



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

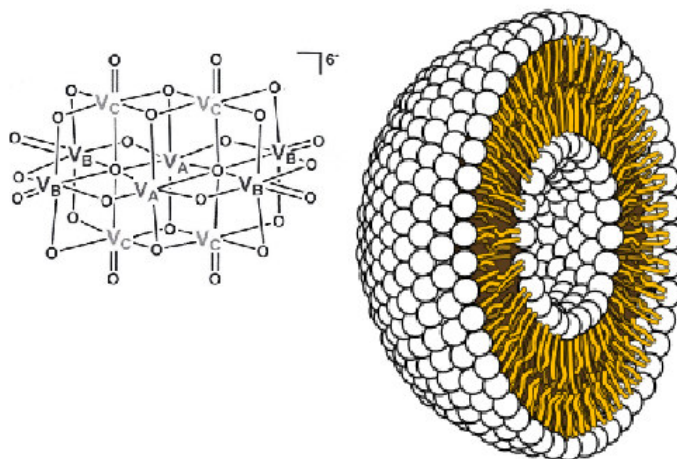
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia



Projecto final do curso de Licenciatura em Bioquímica

Estudo da interacção do decavanadato com bicamadas lipídicas



Autor: Marlene Pacheco Trindade

Orientador: Prof. Doutor Jorge Martins

Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves

Pensamentos mais felizes conduzem essencialmente a uma bioquímica mais feliz.

A um corpo mais feliz, mais saudável.

Dr. John Hagelin

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por todo o apoio quer financeiro quer motivacional que sempre me deram ao longo da minha vida, principalmente durante o meu curso.

Agradeço também aos meus tios e a outros familiares pelo apoio motivacional que sempre me deram deste que estou em Portugal.

Aos meus orientadores, ao Prof. Doutor Jorge Martins e ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves agradeço por me terem dado a oportunidade de realizar este trabalho experimental, assim como de partilhar o seu conhecimento científico, e por toda a ajuda disponibilizada no decorrer deste trabalho.

Gostaria ainda de agradecer aos investigadores Miguel Manuel e Dalila Arrais pela ajuda e apoio que me deram no decorrer deste trabalho em diversos aspectos essenciais para a realização deste.

Agradeço também a todos os professores que transmitiram os conhecimentos essenciais para formar excelentes profissionais de Bioquímica.

Por fim, queria agradecer ao meu namorado Pedro Charneca por todo o seu apoio incondicional, assim como agradeço aos meus amigos pelo apoio constante e aos momentos de lazer que me proporcionaram, aos meus colegas da praxe e a todos os que estiveram lá quando precisei e que me ajudaram a ser quem sou hoje. Agradeço ainda o meu cão Bolinhas, o qual eu espero de ver sempre que possa.

Resumo

O vanádio é um metal de transição de grande interesse nas áreas da química, bioquímica, bem como das ciências da vida e da saúde, em consequência de se terem descoberto acções benéficas dos compostos contendo vanádio, com acção anti-diabética e anti-cancerígena, a realçar de entre outros efeitos farmacológicos. A espécie decamérica do vanádio, também designada decavanadato, tem sido alvo de muitos estudos no desenvolvimento de fármacos no combate dessas doenças. Porém, tendo em conta que o decavanadato é uma espécie bastante estável a pH ácido e estruturalmente compacta, tem gerado alguma controvérsia sobre o modo como este actua ou interage com as membranas biológicas. Por conseguinte, a elucidação da interacção do oligómero decamérico de vanádio com modelos de membranas biológicas, reveste-se de importância acrescida para a compreensão dos mecanismos subjacentes às acções como anti-diabéticos ou anti-cancerígenos. Os lipossomas são o sistema de membrana que melhor simula os estudos envolvendo membranas biológicas. Tendo em atenção a sua dimensão, as vesículas unilamelares grandes (LUV – *large unilamellar vesicles*), são os mais indicados para efectuar este estudo. Sendo assim, o objectivo deste trabalho experimental, foi o de verificar se o decavanadato interage com bicamadas lipídicas unilamelares.

Determinou-se o tempo de desoligomerização do decavanadato em água, de modo a estabelecer a escala temporal possível para os estudos de interacção. Verificou-se que o decavanadato é mais estável quanto mais baixo for o pH e a temperatura, e quanto maior for a concentração de vanádio em solução. A partir dos resultados obtidos é possível verificar que a 25°C, o decavanadato (1mM) a pH 5.84, o valor médio para o tempo de meia-vida é de $22\text{h}45 \pm 1\text{h}45$, enquanto a pH 7.53 o tempo de meia-vida médio é somente de $7\text{h}30 \pm 1\text{h}30$.

Para se poder verificar se o decavanadato interage com bicamadas lipídicas, é necessário utilizar uma sonda de fluorescência que o decavanadato consiga *quenchar*, neste caso será o *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl* (NBD). Verificou-se então que a constante de *quenching* do NBD pelo decavanadato em água é $1,677 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Em seguida inseriu-se a sonda lipídica em LUV e observou-se que, também neste caso, o decavanadato é capaz de *quenchar* a sonda NBD, sendo a constante de *quenching*

$7,20 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Desta forma, a ocorrência de *quenching* comprova que o decavanadato interage com bicamadas lipídicas zwitteriônicas.

Abstract

Vanadium is a transition metal of great interest in the areas of chemistry, biochemistry, as well as in the for health and life sciences, as resulting from benefic action of vanadium containing compounds displaying anti-diabetic and anti-cancer actions, standing out from other pharmacological effects. The decameric specie of vanadium, termed decavanadate, has been the target of many studies in the development of drugs to fight these sicknesses. However, considering that decavanadate is a very stable specie in acid pH and structurally compact, there has been some controversy about the way it acts or interacts with biological membranes. Therefore, the comprehension of the interaction between the decameric oligomers and biological model membranes is of great importance to the understanding of the mechanisms underlying to the anti-diabetic and anti-cancer actions. The liposomes are the membrane systems that best simulate biological membranes. Considering their dimension, large unilamellar vesicles (LUV), are the best indicated to pursue this study. The main goal of this experimental work was to verify if decavanadate interacts with unilamellar lipid bilayers.

It was determined the deoligomerization characteristic time of the decavanadate in water, so that there could be established a temporal scale to use in the interaction studies. The result of this study established that the decavanadate is more stable at a low pH and temperature, and at a high concentration of vanadium in solution. Analyzing the results, it is fair to say that at 25°C, and decavanadate (1mM) at pH=5.84, the average value of half-life time is 22h45±1h45, while at pH=7.53 the half-life time is only 7h30±1h30.

To verify if decavanadate interacts with lipid bilayers, it is necessary to use a fluorescence probe that can be quenched by this vanadium oligomer. The chosen probe was *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl* (NBD). The value determined for of the quenching constant of the NBD in water solution is $1.677 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The next procedure was the insertion of the probe in LUV, it was also observed that the decavanadate is capable of quenching the NBD probe, being the quenching constant found $7.20 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Therefore, the occurrence of quenching proves that the decavanadate interacts with zwitterionic lipid bilayers.

Abreviaturas

Abs – Absorvência

GUV – *Giant Unilamellar Vesicles* (Vesículas unilamelares gigantes)

I_{fo} – Intensidade de fluorescência

I_f – Intensidade de fluorescência na presença de *quencher*

k_Q – constante de *quenching*

LUV – *Large Unilamellar Vesicles* (Vesículas unilamelares grandes)

MLV – *Multilamellar Vesicles* (Vesículas multilamelares)

NBD – *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl*

NBD-C6 – ver NBD-DHPE

NBD-C16 – ver NBD-DMPE

NBD-DHPE - 1,2-di-hexanoíl-*sn*-3-glicerofosfatidiletanolamina-N-(NBD)

NBD-DMPE - 1,2-dimiristoíl-*sn*-3-glicerofosfatidiletanolamina-N-(NBD)

nm – nanómetro

POPC – 1-palmitoíl-2-oleiloíl-*sn*-3-glicerofosfatidilcolina

NMR – Ressonância Magnética Nuclear

SUV – *Small Unilamellar Vesicles* (Vesículas unilamelares pequenas)

$t_{1/2}$ – tempo de meia-vida

V_{10} – Decavanadato ou oligómero decamérico de vanadato

Índice

Agradecimentos	II	
Resumo	iii	
Abstract	V	
Abreviaturas	V	
Índice	VI	
1. Objectivos	1	
2. Introdução	2	
2.1. O Vanádio		2
2.2. Lipossomas		4
2.3. A sonda de fluorescência <i>7-Nitrobenz-2-oxA-1,3-diazole-4-yl</i>		5
2.4. Cinética dos processos fotoquímicos		5
2.4.1. Cinética de Stern-Volmer		6
2.4.2. Mecanismo de quenching		7
2.4.2.1 Desactivação por colisão		7
2.4.2.2 Transferência de energia		7
2.4.2.3 Transferência electrónica		8
3. Parte experimental	9	
3.1. Determinação do tempo de desoligomerização do decavanadato		9
3.1.1. Material		9
3.1.2. Procedimento		9
3.2. Observação do decaimento da fluorescência do NBD-C6 com metavanadato e decavanadato em água		10
3.2.1. <i>Material</i>	10	
3.2.2. Procedimento		11
3.3. Observação do <i>quenching</i> do decavanadato com NBD-C16 em lipossomas		12
3.3.1. Material		12
3.3.2. Procedimento		13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO		
	14	
4.1. Determinação do tempo de desoligomerização do decavanadato		14
4.2. Medição da fluorescência do NBD-C6 em água com metavanadato		22
4.3. Medição da fluorescência do NBD-C6 em água com decavanadato		22
4.4. Determinação do mecanismo de <i>quenching</i> utilizado pelo decavanadato		24
4.5. Medição da intensidade de fluorescência do NBD-C16 em lipossomas com decavanadato		25
5. Conclusões	28	
6. Referências Bibliográficas	29	

1. Objectivos

O objectivo deste trabalho experimental consistiu em verificar se o decavanadato era passível de interagir com bicamadas lipídicas unilamelares. Para isso, foi necessário estudar primeiro a desoligomerização do decavanadato em água, de modo a estimar o tempo de meia-vida do composto. Depois foi obrigatório estudar se o metavanadato e/ou o decavanadato têm a capacidade de *quenchar* a sonda de fluorescência escolhida, neste caso o *7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl* (NBD). Como este último ponto foi possível, procedeu-se em seguida à determinação do mecanismo de *quenching* usado pelo decavanadato. Por fim, efectuou-se a simulação da interacção do decavanadato com membranas biológicas através do uso de lipossomas, concretamente através do uso de vesículas unilamelares grandes (LUV - *Large Unilamellar Vesicle*).

2. Introdução

2.1 O Vanádio

O vanádio é um metal de transição que pertence ao 5º grupo e ao 4º período da tabela periódica. A química dos compostos de vanádio é bastante complexa, pois este metal possui vários estados de oxidação, desde do +2 até ao +5, sendo os estados de oxidação +4 e +5 os mais estáveis em solução aquosa [1-2].

O vanádio foi descoberto por Manuel Del Rio em 1801, e foi designado por eritrónio (do grego “erythros” que significa vermelho). Em 1830, N. G. Sefdröm descreveu um novo mineral que tinha encontrado em alguns minérios de ferro e “baptizou-o” de vanádio, em honra da deusa sueca “Vanadis”, devido as cores variadas e brilhantes dos seus compostos. Pouco tempo depois descobriu-se que o eritrónio e o vanádio eram o mesmo composto [3].

O vanádio é um elemento químico que se pode encontrar em baixas concentrações (aproximadamente 0,02%) na crosta terrestre, sendo também detectável na biosfera. É um elemento que se pode encontrar, quer em plantas, quer em animais, em baixas concentrações. Em mamíferos, o vanádio é encontrado em todos os tecidos a baixas concentrações, sendo as concentrações mais elevadas encontradas nas unhas, pele, plasma e fígado [2]. O vanádio é ingerido diariamente em vários alimentos como a pimenta preta, o cacau em pó e em alguns cogumelos [4]. Estima-se que a quantidade total de vanádio encontrado no corpo humano é de 100 µg sendo que a ingestão diária de vanádio é de 10 até 60 µg e que os níveis de vanádio no sangue e na urina são respectivamente 1 e 10 nmol/L. O vanádio possui um tempo de meia-vida de 20 a 40 horas e é excretado pela urina [5].

O vanádio no estado de oxidação +5 é designado por vanadato e possui um tempo de meia-vida no meio intracelular de meia hora, pois este é reduzido pela glutatona (GSH) em vanadilo (vanádio na estado de oxidação +4), sendo esta a forma mais encontrada no meio

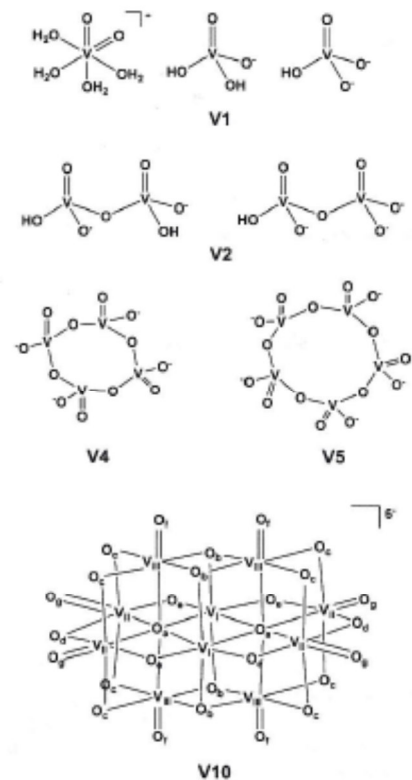


Figura 1 - Estruturas esquemáticas das espécies monoméricas (V1), diméricas (V2), tetraméricas (V4), pentaméricas (V5) e decaméricas (V10) [7].

intracelular (~98%) [6-7]. O vanadato tem uma grande tendência para formar espécies oligoméricas, sendo essas monoméricas, diméricas, tetraméricas, pentaméricas e decaméricas. A formação de cada uma destas espécies oligoméricas depende de vários factores, como o pH, a concentração e condições específicas. A espécie decamérica, também designada por decavanadato (V_{10}), é um complexo formado por 10 átomos de vanádio e 28 átomos de oxigénio ($[V_{10}O_{28}]^{6-}$). O decavanadato é uma espécie bastante estável a pH ácido e estruturalmente compacta. O decavanadato é formado a partir do metavanadato sendo a sua formação dependente do pH e da concentração de vanádio, ou seja, na adição de uma solução ácida, a solução incolor torna-se amarela/laranja. A cor amarelada/alaranjada indica a presença de espécies decaméricas na solução, pois a solução monomérica é incolor. O decavanadato pode estar presente em solução aquosa a pH fisiológico, porém o equilíbrio químico estará mais favorecido para a formação das outras espécies oligoméricas. Para se poder observar essas reacções químicas, pode recorrer-se à espectroscopia de ^{51}V -NMR, mas também pode ser utilizada a espectroscopia de UV/visível, pois a cor amarela do decavanadato deve-se à absorção espectral no ultravioleta [7].

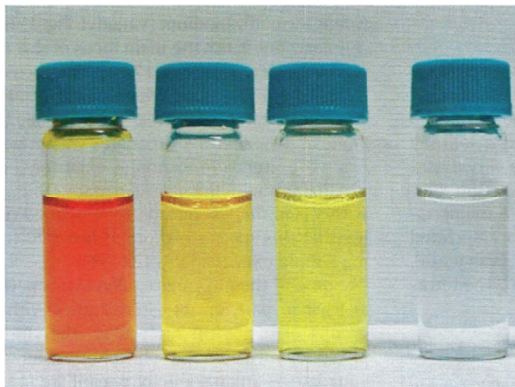


Figura 2 – Fotografia de três soluções de decavanadato (da esquerda para a direita: pH5.8-6.0) e uma solução de metavanadato incolor [7].

Em sistemas biológicos, foi descoberto que algumas proteínas se associam preferencialmente com a espécie decamérica do vanadato. Existem várias possibilidades do modo como se associam as proteínas com o decavanadato, em particular este associa-se as proteínas que possuem uma grande densidade de carga superficial positiva, ou com proteínas que possam estabelecer pontes de hidrogénio ou pontes salinas com o decavanadato [8].

As investigações, em sistemas biológicos, têm se focado mais na interacção do decavanadato com a interface lipídica negativa. Porém, a alta carga negativa e a grande

polaridade do decavanadato, indica que esta associação será limitada. Contudo haverá resultados preliminares que poderão indicar que o decavanadato atravessa a membrana lipídica [8].

2.2 Lipossomas

Os lipossomas são os sistemas de biomembranas mais utilizadas em estudos *in vitro*. Os lipossomas, para além de serem óptimos em estudos para simular as biomembranas, também são utilizados para incorporar solutos como enzimas, fármacos anti-cancerígenos e anti-microbianos para transporte. Os lipossomas são estruturas vesiculares que se formam espontaneamente após a dispersão de fosfolípidos em água, formando várias bicamadas lipídicas concêntricas. Estas estruturas são denominadas por vesículas multilamelares (MLV – *multilamellar vesicles*). Porém estas estruturas não são muito vantajosas e como possuem várias bicamadas, não são muito apropriadas para simular estudos envolvendo biomembranas. Para isso, desenvolveram-se técnicas de modo a ser possível formar vesículas unilamelares de diferentes dimensões, ou seja, com uma bicamada lipídica [9-10-11].

As vesículas unilamelares podem ser classificadas atendendo as suas dimensões. Sendo assim, chamam-se vesículas unilamelares pequenas (SUV- *small unilamellar vesicles*) aquelas de diâmetro entre 25 e 50 nm, e vesículas unilamelares grandes (LUV – *large unilamellar vesicles*) aquelas com diâmetros superiores a 50 nm mas inferiores a 500 nm. Também podem ser produzidas vesículas gigantes (GUV – *giant unilamellar vesicles*) do tamanho de células (até 300 μm) [9-10-11].

A diferença do tamanho das vesículas unilamelares depende das técnicas utilizadas para a sua produção. Deste modo, para se produzir SUV aplica-se uma sonificação aos MLV, produzindo vesículas com dimensões próximas do limite inferior teórico para uma estrutura estável. No entanto a sua pequena dimensão pode constituir uma desvantagem, pois a área da superfície externa é aproximadamente o dobro da área interna. Os LUV são produzidos por extrusão rápida (também podem ser formados por

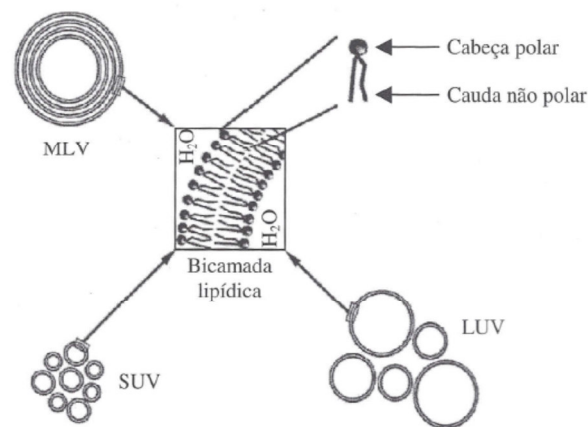


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura de diferentes tipos de vesículas [9].

outra técnica) de MLV através de filtros de policarbonato com diâmetro de poro adequado [9-10-11].

Os lipossomas podem ser formados por só uma variedade de fosfolípidos ou por vários fosfolípidos. Neste caso em estudo, os lipossomas irão ser formados por uma única variedade de fosfolípidos, pelo 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-3-glicerofosfatidilcolina (POPC). O POPC é uma espécie zwitteriônica, ou seja, possui duas cargas opostas na sua estrutura molecular (fosfato: aniônico e trimetilamônio: catiônico).

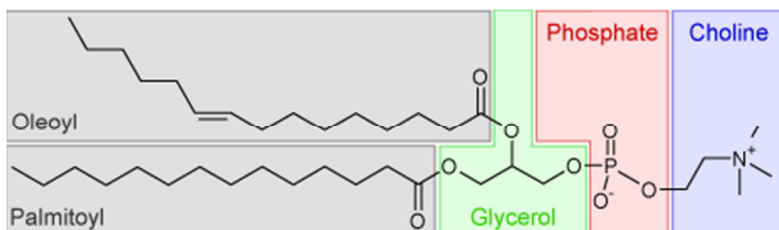


Figura 4 – Estrutura molecular do POPC [12].

2.3 A sonda de fluorescência 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl

O fluoróforo 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl (NBD) foi pela primeira vez introduzido em 1968. O NBD é uma sonda de fluorescência e o seu uso como tal tem aumentado gradualmente ao longo dos anos devido as suas características químicas particulares [13]. O NBD apresenta uma fluorescência fraca em água, possuindo um tempo de vida de emissão de 0,933 ns, e possui uma fluorescência forte em solventes orgânicos, membranas ou meios hidrofóbicos, possuindo um tempo de vida de emissão de aproximadamente 7-10 ns. Outra particularidade do NBD é a sua capacidade de formar aductos de fluorescência estáveis entre os seus grupos cloro e flúor e entre os grupos tiol ou amino, o que significa que o NBD pode ser usado em substratos biológicos [14-15].

Estudos de *quenching* de fluorescência com NBD e modelos de membrana têm mostrado que o NBD inserido numa membrana constituída por fosfatidilcolina situa-se preferencialmente na zona das cabeças polares ou na interface [13].

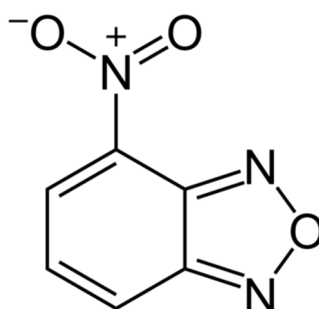
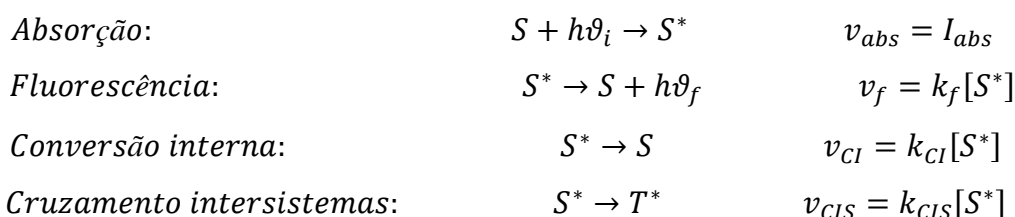


Figura 5 – Estrutura molecular do grupo NBD [16].

2.4 Cinética dos processos fotofísicos

Os processos fotofísicos iniciam-se pela absorção da radiação. Uma vez que uma molécula é excitada pela absorção de um fóton, ela pode retornar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou por outro processo de desactivação, como a conversão interna (retorno directo para o estado fundamental sem emissão de fluorescência), cruzamento intersistemas (possibilidade de ocorrer fosforescência), transferência de carga intramolecular e mudança conformacional:



S representa a espécie que absorve radiação, S^* representa um estado excitado singuleto, T^* representa um estado excitado tripleto, $h\nu_i$ é a energia do fóton incidente e $h\nu_f$ é a energia do fóton emitido por fluorescência. Sendo assim, o rendimento quântico de fluorescência é

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{CI} + k_{CIS}}$$

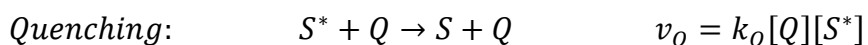
Outro parâmetro importante a considerar na cinética de uma reacção fotofísica é o tempo de vida de fluorescência observado, τ_0 , [17-18]

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_{CI} + k_{CIS}} = \frac{\phi_f}{k_f}$$

2.4.1 Cinética de Stern-Volmer

A redução do tempo de vida do estado excitado é chamada de *quenching*, sendo a tradução mais adequada para esse termo, extinção ou supressão da fluorescência. O *quenching* pode ser um processo desejado, como numa transferência de energia ou de electrões, ou um processo indesejado, que diminui o rendimento quântico do processo fotofísico desejado. O efeito de *quenching* pode ser estudado acompanhando-se a emissão do estado excitado envolvido num processo fotofísico através do formalismo

cinético de Stern-Volmer. Para isso adiciona-se um agente de extinção da espécie que se encontra excitado:



Q representa o agente de *quenching*, sendo caracterizado por uma concentração constante, pois o agente que é usado como agente de extinção não reage directamente com a espécie em estudo. Então o rendimento quântico de fluorescência na presença de agente de extinção altera-se para a seguinte expressão:

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{CI} + k_{CIS} + k_Q[Q]}$$

Para se poder construir o gráfico de Stern-Volmer é necessário fazer a razão entre o rendimento quântico de fluorescência sem e com *quencher*, obtendo-se a seguinte expressão:

$$\frac{\phi_f}{\phi} = 1 + \tau_0 k_Q [Q]$$

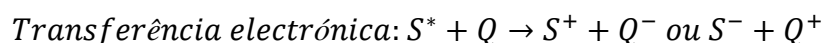
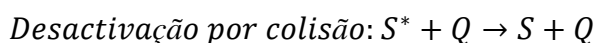
Tendo em conta que os ensaios terão como medida a intensidade de fluorescência, I_f , a expressão acima será transformada para a seguinte expressão:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + \tau_0 k_Q [Q]$$

Esta expressão assemelha-se a uma equação de recta $y = mx + b$, sendo y igual a $\frac{I_{f0}}{I_f}$, o declive (m) é representado por $\tau_0 k_Q$, x é igual a concentração de *quencher* e b é igual a 1. A partir destes dados é construído o gráfico de Stern-Volmer [17-19].

2.4.2 Mecanismo de *quenching*

A cinética de uma reacção envolvendo um agente de *quenching*, é bastante complexa, uma vez que existem três mecanismos de *quenching* [17-19]:



2.4.2.1 Desactivação por colisão:

O mecanismo de *quenching* por colisão é sobretudo eficaz quando o agente de extinção é uma espécie pesada, como é o caso do vanádio, que possui uma massa molecular de 50,9415 g/mol. O estudo do *quenching* por colisão é bastante eficaz para determinar os resíduos de aminoácidos na superfície de uma proteína [17-19].

2.4.2.2 Transferência de energia:

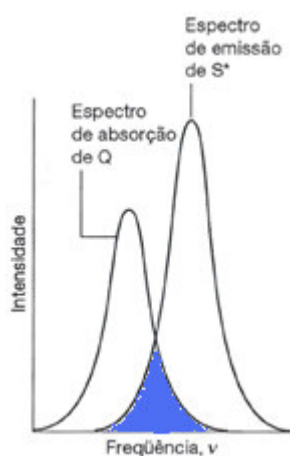
O mecanismo de *quenching* por transferência de energia somente é eficaz quando se observam estes dois parâmetros estipulados por T. Förster em 1959 [17-19]:

1. O dador e o aceitador de energia estão separados por uma pequena distância, na ordem do nanómetro.
2. Os fótons emitidos pelo estado excitado do dador podem ser directamente absorvidos pelo aceitador.

Para que a primeira condição se verifique é necessário calcular a eficácia da energia de transferência, E_T , para um sistema dador-aceitador:

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

em que R_0 representa a distância entre cada par dador-aceitador, sendo por isso específico [17-19].



A segunda condição depende se o espectro de emissão do dador se sobrepõe ligeiramente com o espectro de absorção do aceitador. Na região de sobreposição, os fótons emitidos pelo dador conseguem ser absorvidos pelo aceitador [17-19].

No caso do vanádio, nomeadamente o do decavanadato, esta hipótese está excluída a partida, pois o máximo de absorção do decavanadato situa-se na região do ultra-violeta enquanto o máximo de emissão da sonda NBD é de 540nm [20].

Figura 6 – A zona colorida de azul ilustra o campo em que o espectro de absorção de Q e o espectro de emissão de S* se sobrepõem, sendo essa a zona em que a velocidade de transferência de energia é ótima [17].

2.4.2.3 Transferência electrónica:

O mecanismo de *quenching* por transferência electrónica também envolve vários parâmetros para que o processo ocorra favoravelmente. Os seguintes parâmetros foram estipulados por R.A. Marcus em 1965 [17]:

1. A transferência é mais eficaz quanto menor a distância entre o dador e o aceitador.
2. A reacção é mais favorável quanto mais exoenergética for a reacção.
3. Quando excitado a molécula aceitadora tem de sofrer um rearranjo a nível molecular, para tal existe um custo energético envolvido, designando-se esse custo como energia de reorganização, sendo a velocidade de reacção dependente dessa reorganização molecular.

O decavanadato $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ é um anião que possui propriedades redox, logo pode ser que ocorra *quenching* por transferência electrónica.

3. Parte experimental

3.1 Determinação do tempo de desoligomerização do decavanadato

3.1.1 Material

- Metavanadato de amónio ($M(\text{NH}_4\text{VO}_3) = 116,98\text{g/mol}$)
- H_2O miliQ
- HCl concentrado
- NaOH 2mM
- Balão volumétrico de $10,000 \pm 0,025\text{mL}$, 20°C , Classe A, POLIEX
- 3 Gobelés de 25mL, NORMAX
- Pipeta graduada de $10,00 \pm 0,04\text{mL}$, 20°C , Classe A, LINEX
- Espátula
- Vidro de relógio
- Eppendorfs
- Cuvettes de plástico
- Micropipetas P1000, P100, EPPENDORF Research
- Balança analítica ($\pm 0,0001\text{g}$), OERTLING
- Placa de aquecimento com agitação, AGIMATIC-E
- Eléctrodo selectivo de pH, CRINSON
- Espectrofotómetro UV/Visível, UV-2401 PC, UV-Vis recording spectrophotometer, SHIMADZU

3.1.2 Procedimento

➤ Preparação de metavanadato e decavanadato

Prepararam-se 10mL de metavanadato de amónia de 50mM num gobelé. Depois a solução foi aquecida a 70°C , tapada com um vidro de relógio (o vapor libertado é neurotóxico), até ocorresse a dissolução completa. Adicionaram-se algumas gotas de NaOH 2M até a solução se tornar incolor, obtendo-se deste modo uma solução de metavanadato sem contaminação de espécies decaméricas. A solução foi arrefecida num banho de gelo. Retiraram-se 2mL da solução para um Eppendorf, mediu-se o pH e

guardou-se a 4°C. À solução restante adicionou-se 1µL de HCl concentrado e mediu-se novamente o pH. Guardaram-se 4mL em dois Eppendorfs a 4°C. Adicionou-se novamente HCl à solução restante de modo a que o pH se encontrasse perto dos 5, registando o pH. Esta solução foi guardada em dois Eppendorfs a 4°C.

➤ **Espectros de UV/Visível do metavanadato e decavanadato**

Mediram-se os espectros de absorção do metavanadato e decavanadato de modo a determinar o comprimento de onda de maior absorção. Prepararam-se soluções de decavanadato com as concentrações de 1mM e 2mM, partindo da solução-mãe de 50mM, perfazendo um volume final de 2mL com H₂OmiliQ. Mediram-se os espectros do decavanadato preparados, fazendo variar a temperatura e o tempo da medição. Depois foi determinado o tempo de decomposição do decavanadato.

3.2 Observação do decaimento da fluorescência do NBD-C6 com metavanadato e decavanadato em água

3.2.1 Material

- Solução de metavanadato de amónia 10mM (solução-mãe)
- Solução de NBD-DHPE de 20µM (NBD-C6)
- HCl concentrado
- NaCl (M=58,44g/mol)
- H₂OmiliQ
- 6 Tubos de ensaio
- Micropipetas P1000, P20, EPPENDORF research
- Micropipeta P200, GILSON
- Pipetas de Pasteur
- Cuvette com agitador magnético
- Placa de aquecimento com agitação, AGIMATIC-E
- Eléctrodo selectivo de pH, CRINSON
- Vortex, HEIDOLPH
- Fluorímetro, FluoroMax-3, JOBIN YVON HORIBA

3.2.2 Procedimento

➤ **Observação do efeito de *quenching* do metavanadato e decavanadato em água**

Preparou-se uma solução com 10 μ L de NBD-C6 perfazendo com H₂O miliQ um volume final de 2mL. Esta solução funcionou como solução controlo. Mediu-se a intensidade de fluorescência e foi registado o valor obtido. Seguidamente prepararam-se soluções de metavanadato de 0.1mM, 0.2mM, 0.3mM, 0.4mM e 0.5mM para um volume final de 2mL, tendo em conta que foram adicionados 10 μ L de NBD-C6 em todos os tubos de ensaio. A seguir mediu-se a fluorescência das diferentes concentrações de metavanadato e registaram-se os valores obtidos. Depois preparou-se uma solução de decavanadato a pH 4 a partir da solução-mãe de metavanadato de amónia 10mM, tendo sido preparada com a adição de HCl. A seguir prepararam-se soluções de decavanadato de 0.1mM, 0.2mM, 0.3mM, 0.4mM e 0.5mM para um volume final de 2mL, adicionando-se 10 μ L de NBD-C6 em todos os tubos de ensaio (a concentração real de decavanadato é de 1mM). Mediram-se as intensidades de fluorescência de cada concentração de decavanadato. Este último ensaio foi repetido 5 vezes. Determinou-se finalmente a constante de *quenching* do NBD-C6 em água.

➤ **Determinação do mecanismo de *quenching***

Preparou-se uma solução de NaCl 2M e uma solução de decavanadato a pH 4 a partir da solução-mãe de metavanadato de amónia 10mM. Adicionaram-se 500 μ L de NaCl em 6 tubos de ensaio. A seguir adicionaram-se 10 μ L de NBD-C6 a cada tubo de ensaio. Ao tubo de controlo adicionou-se H₂O miliQ de modo a obter um volume final de 2mL. Mediu-se a fluorescência do tubo controlo e foi registado o valor obtido. Aos restantes tubos de ensaio adicionou-se decavanadato nas concentrações respectivas de 0.1mM, 0.2mM, 0.3mM, 0.4mM e 0.5mM de modo a obter um volume final de 2mL. Mediram-se as intensidades de fluorescência para cada concentração de decavanadato.

3.3 Observação do *quenching* do decavanadato com NBD-C16 em lipossomas

3.3.1 Material

- Solução de metavanadato de amónia 10mM (solução-mãe)
- Solução de NBD-DMPE de 25 μ M (NBD-C16)
- Solução de POPC 5mM
- HCl concentrado
- H₂O miliQ
- Clorofórmio
- Metanol
- 6 Tubos de ensaio
- 2 Pipetas graduadas de 0,5 \pm 0,005mL, BRAND
- Pipeta graduada de 10 \pm 0,04mL, Classe A, DIN
- Micropipetas P1000, P20, EPPENDORF research
- Micropipeta P200, GILSON
- Pipetas Pasteur
- 2 Seringas de 1mL, HAMILTON
- Avanti Mini-Extruder
- Filtros de policarbonato nucleopor 0,1 μ m
- Papel absorvente, Kimberly-Clark
- Ultra-som, Fisher Scientific FB15046
- Cuvette com agitador magnético
- Placa de aquecimento com agitação, AGIMATIC-E
- Eléctrodo selectivo de pH, CRINSON
- Vortex, HEIDOLPH
- Evaporador rotativo ligado a um controlador de vácuo, HEIDOLPIN
- Fluorímetro, FluoroMax-3, JOBIN YVON HORIBA

3.3.2 Procedimento

➤ **Preparação de LUV**

Num balão cônico adicionaram-se 0,080mL de NBD-C16 e 0,080mL de POPC. Em seguida evaporou-se o solvente orgânico a uma pressão de 145mbar e deixou-se correr até se formar um filme lipídico (aproximadamente 15 minutos). Depois diminui-se a pressão para 5mbar e baixou-se o evaporador rotativo de modo a que o balão ficasse embebido dentro de um banho de água a 30°C, durante uma hora. Após este tempo retirou-se o balão cônico e adicionaram-se 3,2mL de H₂O miliQ, tapou-se com parafilm o balão e foi deixado no banho de água a 30°C durante mais uma hora, com agitação mecânica esporádica (a suspensão obtida contém os lipossomas). Montou-se o Avanti Mini-Extruder de modo a produzir os LUV por extrusão, usando filtros de policarbonato Nucleopor 0,1µm. Retirou-se 1mL de lipossomas com uma seringa e transferiu-se pelo Avanti Mini-Extruder para outra seringa. Este processo foi repetido 21 vezes de modo a garantir a obtenção de LUV. Repetiu-se esse processo para os restantes 2mL de lipossomas.

➤ **Observação do mecanismo de *quenching* pelo decavanadato na presença de LUV**




Foi preparada uma solução com 400µL de LUV e o resto com H₂O miliQ, perfazendo um volume final de 2mL. Esta solução foi tida como solução controlo. Mediu-se a intensidade de fluorescência e registou-se o valor obtido. Depois foi preparada uma solução de decavanadato a pH 4 a partir da solução-mãe de metavanadato de amónia 10mM, tendo sido adicionada HCl. A seguir prepararam-se soluções de decavanadato de 0.1mM, 0.2mM, 0.3mM, 0.4mM e 0.5mM para um volume final de 2mL, tendo em conta que se adicionaram 400µL de LUV em todos os tubos de ensaio. Mediram-se as intensidades de fluorescência de cada concentração de decavanadato. Repetiu-se este último ensaio 4 vezes. Determinou-se por fim a constante de *quenching* do NBD-C16 em LUV.

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação do tempo desoligomerização do decavanadato

Na tabela I é possível observar as cores obtidas aquando da preparação das soluções de metavanadato e decavanadato a diferentes pH's.

Tabela I – Registo do pH e da coloração obtida pelos diferentes oligómeros do vanádio

	Metavanadato	Decavanadato	Decavanadato
pH	8,16	7,53	5,84
Coloração	Incolor	Amarelo	Amarelo escuro
Imagem			

Antes de se proceder ao estudo da desoligomerização do decavanadato é necessário saber qual o comprimento de onda de máxima absorção do decavanadato na região do visível. Na seguinte figura pode-se observar a curva de absorvência do metavanadato (curva menos carregada) e do decavanadato (curva mais carregada). Pode-se então constatar que o comprimento de onda em que o decavanadato absorve é de 400nm no visível correspondendo isso a uma absorvência de 0,10938. O metavanadato por sua vez possui uma absorvência aproximadamente constante, devendo-se tal ao facto de a luz ser toda transmitida e não absorvida, pelo que esta é a razão de a solução ser incolor. Verifica-se também que as curvas de absorção do metavanadato e do decavanadato aumentam quando atingem a região do ultravioleta (380nm). Esse facto deve-se às vibrações das ligações vanádio-oxigénio. Porém como não foram utilizada cuvettes de quartzo, essa zona não irá interessar para este trabalho, pois o estudo foi efectuado exclusivamente na região do visível, daí ser importante verificar onde se situa o máximo de absorção do decavanadato no visível.

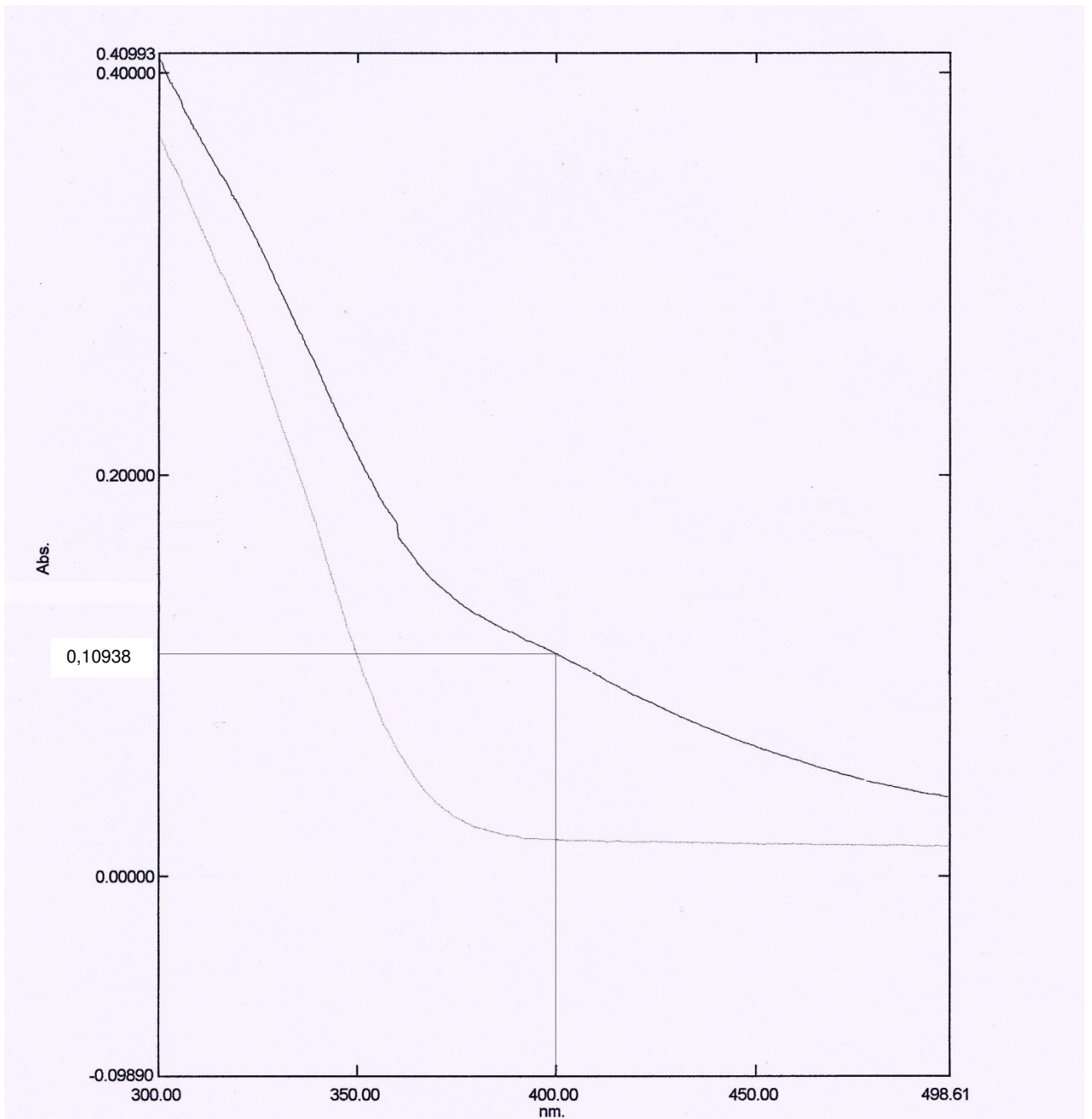


Figura 7 – Espectro de absorção do metavanadato (curva menos carregada) e decavanadato (curva mais carregada).

Para estudar a desoligomerização do decavanadato efectuaram-se vários ensaios cinéticos, fazendo variar vários factores que influenciam a estabilidade do decavanadato no meio aquoso. Os dois primeiros ensaios foram efectuados a temperatura ambiente (23°C) durante 4 horas, utilizando decavanadato 1mM.

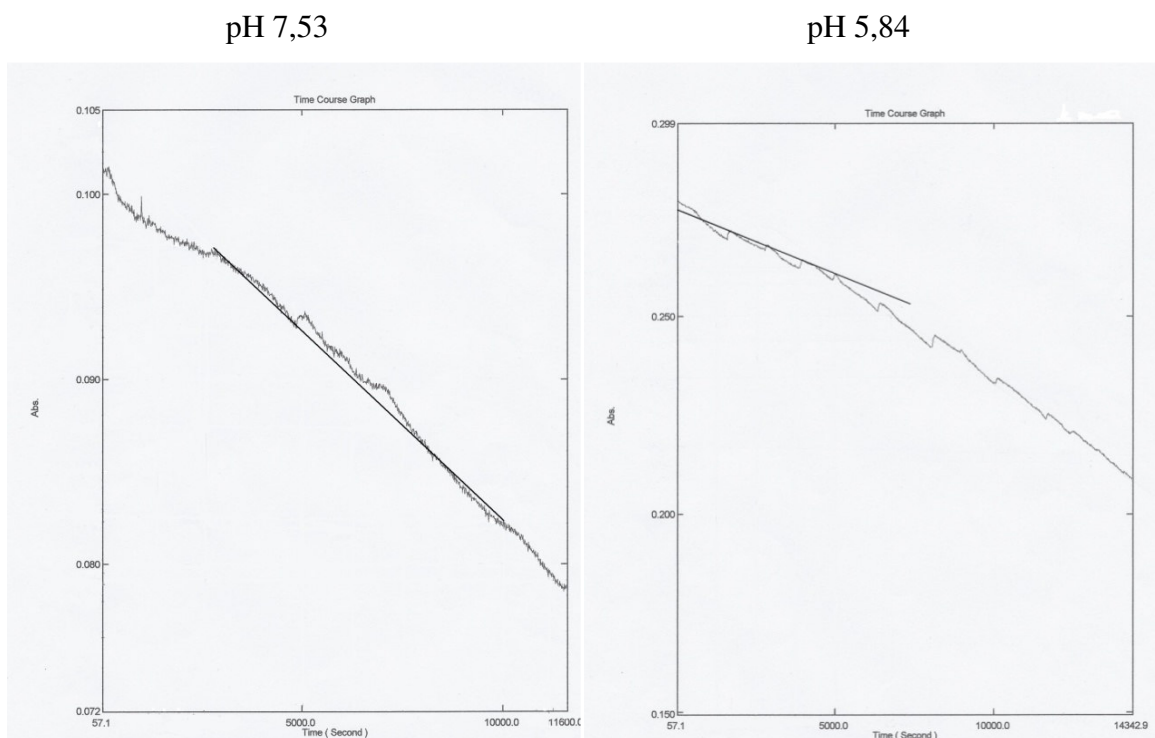


Figura 8 – As curvas da desoligomerização do ensaio 1 (imagem a esquerda) e do ensaio 2 (imagem a direita).

Os próximos quatro ensaios foram novamente efectuados com decavanadato 1mM a pH 5,84 e 7,53, mas desta vez a 25°C durante uma hora. Dois ensaios foram após meia hora agitados, enquanto os outros dois não tiveram agitação, ou seja, a experiência decorreu normalmente sem interrupção. Infelizmente não foi possível efectuar um estudo cinético com agitação constante devido a falta de material laboratorial que possibilitasse este ensaio.

pH 7,53

pH 5,84

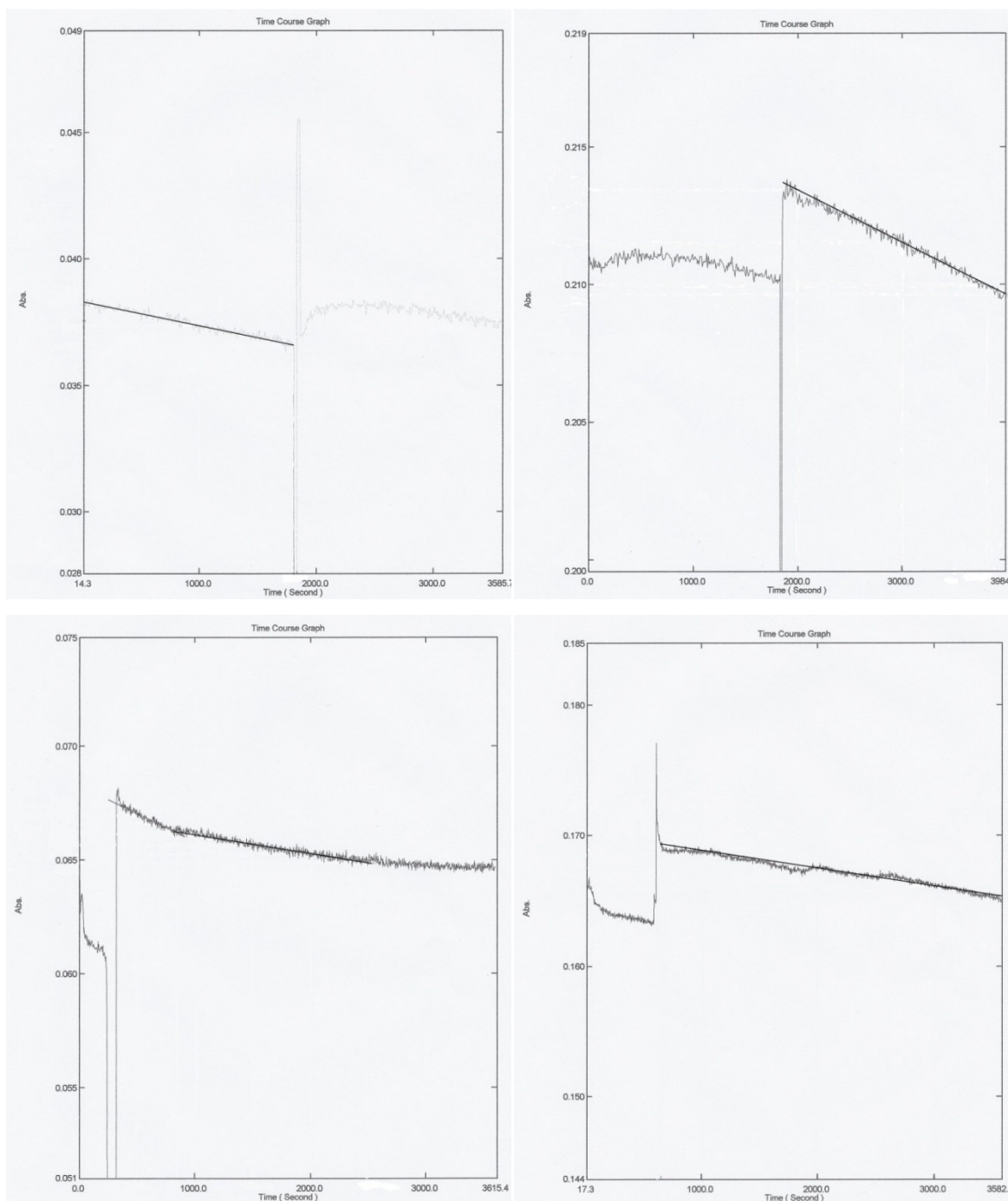


Figura 9 – As curvas da desoligomerização do decavanadato do ensaio 3 (imagem a esquerda de cima), ensaio 4 (imagem a direita de cima), ensaio 5 (imagem a esquerda de baixo) e do ensaio 6 (imagem a direita de baixo). Os ensaios 3 e 4 são os que foram agitados após meia hora de ensaio cinético.

A seguir foram efectuados estudos cinéticos com decavanadato 2mM, também a 25°C durante uma hora. Pode-se verificar a partir dos gráficos obtidos que a linha se mantém constante, não ocorrendo assim qualquer desoligomerização do decavanadato.

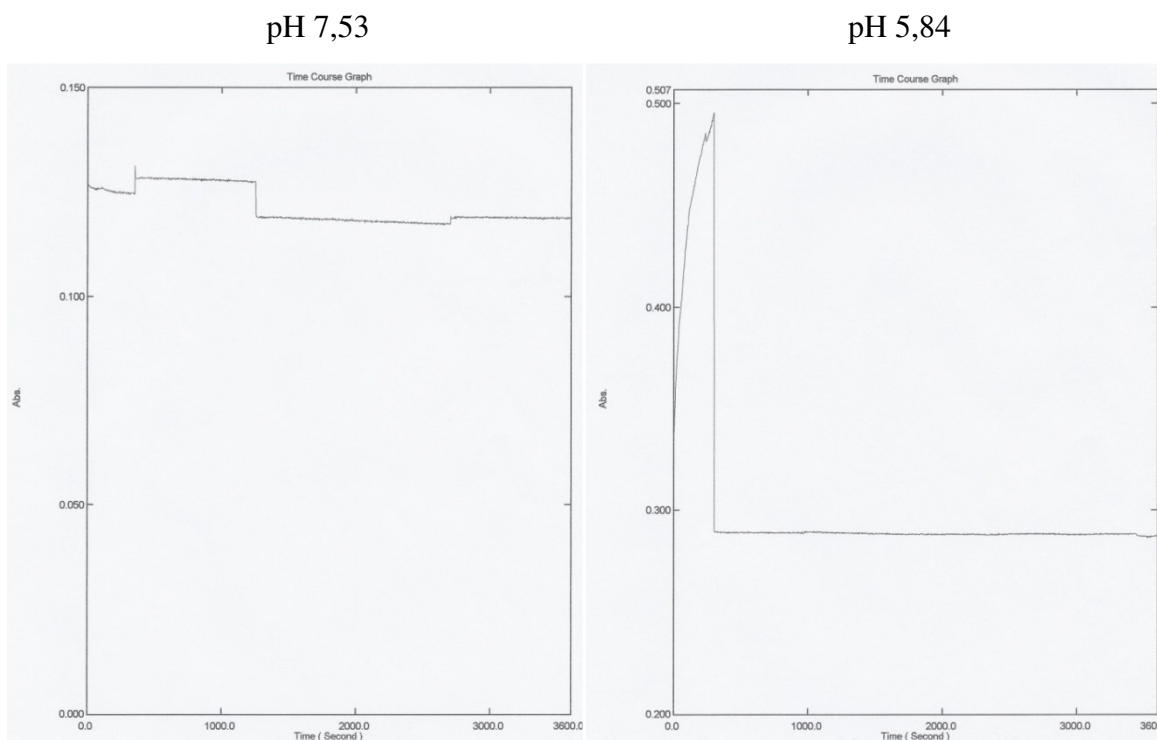


Figura 10 – As curvas da desoligomerização do ensaio 7 (imagem a esquerda) e do ensaio 8 (imagem a direita).

Devido aos resultados obtidos, repetiu-se o mesmo ensaio cinético, mas desta vez a 37°C. Através dos gráficos obtidos observa-se um acentuado decréscimo da desoligomerização do decavanadato.

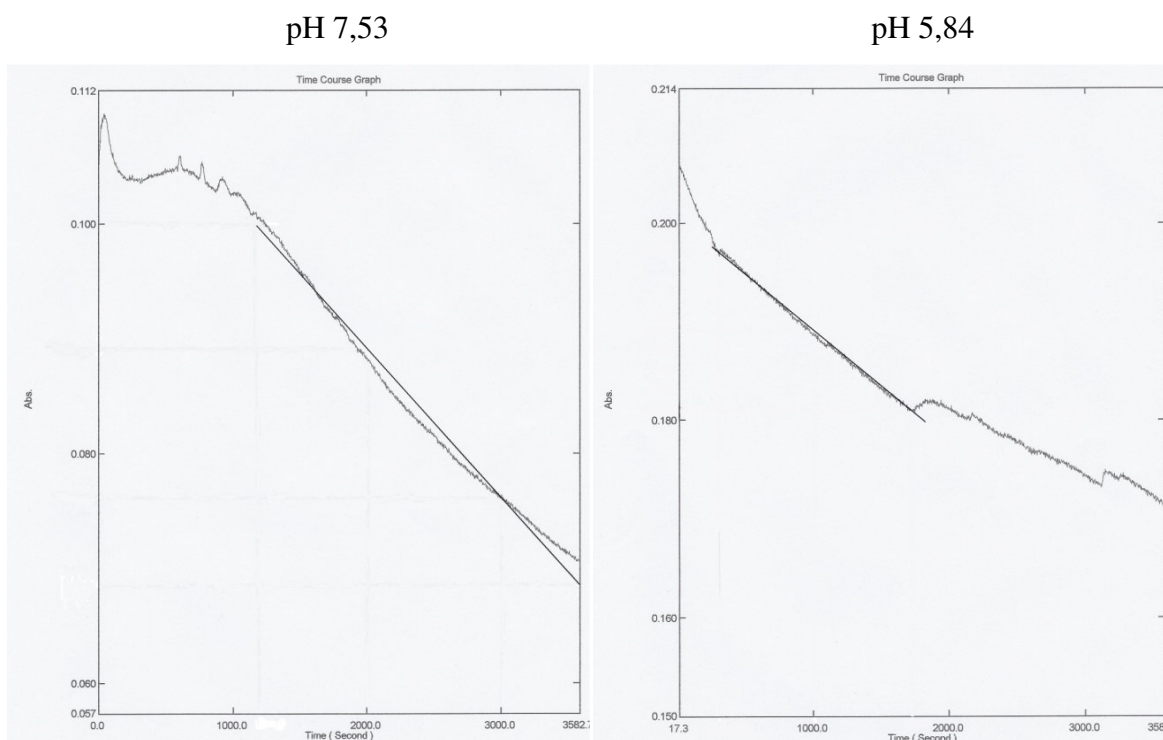
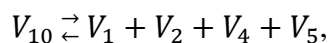


Figura 11 – As curvas de desoligomerização do ensaio 9 (imagem a esquerda) e do ensaio 10 (imagem a direita).

A desoligomerização do decavanadato segue uma cinética de primeira ordem



sendo portanto a equação da reacção de primeira ordem descrita da seguinte forma [21]:

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -kt.$$

Como os ensaios cinéticos foram medidos na unidade de absorvência utiliza-se a equação acima referida, substituindo a concentração de reagente pela absorvência

$$\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = -kt.$$

É possível observar nos gráficos de cada ensaio que foi efectuada uma linearização de modo a poder-se calcular o tempo de meia-vida de cada ensaio. Para tal é necessário efectuar um gráfico de $\ln(abs/abs_0)$ em função do tempo para cada ensaio

de modo a se poder tirar o declive da recta (k). Em seguida estão representados os gráficos de todos os ensaios, excepto os ensaios 7 e 8, pois estes estudos cinéticos foram constantes ao longo do tempo do ensaio.

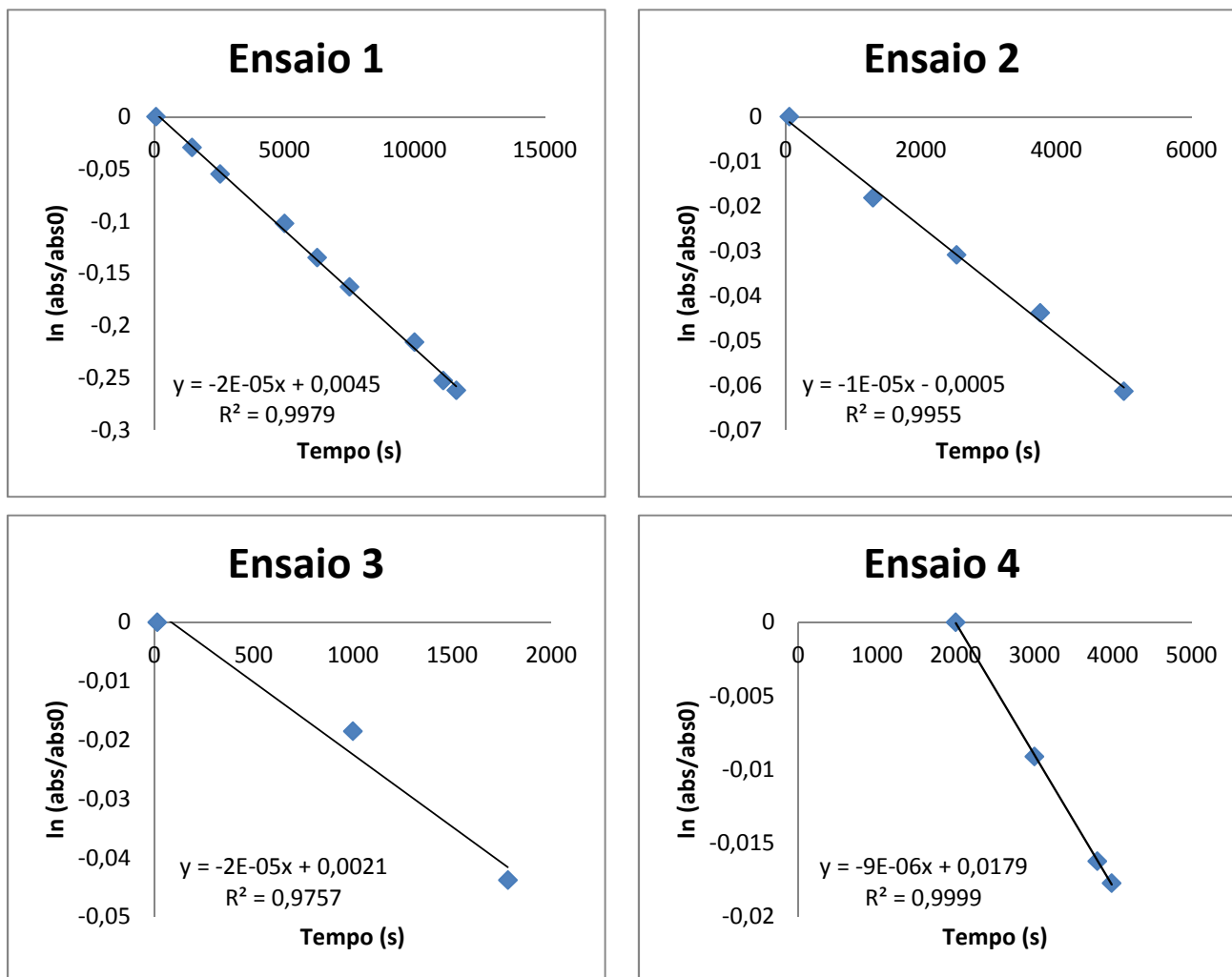


Figura 12 – Gráficos dos estudos cinéticos dos ensaio 1, 2, 3 e 4, de $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ em função do tempo em segundos.

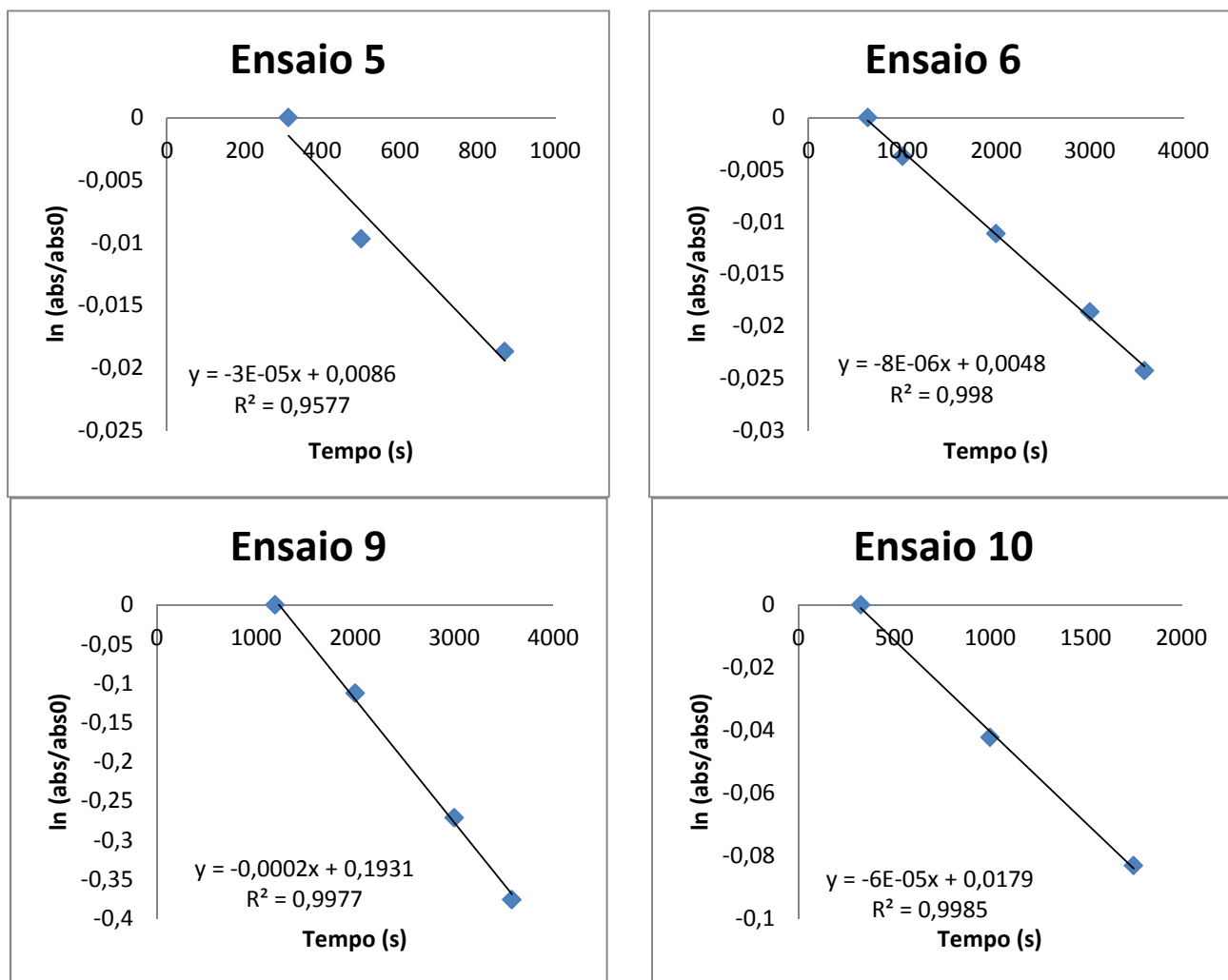


Figura 13 – Gráficos dos estudos cinéticos dos ensaios 5, 6, 9 e 10, de $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ em função do tempo em segundos.

O tempo de meia-vida de uma reacção de primeira ordem é dado pela seguinte equação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

em que o k corresponde ao declive da recta de um ensaio [21]. Deste modo é possível calcular o tempo de meia-vida, ou seja, o tempo de desoligomerização do decavanadato utilizando simplesmente o valor do declive da recta da equação. Os resultados obtidos estão representados na seguinte tabela.

Tabela II – Tempo de meia-vida de cada ensaio cinético

Ensaio	pH	Concentração de V ₁₀ (mM)	Temperatura (°C)	Tempo de meia-vida (segundos)	Tempo de meia-vida (horas:minutos:segundos)
1	7,53	1	Temperatura ambiente	34657,36	9:37:37
2	5,84	1	Temperatura ambiente	69314,72	19:15:14
3	7,53	1	25	34657,36	9:37:37
4	5,84	1	25	77016,35	21:23:36
5	7,53	1	25	23104,91	6:25:04
6	5,84	1	25	86643,40	24:04:03
7	7,53	2	25	Constante	Constante
8	5,84	2	25	Constante	Constante
9	7,53	2	37	3465,74	0:57:45
10	5,84	2	37	11552,45	3:12:32

A partir dos resultados obtidos é possível verificar que a 25°C, o decavanadato a pH 5,84, o tempo de meia-vida varia entre 21:23 horas e 24:04 horas, enquanto a pH 7,53 o tempo de meia-vida varia entre 9:37 horas e 6:25 horas. Verifica-se então que quanto menor o pH do decavanadato, mais estável é a espécie decamérica em solução aquosa. Também se verifica que quando é aumentada a concentração de decavanadato, mantendo a temperatura constante, a espécie decamérica é ainda mais estável, pois a concentração de decavanadato mantêm-se constante, tanto a pH 5,84, como a 7,53. Porém, quando a temperatura é aumentada as espécies decaméricas tornam-se bastante instáveis, principalmente a um pH mais alto, como se pode verificar para o pH 7,53 (tempo de meia-vida é de 0:57 horas). Para uma temperatura mais baixa as espécies decaméricas são mais estáveis em solução aquosa, como se pode observar nos resultados obtidos acima. Então podemos concluir que quanto mais baixo o pH e a temperatura, e quanto maior for a concentração de decavanadato, mais estáveis se tornam as espécies decaméricas em solução aquosa.

Segundo a lei da velocidade de uma reação de primeira ordem, o tempo de meia-vida do decavanadato supostamente não depende da concentração deste. Porém, verifica-se o contrário pelos resultados obtidos. Isto acontece porque como o vanádio é um metal de transição possui propriedades químicas específicas. Neste caso verifica-se que quanto maior for a concentração mais estável será a espécie decamérica. Aliás, todas estas medidas ajudaram a compreender que existe uma grande dependência entre os valores de concentração, pH e temperatura.

As experiências seguintes irão decorrer a 25°C com decavanadato a pH 4 e uma concentração menor que 1mM, pelo que existe tempo suficiente para executar as experiências.

4.2 Medição da fluorescência do NBD-C6 em água com metavanadato

Experiências preliminares mostraram que o metavanadato não tem a capacidade de *quenchar* a sonda NDB-C6 em H₂O miliQ pois não houve alteração da intensidade de fluorescência, ou seja, tanto na ausência como na presença de metavanadato, a intensidade de fluorescência permanecia inalterada.

4.3 Medição da fluorescência do NDB-C6 em água com decavanadato

Verificou-se experimentalmente que o decavanadato, ao contrário do metavanadato, tem a capacidade de *quenchar* a sonda NBD-C6 em H₂O miliQ. Na seguinte tabela encontram-se as intensidades de fluorescência medidas pelo fluorímetro para as diferentes concentrações de decavanadato:

Tabela III – Intensidade de fluorescência (cps – *counts per second*) de cada ensaio na ausência e na presença de diferentes concentrações de decavanadato e a respectiva média

Concentração de V10 (M)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Média
0	263,018	247,351	264,289	222,424	320,077	263,4318
1,00E-04	214,320	207,544	232,954	184,404	187,057	205,2558
2,00E-04	241,539	161,299	198,855	181,217	192,639	195,1098
3,00E-04	267,350	144,034	193,287	126,765	141,601	174,6074
4,00E-04	154,526	149,864	155,986	175,162	156,075	158,3226
5,00E-04	166,943	128,245		144,761	134,136	143,5213

Como se pode observar existe um decréscimo gradual da intensidade de fluorescência na adição de decavanadato, daí ser possível afirmar que o decavanadato tem a capacidade de *quenchar* a sonda NBD-C6 em H₂O miliQ. Para se proceder a um gráfico de Stern-Volmer é necessário dividir a intensidade de fluorescência média na ausência de *quencher* por cada intensidade de fluorescência média de cada concentração diferente de decavanadato. O seguinte cálculo representa a divisão da intensidade de fluorescência na ausência de *quencher* pela intensidade de fluorescência na presença de 0,1mM de decavanadato:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = \frac{263,4318}{205,2558} = 1,283432$$

A seguinte tabela mostra os valores obtidos por este cálculo para cada concentração diferente de *quencher* incluindo o zero.

Tabela IV – Intensidade de fluorescência média na ausência de V₁₀ a dividir pela intensidade de fluorescência média de cada concentração diferente de V₁₀

Concentração de V10 (M)	I _{f0} /I _f
0	1
1,00×10 ⁻⁴	1,283432
2,00×10 ⁻⁴	1,350172
3,00×10 ⁻⁴	1,508709
4,00×10 ⁻⁴	1,663893
5,00×10 ⁻⁴	1,83549

Com os valores obtidos na tabela IV foi possível construir o gráfico de Stern-Volmer para assim se poder obter a constante de *quenching* do decavanadato em água.

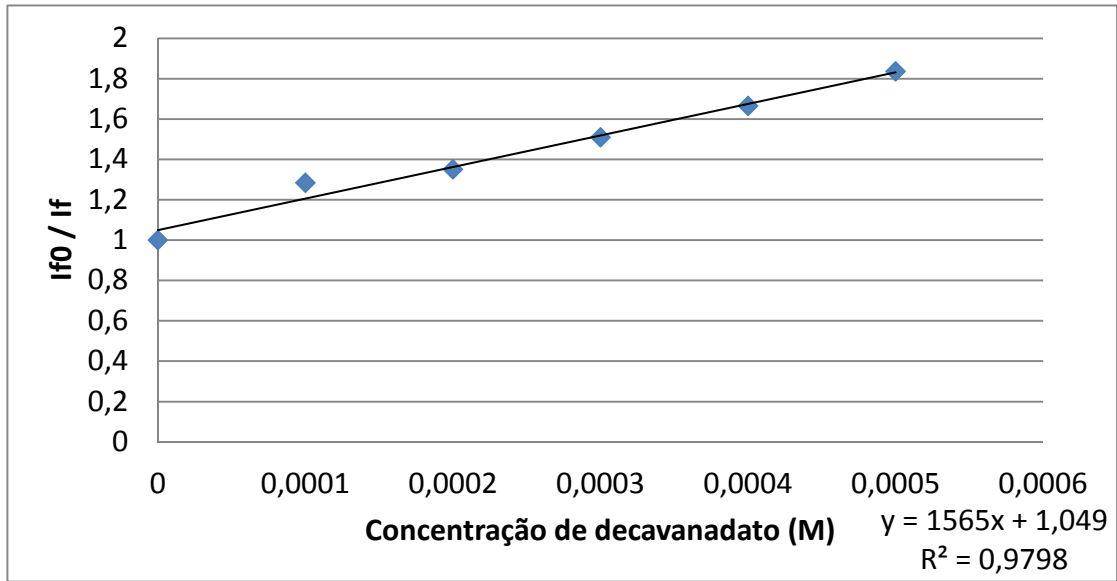


Figura 14 – Gráfico de Stern-Volmer

Como já referido anteriormente na introdução, a equação de Stern-Volmer é descrita pela seguinte fórmula:

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + k_Q \times \tau_0 \times [Q]$$

em que τ_0 é igual a 0,933 ns em água. O valor do declive obtido na equação da recta é 1565. Como o declive (m) é igual a $k_Q \times \tau_0$, podemos facilmente calcular o valor da constante de *quenching* (k_Q):

$$k_Q = \frac{1565}{\tau_0} = \frac{1565}{0,933 \times 10^{-9}} = 1,677 \times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$$

A constante de *quenching* para o NBD-C6 pelo decavanadato em água é de $1,677 \times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$.

4.4 Determinação do mecanismo de *quenching* utilizado pelo decavanadato

Foi discutido na introdução que o decavanadato pode *quencher* a sonda por duas maneiras, *quenching* por colisão ou por transferência electrónica. Para provarmos qual o mecanismo de *quenching* que ocorre, adicionou-se NaCl 2M para anular as cargas electrónicas da solução. Se ocorrer *quenching* é porque é por colisão, caso contrário, será por transferência electrónica.

A seguinte tabela ilustra as intensidades de fluorescência obtidas por diferentes concentrações de decavanadato com NBD-C6 e NaCl 2M.

Tabela V - Intensidade de fluorescência (cps – *counts per second*) de cada ensaio na presença de diferentes concentrações de V10 e NaCl 2M

Concentração de V10 (M)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
0	118,320	124,461	164,799	181,195
$1,00 \times 10^{-4}$	136,867	106,370	174,207	158,305
$2,00 \times 10^{-4}$	145,214	112,612	145,117	193,608
$3,00 \times 10^{-4}$	185,155	133,986	141,343	137,070
$4,00 \times 10^{-4}$	215,832	155,231	146,000	124,845
$5,00 \times 10^{-4}$	137,125	128,075	172,563	122,654

É possível verificar-se que os valores de intensidade de fluorescência na ausência de decavanadato é muito inferior ao constatado para os ensaios sem a adição do sal o que torna estes ensaios inválidos para a determinação do mecanismo de *quenching*. Estes ensaios só seriam válidos para o caso de as intensidades de fluorescência estarem na gama dos ensaios sem a presença do NaCl. Porém também se pode constatar que as intensidades sobem e descem o que pode indicar que o NaCl pode estar a alterar a estabilidade do decavanadato. Ainda se utilizou outro sal, o fosfato de sódio na concentração de 0,625M, para determinar o mecanismo de *quenching*. Porém, também nesse ensaio, a intensidade de fluorescência na ausência de decavanadato ($I_{f0} = 113,478$) deu abaixo da gama das intensidades de fluorescência sem sal. Sendo assim, não é possível determinar qual o mecanismo de *quenching* usado por este método.

4.5 Medição da intensidade de fluorescência do NBD-C16 em lipossomas com decavanadato

Foi dito na introdução que os lipossomas são a melhor aproximação para simular ensaios para as membranas biológicas. Sendo assim, a seguinte tabela mostra os ensaios de *quenching* do decavanadato em lipossomas de POPC contendo 1% de NBD-C16.

Tabela VI – Intensidade de fluorescência (cps – *counts per second*) para diferentes concentrações de V10 na presença de lipossomas contendo NBD-C16 e a respectiva média

Concentração de V10 (M)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Média
0	1303863,42	1304442,32	1271671,08	1244319,99	1281074,203
$1,00 \times 10^{-4}$	1224123,80	1238945,91	1174780,38	1188062,56	1206478,163
$2,00 \times 10^{-4}$	1140003,03	1161782,67	1115690,71	1097601,44	1128769,463
$3,00 \times 10^{-4}$	1100747,26	1093740,74	1056519,60	1099216,33	1087555,983
$4,00 \times 10^{-4}$	1006660,49	1053307,46	983194,00	1004251,50	1011853,363
$5,00 \times 10^{-4}$	1057083,88	996728,00	967033,00		1006948,000

Como se pode observar existe um decréscimo gradual da intensidade de fluorescência na adição de decavanadato, daí podemos afirmar que o decavanadato tem a capacidade de *quenchar* a sonda NBD-C16 nos lipossomas. Para se proceder a um gráfico de Stern-Volmer é necessário dividir a intensidade de fluorescência média na ausência de *quencher* por cada intensidade de fluorescência média de cada concentração diferente de decavanadato. A seguinte tabela mostra os valores obtidos por este cálculo para cada concentração diferente de *quencher* incluindo o zero.

Tabela VII – Intensidade de fluorescência média na ausência de decavanadato a dividir pela intensidade de fluorescência média de cada concentração diferente de decavanadato

Concentração de V10 (M)	I_{f0}/I_f
0	1
$1,00 \times 10^{-4}$	1,062
$2,00 \times 10^{-4}$	1,135
$3,00 \times 10^{-4}$	1,178
$4,00 \times 10^{-4}$	1,266
$5,00 \times 10^{-4}$	1,272

Com os valores obtidos na tabela VII é possível construir o gráfico de Stern-Volmer para assim se poder obter a constante de *quenching* do decavanadato em lipossomas.

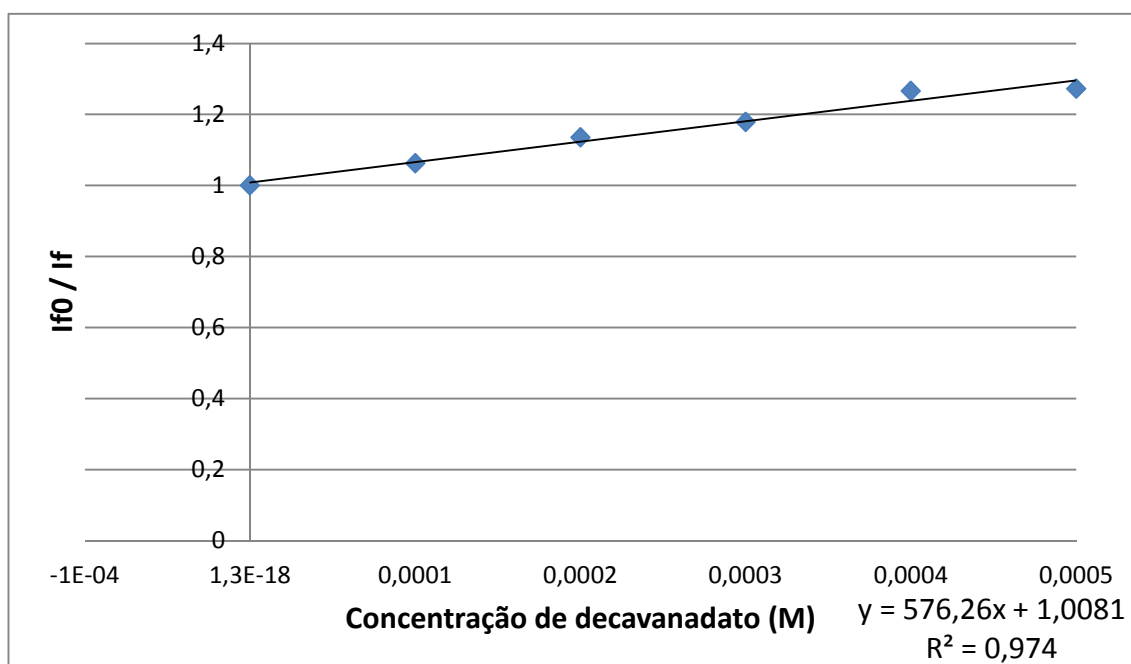


Figura 15 – Gráfico de Stern-Volmer

Pela equação de Stern-Volmer temos que

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + k_Q \times \tau_0 \times [Q]$$

em que τ_0 é entre 7 - 10 ns em solventes apróticos. Decidiu-se em usar 8 ns. O valor do declive obtido na equação da recta é 576,26. Como o declive (m) é igual a $k_Q \times \tau_0$, podemos facilmente calcular o valor da constante de *quenching* (k_Q):

$$k_Q = \frac{576,26}{\tau_0} = \frac{576,26}{8,00 \times 10^{-9}} = 7,20 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$$

A constante de *quenching* do decavanadato em lipossomas é de $7,20 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$. Em virtude de ser impossível um mecanismo de *quenching* por transferência de energia do NBD para o decavanadato, pois a emissão do NBD ocorre a 540 nm e a absorção do

oligómero tem lugar a 400 nm, resta a hipótese da ocorrência de um de dois mecanismos colisionais. Quer isto dizer, que a ocorrência de *quenching* do NBD ligado covalentemente ao grupo etanolamina de um fosfolípido inserido numa bicamada lipídica, implica a colisão com o agente de *quenching* na superfície da bicamada. Deste modo, fica provada a interação física entre o decavanadato e a superfície lipídica.

5. Conclusões

Com este trabalho experimental verificou-se que o decavanadato não possui um tempo de meia-vida fixo, mas sim largamente variado ao longo do tempo, dependendo disso do pH, temperatura e concentração. Verificou-se então que quanto mais baixos forem o pH e a temperatura e mais alta for a concentração da espécie decamérica, maior será o tempo de meia-vida do decavanadato.

Verificou-se também que o metavanadato não é capaz de *quenchar* a sonda de fluorescência escolhida para este trabalho experimental em água, nomeadamente o NBD-C6, mas que o decavanadato é capaz de *quenchar* a sonda NBD-C6 em água, sendo a constante de *quenching* igual a $1,677 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Porém não foi possível determinar qual o mecanismo de *quenching* usado pelo decavanadato, pois o próprio sal utilizado para anular as cargas da solução, *quenchava* a sonda de fluorescência. De modo a poder-se determinar o mecanismo de *quenching*, seria necessário repetir o trabalho experimental com outra sonda fluorescente, menos sensível, mas que fosse passível de ser *quenchada* apenas pelo decavanadato. Isto de modo a que o sal utilizado para anular as cargas da solução não *quenchasse* a nova sonda de fluorescência utilizada.

Também se provou que o decavanadato é capaz de *quenchar* a sonda NBD-C16 inserida nos lipossomas, sendo a sua constante de *quenching* igual a $7,20 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Como os lipossomas são as estruturas biológicas que mais se assemelham com as membranas biológicas, fica comprovado que o decavanadato interage com bicamadas lipídicas zwitteriônicas, o que poderá indicar que também interactuará com membranas biológicas.

Por fim e para complementar este trabalho experimental, os resultados obtidos deveriam ser confirmados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), de modo a comprovar a interacção da espécie decamérica com lipossomas através do esboroamento dos picos característicos de diferentes núcleos de vanádio no oligómero decamérico, sendo isto, portanto, uma perspectiva futura pertinente para a continuação deste trabalho experimental.

6. Referências Bibliográficas

1. Tabela Periódica dos Elementos, Porto Editora, 2004.
2. ZORZANO, A., PALACÍN, M., MARTI, L., GARCÍA-VICENTE, S., 2009, *Journal of Inorganic Biochemistry* 103, 559.
3. TRÍFONOV, D. N., TRÍFONOV, V. D., 1984, *Como Fueron Descubiertos los Elementos Químicos*, Mir.
4. AURELIANO, M., 2007, *Vanadium Biochemistry*, 46.
5. CURTIS, D., KLAASSEN, Ph.D., 2001, *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of Poisons*, 6ª edição, McGraw-Hill, 857-858.
6. AURELIANO, M., 2007, *Vanadium Biochemistry*, 34.
7. AURELIANO, M., CRANS, D., 2009, *Journal of Inorganic Biochemistry* 103, 537-538.
8. AURELIANO, M., 2007, *Vanadium Biochemistry*, 2-9.
9. LOURA, L., ALMEIDA, R., 2004, *Tópicos de Biofísica de Membranas*, LIDEL, 15-20.
10. RICKWOOD, D., HAMES, B., 1990, *Liposomes a practical approach*, IRL PRESS, 1-32.
11. VOET, D., VOET, J., 2004, *Biochemistry – 3rd Edition*, WILEY, 391-392.
12. http://wikipremed.com/image_science_archive_th/040201_th/264300_Popc_details_68.jpg, 8/9/2009.
13. MAZÈRES, S., SCHRAM, V., TOCANNE, J.F., LOPEZ, A., 1996, *Biophysical Journal*, 327-334.
14. LIN, S., STRUVE, WS., *PubMed abstract: Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole-aminohexanoic: effect of intermolecular hydrogen-bonding on non-radiative decay.*
15. GREENOUGH, K., BLANCHARD, G., 2006, *The Journal of Physical Chemistry B* 110(12), 6351-6357.
16. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2c/NBD.png/638px-NBD.png>, 8/9/2009.
17. ATKINS, P., PAULA, J., 2002, *ATKINS Físico-Química - Volume 3*, 7ª edição, LTC Editora, 107-120.
18. VALEUR, B., 2002, *Molecular Fluorescence – Principles and Applications*, WILEY-VCH, 34-41.
19. VALEUR, B., 2002, *Molecular Fluorescence – Principles and Applications*, WILEY-VCH, 72-98.
20. SASAKI, H., WHITE, SH., *PubMed abstract: A novel fluorescent probe that senses the physical state of lipid bilayers.*
21. ATKINS, P., PAULA, J., 2002, *ATKINS Físico-Química - Volume 3*, 7ª edição, LTC Editora, 58-62.