



UM MODELO ESTATÍSTICO PARA «QUENCHING» IÓNICO EM SOLUÇÕES MICELARES

por

MARIA FRANCISCA S. WHEELER *

e

FREDERICK P. WHEELER

Universidade dos Açores

RESUMO

Quando se solubiliza pireno no centro de micelas de SDS o tempo de vida da sua fluorescência é altamente dependente da mobilidade dos iões de «quencher» que se encontrem na solução. Vê-se, neste trabalho, que a livre mobilidade dos iões de «quencher» diminui desde que se reduza a distância entre as micelas. Este facto leva a que o decaimento da fluorescência se apresente como uma sobreposição de exponenciais. Propõe-se um modelo estatístico para explicar o process de «quenching» em causa. As curvas observadas para o decaimento da fluorescência estão em concordância com o modelo apresentado.

* A parte experimental deste trabalho foi realizada na Victoria University of Manchester — England.

ABSTRACT

When pyrene is solubilized within SDS micelles the lifetime of its fluorescent state is very dependent upon the mobility of the ion «quencher» added to the solution. It is shown that the free motion of quencher ions is impeded when micellar surfaces are relatively close. This, in turn, leads to a fluorescence decay which exhibits multiple rate-constants. A statistical model is presented to explain the quenching process involved in the experiment. The observed decay traces support this model.

1. INTRODUÇÃO

A semelhança entre as propriedades de bioagregados e de micelas leva a que nos últimos anos se tenha dado grande interesse a estudos das diferentes propriedades das micelas (WHEELER, 1976). Micelas são agregados multimoleculares formados por moléculas anfifílicas em solução aquosa. A fluorescência das moléculas usadas como sonda e solubilizadas no centro das micelas, dá-nos a informação acerca do seu próprio microambiente. Ao dissolver-se um sal em tal solução micelar, alguns dos iões, «quencher», têm o efeito de reduzir, «quenching», a fluorescência das moléculas sonda que se encontram excitadas.

Apresenta-se neste trabalho, feito com concentrações de micelas relativamente altas e «quencher» eficientes, fluorescência com múltiplos decaimentos exponenciais. Atribuímos este fenómeno às variações locais da concentração dos iões «quencher» e propomos um modelo estatístico que explica as observações.

2. O QUE SÃO MICELAS ?

Micelas são agregados formados aquando da dissolução de moléculas anfifílicas em água. As moléculas anfifílicas contêm uma parte hidrofóbica (uma cadeia longa de hidrocarbonetos) e uma parte hidrofílica (um grupo polar) como se vê na Figura 1(a). Estas moléculas quando dissolvidas em água formam agregados de modo a proteger as cadeias de hidrocarbonetos do contacto directo com a água, ficando então apenas as cabeças imersas na solução aquosa (Figura 1(b)).

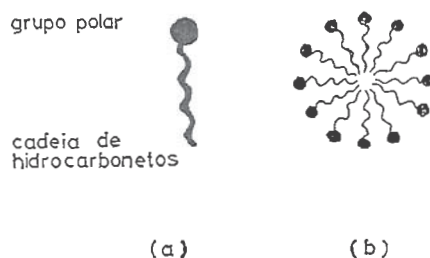


FIGURA 1 — Representação esquemática de :

- a) um monómero
- b) uma micela esférica

Aumentando a concentração das moléculas na água, para um determinado valor da concentração verifica-se uma descontinuidade drástica nas propriedades físicas da solução. Este valor da concentração, chamado cmc (critical micelle concentration), varia com o número de átomos de carbono, N , na cadeia de hidrocarbonetos da seguinte maneira :

$$\text{cmc} = \alpha \exp(-\beta N)$$

onde α e β são constantes. No caso particular deste trabalho em que as micelas são de Sulfato Duodecil de Sódio (SDS) o valor de N é 12 e cmc é $7,5 \times 10^{-3}$ M. O número de monómeros numa micela de SDS em água é 62.

O facto de se formarem agregados revela-nos a presença de duas forças, uma de atracção exercida pelas cadeias de hidrocarbonetos e que aproxima as moléculas, e a outra, uma força repulsiva, exercida pelas cabeças polares. Esta última força é responsável pelo número limitado de moléculas em cada micela.

A aparência de diferentes micelas é discutível mas análises de raio-X revelam que micelas de SDS apresentam-se aproximadamente esféricas desde que a concentração não exceda 1 M (GULIK-KRZYWICKI, et al., 1970). A concentração do detergente usado neste trabalho foi de 0,1 M, o que nos permitiu ter uma ideia precisa da forma dos agregados presentes nas experiências. As micelas não são entidades rígidas com uma estrutura permanente, antes pelo contrário, comportam-se como gotas líquidas. A evidência para este facto vem da possibilidade que as micelas têm de dissolver no seu centro hidrocarbonetos e outros sistemas hidrofóbicos.

3. A TÉCNICA DAS SONDAS FLUORESCENTES

A metodologia das sondas fluorescentes consiste em difundir através da membrana uma molécula orgânica que fluoresça (AZZI, 1975). As propriedades fluorescentes da sonda têm que ser previamente bem conhecidas e devem ser sensíveis ao ambiente. É também necessário assegurar que só as moléculas usadas como sonda, isto é, só as que se encontram no interior das micelas vão afectar significativamente o sinal de fluorescência (WAGGONER & STRYER, 1970). A introdução de moléculas (sondas) dentro das micelas poderia alterar

a estrutura das micelas. No entanto, resultados de raio-X mostram que para baixas concentrações, a entrada da sonda na estrutura da micela, não perturba a arquitectura da mesma (LESSLAVER et al., 1971).

Este tipo de molécula-sonda é apropriadamente usado no estudo de diferentes aspectos dinâmicos do comportamento micelar (RODGERS & WHEELER, 1976). A sonda usada neste trabalho foi a molécula de pireno.

4. RESULTADOS

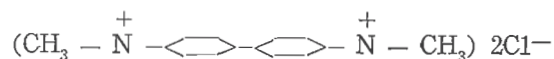
O meio micelar foi obtido por 0,1 M de SDS dissolvido em água destilada. Esta concentração é muito superior a cmc ($7,5 \times 10^{-3}$ M) e assumindo o número de agregação 62, a concentração de micelas era então de $1,6 \times 10^{-3}$ M.

Juntou-se à solução uma concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ M de pireno. Esta concentração de pireno era suficientemente baixa de modo a impedir a formação de excímeros. As propriedades do pireno são tais que asseguram que a fluorescência venha de moléculas localizadas no interior das micelas.

Todas as observações foram feitas em soluções frescas, desgazificadas e à temperatura ambiente. Usou-se como fonte de excitação um laser de nitrogénio de 1 MW de potência. A luz emitida pelo laser, em impulsos de 2×10^{-9} s, tinha um comprimento de onda de 337×10^{-9} m. A fluorescência emitida foi observada perpendicularmente à luz estimulante e com uso de um sistema de detecção com tempo de subida de 2×10^{-9} s. Todo este sistema está detalhadamente descrito em WHEELER (1976).

5. «QUENCHING» DA FLUORESCÊNCIA DO PIRENO POR DIMETILVIOLOGÊNIO

Viologénio é o composto herbicida que correntemente se conhece como «Paraquat» e o dimetilviologénio é um ião orgânico de carga dupla e positiva com a seguinte fórmula :



Este foi o «quencher» usado numa solução de $2,5 \times 10^{-5}$ M de pireno solubilizado em 0,1 M de SDS em solução aquosa.

O tempo de vida do pireno excitado na ausência de «quencher», foi visto ser de 390 ns. Ao juntar-se diferentes concentrações de «quencher» verificou-se que a fluorescência não apresentava um decaimento único mas que para cada concentração de dimetilviologénio se obtinha um decaimento que era uma sobreposição de exponenciais como se vê na Figura 2. Os decaimentos apresentados foram obtidos para duas escalas de tempo diferentes. Na Figura 2 a) pode observar-se todo o perfil da fluorescência enquanto que a Figura 2 b) permite a medição do decaimento rápido.

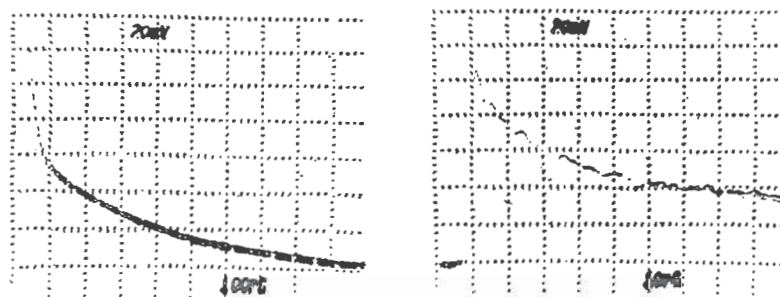


FIGURA 2 — Fotografias do decaimento do estado excitado de $2,5 \times 10^{-5}$ M de pireno em 0,1 M de solução aquosa de SDS na presença de $0,5 \times 10^{-3}$ M de dimetilviologénio. (Observado ao comprimento de onda de 400 nm).

- a) escala vertical, 20 mV por divisão
 escala horizontal, 100 ns por divisão
- b) escala vertical, 20 mV por divisão
 escala horizontal, 10 ns por divisão

UM MODELO ESTATÍSTICO PARA «QUENCHING» IÔNICO

O traçado semilogarítmico da fluorescência como função do tempo, Figura 3, mostra que o decaimento não é uma exponencial única. Por análise dos dados foi possível obter duas constantes diferentes para o decaimento da fluorescência do pireno, cada uma corresponde a uma parte da curva da emissão.

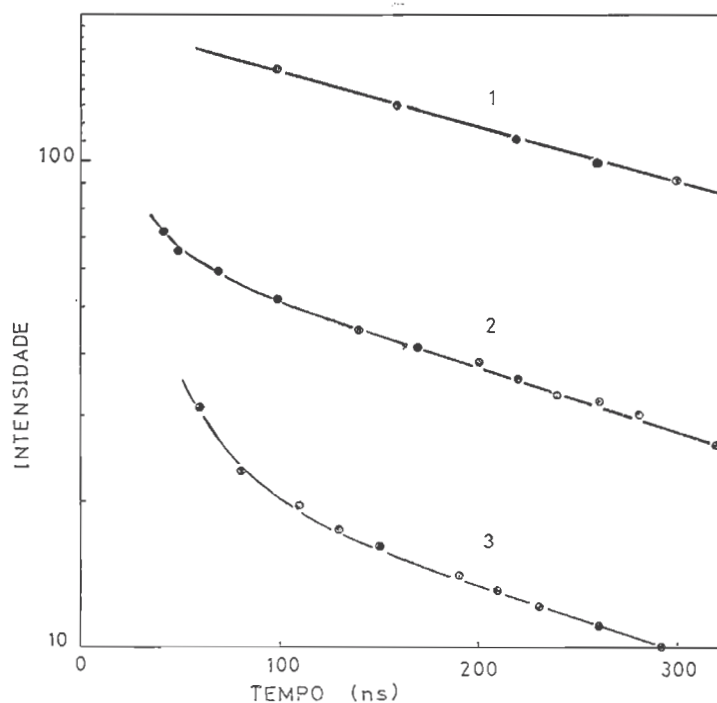


FIGURA 3 — Traçados semilogarítmicos das curvas de fluorescência de $2,5 \times 10^{-5}$ M de pireno em 0,1 M de solução aquosa de SDS na presença de dimetilviologénio. (Observado no comprimento de onda de 400 nm).

- 1) a concentração de dimetilviologénio = 0 ;
- 2) a concentração de dimetilviologénio = $0,5 \times 10^{-3}$ M ;
- 3) a concentração de dimetilviologénio = 1×10^{-3} M.

No Quadro I mostram-se as constantes de «quenching» para diferentes concentrações de «quencher».

QUADRO I
 «QUENCHING» DE $2,5 \times 10^{-5}$ M DE PIRENO EM SOLUÇÃO
 DE 0,1 M SDS POR DIMETILVIOLOGÊNIO
 $\lambda = 400$ nm

[V ⁺⁺](M)	Constantes da taxa de Fluorescência (ns) ⁻¹	
	vida longa	vida curta
0	0,0029	0,00287
$0,25 \times 10^{-3}$	0,0026	0,00867
$0,5 \times 10^{-3}$	0,0031	0,00837
1×10^{-3}	0,0032	0,0143
2×10^{-3}	0,0031	0,0177

As espécies de vida longa mostram um comportamento mais ou menos constante. Por outro lado, para os decaimentos rápidos, é óbvio que há uma relação linear entre a constante de decaimento e a concentração do «quencher», como se pode constatar pela Figura 4.

UM MODELO ESTATÍSTICO PARA «QUENCHING» IÔNICO

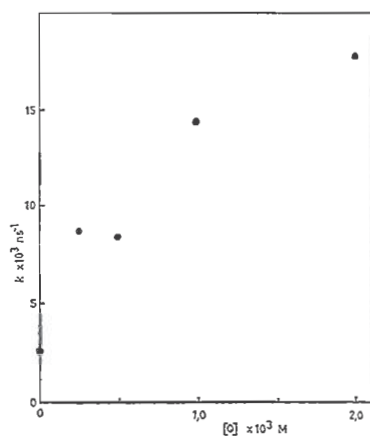


FIGURA 4 — Representação gráfica da constante de taxa do decaimento rápido de $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de pireno em 0,1 M de solução aquosa de SDS como uma função da concentração de dimetilviologénio.

6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

As curvas de decaimento foram obtidas em fotografia com uma máquina Tektronix directamente do osciloscópio. Estas fotografias foram depois amplificadas cinco vezes e passadas a papel milimétrico para facilitar a digitação manual.

Para os casos em que a fluorescência do pireno apresentava apenas uma exponencial, fizeram-se os cálculos da recta de regressão do conjunto total dos dados ($\ln(I_i)$, t_i) e também para o coeficiente de correlação.

Para os sistemas onde se obtiveram duas taxas de decaimento, a leitura dos dados tornou-se mais complicada. Primeiro, as curvas foram amplificadas, digitadas e postas em papel semilogarítmico. Isto permitiu que o ponto de descontinuidade entre o decaimento rápido e o longo fosse encon-

trado. Assim se conseguiu separar os dois tipos de decaimento. Só então os dados correspondentes ao decaimento rápido ($\ln(I_L)$, t) puderam ser analisados pelo método de regressão linear.

A ocorrência mais vulgar para o decaimento da fluorescência do pireno, é uma única exponencial. Sem dúvida, quanto maior for a concentração dos iões de «quencher» nas vizinhanças da molécula excitada de pireno, menor será o tempo de vida desse estado excitado. O tempo necessário para a difusão dum ião entre as micelas é muito curto comparado com o tempo de vida do pireno excitado dentro da micela. Se os iões se podem difundir livremente no meio aquoso, todas as moléculas sonda ficam sujeitas à mesma concentração de «quencher». A fluorescência resultante seria uma exponencial decrescente única com uma constante de decaimento que aumenta devido ao aumento do valor médio da concentração de «quencher».

O facto de que nesta experiência se observaram várias constantes de decaimento indica que para estas circunstâncias as micelas não estavam sujeitas a uma concentração média, mas sim a uma concentração local a qual varia de micela para micela. Isto mostra que os iões de «quencher» não estavam livres para difundir rapidamente no meio aquoso. Nós propomos o seguinte modelo para explicar este comportamento e as várias exponenciais.

Micelas são corpos carregados e encontram-se rodeadas por uma camada iónica a qual se estende a uma distância da ordem do comprimento de Debye dado pela expressão :

$$D = \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 k T}{2n_0 q^2}}$$

onde ε é a constante dieléctrica do meio envolvente, ε_0 a permitividade do espaço livre, k a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, n_0 a concentração iónica e q a carga iónica. Para a temperatura de 20° C e as concentrações

de «quencher» usadas neste trabalho, 10^{-3} M, o comprimento de Debye é de 50 Å.

As micelas são entidades relativamente grandes; o raio de uma micela de SDS é de 20 Å. Para uma concentração micelar de $1,6 \times 10^{-3}$ M, o número de micelas por litro é de $9,7 \times 10^{20}$. Pode calcular-se a distância entre os centros das micelas, pelo inverso da raiz cúbica deste número. Assim se vê que os centros das micelas se encontram a uma separação de aproximadamente 100 Å, donde se conclui que as superfícies das micelas se encontram separadas de 60 Å, ou seja uma distância aproximada ao comprimento de Debye. A maioria dos iões de «quencher» encontram-se portanto na camada iônica micelar e não no meio aquoso livre.

Se os «quenchers» forem suficientemente eficientes na redução do tempo de vida da fluorescência do pireno e se se mantiverem na região da camada iônica de certas micelas por um tempo semelhante ao da fluorescência, então podemos assumir que os «quenchers» estão associados a determinadas micelas durante o tempo de fluorescência.

No momento de excitação das moléculas de pireno pelo laser haverá uma certa distribuição de «quenchers» dentro da camada iônica das micelas. Na altura da excitação algumas micelas não terão qualquer «quencher», algumas terão um «quencher», outras dois «quenchers», etc. Essa distribuição será a de Poisson (KENDALL e STUART, 1958) visto que as condições físicas satisfazem aos requisitos desta distribuição; a probabilidade de um ião estar associado a uma certa micela é muito pequena mas ao mesmo tempo o número de iões disponíveis para «quenching» é muito grande.

O número de moléculas de pireno excitadas para um tempo t , depois da excitação é:

i) dentro das micelas sem «quencher»

$$= n_0 e^{-t/\tau_0}$$

τ_0 é a vida natural do pireno em meio micelar

ii) dentro das micelas com r «quenchers»

$$= n_r e^{-t/\tau}$$

onde τ é dado por

$$1/\tau = 1/\tau_0 + 1/\tau_r$$

e $1/\tau_r$ é a taxa de «quenching» devido à presença de r «quenchers».

Assumindo que

$$\tau_r = \tau_1 / r$$

onde $1/\tau_1$ é a taxa de «quenching» no caso de haver um ião de «quencher» por micela, deste modo o número de moléculas de pireno excitadas presentes em micelas com r «quenchers» é

$$= n_r e^{-t(\nu\tau_0 + r/\tau_1)}$$

Mas $n_r = N_0 P(r)$ onde N_0 é o número total de moléculas excitadas de pireno para $t = 0$, e

$$P(r) = (\lambda_r / r!) e^{-\lambda}$$

distribuição de Poisson onde λ é o número médio de «quenchers» associado a cada micela,

$$\lambda = \frac{[Q]}{[M]}$$

e r é o número de «quenchers» associados a cada micela. Por isso:

$$n_r = (\lambda^r / r!) e^{-\lambda} N_0$$

UM MODELO ESTATÍSTICO PARA «QUENCHING» IÔNICO

e o número total de moléculas de pireno excitadas para o tempo t é:

$$\begin{aligned}
 N(t) &= N_0 \sum_{r=0}^{r=\infty} e^{-\lambda} (\lambda^r / r!) \exp\{-t(\frac{1}{\tau_0} + r/\tau_1)\} \\
 &= N_0 e^{-\lambda} e^{-t/\tau_0} \sum_{r=0}^{r=\infty} (\lambda e^{-t/\tau_1})^r / r!
 \end{aligned}$$

mas $(\lambda e^{-t/\tau_1})^r / r!$ é o termo geral da série exponencial

$$e^x = 1 + x + x^2/2! + \dots + x^r/r!$$

Portanto

$$\begin{aligned}
 N(t) &= N_0 e^{-\lambda} e^{-t/\tau_0} \exp\{\lambda e^{-t/\tau_1}\} \\
 &= N_0 \exp\{\lambda e^{-t/\tau_1} - t/\tau_0 - \lambda\} \tag{1}
 \end{aligned}$$

$$\log_e N(t)/N_0 = -t/\tau_0 - \lambda (1 - e^{-t/\tau_1}) \tag{2}$$

Desta expressão poderemos concluir:

- 1) a presença de um termo de longa vida ($-t/\tau_0$) correspondente ao decaimento natural do pireno em micelas. Pelos valores apresentados no Quadro I vê-se que a este decaimento corresponde um valor médio da constante de decaimento igual a $0,0030(\text{ns})^{-1} \pm 0,0004(\text{ns})^{-1}$;
- 2) a presença duma componente de vida curta a qual depende da concentração de «quencher»;

Da equação (1) pode ver-se a presença de um termo $N_0 \exp(-t/\tau_0 - \lambda)$ com uma constante de vida correspon-

dente à das moléculas do pireno dentro de micelas sem «quencher». Isto explica o facto de que, nos gráficos dos traçados semilogarítmicos das intensidades de fluorescência como função do tempo, a segunda parte das curvas todas tenham a mesma inclinação. Da expressão para $N(t)$, vemos como a constante da fluorescência do pireno varia com a concentração do «quencher». Expandindo a exponencial

$$e^{-t/\tau_1}$$

e tomando os dois primeiros termos da expansão obtemos:

$$\begin{aligned} N(t) &= N_0 e^{-t/\tau_0} e^{-\lambda t} \exp \left\{ \lambda (1-t/\tau_1) \right\} \\ &\approx N_0 e^{-t/\tau_0} e^{-\lambda t} e^{\lambda t} e^{-\lambda t/\tau_1} \end{aligned}$$

Esta expansão é válida somente para valores de t/τ_1 pequenos, por exemplo para $t/\tau_1 = 0,3$ o erro é de 6 %.

$$\begin{aligned} N(t) &\approx N_0 e^{-t/\tau_0} e^{-\lambda t/\tau_1} \\ &\approx N_0 e^{-(1/\tau_0 + \lambda/\tau_1) t} \end{aligned}$$

$$k_M = 1/\tau_0 + \lambda/\tau_1 = 1/\tau_0 + (1/\tau_1) [Q] / [M]$$

e por isso devemos esperar uma relação linear entre a constante rápida da fluorescência k_M e a concentração de «quencher». Isto é, sem dúvida, o que se observa na Figura 4. A constante da taxa de «quenching» é então expressa por

$$k_q = (\tau_1[M])^{-1}$$

CONCLUSÕES

Soluções micelares têm sido usadas em investigações de natureza biofísica uma vez que tais agregados simulam as condições complexas de ambiente de, por exemplo, as membranas. As membranas biológicas são formadas por grupos organizados de moléculas os quais exercem funções em processos importantes tais como transdução de energia, condução do impulso nervoso, etc. Tentou-se com este trabalho compreender o processo de «quenching» da fluorescência em pireno usado como sonda numa solução de micelas. Observaram-se múltiplas constantes da taxa de fluorescência de pireno. As condições físicas presentes nestas soluções eram tais que a maioria dos iões de «quencher» se encontravam localizados dentro da camada iônica e não na fase aquosa livre. Sugere-se que como resultado do efeito do potencial eléctrico existente na interface micela-água sobre o movimento dos iões de «quencher», estes iões permanecem associados a certas micelas durante um período de tempo da ordem da duração da fluorescência. Um modelo estatístico de «quenching» baseado nesta hipótese mostrou explicar com sucesso as observações.

REFERÊNCIAS

- AZZI, A., 1975 : « The application of fluorescent probes in membrane studies », *Q.Rev.Biophys.*, 8, pp. 237-316.
- GULIK-KRZYWICKI, T., SHECHTER, E., IWATSUBO, M., RANCK, J. L. & LUZZATTI, V., 1970 : « Correlations between structure and spectroscopic properties in membrane model systems. Tryptophan and -anilino-8-naphthalene-sulfonate fluorescence in protein-liquid water phase », *Biochim. Biophys. Acta*, 219, pp. 1-10.
- KENDALL, M. G. & STUART, A., 1958 : *The Advanced Theory of Statistics*, Vol. I, « Distribution Theory » (Charles Griffin and Co. Ltd., London, England).
- LESSLAVER, W., CAIN, J. & BLASIE, J. K., 1971 : « On the location of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate in lipid model systems. An X-ray diffraction study », *Biochim. Biophys. Acta*, 241, pp. 547-566.
- RODGERS, M. A. J., & WHEELER, M. F. S., 1976 : « Fluorescence from pyrene solubilized in aqueous micelles », *Chem.Phys.Let.*, 43, pp. 587-591.
- WAGGONER, A. S. & STRYER, L., 1970 : « Fluorescent probes of biological membranes », *Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A.*, 67, pp. 579-589.
- WHEELER, M. F. S., 1976 : *Ph. D. Thesis*, Victoria University, Manchester, England.