys-Flu e para a Cys-Rdm e a tabela 3 os resultados do λ teórico obtido.

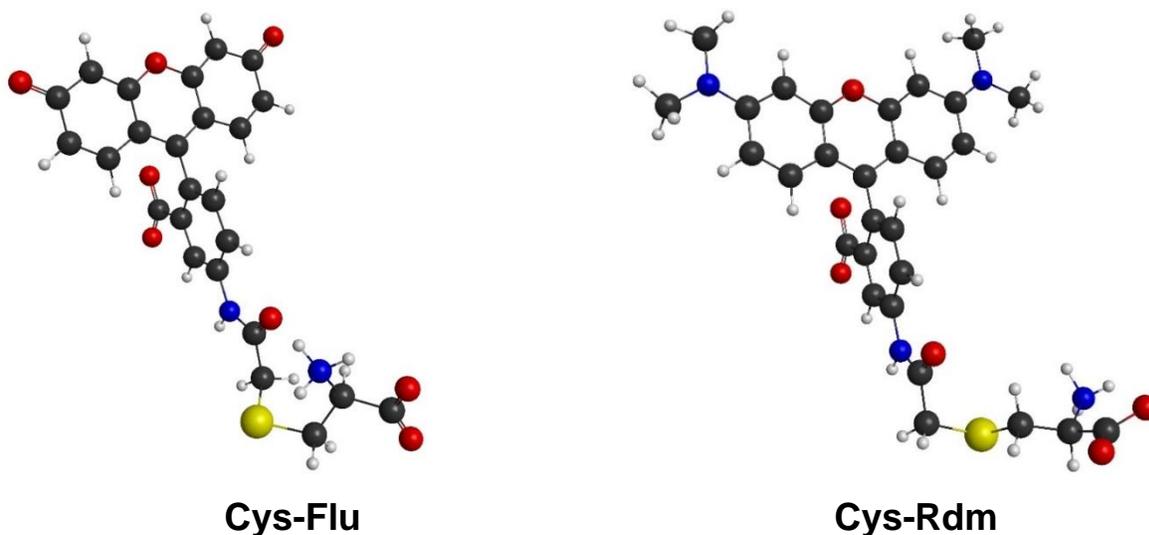


Figura 3.3 – Estrutura otimizada em água, à esquerda da Cys-Flu e à direita da Cys-Rdm, com PCM/B3LYP/6-31G(d).

Resultados e Discussão

Tabela 3 – Resumo dos resultados de previsão teórica da energia de excitação S^0-S^1 para a Cys-Flu e Cys-Rdm com vários funcionais.

Cys-Flu

Método e base	λ_{cal} (nm)	F.oscilador	Desvio (%)	OM envolvidas
Água PCM ($\lambda_{exp}= 489$ nm) OPT - B3LYP/6-31G(d)				
B3LYP/6-311++G (d,p)	439	0.78	-10.31	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/def2-TZVPP	436	0.75	-10.97	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	444	0.75	-9.34	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	441	0.71	-9.95	HOMO->LUMO (98%)
Etanol PCM ($\lambda_{exp}= 498$ nm) OPT - B3LYP/6-31G(d)				
B3LYP/6-311++G (d,p)	441	0.79	-11.24	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/def2-TZVPP	438	0.76	-11.91	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	446	0.76	-10.28	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	443	0.72	-10.91	HOMO->LUMO (98%)

Cys-Rdm

Água PCM ($\lambda_{exp}= 548$ nm) OPT - B3LYP/6-31G(d)				
B3LYP/6-311++G (d,p)	461	0.83	-15.89	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/def2-TZVPP	459	0.82	-16.30	HOMO->LUMO (98%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	471	0.78	-14.06	HOMO->LUMO (97%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	469	0.77	-14.45	HOMO->LUMO (97%)
Etanol PCM ($\lambda_{exp}= 547$ nm) OPT - B3LYP/6-31G(d)				
B3LYP/6-311++G (d,p)	459	0.82	-16.01	HOMO->LUMO (98%)
B3LYP/def2-TZVPP	469	0.82	-14.30	HOMO->LUMO (97%)
tHCTHhyb/6-311++G (d,p)	470	0.78	-14.15	HOMO->LUMO (97%)
tHCTHhyb/def2-TZVPP	480	0.75	-12.17	HOMO->LUMO (95%)

Estes cálculos teóricos preveem igualmente para a Cys-Flu uma ligeira diminuição na energia da excitação e um ligeiro aumento na força do oscilador quando se passa de água para etanol. Podem ainda ser comparados com os resultados teóricos obtidos para a fluoresceína livre (tabela 1) e vê-se que, de forma geral, estes preveem que a ligação à cisteína resulta num desvio para o azul.

A mesma análise pode ser feita para a Cys-Rdm, onde através dos resultados da tabela 3, observa-se que estes geralmente preveem uma diminuição na energia de excitação na passagem de água para etanol. E também comparando estes resultados com dos da rodamina livre (tabela

2) é possível ver que estes preveem que a ligação à cisteína leva a um desvio do λ_{cal} para o vermelho, contrariamente ao que se observa para a fluoresceína.

3.1.2 - Efeito do Solvente

No capítulo anterior é notável que a energia de excitação prevista tem um desvio ainda considerável para o valor observado experimental, para além disso, parece também não prever muito bem a dependência com o solvente. Por este motivo, tentou-se perceber possíveis interações com o solvente que explicassem essa dependência e o desvio comparado com o experimental.

Uma vez que os cálculos anteriores simplesmente descrevem o solvente implicitamente (fazendo apenas variar parâmetros do solvente, como a constante dielétrica, etc.) tentou-se estudar a forma como a fluoresceína (F^{2-}) é afetada na presença de algumas moléculas explícitas de solvente.

A figura 3.4 mostra, à esquerda o sistema submetido a otimização ao nível PCM/B3LYP/6-31G(d) e, à direita, o sistema depois de otimizado.

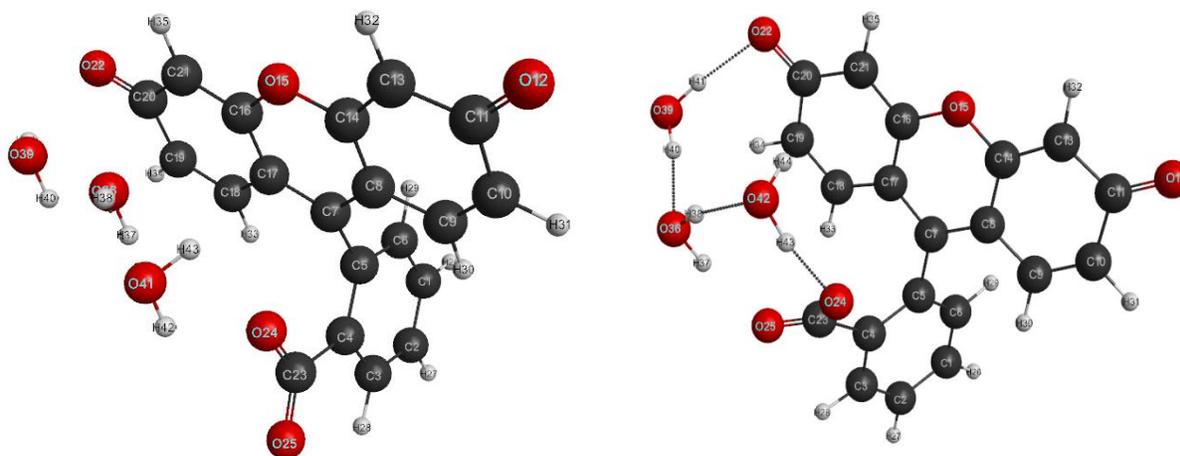


Figura 3.4 – Estrutura da fluoresceína com 3 moléculas de água explícitas, à esquerda antes de ser otimizado e à direita depois de ser otimizado ao nível PCM/B3LYP/6-31G(d).

As posições das moléculas de água foram escolhidas pelo facto de se perspetivar uma possível interação entre elas, o O_{22} (xanteno) e o O_{24} (carboxilo). A figura com o sistema otimizado mostra exatamente isso, uma interação entre as moléculas de água, o oxigénio do xanteno e o oxigénio do carboxilo. Derivado a esta interação há uma torção do ângulo diedro $C_{17}-C_7-C_5-C_6$ passando de 84.5° para 117° . Quando se calcula o espectro de absorção para a geometria otimizada este

Resultados e Discussão

mostra um desvio considerável para o vermelho, sendo este mais próximo do observado experimentalmente. Uma vez que nos cálculos anteriores (capítulo 3.1.1) este ângulo já tinha mostrado pequenas variações quando a molécula passa de água para etanol, decidiu-se procurar uma interpretação da influência da sua variação no espectro de absorção da fluoresceína.

Para isso, realizou-se um cálculo rotacional do ângulo diedro entre o benzeno e o xanteno e calcularam-se as energias de excitação S_0-S_1 para vários valores deste ao nível PCM/B3LYP/6-31G(d). A tabela 4 mostra para cada valor do ângulo a diferença de energia relativamente ao conformero de menor energia, a sua abundância relativa, a energia calculada para a excitação vertical e esta novamente calculada consoante a probabilidade de existência de cada conformero.

Tabela 4 - Resumo dos resultados de previsão teórica da energia de excitação S^0-S^1 para o estudo feito da rotação do ângulo diedro $C_{17}-C_7-C_5-C_6$ (figura 3.4) na fluoresceína. A otimização para cada variação angular e para o cálculo da energia de excitação foram feitos ao nível PCM/B3LYP/6-31G(d).

Cálculo rotacional do ângulo diedro entre o benzeno e o xanteno

Ângulo (°)	^a Energia (J/mol)	^b Probabilidade	λ_{cal} (nm)
Água			
85	-	0.35	422
103	1207	0.22	427
121	6639	0.02	438
139	23553	0.00	452
157	57892	0.00	471
175	113806	0.00	492
193	119916	0.00	571
211	38817	0.00	462
229	13430	0.00	445
247	3127	0.10	432
265	315	0.31	423
Σ		1.00	426*

^a Diferença de energia relativamente ao conformero com o ângulo diedro de 85 ° (conformero menos energético)

^b Probabilidade calculada com base na distribuição de Boltzmann.

O espectro de absorção obtido experimentalmente para a espécie dianiónica da fluoresceína em solução aquosa apresenta um máximo de absorção a 490 nm.⁶ Como é possível ver através da tabela 4 os conformeros em que o ângulo é mais próximo de 180° (em que o plano do xanteno se encontra paralelo ao plano do benzoico) são os que melhor preveem a transição obtida experimentalmente. Contudo, estes são também os que têm uma maior energia associada e, por

isso, uma abundância relativa mais baixa. Devido a isto quando se calcula o λ_{cal} , sendo o somatório das contribuições de cada conformero ponderada pela sua abundância relativa (λ^*_{cal}), este apenas apresenta um desvio de 4 nm para o vermelho comparado com o conformero de menor energia.

Para além disso, se este desvio fosse apenas devido a interações por pontes de hidrogénio com solvente não seria de esperar um desvio para maiores comprimentos de onda em etanol e ainda maiores em DMSO.⁶ Posto isto, mais estudos são necessários de forma a perceber como é que o solvente afeta os espectros de absorção desta família de moléculas.

3.2 - Síntese de Ligação das Sondas à Cisteína

3.2.1 - Caracterização Estrutural e Espectroscópica – RMN e Absorção

Foi possível identificar através de TLC de fase reversa qual o produto que queríamos purificar. Uma vez que a ligação da cisteína à sonda torna-a mais polar, foi possível observar uma boa separação entre o produto e os reagentes iniciais. Sendo que se observou um *rf* (*retention factor*) de 1 para a cisteína, 0.1 para a sonda reativa e 0.8 para o produto formado.

Para observação da cisteína na placa de TLC usou-se a ninidrina, que apresenta um verde pouco intenso, passando a rosa quando reage com aminas primárias, no caso com a amina primária da cisteína. O produto como já possui por sua vez cor (amarelo esverdeado) não ficou rosa, porém, observou-se um escurecimento da banda.

Como já foi referido no capítulo 2.1, usou-se uma coluna de sílica RP-18 para purificação dos produtos, usando 80:20 metanol/água como eluente.

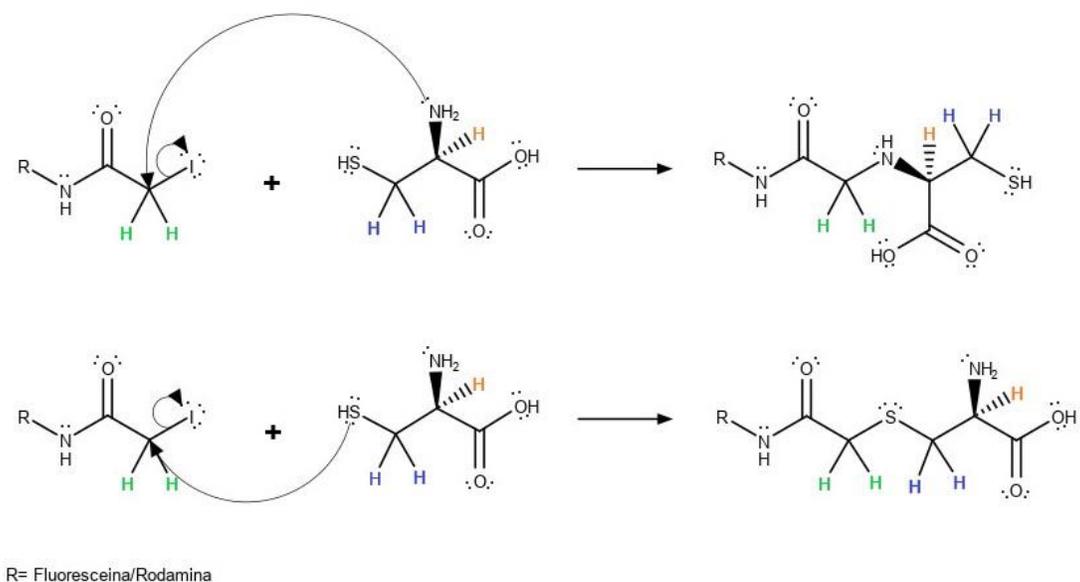
Tendo o produto final das reações (A1 e B) purificado, de forma a elucidar o seu carácter estrutural foram caracterizados por RMN e por espectroscopia de absorção UV-Vis. O produto da reação A2 não foi caracterizado por ter mostrado um rendimento idêntico à reação A1, assim também se pode concluir que adicionar cisteína em excesso não afeta a reação (ver capítulo 2.1 para detalhes sobre as condições das reações).

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Para a caracterização em RMN havia o interesse em avaliar primeiro, se tinha ocorrido ligação da sonda à cisteína e posteriormente se essa ligação tinha ocorrido maioritariamente pelo tiol ou pela amina. É particularmente relevante avaliar uma possível ligação à amina, uma vez, que num sistema biológico como é o caso de uma proteína existem sempre aminas disponíveis para

Resultados e Discussão

participar na reação. É de esperar, contudo, que esta ocorra principalmente pelo tiol uma vez que o pH em que se realiza a reação (8.3) é inferior ao pKa da amina (10.70).⁵⁹ Ou seja, a amina encontra-se maioritariamente protonada, por isso carregada positivamente, e sem o par de elétrons livres disponível para efetuar o ataque nucleófilo à Iodoacetamida (esquema 5). Para além disso, o grupo tiol da cisteína apresenta um pKa igual a 8.37⁵⁹, apresentando uma fração significativa da forma S⁻, sendo por isso um bom nucleófilo.



Esquema 5 – Esquema das duas hipóteses reacionais do grupo reativo das sondas com a cisteína.

O número de ligações entre grupo metileno da sonda (CH₂) e da cisteína (CH₂), são diferentes quando a ligação se estabelece pelo grupo amina ou pelo tiol, permitindo a distinção entre os dois produtos através da técnica HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Nesta metodologia é possível observar correlações carbono-hidrogénio até 3 ligações. Quando o ataque é feito pela amina não será assim possível observar correlações entre o carbono de um grupo e os hidrogénios do outro, uma vez que estes ficam a 4 ligações de distância. Contrariamente, se for o tiol a atuar como nucleófilo os dois grupos em causa ficam apenas a 3 ligações de distância sendo possível observar correlações em RMN HMBC.

Para isso, começou por se fazer as atribuições dos desvios químicos de ¹H- e ¹³C-RMN para a cisteína livre. A figura 3.5 mostra o espectro de HSCQ (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) para a cisteína, este mostra a correlação entre carbonos e hidrogénio ligados covalentemente. Os espectros de ¹H- e ¹³C-RMN para a cisteína estão apresentados em cima e à esquerda respetivamente.

Cisteína: $^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$, δ (ppm) – 3.94 (triplete, CH (cisteína)); 2.79-2.36 (duplo dubleto, CH₂ (cisteína)).

Cisteína: $^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$, δ (ppm) – 58.5 (CH (cisteína)); 31.2 (CH₂ (cisteína)).

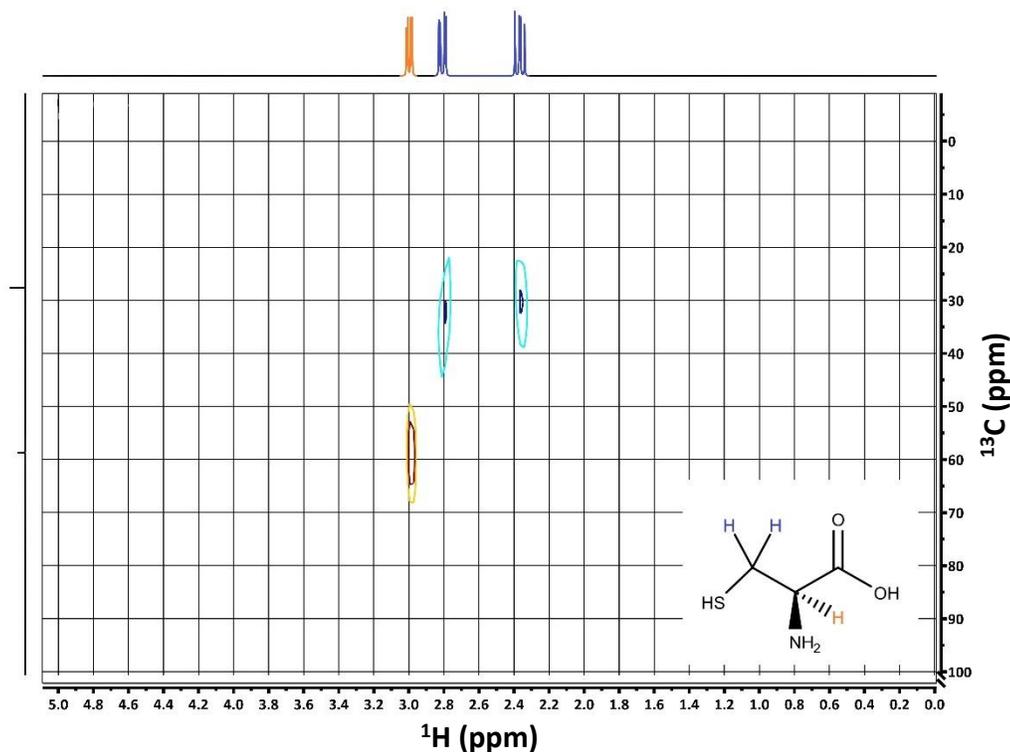


Figura 3.5 – Espectro de HSQC da cisteína obtida a 25 °C em D₂O. O mapa de isolinhas mostra a correlação entre átomos de carbono e hidrogénio covalentemente ligados. Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN encontram-se respetivamente na abcissa e na ordenada.

AMOSTRA A1 (CYS-FLU)

A atribuição antes feita para a cisteína livre facilitou a atribuição dos desvios químicos ^1H - e ^{13}C -RMN para a amostra A1 (Cys-Flu). As figuras 3.6 e 3.7 mostram, respetivamente, para esta o espectro de RMN ^1H e de HSQC. Através destes espectros e da atribuição feita anteriormente para a cisteína foi possível fazer a seguinte atribuição de desvios químicos:

Amostra A1 (Cys-Flu): $^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$, δ (ppm) – 3.94 (triplete, CH (cisteína)); 3.52 (singleto, CH₂ (sonda)); 3.15 (duplo dubleto, CH₂ (cisteína)).

Amostra A1 (Cys-Flu): $^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$, δ (ppm) – 53.6 (CH (cisteína)); 36.2 (CH₂ (sonda)); 33 (CH₂ (sonda)).

Resultados e Discussão

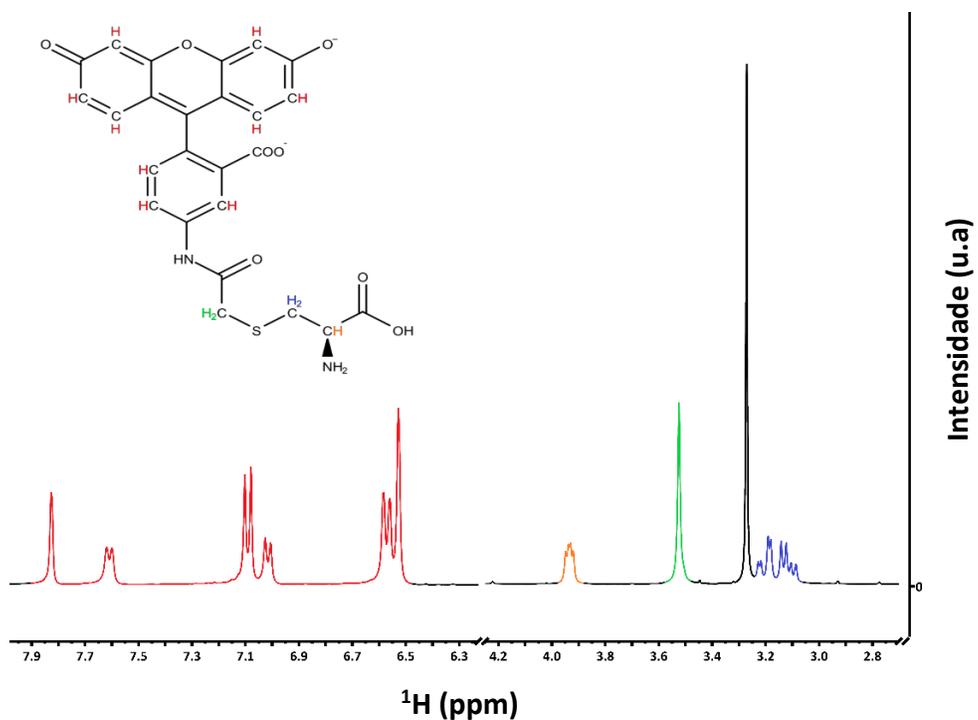


Figura 3.6 – Espectro de ^1H -RMN obtido a 25 °C em D_2O para a amostra A1 (Cys-Flu).

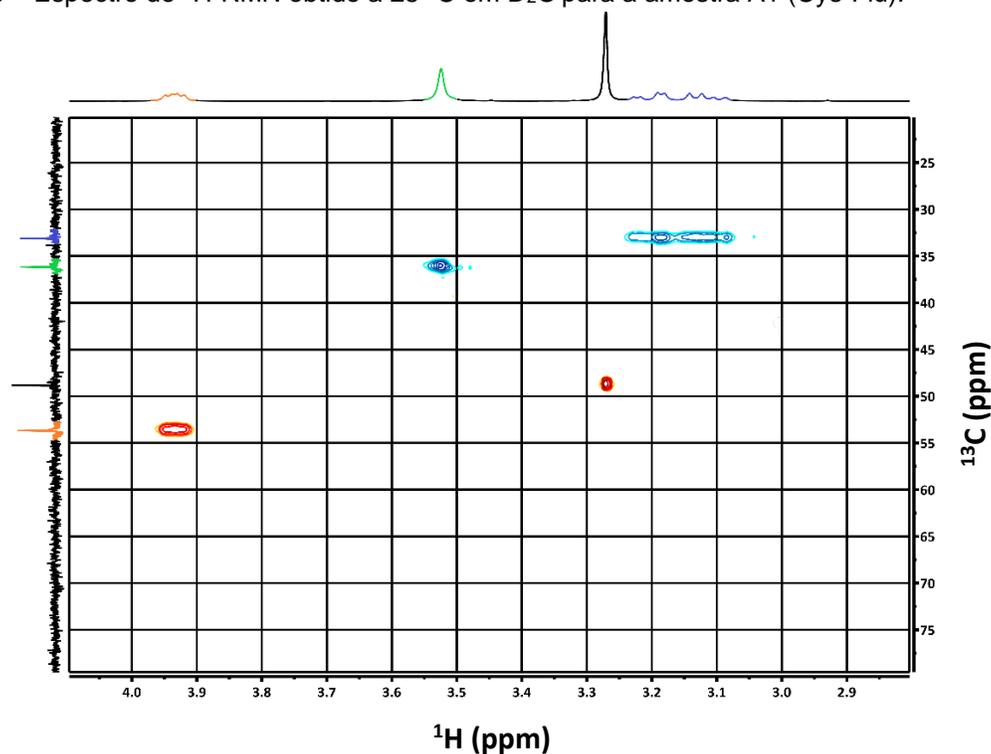


Figura 3.7 – Espectro de HSQC da amostra A1 (Cys-Flu) obtida a 25 °C em D_2O . O mapa de isolinhas mostra a correlação entre átomos de carbono e hidrogênio covalentemente ligados. Os espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN encontram-se respectivamente na abcissa e na ordenada.

O singleto a cerca de 3.27 ppm que não se encontra atribuído é uma contaminação por ácido acético usado no eluente da coluna de cromatografia que não foi completamente eliminado no processo de secagem do produto.

Tendo já a atribuição de desvios químicos feita a todos os grupos de interesse realizou-se então, como objetivo final o espectro de RMN HMBC (figura 3.8). Através deste, como já foi referido, é possível ver correlações, até 3 ligações, entre carbonos e hidrogénios. Como se pode constatar na figura 3.8, existe correlação entre o carbono do CH₂ da sonda e os hidrogénios do CH₂ da cisteína e naturalmente o mesmo acontece entre o carbono do CH₂ da cisteína e os hidrogénios do CH₂ da sonda. Ficando assim comprovado a ligação à iodoacetamida-fluoresceína pelo ataque nucleófilo do tiol.

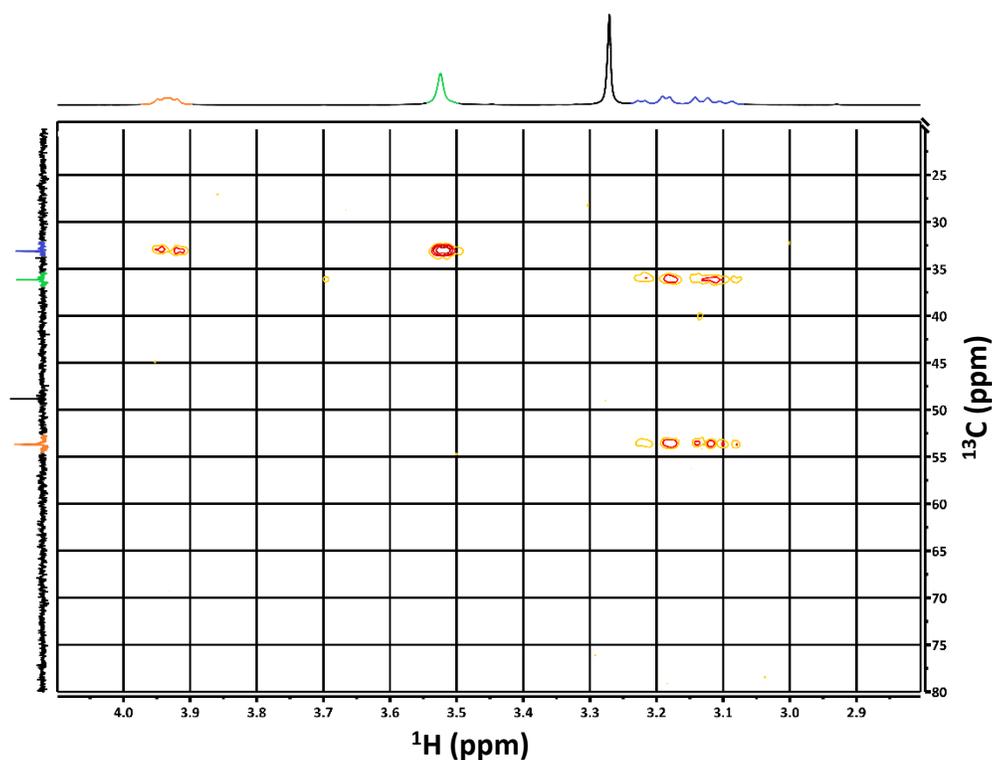


Figura 3.8 – Espectro de HMBC da amostra A1 (Cys-Flu) obtida a 25 °C em D₂O. O mapa de isolinhas mostra a correlação a longa distância entre átomos de carbono e hidrogênio. Os espectros de ¹H- e ¹³C-RMN encontram-se respetivamente na abcissa e na ordenada.

Resultados e Discussão

AMOSTRA B (CYS-RDM)

O espectro de ^1H -RMN da amostra B (Cys-Rdm) encontra-se na figura 3.9. E foi feita através deste a seguinte atribuição:

Amostra B (Cys-Rdm): ^1H -RMN (CD_3OD), δ (ppm) – 3.6 (triplete, CH (cisteína)); 3.29 (singlete, CH_3 , (sonda)); 3 - 3.2 (CH_2 , (cisteína)).

Aparece ainda a 3.32 ppm um multipletto, proveniente do CD_3OD e um quarteto a 3.55 por contaminação de etanol. Estes dois sinais juntamente com um singlete do CH_3 dos grupos dimetilamina da rodamina não permitiram que fosse feita uma atribuição mais detalhada, nomeadamente, atribuir o pico do CH_2 e confirmar a ligação à cisteína pelo tiol. Contudo, é provável que este pico esteja no mesmo desvio químico que o quarteto do etanol (3.55 ppm), uma vez que na amostra A1 este aparece a 3.52 ppm. Futuramente, é necessário um maior cuidado com contaminações e fazer uma escolha mais ponderada do solvente usado.

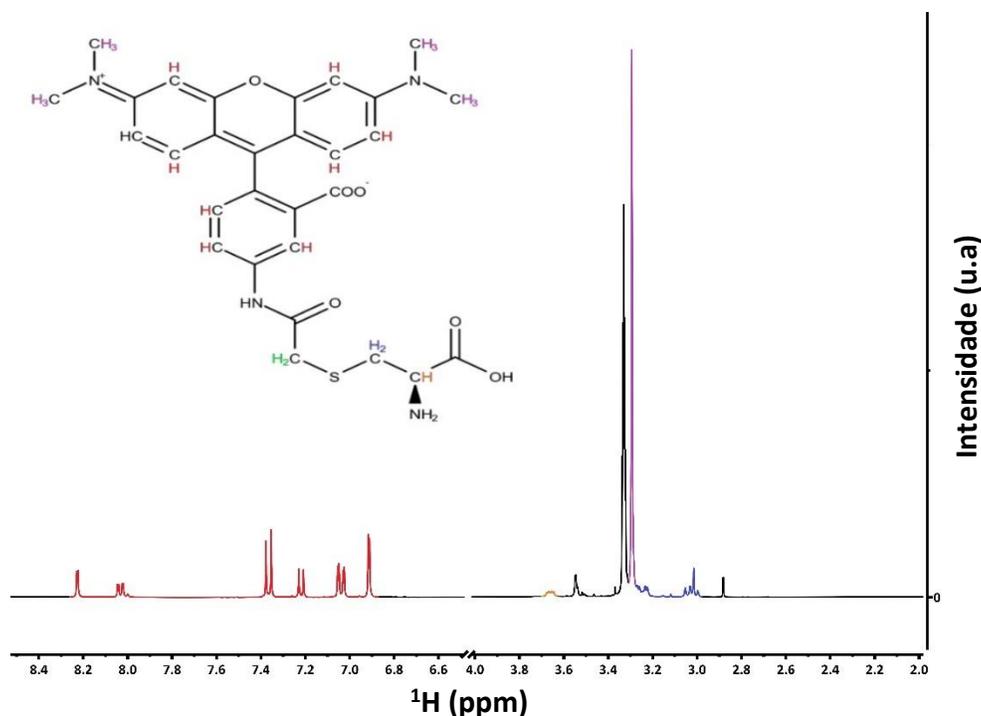
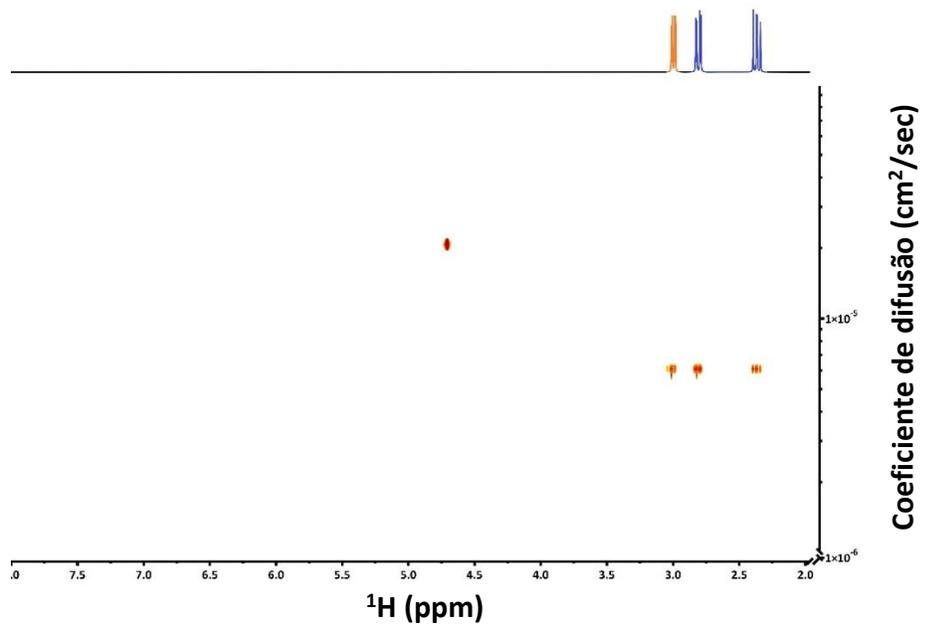


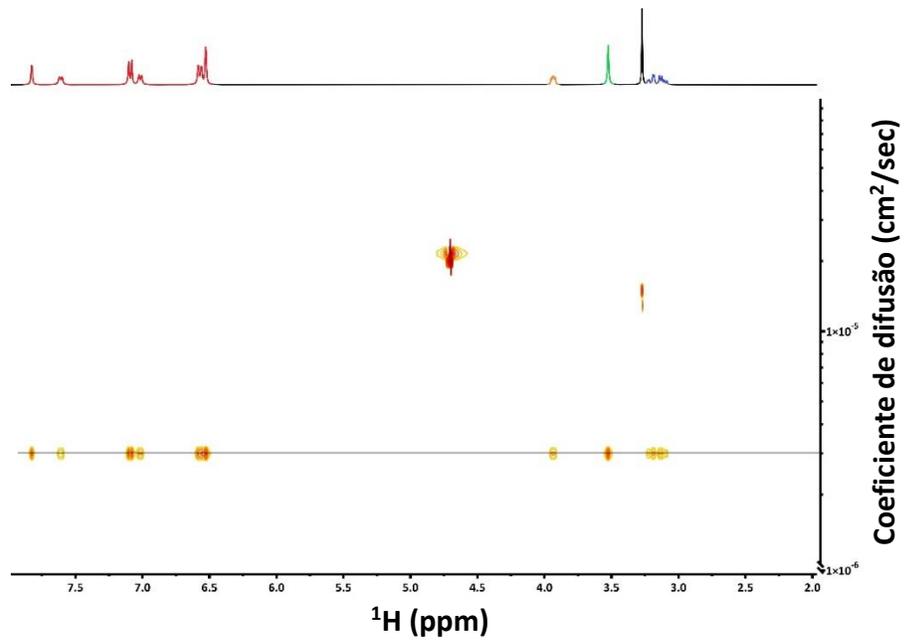
Figura 3.9 – Espectro de ^1H -RMN obtido a 25 °C em CD_3OD para a amostra B (Cys-Rdm).

Os produtos sintetizados e a cisteína livre foram também caracterizados através de espectros DOSY, que são apresentados na figura 3.10. Através deste tipo de espectros é possível determinar o coeficiente de difusão associado (à direita) a cada pico no espectro de ^1H -RMN (em cima).

Cisteína



Amostra A1 (Cys-Flu)



Resultados e Discussão

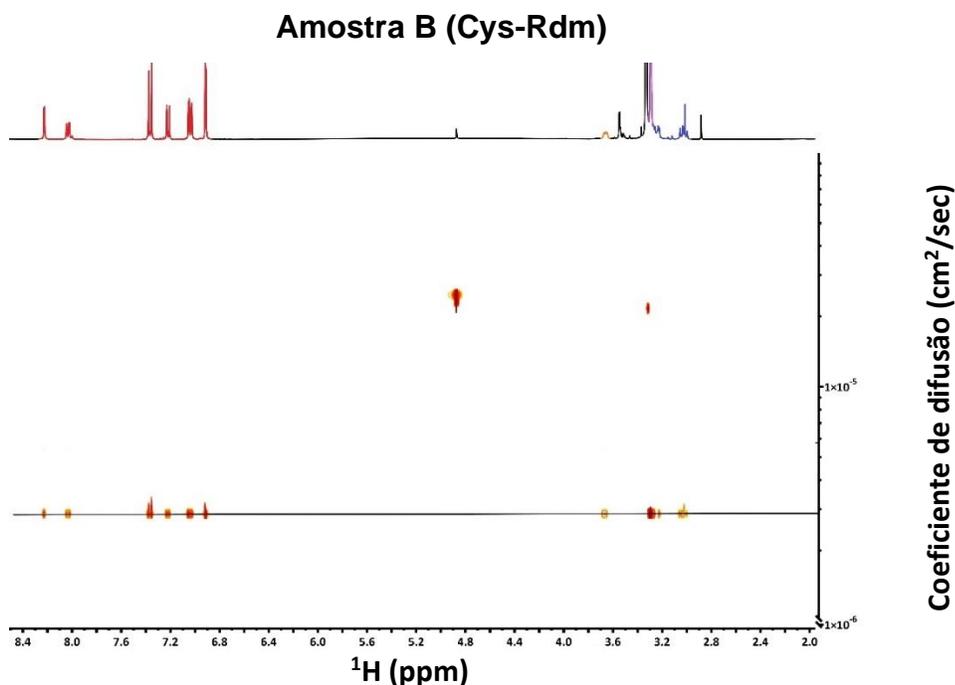


Figura 3.10 – Espectro de DOSY obtido a 25 °C em D_2O para a cisteína e para a amostra A1 (Cys-Flu) e em CD_3OD para a amostra B (Cys-Rdm). As isolinhas representam o coeficiente de difusão na ordena correspondente a cada sinal do espectro ^1H nas abcissas.

Através destes é possível ver que nas amostras A1 (Cys-Flu) e B (Cys-Rdm) os coeficientes de difusão associados aos picos da sonda e aos picos da cisteína são os mesmos, o que comprova que em ambas as reações houve ligação da sonda à cisteína. E, uma vez tendo a evidência que a reação A1 (Cys-Flu) se deu através do ataque nucleófilo do tiol ao grupo reativo da sonda, e sendo o grupo reativo igual na rodamina, é de esperar que a reação B (Cys-Rdm) tenha seguido o mesmo caminho reacional.

ABSORÇÃO

Foram recolhidos espectros de absorção no UV-Vis dos produtos das reações A1 e B. O espectro da reação A1 mostra um pequeno desvio relativo ao espectro da sonda livre, figura 3.11. No caso da reação de ligação da rodamina à cisteína, aparentemente o seu espectro de absorção é idêntico ao espectro da rodamina livre.

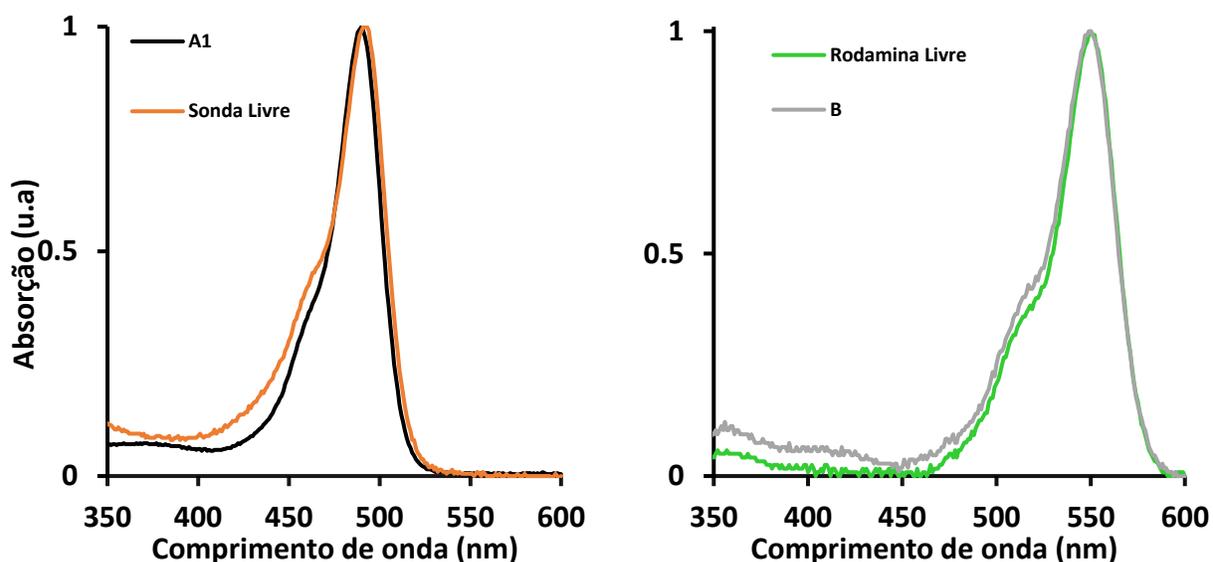


Figura 3.11 – Espectros normalizados de absorção UV-Vis do produto das reações A1 (—, preto), B (—, cinzento), fluoresceína livre (—, laranja) e da sonda rodamina livre (—, verde) recolhidos em tampão fosfato a pH 8.6, 9.6, 8.1 , e 8.3 respetivamente.

Este resultado pode ser comparado com os espectros obtidos teoricamente no capítulo 3.1.1. A figura 3.12 mostra os espectros das sondas livres e das sondas ligadas à cisteína cálculos teoricamente ao nível PCM/tHCTHhyb/6-311++G(d,p).

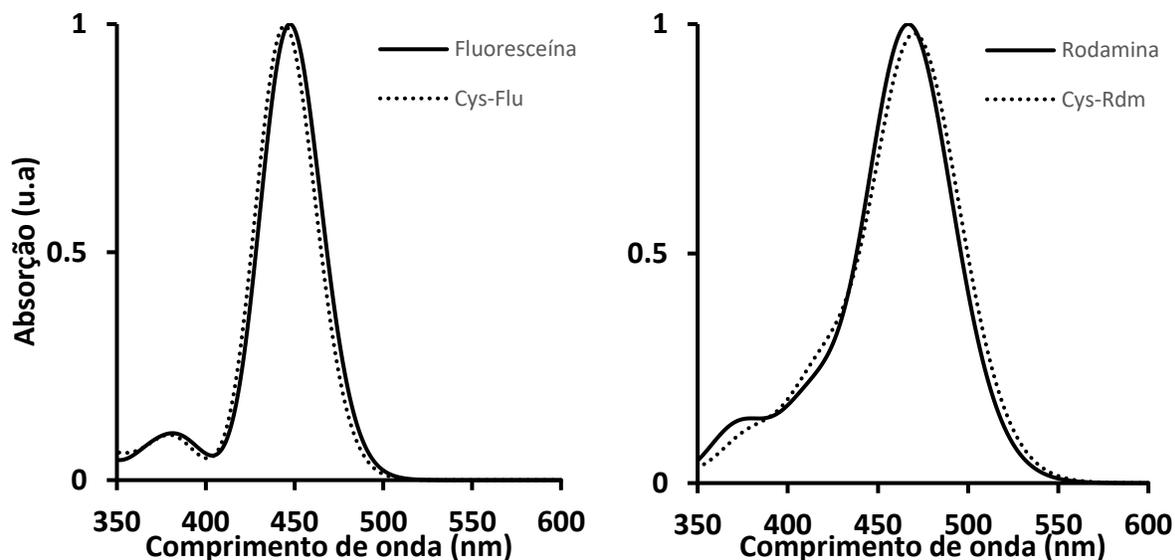


Figura 3.12 – Espectros teóricos calculados ao nível PCM/tHCTHhyb/6-311++G(d,p) a transejado para as respetivas sondas livres e a cheio para as mesmas ligadas à cisteína, normalizado segundo o espectro que tinha uma maior força de oscilador (resultados obtidos no capítulo 3.1.1).

Resultados e Discussão

Para a figura 3.12 optou-se por representar os espectros teóricos calculados com o nível de teoria que mostrou ter um desvio menor ao experimental. Assim e como foi discutido no capítulo 3.1.1, os cálculos teóricos preveem para a Cys-Flu um pequeno desvio para o azul que parece ser concordante com o observado experimentalmente.

Contrariamente para a rodamina, esse pequeno desvio é previsto acontecer para o vermelho, contudo experimentalmente a ligação à cisteína parece não ter afetado o seu espectro de absorção.

3.2.2 - Titulação da Cisteína-Fluoresceína (Cys-Flu)

Uma vez confirmado a estrutura das moléculas de interesse, avançou-se para as titulações destas com HCl e NaOH em água e em misturas de etanol/água (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50) que foram seguidas por espectroscopia de absorção UV-Vis e espectroscopia de fluorescência. Neste capítulo apresenta-se apenas os resultados destas experiências em 100% água e 50:50 etanol/água, deixando os resultados das restantes titulações em anexos.

- 100% ÁGUA

Os espectros de absorção da Cys-Flu em função do valor de pH em solução aquosa contendo 150mM NaCl encontram-se apresentados na figura 3.13.

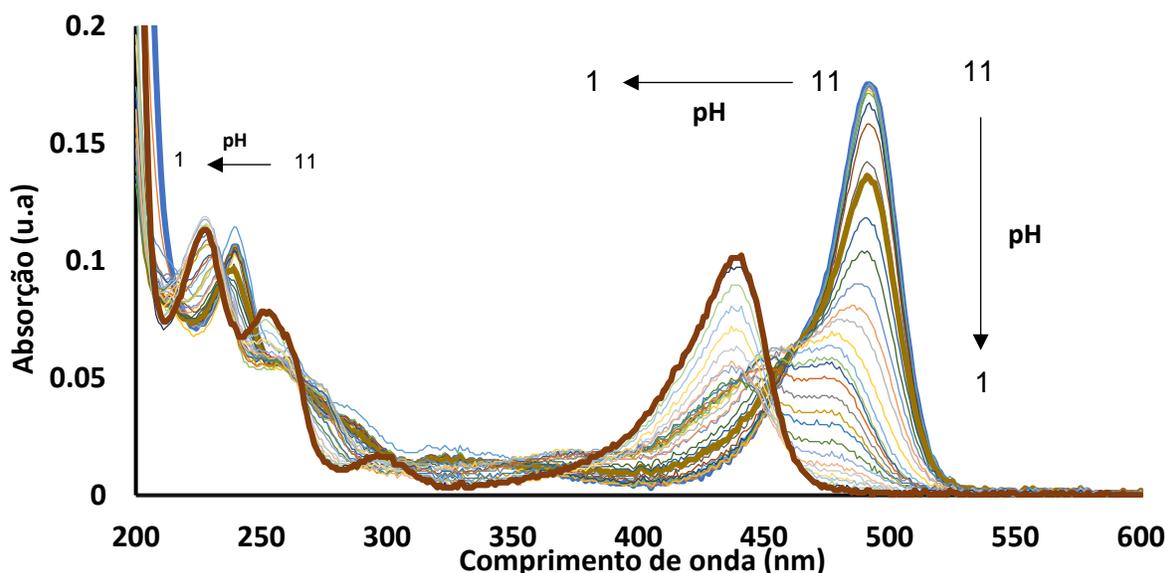


Figura 3.13 – Espectros de absorção da Cys-Flu durante a titulação ácido-base em água 150 mM NaCl. Os espectros obtidos aos valores extremos de pH e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas.

No início da titulação ácido-base da Cys-Flu (pH 11), o espectro de absorção apresenta uma banda bem definida a 490 nm característica da espécie dianiónica da fluoresceína (F^{2-}). A forma do espectro de absorção mantém até $\text{pH} \cong 7$, sendo acompanhada apenas por uma ligeira diminuição da absorvidade. Para valores inferiores de pH (entre 6 e 3), nota-se uma acentuada diminuição na absorvidade que é acompanhada por um desvio para menores comprimentos de onda. Neste intervalo existem as espécies monoaniónica (MAC) e neutra ($F\text{-NEQ}$). Ambas com duas bandas situadas a cerca de 470 e 450 nm, porém a monoaniónica com a banda a 470 nm mais intensa enquanto que na espécie neutra a banda mais intensa é a 450 nm. Esta última pode ainda estar em equilíbrio com o seu outro tautómero ($F\text{-NEL}$), contudo este não tem absorção na zona do visível. E finalmente, para valores abaixo de pH 3, forma-se uma banda bem definida a 440 nm correspondente à última espécie de protonação, a espécie catónica (F^+).

Nas figuras seguintes (3.14 e 3.15) estão apresentados os espectros de fluorescência correspondentes aos diferentes valores de pH. Na figura 3.14 encontram-se os espectros não tratados e na figura 3.15 encontram-se os espectros normalizados com o seu respetivo máximo.

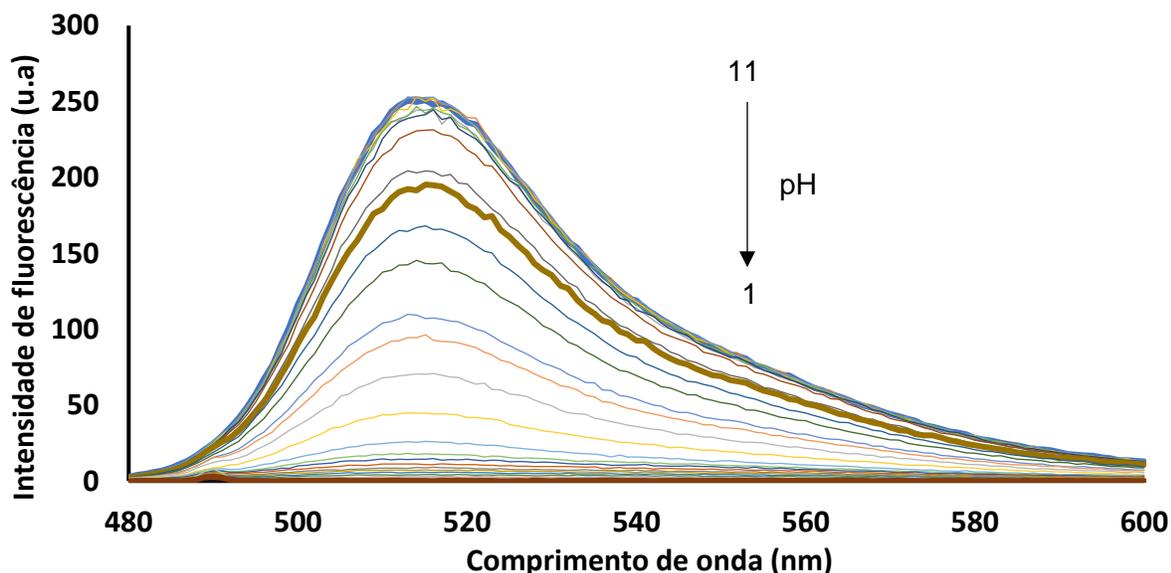


Figura 3.14 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Flu durante a titulação ácido-base em água 150mM NaCl. Os espectros correspondentes aos pH extremos e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas– $\lambda_{\text{exc}}=490$ nm.

Resultados e Discussão

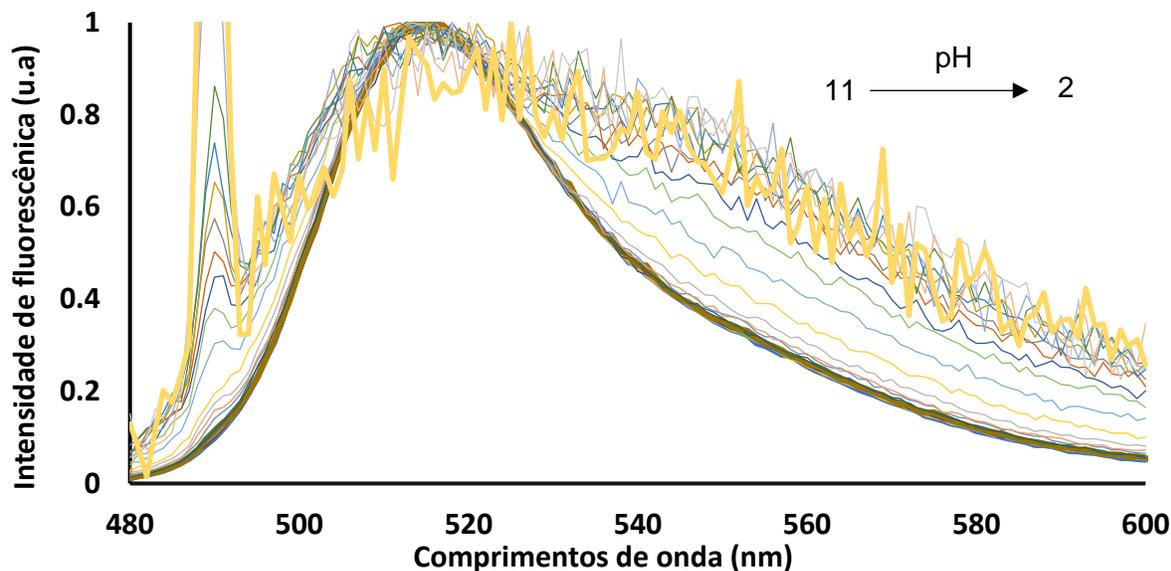


Figura 3.15 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Flu, normalizados pelo o respetivo máximo, durante a titulação ácido-base em água 150mM NaCl. Os espectros correspondentes aos pH extremos e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas– $\lambda_{exc}=490$ nm.

A fluorescência acompanha, de certa forma, a absorção. Havendo uma fluorescência constante entre pH 11-8 com uma banda bem definida a 515 nm. À medida que nos vamos aproximando de valores de pH mais baixos (pH ~8-6) e o valor de absorção vai diminuindo, a intensidade de fluorescência diminui igualmente. Este resultado evidencia uma protonação parcial da espécie maioritária (F^{2-}) e inicial aparecimento da espécie monoaniónica (F-MAC).

Abaixo de pH 6 já foi extinta mais de 50% da intensidade de fluorescência a 515 nm e começa a haver o aparecimento de um ombro à volta dos 550 nm, sendo possível observá-lo quando se normaliza os espectros de emissão com o seu respetivo máximo (Figura 3.15). O surgimento deste ombro deve-se ao desaparecimento acentuado da espécie dianiónica e formação da espécie monoaniónica. Até pH 2 é possível observar o espectro correspondente à espécie monoaniónica com excitação a 490 nm.

A partir de pH 2, onde existe maioritariamente no estado fundamental a espécie catiónica e, uma vez que esta não absorve a 490 nm os espectros de emissão com excitação nesse comprimento de onda são apenas ruído.

Entre pH 4 e 1, onde as espécies presentes no estado fundamental são apenas as neutras e a catiónica, o espectro de emissão permanece constante e idêntico ao da monoaniónica mesmo quando se excita o catião a 437 nm (Figura 3.16). Tal evidência tem sido interpretada como a

existência de reações de transferência de próton no estado excitado.^{2, 5} Isto é, as espécies presentes no estado fundamental quando excitadas sofrem desprotonação e a emissão de fluorescência acontece a partir da espécie monoaniônica.

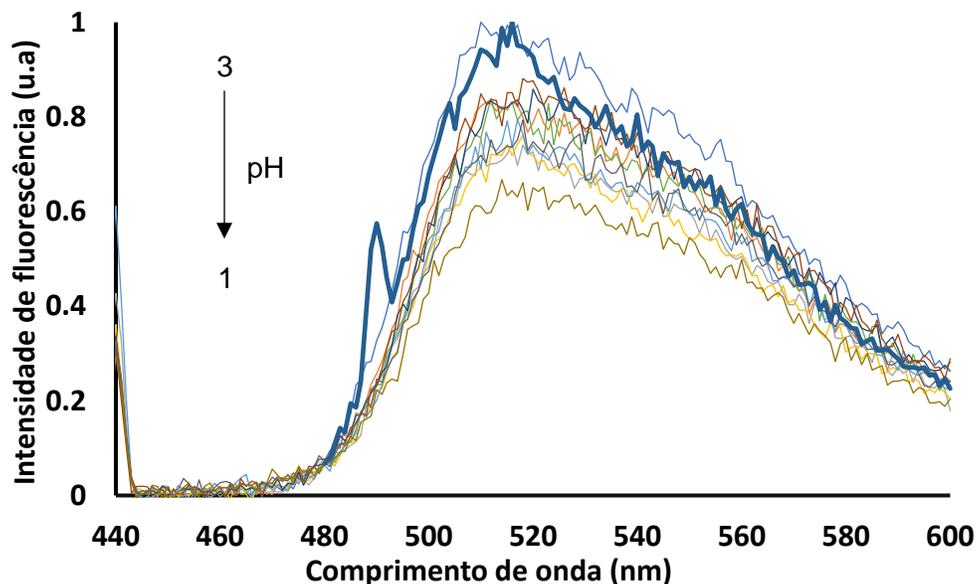


Figura 3.16 – Espectros de fluorescência da Cys-Flu, normalizados com o respetivo máximo, em água 150mM entre pH 3.5 e 1 - $\lambda_{exc}=437$ nm; O espectro de emissão a azul carregado (—) foi recolhido em água 150mM a pH 4 - $\lambda_{exc}=490$ nm.

A banda de emissão do catião é possível observar a 470 nm apenas em condições bastante acídicas (1-10 M HCl), no entanto, neste trabalho não se chegou a essas condições.

- 50:50 ETANOL/ÁGUA

Quando se observa para os mesmos resultados, mas onde o solvente é substituído por etanol até um máximo de 50% (figura 3.17), alterando assim as propriedades do meio (diminuído a polaridade e a capacidade de dador de pontes de hidrogénio) é possível notar que o desaparecimento da banda de absorção a 490 nm (espécie F^{2-}) acontece mais cedo, isto é, para valores maiores de pH. Mais ainda, a banda desta e das outras espécies aparecem desviadas para o vermelho em cerca de 5 nm. Sendo o $\lambda_{abs}=496$ nm para a espécie dianiónica em 50:50 etanol/água.

Resultados e Discussão

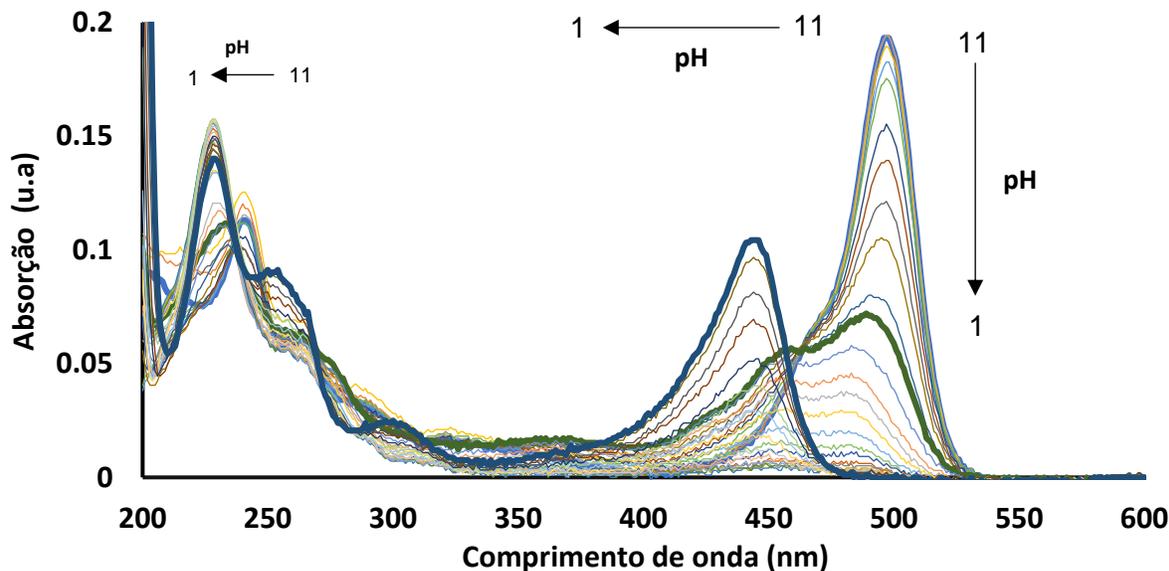


Figura 3.17 – Espectros de absorção da Cys-Flu durante a titulação ácido-base em 50:50 etanol/água. Os espectros obtidos aos valores extremos de pH e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas.

Observando ainda a figura 3.17, para além do precoce aparecimento da espécie monoaniônica, é possível também constatar um rápido desaparecimento desta e formação das espécies neutras, onde, estas se mantêm ao longo de um vasto intervalo de pH.

Além disso, é bastante visível que neste intervalo de pH a absorção praticamente zero na zona do visível e há um surgimento claro de uma banda na zona do ultravioleta (230 nm), característico do espectro da espécie neutra lactona (F-NEL). Tal evidência não é observável em água, significando que, primeiro o etanol estabiliza bastante as espécies neutras (aumenta o intervalo de pH onde estas estão presentes) e segundo há um predomínio maior da espécie lactona em relação à quinóide.

Em relação à fluorescência, como é de esperar, esta sofre uma diminuição rápida, chegando a perder 50% da sua intensidade a pH 7 (figura 3.18). O ombro a 550 nm característico da espécie monoaniônica aparece também mais cedo, figura 3.19.

Mais ainda, a intensidade de fluorescência entre pH 4-2 (zona da espécie neutra) é bastante inferior (cerca de 5 vezes) quando comparada com a mesma, mas em água. Esta evidencia experimental, pode ser explicada pelo facto da espécie neutra mais abundante no estado fundamental em 50:50 etanol/água ser a lactona e esta não absorver ao comprimento de onda de excitação e consequentemente não emitir.

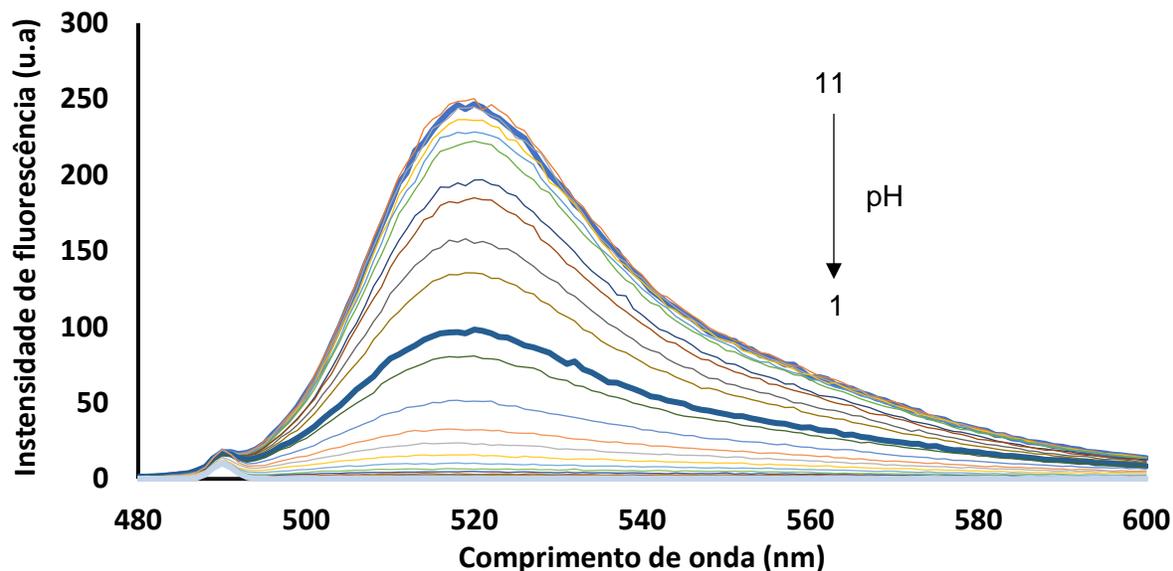


Figura 3.18 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Flu durante a titulação ácido-base 50:50 etanol/água. Os espectros correspondentes aos pH extremos e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=490$ nm.

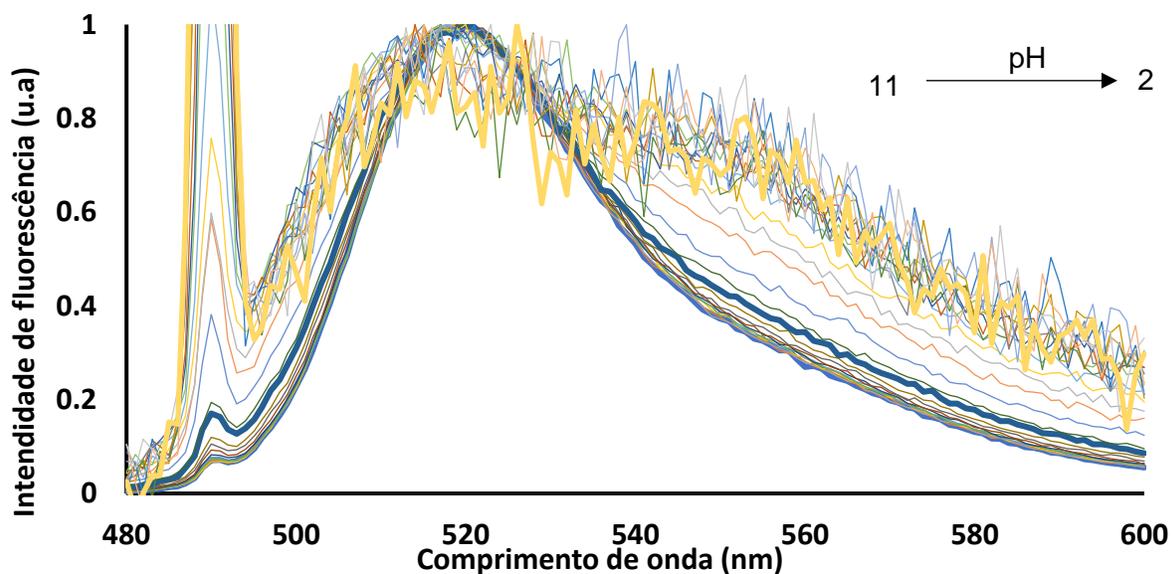


Figura 3.19 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Flu, normalizados pelo o respetivo máximo, durante a titulação ácido-base em 50:50 etanol/água. Os espectros correspondentes aos pH extremos e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=490$ nm.

Resultados e Discussão

3.2.3 - Cálculo de pK_a 's – Cys-Flu

Os gráficos dos ajustes feitos aos dados experimentais das titulações em água e em 50:50 etanol/água para a absorção e para a fluorescência encontram-se respetivamente nas figuras 3.20 e 3.21. Para estes ajustes foram escolhidos comprimentos de onda que representassem melhor as espécies presentes no equilíbrio e as variações na absorção/fluorescência. Para a absorção escolheram-se quatro comprimentos de onda (506 nm, 491 nm, 450 nm e 437 nm) enquanto que para a fluorescência apenas se fez o ajuste a dois (512 nm e 550 nm). Esta última escolha deve-se ao facto da fluorescência ser sensível apenas a duas espécies (dianiónica e monoaniónica), e devido a isso também na fluorescência apenas é possível determinar com rigor o pK_{a3} (a espécie monoaniónica apresenta alguma fluorescência a 550 nm mas a sua intensidade relativamente baixa não permite obter o pK_{a2} com elevado grau de confiança). Para além disso, na fluorescência apenas se fez o ajuste para valores superiores a pH 4 dado que abaixo deste pode haver emissão do monoanião que deriva da excitação de espécies neutras no estado fundamental.

É possível constatar através da figura 3.20 algumas diferenças entre a absorção em 100% água e em 50:50 etanol/água para alguns comprimentos de onda, nomeadamente, a 506 nm vê-se uma maior absorção a pH alcalinos devido à banda do dianião (F^{2-}) desviar para o vermelho à medida que se adiciona etanol ao meio. Para além disso, é visível também em 50:50 etanol/água o desaparecimento da absorção entre pH 3 e 5 aos comprimentos de onda 450 nm e 437 nm correspondente ao desaparecimento da espécie neutra quinóide (F-NEQ) e aparecimento da espécie lactona (F-NEL). O aparecimento desta não é visível nos gráficos da figura 3.20 pois nos ajustes apenas se considerou a zona do visível e esta absorve na zona do UV (230 nm) como foi discutido no capítulo 3.2.2. Os pK_a que saíram destes ajustes foram, em água, $pK_{a1}=2.1$, $pK_{a2}=4.1$, $pK_{a3}=6.5$, e em etanol, $pK_{a1}=1.4$, $pK_{a2}=6.0$ e $pK_{a3}=7.5$.

Na fluorescência (figura 3.21) existem também algumas diferenças visuais entre o ajuste feito em água e em 50:50 etanol/água, nomeadamente, a diminuição da intensidade de fluorescência que acontece mais cedo (pH mais alcalino) quando o meio contém etanol o que faz desviar a curva da titulação e conseqüente mudança no pK_{a3} . É possível também observar que, em água, a pH 4 ainda existe alguma intensidade de fluorescência devida ao monoanião que não existe em 50:50 etanol/água. Isto deve-se simplesmente ao facto do pK_{a2} mudar de 4.1 (em água) para 6 (em 50:50 etanol/água), ou seja, abaixo de pH 6 vamos encontrar mais moléculas de sonda na forma de espécie neutra e como estamos em 50:50 etanol/água a espécie neutra existente é a lactona (F-NEL) que não emite fluorescência, nomeadamente, por não absorver ao comprimento

de onda de excitação. Através destes ajustes apenas foi possível determinar com rigor o pK_{a3}^* , com valores de 6.4 em água e 7.5 em 50:50 etanol/água.

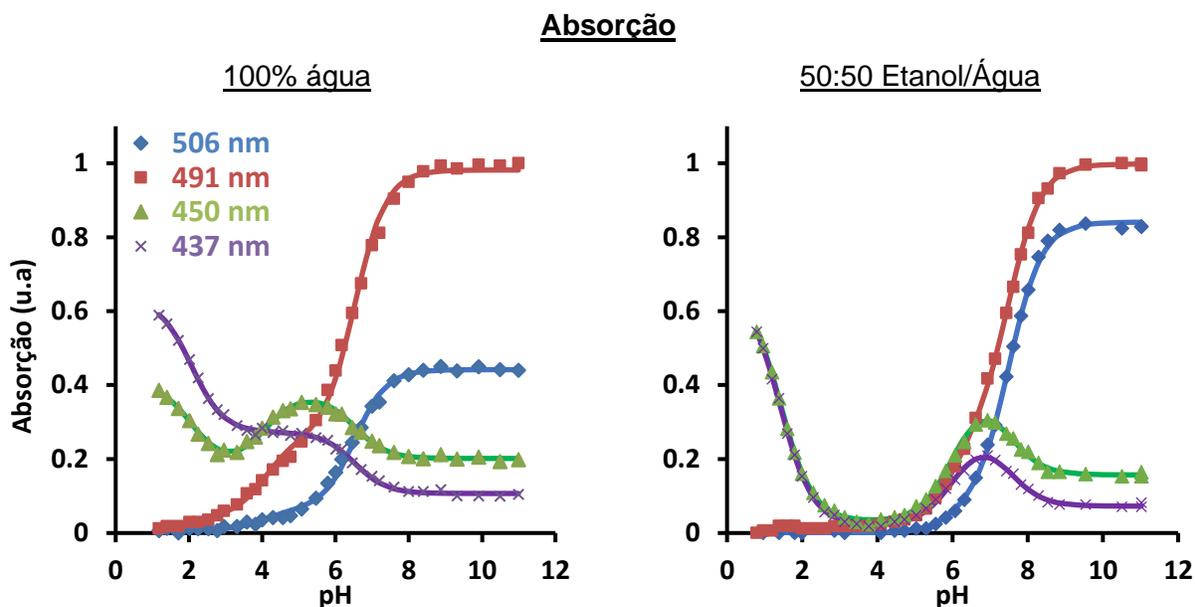


Figura 3.20 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da absorção, normalizados pela absorção máxima a 506 nm, durante a titulação ácido-base da Cys-Flu em água à esquerda e em 50:50 etanol/água à direita. Os gráficos mostram com marcadores os pontos experimentais e as linhas o ajuste global feito a 506 nm (—, azul), 491 nm (—, vermelho), 450 nm (—, verde) e 437 nm (—, roxo)

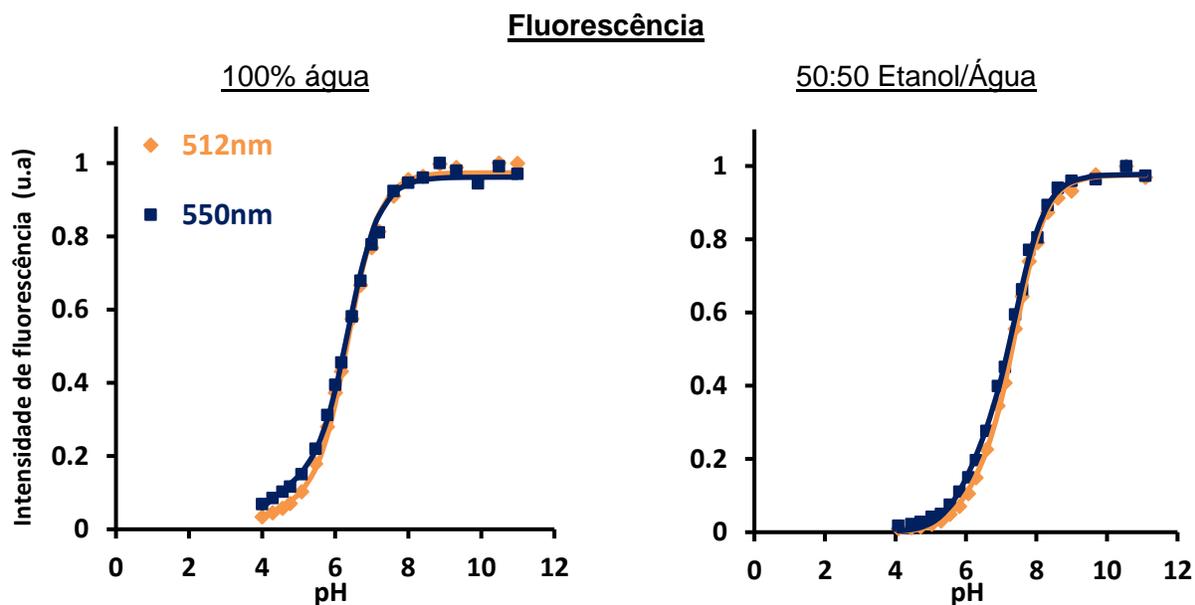


Figura 3.21 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima ao respectivo comprimento de onda, durante a titulação ácido-base da Cys-Flu em água à esquerda e em 50:50 etanol/água à direita. Os marcadores mostram os pontos experimentais e as linhas o ajuste global feito a 506 nm (—, laranja) e 491 nm (—, azul escuro).

3.2.4 - Titulação da Cisteína-Tetrametilrodamina (Cys-Rdm)

- 100% ÁGUA

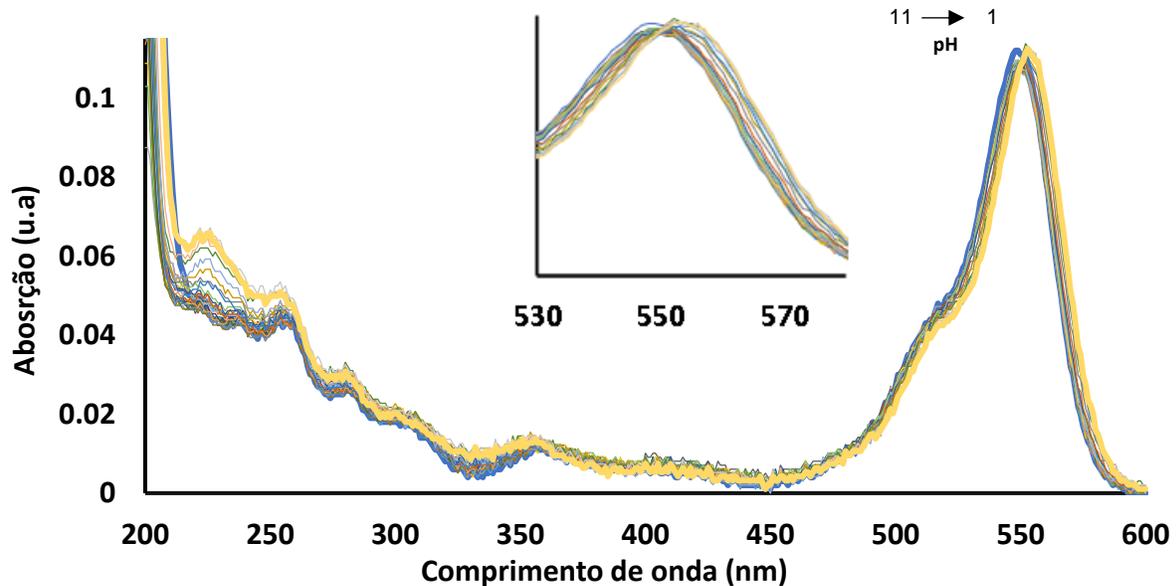


Figura 3.22 – Espectros de absorção da Cys-Rdm durante a titulação ácido-base em água 150mM NaCl. Os espectros obtidos aos valores extremos de pH encontram-se representados por linhas espessas. A zona em zoom diz respeito ao pico a 550 nm se forma a ser mais claro o desvio do espectro.

Na rodamina os resultados são bastante mais simples de interpretar, tendo apenas um pK_a e três espécies a considerar, duas neutras e uma catiónica. No que diz respeito à absorção (figura 3.22) é visível inicialmente, para pH alcalinos uma banda a 548 nm característica da espécie neutra zwitteriónica (R-NEZ). Na zona mais ácida (pH ~ 2) começa a haver um desvio da banda inicial para o vermelho que sugere a protonação da primeira espécie dando lugar à formação da espécie catiónica (R⁺). A banda de absorção desta espécie tem um máximo de absorção a cerca de 552 nm, sendo os coeficientes de extinção molar muito semelhantes para as duas espécies em água.

A espécie neutra (R-NEZ) tem o máximo da sua emissão a 574 nm e possui um rendimento quântico maior pois apresenta uma intensidade de fluorescência maior, uma vez que como foi referido anteriormente estas possuem um coeficiente de extinção molar idêntico. A banda de emissão da espécie catiónica, com uma intensidade de fluorescência visualmente mais baixa, encontra-se centrada a 580 nm (figura 3.23).

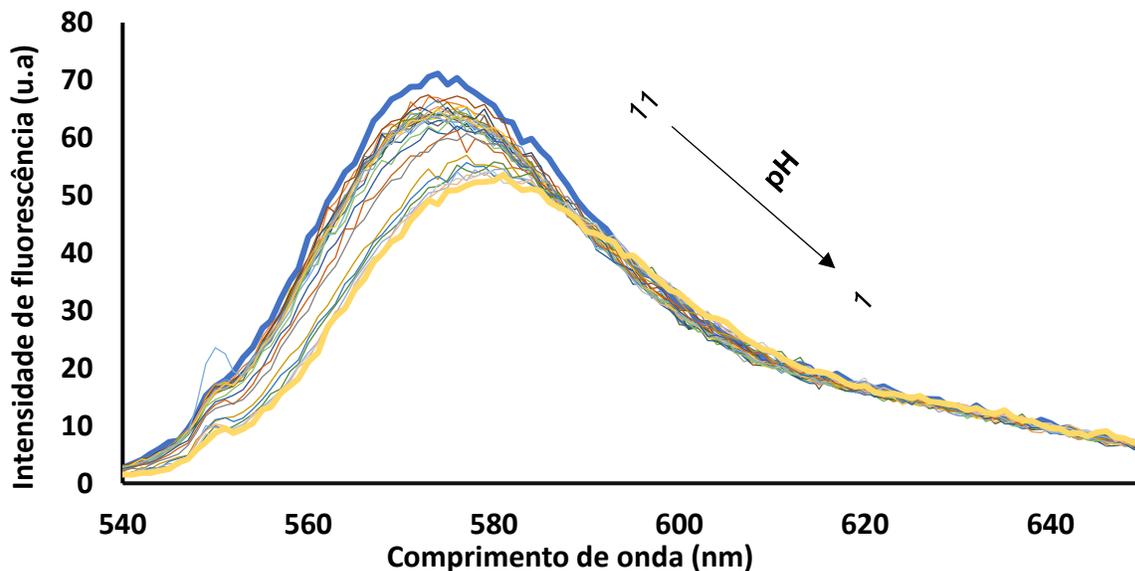


Figura 3.23 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Rdm durante a titulação ácido-base em água 150mM NaCl. Os espectros correspondentes aos pH extremos encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=550$ nm

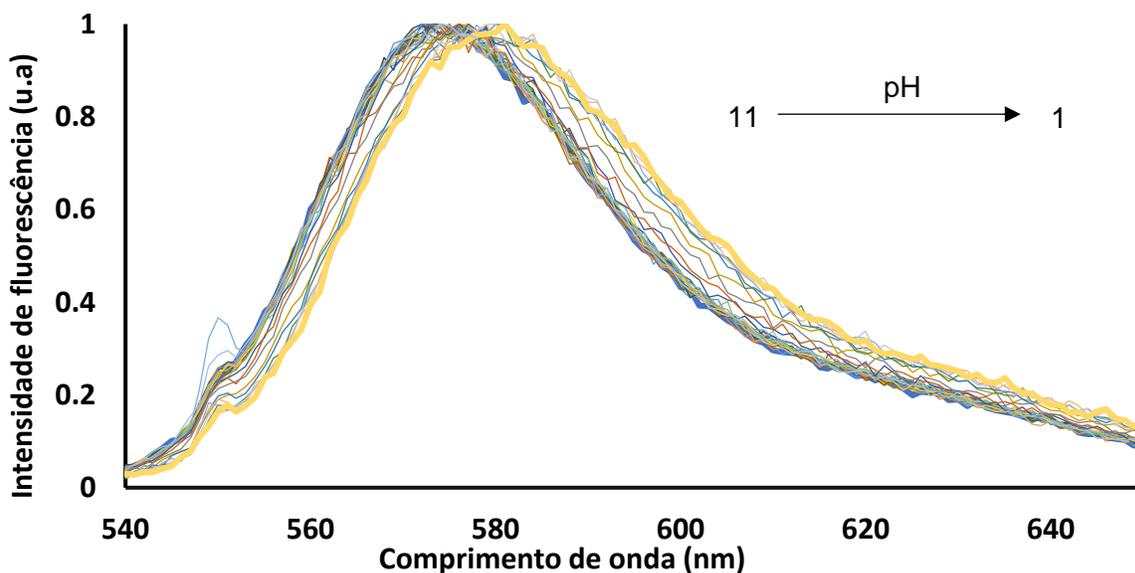


Figura 3.24 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Rdm, normalizados com o respetivo máximo, durante a titulação ácido-base em água 150mM NaCl. Os espectros correspondentes aos pH extremos encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}= 550$ nm

- 50%:50% ETANOL/ÁGUA

Em 50% etanol e 50% água existe tanto na absorção como na emissão uma mudança nos respetivos comprimentos de onda máximos, tendo a espécie neutra o λ_{abs} 546 nm e o λ_{ems} 570

Resultados e Discussão

e a espécie catiónica λ_{abs} 555 nm e λ_{ems} 578 nm (figuras 3.25 e 3.26). Para além disso, quando se adiciona etanol o coeficiente de extinção molar do catião é superior ao da espécie neutra (figura 3.25)

Existe também um claro aparecimento da espécie catiónica para valores menores de pH quando comparado com os resultados em 100% água.

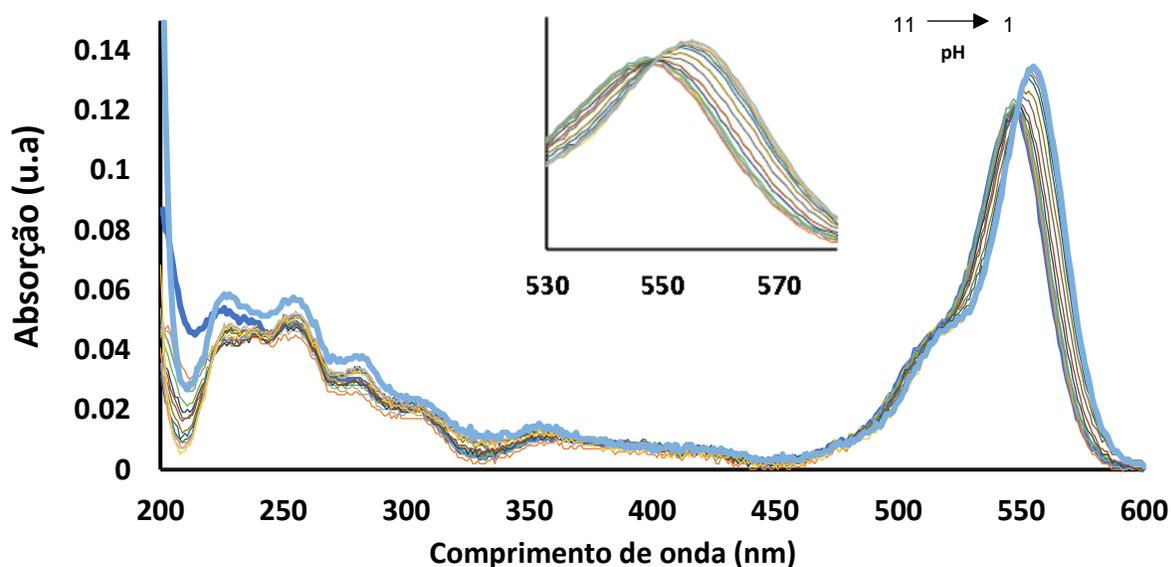


Figura 3.25 – Espectros de absorção da Cys-Rdm durante a titulação ácido-base em 50:50 etanol/água. Os espectros obtidos aos valores extremos de pH encontram-se representados por linhas espessas. A zona em zoom diz respeito ao pico a 550 nm se forma a ser mais claro o desvio do espectro.

Curiosamente, à medida que adicionamos etanol ao meio começa a haver uma separação das bandas das duas espécies. Tanto na absorção, sendo a diferença entre o λ_{abs} da espécie neutra e o λ_{abs} da espécie catiónica em água cerca de 4 nm e cerca de 9 nm em mistura de 50:50 etanol/água, como na fluorescência em que a diferença entre os seus λ_{ems} é de 6 nm em água e 8 nm em 50:50 etanol/água.

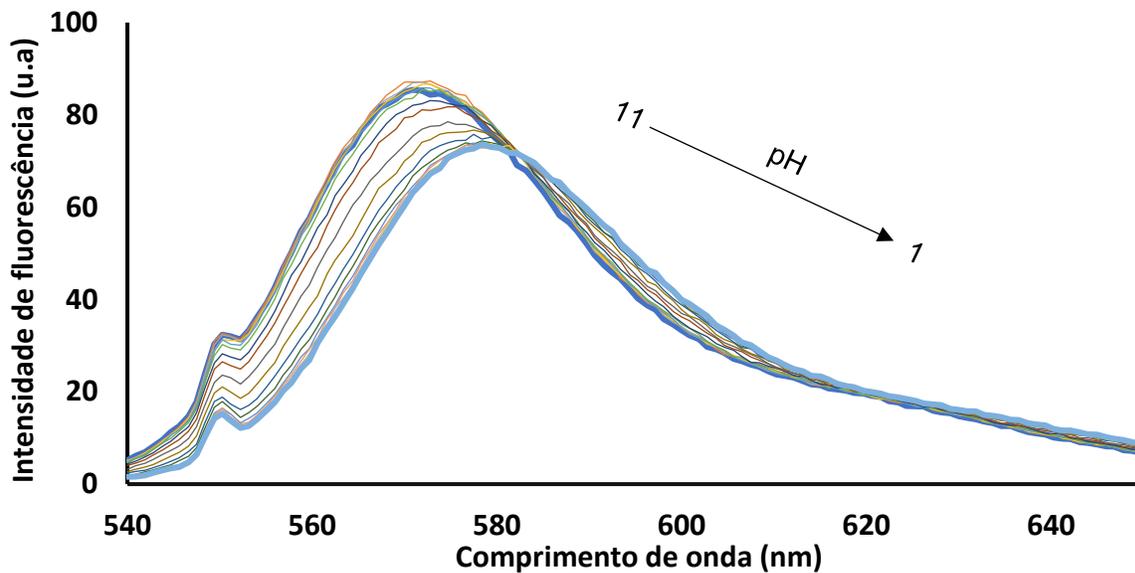


Figura 3.26 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Rdm durante a titulação ácido-base em 50:50 etanol/água. Os espectros correspondentes aos pH extremos encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=550$ nm

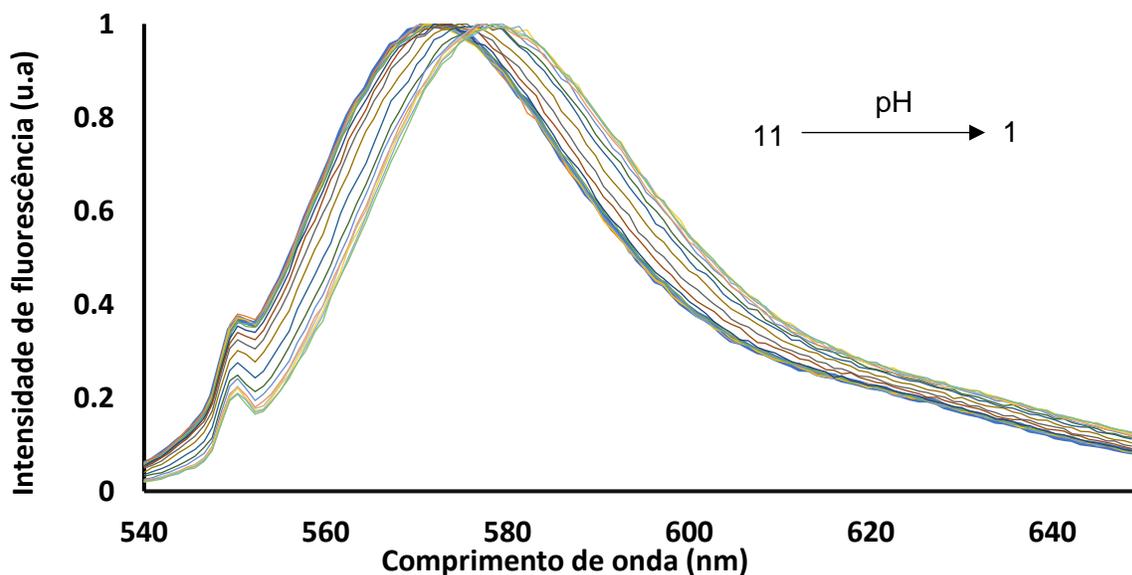


Figura 3.27 – Espectros de emissão de fluorescência da Cys-Rdm, normalizados com o respetivo máximo, durante a titulação ácido-base em 50:50 etanol/água. Os espectros correspondentes aos pH extremos encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=550$ nm

Resultados e Discussão

3.2.5 - Cálculo dos pK_a 's – Cys-Rdm

O ajuste global feito aos resultados experimentais da absorção e fluorescência da Cys-Rdm, encontram-se respectivamente nas figuras 3.28 e 3.29. Como é visível tanto na absorção como na fluorescência existe um claro afastamento dos λ_{abs} e λ_{ems} das duas espécies (F-NEZ e RH^+). Através destes ajustes foi possível obter para a absorção um $pK_{a1}=2.9$ em água e de 4.1 em 50:50 etanol/água. O pK_{a1} que resultou dos ajustes feitos para a fluorescência foi de 3 em água e de 4.6 em 50:50 etanol/água.

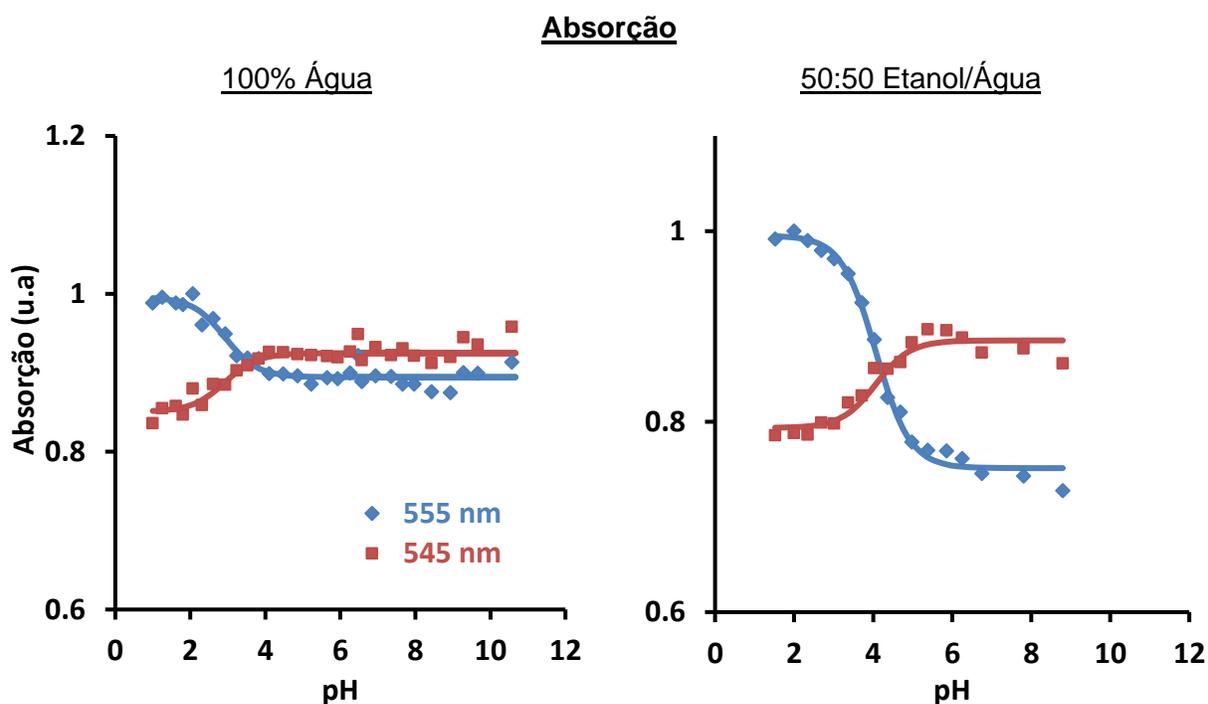


Figura 3.28 – Gráficos dos ajustes aos dados experimentais da absorção durante a titulação ácido-base da Cys-Rdm em água à esquerda e em 50:50 etanol/água à direita. Os gráficos mostram com marcadores os pontos experimentais e as linhas os ajustes feitos a 555 nm (—, azul) e 545 nm (—, vermelho)

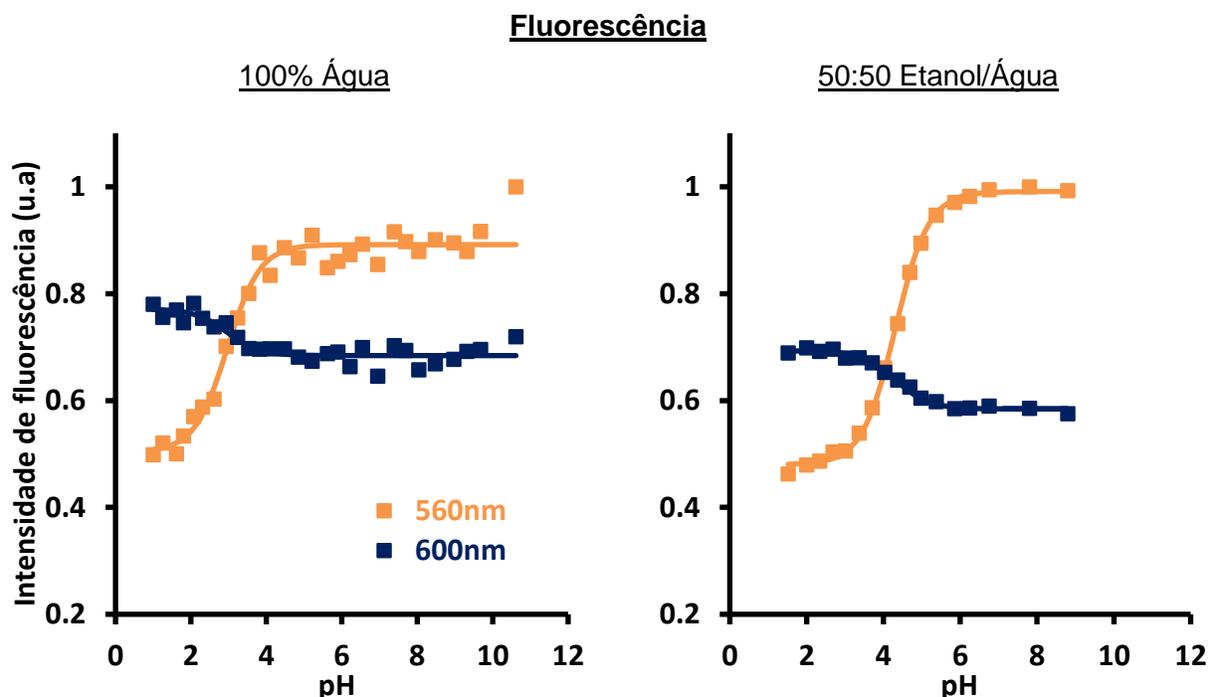


Figura 3.29 – Gráficos dos ajustes aos dados experimentais da fluorescência durante a titulação ácido-base da Cys-Rdm em água à esquerda e em 50:50 etanol/água à direita. Os gráficos mostram com marcadores os pontos experimentais e as linhas os ajustes feitos a 560 nm (—, laranja) e 600 nm (—, azul escuro).

3.3 - Marcação da Albumina de Soro Bovino (BSA)

Após a reação de marcação da proteína avaliou-se o grau de ligação das sondas. Na tabela 5 estão presentes os dados relativos à marcação da proteína com a fluoresceína, sendo o A_{496nm} a absorção da sonda, o [FLU] a concentração da sonda, o A_{280nm}^* a absorção da proteína corrigida, o [BSA] a concentração da proteína e o DOL (*degree of labeling*) o grau de ligação da sonda à proteína. A tabela 2 mostra os mesmos dados, mas para a marcação da proteína com a rodamina.

A marcação e o modo de calcular o grau de ligação das sondas à proteína seguiu o procedimento referido anteriormente (ver capítulo 2.2). Os tubos referidos nas tabelas são os eppendorfs para o qual foram recolhidas as frações de bioconjugado após a passagem pela coluna de exclusão. O volume de injeção foi 5 mL e para cada tubo presente na tabela recolheu-se cerca de 1 mL. O tubo 1 da tabela 5 e os tubos 1 e 2 da tabela 6 não foram usados para o cálculo do DOL uma vez que correspondem às primeiras frações recolhidas e não continham bioconjugado. A coluna referente à sonda livre diz respeito à fração que saiu em último.

Resultados e Discussão

Segundo a tabela 5, correspondente à marcação da proteína com a fluoresceína, é possível verificar que o DOL médio foi de 0.61. Este valor indica que em cerca de 5 proteínas existem 3 moléculas de sonda, indicando que houve proteínas que não foram marcadas.

O DOL para a marcação da BSA com a rodamina (0.74 em média) indica que esta foi ligeiramente mais eficiente, tabela 6. Ainda assim, existiram também proteínas não marcadas. Para além disso, é preciso ter em conta que o coeficiente de extinção molar das sondas pode alterar quando estas estão ligadas à proteína. No entanto, não foi possível encontrar esses valores na literatura, tendo sido o DOL calculado através do coeficiente de extinção molar das sondas em tampão ($76\ 900\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ para a fluoresceína⁵ e $66\ 100\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ para a tetrametilrodamina⁶⁰).

Tabela 5 – Resultados da marcação da proteína BSA com fluoresceína iodoacetamida.

BSA-Fluoresceína											
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Sonda Livre
$A^{*280\text{nm}}$	0.007	0.059	0.565	0.671	0.726	0.695	0.655	0.622	0.227	0.081	0.134
$A_{496\text{nm}}$	0.004	0.034	0.441	0.545	0.573	0.557	0.534	0.499	0.173	0.059	0.365
[BSA] / μM	0.25	2.12	18.40	21.49	23.53	22.39	20.95	20.03	7.46	2.71	-
[FLU] / μM	0.10	0.88	11.47	14.17	14.90	14.49	13.89	12.98	4.50	1.53	9.49
[DOL]	-	0.42	0.62	0.66	0.63	0.65	0.66	0.65	0.60	0.57	-

Tabela 6 – Resultados da marcação da proteína BSA com rodamina iodoacetamida.

BSA-Rodamina								
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Sonda Livre
$A^{*280\text{nm}}$	0.001	0.001	0.302	0.444	0.455	0.418	0.216	0.02
$A_{555\text{nm}}$	0	0.002	0.276	0.407	0.411	0.393	0.208	0.112
[BSA] / μM	0.08	0.05	19.22	28.24	29.03	26.46	13.60	-
[RDM] / μM	0.00	0.10	13.92	20.52	20.73	19.82	10.49	5.65
[DOL]	-	-	0.72	0.73	0.71	0.75	0.77	-

Avaliou-se também uma possível ligação não-covalente das sondas à proteína. Para esse fim precipitou-se uma alíquota dos bioconjugados em metanol frio, retirou-se o sobrenadante, evaporou-se o metanol tanto do precipitado como do sobrenadante e ressuspendeu-se ambos em tampão novamente.

Quando se compara os espectros desta experiência (original, ressuspendido e sobrenadante) com o espectro da respetiva sonda livre, figura 3.30, é possível perceber que o sobrenadante é idêntico ao ressuspendido e ao tubo original de onde foi retirada a alíquota. Para além disso, é possível ver claramente no espectro do sobrenadante uma banda a 280 nm (banda do triptofano da proteína), indicando que o conteúdo presente no sobrenadante é de facto maioritariamente bioconjugado e não sonda livre. A presença de bioconjugado no sobrenadante pode ocorrer pelo facto de este não ter precipitado completamente durante a centrifugação ou por uma pequena porção ter sido aspirado juntamente com o sobrenadante.

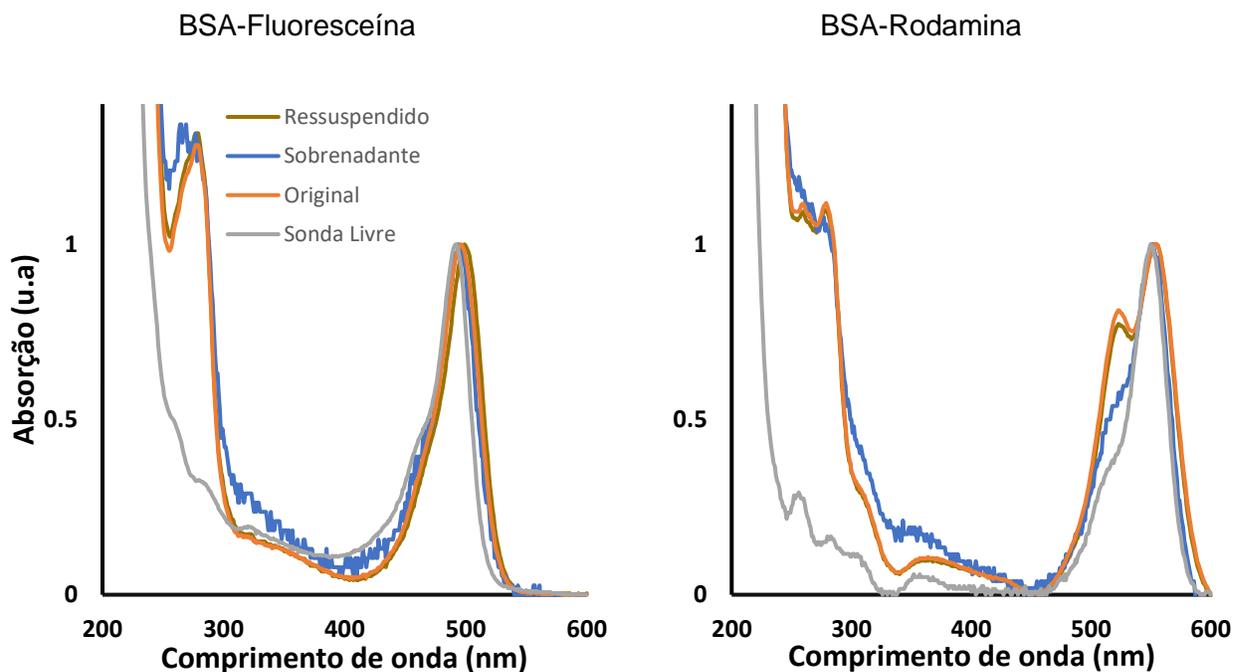


Figura 3.30 – Espectros de absorção, normalizados para a banda da sonda, dos precipitados, sobrenadantes, tubos originais e respetivas sondas livres dos bioconjugados em tampão.

Relativamente aos espectros do bioconjugado com a rodamina, é possível observar uma diferença na zona de absorção da sonda (555 nm) entre o espectro do bioconjugado e o espectro da sonda livre. Nomeadamente, o aparecimento de uma banda à volta dos 520 nm que é característica do fenómeno de agregação da rodamina.⁶¹

Esta banda não desapareceu após precipitação e ressuspensão, mas ficou menos intensa. Para além disso, o espectro do sobrenadante na zona da sonda é algo intermédio entre o espectro do ressuspendido e da sonda livre, o que sugere que a rodamina possa estar parcialmente agregada na proteína.

Resultados e Discussão

3.3.1 - Titulação dos Bioconjugados

Assim como se procedeu para as sondas ligadas à cisteína também se titulou os dois bioconjugados de forma a perceber o comportamento das sondas ligadas à proteína com a variação do pH. As titulações com os bioconjugados foram realizadas apenas em água pois a proteína em etanol desnatura, começa a agregar e conseqüentemente precipita. Neste capítulo apresentarei apenas os resultados para a BSA-Flu, pois, na BSA-Rdm não foi possível ir ao pH de equilíbrio das suas espécies.

A figura 3.31 mostra as absorções medidas em cada ponto da titulação ácido-base da BSA-Flu em água, e através desta observa-se, abaixo de pH 6, um aumento anormal da absorção que sugere a agregação da BSA. Este resultado foi também comprovado por DLS (figura 3.32) onde também é possível ver um aumento do tamanho médio das partículas em solução abaixo de pH 6. Esta agregação deve-se ao facto da BSA possuir o seu ponto isoelétrico próximo deste pH ($pI=4.7$ podendo este aumentar quando se adiciona ácido gordos).⁶²

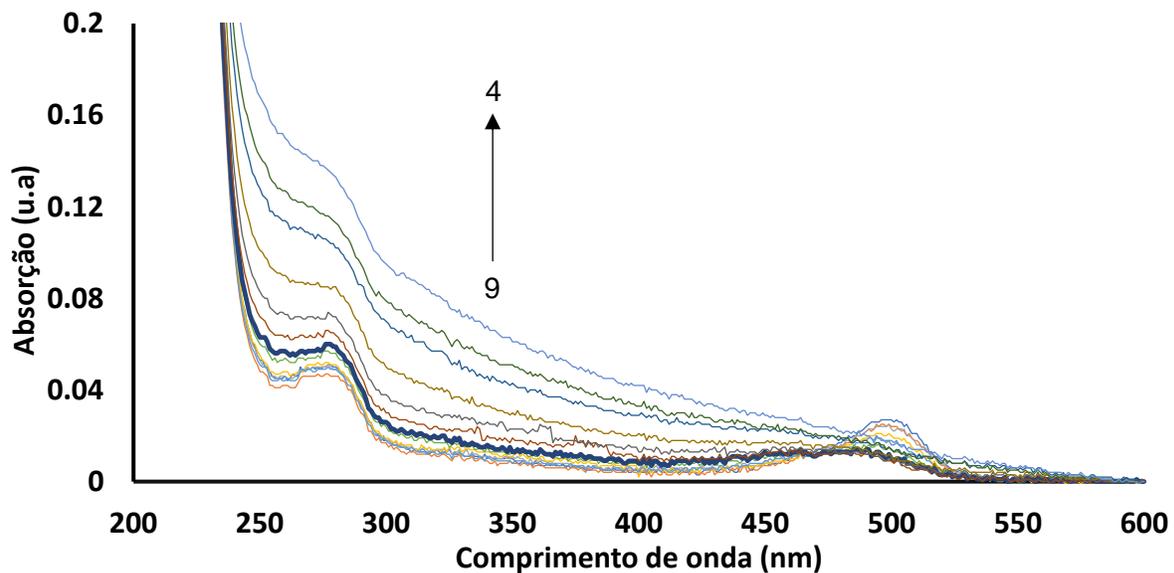


Figura 3.31 – Espectro de absorção da titulação ácido-base da BSA-Flu em água 150 mM NaCl entre pH 9-4. A linha a negrito corresponde ao espectro de absorção a pH 6.1.

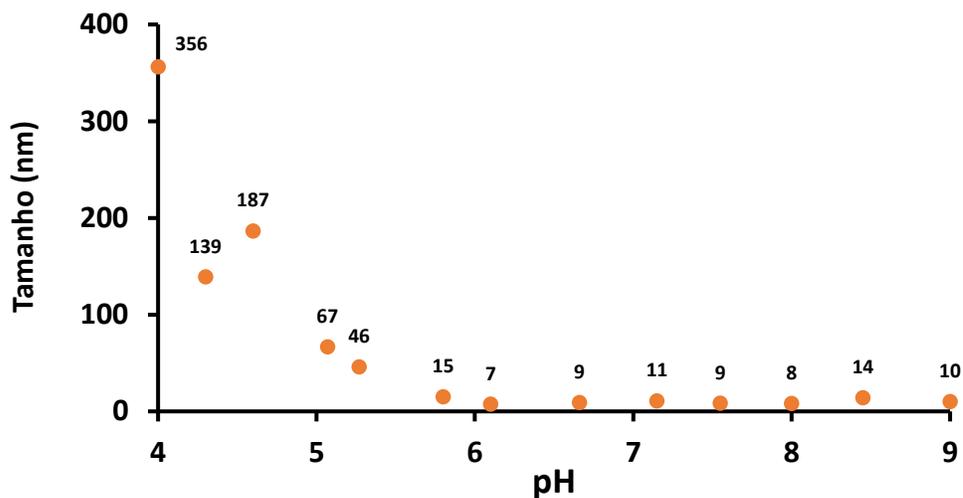


Figura 3.32 – Resultados obtidos através do DLS para a titulação ácido-base da BSA-Flu em tampão. Encontram-se representados os diâmetros médios das partículas em solução em função do pH.

Através do triptofano é possível seguir a fluorescência e desnaturação das proteínas, dado que este aminoácido contém na sua estrutura um fluoróforo (índole) que pode emitir de estados excitados diferentes. Isto é, dependendo do meio em que se encontra um estado ou outro pode ser estabilizado devido às interações com o solvente e a emissão é proveniente do estado que se encontra estabilizado pelo o solvente. Assim, quando a proteína desnatura e o triptofano é exposto ao solvente (água) existe um estado excitado que por ser mais polar que o outro e tendo assim uma melhor interação com a água é estabilizado e a emissão acontece a partir desse.⁶³

Assim seguiu-se também a fluorescência do triptofano ao logo da titulação e ilustraram-se os resultados no gráfico da figura 3.33. Este mostra que o λ_{ems} se mantém relativamente constante não revelando desnaturação da proteína. A diminuição na intensidade de fluorescência poderá dever-se ao aumento da dispersão de luz devido à agregação da proteína.

Resultados e Discussão

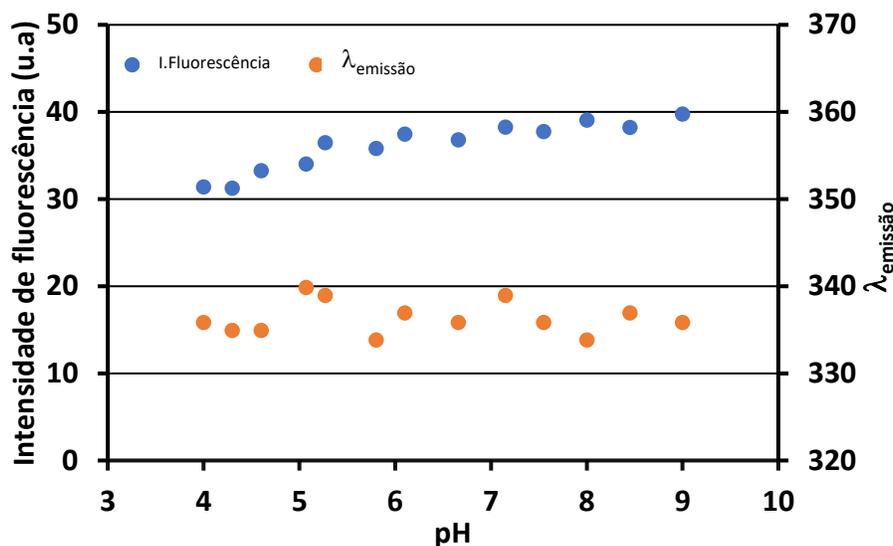


Figura 3.33 – Representação dos resultados da titulação ácido-base da BSA-Flu em tampão. No eixo das ordenadas à direita encontra-se representado o λ_{ems} e à esquerda a intensidade de fluorescência – $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$.

Os resultados da titulação para a fluorescência da sonda encontram-se na figura 3.33 onde é possível ver a diminuição esperada da sua intensidade para valores de pH mais baixos. A figura 3.34 mostra os mesmos resultados, mas em que se normalizou os espectros de forma a ser visível o aparecimento da espécie monoaniônica. É, contudo, de esperar que estes venham também afetados não só pelo equilíbrio entre a espécie di e monoaniônica como também pela agregação da proteína. Esta pode afetar a emissão da sonda e, portanto, afetar os resultados pretendidos devido a dois fatores, um por colocar a sonda num ambiente diferente daquele que se pretende medir e dois por aumentar a dispersão de luz que leva a uma diminuição da intensidade de fluorescência não derivada do equilíbrio de espécies. Todavia esta última vem certamente menos afetada do que a observada na intensidade de fluorescência do triptofano dado que a dispersão de luz é tão menor quanto menor for o comprimento de onda de excitação, figura 3.32.

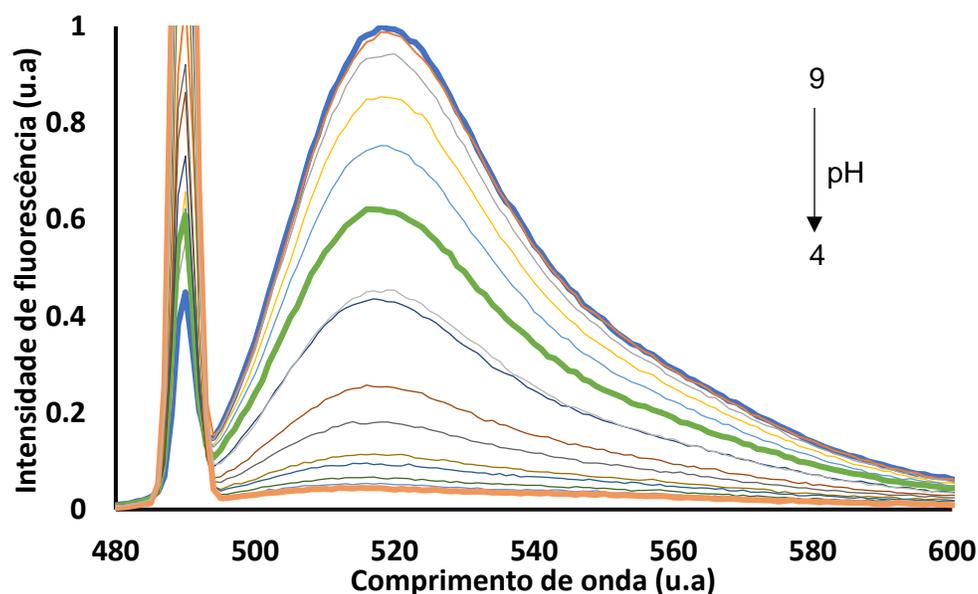


Figura 3.34 – Espectros de emissão de fluorescência da BSA-Flu durante a titulação ácido-base em tampão fosfato. Os espectros correspondentes aos pH extremos e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=490$ nm.

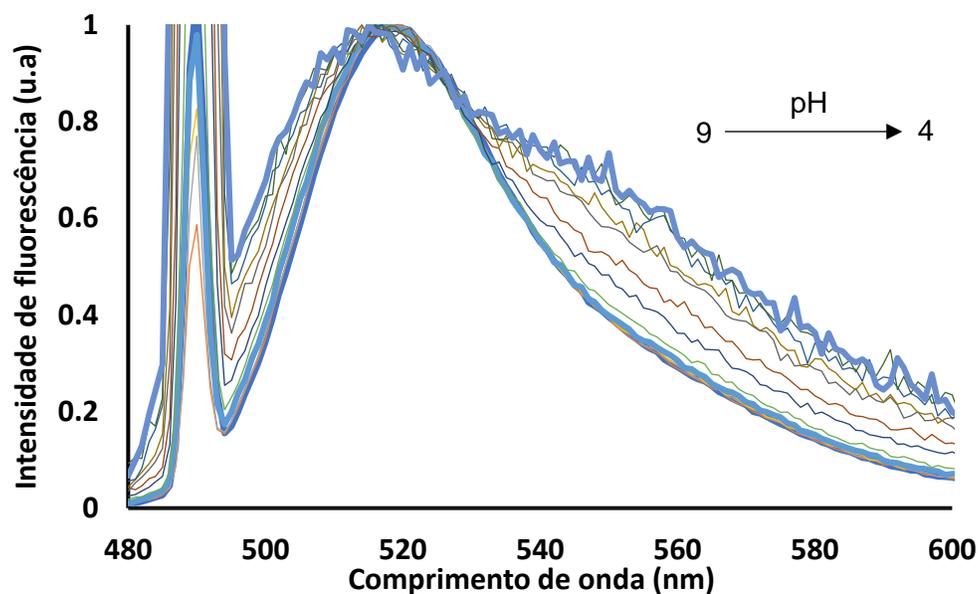


Figura 3.35 – Espectros de emissão de fluorescência da BSA-Flu, normalizados pelo o respetivo máximo, durante a titulação ácido-base em tampão fosfato. Os espectros correspondentes aos pH extremos e a pH 7 encontram-se representados por linhas espessas – $\lambda_{exc}=490$ nm.

Nas figuras 3.34 e 3.35 observa-se que o λ_{ems} para a espécie Cys-Flu é a 522 nm, que comparado com a sonda ligada à cisteína em água é ligeiramente desviado para o vermelho (cerca de 7 nm).

Resultados e Discussão

É visível também na figura 3.35, quando se normaliza os espectros, o aparecimento da espécie monoaniônica a pH cerca de 7, enquanto que para a sonda livre em solução aquosa esta espécie só é significativa a pH<6.

3.3.2 - Cálculo de pK_a – BSA-Fluoresceína

Através do capítulo anterior pode ver-se que o cálculo do pK_a da sonda ligado à BSA não é algo trivial. Os resultados da absorção para o cálculo deste foram excluídos, por esta vir muito afetada pela a agregação da proteína. Para além disso, os resultados da fluorescência carecem de algum cuidado para termos um ajuste bom, correto e com algum significado.

Para isso apenas se consideraram os pontos entre pH 9 e 6, onde a absorção e o DLS ainda não mostram agregação severa. Porém, entre este pH pode ainda não ter ocorrido a conversão total da espécie dianiônica em monoaniônica e conseqüentemente levar a um ajuste sem significado por incluir parâmetros mal definidos (neste caso o coeficiente de contribuição da espécie monoaniônica).

Como solução procurou-se em qual das frações etanol/água o espectro da espécie dianiônica era igual ao da mesma ligada à BSA. Tendo-se escolhido a fração 30:70, fixou-se os coeficientes de contribuição de cada espécie (monoaniônica e dianiônica) aos comprimentos de onda 512 nm e 550 nm que saíram do seu ajuste e calculou-se o pK_{a3}^* . Deste modo saiu o ajuste presente na figura 3.36 e um $pK_{a3}^*=6.9$. Como abordagem alternativa foi calculado o valor do pK_a com base nos coeficientes de contribuição de cada sonda a cada comprimento de onda que saíram dos ajustes em todas as frações de etanol (0 a 50%). Isto é, inseriram-se os coeficientes que saíram do ajuste para 100% água, calculou-se o pK_a e registou-se o χ^2 e assim sucessivamente até 50% etanol.

Os coeficientes que levaram a um menor χ^2 e naturalmente a um melhor ajuste dos dados da figura 3.36 foram os que saíram do ajuste com os coeficientes de contribuição obtidos em 50:50 etanol/água e conduziram a $pK_{a3}^*=7.00$. Dada a semelhança entre os valores obtidos para o pK_{a3}^* segundo as diferentes abordagens, foi considerado que este parâmetro apresenta um grau aceitável de confiança, considerando-se como valor de referência 7.0.

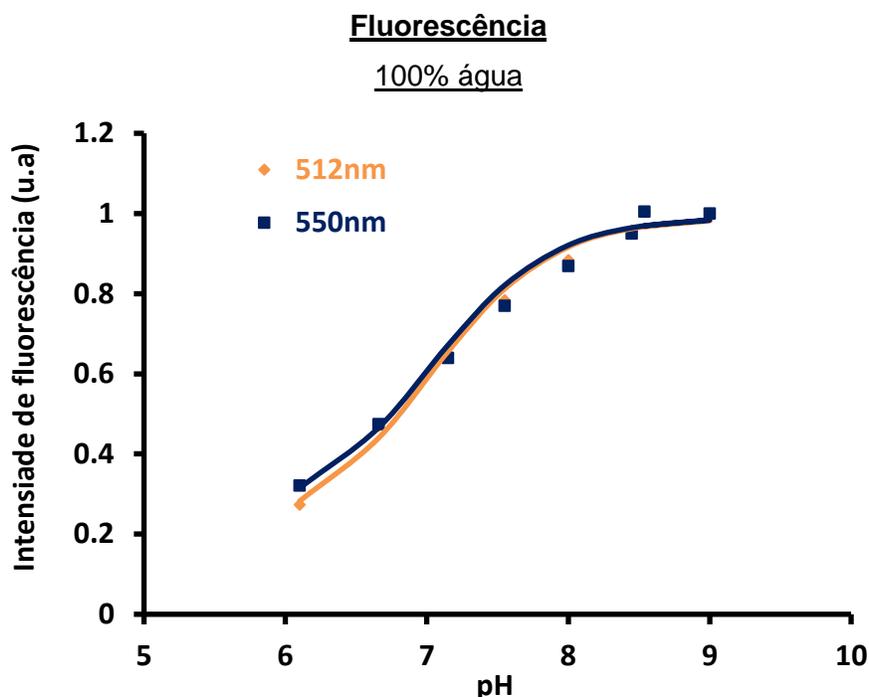


Figura 3.36 – Gráficos dos ajustes aos dados experimentais da fluorescência durante a titulação ácido-base da BSA-Flu em tampão. Os gráficos mostram com marcadores os pontos experimentais e as linhas os ajustes feitos a 560 nm (—, laranja) e 600 nm (—, azul escuro).

3.4 - Efeito do meio no equilíbrio ácido-base das sondas

- FLUORESCÊNCIA

A figura 3.37 mostra os pK_a calculados a partir da absorção (à esquerda) e da fluorescência (à direita), para a Cys-Flu nas várias frações de etanol e para a BSA-Flu apenas em água. Esta figura ilustra bem, através do afastamento do pK_{a1} do pK_{a2} , a estabilização da espécie neutra à medida que se aumenta a quantidade de etanol. Mais concretamente o pK_{a1} baixa de 2 (em água) para 1.4 (em 50:50 etanol/água), enquanto que o pK_{a2} aumenta praticamente duas unidades subindo de 4.1 para 6. O pK_{a3} , que corresponde à constante de equilíbrio entre a espécie di- e monoaniônica, passa de 6.5 em água para 7.5 na mistura com 50% etanol. A variação da intensidade de fluorescência com o pH é maioritariamente sensível ao equilíbrio entre a espécie mono e di-aniónica, estando o valor obtido para este equilíbrio no estado excitado (pK_{a3}^*) representado no painel da direita da figura 3.37. Observa-se uma ligeira diminuição neste parâmetro quando comparado com o equilíbrio entre ambas as espécies no estado fundamental (pK_{a3}) mostrando existir uma estabilização da espécie di-aniónica no estado excitado. Este

Resultados e Discussão

comportamento está em concordância com outros estudos apresentados na literatura para a fluoresceína.⁵

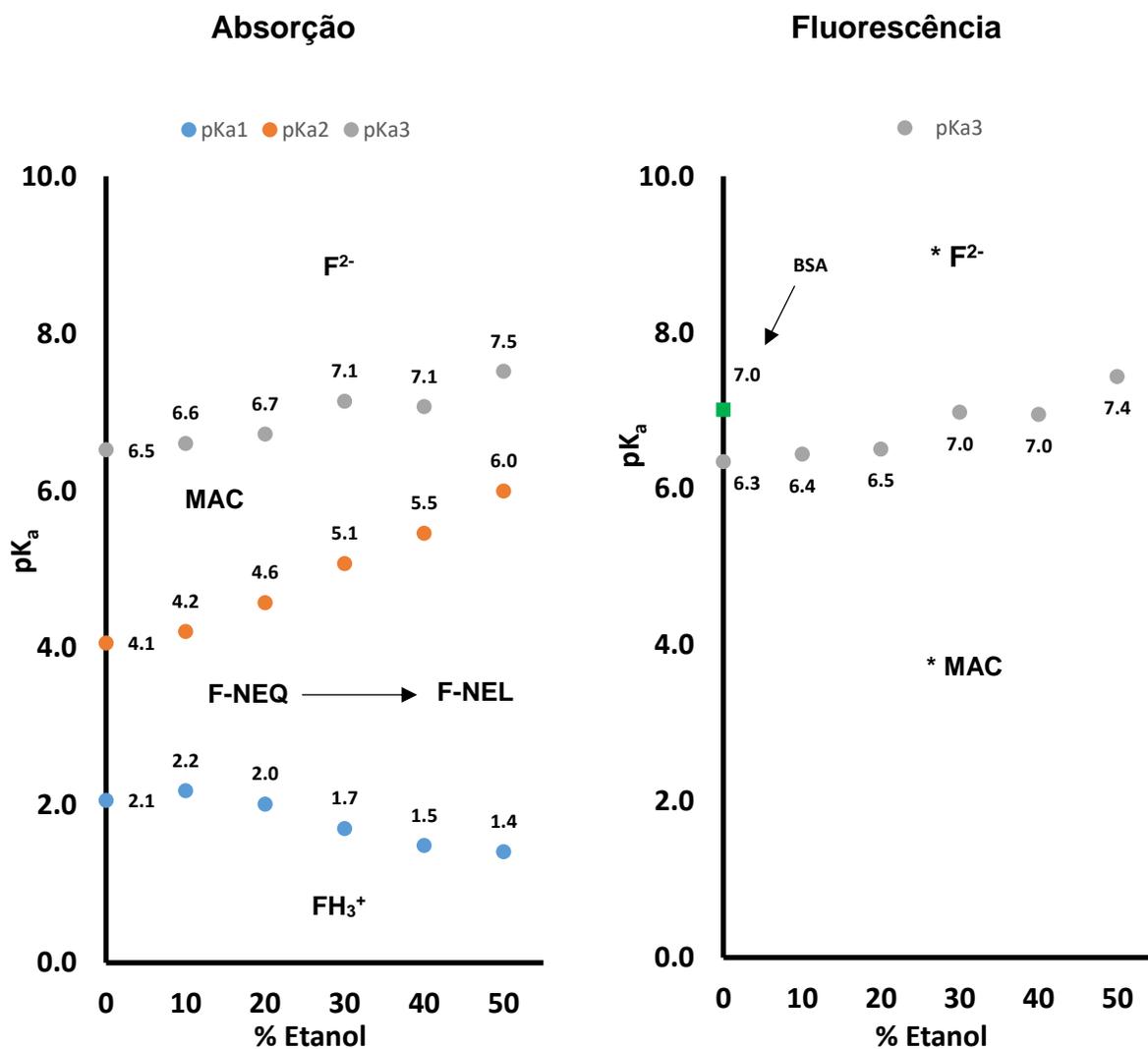


Figura 3.37 – Valores dos pK_a 's calculados, à esquerda pela absorção e à direita pela fluorescência, para a Cys-Flu em água, misturas de etanol/água e para a BSA-Flu em tampão. Entre os valores dos pK_a 's esta também é representado através da sua abreviatura qual a espécie em solução nesse intervalo.

Na figura 3.37 está também representado o pK_{a3}^* obtido para a fluoresceína ligada à BSA (que é de 7.0). Este parâmetro é significativamente diferente do valor obtido para a Cys-Flu em água (6.3) indicando que a fluoresceína se encontra num ambiente com diferentes propriedades. A comparação com os resultados obtidos para a Cys-Flu nas diferentes proporções de água e

etanol permite-nos estabelecer uma correspondência para o pK_{a3}^* obtido no meio que contém entre 30 a 40% de etanol.

Este resultado é de certa forma relevante uma vez que a fluoresceína é muitas vezes usada como sonda de pH e como se mostra a estabilização das suas espécies é afetada pelo o meio onde esta se encontra. Como a fluorescência do dianião (F^{2-}) é muito superior às outras, dependendo de onde esta se encontra a intensidade de fluorescência associada à sua banda de emissão pode não ser proporcional à concentração e levar a interpretações menos corretas.

- RODAMINA

A rodamina é uma sonda muito menos complexa em termos de equilíbrios ácido-base quando comparada com a fluoresceína. Ainda assim, esta sofre uma variação também considerável no valor da constante de equilíbrio entre a espécie neutra (R-NEZ) e o catião (R^+) quando na presença de etanol, figura 3.38. Observa-se uma variação ligeiramente superior a 1 unidade quando esta passa de um meio aquoso ($pK_a=2.9$) para um meio com 50:50 etanol/água ($pK_a=4.1$). Apesar deste pK_a não ser muito relevante para experiências a pH fisiológico pode eventualmente haver interesse em realizar experiências neste intervalo de pH, tendo neste caso que se considerar as propriedades fotofísicas das duas espécies uma vez que ambas se encontraram em solução. Os valores obtidos para a constante de ionização através da variação da intensidade de fluorescência são ligeiramente superiores (0.1 a 0.2 unidades) aos obtidos por absorção. Estes resultados indicam uma ligeira estabilização da espécie catiónica quando no estado excitado.

Não foi possível obter o valor de pK_a da rodamina quando ligada à BSA pois este equilíbrio ocorre para valores de pH onde a BSA apresenta forte agregação, figura 3.31.

Resultados e Discussão

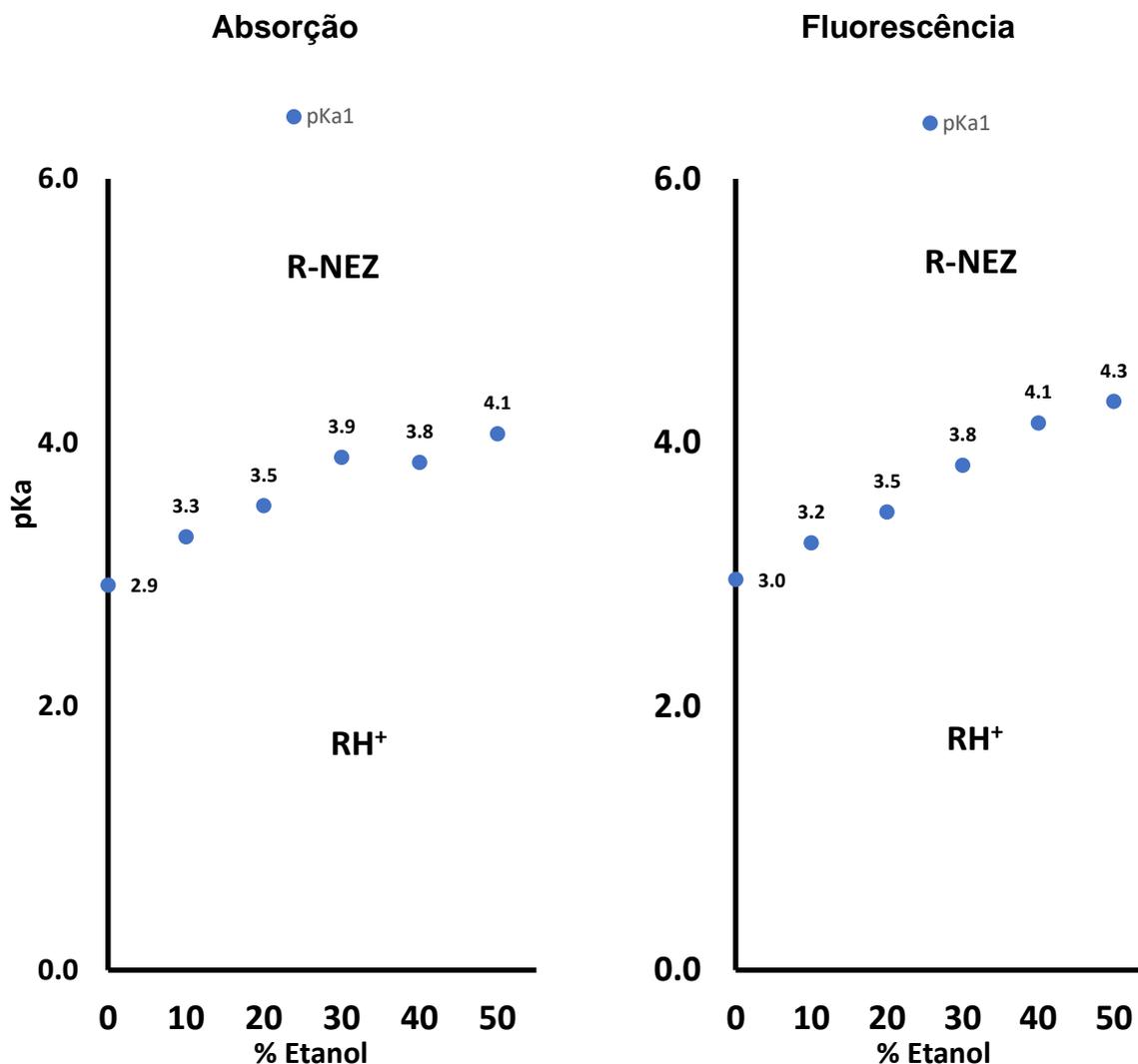


Figura 3.38 – Valores de pK_a 's calculados, à esquerda pela absorção e à direita pela fluorescência, para a Cys-Rdm em água e misturas de etanol/água. Entre os valores dos pK_a 's esta também representado através da sua abreviatura qual a espécie em solução nesse intervalo.

3.5 - Nanodroplets

A preparação de *nanodroplets* estabilizadas pelos bioconjugados preparados neste trabalho, BSA-Flu e BSA-Rdm, teve por objetivo o seu estudo utilizando metodologias baseadas em fluorescência (microscopia confocal e citometria de fluxo) para caracterização da sua estrutura e dinâmica. Uma vez que a concentração dos bioconjugados preparados era inferior à concentração de BSA utilizada no método seguido para a preparação dos *nanodroplets*³⁸, foi inicialmente efetuado um estudo do efeito da concentração de BSA nas propriedades dos *nanodroplets*. Assim, preparam-se, através do procedimento descrito no capítulo 2.4,

nanodroplets com BSA não marcada com a concentração usada pelos autores (30 μM) e com uma concentração mais baixa (12 μM) que achamos aceitável usar com base no stock que possuíamos de BSA marcada. Estas, uma vez formadas, foram ainda diluídas 1:2 e 1:4 em água e avaliadas por DLS ao longo do tempo. A tabela 7 mostra os resultados do DLS para esta experiência.

Tabela 7 – Resultados de tamanhos e polidispersão dos diferentes tipos de *nanodroplets* formados e acompanhamento destes com o tempo.

BSA Não Marcada

[BSA] (μM)	T (h:min)	Tamanho médio (nm)	Polidispersão (u.a)	Intensidade (u.a)
30	0:00	365	0.35	437872
	5:00	432	0.20	26165
	24:00	369	0.16	47502
	1:2 – 0:00	457	0.40	215550
	1:2 – 5:00	432	0.24	61753
	1:4 – 0:00	499	0.39	122638
	1:4 – 5:00	517	0.23	43363
12	0:00	481	0.41	491520
	5:00	506	0.22	47571
	24:00	354	0.13	67200
	1:2 – 0:00	610	0.44	250101
	1:2 – 5:00	454	0.23	47196
	1:4 – 0:00	707	0.41	178781
	1:4 – 5:00	579	0.22	26623

BSA Marcada (Verde)

12	0:00	285	0.24	31149
	3:30	351	0.18	29605
	5:00	328	0.18	22895
	24:00	29	0.9	832
	1:5 - 0	363	0.3	18305
	1:5 – 3:30	348	0.28	9866
	1:5 – 5:00	341	0.15	8253
	1:5 – 24:00	70	0.4	171
	1:20 – 0:00	310	0.22	3050
	1:20 – 3:30	328	0.21	1644
	1:20 – 5:30	332	0.19	905
	1:20 – 24:00	358	0.35	360

Resultados e Discussão

Verifica-se que a formação das *nanodroplets* é eficaz para concentrações mais baixas de proteína, embora o tamanho médio dos *nanodroplets* formados seja superior. Observa-se também que o tamanho médio das *nanodroplets* em suspensão não se altera significativamente ao longo do tempo (até 24 h), mas que se observa uma diminuição no índice de polidispersão. Verifica-se também por inspeção visual da suspensão que se forma um depósito ao longo do tempo e que de modo geral a intensidade de dispersão por parte das partículas em suspensão diminui. Este efeito observa-se tanto nas *nanodroplets* formadas na presença de 30 μM como de 12 μM de BSA.

Após se perceber que era possível trabalhar com concentrações de BSA mais baixas, prosseguiu-se para a formação destas inicialmente com proteína marcada com fluoresceína. O DLS mostra que o tamanho é semelhante às formadas anteriormente com BSA não marcada (tabela 7). Recolheu-se ainda espectros de fluorescência apresentados na figura 3.39, mostrando estes que a sonda se encontra num ambiente idêntico ao da mesma na BSA. Este resultado pode ainda evidenciar que após a formação das *nanodroplets* a BSA continua nativa, uma vez que, se esta desnatura-se a sonda iria ficar mais exposta à água e tal não parece acontecer.

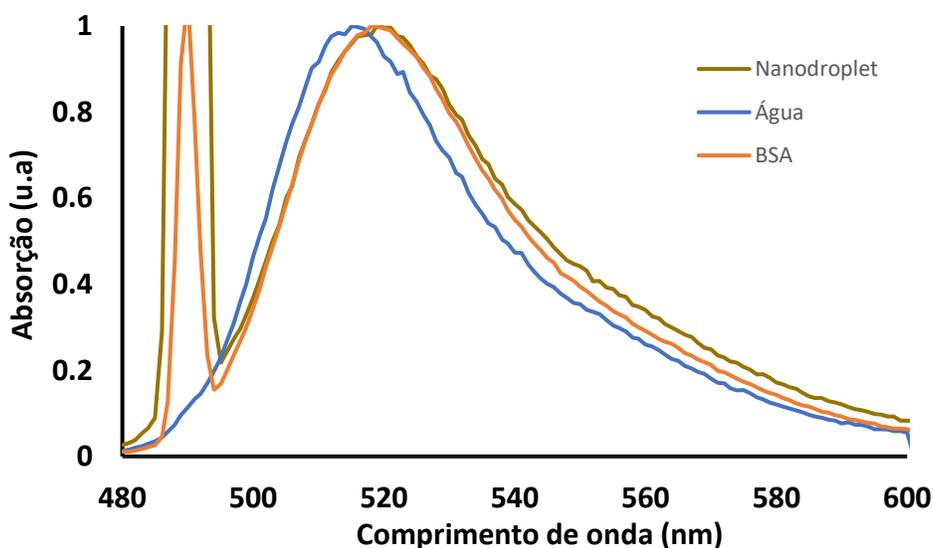


Figura 3.39 – Espectros de emissão de fluorescência da fluoresceína em *nanodroplet*, água e na BSA – $\lambda_{exc}=490$ nm.

Com isto avançou-se para a preparação das amostras com o objetivo de as visualizar através da microscopia confocal (descrita no capítulo 2.6). Realizaram-se dois tipos de ensaios, um com o intuito de perceber melhor a estabilidade, e dinâmica deste tipo de sistemas em solução de forma

a complementar os resultados obtidos na citometria de fluxo e outro de forma a estudar estes sistemas como agentes de encapsulação com liberação controlada. Os quais vão ser apresentados e discutidos nos próximos capítulos.

3.5.1 - Citometria de fluxo

Nesta experiência criaram-se duas populações de nanodroplets, umas produzidas com BSA não marcada (branca) e outra com BSA marcada com fluoresceína (verde) as quais foram misturas e analisadas por citometria de fluxo a diferentes tempos.

A imagem da figura 3.40 mostra os resultados em citometria de fluxo para a mistura das duas populações de nanodroplets e a sua evolução com o tempo. Como se pode ver através desta, existem duas populações presentes, uma para valores de intensidade mais baixos correspondente à BSA branca e outra para valores maiores de intensidade maiores a população da BSA verde e o esquema de cores mostra a evolução com o tempo. Apesar de não se perceber bem o porquê da diminuição das contagens ao longo do tempo, a não ser devido à sedimentação e a agitação que o citômetro faz não ser suficientemente eficaz e a posterior aspiração do poço levar cada vez menos partículas. Contudo, é possível observar que ao longo do tempo as duas populações mantêm-se isoladas, mostrando que a cápsula criada pela proteína à volta do PFP é estável caso contrário e se houvesse equilíbrio entre a proteína na cápsula e a proteína em solução iria ser visível uma fusão das duas bandas presentes no gráfico.

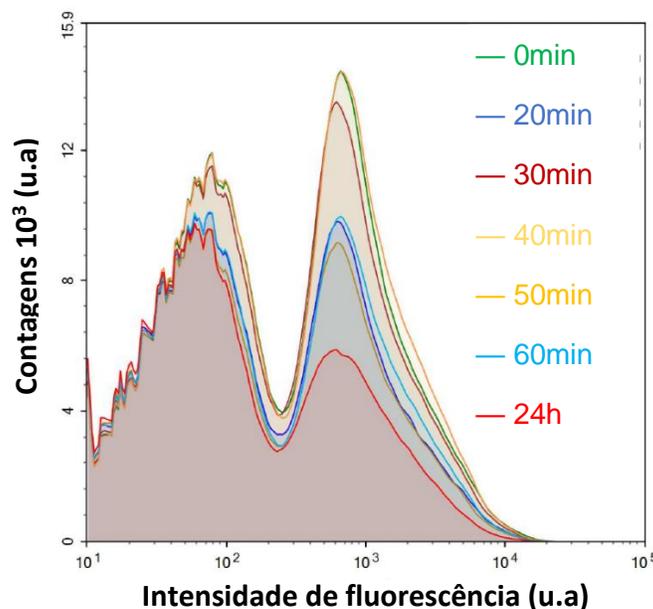


Figura 3.40 – Gráfico com os resultados para a citometria de fluxo. A banda à esquerda mostra a população de nanodroplets com BSA branca e à direita a população com BSA verde.

Resultados e Discussão

3.5.2 - Microscopia confocal – Ensaio 1

Para este ensaio procedeu-se à formação de vários grupos de *nanodroplets*:

1 – *Nanodroplets* verdes, formados com BSA marcada com fluoresceína.

2 – *Nanodroplets* vermelhos, formados com BSA marcada com rodamina.

3 – *Nanodroplets* formados com BSA marcada com fluoresceína e BSA marcada com rodamina, sendo estas misturadas antes de se fazer as *nanodroplets*.

4 – *Nanodroplets* onde simplesmente se misturaram as *nanodroplets* do grupo 1 (verdes) com as do grupo 2 (vermelhas).

Os resultados obtidos em microscopia confocal para as várias preparações de *nanodroplets* estão apresentados nas figuras 3.41 e 3.42.

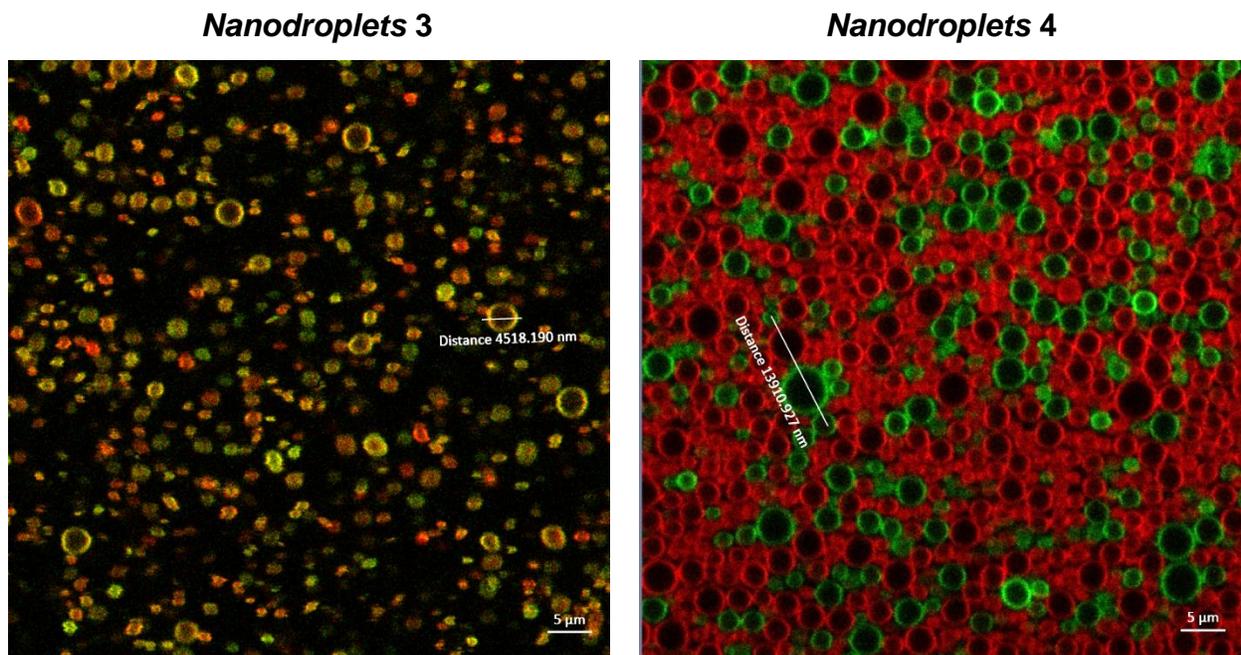


Figura 3.41 – Imagens de microscopia confocal dos diferentes grupos de *nanodroplets*. A cor verde corresponde à emissão proveniente da excitação a 488 nm e a cor vermelha à emissão da excitação a 561 nm. As linhas indicam secções de corte cuja intensidade de fluorescência está apresentada na figura 3.42.

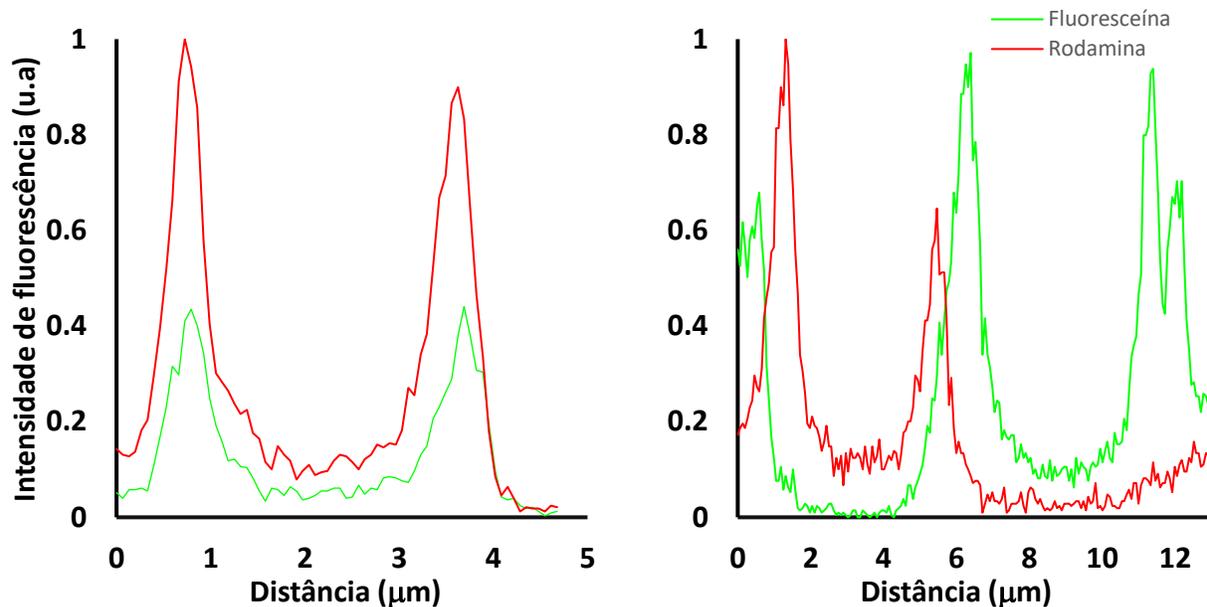


Figura 3.42 – Intensidades de fluorescência em função da distância selecionada nas imagens da figura 3.37. A verde (—) encontra-se emissão registada pela excitação a 488 nm e a vermelho (—) pela excitação a 561 nm.

Na figura 3.42 estão presentes os gráficos das intensidades de fluorescência provenientes das proteínas verdes e vermelhas, onde se observa, no grupo 3, que a mesma *nanodroplet* contém tanto proteína com fluoresceína como com rodamina. Contrariamente para o grupo 4, é evidente que a emissão da fluoresceína e da rodamina são provenientes de *nanodroplets* diferentes. Este resultado é facilmente visível na figura 3.41, onde para o grupo 3 vê-se apenas um tipo de *nanodroplets*, isto é, *nanodroplets* com uma mistura de verde e vermelho na sua superfície e no grupo 4 é claro duas classes de *nanodroplets* (verdes e vermelhas).

Os resultados apresentados nas figuras 3.41 e 3.42 para as *nanodroplets* do grupo 4 foram obtidos 3 dias após a sua preparação. O facto de serem apenas observadas *nanodroplets* estabilizadas apenas por um dos tipos de BSA, evidencia a estabilidade muito elevada destes sistemas sem ocorrência de mistura entre diferentes partículas. Confirma-se desta forma os resultados da citometria de fluxo onde se seguiu a distribuição de fluorescência entre duas populações de *nanodroplets*, uma formada na presença de BSA e outra de BSA-Flu, e estas mostravam não se misturar. (ver capítulo 3.4.1).

Resultados e Discussão

3.5.3 - Microscopia Confocal – Ensaio 2

Este ensaio foi feito em colaboração e no enquadramento do doutoramento da Mestre Maria Inês Mendes. No qual se encapsulou um potencial agente ativo, uma porfirina, em *nanodroplets* com BSA marcada. Para isso, inicialmente dissolveu-se a porfirina numa pequena porção de THF (tetraidrofurano) e posteriormente misturou-se no PFP e por fim produziram-se as *nanodroplets* com BSA verde.

Na figura 3.43 estão presentes algumas imagens recolhidas na microscopia confocal para as amostras acima referidas. Estas imagens foram recolhidas num modo de aquisição que faz a excitação e recolha do sinal num canal (laser) e passado algum tempo é que faz a excitação e recolha do sinal do segundo canal, ou seja, os sinais dos diferentes canais podem vir desfasados um do outro caso a amostra não esteja fixa.

Através do conjunto de figuras 3.43 e 3.44 é possível ver que alguns dos sinais da porfirina vem na forma de um pico apenas e outros na forma de dois. Os sinais que contém dois picos é certamente porfirina que se deslocou para a BSA em vez de ficar em solução. Os sinais que contém apenas um pico devem, em princípio, ser porfirina encapsulada uma vez que se fossem simplesmente agregados de porfirina não seriam suficientemente grandes para serem visíveis no confocal, infelizmente não se usou o modo de aquisição que permite ver em simultâneo o sinal dos dois canais e confirmar o sinal da fluoresceína à volta do sinal da porfirina.

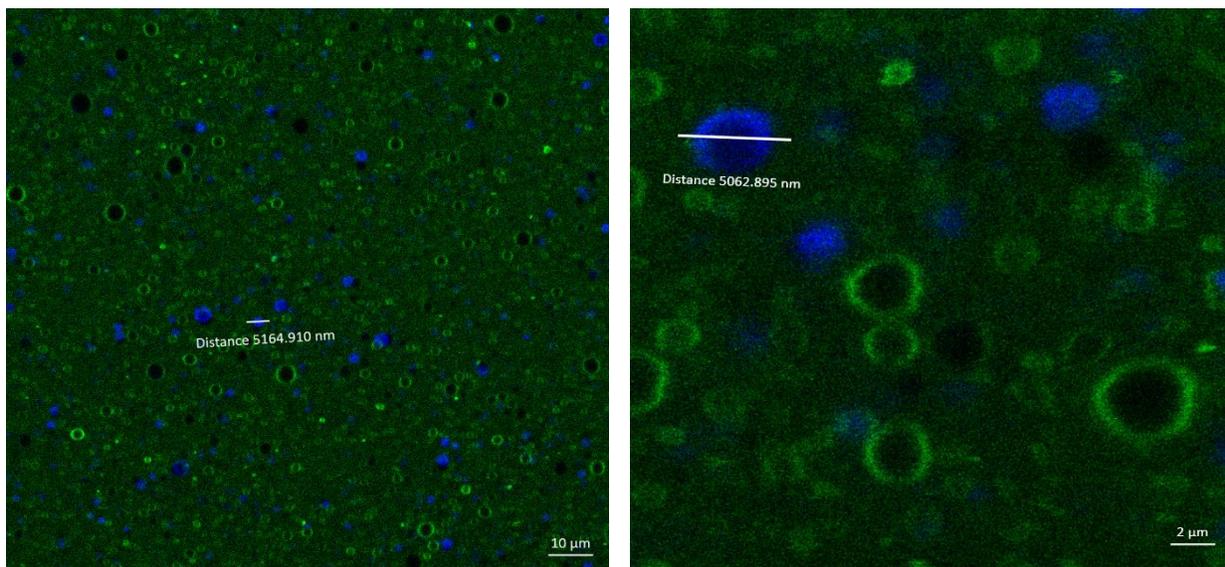


Figura 3.43 – Imagens de microscopia confocal dos diferentes grupos de *nanodroplets*. A cor verde corresponde à emissão proveniente da excitação a 488 nm e a cor azul à emissão da excitação a 405 nm. As linhas indicam secções de corte cuja intensidade de fluorescência está apresentada na figura 3.44.

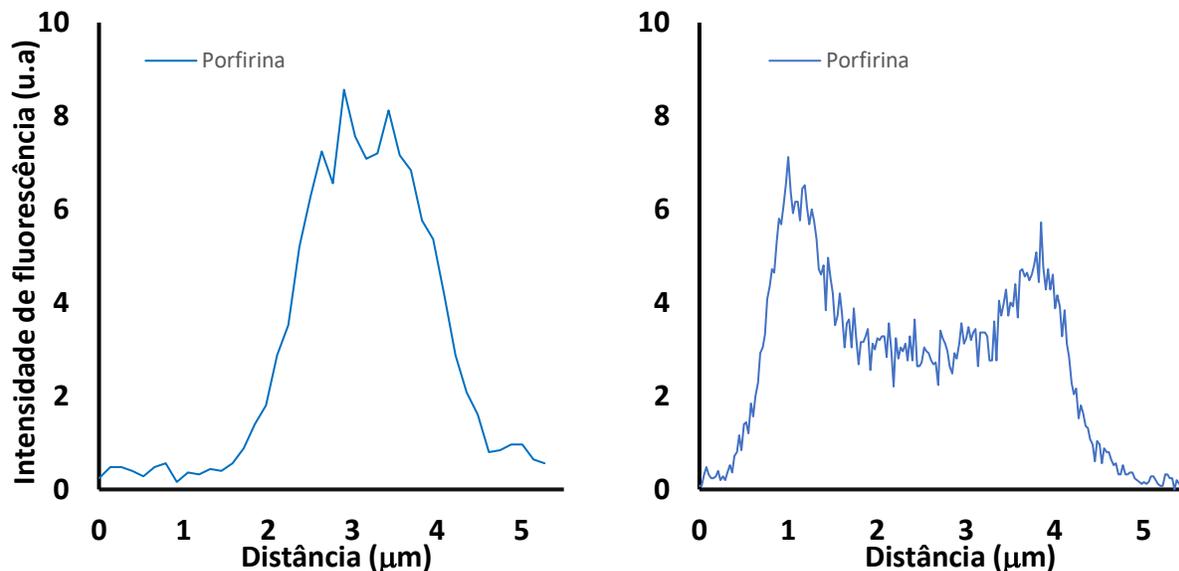


Figura 3.44 – Intensidades de fluorescência em função da distância selecionada nas imagens da figura 3.43. A verde (—) encontra-se emissão registada pela excitação a 405 nm.

Com vista em perceber melhor a capacidade do PFP em dissolver compostos realizou-se ainda um ensaio complementar. Preparou-se dois novos conjuntos de *nanodroplets* em que se dissolveu previamente no PFP pireno ou BODIPY.

A escolha das sondas foi baseada na sua grande apolaridade e sendo o PFP também bastante apolar havia interesse em perceber se este era capaz de dissolver essas sondas. Para além disso, o pireno é sabido ser uma sonda de polaridade e o BODIPY pode-se observar em microscopia confocal.

A polaridade do pireno pode ser seguida pela razão entre as intensidades da banda 1 e da banda 3 do seu espectro de emissão. Na figura 3.45 estão presentes os espectros de fluorescência do pireno nas nanodroplets, no PFP e incubado na BSA e as razões de bandas do pireno em cada sistema. Como se pode ver a razão da intensidade da banda 1 e da banda 3 no pireno nas nanodroplets e na BSA são iguais, e completamente diferentes da razão para o pireno dissolvido no PFP. Isto mostra o que o pireno se desloca para a BSA aquando da formação dos nanodroplets e que interage mais favoravelmente com a BSA do que com o PFP.

Resultados e Discussão

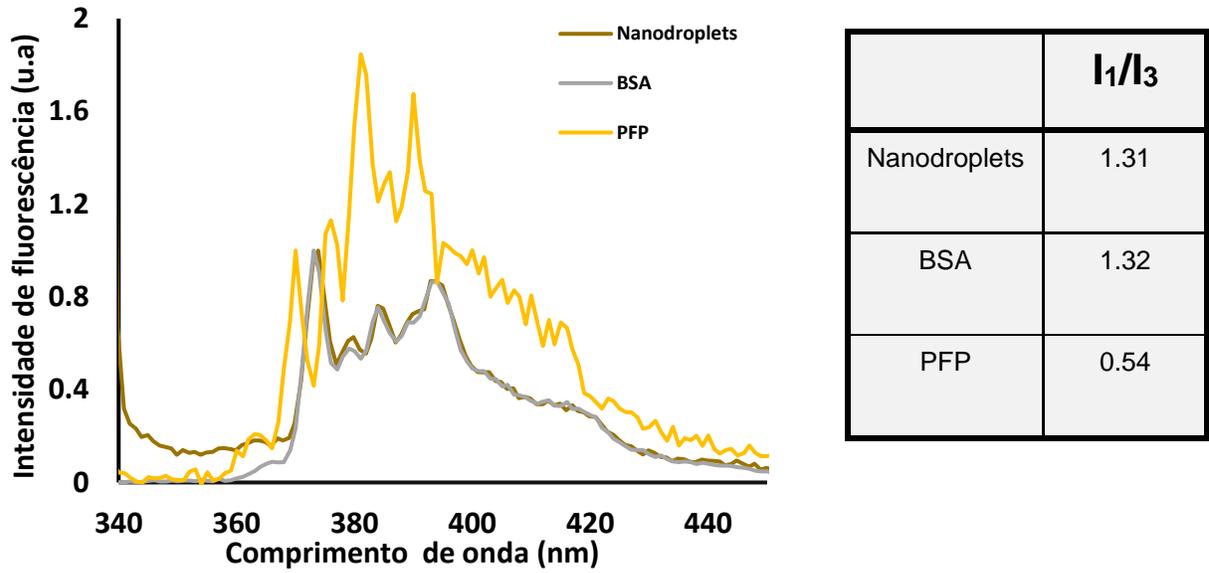


Figura 3.45 – Espectros de fluorescência para o pireno, nas nanodroplets (—, castanho), na BSA (—, cinzento) e em PFP (—, amarelo)

Um resultado equivalente foi obtido para as nanodroplets com BODIPY. Uma vez que o BODIPY apresenta fluorescência na região do visível, este sistema foi caracterizado por microscopia confocal. Na figura 3.46 pode observar-se que o BODIPY se encontra à superfície das *nanodroplets* evidenciando que este foi também para a BSA.

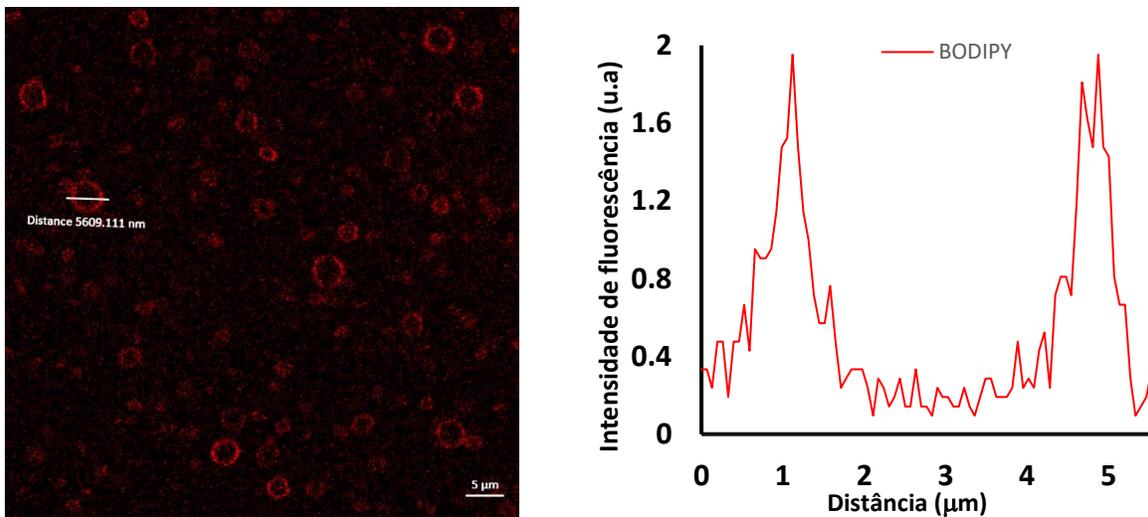


Figura 3.46 – Imagens de microscopia confocal das *nanodroplets* contendo BODIPY. A cor vermelha corresponde à emissão proveniente da excitação a 506 nm e a cor vermelha. As linhas indicam secções de corte cuja intensidade de fluorescência está apresentada na figura do lado direito.

Estes resultados sugerem uma baixa solubilidade das sondas testadas no PFP, por este facto, será difícil, em princípio, encontrar moléculas que tenham preferência pelo o PFP e não migrem para a BSA.

É curioso, no entanto, esta dificuldade uma vez que o ponto de ebulição do PFP é bastante baixo (28 °C) o que sugere que as interações intermoleculares deste são realmente fracas. Está é certamente uma limitação destes sistemas numa possível aplicação para encapsulação de agentes ativos. Por outro lado, estas são bastante fáceis de preparar, com elevada estabilidade e bastante uniformes.

Outro facto curioso deve-se às experiências de DLS mostrarem partículas com um diâmetro médio à volta das centenas de nanómetros com uma baixa polidispersão e com um ótimo correlograma e às experiências de microscopia confocal mostraram-nos bastante partículas já com algumas unidades de micrómetros.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES

Capítulo 4 - Conclusões

O presente trabalho revelou-se, ao longo do estudo, bastante pertinente, e com ele é possível deixar algumas conclusões gerais.

Os tipos de sondas estudadas no presente trabalho carecem de um elevado cuidado e pormenor para serem caracterizadas. Como referido, o equilíbrio e a estabilidade das espécies da fluoresceína e da rodamina, são afetados tanto pelas interações com o meio envolvente como pela concentração de iões H^+ nele presente. Contudo, o estudo do efeito combinado destes dois parâmetros é algo ainda não aprofundado. Neste trabalho percebeu-se melhor este duplo efeito não só em meio homogéneo, através das titulações ácido-base em diferentes percentagens água/etanol, como também quando a sonda se encontra ligada à uma proteína.

Os valores de pK_a calculados para a fluoresceína nas diferentes titulações revelam, em soluções com maiores percentagens de etanol, uma menor estabilização das espécies aniónicas e uma maior da espécie neutra. Para além disso, o pK_{a3} desta sonda ligada à BSA é substancialmente diferente do calculado em água, mostrando que o equilíbrio entre as espécies di- e monoaniónica acontece para valores de pH mais elevados quando ligada à proteína (passado de 6.5 para 7). O aumento do pK_{a1} da rodamina em cerca de 1 unidade quando se varia a percentagem de etanol de 0 para 50% indica uma forte estabilização da espécie globalmente carregada (catião), ocorrendo uma igual concentração das espécies neutra e catiónica a concentrações mais baixas de iões H^+ .

Os resultados obtidos são particularmente relevantes para o caso da fluoresceína, pois esta é habitualmente usada como sonda de pH. A não caracterização prévia das propriedades do meio envolvente da sonda pode conduzir a interpretações incorretas relativamente ao pH do meio em estudo.

Os cálculos teóricos efetuados, mostram que as propriedades fotofísicas das duas sondas são ainda afetadas por mais propriedades para além da polaridade do meio e estabelecimento de interações por pontes de hidrogénio. A viscosidade do meio é uma das propriedades a considerar em estudos futuros.

Uma aplicação direta destas sondas foi também abordada neste trabalho, a ligação covalente destas à BSA permitiu estudar um nano sistema apontado como potencial meio de encapsulação de agentes ativos. Os resultados mostraram que este sistema apresenta uma elevada

Conclusões

estabilidade dado que a integridade da cápsula criada pela BSA se mantém durante vários dias sem trocas de material entre partículas. Porém, a fraca interação entre as sondas utilizadas e o perfluorpentano que constituem o meio apolar aprisionado pela BSA mostra haver uma clara dificuldade para se conseguir dissolver compostos de forma a ter uma encapsulação homogênea. Certamente, uma melhor avaliação no tamanho das partículas será necessária uma vez que o DLS diz que as partículas contêm um diâmetro médio de centenas de nanômetros e a microscopia confocal mostra bastante partículas já nos micrómetros.

Bibliografia

1. G. Shabir, A. Saeed and P. A. Channar, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2018, **15**, 166-197.
2. N. Klonis and W. H. Sawyer, *Journal of Fluorescence*, 1996, **6**, 147-157.
3. G. L. Li, B. Zhang, X. B. Song, Y. Xia, H. B. Yu, X. F. Zhang, Y. Xiao and Y. T. Song, *Sens. Actuator B-Chem.*, 2017, **253**, 58-68.
4. E. A. Slyusareva and M. A. Gerasimova, *Russian Physics Journal*, 2014, **56**, 1370-1377.
5. R. Sjoback, J. Nygren and M. Kubista, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 1995, **51**, L7-L21.
6. N. O. McHedlovetrossyan, V. I. Kukhtik and V. I. Alekseeva, *Dyes and Pigments*, 1994, **24**, 11-35.
7. D. L. Silva, R. C. Barreto, E. G. Lacerda, K. Coutinho and S. Canuto, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 2014, **119**, 63-75.
8. A. V. Lebed, A. V. Biryukov and N. O. McHedlov-Petrosyan, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2014, **50**, 336-348.
9. P. W. Zhou, J. Y. Liu, S. Q. Yang, J. S. Chen, K. L. Han and G. Z. He, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, **14**, 15191-15198.
10. E. A. Slyusareva, F. N. Tomilin, A. G. Sizykh, E. Y. Tankevich, A. A. Kuzubov and S. G. Ovchinnikov, *Optics and Spectroscopy*, 2012, **112**, 671-678.
11. F. Buonocore and A. di Matteo, *Theoretical Chemistry Accounts*, 2012, **131**.
12. D. L. Silva, K. Coutinho and S. Canuto, *Molecular Physics*, 2010, **108**, 3125-3130.
13. D. Fazzi, C. Castiglioni and F. Negri, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, **12**, 1600-1609.
14. C. C. Spagnuolo, W. Massad, S. Miskoski, G. O. Menendez, N. A. Garcia and E. A. Jares-Erijman, *Photochemistry and Photobiology*, 2009, **85**, 1082-1088.
15. R. Markuszewski and H. Diehl, *Talanta*, 1980, **27**, 937-946.
16. Y. H. Jang, S. G. Hwang and D. S. Chung, *Chem. Lett.*, 2001, DOI: 10.1246/cl.2001.1316, 1316-1317.
17. D. V. Samoilov, N. O. McHedlov-Petrosyan, V. P. Martynova and A. V. El'tsov, *Russ. J. Gen. Chem.*, 2000, **70**, 1259-1271.
18. V. R. Batistela, J. D. Cedran, H. P. M. de Oliveira, I. S. Scarminio, L. T. Ueno, A. E. H. Machado and N. Hioka, *Dyes and Pigments*, 2010, **86**, 15-24.
19. N. O. McHedlovetrossyan and V. N. Kleshchevnikova, *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.*, 1994, **90**, 629-640.
20. D. A. Hinckley, P. G. Seybold and D. P. Borris, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 1986, **42**, 747-754.
21. G. T. Hermanson, 2013.
22. J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri and S. Curry, *Journal of Molecular Biology*, 2005, **353**, 38-52.
23. L. Plank and B. R. Ware, *Biophysical Journal*, 1987, **51**, 985-988.
24. J. J. Gorman, *Analytical Biochemistry*, 1987, **160**, 376-387.
25. R. E. Hirsch, R. S. Zukin and R. L. Nagel, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, **138**, 489-495.
26. L. E. Greene, *Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**, 1279-1285.
27. R. Aguirre, F. Gonsoulin and H. C. Cheung, *Biochemistry*, 1986, **25**, 6827-6835.
28. C. Christiansen, H. Kryvi, P. C. Sontum and T. Skotland, *Biotechnol Appl Biochem*, 1994, **19**, 307-320.
29. J. G. Riess and M. P. Krafft, *Biomaterials*, 1998, **19**, 1529-1539.

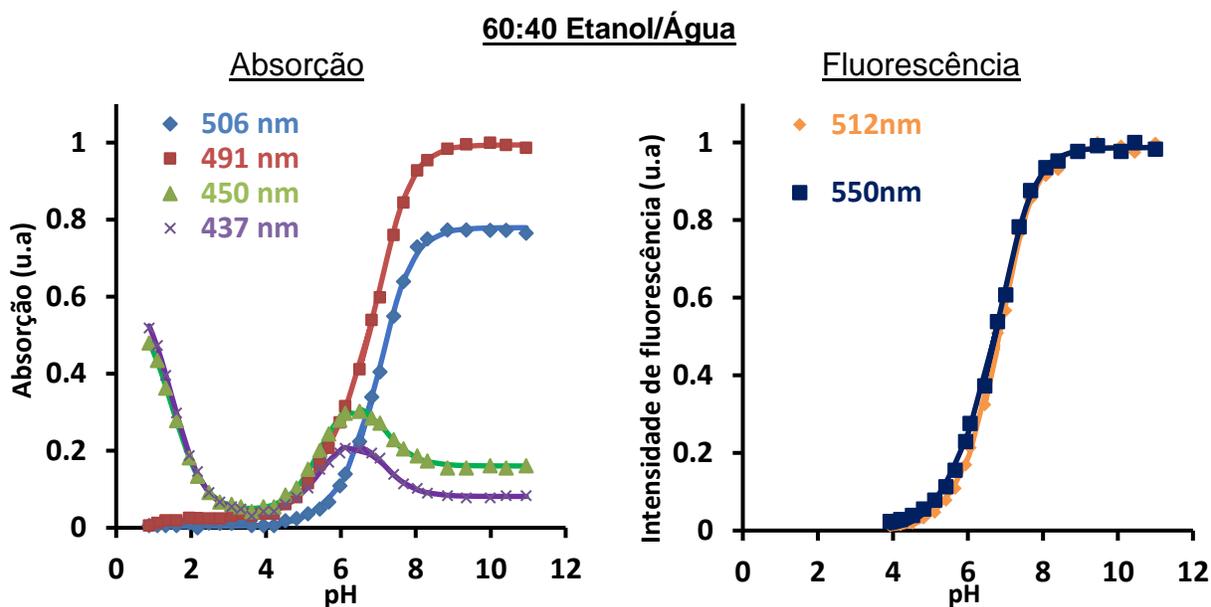
Bibliografia

30. C. H. Wang, S. T. Kang, Y. H. Lee, Y. L. Luo, Y. F. Huang and C. K. Yeh, *Biomaterials*, 2012, **33**, 1939-1947.
31. N. Y. Rapoport, A. M. Kennedy, J. E. Shea, C. L. Scaife and K. H. Nam, *Journal of Controlled Release*, 2009, **138**, 268-276.
32. K. H. Nam, D. A. Christensen, A. M. Kennedy and N. Rapoport, in *8th International Symposium on Therapeutic Ultrasound*, ed. E. S. Ebbini, 2009, vol. 1113, pp. 124-+.
33. N. Rapoport, Z. G. Gao and A. Kennedy, *Jnci-Journal of the National Cancer Institute*, 2007, **99**, 1095-1106.
34. P. S. Sheeran and P. A. Dayton, *Current Pharmaceutical Design*, 2012, **18**, 2152-2165.
35. N. Reznik, M. Seo, R. Williams, E. Bolewska-Pedyczak, M. Lee, N. Matsuura, J. Gariepy, F. S. Foster and P. N. Burns, *Physics in Medicine and Biology*, 2012, **57**, 7205-7217.
36. T. Giesecke and K. Hynynen, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 2003, **29**, 1359-1365.
37. O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, D. L. Miller, O. P. Eldevik and P. L. Carson, *Ultrasound in Medicine and Biology*, 2000, **26**, 1177-1189.
38. A. Hannah, G. Luke, K. Wilson, K. Homan and S. Emelianov, *ACS Nano*, 2014, **8**, 250-259.
39. W. Kohn and L. J. Sham, *Physical Review*, 1965, **140**, 1133-&.
40. M. A. L. Marques and E. K. U. Gross, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**, 427-455.
41. E. Runge and E. K. U. Gross, 1984, **52**, 997.
42. J. C. Slater, *Physical Review*, 1930, **36**, 57-64.
43. S. F. Boys and A. C. Egerton, 1950, **200**, 542-554.
44. R. Ditchfield, W. J. Hehre and J. A. Pople, 1971, **54**, 724.
45. F. Weigend and R. Ahlrichs, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2005, **7**, 3297-3305.
46. S. Wilhelm, B. Grobler, G. Gluch and H. Heinz, *Confocal Laser Scanning Microscopy*.
47. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox, *Journal*, 2016.
48. P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98**, 11623-11627.
49. K. Kim and K. D. Jordan, *The Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98**, 10089-10094.
50. A. D. Becke, 1993, **98**, 5648.
51. C. Adamo and V. Barone, 1999, **110**, 6158.
52. J. P. Perdew, M. Ernzerhof and K. Burke, 1996, **105**, 9982.
53. Y. Zhao and D. G. Truhlar, *Theoretical Chemistry Accounts*, 2008, **120**, 215-241.
54. A. D. Boese and N. C. Handy, *Journal of Chemical Physics*, 2002, **116**, 9559-9569.
55. J. L. Pascual-Ahuir, E. Silla and I. Tuñon, 1994, **15**, 1127-1138.
56. S. Miertuš and J. Tomasi, *Chemical Physics*, 1982, **65**, 239-245.
57. S. Miertuš, E. Scrocco and J. Tomasi, *Chemical Physics*, 1981, **55**, 117-129.
58. N. M. O'Boyle, A. L. Tenderholt and K. M. Langner, *Journal of computational chemistry*, 2008, **29**, 839-845.
59. D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*. [2,1], [2,1], Wiley, New York, 2011.

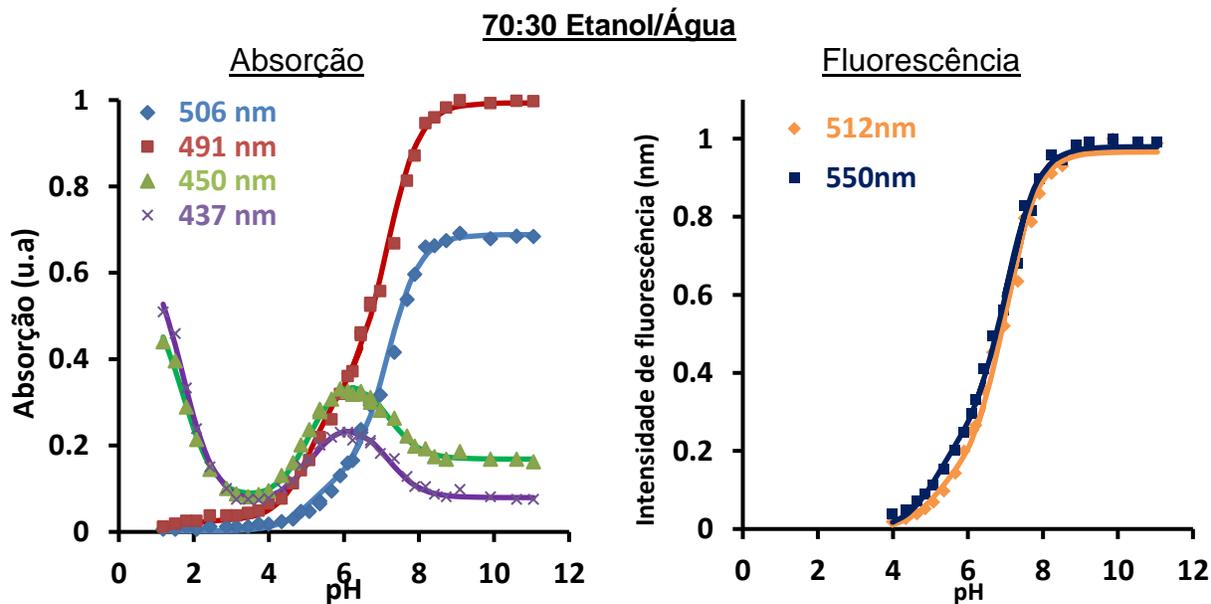
60. R. J. Christie, C. J. Tadiello, L. M. Chamberlain and D. W. Grainger, *Bioconjugate Chemistry*, 2009, **20**, 476-480.
61. R. M. S. Cardoso, P. A. T. Martins, C. V. Ramos, M. M. Cordeiro, R. J. B. Leote, K. R. Naqvi, W. L. C. Vaz and M. J. Moreno, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 2020, **1862**, 12.
62. T. Peters, *All about albumin : biochemistry, genetics, and medical applications*, Academic Press, San Diego, CA [etc.], 2008.
63. J. R. Lakowicz, 2013.

Anexos

Cys-Flu



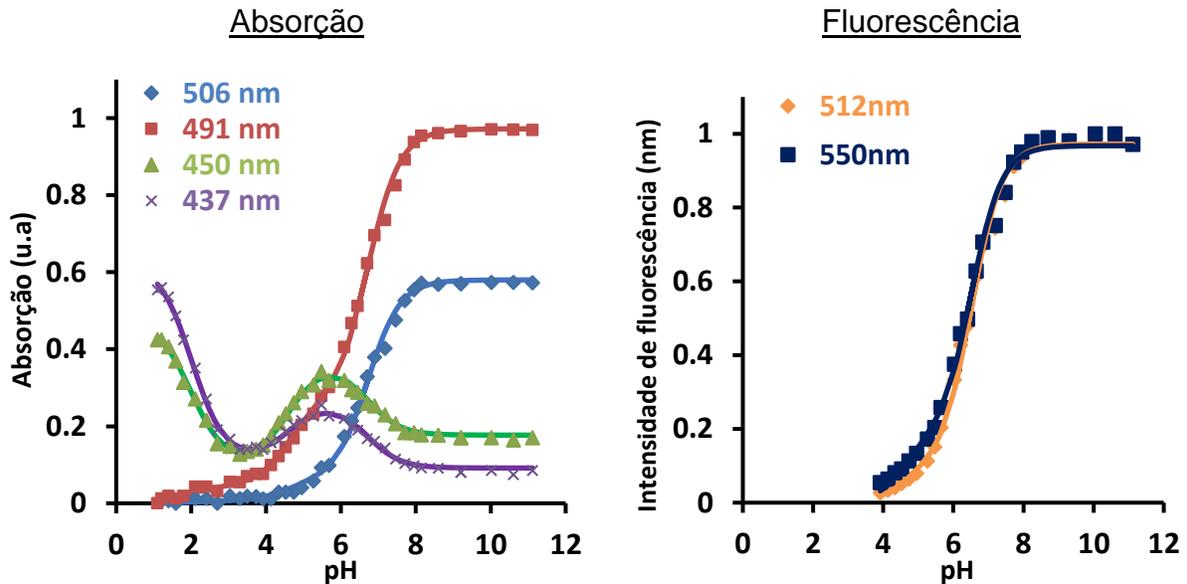
Anexo 1 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Flu em 60:40 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{máx}$ a 506 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima ao respectivo comprimento de onda.



Anexo 2 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Flu em 70:30 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{máx}$ a 506 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima ao respectivo comprimento de onda.

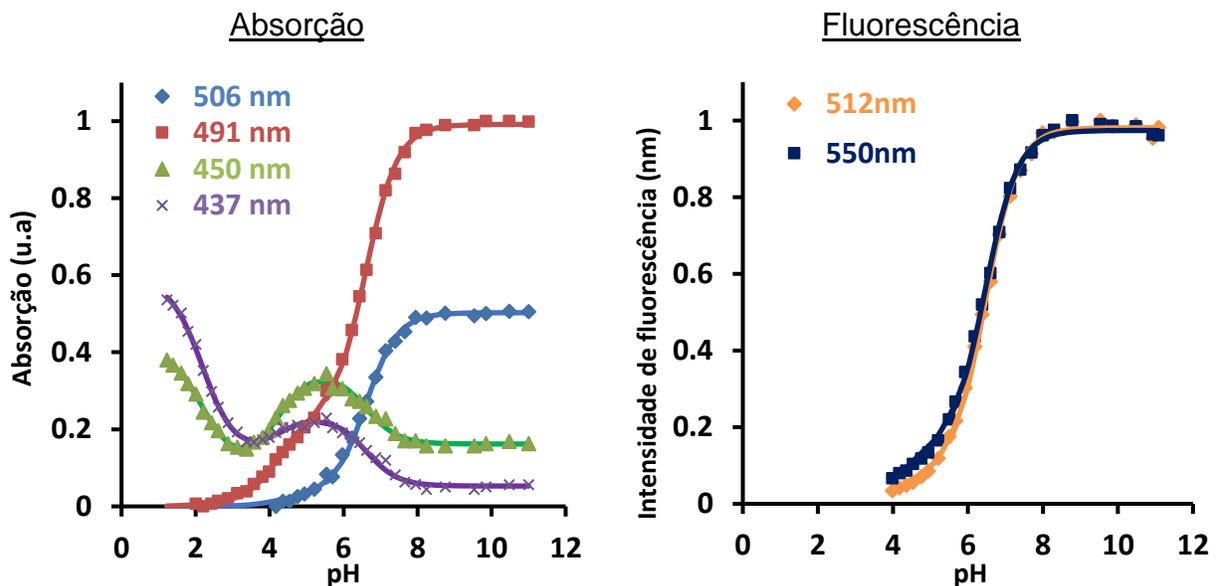
Cys-Flu

80:20 Etanol/Água



Anexo 3 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Flu em 80:20 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{\text{máx}}$ a 506 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima ao respectivo comprimento de onda.

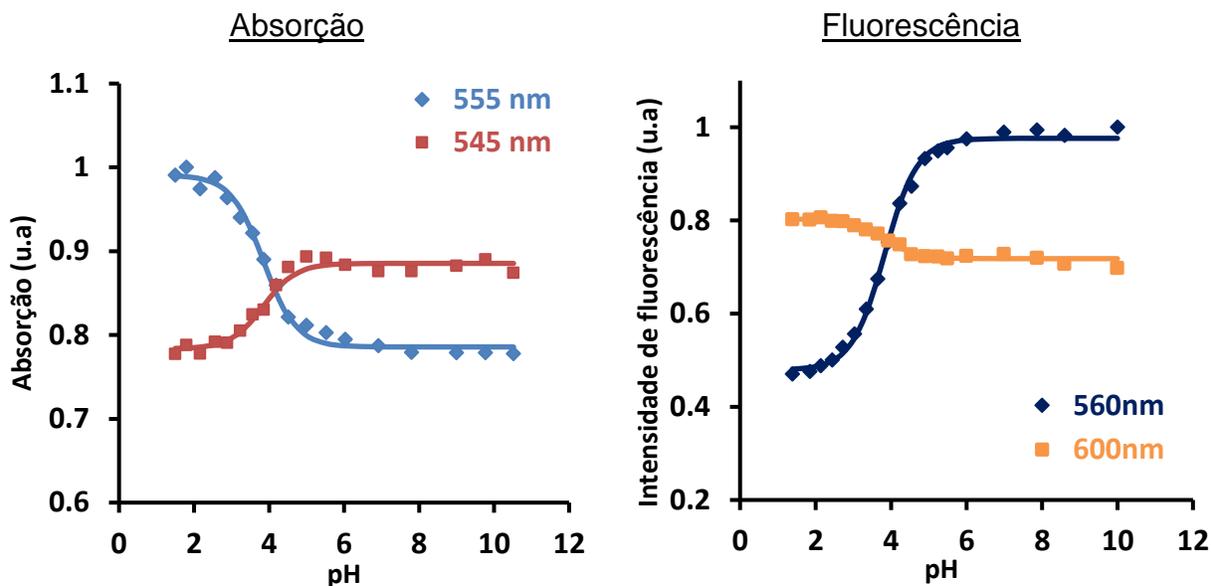
90:10 Etanol/Água



Anexo 4 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Flu em 90:10 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{\text{máx}}$ a 506 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima ao respectivo comprimento de onda.

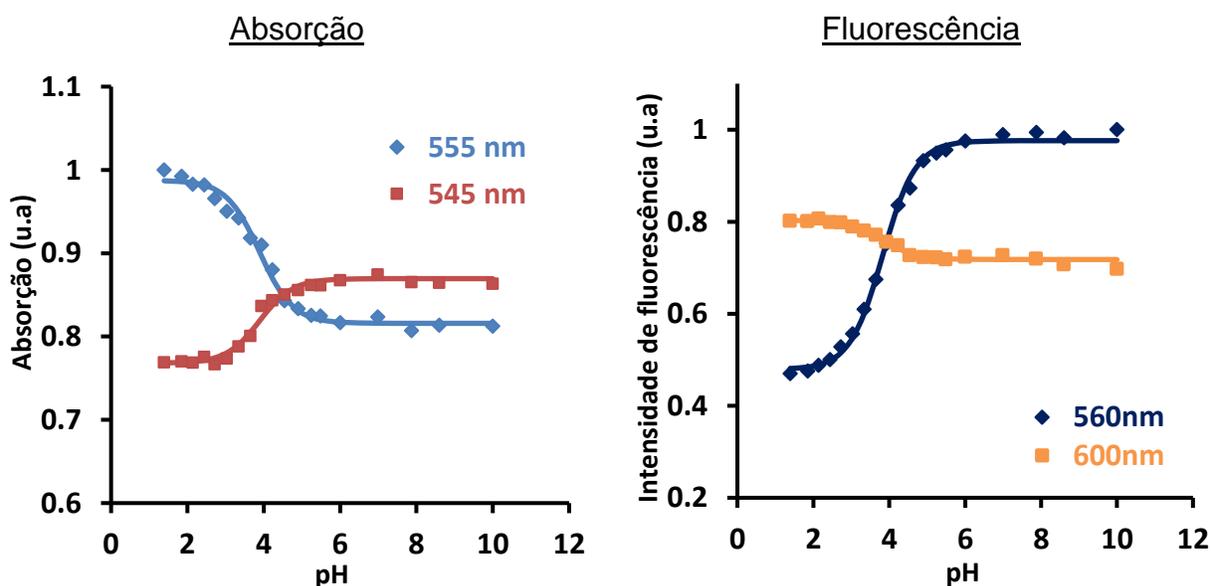
Cys-Rdm

60:40 Etanol/Água



Anexo 5 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Rdm em 60:40 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{\text{máx}}$ a 555 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima.

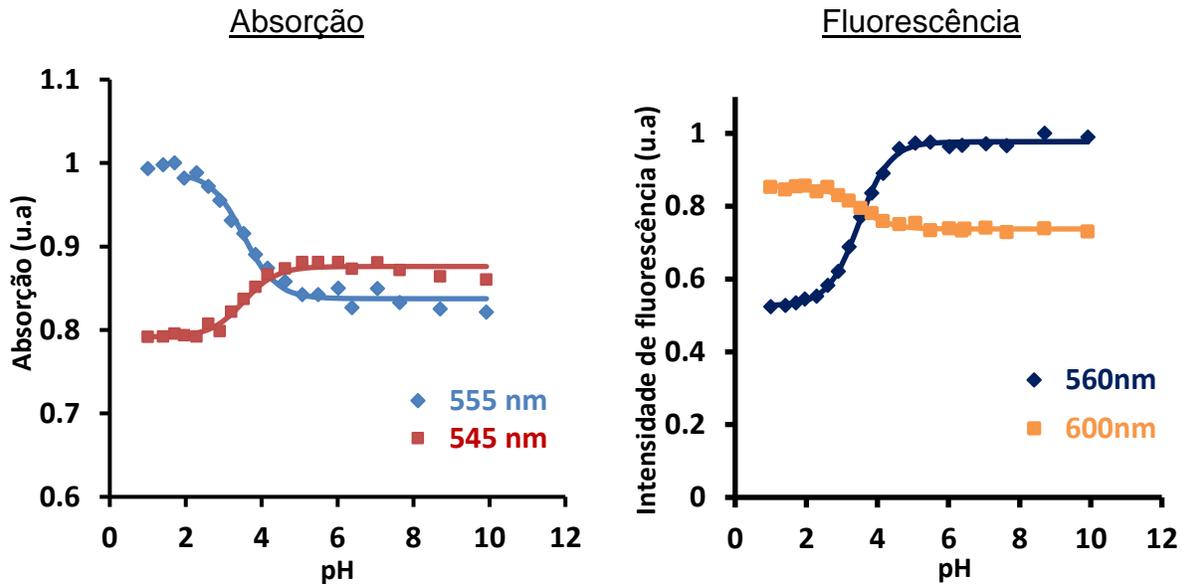
70:30 Etanol/Água



Anexo 6 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Rdm em 70:30 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{\text{máx}}$ a 555 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima.

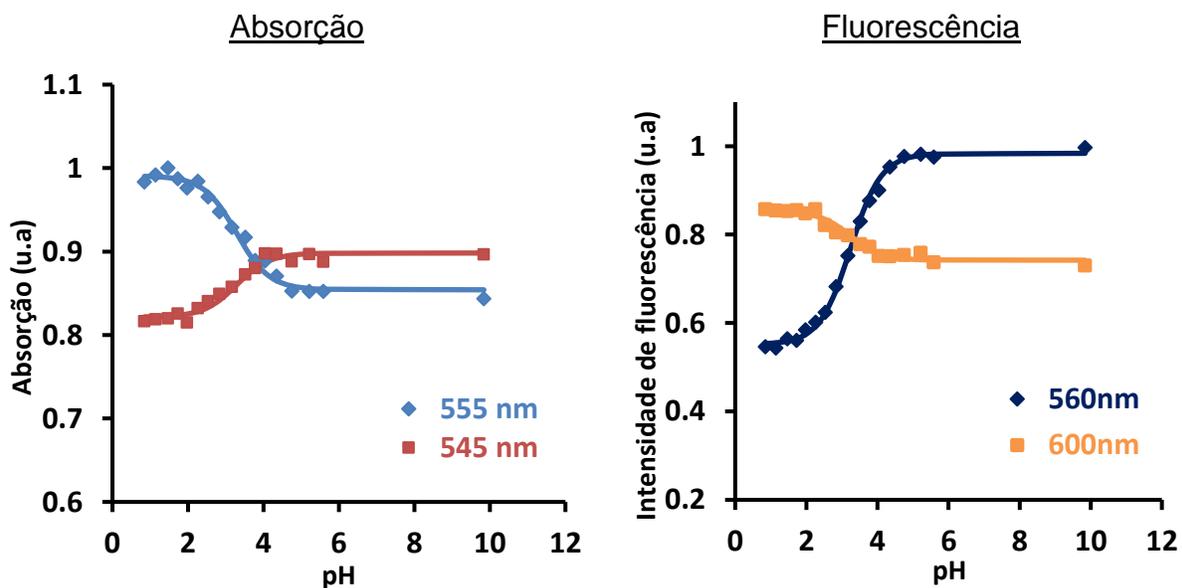
Cys-Rdm

80:20 Etanol/Água



Anexo 7 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Rdm em 80:20 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{máx}$ a 555 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima.

90:10 Etanol/Água



Anexo 8 – Gráficos do ajuste global ao dados experimentais da titulação ácido-base da Cys-Rdm em 90:10 etanol/água para a absorção à esquerda, normalizados pela $A_{máx}$ a 555 nm e à direita para a fluorescência, normalizados pela intensidade de fluorescência máxima.