Norma Miriã Bonassi

Estudos de Sondas Fluorescentes Derivadas dos Trans-Difenilpolienos ts, DPB e DPH na Caracterização de Sistemas Vesiculares de Fosfolipídeos

unesp

1910000813

UNIVERSIDADE ESTATUAL PAULISTA
Câmpus de São José do Rio Preto
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Norma Miriã Bonassi

ESTUDOS DE SONDAS FLUORESCENTES DERIVADAS DOS TRANS-DIFENILPOLIENOS tS, DPB e DPH NA CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS VESICULARES DE FOSFOLIPÍDEOS

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
813/98

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estatual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto, para obtenção do grau de mestre em Física Área de Concentração: Biofísico-Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Laerte Miola

São José do Rio Preto
1998

“Deus, de fato, joga dados. E o problema é que muitas vezes ele os lança em lugares que não enxergamos.”

Stephen W. Hawking

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e sobrinhos pelo respeito, carinho e confiança que sempre me proporcionaram.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Laerte Miola pela orientação, apoio, dedicação, respeito, amizade, simplicidade, honestidade e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ieda A. Pastre Fertonani pela amizade, solidariedade, apoio, incentivo, discussões importantes e por permitir o uso de seu computador.

A Cecília C. Marques dos Santos pela amizade e incentivo nas horas difícieis.

A minha irmã Márcia Bonassi Bonalumi por estar sempre do meu lado.

Ao Prof. Dr. Márcio José Tiera pelo respeito, incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Eloi S. Feitosa pelo respeito, apoio, incentivo e discussões.

Aos professores do departamento de Depto. de Química e Geociências pelo respeito e confiança.

Ao técnico João Rodrigues dos Santos pelo apoio e respeito.

Ao Pedro B. da Silveira Junior pelo apoio nas sínteses das sondas TDS e TDB.

A Araguaia Solange de Souza Roque pelo apoio na digitação do texto e correção.

À secretária Rita B. de Seixas Mazzocato pelo respeito e confiança.

Aos professores do Depto. de Física pelo respeito, apoio e confiança.

Ao Professor Dr. Carlos Daghlian pelo apoio na execução do *Abstract*.

Às pessoas que colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

A FAPESP, ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

unesp

ÍNDICE

SÍMBOLOS e ABREVIATURAS i

RESUMO iii

ABSTRACT iv

1- INTRODUÇÃO 01

1.1 Espectros no UV-VIS (Absorção eletrônica) 01
1.2 Processos fotofísico e fotoquímico 05
1.3 Fluorescência dos trans-difenilpolienos incorporados em vesículas de fosfolipídeos .. 08
1.4 Processo fotoquímico e fotofísico do trans-estilbeno 12
1.5 Lipossomos ou vesículas 14
1.6 Estrutura química dos fosfolipídeos e sua temperatura de transição de fase (Tc) 18
1.7 Estrutura física dos agregados de fosfolipídeos 22
1.8 Medidas de fluidez da bicamada 23

2- OBJETIVOS 27

3- MATERIAIS E MÉTODOS 28

3.1 Reagentes utilizados 28
3.2 Sínteses realizadas 28
3.2.1. Síntese prévia do sal de fosfônio 28
3.2.2. Síntese dos derivados do carboxi estilbeno 29
3.2.2.1. Síntese de trans, p-carboxi estilbeno (S1A) 29
3.2.2.2. Síntese de trans, 4n-butil-p'-carboxi estilbeno (4S1A) 30
3.2.2.3. Síntese de trans, 4n-octil-p'-carboxi estilbeno (8S1A) 30
3.2.2.4. Síntese de trans, trans, 1,4-difenil-p-carboxi-1,3-butadieno (DPBA) 30

3.2.3. Síntese dos derivados de tercbutil (trans-estilbeno e trans-difenilbutadieno) e carboxi-difenilbutadieno..... 31
3.2.3.1. Síntese de trans, trans, 1,4-difenil-p-tercbutil-1,3 butadieno (TDB)..... 31
3.2.3.2. Síntese de trans, p-tercbutil estilbeno (TDS)..... 31
3.2.3.3. Síntese de trans, trans, 1,4-difenil-p-carboxi propil-1,3 butadieno (B4A)..... 32
3.3. Estrutura molecular das sondas sintetizadas derivadas dos trans-difenilpolienos..... 34
3.4. Preparo da vesícula/sonda, utilizado na determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e nas medidas de anisotropia de fluorescência (r)..... 37
3.5. Preparo da solução de referência..... 37
3.6. Temperatura de transição de fase (Tc) das vesículas..... 38
3.7. Aparelhos utilizados..... 38
3.8. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)..... 39
3.9. Anisotropia (r)..... 39

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 41

4.1 Propriedades espectroscópicas das sondas sintetizadas derivadas dos trans-difenil polienos..... 41
4.2 Dados comparativos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) das sondas incorporadas em vesículas de fosfolipídeos (DMPC, DPPC e DSPC), com método de obtenção diferenciados..... 49
4.3 Dados comparativos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da sonda 4H4A incorporada em vesículas de fosfolipídeos (DMPC, DPPC e DSPC), com método de obtenção diferenciados..... 60

4.4 Dados comparativos de anisotropia (r) das sondas em vesículas de fosfolipídeos (DMPC,DPPC e DSPC), sonicadas em banho..... 64

5- CONCLUSÃO..... 71

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 73

1- ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. (a) Transição entre dois estados de uma molécula num processo de excitação. (b) Níveis de energias eletrônicas nas transições eletrônicas possíveis de ocorrer.[56] 02

Figura 2. Estruturas trans-difenilpolieno (n = 3-1).[5] 04

Figura 3. Espectros de absorção dos trans-difenilpolienos em ciclohexano a 25°C, onde: tS (estilbeno), DPB (difenilbutadieno) e DPH (difenilhexatrieno)..... 05

Figura 4. Diagrama de Jablonski.[45] 07

Figura 5. Espectros de absorção e emissão de fluorescência das sondas: tS (a); DPB (b) e DPH (c) em ciclohexano (CH), a 25°C..... 09

Figura 6. Esquema do caminho fotoquímico da molécula trans-estilbeno (tS).[61] 13

Figura 7. Energia potencial de superfície do estilbeno em função do ângulo de rotação sobre a dupla ligação C-C. [1] 13

Figura 8. Modelos de agregados em meio aquoso (a) bicamada, (b) lipossomo (vesícula) e (c) micela. [42] 15

Figura 9. Modelo mosaico fluido para estrutura da membrana biológica.[42] 16

Figura 10. Possíveis movimentações lipídicas no interior de uma bicamada em membranas biológicas.[42] 17

Figura 11. Estruturas das moléculas de fosfatidilcolina aplicadas na obtençào das vesículas..... 19

Figura 12. Cadeias hidrocarbônicas de fosfatidilcolina nas conformações: (a) anti e (b) gauche (+g)..... 20

Figura 13. Representação do movimento da estrutura da bicamada lipídica na faixa de temperatura entre a pré-transição e a transição de fase principal.[22,51] 21

Figura 14. Polarização e anisotropia da luz.[40] 24

Figura 15. Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda 8S1A em clorofórmio..... 44

Figura 16. Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda TDS em clorofórmio..... 45

Figura 17. Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda TDB em clorofórmio..... 46

Figura 18. Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda B4A em

clorofórmio..... 47
Figura 19. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura das sondas S1A, 4S1A, 8S1A e TDS (a); TDB, DPBA e B4A (b) em solvente ciclohexano..... 48
Figura 20. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda S1A conc. 10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 53
Figura 21. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 4S1A conc. 10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 54
Figura 22. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 8S1A conc. 10^{-5}M em vesículas DPPC (a) e DSPC (b) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 55
Figura 23. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda TDS conc. 10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 56
Figura 24. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda TDB conc. 10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 57
Figura 25. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda DPBA conc. 10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 58
Figura 26. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda B4A conc. 10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2)..... 59
Figura 27. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 4H4A conc. 10^{-5}M em vesículas DPPC, DPPC e DSPC conc. 10^{-4}M (sonicado em banho)..... 62
Figura 28. Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 4H4A conc. 10^{-5}M em vesículas DPPC (a) e DSPC (b) conc.10^{-4}M. Sonicado em ponta de titânio (1), sonicado em ponta de titânio (2) e sonicado em banho (3)..... 63
Figura 29. Anisotropia x temperatura das sondas 4S1A, TDS, TDB, DPBA e B4A em ciclohexano..... 67

Figura 30. Anisotropia x temperatura para diferentes sondas conc. 10^{-5}M em vesícula DMPC conc.10^{-4}M..... 68
Figura 31. Anisotropia x temperatura para diferentes sondas conc. 10^{-5}M em vesícula DPPC conc.10^{-4}M..... 69
Figura 32. Anisotropia x temperatura para diferentes sondas conc. 10^{-5}M em vesícula DSPC conc.10^{-4}M..... 70

2- ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Dados de temperatura de transição de fase para as vesículas:..... 38
Tabela 2. Características espectroscópicas das sondas em solventes orgânicos clorofórmio e ciclohexano (T=25°C)..... 41
Tabela 3. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) das sondas em vesículas (DMPC, DPPC e DSPC), obtidas por sonicação com ponta de titânio e banho:.... 49
Tabela 4. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da sonda 4H4A em vesículas (DMPC, DPPC e DSPC), obtidas por sonicação com ponta de titânio e banho:.... 60

SÍMBOLOS e ABREVIATURAS

UV-VIS	ultra violeta - visível
E_{max}	emissão máxima
λ_{max}	comprimento de onda máxima
Φ_f	rendimento quântico de fluorescência
r	anisotropia
ξ	absortividade molar
tS	trans-estilbeno
DPB	trans-difenil butadieno
DPH	trans-difenil hexatrieno
S1A	Trans, p-carboxi estilbeno
4S1A	Trans, 4n-butil-p'-carboxi estilbeno
8S1A	Trans, 4n-octil-p'-carboxi estilbeno
TDS	Trans, p-tercbutil estilbeno
TDB	Trans, trans, 1,4 difenil-p-tercbutil-1,3 butadieno
DPBA	Trans, trans, 1,4 difenil-p-carboxi-1,3 butadieno
B4A	Trans, trans, 1,4 difenil-p-carboxi propil-1,3 butadieno
4B4A	Trans, trans, 4n butil-1,4 difenil-p'-carboxi propil-1,3 butadieno
4H4A	Trans, trans, trans-4n butil-1,6 difenil-p'-carboxi propil-1,3,5 hexatrieno
CH	ciclohexano
$CHC\ell_3$	clorofórmio
PC	fosfatidilcolina
DMPC	DL - α - dimeristoil fosfatidil colina
DPPC	DL - α - dipalmitoil fosfatidil colina
DSPC	DL - α - diestearoil fosfatidil colina
Tc	temperatura de transição de fase
$h\nu$	reação fotoquímica
Ph	grupo fenil

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

k_f	constante de velocidade de fluorescência
k_{t-p}	constante de velocidade de trans para perpendicular
k_{IC}	constante de conversão interna
k_{SV}	constante de Stern-Volmer
PM	fotomultiplicadora
P	componente da intensidade de polarização
n	componente da intensidade natural
G	fator de correção da luz polarizada verticalmente e horizontalmente

RESUMO

BONASSI, N.M[2]., **Estudos de sondas fluorescentes derivadas dos trans-difenilpolienos tS, DPB e DPH na caracterização de sistemas vesiculares de fosfolipídeos.** Dissertação de Mestrado, Orientador: Prof. Dr. Laerte Miola[1], [2]Depto. de Física[2], Depto. de Química e Geociências[1], IBILCE-UNESP de S. J. de Rio Preto-SP, 1998.

Este trabalho tem como objetivo estudar propriedades fotoquímicas das moléculas (sondas fluorescentes) sintetizadas, derivadas dos trans-difenilpolienos (tS, DPB e DPH), incorporadas aos lipossomos (vesículas:SUVs) formados por fosfolipídeos DMPC, DPPC e DSPC na concentração de 10^{-4}M, por método diferenciado de obtenção: sonicado em ponta de titânio e sonicado em banho.

A aplicação destas sondas na concentração 10^{-5}M incorporadas às vesículas tem como ferramenta também o estudo das propriedades das vesículas (lipossomos), explorando seu microambiente, mimetizando as membranas biológicas, já que estas sondas possuem afinidade com este microambiente.

Através de medidas espectroscópicas de fluorescência, foram calculados os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) em função da temperatura das sondas sintetizadas; S1A, 4S1A, 8S1A, DPBA, TDS, TDB e B4A, as quais demonstraram comportamentos diferentes, com a mudança de transição de fase de sólido (rígido) a líquido cristalino quando incorporadas às vesículas. O ponto crítico de mudança de fase Tc das vesículas para as sondas polares apresenta um decréscimo do Φ_f e para as apolares há um crescimento até Tc, o que demonstra grande interação com a bicamada da vesícula e após a Tc há um decréscimo efetivo do Φ_f. Para ambos os métodos de obtenção das vesículas, os resultados obtidos de Φ_f são semelhantes.

Estudos de polarização de fluorescência (anisotropia), em função da temperatura nas medidas de fluidez das bicamadas das vesículas sonicadas em banho, nas mesmas concentrações de medidas do Φ_f, confirmam que a taxa rotacional das sondas são dependentes das forças viscosas impostas a elas.

ABSTRACT

BONASSI, N.M.[2], **Study of fluorescent probes derived from tS, DPB and DPH in the characterization of phospholipid vesicle systems.** Master's thesis, Supervised by Professor Dr. Laerte Miola[1], Depto. de Física[2], Depto. de Química e Geociências[1], IBILCE-UNESP de S. J. do Rio Preto-SP, 1998.

This work aims at studying photochemical properties of the synthesized molecules (fluorescent probes) derived from the trans-difenylpolyenes (tS, DPB and DPH) incorporate to the lipossomes (vesicles: SUVs) formed by phospholipides DMPC, DPPC and DSPC in the concentration of 10^{-4}M through a differentiated obtention method: sonication in the edge of titanium and sonication in bath.

The application of these probes in 10^{-5}M concentration incorporate to the vesicles has also as a tool the study of the properties of the vesicles (lipossomes), exploring its micro-environment, mimetizing the biological membranes, since these probe have affinity with this micro-environment.

Through spectroscopic measurements of fluorescence, the fluorescence quantum yield (Φ_f) were calculated in terms of the temperature synthesized probes: S1A, 4S1A, 8S1A, DPBA, TDS, TDB and B4A, which showed different behavior with the change of solid phase transition (rigid) to crystalline liquid when incorporate to the vesicles. The critical changing point from the vesicles Tc phase to the polar probes presents a decrease of Φ_f and for the non-polar ones there is an increase of up to Φ_f Tc, which shows great interaction with the vesicle bilayer. After Tc there is a decrease of Φ_f. It shows that the obtained data are not much different when the vesicles obtention method is changed.

Fluorescence polarization (anisotropy) studies, due to the temperature in the measurements of fluidity of the vesicles bilayers sonication in bath, in the same concentrations of measurements of Φ_f, confirm that the probes rotational rates depend on the viscose forces imposed on them.

1- INTRODUÇÃO

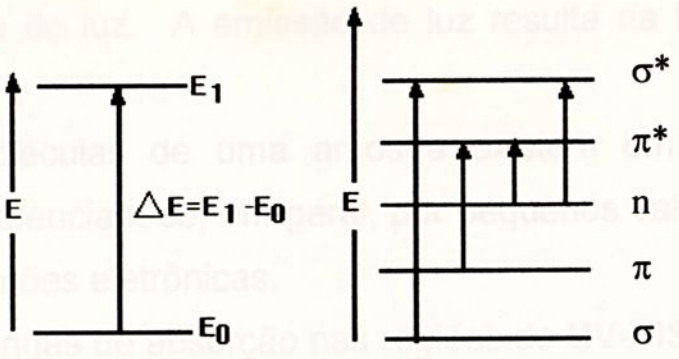
Sondas fluorescentes, como tS, DPB e DPH ou sintetizadas que possuem estes cromóforos, têm sido estudadas como modelo de comportamento fotoquímico em sistemas heterogêneos, como as micelas e vesículas, os quais influenciam as suas propriedades fotoquímicas.[47] Estas sondas possuem grande potencial de solubilização (incorporação) em meios apolares, tais como as bicamadas das vesículas.

As bandas do espectro de absorção para estas sondas encontram-se na região do **UV-VIS**. Os diferentes comprimentos de onda de absorção, obtidos para as sondas, referem-se ao aumento de duplas conjugadas no cromóforo, efeito batocrômico (deslocamento do λ_{max} para o vermelho) com aumento da intensidade de absorção ξ (absortividade molar). E estas características atribuem a tais compostos excelentes propriedades fotoquímicas. Quando as sondas são expostas à luz, com um comprimento de onda absorvido pela dupla ligação, ocorre interconversão do isômero trans a cis (fotoisomerização), uma vez que os isômeros trans e cis são termicamente estáveis à temperatura ambiente.[47,56,57]

1.1. Espectros no UV-VIS (Absorção eletrônica)

A transição eletrônica que ocorre dentro de uma molécula é estudada pela absorção seletiva da radiação eletromagnética que passa pela molécula, a qual, absorvendo um fóton, um dos elétrons passará do estado de menor energia (estado fundamental) para o estado de maior energia (estado excitado) (Fig. 1).

O processo ocorrerá se a freqüência da radiação eletromagnética corresponder à separação de energia entre os dois orbitais moleculares envolvidos.[48]



(a) (b)

Figura 1. (a) Transição entre dois estados de uma molécula num processo de excitação. (b) Níveis de energias eletrônicas nas transições eletrônicas possíveis de ocorrer.[56]

Esta relação pode ser dada pela equação:

$$\Delta E = h.\upsilon = \frac{h.c}{\lambda} \qquad (1)$$

onde, ΔE = energia absorvida por uma molécula em uma transição eletrônica (estado fundamental→estado excitado);

h = constante de Planck;
υ = freqüência da luz;
λ = comprimento de onda;
c = velocidade da luz.

A energia da radiação eletromagnética depende somente da freqüência e não da intensidade, sendo esta quantidade de energia inversamente proporcional ao comprimento de onda, e a absorção de luz proporcional à freqüência da luz incidente para um dado processo de excitação.[9]

O excesso de energia acumulada no estado excitado pode provocar dissociação ou ionização da molécula ou pode ser reemitido na

forma de calor ou de luz. A emissão de luz resulta na fluorescência ou fosforescência.[48]

As moléculas de uma amostra existem em vários estados vibracionais, e diferenciam-se, em geral, por pequenos valores de energia, ao sofrerem transições eletrônicas.

As bandas de absorção nas regiões do **UV-VIS** são largas; isto porque cada nível de energia eletrônica tem, associado a ele, níveis vibracionais e rotacionais. Assim, as transições eletrônicas podem ocorrer entre quaisquer dos vários estados vibracionais e rotacionais de um nível eletrônico e quaisquer estados vibracionais e rotacionais de um outro nível de energia mais alto.[57]

A intensidade de uma determinada banda de absorção é habitualmente dada pela absortividade molar ξ , ou $\log\xi$, obtida da Lei de Lambert-Beer.[9]

$$\xi = \frac{\log(I_o / I)}{c.\ell} \qquad (2)$$

onde: I_o = intensidade de luz incidente;
I = intensidade de luz transmitida;
c = concentração em moles/ℓ;
ℓ = caminho ótico através da amostra, em centímetros.

$$\text{Se } \log(I_o/I) = A \quad \therefore \quad \xi = \frac{A}{c.\ell} \qquad (3)$$

A = absorbância,

O valor de ξ está associado a uma transição eletrônica e é proporcional à probabilidade da ocorrência dessa transição.

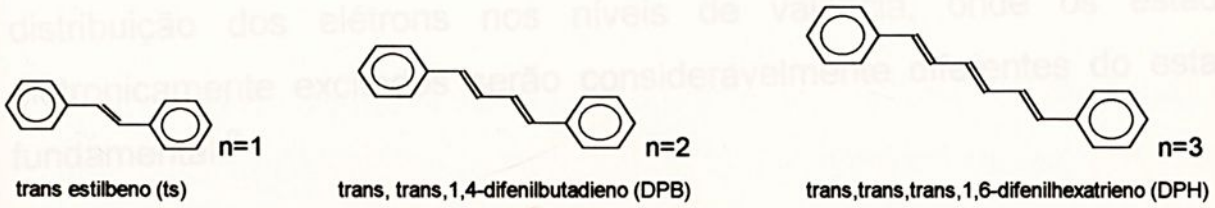
A absorção com $\xi_{max} > 10^4$ é considerada uma absorção muito intensa e as absorções em que ξ_{max} é inferior a 10^3 são consideradas de fraca intensidade. [9]

Moléculas que possuem ligações duplas conjugadas apresentam absorção característica na região do ultravioleta (ou do visível), sendo que os grupos insaturados, responsáveis pelas transições eletrônicas, recebem o nome de cromóforo. Quando dois grupos cromóforos forem conjugados, passarão a se comportar como um novo cromóforo, produzindo diferença marcante no espectro, deslocando o seu comprimento de onda máximo (λ_{max}) para o vermelho (deslocamento batocrômico), acompanhado de um aumento na intensidade da absorção.[8]

Os orbitais π e π^* terão energias mais próximas, resultando daí uma energia de excitação menor, devido à coplanaridade que permite uma superposição efetiva dos orbitais π. Esta superposição ou interação resulta na criação de dois novos níveis de energia.

As bandas atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (*Banda K*), que aparecem no espectro de moléculas que contêm estruturas com ligações duplas conjugadas, são transições que caracterizam-se por alta absortividade molar $\xi_{max} > 10^4$. Como exemplos disso, podemos citar as moléculas derivadas dos trans-dienos, polienos e difenilpolienos (Fig.2 e 3),

$$Ph - (CH_2 = CH_2)_n - Ph$$



trans estilbeno (ts) | trans, trans,1,4-difenilbutadieno (DPB) | trans,trans,trans,1,6-difenilhexatrieno (DPH)

Figura 2. Estruturas trans-difenilpolieno (n = 1-3). [5]

sendo estas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ praticamente insensíveis à polaridade do solvente devido às ligações entre C = C serem apolares.[56]

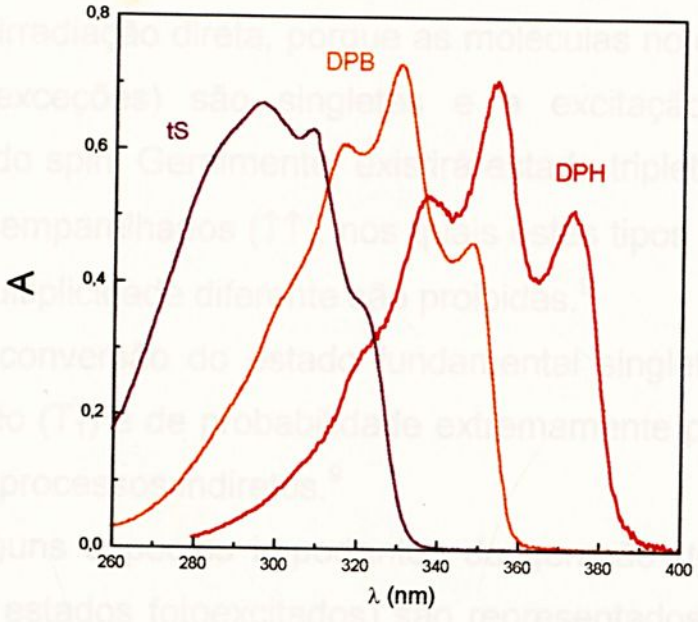


Figura 3. Espectros de absorção dos trans-difenilpolienos em ciclohexano a 25°C, onde: tS (estilbeno), DPB (difenilbutadieno) e DPH (difenilhexatrieno).

1.2. Processos fotofísico e fotoquímico

A freqüência da luz, quando controlada, possibilita a excitação seletiva dos elétrons associados a grupos específicos de átomos em uma molécula, sem alterar significativamente os níveis energéticos dos demais elétrons.[48]

A excitação eletrônica provoca uma reorganização dos elétrons de valência da molécula. A distribuição dos elétrons nos estados excitados difere do estado fundamental. As alterações químicas são controladas pela distribuição dos elétrons nos níveis de valência, onde os estados eletronicamente excitados serão consideravelmente diferentes do estado fundamental.[9]

Nas moléculas, a absorção **(Abs)** de um quantum leva a uma transição de estado fundamental singlete a um dos estados excitados singlete ($S_o \rightarrow S_n$), onde todos os spins estão emparelhados (↑↓).Estes são gerados pela irradiação direta, porque as moléculas no estado fundamental (com raras exceções) são singletes e a excitação segue a lei da conservação do spin. Geralmente, existirá estado triplete, quando os spins estiverem desemparelhados (↑↑), nos quais estes tipos de transições entre estados de multiplicidade diferente são proibidas.[9]

A conversão do estado fundamental singlete (S_o) ao primeiro triplete excitado (T_1) é de probabilidade extremamente pequena e somente é atingido por processos indiretos.[9]

Alguns aspectos importantes da geração (tempo de vida e a destruição de estados fotoexcitados) são representados pelo diagrama de Jablonski (Fig. 4).[9]

Pode ocorrer a dissipação de energia da molécula eletronicamente excitada por dois processos:[29]

Processo fotofísico: - Conversão entre estados,
- Transferência de energia,
- Dissipação radiativa.

Processo fotoquímico: - Formação de radicais livres,
- Ciclização,
- Rearranjo intramolecular,
- Eliminação.

A conversão interna (**IC**) ocorre entre 10^{-10} e 10^{-12} segundos, se a molécula em qualquer estado singlete S_n superior decair ao estado excitado (S_1) de transição sem emissão de radiação. O excesso de energia

vibracional e rotacional que as moléculas adquirem é dissipado sob forma de calor através de colisões com moléculas adjacentes e solventes ocorrendo a relaxação vibracional (**vr** ⇝).

A partir do estado S_1, a molécula pode decair através de vários processos, perdendo energia e voltando a S_0 por emissão de radiação em um comprimento de onda apropriado, num processo chamado fluorescência (**Fluor.**), com tempos de vida da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} segundos. Pode perder energia como calor e retornar a S_o (**vr** ⇝) processo não radiativo; pode reagir quimicamente (fotoquímica do S_1); pode sofrer transição sem emissão de radiação, com alteração do spin, indo à T_1 (o primeiro estado excitado triplete) pelo processo de cruzamento entre sistemas (**ISC**), com tempo de vida de 10^{-11} a 10^{-7} segundos, suficientemente rápidos para competir com a fluorescência para desativação do S_1.[9]

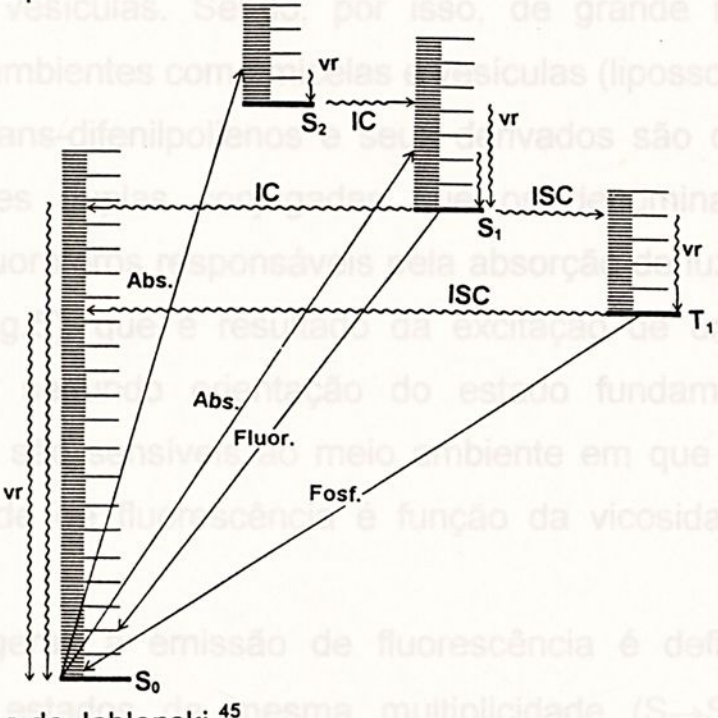


Figura 4. Diagrama de Jablonski.[45]

O cruzamento entre sistemas (**ISC**) seguido de conversão interna (**IC**) é um processo exotérmico. O estado T_1 tem vida maior do que

o estado S_1 (da ordem de 10^{-4} segundos). Da emissão de radiação associada à conversão $T_1 \rightarrow S_0$ dá-se a fosforescência (**Fosf.**). As conversões ($T_1 \rightarrow S_o$), têm, assim como as excitações ($S_1 \rightarrow T_1$), probabilidade muito pequena de ocorrer.[9]

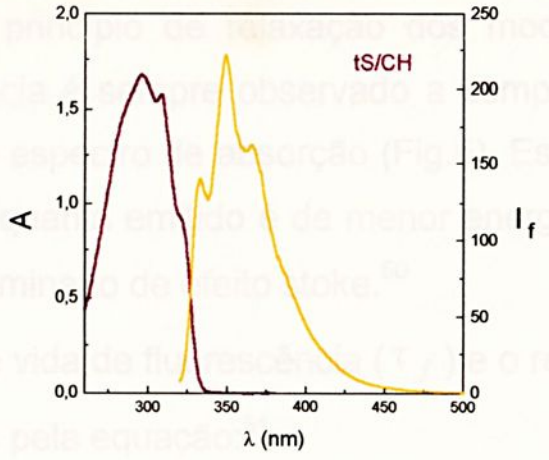
1.3. Fluorescência dos trans-difenilpolienos incorporados em vesículas

Várias técnicas espectroscópicas são empregadas no estudo de estrutura e propriedades dinâmicas das membranas naturais e sintéticas.[14,31,35,36,37]

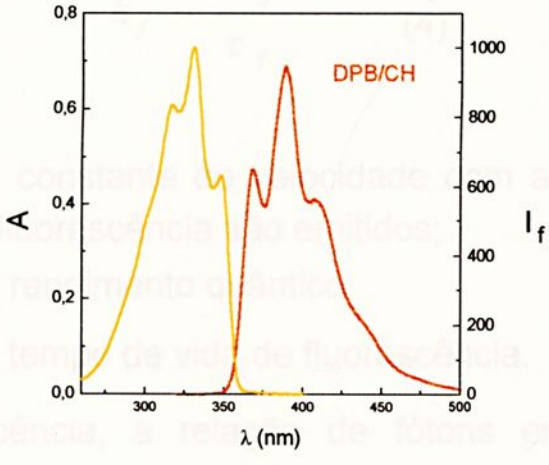
A técnica de fluorescência é muito sensível a concentrações micromolares da sonda fluorescente, não perturbando as propriedades das bicamadas das vesículas. Sendo, por isso, de grande importância no estudo de microambientes como micelas e vesículas (lipossomos).

Os trans-difenilpolienos e seus derivados são compostos que possuem ligações duplas conjugadas que os denominam de grupos cromóforos ou fluoróforos responsáveis pela absorção de luz e emissão de fluorescência (Fig.5), que é resultado da excitação de um elétron, que retém seu spin segundo orientação do estado fundamental. E suas emissões de luz são sensíveis ao meio ambiente em que se encontram, pois a intensidade de fluorescência é função da vicosidade para estes compostos.[50]

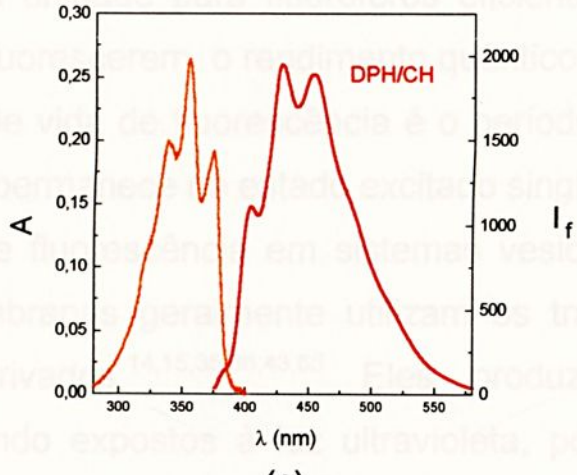
Em geral, a emissão de fluorescência é definida por uma transição entre estados de mesma multiplicidade ($S \rightarrow S$ ou $T \rightarrow T$) e fosforescêcia por uma transição entre estados de diferentes multiplicidades ($T \rightarrow S$). Estes dois processos são radiativos e resultam na emissão de luz, que ocorre sempre do nível excitado mais baixo para o fundamental.



(a)



(b)



(c)

Figura 5. Espectros de absorção e emissão de fluorescência das sondas: tS (a); DPB (b) e DPH (c) em ciclohexano (CH),a 25°C.

Devido ao princípio de relaxação dos modos vibracionais, o espectro de fluorescência é sempre observado a comprimentos de ondas maiores em relação ao espectro de absorção (Fig.5). Esta mudança para o vermelho indica que o quanta emitido é de menor energia que o absorvido ($h\nu_f < h\nu_a$), sendo denominado de efeito stoke.[50]

O tempo de vida de fluorescência (τ_f) e o rendimento quântico (Φ_f) estão relacionados pela equação:[51]

$$k_f = \frac{\Phi_f}{\tau_f} \qquad (4)$$

onde: k_f = constante de velocidade com a qual os fótons de fluorescência são emitidos;

Φ_f = rendimento quântico;

τ_f = tempo de vida de fluorescência.

Na fluorescência, a relação de fótons emitidos por fótons absorvidos é chamada de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f), que tem valor próximo da unidade para fluoróforos eficientes.[51] Se todas as moléculas excitadas fluorescerem, o rendimento quântico será igual a 1.[9]

O tempo de vida de fluorescência é o período médio de tempo no qual um fluoróforo permanece no estado excitado singlete.[41]

Estudos de fluorescência em sistemas vesiculares de sondas incorporadas às membranas geralmente utilizam os trans-difenilpolienos (Fig.2), e seus derivados.[14,15,35,36,43,65] Eles produzem prontamente fotoisomerização quando expostos à luz ultravioleta, podendo assim ser monitorados como sondas fluorescentes.[47]

A isomerização fotoquímica cis-trans da ligação dupla C=C em polienos conjugados é de grande importância, por exemplo, em polienos

biológicos, como retinol, β-caroteno e vitamina D[22,24,44]. Os trans-difenilpolienos conjugados, (tS (ξ=20.000$M^{-1}cm^{-1}$), DPB (ξ=54.500$M^{-1}cm^{-1}$) e DPH ($\xi\cong$80.000$M^{-1}cm^{-1}$)[2,3,4,5,6]) podem ser utilizados como moléculas modelo para estes tipos de processos. Suas fluorescências são intensas, com tempo de vida relativamente longo e sensíveis ao seu microambiente, ao mesmo tempo compatíveis com a membrana, podendo ser incorporadas, devido às suas estruturas de hidrocarbonetos serem apolares.[2]

O uso como sonda propicia uma melhor caracterização de estrutura e dinâmica de membranas. Outros compostos derivados dos trans-difenilpolienos exibem comportamento fotofísico e fotoquímico similares ao DPH.[3,14] O interesse pelos trans-difenilpolienos deve-se à capacidade que eles apresentam de isomerizar-se nas duas configurações estáveis cis e trans.(Fig. 6).[15,43]

Dependendo do meio no qual se encontram, ocorre uma competição entre a isomerização e a fluorescência das moléculas expostas à luz ultra-violeta.[2,3] Em meio desimpedido (microviscosidade baixa) ocorre um aumento do rendimento quântico de isomerização, tendendo para 1 ($\Phi_{t \rightarrow} \cong 1$), mas quando a molécula encontra-se em meio rígido, a isomerização é dificultada e a fluorescência tende a 1 ($\Phi_f \cong 1$). Um fator importante que favorece a isomerização é o aumento da temperatura e a polaridade do solvente, responsáveis pela diminuição da microviscosidade do sistema. Em meios microheterogêneos, como micelas e vesículas, a isomerização dependerá da localização da sonda no interior ou na interface das mesmas.[2,6]

1.4. Processos fotoquímico e fotofísico do trans-estilbeno

O processo de isomerização do trans-estilbeno é extensamente estudado, sendo que esta molécula tem como base de modelo para outras moléculas derivados dos trans-difenilpolienos. Focalizaremos primeiramente a química do estado singlete.

Os trans-difenilpolienos são moléculas altamente simétricas pertencendo ao grupo pontual C_{2h}. Seus estados fundamentais são caracterizados por A_g simétrico e seus estados excitados singlete $\pi \rightarrow \pi^*$ são alternados entre A_g^- e B_u^+ simétricos. A transição $1B_u^* \rightarrow 1A_g$ (permitida) ocorre por irradiação direta ou emissão de um fóton singlete. O estado populado de $1A_g^*$ por irradiação direta (processo proibido) é limitado devido à fraca vibração, mas pode ser realizado excitando 2 fótons. Sobre a formação do estado excitado $1A_g^* \rightarrow A_g$ de emissão proibida pode ocorrer via Herzberg-Teller vibrônico acoplamento do estado $1A_g^*$ e $1B_u^*$, a transição direta é parcialmente permitida e uma redução simétrica e relaxação conformacional da requerida simetria.[1]

A fotoquímica dos estados singletes dos α,ω-difenilpolienos é governada por diversos fatores: a) designado pela ordem ou simetria dos dois primeiros estados excitados S_1 e S_2; b) a diferença de energia eletrônica S_2 - S_1 ; c) cruzamento entre sistemas e d) dinâmica de isomerização.[1]

A fluorescência do primeiro estado excitado ativado da molécula do trans-estilbeno gira para a geometria perpendicular, a rotação é máxima entre a ligação C=C quando forma o ângulo de 90° (Fig.6 e 7). Este estado excitado perpendicular decai para o máximo de energia no estado fundamental, do qual são produzidos tanto isômeros cis quanto trans (Fig.7). Há uma pequena barreira para formar o estado excitado $1p^*$ "*twisted*" $\cong$ 3,5Kcal/mol atribuído a um cruzamento permitido $1B_u^*$ com

um segundo estado excitado $1A_g^*$ quando a molécula tem seu movimento de rotação para fora de sua conformação planar, sofrendo então este processo de rotação.[1,61]

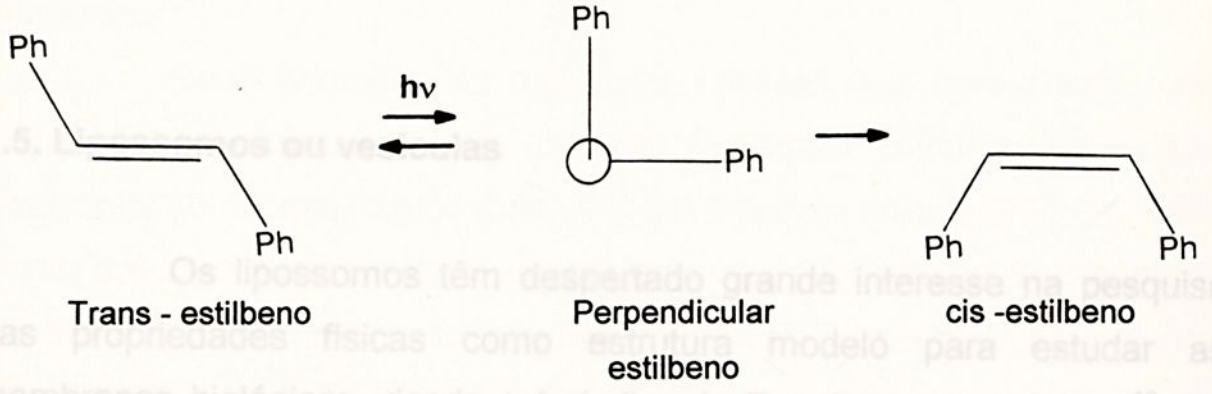


Figura 6. Esquema do caminho fotoquímico da molécula trans-estilbeno (tS).[61]

A barreira térmica de isomerização cis-trans requer um processo de energia relativamente alta, calculada como sendo aproximadamente 49kcal/mol para trans-estilbeno, e aproximadamente 46kcal/mol para cis-estilbeno. A repulsão estérica no isômero cis é devido à não coplanaridade e à perda relativa da estabilização de ressonância da dupla conjugada. O cis-estilbeno é estericamente mais volumoso que o trans. Para minimizar o volume, os grupos fenis giram através de suas simples ligações exocíclicas, que são forçadas para fora da olefina aproximadamente 30°.[47]

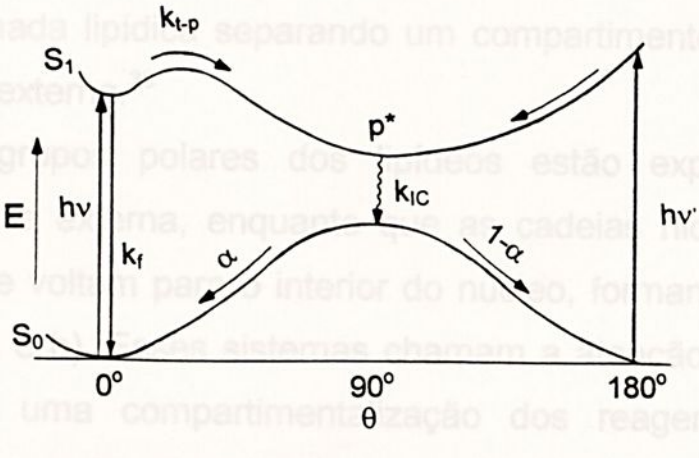


Figura 7. Energia potencial de superfície do estilbeno em função do ângulo de rotação sobre a dupla ligação C-C.[1]

O aumento da velocidade de rotação no estado excitado é provocado pelo aumento da temperatura, assim como o da polaridade do solvente e diminuição da viscosidade do meio.[47]

1.5. Lipossomos ou vesículas

Os lipossomos têm despertado grande interesse na pesquisa das propriedades físicas como estrutura modelo para estudar as membranas biológicas, desde o trabalho de Bangham *et. al* (1965)[12], no qual estas membranas sintéticas foram utilizadas para investigar a permeabilidade de vários íons e moléculas através de bicamadas.

Gregoriadis[25,27] propôs a utilização dos lipossomos como sistemas transportadores de agentes farmacologicamente ativos (drogas enzimas), sugerindo elevado interesse então, na possibilidade de aplicação dos lipossomos *in vivo* na Medicina e na pesquisa.[18,31,49,62,65]

De maneira simplificada, podemos definir os lipossomos como vesículas lipídicas que possuem em seu interior um espaço aquoso. A formação de vesículas ocorre quando os lipídeos (moléculas anfipáticas) são dispersos em meio aquoso, formando agregados supramoleculares, com uma bicamada lipídica separando um compartimento aquoso interno da fase aquosa externa.[38]

Os grupos polares dos lipídeos estão expostos às fases aquosas interna e externa, enquanto que as cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos se voltam para o interior do núcleo, formando uma camada bilipídica (Fig.8a e b). Esses sistemas chamam a atenção por conduzirem naturalmente a uma compartimentalização dos reagentes na qual a localização destes pode estar restrita a determinados sítios dos lipossomos: a) na região do núcleo hidrocarbônico; b) na região polar interface

(hidrofílica) externa e interna; c) na fase aquosa interna e d) na fase aquosa externa. Possivelmente as primeiras células vivas assemelham-se a lipossomos, segregando o conteúdo aquoso, como uma concha hidrofóbica.[42]

Genericamente, as moléculas lipídicas que apresentam duas longas cadeias acilas possuem unidades individuais cilíndricas (a secção transversal da cabeça, região polar, é igual à cadeia acila lateral), podendo formar dois tipos de agregados em meio aquoso: lipossomos ou bicamada (Fig.8.a e b) (dependendo das condições precisas empregadas em estudo). As moléculas surfactantes possuem unidades individuais em forma de cunha (a secção transversal da cabeça, região polar, maior do que à cadeia alquílica lateral), formam micelas (Fig.8.c), ou seja, estruturas esféricas relativamente pequenas envolvendo várias moléculas, arranjadas de tal forma que suas regiões hidrofóbicas se agregam no interior com exclusão de água, e seus grupos de cabeça polares permanecem na superfície (meio aquoso).[42]

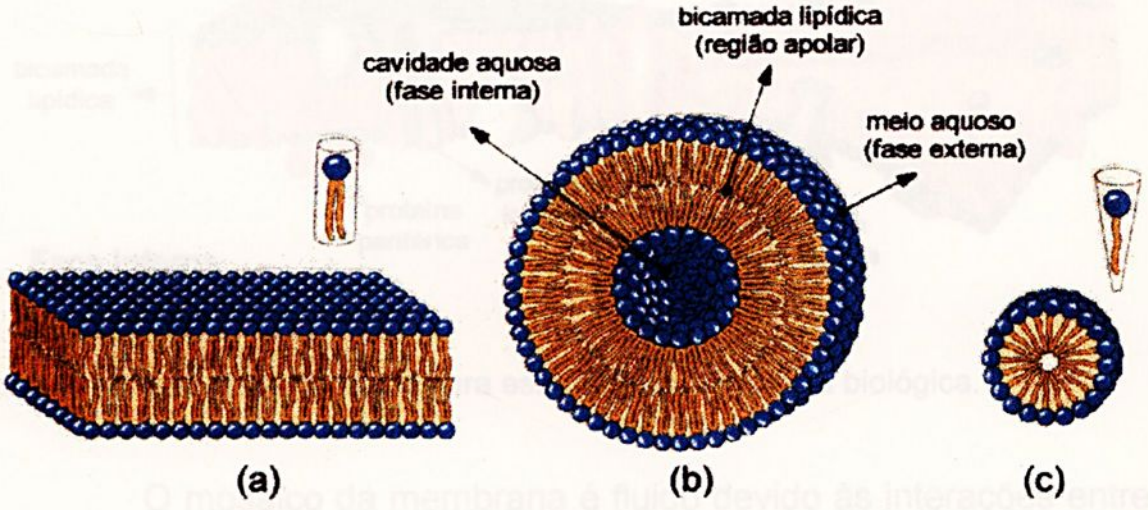


Figura 8. Modelos de agregados em meio aquoso (a) bicamada, (b) lipossomo (vesícula) e (c) micela.[42]

Os lipídeos, dos quais se obtém as vesículas, possuem várias funções biológicas importantes servindo como: componentes estruturais de membranas; formas de armazenamento e transporte de combustível metabólico; película protetora sobre a superfície de muitos organismos e como componentes da superfície celular incumbidos do reconhecimento de células, da especificidade de espécies e da imunidade dos tecidos.[42]

Os pesquisadores necessitam de sistemas modelo que caracterizem as membranas naturais como os lipossomos que, devido aos seus constituintes naturais, formam uma estrutura da bicamada que é um princípio semelhante com a posição lipídica das membranas celulares.[51]

Esta semelhança favorece um estudo químico detalhado das membranas biológicas "o mar de fosfolipídeos" no modelo proposto por Singer e Nicholson[51] (Fig. 9). A essência desse modelo é que as membranas são soluções bidimensionais de proteínas globulares orientadas e lipídeos.[59]

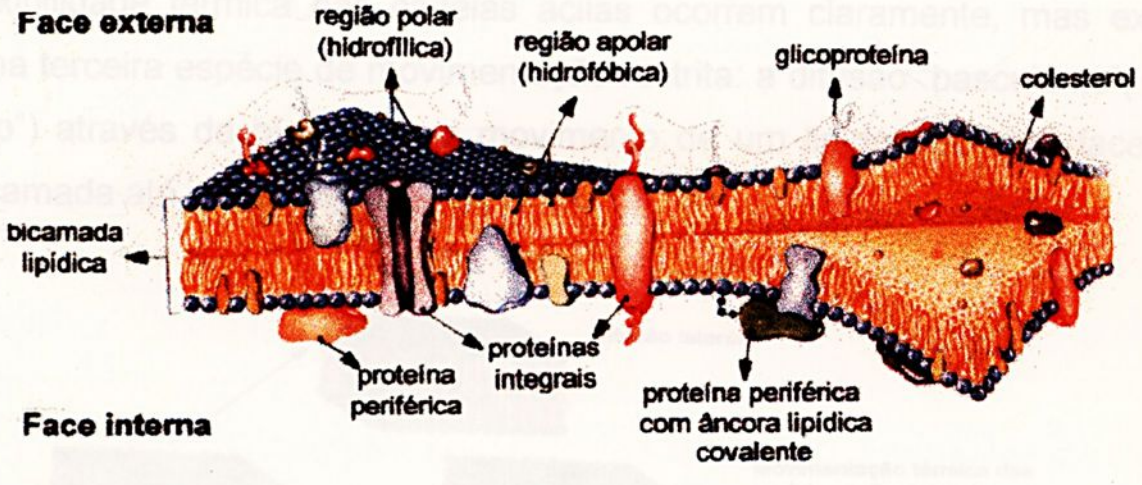


Figura 9. Modelo mosaico fluido para estrutura da membrana biológica.[42]

O mosaico da membrana é fluido devido às interações entre os lipídeos e entre os lipídeos e proteínas por não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídeos e das proteínas movam-se lateralmente no plano da membrana.

Embora as membranas sejam estáveis, elas de modo algum são estáticas. A estrutura do mosaico fluido é dinâmica e suficientemente flexível para permitir a fusão de duas membranas.[59]

Elas difundem-se lateralmente tão rapidamente, que uma molécula individualizada de um lipídeo pode circunavegar um eritrócito em segundos. O interior da bicamada é também fluido, as cadeias acilas individualizadas estão em movimentação constante, produzida pela livre rotação das ligações carbono-carbono destas longas cadeias acilas laterais.

O grau de fluidez depende da composição lipídica e da temperatura. Em baixas temperaturas há pouca movimentação lipídica, mantendo-se quase que cristalina (estado paracristalino). Acima de uma certa temperatura os lipídeos apresentam grande movimentação. A temperatura de transição rígido ordenado para fluido depende da composição química do lipídeo que constitui a membrana.

A migração lateral dos componentes da membrana e a flexibilidade térmica das cadeias acilas ocorrem claramente, mas existe uma terceira espécie de movimentação restrita: a difusão "basculante"("flip flop") através da bicamada, o movimento de um lipídeo de uma face da bicamada até outra (Fig.10).[42]

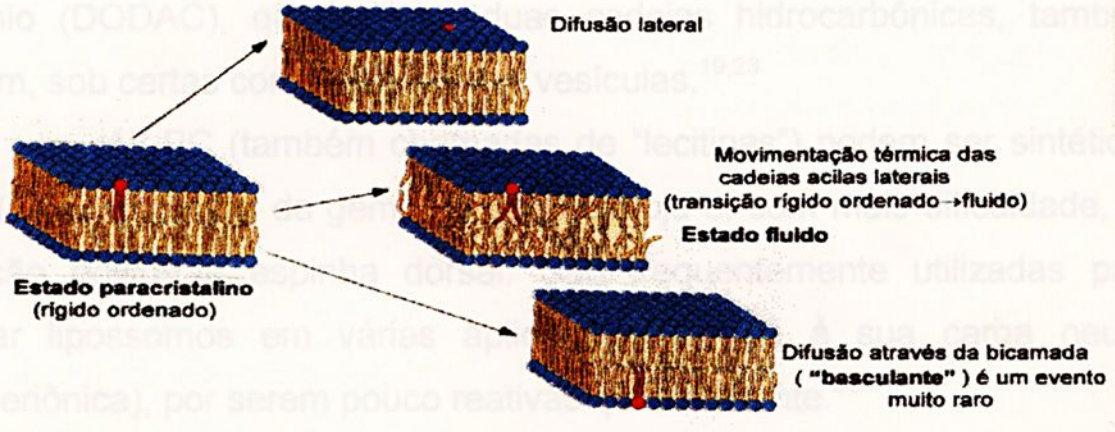


Figura 10. Possíveis movimentações lipídicas no interior de uma bicamada em membranas biológicas.[42]

1.6. Estrutura química dos fosfolipídeos e sua temperatura de transição de fase (Tc)

Os fosfolipídeos são os componentes fundamentais na estrutura das membranas biológicas. Os mais comuns, as moléculas de fosfatidilcolina (PC) (Fig. 11), são moléculas anfifílicas, onde uma ponte de glicerol liga-se a dois grupos acilas que fazem parte de duas longas cadeias hidrocarbônicas hidrofóbicas e um grupo polar hidrofílico. Estas moléculas não são solúveis em meio aquoso e, para minimizar as interações desfavoráveis com as fases aquosas, elas se aproximam e se alinham, formando uma bicamada plana lamelar, que se dobra para formar vesículas, bicamadas fechadas.[22,51]

Dependendo da quantidade de água adicionada, as moléculas de PC assumem diferentes formas estruturais nos agregados. Em baixo conteúdo de água, teremos fases líquido-cristalinas de diferentes tipos. Após adição de mais água e agitação suave, elas se desintegram formando lipossomos multilamelares que, sob ação da dispersão ultrassônica, leva à formação de vesículas menores (unilamelares) de diferentes tamanhos (diâmetro de 250 a 1000Å).[22]

Moléculas surfactantes, tais como cloreto de dioctadecil dimetil amônio (DODAC), que contém duas cadeias hidrocarbônicas, também podem, sob certas condições, formar vesículas.[19,23]

As PC (também chamadas de "lecitinas") podem ser sintéticas (Fig.11) ou extraídas da gema de ovo, da soja e, com mais dificuldade, do coração bovino e espinha dorsal. São frequentemente utilizadas para formar lipossomos em várias aplicações, devido à sua carga neutra (zwitteriônica), por serem pouco reativas quimicamente.[51]

A lecitina de fontes naturais é de fato uma mistura de fosfatidilcolinas, cada uma com cadeias hidrocarbônicas de diferentes

comprimentos e vários graus de insaturação. As de plantas têm alto nível de poli-insaturações nas cadeias hidrocarbônicas acila, enquanto que as de fontes mamíferas contêm uma alta proporção de cadeias totalmente saturadas.[22]

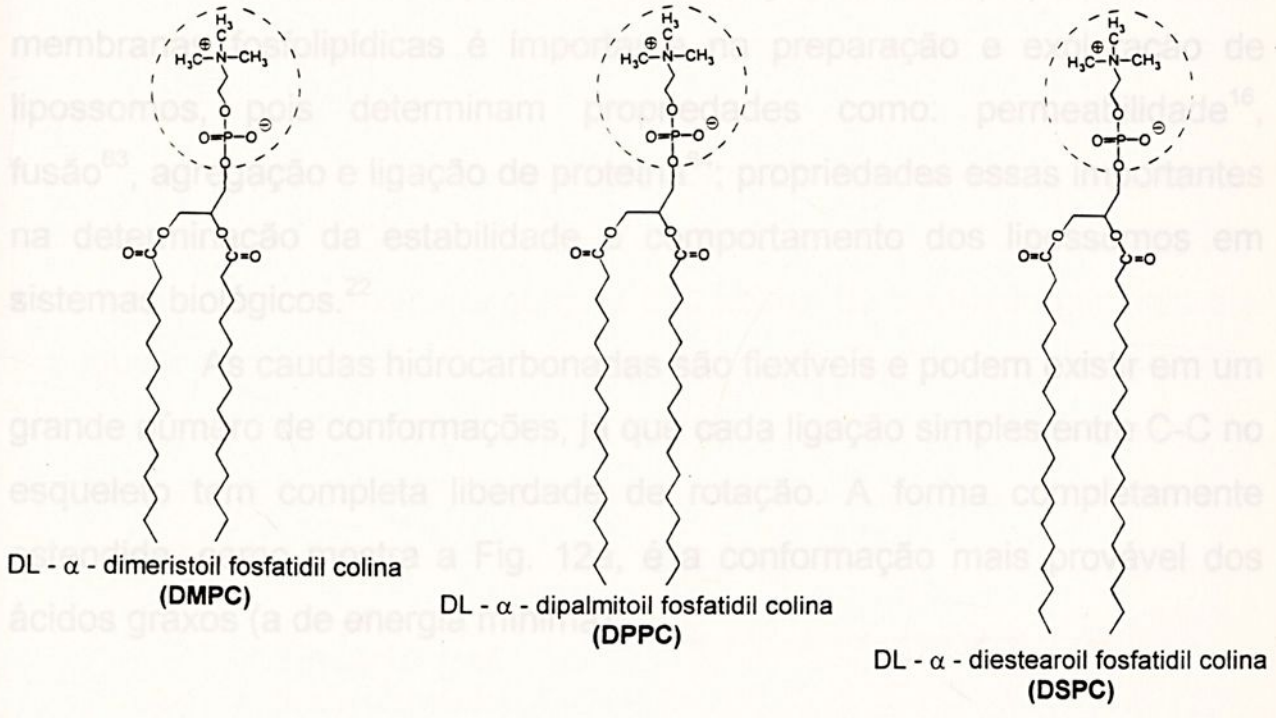


Figura 11. Estruturas das moléculas de fosfotidilcolina aplicadas na obtenção das vesículas.

Dependendo da temperatura do meio onde se encontram, os lipídeos em bicamada podem estar no estado gel (rígido) ou no estado líquido-cristalino (fluido). À medida que a temperatura aumenta, atingem um ponto de transição, próprio de cada lipídeo, de uma fase gel ou rígida ordenada, a membrana passa para uma fase líquida-cristalina, aumentando a liberdade de movimentos das moléculas, chamada "mudança termotrópica dos lipídeos", (mudança de fase causada pelo efeito da temperatura).[28]

O método mais usado para determinar a temperatura de transição de fase (Tc) é a calorimetria,[34] mas pode-se usar outros métodos que detectem a transição.[58] Existem fatores importantes para determinar Tc, como: comprimento da cadeia alquílica, insaturações e cabeça do grupo.[51]

Entender a temperatura de transição de fase (Tc) e fluidez das membranas fosfolipídicas é importante na preparação e exploração de lipossomos, pois determinam propriedades como: permeabilidade[16], fusão[63], agregação e ligação de proteína[64]; propriedades essas importantes na determinação da estabilidade e comportamento dos lipossomos em sistemas biológicos.[22]

As caudas hidrocarbonadas são flexíveis e podem existir em um grande número de conformações, já que cada ligação simples entre C-C no esqueleto tem completa liberdade de rotação. A forma completamente estendida, como mostra a Fig. 12a, é a conformação mais provável dos ácidos graxos (a de energia mínima).

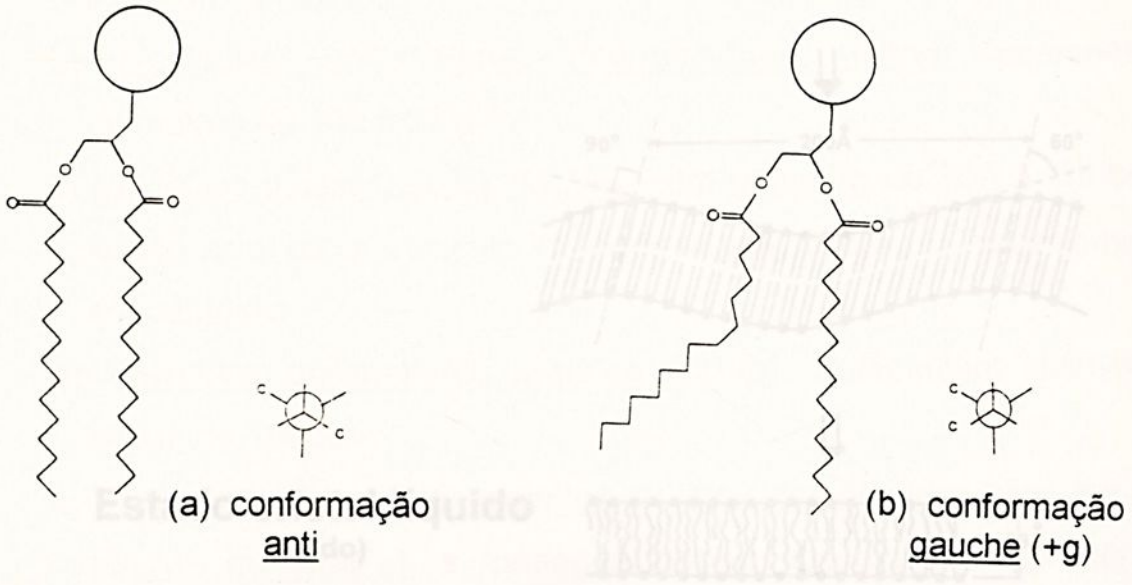


Figura 12. Cadeias hidrocarbônicas de fosfatidilcolina nas conformações: (a)anti e (b) gauche (+g).[22, 51]

Quando a temperatura aumenta, as cadeias dos ácidos graxos tendem a adotar certas conformações diferentes na configuração da cadeia reta anti para a conformação gauche Fig. 12b.[22,51]

Ao ocorrer mudança na conformação da cadeia hidrocarbônica do lipídeo, expande-se a área ocupada pelas cadeias e consequentemente a membrana reduzirá o comprimento total das cadeias hidrocarbônicas, (diminuindo a espessura da bicamada) após a transição de fase gel para líquido-cristalino.[22,51]

A mudança do estado de transição da fase gel para líquido-cristalino ocorre em duas etapas para lecitina: a transição principal e a pré-transição ocorre aproximadamente a 5°C abaixo da transição principal que faz mudar a orientação das cabeças do grupo. Na faixa de temperatura entre essas duas transições, a membrana adota uma aparência enrugada, a qual é transformada de superfície planar em superfície ondulada com uma periodicidade regular, como mostra a (Fig.13).[22,51]

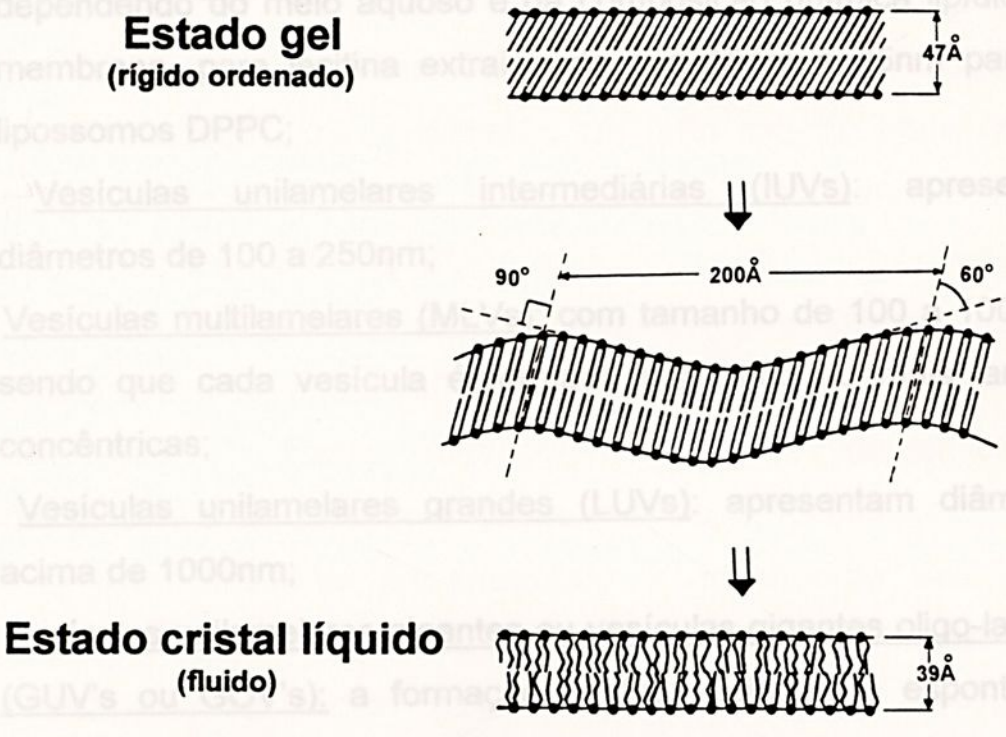


Figura 13. Representação do movimento da estrutura da bicamada lipídica na faixa de temperatura entre a pré-transição e a transição de fase principal.[22,51]

1.7. Estrutura física dos agregados de fosfolipídeos

O tamanho dos lipossomos varia de acordo com o método de preparação.[22,51] As técnicas mais usadas são: sonicação, injeção de solventes orgânicos e extrusão de lipossomos.

Vesículas de uma única bicamada (unilamelares) são geralmente preparadas por dois métodos de sonicação:

a) Com ponta de Titânio de imersão: consiste em introduzir uma ponta de titânio (responsável pela sonicação) diretamente em uma dispersão aquosa de fosfolipídeos;[1,2,4,47,60,61]

b) De banho: consiste em introduzir um balão volumétrico contendo uma dispersão aquosa de fosfolipídeos em um sonicador de banho.[23]

Os lipossomos são classificados por seu tamanho, como:[21, 42, 54]

a) Vesículas unilamelares pequenas (SUVs): são as menores, variam dependendo do meio aquoso e da composição química lipídica da membrana, para lecitina extraída do ovo 15nm e 25nm para os lipossomos DPPC;

b) Vesículas unilamelares intermediárias (IUVs): apresentam diâmetros de 100 a 250nm;

c) Vesículas multilamelares (MLVs): com tamanho de 100 a 1000nm, sendo que cada vesícula é formada por cinco ou mais lamelas concêntricas;

d) Vesículas unilamelares grandes (LUVs): apresentam diâmetros acima de 1000nm;

e) Vesículas unilamelares gigantes ou vesículas gigantes oligo-lamelar (GUV's ou GOV's): a formação destas vesículas é espontânea, observadas por microscopia eletrônica apresentando diâmetros de ≅ 1000 nm.[41]

1.8. Medidas de fluidez da bicamada

Informações sobre o grau de ordem ou fluidez, de bicamada lipídica são fornecidas por várias técnicas espectroscópicas como: ressonância magnética nuclear (RMN)[13,32,37,48] espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR).[47,55,67]

Uma das técnicas mais amplamente usadas nas medidas da fluidez da membrana é a polarização de fluorescência[2,10,14,39], na qual a emissão de fluorescência de polarização (ou anisotropia (**r**)) de cromóforos (trans-difenilpolienos) incorporados às membranas são usados como medida da extensão do movimento ao acaso da sonda durante o seu tempo de vida no estado excitado, sendo o movimento da sonda limitado pelas propriedades de movimentação e grau de ordem das cadeias hidrocarbônicas. A sonda fornecerá então uma medida da ordem da cadeia hidrocarbônica.[15,36,43,44,57,60,65]

A luz polarizada excita preferencialmente aqueles cromóforos cujos eixos moleculares estão orientados em uma direção particular em relação ao plano de polarização. Se o cromóforo permanecer imóvel durante o seu tempo de vida do estado excitado, então a luz fluorescente será também altamente polarizada. Se o cromóforo girar durante o tempo de vida de fluorescência, então a fluorescência resultante se tornará bem menos polarizada.[21,40] Esses movimentos relativos dependem da viscosidade do meio e do tamanho e formato das espécies difusas.

A taxa rotacional do cromóforo é dependente das forças viscosas impostas ao cromóforo pelo meio. A polarização de fluorescência (anisotropia) age como índice conveniente da extensão da rotação molecular. Durante o seu tempo de vida do estado excitado a polarização

unesp

de fluorescência ou anisotropia decresce à medida que ocorre a livre rotação do cromóforo ou fluoróforo.[40]

A anisotropia (*r*) é definida pela diferença das intensidades paralela ($I_{//}$) e perpendicular ($I_{\perp}$) à excitação dividida pela intensiade total (I_T). Entretanto, quando a direção de excitação é desconhecida, a anisotropia (*r*) pode ser determinada através da polarização (*P*). As medidas de polarização e anisotropia são representadas pelas equações 5 e 6:[40]

$$P = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \qquad (5)$$

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_T} \Rightarrow \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \qquad (6)$$

Considerando que a luz polarizada percorre ao longo do eixo **X** (Fig.14).

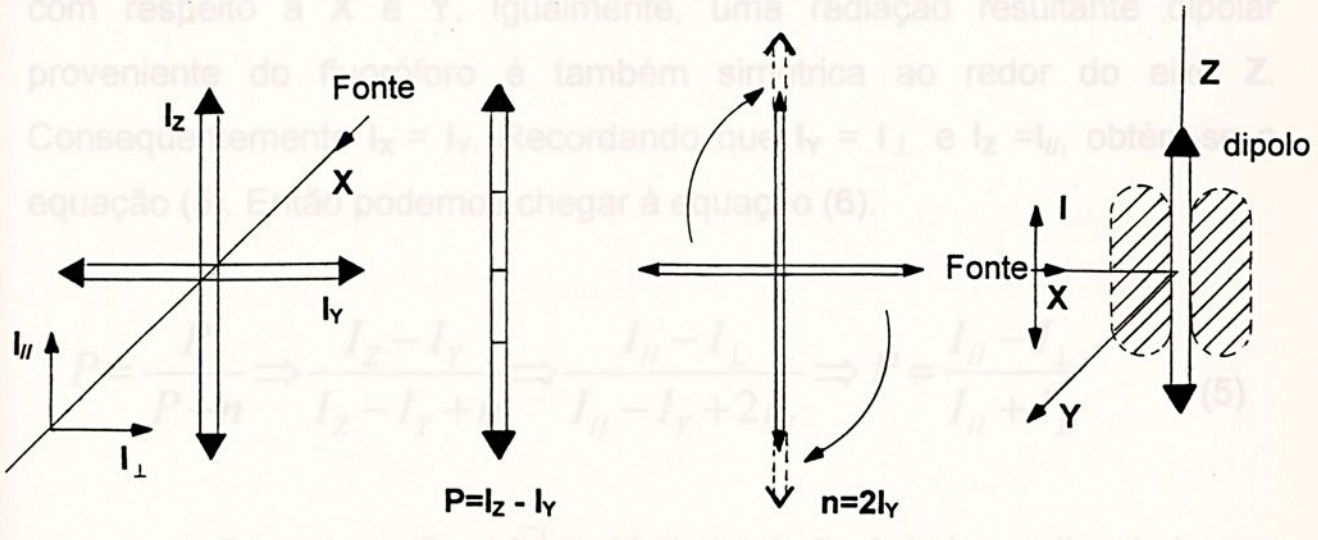


Figura 14. Polarização e anisotropia da luz.[40]

Assumindo medidas de intensidades I_Z e I_Y com orientação do detector ao longo do eixo **X** a luz polarizada é definida quando a fração de luz é linearmente polarizada.[40]

$$P = \frac{P}{P + n} \quad (7),$$

onde *P* é a componente da intensidade de polarização e *n* é a componente da intensidade natural, sendo que, a componente de intensidade natural (*n*) é a igualdade de $n=2I_Y$ e $P=I_Z - I_Y$. Para excitação verticalmente polarizada $I_Z = I_{//}$ e $I_Y = I_\perp$, substituindo a equação (7) chega-se ao produto da equação (5) que é a medida de polarização. À anisotropia (*r*) de uma fonte de luz segue-se a razão da componente polarizada da intensidade total (I_T):[40]

$$r = \frac{I_Z - I_Y}{I_X + I_Y + I_Z} \Rightarrow \frac{I_Z - I_Y}{I_T} \quad (8)$$

Quando a excitação é polarizada ao longo do eixo **Z**, é simétrica com respeito a **X** e **Y**. Igualmente, uma radiação resultante dipolar proveniente do fluoróforo é também simétrica ao redor do eixo **Z**. Consequentemente $I_X = I_Y$. Recordando que $I_Y = I_\perp$ e $I_Z = I_{//}$, obtém-se a equação (5). Então podemos chegar à equação (6).

$$P = \frac{P}{P+n} \Rightarrow \frac{I_Z - I_Y}{I_Z - I_Y + n} \Rightarrow \frac{I_{//} - I_\perp}{I_{//} - I_Y + 2I_Y} \Rightarrow P = \frac{I_{//} - I_\perp}{I_{//} + I_\perp} \quad (5)$$

Por esta razão, a intensidade total não é dada por ($I_{//} = I_\perp$), mas sim por ($I_T = I_{//} + 2I_\perp$). Isto ocorre porque a luz radiada por um dipolo é

igualmente distribuída ao longo do eixo **X** e **Y**, sendo que a anisotropia é a razão do excesso de intensidade que é paralelo ao eixo **Z**, dividido pela intensidade total da equação (6).[40]

A polarização e anisotropia podem ser substituídas usando também as seguintes equações:

$$P = \frac{3r}{2+r} \qquad (9)$$

$$\Downarrow$$

$$\Rightarrow P(2+r) = 3r \Rightarrow 2P + \mathrm{Pr} = 3r \Rightarrow 2P = 3r - \mathrm{Pr} \Rightarrow$$

$$\Downarrow$$

$$2P = r(3-P) \Rightarrow r = \frac{2P}{3-P} \qquad (10)$$

Para medidas de polarização de fluorescência e anisotropia em um fluorímetro que possuem um único canal de emissão (ou chamado formato em " L "), é necessário aplicar o fator de correção (*G*), equação (11), isto é, a relação entre a sensibilidade de detecção dos sistemas para luz polarizada verticalmente e horizontalmente:[40]

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{//}} \qquad (11)$$

Substituindo o fator de correção (*G*) equação(11) nas equações (5 e 6), obtém-se as seguintes equações de: *polarização* (*P*) equação (12) e *anisotropia* (*r*) equação (13).

$$P = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + GI_{\perp}} \quad (12) \quad \text{e} \quad r = \frac{I_{//} - GI_{\perp}}{I_{//} + 2GI_{\perp}} \quad (13) \quad \text{ou} \quad r = \frac{2P}{3-P} \quad (10)$$

onde, $i_{\perp}$ = intensidade perpendicular; $i_{//}$ = intensidade paralela;

$I_{//}$ = intensidade paralela; $I_{\perp}$ = intensidade perpendicular.

2- OBJETIVOS

Pretendemos, com este trabalho, estudar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas das moléculas sintetizadas derivadas dos trans-difenilpolienos (tS, DPB e DPH), quando incorporadas em bicamadas lipídicas (lipossomos). Esses lipossomos também despertam grande interesse no estudo de suas propriedades por serem usados como meio de transporte na administração sistemática de drogas.[7,8,18,65]

As sondas fluorescentes (trans-difenilpolienos) possuem afinidade com as vesículas (lipossomos), que contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, não interferindo na estabilidade de formação das mesmas à conc. 10^{-5}M.

Estas sondas incorporadas às vesículas permitem estudar diferentes sítios na membrana da vesícula, facilitando a obtenção de dados espectroscópicos de fluorescência. Aplicando-se técnicas de rendimento quântico (Φ_f) e anisotropia (**r**) objetiva-se melhorar a compreensão dos seus microambientes, resultados estes de grande importância para pesquisa em sistemas biológicos.

Como aspectos importantes da continuidade desta pesquisa alcançaremos: (a) uma compreensão melhor e mais detalhada das membranas biológicas e (b) a simulação de funções da membrana em modelos relativamente simples que possam levar a uma química nova de grande utilidade prática.[1,2,4,22]

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes utilizados

Fosfolipídeos: DMPC, DPPC e DSPC (Sigma) cujas estruturas encontram-se na (Fig.11).

Benzaldeído (Baker): tratado com $CaCl_2$ e filtrado. Xileno (Baker) tratado com $CaCl_2$ um dia antes de ser utilizado. Tetrahidrofurano (THF) (Merk): refluxado por duas horas em presença de hidreto de lítio e alumínio ($LiAlH_4$) (Merck). Cinamaldeído (Aldrich): usado conforme recebido. Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck): tratado com Na_2SO_4 anidro, filtrado e destilado. Cloreto de metileno (CH_2Cl_2): tratado com cloreto de cálcio, filtrado e destilado.

Trifenilfosfina (Aldrich); Hexano (Baker); Cloreto de Cromo III (Baker); Ácido Perclórico (Baker); Cloreto de Mercúrio II (Merck); Carbonato de Potássio anidro (Ecibra); Clorofórmio (Merck); Sílica Gel 100-200 Mesh (Sigma); Hidreto de lítio e alumínio ($LiAlH_4$) (Merck); Cloreto de cálcio anidro (Ecibra) e 4-brometo de Terc-butil benzila (Aldrich) foram utilizados sem tratamento prévio.

3.2. Sínteses realizadas

3. 2.1. Síntese prévia do sal de Fosfônio

10g (0,044 mol) de 4-brometo de terc-butilbenzila, 11,6g (0,044 mol) trifenilfosfina e 150ml de xileno (seco em $CaCl_2$) foram refluxados com agitação por 18 horas. Formou-se um sólido branco que, após a eliminação do solvente, foi recristalizado em n-hexano (pf=220°C) e rendimento 21,28g (98,52%).

3.2.2. Síntese dos derivados do carboxi estibeno

S1A, 4S1A, 8S1A e DPBA foram sintetizados pela reação de Wittig utilizando o aldeído apropriado (benzaldeído, 4-n-octilbenzaldeído, n-butil benzaldeído e cinamaldeído, respectivamente) com o ilídio derivado do brometo de 4-carboxibenziltrifenil fosfônico em solução do DMSO-THF.[47]

3.2.2.1. Síntese de trans, p-carboxi estilbeno (S1A)

A mistura de 2,5g (0,00943 mol) de benzaldeído, 2,11g (0,00943 mol) de ilídio derivado de brometo de 4-carboxibenziltrifenil-fofônico, 4,72g (0.01886 mol) de hidreto de sódio, 50ml de dimetil sufóxido (DMSO) e 50ml de Tetrahidrofurano (THF) foi agitada magneticamente durante 20 horas a 0°C (banho de gelo e corrente de nitrogênio). Os solventes foram eliminados em roto-vaporizador (com bomba de vácuo). O sólido remanescente foi parcialmente dissolvido em água e o trifenilfosfinóxido, filtrado.

À solução aquosa, adicionou-se ácido clorídrico 25% para a precipitação de (S1A); o produto foi passado em coluna de sílica 28 Mesh, tendo como eluente clorofórmio, que foi eliminado no rotovaporizador a vácuo. O produto branco foi filtrado e recristalizado duas vezes em acetona e água ultra-pura, (pf=150°C), rendimento 46%. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) 6,7-6,9 (2H, m, vinil), 7,20-7.90 (9H, m, Ar), UV (clorofórmio)λ_{max}= 306nm. Análise (IQ-USP): calculado ($C_{15}H_{12}O_2$ (224,27)): 80,34% C e 5.39% H; encontrado: 79,12% C e 5,41% H.[47]

3.2.2.2. Síntese de trans, 4n-butil-p'-carboxi estilbeno (4S1A)

Seguiu-se o mesmo processo da síntese 3.2.2.1., utilizando p-butilbenzaldeído.

Sólido branco (pf=120°C), rendimento 32%. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) 0,92 (3H, t, CH_3), 1,2-1,7 (4H, 2m, CH_2), 2,5-2.7 (2H, m, CH_2-Ar), 6,6-6,8 (2H, m, vinil), 7,0-8,0 (6H, m, CH-Ar), UV (clorofórmio)λ_{max}=312nm. Análise (IQ-USP): calculado ($C_{19}H_{20}O_2$ (280,38)): 81,40% C e 7,19% H; encontrado: 80,43% C e 7,43% H.[47]

3.2.2.3. Síntese de trans, 4n-octil-p'-carboxi estilbeno (8S1A)

Seguiu-se o mesmo processo da síntese 3.2.2.1., utilizando p-octilbenzaldeído:

Sólido branco (pf=97°C), rendimento 25%. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) 0,92 (3H, m, CH_3), 1,2-1,9 (12H, m, CH_2), 2.4-2,6 (2H, m, CH_2-Ar), 6,55-6,75 (2H, m, vinil), 7,05-7,95 (8H, m, Ar), UV (clorofórmio)λ_{max}=311nm. Análise (IQ-USP): calculado (C23H28O2): 82,10% C e 8,39% H; encontrado: 81,53% C e 8,31% H.[47]

3.2.2.4. Síntese de trans, trans, 1,4-difenil-p-carboxi-1,3 butadieno (DPBA)

Seguiu-se o mesmo processo da síntese 3.2.2.1., utilizando cinamaldeído:

Sólido branco amarelado (pf=215°C), rendimento 22%. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) 1,3 (3H, m, CH_3), 1,2-2,8 (6H, m, CH_2), 6,5-6,65 (4H, m, vinil), 6,8-

8,15 (8H, m, Ar), UV (clorofórmio)λ_{max}=350nm. Análise (IQ-USP): calculado ($C_{17}H_{14}O_2$ (250,31)): 81,58% C e 5,64% H; encontrado: 81,42%m C e 5,50% H.

3.2.3. Síntese dos derivados de tercbutil (trans-estilbeno e trans-difenilbutadieno) e carboxi trans-difenilbutadieno

3.2.3.1. Síntese de trans, trans, 1,4-difenil-p-tercbutil-1,3 butadieno (TDB)

Uma reação de Wittig foi realizada pela dissolução de 4,0g (0,00818mol) de sal de fosfônio de 4-brometo de Terc-butilbenzila em 25ml de cloreto de metileno e 80ml de THF previamente purificado. A esta solução foram adicionados 1,1g (0,00818mol) de cinamaldeído dissolvido em 20ml de THF e 5,0g de carbonato de potássio anidro. A mistura foi refluxada com nitrogênio e a formação do produto foi monitorada por cromatografia de camada delgada (TLC) usando $CHCl_2$ como solvente. Sólido branco (pf=125-126°C), rendimento (76,17%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) 1,3 (9H, s, CH_3), 6,6-6,8 (2H, m, vinil), 7,0-7,5 (9H, m, Ar), UV. (CH_2Cl_2)λ_{max} = 337nm. Análise (IQ-USP): calculado ($C_{20}H_{22}$ (262,40)): 91,95% C e 8,45%H; encontrado: 90,94% C e 8,41%H.[6]

3.2.3.2. Síntese de trans, p-tercbutil estilbeno (TDS)

Seguiu-se a mesma metodologia para a síntese do TDB. Foram utilizados 4g (0,00818mol) de sal fosfônio de 4-brometo de Tercbutilbenzila, 0,87g (0,00818mol) de benzaldeído e 5g de carbonato de potássio anidro,

com os mesmos solventes e nas mesmas quantidades. Por recristalização em álcool, obteve-se 0,29g de um sólido branco com (pf = 99°C), rendimento (72,9%). 1_H NMR($CDCl_3$) 1,2 ((H, s, CH_3), 7,2-7,35 (2H,m,vinil), 7,40-7,65 (9H,m, Ar), UV (CH_2Cl_2)λ_{max} = 314nm. Análise (IQ-USP): calculado ($C_{18}H_{20}$(236,37)): 91,47% C e 8,53% H; encontrado: 89,75% C e 8,45% H.[6]

3.2.3.3. Síntese de trans, trans, 1,4-difenil-p-carboxi propil-1,3 butadieno (B4A)

Foi realizada uma reação de Wittig pela dissolução de 4,3g (0,00785 mol) de sal fosfônio de 4-(p-bromometilfenil)-4-oxo-butanoato, BrTK4E, em 25 ml de CH_2Cl_2 e 80ml de THF. A esta solução foram adicionados 2,48g (0,0234mol) de benzaldeído dissolvidos em 20ml de THF, 5,0g de carbonato de potássio e adicionados 25mg de 18-coroa-6-éter. A mistura foi refluxada com nitrogênio por 30 horas e a formação do produto foi monitorada por cromatografia de camada delgada (TLC) usando CH_2Cl_2 como solvente.

Uma amostra amarela altamente fluorescente foi detectada a Rf=0,4. O líquido foi separado do carbonato de potássio, o solvente foi evaporado e o óxido de difenilfosfina foi separado como impureza em uma coluna de sílica, utilizando CH_2Cl_2 como solvente. As frações coletadas contendo a substância fluorescente foram purificadas por evaporação do solvente e recristalizadas em hexano.

O ceto-ester obtido foi reduzido por uma reação de Clemmensen. Zinco metálico (0,9g; 20 Mesh) foi lavado em 4ml de ácido clorídrico 10% por 1 min., seguido por duas lavagens em água destilada.

Ao zinco foi adicionada solução amalgamante (5ml de ácido clorídrico concentrado, 50ml de água destilada e 5g de cloreto de mercúrio) e a mistura foi agitada por 1 min. O zinco foi lavado 4 vezes em água destilada e colocado em um frasco contendo 4ml de ácido clorídrico a 25% seguido de adição de ceto-ester dissolvido em 8ml de tolueno.

A mistura foi refluxada com rigorosa agitação. A TLC eluída com CH_2Cl_2 mostrou uma mancha fluorescente brilhante a Rf=0,7 que indica completo desaparecimento do material de partida.

A redução foi repetida 6 vezes. As fases de tolueno foram combinadas e tratadas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado e o produto passado em coluna de sílica usando CH_2Cl_2 como eluente. O solvente foi evaporado produzindo um sólido que foi recristalizado em hexano.

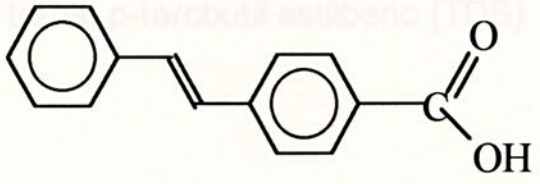
O produto foi hidrolizado por refluxo e agitação por duas horas, com 4 pastilhas de hidróxido de potássio, 10ml de acetona e 5ml de água.

A mistura foi concentrada em um rotovaporizador até 10ml e o pH foi ajustado a 2-3 pela adição de ácido clorídrico 25%.

O precipitado formado foi filtrado e então extraído com éter. O precipitado e a camada etérea foram combinados, evaporando e recristalizando em acetona-água, contendo 0,5g (15%) de um sólido amarelo (pf=112-114°C). ^1H NMR($CDCl_3$) 1,59-1,96 (4H, 2m, CH_2); 2,37 (2H, t, CH_2COOH); 2,6 (2(H, m, Ar-CH_2); 7,2 (4H,m,vinil); 1,15 (4H, d, m-ArH) e 7,4 (4H, d, O-ArH), UV (CH_2Cl_2)λ_{max} = 338 nm. Análise (IQ-USP): calculado ($C_{20}H_{20}O_2$ (292,38)), 82,16% C e 6,89% H; encontrado 82,27% C e 6,93% H.[6]

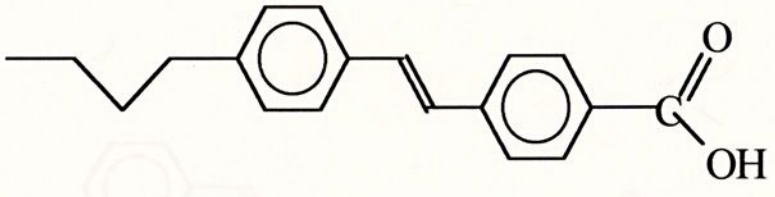
3.3. Estrutura molecular das sondas sintetizadas derivadas dos trans-difenilpolienos

1-



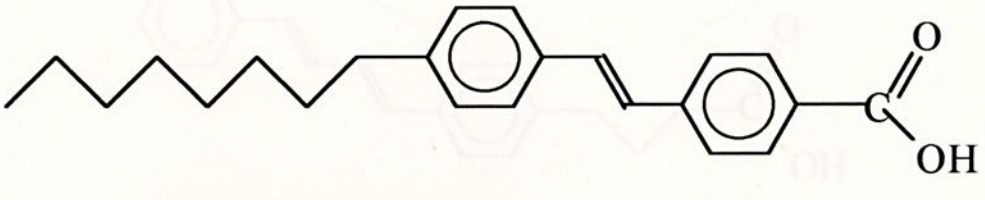
trans, p-carboxi estilbeno (S1A)

2-



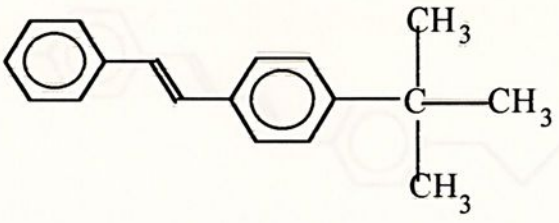
trans, 4n-butil-p'-carboxi estilbeno (4S1A)

3-



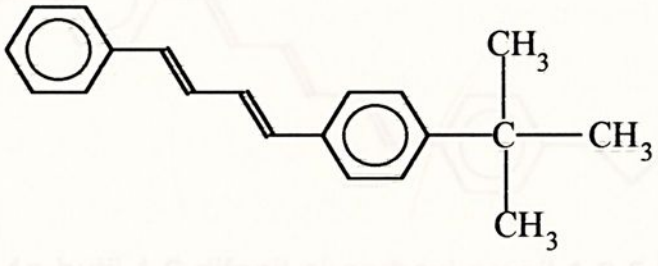
trans, 4n-octil-p'-carboxi estilbeno (8S1A)

4-



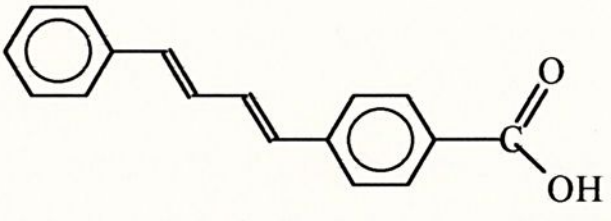
trans, p-tercbutil estilbeno (TDS)

5-



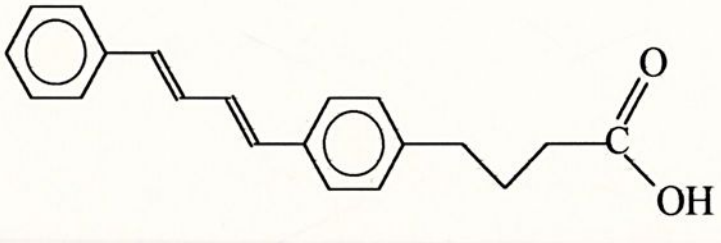
trans, trans, 1,4 difenil-p-tercbutil-1,3 butadieno (TDB)

6-



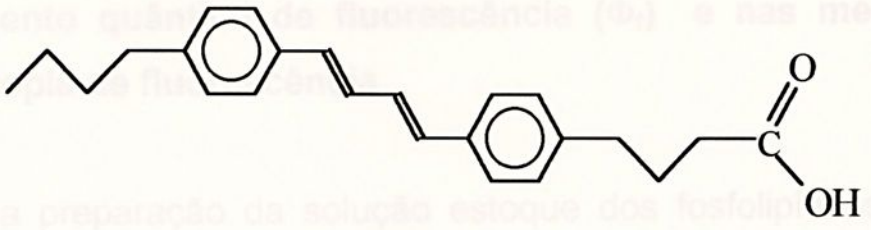
trans, trans, 1,4 difenil-p-carboxi-1,3 butadieno (DPBA)

7-



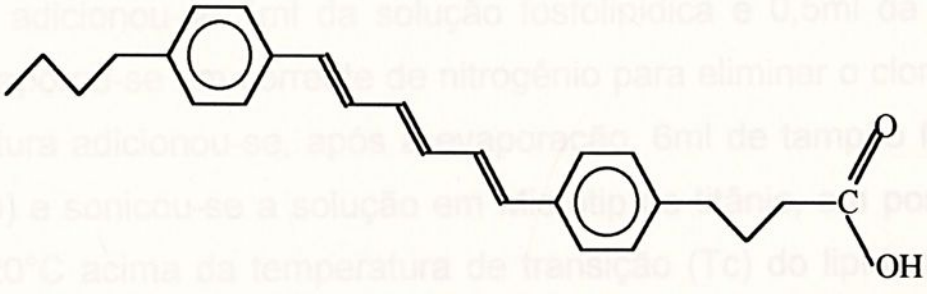
trans, trans, 1,4 difenil-p-carboxi propil-1,3 butadieno (B4A)

8-



trans, trans, 4n-butil-1,4difenil-p'-carboxi propil-1,3 butadieno (4B4A)[a]

9-



trans,trans,trans, 4n-butil-1,6 difenil-p'-carboxi propil-1,3,5 hexatrieno (4H4A)[a]

[a]Sondas cedidas pelo Prof. Dr. Laerte Miola: 4B4A e 4H4A.

3.4. Preparo da vesícula/sonda utilizado na determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e nas medidas de anisotropia de fluorescência

Na preparação da solução estoque dos fosfolipídeos (DMPC, DPPC e DSPC) (Sigma) pesou-se 10mg e diluiu-se em 10ml de clorofórmio (Merck), resultando uma solução aproximada da conc.de 10^{-3}M. Utilizou-se solução estoque da sonda dissolvida em clorofórmio à conc.de 10^{-4}M. Em um frasco, adicionou-se 1ml da solução fosfolipídica e 0,5ml da solução sonda e evaporou-se em corrente de nitrogênio para eliminar o clorofórmio. A esta mistura adicionou-se, após a evaporação, 6ml de tampão fosfato à razão (1:10) e sonicou-se a solução em Microtip de titânio, em posição de força 4 e 20°C acima da temperatura de transição (Tc) do lipídeo, por 30 min. Deixou-se em repouso para atingir a temperatura ambiente, centrifugou-se a 3.600 r.p.m. por 15 min. para eliminar partículas dispersas e fragmentos de titânio.

No preparo da vesícula/sonda por sonicação em banho (sonicador Thorton-modelo 17) o processo foi o mesmo, porém não sendo necessário centrifugar.

O tampão fosfato foi preparado com reagentes (Aldrich Gold Label): Na_2HPO_4 (6,4mM), KH_2PO_4 (1,4mM), NaCl (137mM) e KCl (2,6mM) e água Millipore (0,22 μm).

3.5. Preparo da solução de referência

Utilizou-se o mesmo procedimento anterior, adicionando somente 1ml da solução estoque de fosfolipídeos no frasco e evaporando-se em corrente de nitrogênio, com posterior adição ao frasco, de 6ml de

tampão fosfato à razão (1:10). Seguiu-se o mesmo processo para sonicação em banho e em ponta de titânio.

3.6. Temperatura de Transição de fase (Tc) das vesículas

Os intervalos para cada temperatura na medida de intensidade de fluorescência, para obtenção da curva de Φ_f x temperatura para todas sondas/vesículas, foram de 5°C, mas para a temperatura próxima a Tc, utilizou-se intervalos menores (Tabela 1):

Tabela 1. Dados de temperatura de transição de fase para as vesículas:

vesícula	Tc* (°C)	Intervalos de temperatura para cada leitura(°C)	Intervalos de temperatura próximos à Tc da vesícula (°C)
DMPC	23	5	20 - **23*** - 25
DPPC	41	5	37,5 - **41*** - 45
DSPC	55	5	50 - 52,5 - **55*** - 57,5 - 60

*Temperatura de transição de fase (principal) Tc. [1,2,4,61]

3.7. Aparelhos utilizados

- Espectrofotômetro UV-Visível-Cary1E (Varian), cela de quartzo com caminho ótico de 1cm;
-Espectrofluorímetro Hitachi-F4500, cela de quartzo (ℓ = 1cm) com todas as faces transparentes e polarizador. Slit 0,25 para Ex/Em, com fotomultiplicadora operando à tensão de 700V;
-Sonicador Microponta Heat Systems Model 220F em posição de força 4 (ponta de titânio);
-Sonicador de banho (Thorton-Modelo 17);
-Lâmpada de vapor de mercúrio Baush & Lomb de 200W;
-Purificador de água Milipore (Milli-Q-Plus System - 0,22μm).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

3.8. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

O rendimento quântico de fluorescência da sonda ($\Phi_{f\ sonda}$) foi determinado utilizando-se como padrão a substituição de rendimento quântico conhecido ($\Phi_{f\ ref.}$), obtendo-se dados de fluorescência para a amostra ($I_{f\ sonda}$) e padrão ($I_{f\ ref.}$) a 25°C, excitados no mesmo comprimento de onda (λ_{max}) da amostra, com mesma intensidade de luz (I_o) e a leitura da emissão com a fotomultiplicadora (**PM**) na mesma sensibilidade.

Avaliou-se o rendimento quântico comparando-se a fluorescência das amostras com a do padrão através da equação: [1,2,3,4,5,6,61]

$$\Phi_{f_{sonda}} = \left(\frac{I_{f_{sonda}} \cdot \Phi_{f_{ref.}}}{I_{f_{ref.}}} \right) x \left(\frac{1 - 10^{-A_{ref.}}}{1 - 10^{-A_{sonda}}} \right)$$

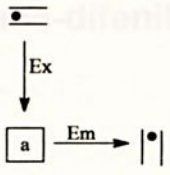
Os valores do rendimento quântico de fluorescência conhecidos das referências trans-difenilpolienos em metilciclohexano (MCH) e ciclohexano (CH), que foram utilizados como padrão a 25°C para determinação do ($\Phi_{f\ sonda}$) são: **ts**/$_{MCH}\Phi_f$ = 0,05; **DPB**/$_{CH}\Phi_f \cong$ 0,44; **DPH**/$_{CH}\Phi_f \cong$ 0,80.[6]

3.9. Anisotropia (r)

O preparo das soluções vesícula/sonda é o mesmo utilizado na determinação do Φ_f. No início da medida de polarização de fluorescência, a temperatura é de 15°C variando em cada medida 5°C até atingir 65°C, não importando a temperatura de transição de fase da vesícula (Tc). As condições do aparelho Hitachi-F4500 são as mesmas utilizadas na determinação do Φ_f. Utilizou-se somente as lentes polarizadoras.

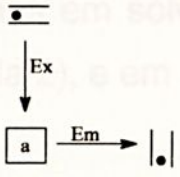
- Posição dos polarizadores adaptados ao aparelho Hitachi F4500:

VV→ corresponde a Vertical/Vertical

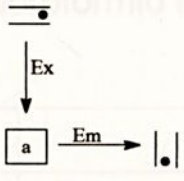


a = amostra; Ex = excitação; Em = emissão

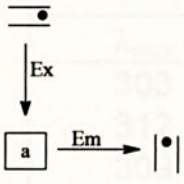
VH → corresponde a Vertical/Horizontal



HH → corresponde a Horizontal/Horizontal



HV → corresponde a Horizontal/Vertical



onde: VV= $i_{//}$ (Intensidade paralelas $90^{o}_{EX}/90^{o}_{Em}$);

VH = $i_{\perp}$ (Intensidade perpendiculares $90^{o}_{EX}/0^{o}_{Em}$);

HH = $I_{//}$ (Intensidade paralelas $0^{o}_{EX}/0^{o}_{Em}$);

HV = $I_{\perp}$ (Intensidade perpendiculares $0^{o}_{EX}/90^{o}_{Em}$).

Para obtenção das curvas de anisotropia (**r**) x temperatura foram calculados a polarização e anisotropia de fluorescência utilizando as equações 12 e10 (item 1.8.).

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Propriedades espectroscópicas das sondas sintetizadas derivadas dos trans-difenilpolienos

As características espectroscópicas das moléculas trans-difenilpolienos em solventes orgânicos clorofórmio ($CHC\ell_3$) e ciclohexano (CH) (Tabela 2), e em vesículas DMPC, DPPC e DSPC (Tabela 3).

Tabela 2. Características espectroscópicas das sondas em solventes orgânicos clorofórmio e ciclohexano (T=25°C):

Sonda	Solventes				
	$CHC\ell_3$		CH		
	λ_{max}	E_{max}	λ_{max}	E_{max}	Φ_f
S1A	303	382	304	390	0,0104
4S1A	312	395	306	382	0,011
8S1A	309	398	319	388	0,026
TDS	315	360	312	358	0,071
TDB	337	386	334	383	0,798
DPBA	334	411	346	401	0,221
B4A	337	387	334	384	0,766

Os dados espectroscópicos de comprimento de onda máximo (λ_{max}) de absorção foram utilizados como excitação para obtenção dos espectros de emissão de fluorescência (E_{max}). São apresentadas nas Figuras:15,16,17 e 18 as imagens especulares dos espectros de absorção e emissão de fluorescência das sondas 8S1A, TDS, TDB e B4A.

Verificou-se que em solventes orgânicos com baixa polaridade[b] não ocorre muita variação no deslocamento do comprimento de onda máximo (λ_{max}), com exceção de 4S1A, 8S1A e DPBA, sabendo-se que estes deslocamentos estão dentro do padrão teórico.[50]

O rendimento quântico das sondas (Φ_f) em ciclohexano (CH) é dado como referência por ser este um solvente orgânico apolar e de alta viscosidade, diferente da viscosidade da água a 25°C. Estas sondas derivadas dos trans-difenilpolienos demonstraram bom Φ_f, devido ao movimento de difusão das moléculas ser menor nestes solventes a baixas temperaturas, pois ocorrem maiores interações (Forças de van der Waals) dipolo induzido resultando uma atração fraca entre as cadeias alquílicas.

O espectro de absorção e emissão de fluorescência da sonda 8S1A (Fig. 15) derivada do trans-estilbeno é menos resolvido e não tão intenso quanto para as moléculas apolares TDS e TDB (Fig.16 e 17), demonstrando que o grupo carboxílico, por estar ligado na posição para do fenil e sendo receptor de elétron, desloca as duplas pelo efeito da ressônancia, diminuindo a densidade eletrônica no estilbeno.[50]

No espectro de B4A (Fig.18), o efeito do grupo carboxílico fica neutralizado (diminuído), pois este não está ligado diretamente ao trans-difenilbutadieno. O grupo ligado na posição para do anel é um carboxi-n-propil (item 3.3 estrutura molecular 7), resultando um espectro mais resolvido do que no caso da sonda 8S1A.[50]

Este aumento da intensidade de fluorescência da sonda B4A também provém do acréscimo na adição de duplas (n=2), aproximando os orbitais π e π^* diminuido a energia de transição eletrônica.

As curvas a e b do Φ_f x temperatura (Fig.19) demonstram

---

[b] Constante dielétrica: E_{CH}=2,015, E_{CHCl3}=4,8o6 e E_{H2O}=78,54

Viscosidade: (20°C) η_{CH}=68,66 cp, (25°C) η_{CHCl3}=13,542 cp e (25°C) η_{H2O}=0,8904 cp.[30]

claramente que não há interação com o sistema homogêneo (em solvente ciclohexano), com o decaimento constante do Φ_f, as sondas estão livres para interconversão trans à cis (isomerização).

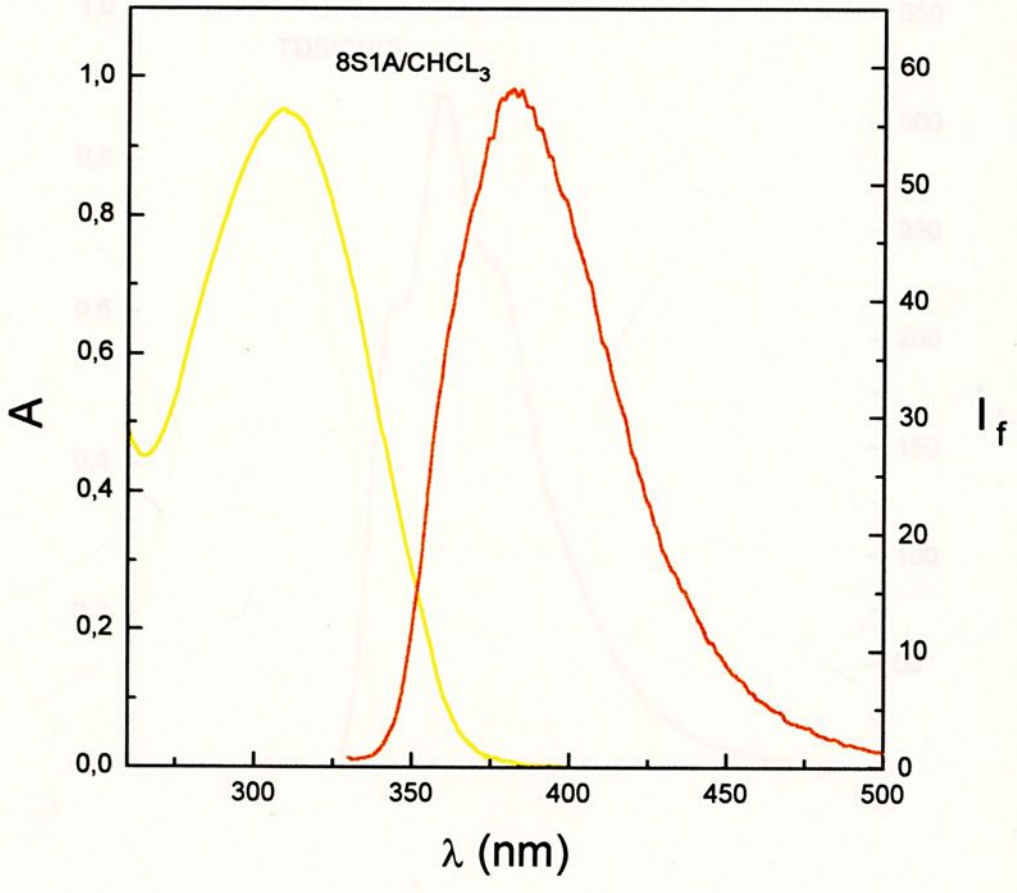


Figura -15 Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda 8S1A em clorofórmio.

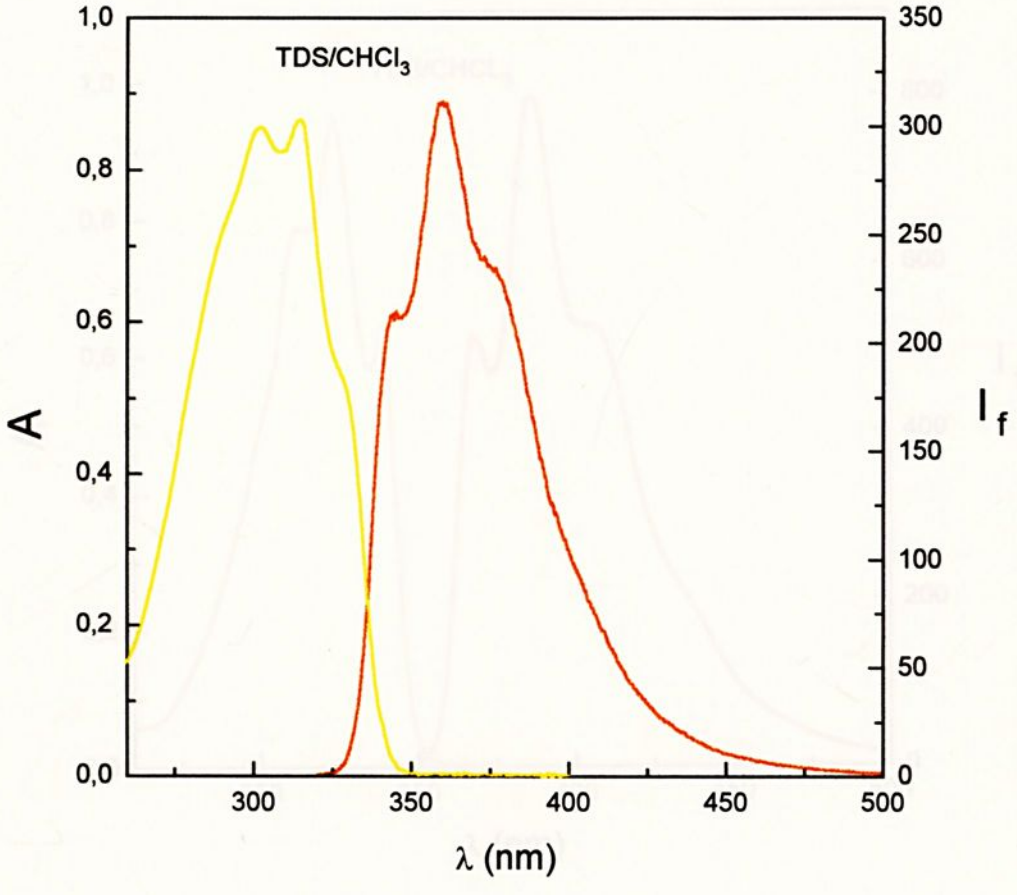


Figura - 16 Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda TDS em clorofórmio.

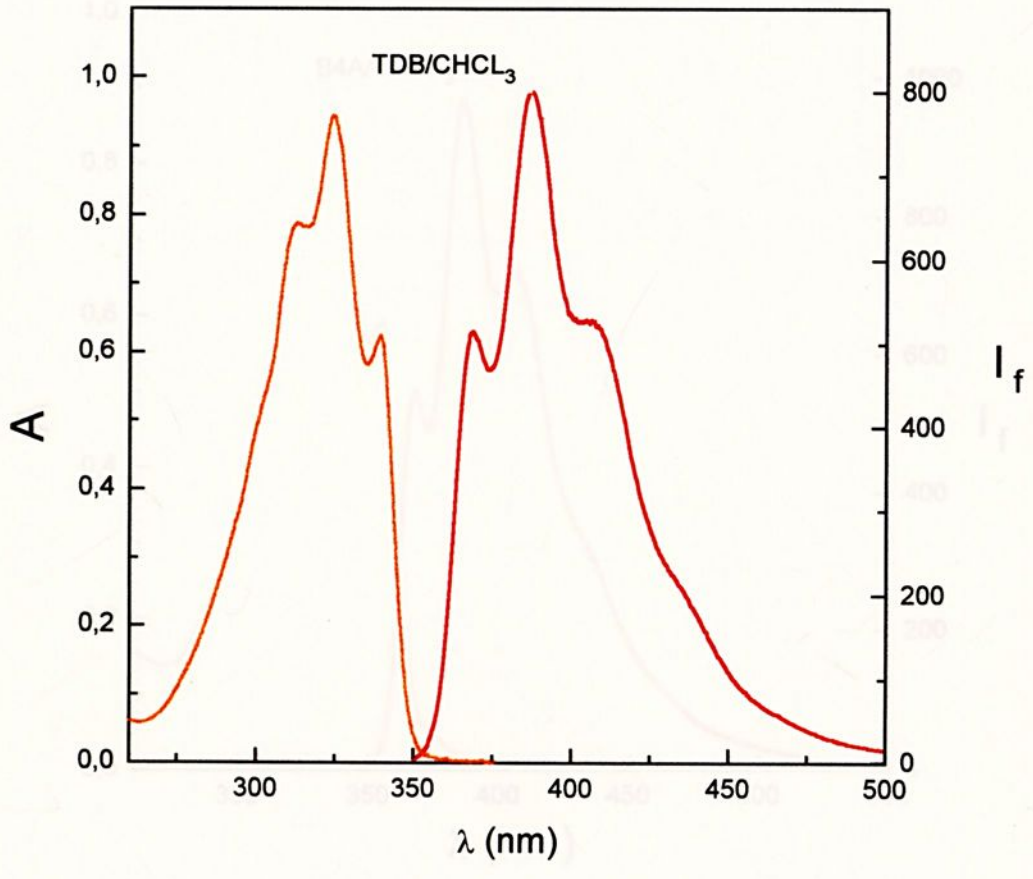


Figura - 17 Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda TDB em clorofórmio.

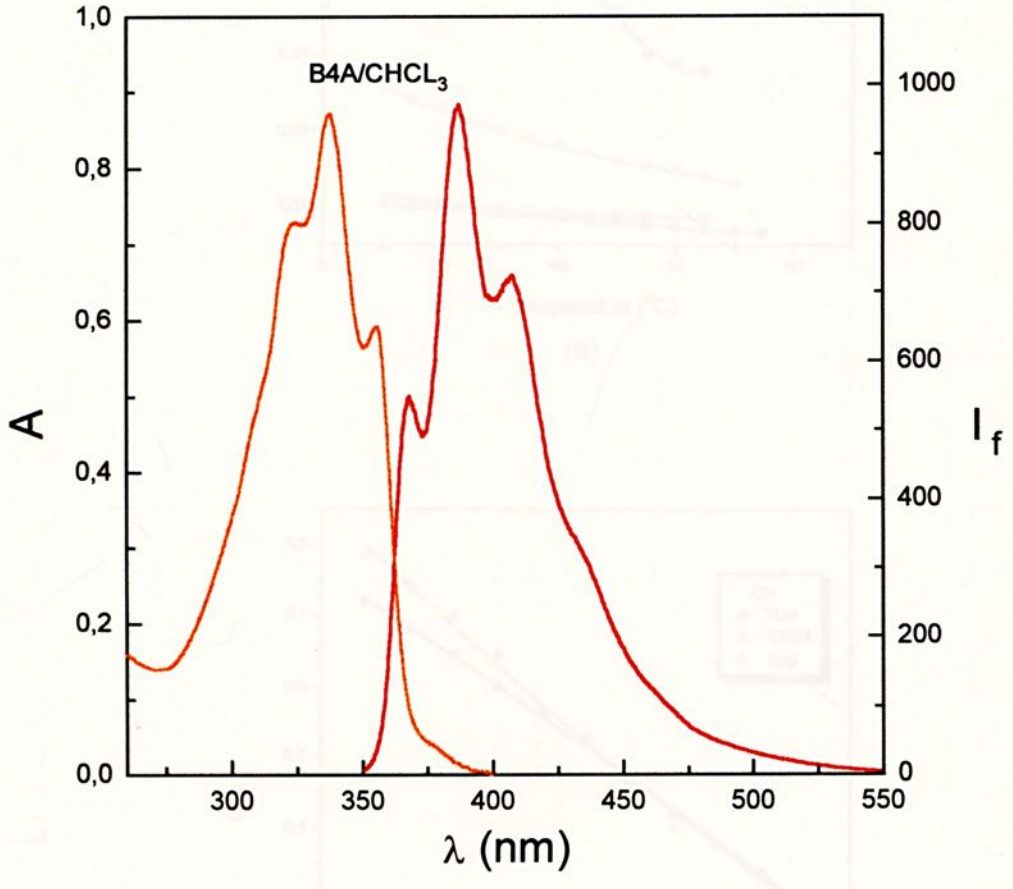
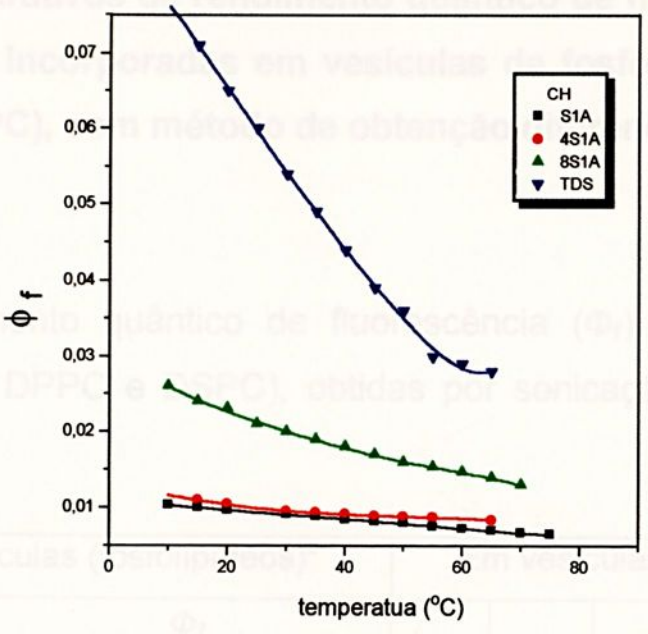
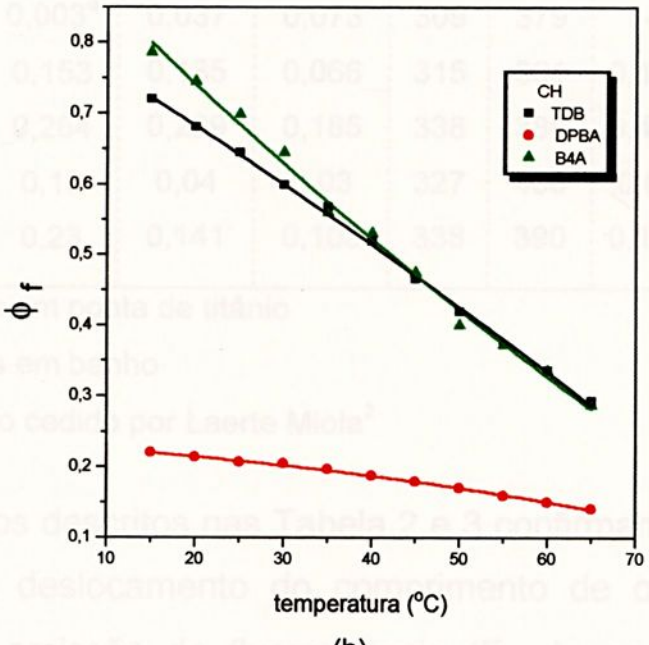


Figura - 18 Espectros de absorção e emissão de fluorescência da sonda B4A em clorofórmio.



(a)



(b)

Figura -19 Rendimento quântico de fluorecência x temperatura das sondas S1A, 4S1A, 8S1A e TDS (a) ; TDB, DPBA eB4A (b) em solvente ciclohexano.

4.2. Dados comparativos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) das sondas incorporadas em vesículas de fosfolipídeos (DMPC, DPPC e DSPC), com método de obtenção diferenciados

Tabela 3. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) das sondas em vesículas (DMPC, DPPC e DSPC), obtidas por sonicação com ponta de titânio e banho:

Sonda	Em vesículas (fosfolipídeos)[c]					Em vesículas (fosfolipídeos)[d]				
			Φ_f					Φ_f		
	λ_{max}	E_{max}	DMPC	DPPC	DSPC	λ_{max}	E_{max}	DMPC	DPPC	DSPC
S1A	295	370	0,01	0,01	0,004	295	370	0,01	0,0062	0,0032
4S1A	305	380	0,01	0,082	0,044	305	380	0,067	0,061	0,041
8S1A	309	378	0,003[d]	0,037	0,073	309	379	-	0,017	0,039
TDS	315	360	0,153	0,135	0,066	315	361	0,192	0,09	0,06
TDB	338	387	0,264	0,229	0,185	338	388	0,422	0,52	0,141
DPBA	340	392	0,13	0,04	0,03	327	400	0,01	0,0122	0,016
B4A	338	388	0,23	0,141	0,103	338	390	0,114	0,134	0,064

[c]Vesículas sonicadas em ponta de titânio

[d]Vesículas sonicadas em banho

[e]Rendimento quântico cedido por Laerte Miola[2]

Os dados descritos nas Tabela 2 e 3 confirmam que não ocorre muita variação no deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) e emissão de fluorescência (E_{max}), ao modificar o seu microambiente em solventes orgânicos ou em vesículas, exceto com a sonda DPBA (Fig.25).

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) varia em função do tamanho da cadeia acila dos fosfolipídeos que são utilizados na obtenção das vesículas, para uma determinada concentração de sonda[22]. Neste

trabalho, fixou-se as concentrações das sondas (10^{-5}M) e vesículas (10^{-4}M), e verificou-se que, para métodos diferentes de obtenção das vesículas unilamelares pequenas (SUVs), (quando sonicadas em ponta de titânio e sonicadas em banho) estas não alteram muito o comportamento das sondas, tendo alguns dados diferenciados das outras sondas como os das sondas 8S1A e DPBA em relação ao Φ_f em função da temperatura.

A partir destes experimentos, para a maioria das sondas, Φ_f diminui com o aumento da cadeia hidrocarbônica dos fosfolipídeos que formam as vesículas. Possivelmente, deve ocorrer maior flexibilidade nas cadeias hidrocarbônicas das vesículas (porque diminui a microviscosidade) e as sondas, quando incorporadas, têm livre rotação no estado excitado de trans para cis, havendo um decréscimo do Φ_f.

As sondas apolares TDS (Fig.23) e TDB (Fig.24) independentes do tamanho de suas cadeias hidrofóbicas como a sonda TDS que deriva do trans-estilbeno e a sonda que deriva do trans-difenilbutadieno (DPB), têm maiores Φ_f do que as sondas polares que são derivadas destes mesmos cromóforos, reforçando que a solubilidade destas sondas apolares são maiores nas bicamadas das vesículas (encontram-se no interior da vesícula entre as bicamadas). Estas sondas, provavelmente, mantém as conformações dos fosfolipídeos que formam as vesículas e as próprias sondas mais estendidas, aumentando a microviscosidade do sistema e tornando mais ordenado o microambiente onde elas se encontram[15]. Mantendo suas conformações em trans no estado excitado, maior será sua intensidade de fluorescência, e consequente aumento do Φ_f quando se encontra no estado rígido, sendo que acima de Tc com abertura da vesícula (estado de transição de fase líquido-cristalino) há um decréscimo brusco do Φ_f a sonda encotra-se livre para isomerizar.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - S. J. Rio Preto - BIBLIOTECA

Para as sondas polares como a S1A, 4S1A e 8S1A, derivadas do estilbeno (tS), os Φ_f são menores porque elas estão ligadas a grupos carboxílicos na posição para do fenil do cromóforo estilbeno e estes, por serem receptores de elétrons, deslocam as duplas pelo efeito da ressonância, diminuindo a intensidade de fluorescência e o Φ_f [50].

As sondas 4S1A e 8S1A, por terem cadeias hidrofóbicas maiores (grupos: 4n-propil e 4n-octil ligados ao trans-estilbeno), aumentam as interações com as cadeias hidrocarbônicas das vesículas (Fig. 21 e 22). As curvas do Φ_f, em função da temperatura, demonstram um aumento do Φ_f e, próximo à Tc, perto da pré-transição aproximadamente a 5 °C abaixo da Tc principal, há um decréscimo do Φ_f , provavelmente o início da abertura das moléculas dos fosfolipídeos.

Para a sonda S1A, há um decréscimo contínuo do Φ_f (Fig.20). A sonda encontra-se na interface da vesícula. A abertura da vesícula é mais pronunciada ao aumentar a temperatura contribuindo para a sonda isomerizar-se, ficando livre para a interconversão trans→cis. A rotação que envolve a ligação dupla entre carbono carbono é maior no cromóforo trans-estilbeno, e mais intensa é a interconversão de trans para cis, diminuindo a intensidade de fluorescência e, consequentemente, o Φ_f da sonda no sistema onde se encontra (viscosidade muito baixa).

A B4A é polar, mas possui cadeia hidrofóbica maior (derivada do cromóforo DPB) demonstrando maior Φ_f do que as sondas polares com cadeias hidrofóbicas menores, mas não tanto quanto a sonda apolar TDB (Fig.24), tendo como referência que a B4A se encontra interagindo com a cabeça polar (hidrofílica) do fosfolípideo da vesícula e com a cadeia hidrocarbônica (hidrofóbica) do mesmo. Acima da Tc, com aumento da temperatura, ocorre a abertura das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídeos diminuindo a microviscosidade do microambiente e,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

consequentemente, diminuindo o Φ_f, pois a B4A tem livre rotação nas ligações C=C trans,trans para cis,cis na cadeia do trans-difenilbutadieno (Fig.26).

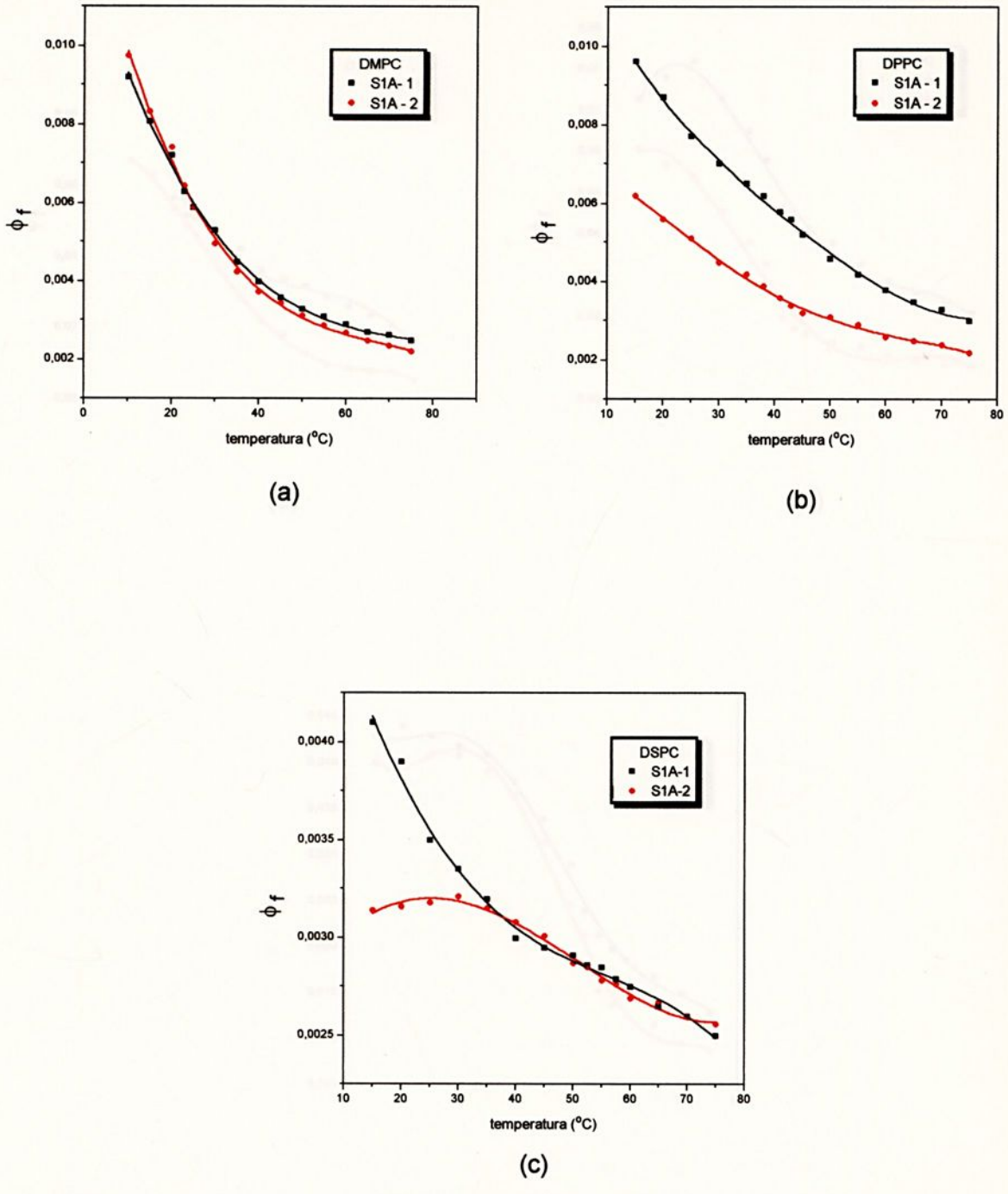
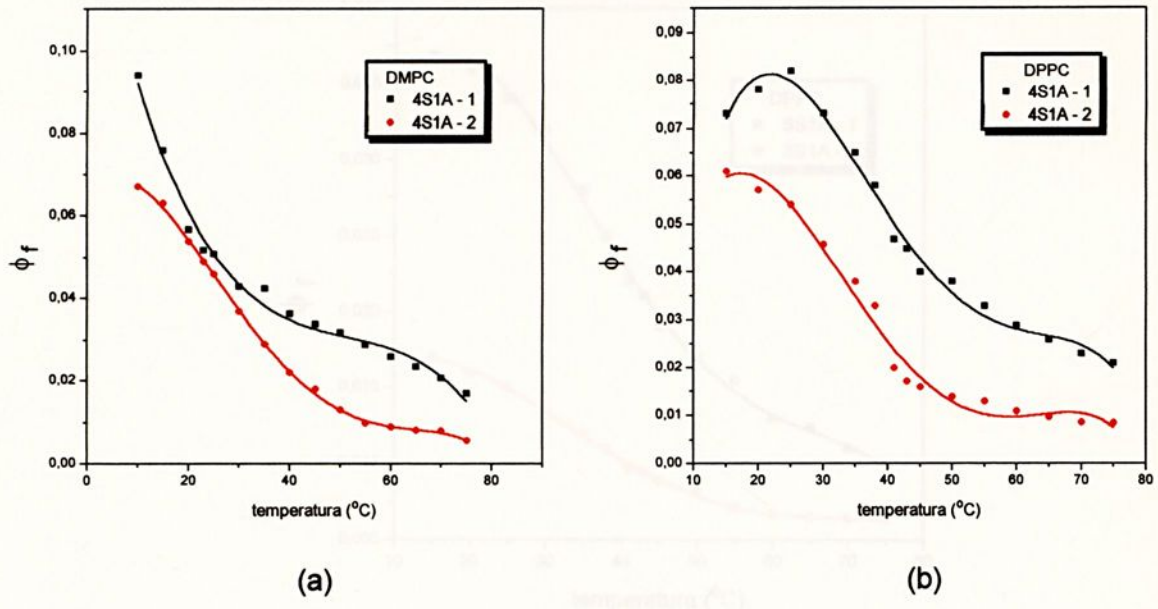


Figura - 20 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda S1A conc.10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc.10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2).



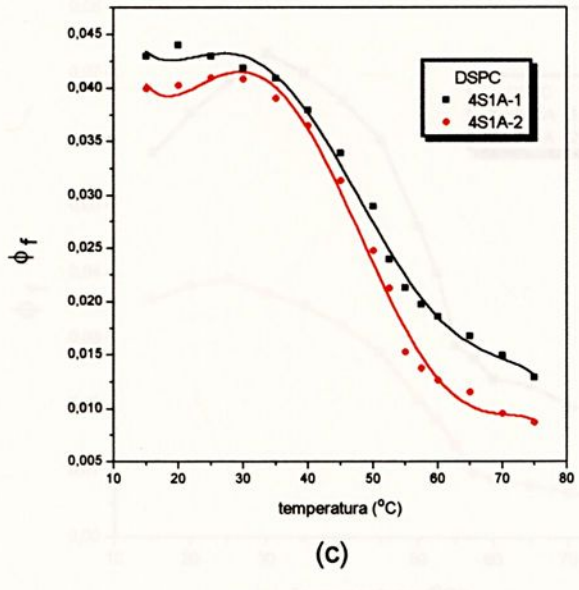
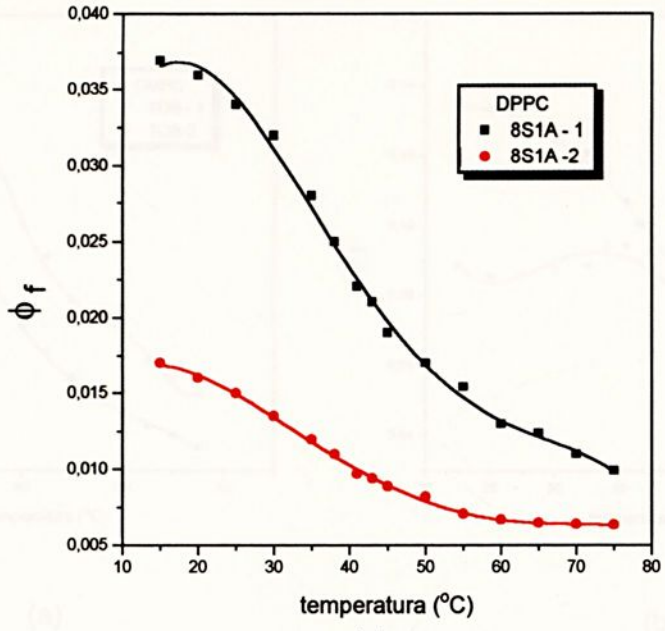
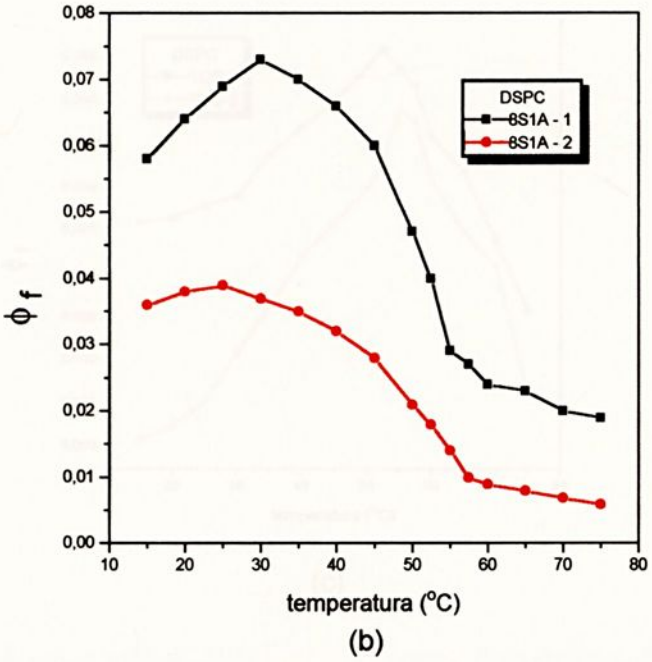


Figura - 21 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 4S1A conc.10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc.10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) sonicado em banho (2).

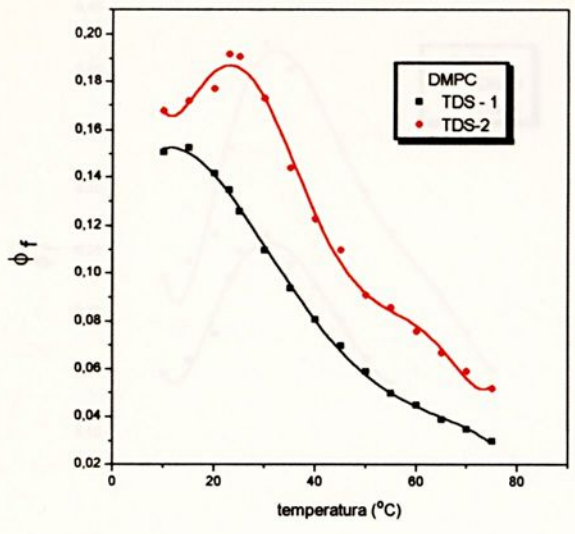


(a)

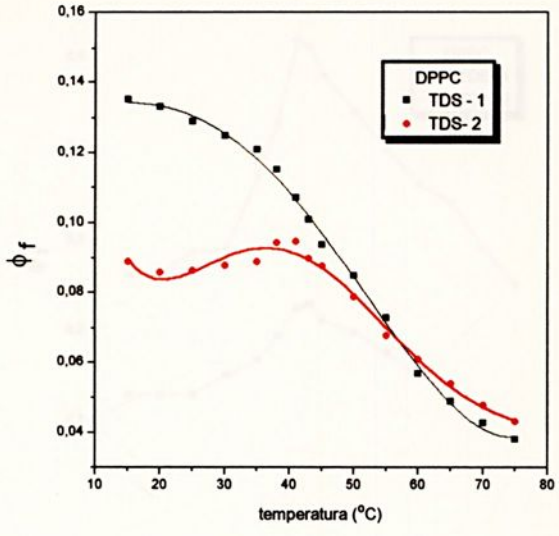


(b)

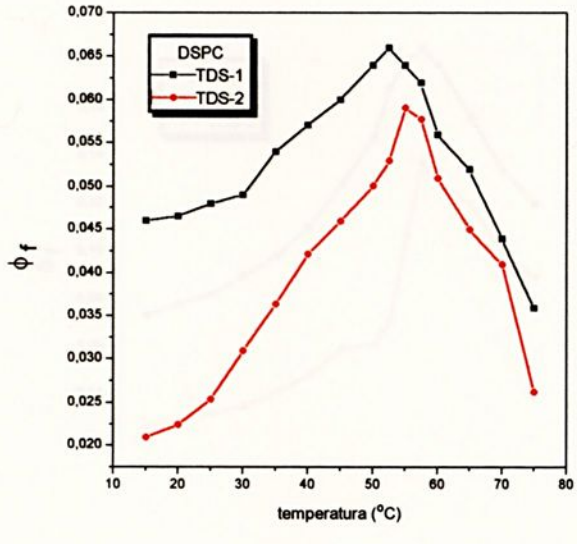
Figura - 22 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 8S1A conc.10^{-5}M em vesículas DPPC (a) e DSPC (b) conc.10^{-4}M , obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2).



(a)



(b)



(c)

Figuras - 23 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda TDS conc.10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc.10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2).

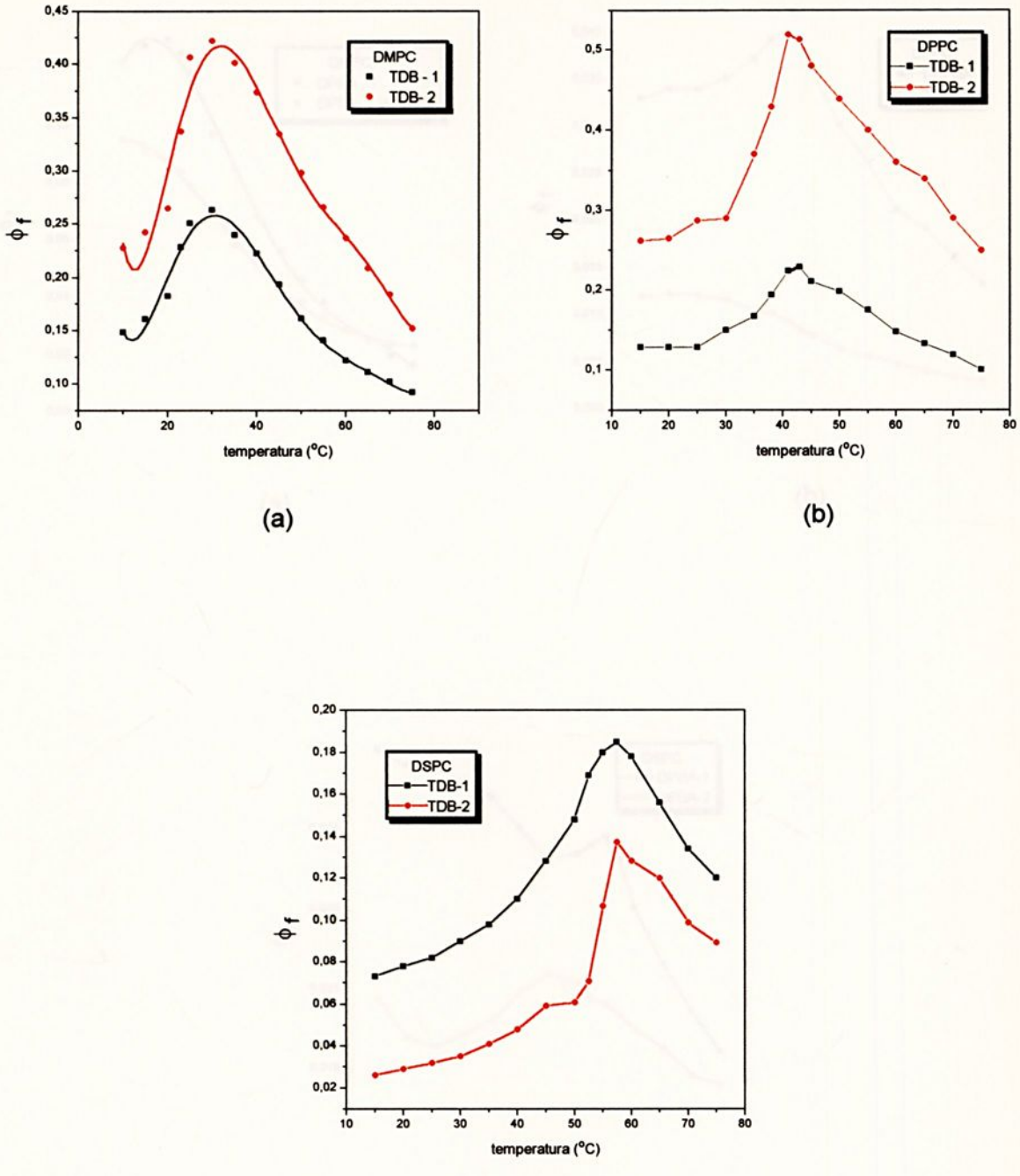
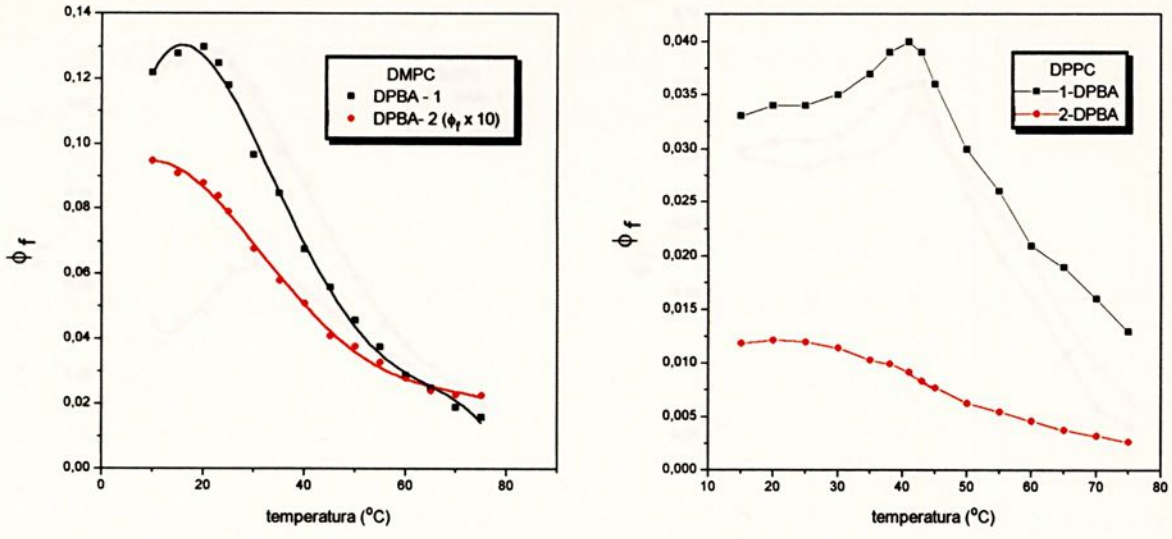


Figura - 24 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda TDB conc.10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc.10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2).



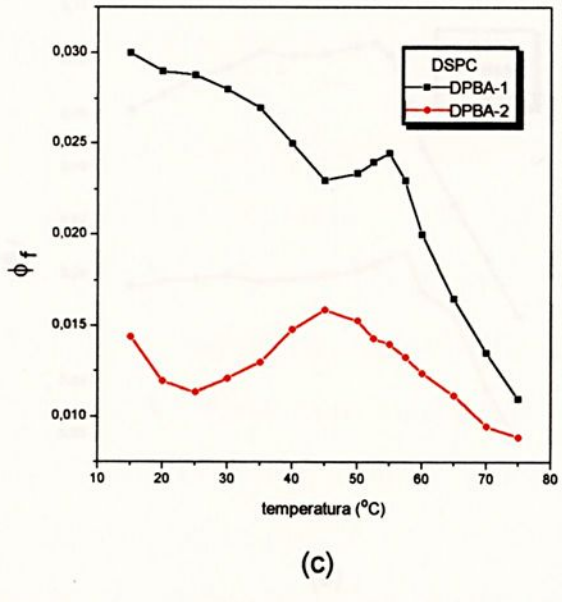
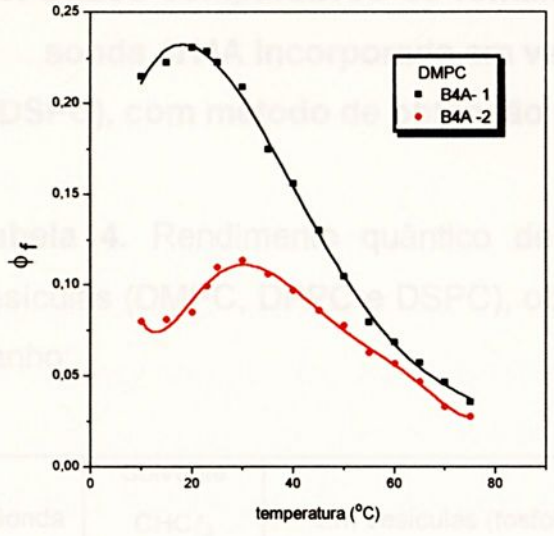
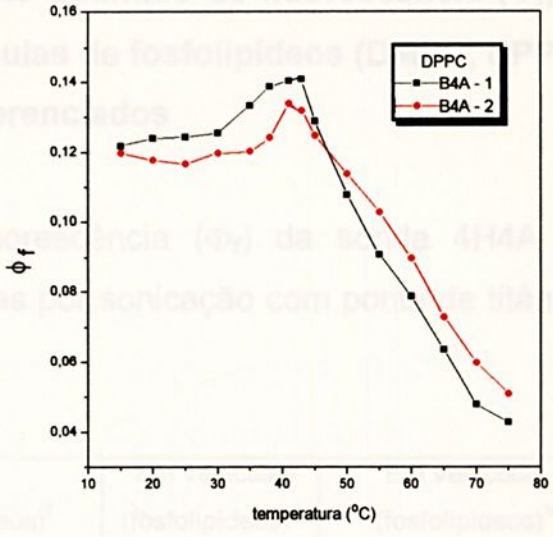


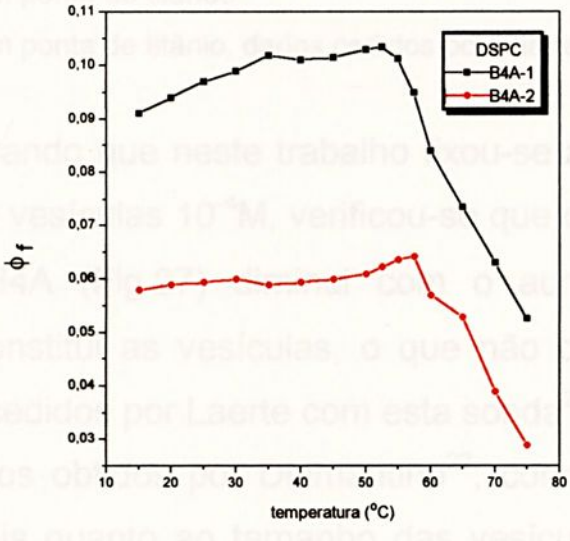
Figura - 25 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda DPBA conc.10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc.10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) sonicado em banho (2).



(a)



(a)



(c)

Figura - 26 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda B4A conc.10^{-5}M em vesículas DMPC (a), DPPC (b) e DSPC (c) conc. 10^{-4}M, obtido por dois métodos diferentes. Sonicado em ponta de titânio (1) e sonicado em banho (2).

4.3. Dados comparativos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da sonda 4H4A incorporada em vesículas de fosfolipídeos (DMPC, DPPC e DSPC), com método de obtenção diferenciados

Tabela 4. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da sonda 4H4A em vesículas (DMPC, DPPC e DSPC), obtidas por sonicação com ponta de titânio e banho:

Sonda	Solvente $CHC\ell_3$		Em vesículas (fosfolipídeos)[f]					Em vesículas (fosfolipídeos)[g]		Em vesículas (fosfolipídeos)[h]	
					Φ_f			Φ_f		Φ_f	
	λ_{max}	E_{max}	λ_{max}	E_{max}	DMPC	DPPC	DSPC	DPPC	DSPC	DPPC	DSPC
4H4A	364	436	366	434	0.664	0.47	0.46	0,55	0,49	0,68	0,841

[f] Vesículas sonicadas em banho

[g] Vesículas sonicadas em ponta de titâneo

[h] Vesículas sonicadas em ponta de titânio, dados cedidos por Laerte Miola.[2]

Reafirmando que neste trabalho fixou-se as concentrações das sondas em 10^{-5}M e vesículas 10^{-4}M, verificou-se que o rendimento quântico (Φ_f) da sonda 4H4A (Fig.27) diminui com o aumento da cadeia do fosfolipídeo que constitui as vesículas, o que não observa-se em outros trabalhos e dados cedidos por Laerte com esta sonda[2] (Fig. 28).

Os dados obtidos por Diamantino[22], correspondem com estes dados experimentais quanto ao tamanho das vesículas, mas observando que o método de obtenção das vesículas é por injeção clorofórmica, o diâmetro médio destas vesículas é bem maior (vesículas unilamelares grandes (LUVs)) ao tamanho das as obtidas por sonicação de banho e titânio (vesículas unilamelares pequenas (SUVs)).

Lentz *et. al.*[43] verificou que a sonda DPH isomeriza mais rapidamente em vesículas maiores como as grandes multilamelares (MLVs) do que em vesículas pequenas unilamelares. Talvez ocorra o mesmo para

vesículas unilamelares um pouco maiores, principalmente as que são obtidas por sonicação em banho e as de fosfolipídeos maiores como a de DSPC, aumentando a flexibilidade da cadeia hidrocarbônica entre C-C (Fig.28).

Evidentemente, deve-se considerar que com aumento da cadeia do cromóforo da sonda há um aumento da intensidade de fluorescência e, sucessivamente, do Φ_f. Sabe-se muito bem que existe uma resistência com as interações de van der Waals entre a cadeia da sonda com as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídeos e também interações diferenciadas das sondas com os sítios da vesícula.[4] Verifica-se claramente neste trabalho, que as sondas apolares demonstram maiores interações com a cadeia hidrofóbica, observando-se que, após a Tc, há um decréscimo do Φ_f devido à abertura da cadeia hidrofóbica da vesícula.

Provavelmente, com este aumento da cadeia do fosfolipídeo, aumentem as interações com as sondas que possuem maior cadeia hidrofóbica, mas proporcionam a elas maior flexibilidade para isomerizar, decorrente do aumento da espessura da bicamada fazendo com que diminua o Φ_f na ordem de DSPC<DPPC<DMPC, principalmente quando a sonda interage com a interface da vesícula como para a sonda 4H4A (polar). O aumento da movimentação dos lipídeos na bicamada da vesícula com aumento da temperatura após a Tc, evidencia a movimentação também da difusão "basculante" através da bicamada.[42]

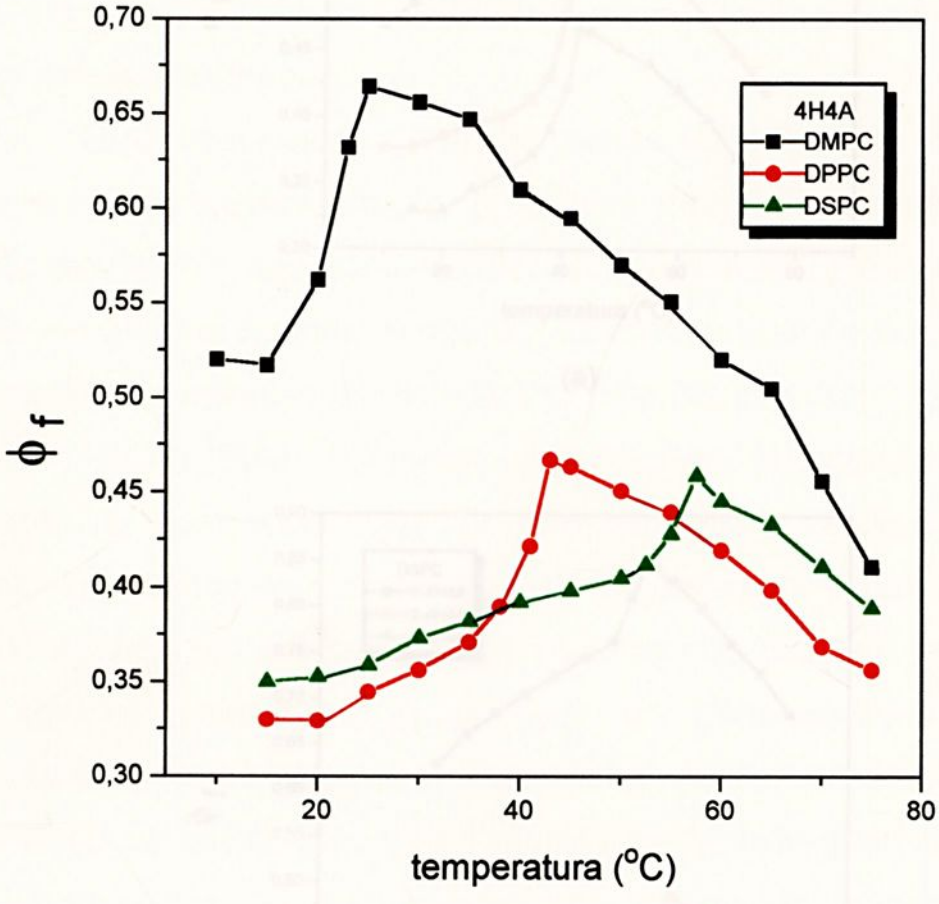
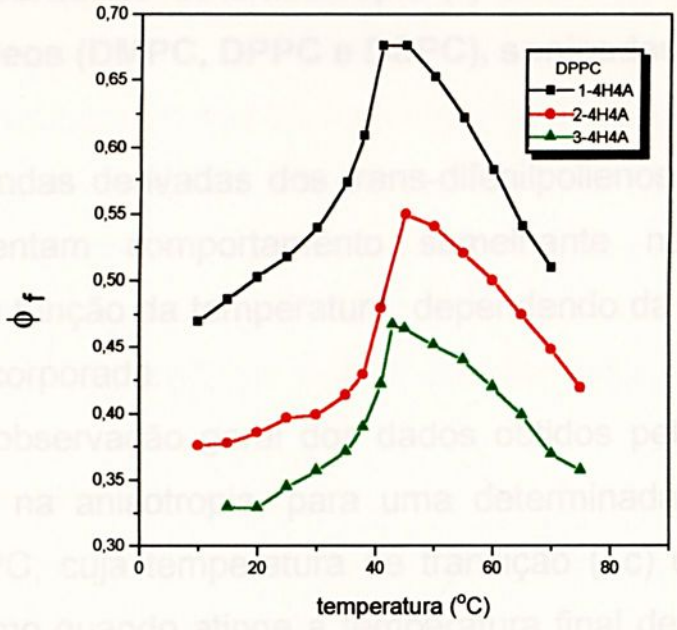
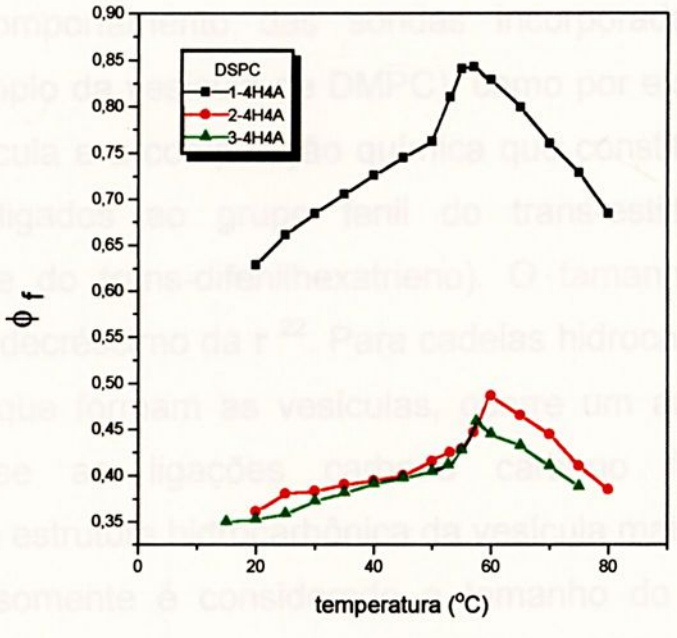


Figura - 27 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 4H4A conc.10^{-5}M em vesículas DMPC, DPPC e DSPC conc.10^{-4}M (sonicado em banho).



(a)



(b)

Figuras - 28 Rendimento quântico de fluorescência x temperatura da sonda 4H4A conc.10^{-5}M em vesículas DPPC (a) e DSPC (b) conc.10^{-4}M. Sonicado em ponta de titânio[2], sonicado em ponta de titânio (2) e sonicado em banho (3).

4.4. Dados comparativos de anisotropia (r) das sondas em vesículas de fosfolipídeos (DMPC, DPPC e DSPC), sonicadas em banho

As sondas derivadas dos trans-difenilpolienos na presença de vesículas apresentam comportamento semelhante nas medidas de anisotropia (**r**) em função da temperatura, dependendo da vesícula em que a sonda esteja incorporada.

Uma observação geral dos dados obtidos pelos experimentos espectroscópicos na anisotropia, para uma determinada vesícula (como exemplo de DMPC, cuja temperatura de transição (Tc) é 23°C) é que o valor de **r** é mínimo quando atinge a temperatura final de 65°C, menor do que para outras vesículas DPPC e DSPC (Fig.30, 31 e 32).

Foram feitas algumas observações importantes quanto à localização e comportamento das sondas incorporadas às vesículas (seguindo o exemplo da vesícula de DMPC), como por exemplo quanto ao tamanho da vesícula e a composição química que constitui a estrutura da sonda (grupos ligados ao grupo fenil do trans-estilbeno, do trans-difenilbutadieno e do trans-difenilhexatrieno). O tamanho das vesículas também influi no decréscimo da **r** [22]. Para cadeias hidrocarbônicas maiores de fosfolipídeos que formam as vesículas, ocorre um aumento na Tc e, principalmente se as ligações carbono carbono forem saturadas proporcionando à estrutura hidrocarbônica da vesícula maior flexibilidade.

Não somente é considerado o tamanho do fosfolipídeo que forma a vesícula, mas também a sonda à qual está incorporada. Se a sonda tem cabeça polar, como S1A, 4S1A e 8S1A, o valor de **r** tende a ser maior na temperatura final, mas se a sonda for apolar, ela se voltará para dentro da vesícula no interior da bicamada (região hidrofóbica), apresentando assim valores de **r** menores. Este último comportamento ocorre com as sondas TDS e TDB, mas não são observadas grandes

unesp

variações no decréscimo dos valores de **r** a elevadas temperatura relacionadas ao aumento do tamanho das vesículas DPPC e DSPC.

A anisotropia (**r**) nos permite medir a emissão de fluorescência da luz polarizada e despolarizada em relação à movimentação da rotação conformacional da estrutura química da sonda, a qual está intrinsecamente ligada com a rigidez e fluidez do sistema, permitindo determinar a posição da sonda quando incorporada no interior da bicamada ou na interface da vesícula.

Como demonstram as curvas de **r**, as sondas apolares, quanto menor a sua cadeia, mais livre é a rotação da sonda no interior da bicamada da vesícula, principalmente porque as cadeias hidrocarbônicas da vesícula são constituídas por carbonos saturados, possuem livre rotação entre carbono carbono (aumentando a fluidez após a Tc, possivelmente uma difusão não só lateral como a difusão "basculante" de um para o outro lado da bicamada da vesícula[37]), facilitando a livre rotação (isomerização) da sonda apolar.

Pesquisas confirmaram que a sonda DPH (apolar) em relação a outras sondas que possuem este cromóforo mas são polares, estas têm valores de **r** maiores em relação à sonda DPH. Afirmaram que a sonda DPH tem livre rotação na bicamada da vesícula, semelhante à rotação isotrópica.[1,2,4,22,61]

Para as sondas polares, verificou-se que os valores de **r** em temperaturas finais são apenas um pouco maiores do que para o caso anterior, indicando que a sonda está interagindo com a cabeça polar da vesícula (interface), desfavorecendo o grau de liberdade de rotação das moléculas derivadas dos difenil polienos (representados nas Fig. 30, 31 e 32).

A anisotropia (**r**), em função da temperatura (Fig.29) das sondas 4S1A, TDS, TDB, DPBA e B4A em solvente ciclohexano $(CH)^i$,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

mostra que seus valores são praticamente constantes, quase lineares. O sistema não é ordenado em meio homogênio (solvente orgânico) como para vesículas, as interações são menores, principalmente com o aumento da temperatura (viscosidade muito baixa), a difusão das moléculas aumenta e as sondas estão livres para a interconversão trans a cis.

Figura - 29 Anisotropia x temperatura das sondas 4S1A, TDS, TDB, DPBA e DAA em diclorobenzeno.

[f]Este mesmo experimento já foi citado anteriormente, para as sondas S1A e 8S1A.[47]

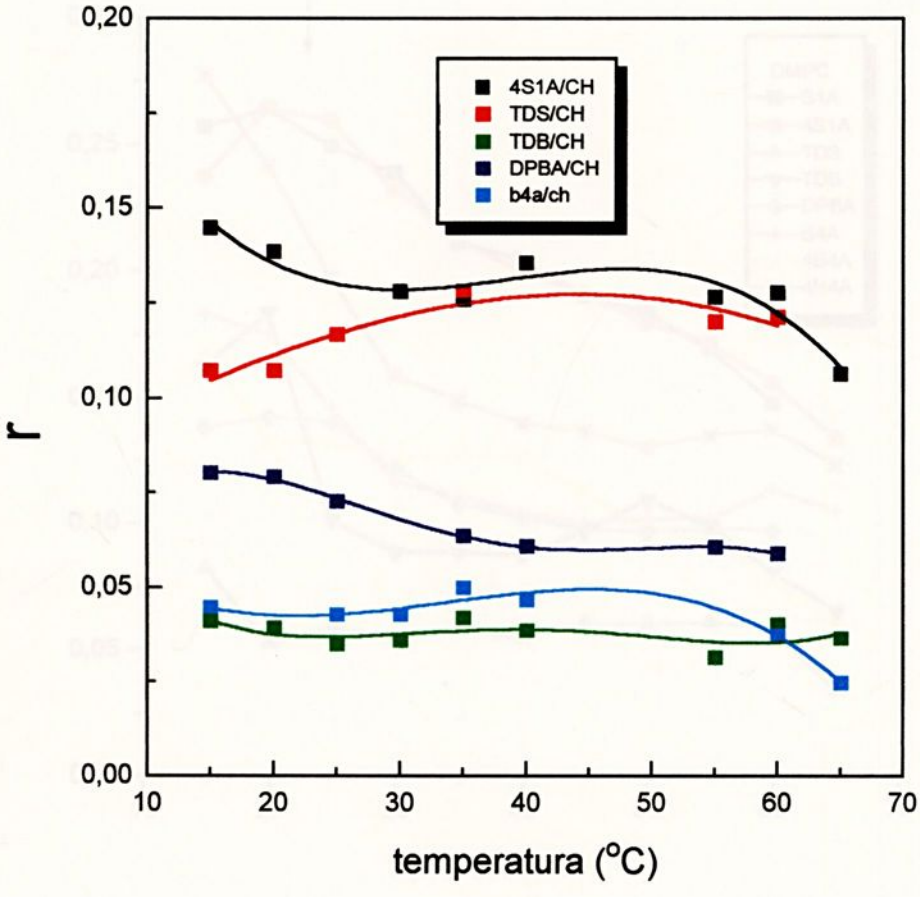


Figura - 29 Anisotropia x temperatura das sondas 4S1A, TDS, TDB, DPBA e B4A em ciclohexano.

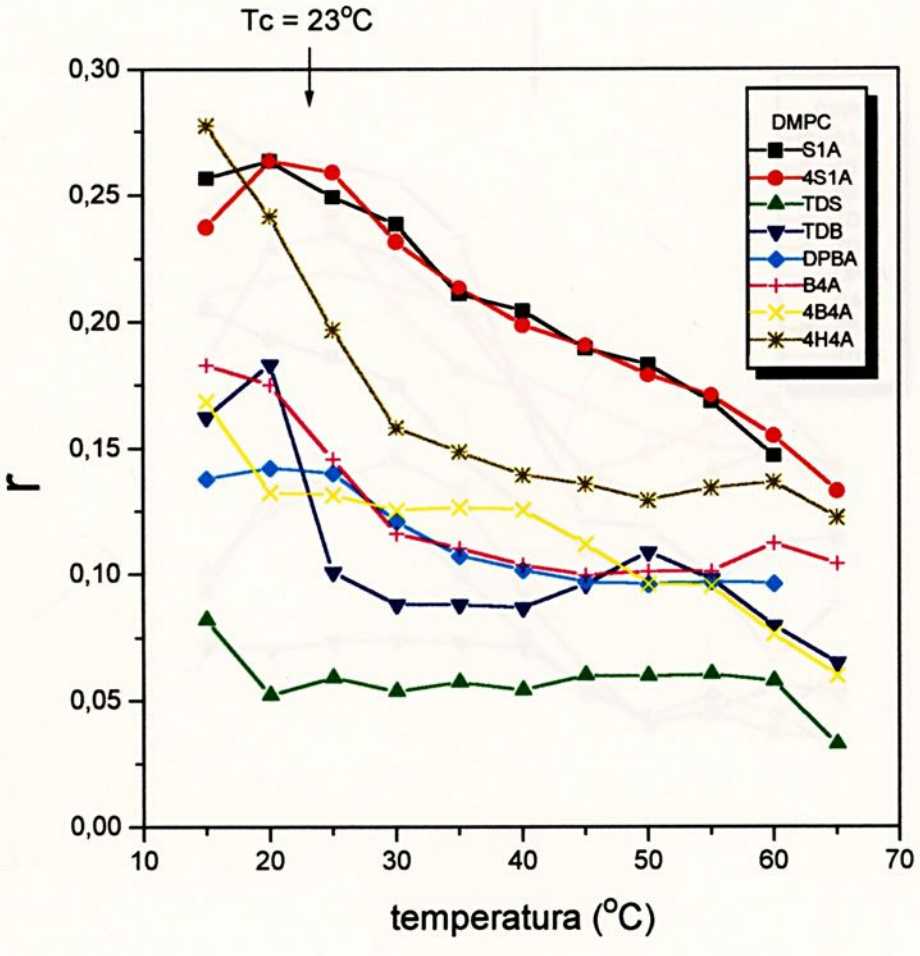


Figura - 30 Anisotropia x temperatura para diferentes sondas conc.10^{-5}M em vesícula DMPC conc.10^{-4}M.

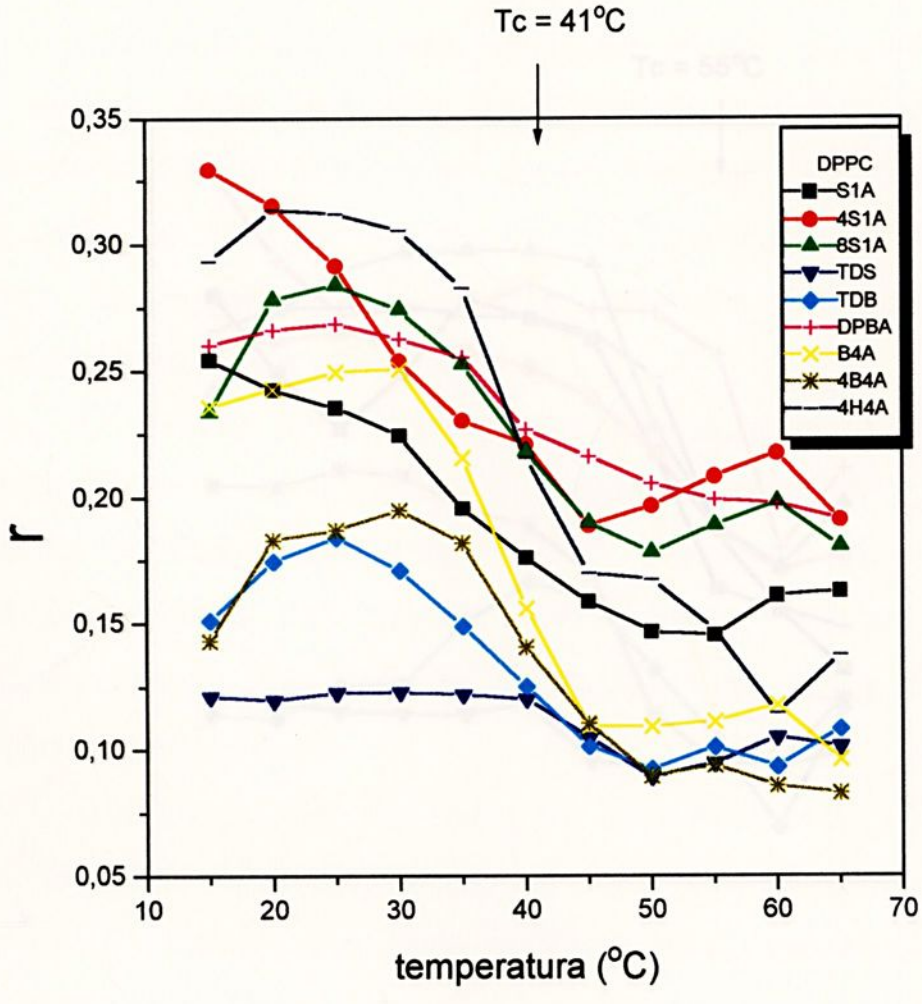


Figura -31 Anisotropia x temperatura para diferentes sondas conc.10^{-5}M em vesícula DPPC conc.10^{-4}M.

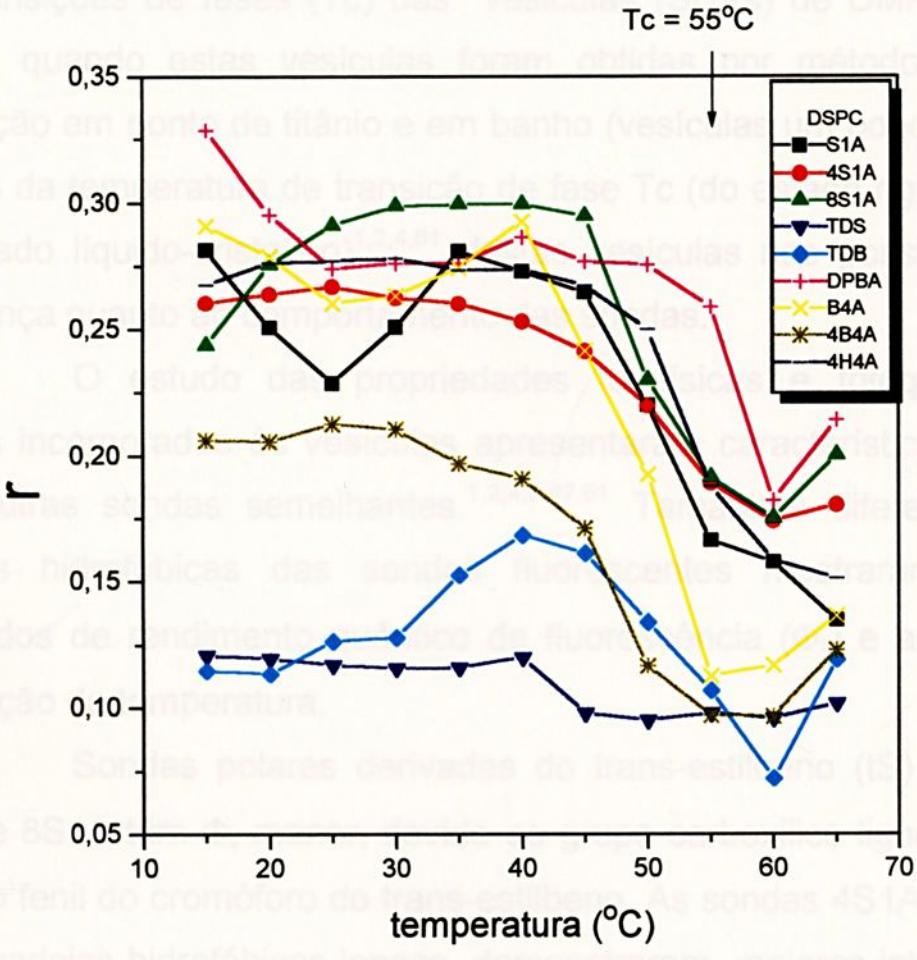


Figura -32 Anisotropia x temperatura para diferentes sondas conc.10^{-5}M em vesícula DSPC conc.10^{-4}M.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram que ocorrem poucas variações nas transições de fases (Tc) das vesículas (SUVs) de DMPC, DPPC, e DSPC, quando estas vesículas foram obtidas por métodos diferentes: sonicação em ponta de titânio e em banho (vesículas um pouco maior). Os valores da temperatura de transição de fase Tc (do estado rígido ordenado ao estado líquido-cristalino)[1,2,4,61] destas vesículas nos possibilitou maior segurança quanto ao comportamento das sondas.

O estudo das propriedades fotofísicas e fotoquímicas das sondas incorporadas às vesículas apresentaram características parecidas com outras sondas semelhantes.[1,2,4,6,47,61] Tamanhos diferenciados das cadeias hidrofóbicas das sondas fluorescentes mostraram diferentes resultados de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e anisotropia (**r**) em função da temperatura.

Sondas polares derivadas do trans-estilbeno (tS) como: S1A, 4S1A e 8S1A têm Φ_f menor, devido ao grupo carboxílico ligado à posição para do fenil do cromóforo do trans-estilbeno. As sondas 4S1A e 8S1A, por terem cadeias hidrofóbicas longas, demonstraram maiores interações com a interface das vesículas (Fig. 21 e 22), mas para a sonda S1A a interação foi pequena, considerando-se que sua cadeia hidrofóbica é menor, e que com a abertura da vesícula, a dinâmica de isomerização aumenta. Demonstrado na (Fig.20) o decréscimo contínuo do Φ_f, comportamento semelhante quando se encontra em ciclohexano (CH), cuja viscosidade é bem menor (Fig.19a) e a interconversão de trans para cis é mais efetiva.

Para TDS, também derivada do tS, mas apolar, houve total incorporação na vesícula, por ter maior afinidade com a bicamada e apresentou comportamento diferente das sondas polares. Há um

impedimento maior do microambiente (mais viscoso), e a sonda mantém a conformação trans aumentando a fluorescência e consequentemente o Φ_f, e, acima da Tc, com altas temperaturas, ocorre um decréscimo brusco do Φ_f.

As sondas derivadas do trans-difenilbutadieno (DPB) possuem maior Φ_f, por apresentarem dois carbonos a mais na cadeia insaturada do cromóforo, e estes aumentam a coplanaridade, diminuindo a energia de transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ e aumentando o Φ_f em função do aumento da intensidade de fluorescência. Algumas sondas são polares como a DPBA e B4A, as quais se encontraram na interface da vesícula interagindo com a cabeça polar (hidrofílica) dos fosfolipídeos que formam a bicamada das vesículas, e possuem maior Φ_f em relação às sondas polares derivadas do tS.

A sonda TDB, por ser apolar, tem maior interação hidrofóbica com a bicamada da vesícula, do que a sonda TDS (cadeia menor). O Φ_f é maior e a curva do Φ_f (Fig.24) é bem definida antes da Tc da vesícula em que se encontrou incorporada e acima da Tc há um decréscimo do Φ_f, quando ocorre abertura das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídeos, diminuindo a microviscosidade do microambiente e favorecendo a mudança da conformação trans para cis da sonda TDB, diminuindo também a intensidade de fluorescência e, sucessivamente o Φ_f. Dois processos contribuem para diminuir o Φ_f: a reação fotoquímica e a vibração na molécula em meio menos viscoso.

Observou-se que os valores de anisotropia (**r**) para as sondas polares são maiores em relação as sondas apolares (TDS eTDB), estas sondas demonstraram comportmento isotrópico, confirmando que elas estavam no interior bicamada da vesícula e as sondas polares na interface da vesícula, comportamento semelhante de outras sondas.[2,22]

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, M.T., **Studies of the solubility and reactivity of diphelnylpolyene chromophores in homogeneous and heterogeneous media**, Thesis Doctor of Philosophy, supervised by Professor David G. Whitten, Department of Chemistry, University of Rochester, New York, 1988.

2. ALLEN, M.T., MIOLA, L. and WHITTEN, D.G., **Host-guest interactions: a fluorescence investigation of the solubilization of diphenylpolyene solute molecules in lipid bilayers,** *J. Am. Chem. Soc.,* **110**, p. 3198-3206, Rochester, New York, 1988.

3. ALLEN, M.T., MIOLA, L. and WHITTEN, D.G, **Temperature effects on fluorescence in diphenyl polyene derivatives; structure-and substituent-dependent changes in mechanisms and rates for nonradiative decay**, *J. Phys.Chem.,* **91**, p. 6099-6102, Rochester, New York, 1987.

4. ALLEN, M.T., MIOLA, L., SHIN, D.M., SUDABBY, B.R. and WHITTEN, D.G., **Solubilization sites in phospholipid bilayers: studies with photochemically reactive probes**, *J. Membr. Sci.,* **33**, p. 201-219, Rochester, New York, 1987.

5. ALLEN, M.T. and WITTEN, D.G., **The photophysics and photochemistry of α,ϖ-diphenylpoliene singlet states**, *Chem. Rev.,* **89**, p. 1691-1702, Rochester, New York, 1989.

6. ALLEN, M.T., MIOLA, L., SUDDABY, B.R. and WHITTEN, D.G., **Fluorescent stilbene, diene and triene surfactants as probes of reactivity in**

amylose inclusion complexes, *Tetrahedron.,* **43**, p. 1477-1484, Rochester, New York, 1987.

7. ALLEN, T.M., HANSEN, C., MARTIN, F., REDEMAN, C. and YOUNG, Y., **Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo**, *Biochem. Biophys.Acta.,* **1066**, p. 29-36, Edmonton, Canada, 1991.

8. ALLEN, T.M., McALLISTER, L., MAUSOLF, S. and GYORFFY, E., **Liposome-cell interactions: a study of the interactions of liposomes containing entrapped anti-cancer drugs with the EMT6, S49 and AE_1 (transport-deficient) cell lines.,** *Biochem. Biophys. Acta.,* **643**, p. 346-352, Edmonton, Canada, 1981.

9. ALLINGER, N.L., CAVA, M.P., DE JONGH, D.C., JOHNSON, C.R., LEBEL, N.A., STEVENS, C.L., **Química Orgânica**, Editora Guanabara Dois S.A, 2ª ed., Rio de Janeiro-RJ, 1978.

10. ARCIONI, A., TARRONI, R. and ZANNONI, C., **Global target analysis of florescence depolarization in model membranes using exponential splines**, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.,* **89**, p. 2815-2822, 1993.

11. BAI, J., PAGANO, R.E., **Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of Bodipy-Labeled lipids in vesicles**, Biochemistry, **36**, p. 8840-8848, Rochester, Minnesota, 1997.

12. BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M. and WALTKINS, J.C. **Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids**, *J. Mol. Biol.,* **13**, p. 238-252, 1965.

13. BARENHOLZ, Y., COHEN, T., KORESTEIN, R. and OTTOLENGHI, M., **Organization and dynamics pyrene lipids in inact lipid bilayers**, *Biophys. J.* , **59**, p. 110-124, 1991.

14. BEN-YASHAR, V., BARENHOLZ, Y., **Caracterization of the core and surface of humam plasma lipoproteins: A study based on the use of five fluorophores**, Chemistry and Physics of Lipids, **60 (1)**, p. 1-14, Jerusalem, ISR, 1991.

15. BERNSDORFF, C., WOLF, A., WINTER, R., **The e effect of temperature and pressure on structural and dynamic properties of phospholipid/sterol mixture- A steady-state and time-resolved fluorescence anisotropy study**, Zeitschrif fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics, **193**, p. 151-173, Berlin, Germany, 1996.

16. BLOK, M.C., VAN DER NEUT-KOK, E.C.M., VAN DEENEN, L,L.M. and DE GIER, J., **The effect of chain lenght and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes**, *Biochim. Biophys. Acta.*, **406**, p. 187-197, 1975.

17. BORENSTAIN, V., BARENHOLZ, Y., **Caracterization of liposomes and other lipid assemblies by multi-probe fluorescence polarization**, Chemistry and Physics of Lipids, **64-(1-3)**, p. 177-127, Jerusalem, ISR, 1993.

18. BURKE, T.G., MISHRA, A.K., WANI, M.C., WALL, M.E., **Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs**, Biochemistry, **32 (20)**, p. 5352-5364, Columbus, USA, 1993.

19. CARMONA-RIBEIRO, A.M. and CHAIMOVICH, H., **Preparation and characterization of large diotadecyldimethylammonium chloride**

liposomes and comparison with small sonicated vesicles, , *Biochim. Biophys. Acta.*, **733**, p. 172-179, São Paulo-SP, 1983.

20. COYLE, J.D., **Introduction to organic photochemistry**, Publication by John Wiley & Sons Ltd., New York, 1986.

21. DECKER, V., IWATA, K., HAMAGUICHI, H., **The exchange polarization model of photoisomerization: A rationale for profund solvent effects or photoisomerization of trans-stilbene and all-profound solvent effects on photoisomerization of trans -stilbene and all-trans retinal**, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **102**, p. 35-38, Tokyo-Japan, 1996.

22. DIAMANTINO, M.T.R.S., **Localização de sondas fluorescentes em vesículas de fosfolipídeos**, Tese de Doutoramento, F.F.C.L.R.P. Depto. de Química Orgânica - USP, Ribeirão Preto, 1994.

23. FEITOSA, E.S. **Solução da equação de Poisson-Boltzman aplicada à análise da distribuição de íons e tamanho das vesículas de anfifílicos sintéticos em solução aquosa** - Tese de Doutoramento, Instituto de Química-SP/USP, São Paulo-SP, 1990.

24. GANAPATHY, S. and LIU, R.S.H., **Photoisomerization os sixteen isomers of retinal. Initial product distribution in direct and sensitizes irradiation, Photochemistry of polyenes 32.,** *Photochem. Photobiol.*, **56**, p. 959-964, 1992.

25. GREGORIADIS, G., LEATHWOOD, P.D. and RYMAN, B.E., **Enzyme entrapment in liposomes**, *FEBS Lett.*, **14**, p. 95-99, 1971.

26. GREGORIADIS, G., **The carrier potential of liposomes in biology and medicine** (first of two parts), *New Engl. J. Med.*, **295**, p. 704-710, 1976.

27. GREGORIADIS, G., **The carrier potential of liposomes in biology and medicine** (second of two parts), *New Engl. J. Med.*, **295**, p. 765-770, 1976.

28. GREGORIADIS, G., **Liposome Technology** - Ed. Boca Raton, CRC Press, 1986.

29. GUILLET, J., **Polymer photofhysics and photochemistry**, Cambridge University Press, 1987.

30. HANDBOOK, **Chemistry and Physics**, Editor: Robert C. Weast, Ph. D, 52ª ed., 1972.

31. HILL, S.Y., ZUBENKO, G.S., GRONLUND, S., TEPLY, I., **Ethanol's fluidizing effects on RBC membranes from children at risk for alcolism**, Alcohol, **8 (5)**, p. 405-408, Pittsburg, USA, 1991.

32. HINTON, D.P. and HOHNON, Jr., C.S., **Diffusion ordered 2D NMR spectroscopy of phospholipid vesicles: determination of vesicle size distributions**, *J. Phys. Chem..*, **97**, p. 9064-9072, 1993.

33. HINZ, H.J. and STURTEVANT, J., **Calorimetric studies of dilute aqueous suspensions of bilayers formed from synthetic L-α-lecithins**, *J. Biol. Chem.*, **247**, p. 6071-6075, 1972.

34. HOROWITZ, A.D.,ELLEDGE,B., WHISTSETT, J.A., BAATZ, J. E.,**Effects of lung surfactant proteolipid SP-C on the organization of model**

membrane lipids: A fluorescence study, Biochimica et Biophysica Acta, **1107 (1)**, p. 44-54, USA, 1992.

35. ILLINGER, D., POINDRON, P., KUHRY, J.G., **Fluid phase endocytosis investigated by fluorescence with trimethylamino diphenylhexatriene in L929 cells: The influence of temperature and of cytoskeleton depolymerizing drugs**, Biology of the cell, **73 (2-3)**, p.131-138, France, 1991.

36. ILLINGER, D., DUPORTAIL, G., MELY, Y., POIREL, M.N., GERARD, D., KURHY, J.G., **A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane**, Biochimica et Biophysical Acta., **1239 (1)**, p. 58-66, France, 1995.

37. JOHNSON, D.A., VALENZUELA, C.F., ZIDOVETZKI, R., **A deuterium NMR and steady-state fluorescence anisotropy study of the effects of cholesterol on the lipid membrane-disordering actions of ethanol**, Biochemical Pharmacology, **44 (4)**, p. 769-774, California, USA, 1992.

38. KALYANASUNDARAM, K., **Photochemistry in Microheterogeneous Systems**, Academic Press, Orlando-Flórida, 1987.

39. KIM, Y.H., HIGUCHI, W.I., HERRON, J.N. and ABRAHAM, W., **Fluorescence anisotropy studies on the interaction of the short n-alkanols with stratum corneum lipid liposomes (SCLL) and distearoylphosphatidylcholine (DSPC)/distearoyl phosphatidic acid (DSPA) liposomes,** *Biochem. Biophys. Acta.*, **1148**, p. 139-151, USA, 1993.

40. LAKOWICS, J., **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Plenum Press, New York, (1983).

41. LASIC, D.D., **Liposomes: from physics to applications,** Elsevier Science Publishers B.V., Copyright & Permissions Department, P.O. Box 521, AM Amsterdam, The Netherlands, 1993.

42. LEHNINGER, A. L., NELSON D.L., COX M. M., Princípios de Bioquímica, Editora Sarvier, 2ª ed., Rio de Janeiro-RJ, 1995.

43. LENTZ, B.R., **Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers**, Chemistry and Physics of Lipids, **64 (1-3)**, p. 99-116, Chapel Hill, USA, 1993.

44. LIU, R.S.H. and BROWNE, D.T., **A bioorganic view of the chemistry of vision: H.T.-n B.P.-m,n mechanisms for reactions of confined, anchored polyenes,** *Acc. Chem. Res.*, **19**, p. 42-48, 1986.

45. MARCH, J., **Advanced Orgânic Chemistry: Reactions, mechanisms, and structures,** Wiley-Interscience by John Wiley & Sons, Inc., New York, 4ª ed., 1992.

46. MARSH, D., **Membrane assembly studied by spin-label electron spin ressonance**, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **29**, p. 863-871, Ribeirão Preto-SP, Brasil, 1996.

47. MIOLA, L., GEORGETTO, R.M.Z., BONILHA, J.B.S., **Synthesis and photocyclization of carboxylstilbenes in cyclohexane and in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles.** IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto-SP, Atualidades de Físico-Química Orgânica, **210**, p.207-218, 1989.

48. MOORE, J.W., **Físico-Química**, Editora Edgard Blucher Ltda., 4ª ed., Rio de Janeiro-RJ, 1976.

49. MURKHERJEE, A.B., ORLOFF, S. BUTLER, J.D., TRICHE, T., LALLEY, P. and SCHULMAN, J.D., **Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): carrier potential in gene transfer**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* ***75,*** p. 1361-1365, Cell Biology.

50. NEUMANN, M.G., PASTRE, I.A., **Energy transfer bet ween basic dyes,** Instituto de física e química de São Carlos-USP, Solar Energy, **38**, N° 6, p. 431-435, 1987.

51. NEW, R.R.C., **Liposomes: a practical approach**, Oxford University Press, New York, 1990.

52. POLOZOV, I.V., MOLOTKOVSKY, J.G., BERGELSON, L.D., **Anthrylvinyl labeled phospholipids as membrane probes: The phosphatidylcoline-phosphatidylethanolamine system**, Chemistry and Physics of Lipids, **69 (3)**, p. 209-218, Jerusalem, ISR, 1994.

53. RAMAMURTHY, V., **Photochemistry in organized and constrained media**, Photochemistry, VCH Publishers, Inc., New York, 1991.

54. SHIN, D.M. and WHITTEN, D.G., **Solvatochromic behavior of intramolecular chargetransfer diphenylpolyenes in homogeneous solution and microheterogeneous media**, *J. Phys. Chem.,* **92**, p. 2945-2956, Rochester, New York, 1988.

55. SHIMSHICK, E.D. and McCONNELL, H.M., **Lateral phase separation in phospholipid membranes**, *Biochem.*, **12**, p. 2351-2360, 1973.

56. SILVERSTEIM, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Editora Guanabara, 3ª ed., Rio de Janeiro-RJ, 1987.

57. SOLLOMONS, T.W.G., **Química orgânica**, LTC - Editora, 2ª ed., Rio de Janeiro-RJ, (1982).

58. SONG, X., GEIGER, C., VADAY, S., PERLSTEIN, J., WITTEN, D.G., **Supramolecular aggregates of photoreactive aromatics. Structure, photophysics and photochemistry of stilbene and azobenzene phospholipids**, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **102**, p.39-45, Rochester, NY, 1996.

59. STRYER, L., **Bioquímica**, Editora - Guanabara Koogan S.A., 3ª ed., Rio de Janeiro-RJ, 1992.

60. SUDDABY, B.R., BROWN, P.E., RUSSEL, J.C. and WHITENN, D.G., **Surfactant and hydrophobic derivaties of *trans*-stilbenes as probes of vesicle and micelle solubilization sites.** Studies using fluorescence and photoisomerization as probes, *J. Am. Chem.*, **107**, p. 5609-5617, Rochester, New York, 1985.

61. SUDDABY, B.R., **Photochemical studies of the stilbene chromophore in microheterogeneous media**, Thesis Doctor of Philosophy, Supervised by Professor David G. Whitten, Department of Chemistry, University of Rochester, New York, 1986.

62. SZOKA, F., OLSON, F., HEALTH, T., VAIL, W. MAYHEW, E. and PAPAHADJOPOULOS, D., **Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2μm) by a combination of reverse phase**

evaporation and extrusion through polycarbonate membranes, *Biochem. Biophys. Acta.*, **601**, p. 559-571, 1980.

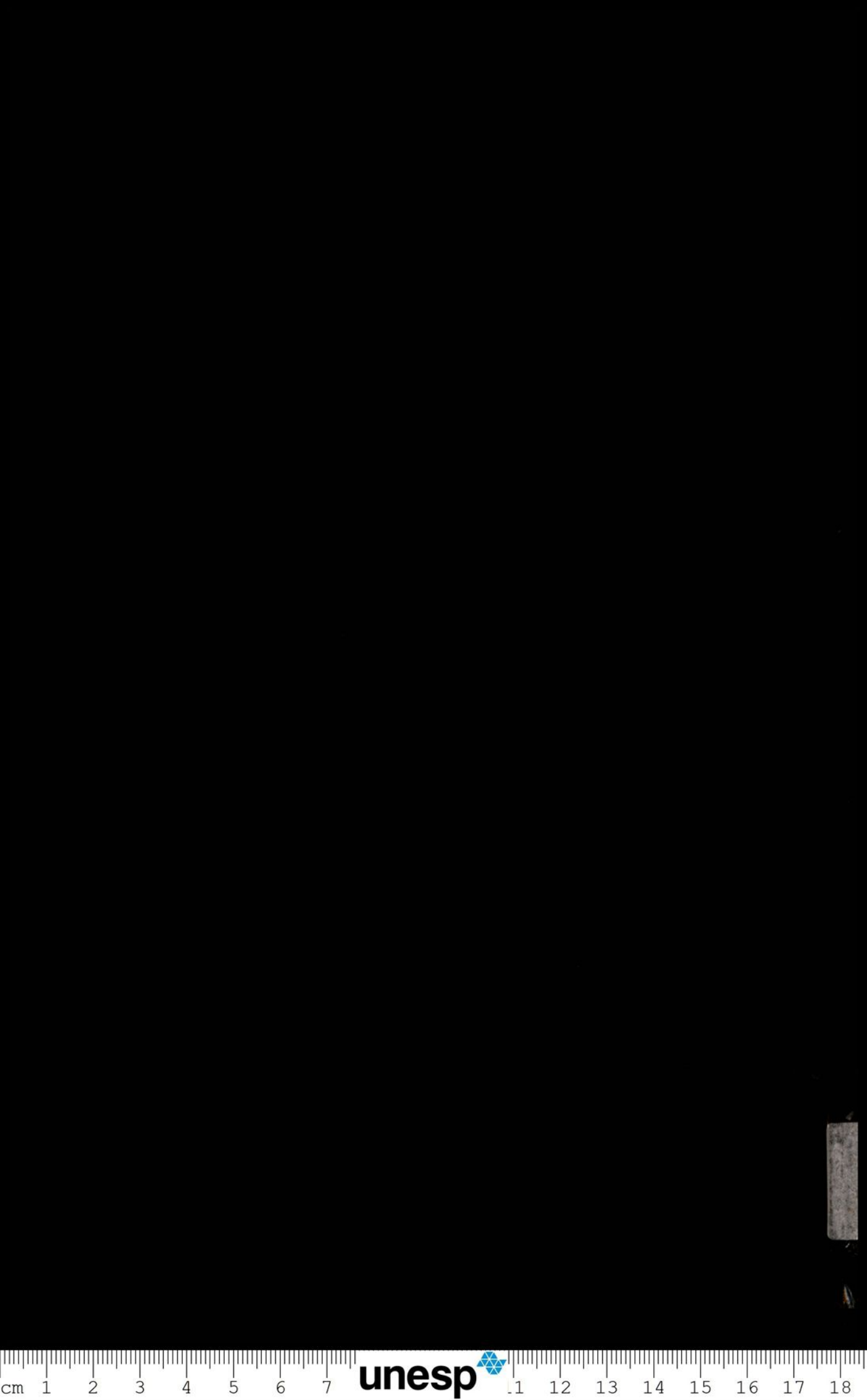
63. TOKUTOMI, S., LEW, R. and OHNISHI, SHUN-ICHI, **Ca^{2+}. induced phase separations in phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine mixed membranes**, *Biochem. Biophys. Acta.*, **643**, p. 276-282, 1981.

64. TROTTER, P.M. and STORCH, J., **3-[*p*-(6-Phenyl)-1,3,5-hexatrienylphenylpropinic acid (PA-PDH): caracterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins,** *Biochim. Biophys Acta.*, **982**, p. 131-139, 1989.

65. TURUNEM, T.M., URTTI, A., PARONEM, P., AUDUS, K.L., RUTTING, J.H., **Effect of some penetration enhancers on epithelial membrane lipid domains: Evidence from fluorescence spectroscopy studies**, Pharmaceutical Research (New York), **11 (2)**, p. 288-294, 1994.

66. WHITTEN, D.G., **Photochemistry and photophysics of *trans*-stilbene and related alkenes in surfactant assemblies**, *Acc. Chem. Res.*, **26**, p. 502-509, Rochester, NY, 1993.

67. WU HONG-WEI, S. and McCONNELL, H. M., **Phase separations in phospholipid membranes**, *Biochim.*, **14**, p. 847-854, 1975.


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18