



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE FÍSICA (IF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA (PPG-FÍS)

GUSTAVO ALMEIDA E SILVA

**Caracterização espectroscópica da Bufotenina e do Óxido de
bufotenina e suas interações com membranas modelo**

GOIÂNIA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Gustavo Almeida e Silva

3. Título do trabalho

Caracterização espectroscópica da bufotenina e do óxido de bufotenina e suas interações com membranas modelo

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Cássia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 01/08/2022, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GUSTAVO ALMEIDA E SILVA, Discente**, em 01/08/2022, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3081120** e o código CRC **9FF9D77F**.

Referência: Processo nº 23070.034120/2022-04

SEI nº 3081120



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC n° 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Gustavo Almeida e Silva

3. Título do trabalho

Caracterização espectroscópica da bufotenina e do óxido de bufotenina e suas interações com membranas modelo

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 07/05/2025, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Almeida E Silva, Usuário Externo**, em 13/05/2025, às 14:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5352923** e o código CRC **B8514786**.

Referência: Processo nº 23070.034120/2022-04

SEI nº 5352923

GUSTAVO ALMEIDA E SILVA

**Caracterização espectroscópica da Bufotenina e do Óxido de
bufotenina e suas interações com membranas modelo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, do
Instituto de Física, da Universidade Federal de Goiás (UFG),
como requisito para obtenção do título de Doutor em Física.

Área de concentração: Física

Linha de pesquisa: Biofísica

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Cássia Alessandra Marquezin

Goiânia
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Gustavo Almeida e
Caracterização espectroscópica da Bufotenina e do Óxido de bufotenina e suas interações com membranas modelo [manuscrito] / Gustavo Almeida e Silva. - 2022.
CVIII, 108 f.

Orientador: Profa. Dra. Cássia Alessandra Marquezin.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2022.

1. Bufotenina. 2. Absorção óptica. 3. Fluorescência. 4. Micelas. 5. Vesículas fosfolipídicas. I. Marquezin, Cássia Alessandra, orient. II. Título.

CDU 53



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 64 da sessão de Defesa de Tese de Gustavo Almeida e Silva que confere o título de Doutor em Física, na área de concentração em Física.

Aos 21 dias do mês de julho de 2022, a partir das 14h00min, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Caracterização espectroscópica da bufotenina e do óxido de bufotenina e suas interações com membranas modelo”. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Cássia Alessandra Marquezin (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Eduardo Sérgio de Souza (IF/UFCAT), membro titular externo; Professor Doutor Gabriel Silva Vignoli Muniz (IQ/UnB), membro titular externo; Professora Doutora Karin do Amaral Riske (EPM/UNIFESP), membro titular externo; e Professor Doutor Antonio Alonso (IF/UFG), membro titular interno. Durante a arguição, os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Cássia Alessandra Marquezin, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 21 dias do mês de julho de 2022.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Karin do Amaral Riske, Usuário Externo**, em 21/07/2022, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Silva Vignoli Muniz, Usuário Externo**, em 21/07/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cássia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 21/07/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 21/07/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Sérgio De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 21/07/2022, às 18:01, conforme



horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3003637** e o código CRC **2B2B258D**.

Referência: Processo nº 23070.034120/2022-04

SEI nº 3003637

Aos meus pais, Adailton e Adriana;

Ao meu irmão, Gui;

A todos os injustiçados sociais;

A todos que, de alguma forma, sofrem da estupidez do preconceito

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Cássia pela orientação, sempre com muita paciência e extrema dedicação; por todos os momentos de conversas e troca de experiências.

Ao professor Alonso por disponibilizar o fluorímetro e toda estrutura do laboratório.

Ao grupo de Física de Materiais – IF por disponibilizar o espectrofotômetro.

À professora Lucília Kato e ao colega Vinícius Galvão do Instituto de Química por sintetizar e fornecer os compostos utilizados na pesquisa.

A todos que passaram em minha vida durante estes quatro (duros) anos e que de alguma forma contribuíram ou torceram pelo meu sucesso.

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional.

À Capes pelo suporte financeiro no período de 01/08/2018 a 28/02/2021.

A Deus, pela força e sabedoria.

RESUMO

Neste trabalho, estudamos propriedades de absorção óptica e emissão fluorescente da 5-hidroxi-N,N dimetiltryptamina (Bufotenina) e do N-óxido-5-hidroxi-N,N-dimetiltryptamina (Óxido de bufotenina). Na presença de solventes orgânicos as moléculas apresentaram duas bandas de absorção óptica; os espectros indicam deslocamento espectral para o vermelho em solvente de caráter aprótico. Foram calculados os coeficientes de absorção de ambas as moléculas em diversos solventes. Ainda na presença de solventes orgânicos foram obtidos espectros de emissão fluorescente, observando que a intensidade diminui com o aumento da polaridade do meio. Medidas de anisotropia de fluorescência nos diversos solventes sugerem que não há formação de agregados na faixa de concentração estudada. Em solução aquosa as moléculas apresentaram fluorescência em uma ampla faixa de pH. Foram observadas alterações nos espectros de absorção e emissão para diferentes valores de pH, o que sugere a existência de estruturas absorvedoras diferentes (espécies protonadas/desprotonadas). Os resultados dos experimentos das moléculas na presença de surfactantes sugerem que as moléculas se encontram na superfície externa da micela, a partir de determinada concentração do surfactante. Na presença de membranas modelos de células, os resultados mostram que as moléculas se localizam na interface entre os grupos polares dos fosfolipídios e a água.

Palavras-chave: Bufotenina, absorção óptica, fluorescência, micelas, vesículas fosfolipídicas.

ABSTRACT

In this work, optical absorption and fluorescence emission properties of 5-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine (Bufotenine) and N-oxi-5-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine (Bufotenine oxide) were studied. In the presence of organic solvents the molecules presented two optical absorption bands; the spectra indicate a red shift in an aprotic solvent. The absorption coefficients of both molecules in several solvents were calculated. Also in the presence of organic solvents, fluorescent emission spectra were obtained, and it was observed that the intensity decreases with increasing the polarity of the medium. Fluorescence anisotropy measurements in the several solvents suggest that no aggregates are present in the concentration range studied. In aqueous solution the molecules showed fluorescence over a wide pH range. Changes in the absorption and emission spectra were observed for different pH values, suggesting the existence of different absorber structures (protonated/deprotonated species). The results for the molecules in the presence of surfactants suggest that molecules are located on the outer surface of the micelle, above a specific concentration of the surfactant. In the presence of model cell membranes, the results show that the molecules are located at the interface between the polar groups of the phospholipids and the water.

Key-words: Bufotenine, optical absorption, fluorescence, micelles, phospholipid vesicles.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina (Bufotenina) e N-óxido-5-hidroxi-N-N-dimetiltriptamina (Óxido de bufotenina)	10
1.2. Espectroscopia de absorção óptica	13
1.3. Lei de Lambert-Beer	16
1.4. Espectroscopia de Fluorescência	17
1.5. Rendimento quântico	19
1.6. Anisotropia de fluorescência	20
1.7. Efeitos de solvente	23
1.8. Sistemas miméticos para membrana celular: micelas e vesículas fosfolipídicas	25
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Equipamentos	33
3.2. Preparação de amostra	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1. Bufotenina em solventes	38
4.1.1. Espectros de absorção.....	38
4.1.2. Espectros de emissão fluorescente	43
4.1.3. Anisotropia de fluorescência	48
4.2. Bufotenina em solução aquosa com variação do pH	49
4.2.1. Espectros de absorção	51
4.2.2. Espectros de emissão fluorescente	53
4.3. Bufotenina em surfactantes	57
4.3.1. CTAB	58
4.3.2. SDS	61
4.4. Bufotenina em DMPC	65
4.5. Óxido de bufotenina em solventes	69
4.5.1. Espectros de absorção	69
4.5.2. Espectros de emissão fluorescente	74
4.5.3. Anisotropia de fluorescência	78

4.6. Óxido de bufotenina em solução aquosa com variação do pH ...	79
4.6.1. Espectros de absorção	80
4.6.2. Espectros de emissão fluorescente	82
4.7. Óxido de bufotenina em surfactantes	84
4.7.1. CTAB	84
4.7.2. SDS	87
4.8. Óxido de bufotenina em DMPC	91
5. CONCLUSÕES	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. INTRODUÇÃO

Este capítulo descreve brevemente a base científica para compreensão dos resultados obtidos. Não é a intenção exaurir o tema uma vez que existem diversas referências, dentre as quais utilizamos algumas (ALBERTS et al., 2017; ITO; BERARDI; PAZIN, 2016; LAKOWICZ, 2006; MARQUEZIN, 2004; PAZIN, 2012; TAKARA, 2006; VALEUR, 2001) para construir o texto.

1.1 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina (Bufotenina) e N-óxido-5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina (Óxido de bufotenina)

O composto 5-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina (5OH-DMT), também conhecido como bufotenina, é um alcalóide indólico; os alcalóides compõem um grupo de substâncias que contém pelo menos um nitrogênio básico em sua estrutura e que de maneira frequente apresentam atividade farmacológica, justificando o grande interesse no estudo dessas moléculas. Os alcalóides indólicos fazem parte de um grupo que possui um anel indol em sua estrutura básica; é um sistema heteroaromático planar, formado por cinco pares de elétrons π conjugados provenientes das ligações duplas carbono-carbono e dos elétrons não ligantes do átomo de nitrogênio (RAMOS, 2008).

A bufotenina é um metabólito encontrado em diferentes organismos vivos, por exemplo, na secreção de pele de diversos sapos do gênero *Rhinella* que são anfíbios da família *Bufo* bem como em plantas da família Fabaceae ou leguminosas (VIGERELLI et al., 2018) e em folhas de *Piptadenia peregrina* (REYNOLDS, 1989) e *Psychotria capitata* (WAKUI, 2015). A toxicidade varia com o nível de exposição e alucinações ativas foram relatadas após a ingestão (HITT and ETTINGER, 1986).

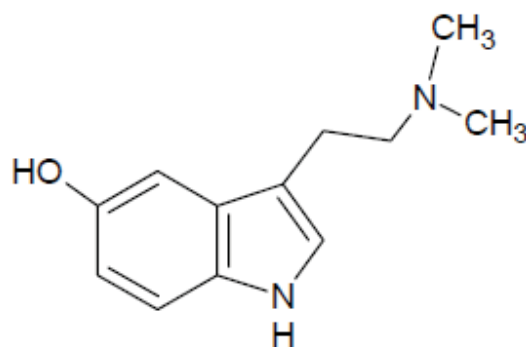
Devido à sua ação psicotrópica em humanos, a bufotenina tem sido amplamente estudada (BARKER et al., 2012; DEZAN et al., 1971; EMANUELE et al., 2010; FISCHER, 1961; FISH et al., 1955; GESSNER and PAGE, 1962; LENZ et al., 2022; VIGERELLI et al., 2020, 2018; WEIL; DAVIS, 1994). Em 1961, o periódico *The Lancet* publicou um protocolo sobre como detectar a presença de bufotenina na urina de pacientes com esquizofrenia (FISCHER, 1961). Estudos recentes aprofundam os mecanismos neurobiológicos e neuropsiquiátricos da modelagem de psicodélicos como a bufotenina (BARKER, 2022), considerando seu papel no desenvolvimento de drogas

que atenuem distúrbios neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia, por exemplo (MAHMOOD et al., 2022). Os efeitos alucinógenos da bufotenina provavelmente ocorrem devido às suas características fisiológicas e estruturais serem semelhantes ao LSD (Dietilamida do Ácido Lisérgico), à Psilocina (EMANUELE et al., 2010; VIGERELLI et al., 2018) e à Psilocibina, que vem sendo estudada por apresentar potencial para atender a diversas indicações terapêuticas, sem causar dependência (KARGBO, 2020; TYLS et al 2014; FRICKE et al 2018)

Apesar de bastante estudada, os mecanismos de ação da bufotenina sobre o sistema nervoso central ainda não são totalmente compreendidos. Estudos mostram que a molécula pode ter atividade sobre vários receptores de serotonina, bem como em transportadores da mesma; estes últimos, estão envolvidos no processo de recepção da serotonina na fenda sináptica (MOREIRA, 2011). A bufotenina derivada de sapo não apresenta efeitos psicotrópicos quando administrada por via oral e em doses nas quais a psilocina é claramente psicoativa (LENZ et al, 2022). Enquanto cerca de 4 mg de psilocina administrada por via oral pode induzir efeito psicodélico mensurável em humanos, 100 mg de bufotenina não apresentou efeito psicoativo significativo (TURNER, 1959; OTT, 2001. Ainda assim, a bufotenina testada *in vitro* demonstrou atividade agonista potente no receptor de serotonina 5-HT_{2A} (ROTH et al, 1997). Há evidências de que a bufotenina, tal como a serotonina, tenha capacidade limitada de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) passivamente (MCBRIDE, 2000).

A figura 1.1 a seguir mostra a estrutura molecular da bufotenina:

Figura 1.1 - Estrutura molecular da bufotenina.

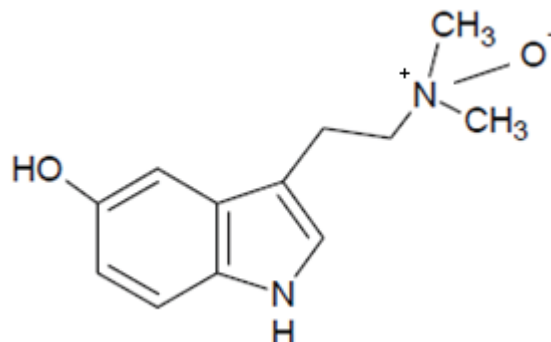


Fonte: Adaptado de (VIGERELLI et al., 2018), p. 2.

O composto N-óxido-5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina, conhecido como Óxido de bufotenina, pode ser obtido pela N-oxidação da bufotenina; assim como a

bufotenina, o óxido de bufotenina também pode ser extraído de diversas plantas (QU et al., 2006). A figura 1.2 a seguir mostra a estrutura molecular do óxido de bufotenina:

Figura 1.2 - Estrutura molecular do óxido de bufotenina obtido a partir da N-oxidação da bufotenina.



Fonte: (RAMOS, 2008), p. 11.

Por apresentar um anel indol em suas estruturas, tanto a bufotenina quanto o óxido de bufotenina são fluorescentes, tornando-as moléculas atrativas para o estudo com espectroscopia de fluorescência, que é uma das técnicas utilizadas neste trabalho. Apesar dessa característica, há considerável escassez de trabalhos na literatura explorando essas moléculas do ponto de vista espectroscópico.

Diante do exposto, neste trabalho é realizada uma caracterização espectroscópica das moléculas de bufotenina e óxido de bufotenina, apresentando a faixa espectral onde absorvem e emitem radiação eletromagnética e seu comportamento em solventes de diferentes polaridades e em meios com diferentes valores de pH. Ainda como parte do processo de caracterização, buscamos compreender os mecanismos de interação entre bufotenina e óxido de bufotenina com modelos de membrana celular, uma vez que os estudos evidenciam dificuldade de moléculas como a bufotenina atravessarem a barreira hematoencefálica. A seção 1.8 adiante apresentará em detalhes os modelos de membranas utilizados neste trabalho.

As moléculas de bufotenina e óxido de bufotenina aqui investigadas foram gentilmente cedidas pela profa. Dra. Lucília Kato, do Instituto de Química da UFG. Ambas as moléculas foram obtidas através de estudos fitoquímicos, tendo sido isoladas a partir de extratos das folhas de *Psychotria capitata*, espécie abundante no Cerrado Brasileiro (WAKUI, 2015).

1.2. Espectroscopia de absorção óptica

Do ponto de vista da mecânica quântica no processo de absorção por uma molécula a energia absorvida deve se relacionar com a frequência da radiação eletromagnética incidente por meio da equação:

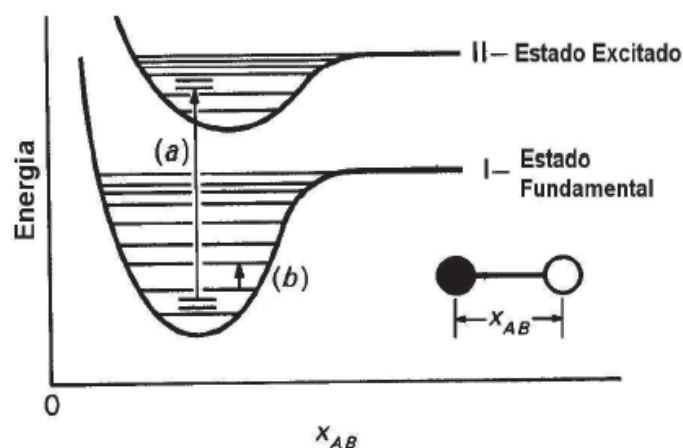
$$E = h\nu \quad (1.1)$$

Onde ν é a frequência da radiação incidente e h a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s). Dessa forma a radiação assume um aspecto corpuscular, sem qualquer equivalente clássico. Outro ponto da teoria é que átomos e moléculas só podem existir em determinados níveis de energia, não sendo uma distribuição contínua, o que explica a existência da emissão de linhas espectrais agudas após serem excitados.

Ao absorver radiação eletromagnética uma molécula pode sofrer transições para estados excitados de maior energia. Os estados excitados podem ser níveis eletrônicos, vibracionais (subdivisões dos níveis eletrônicos) e rotacionais (subdivisões dos níveis vibracionais). Para que a transição ocorra entre os níveis eletrônicos é necessário que ocorra absorção na faixa do espectro chamada UV-visível. Transições entre os níveis vibracionais ocorrem na faixa do infravermelho, e as transições entre níveis rotacionais acontecem na faixa das microondas.

Podemos recorrer a modelos simplificados para uma compreensão qualitativa dos níveis de energia permitidos em uma molécula. A figura 1.3 é um diagrama de energia mostrando os níveis rotacionais associados a cada nível vibracional para uma molécula diatômica simples em um determinado estado eletrônico. Observa-se que a energia depende da distância entre os núcleos dos átomos que constituem a molécula.

Figura 1.3 - Diagrama esquemático de energia de uma molécula diatômica simples. I – Representa o estado fundamental de energia. II – Representa o estado excitado de energia.



Fonte: (TAKARA, 2006), p. 10.

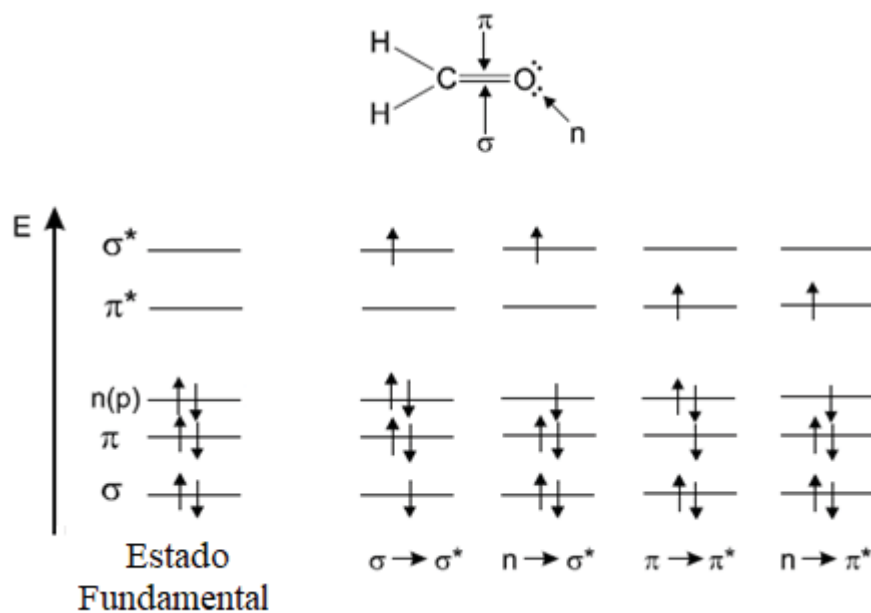
Existem vários tipos de orbitais moleculares nos quais o elétron pode transitar. Um orbital σ pode ser formado por dois orbitais atômicos s , ou dois orbitais p , ou por um orbital s e um p , possuindo um eixo de simetria paralelo à direção da ligação. Um orbital π é formado a partir de dois orbitais atômicos p sobrepondo-se lateralmente, possuindo um eixo de simetria perpendicular à direção da ligação. Ao absorver um fóton, de energia apropriada, pode haver a promoção de um elétron que se encontra, por exemplo, no orbital π para um orbital não ocupado π^* . A transição é denotada por $\pi \rightarrow \pi^*$. Um outro orbital n se refere a elétrons não ligados a carbono e hidrogênio, mas a outros átomos que integram a cadeia carbônica, a exemplo do nitrogênio e oxigênio, denominados heteroátomos. A excitação de um elétron não ligado para um orbital não ocupado é denotada por $n \rightarrow \pi^*$ ou por $n \rightarrow \sigma^*$.

Podemos colocar as transições em ordem de energia:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

Para ilustrar os níveis de energia a figura 1.4 mostra a estrutura molecular do formaldeído com seus respectivos orbitais e todas as transições eletrônicas possíveis.

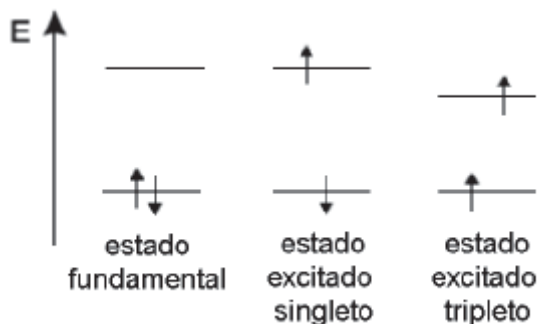
Figura 1.4 - Estrutura molecular com seus respectivos orbitais e níveis de energia do formaldeído.



Fonte: Adaptado de (VALEUR, 2001), p. 21.

Quando um de dois elétrons, com spins opostos, pertencentes ao orbital no estado fundamental é transferido para um orbital molecular de maior energia sem alteração do seu spin, temos estados singletos de energia; denotamos S_0 para o estado fundamental e S_n para os demais estados excitados (com $n = 1, 2, 3, \dots$). Uma molécula no estado excitado singleto pode sofrer uma conversão para um estado que modifique seu spin, devido a existir dois elétrons de spins paralelos; tal estado é chamado de estado tripleto. A figura 1.5 representa cada um desses estados:

Figura 1.5 - Representação dos estados singletos e tripletos para uma determinada molécula.



Fonte: Adaptado de (VALEUR, 2001), p. 22.

O estado tripleto tem energia menor que o estado singleto de mesma configuração, devido à regra de Hund, ou regra da multiplicidade máxima (SUBRAMANIAN; DE OLIVEIRA, 1997).

1.3. Lei de Lambert-Beer

A intensidade de luz que atravessa uma amostra é reduzida devido a sucessivos processos de absorção, reflexões nas paredes da cubeta que comporta a amostra e fenômenos de dispersão. Considerando apenas os processos de absorção podemos medir a atenuação da intensidade do feixe de radiação eletromagnética através da lei de Lambert-Beer.

Consideremos uma placa fina de solução com espessura dx que contém n moléculas/cm³ que absorvem luz. Seja σ a seção transversal efetiva que absorve luz em cm², a intensidade de luz absorvida dI por espessura dx é proporcional a n , σ e I , onde I representa a intensidade do feixe de luz incidente.

$$\frac{dI}{dx} = -I_0 \sigma n \quad (1.2)$$

Integrando e fazendo $I = I_0$ em $x = 0$, obtemos

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\sigma n l \quad (1.3)$$

Sendo l o caminho óptico percorrido pela luz. De forma alternativa a equação 1.3 é geralmente escrita como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \quad (1.4)$$

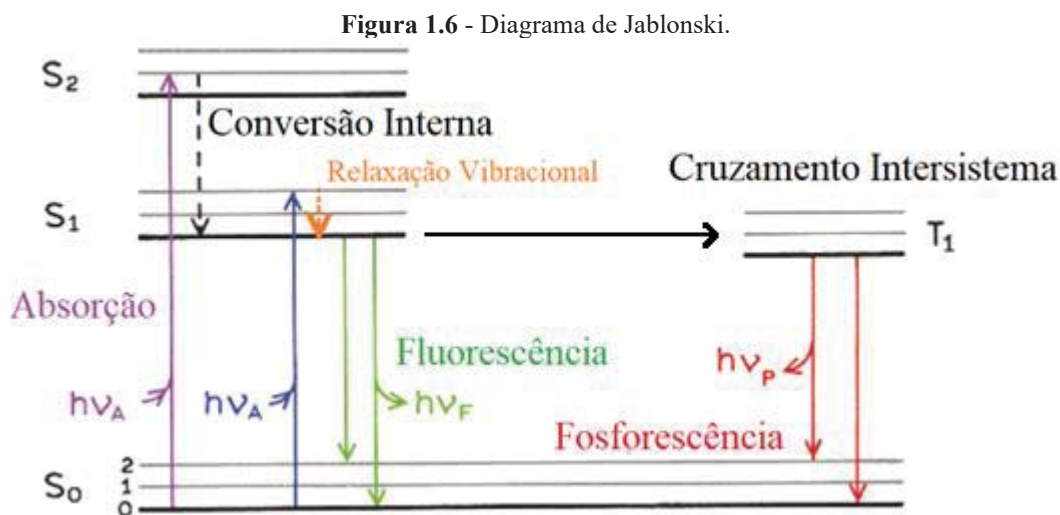
Onde A é a absorbância, ϵ o coeficiente de absortividade molar (L mol⁻¹ cm⁻¹) e c a concentração (mol/L). O valor de ϵ de uma determinada substância depende do comprimento de onda da radiação incidente, sendo normalmente utilizado o comprimento de onda que fornece o máximo valor de absorbância. Pela equação 1.4

observa-se que a absorvância é proporcional à concentração da substância; dessa forma, a curva A versus c deve ser uma reta.

Em determinadas condições ocorrem desvios da lei de Lambert-Beer. Uma delas é no regime de altas concentrações, que devido à formação de agregados moleculares, ocorrem mudanças na posição ou intensidade do máximo de absorção. De maneira geral a interação entre as moléculas e o solvente pode gerar desvios da lei.

1.4. Espectroscopia de Fluorescência

Uma molécula no estado fundamental possui a menor configuração energética possível. Após absorver radiação a molécula pode assumir uma configuração de maior energia, denominada estado excitado (já foi mencionado no item Absorção Óptica). Uma vez no estado excitado a molécula pode retornar ao estado inicial por diferentes “caminhos”, emitindo ou não radiação. A fluorescência é o processo de desexcitação que ocorre com a emissão de fótons e entre estados singletos. O diagrama de Jablonski (figura 1.6) é conveniente para melhor visualização dos possíveis processos de transição:



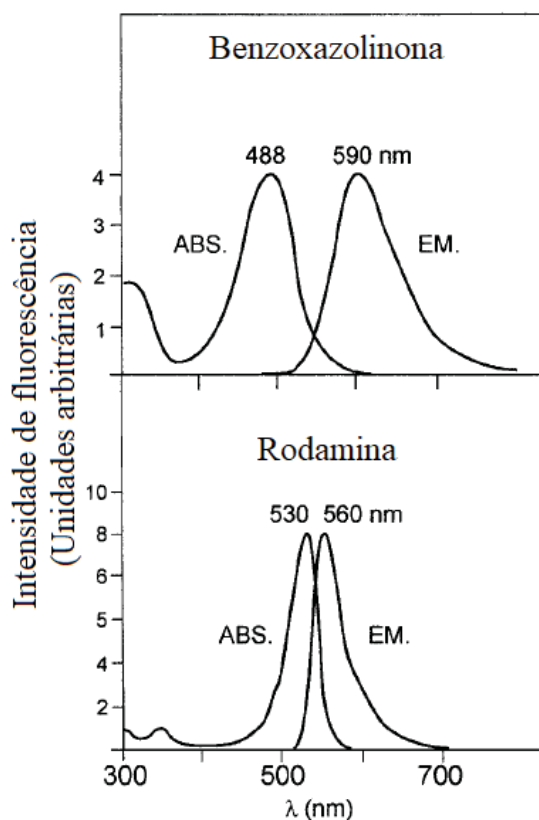
Fonte: Adaptado de (LAKOWICZ, 2006), p. 5.

A absorção ocorre em um tempo da ordem de 10^{-15} s, levando a molécula de S₀ para níveis eletrônicos singletos de maior energia (S₁, S₂, ...). O tempo de vida de um estado excitado é da ordem de 10^{-8} s. A conversão interna é um processo entre dois estados eletrônicos excitados que ocorre antes da emissão fluorescente. Após um tempo da ordem de 10^{-12} s a molécula assume um nível vibracional de menor energia, no

mesmo estado eletrônico; esse processo é a relaxação vibracional. A molécula pode ainda sofrer transições por processos não radiativos, de um nível eletrônico para outro de menor energia, através da colisão com as moléculas do solvente, por exemplo. A fluorescência ocorre em um tempo da ordem de 10^{-9} s na emissão de fótons para a transição $S_1 \rightarrow S_0$. Transições envolvendo estados singletos e tripletos são chamadas de cruzamento intersistema. A emissão de radiação a partir de um estado tripleto para o estado fundamental singlete denomina-se fosforescência, envolvendo tempos da ordem de 10^{-3} s.

A partir do diagrama de Jablonski observa-se que a energia da radiação emitida é menor que a energia da radiação absorvida pela molécula, ou seja, o comprimento de onda da emissão é maior que para absorção. Esse efeito é conhecido como deslocamento de Stokes, ilustrado como exemplo, na figura 1.7 para duas moléculas fluorescentes: benzoxazolina e rodamina.

Figura 1.7 - Deslocamento de Stokes: benzoxazolina e rodamina.



Fonte: Adaptado de (VALEUR, 2001), p. 55.

1.5. Rendimento quântico

A despopulação do estado excitado de uma molécula é descrita pelos processos moleculares de decaimento radiativo e não radiativo. Nos processos não radiativos a energia de excitação não é convertida em fótons, mas é dissipada por outros processos como, por exemplo, térmicos. Seja k_r e k_{nr} as taxas de decaimento radiativo e não radiativo, respectivamente e $N(t)$ a fração de fluoróforos (molécula fluorescente) no estado excitado no instante t após a excitação. A evolução temporal do estado excitado pode ser descrita por:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr})N(t) \quad (1.5)$$

Cuja solução resulta no decaimento exponencial da população do estado excitado:

$$N(t) = N(0)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (1.6)$$

em que τ é o tempo de vida de fluorescência do fluoróforo que corresponde à taxa combinada de decaimento radiativo e não radiativo:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.7)$$

Na ausência de processos de decaimento não radiativos, temos que $k_{nr} = 0$; dessa forma pode-se definir o tempo de vida intrínseco do fluoróforo:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r} \quad (1.8)$$

A intensidade da fluorescência pode ser quantificada pelo seu rendimento quântico de fluorescência, ϕ :

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (1.9)$$

A despopulação não radiativa reduz a intensidade de fluorescência da amostra. A maioria dos processos não-radiativos podem ser classificados como: (1) conversão interna (k_{ic}), onde há transição eletrônica entre dois estados singletos ($S_2 \rightarrow S_1$, por exemplo); (2) conversão externa (k_{ec}) onde o fluoróforo perde energia eletrônica para o ambiente através de colisão com outros solutos; (3) cruzamento intersistema (k_{is}) é outro processo em que o sinal de fluorescência é reduzido e ocorre a geração de outro fenômeno luminescente: a fosforescência. De maneira geral:

$$k_{nr} = k_{ic} + k_{ec} + k_{is} \quad (1.10)$$

Sob determinadas circunstâncias, o rendimento quântico pode ser obtido utilizando-se um composto de referência, cujo rendimento quântico ϕ_{ref} seja conhecido. Neste caso o composto de referência deve apresentar estrutura molecular semelhante a do fluoróforo de interesse, bem como absorver e emitir na mesma faixa espectral; além disso é necessário que os parâmetros dos equipamentos sejam mantidos inalterados nas medidas realizadas para ambas as moléculas fluorescentes. Desta forma pode-se obter o rendimento quântico experimentalmente por meio da seguinte equação:

$$\phi = \frac{F_{amostra}}{A_{amostra}} \cdot \frac{A_{ref}}{F_{ref}} \cdot \phi_{ref} \quad (1.11)$$

Onde $F_{amostra}$ é a área sob o espectro de emissão fluorescente da amostra e $A_{amostra}$ é o valor da absorção no comprimento de onda utilizado na excitação. O índice *ref* diz respeito aos dados do composto de referência utilizado.

1.6. Anisotropia de fluorescência

Algumas amostras, ao serem excitadas por luz polarizada, emitem luz também polarizada. O grau de polarização desta emissão é descrito em termos da anisotropia (r). Cada fluoróforo possui seus momentos de absorção e emissão posicionados em direções específicas; aqueles que apresentam seus momentos orientados na mesma direção do vetor campo elétrico da luz incidente são preferencialmente excitados (Excitação fotoseletiva). Dessa forma há, no estado excitado, um número maior de moléculas com seus momentos orientados na direção do vetor campo elétrico da luz polarizada.

A despolarização da emissão pode ser causada pela difusão rotacional, e medidas de anisotropia mostram o deslocamento angular médio que ocorre entre a absorção e a emissão. A difusão rotacional (movimentos de rotação) depende de alguns parâmetros como: viscosidade do solvente e dimensão da molécula.

Para o caso onde o fluoróforo tenha seu momento de dipolo de absorção paralelo ao seu momento de dipolo de emissão e considerando que não ocorra difusão rotacional ou algum outro processo de despolarização da luz emitida, a anisotropia é dada por:

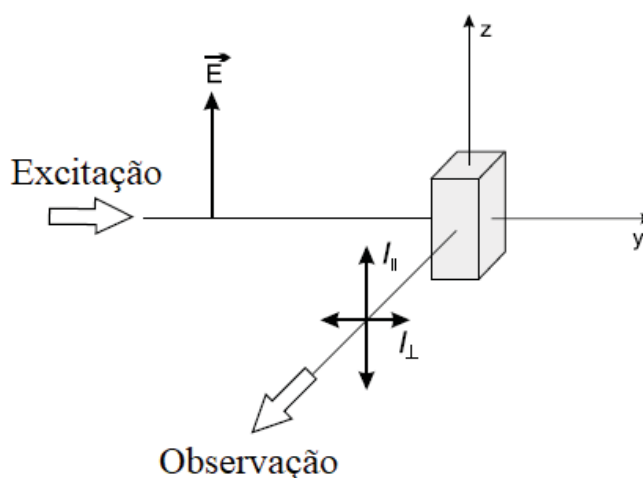
$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (1.12)$$

onde θ é o ângulo entre o momento de dipolo de emissão e o eixo z .

Normalmente os momentos de absorção e emissão não são paralelos. Deve-se então considerar um deslocamento β entre o dipolo de absorção e dipolo de emissão, assim como a excitação fotoseletiva dos fluoróforos. A existência do ângulo β implica em uma perda de anisotropia. Para algumas moléculas β é próximo de zero. A anisotropia fundamental r_0 (anisotropia na ausência de quaisquer movimentos rotacionais da molécula) é dada por:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (1.13)$$

Figura 1.8 - Diagrama esquemático para medida de anisotropia.



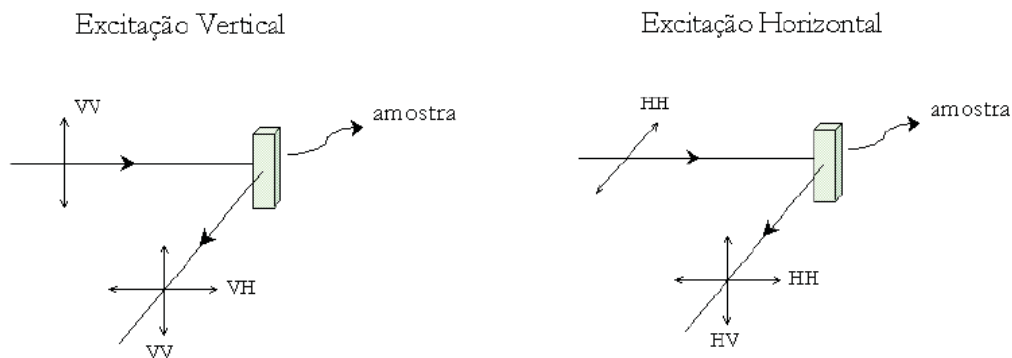
Fonte: Adaptado de (VALEUR, 2001), p. 129.

Na figura 1.8 temos a representação de uma amostra que está sendo excitada com luz verticalmente polarizada, com o vetor campo elétrico paralelo à direção do eixo z. Mede-se a intensidade de emissão após sua passagem por um polarizador. Representamos por $I_{//}$ a intensidade da fluorescência polarizada verticalmente e I_{\perp} a intensidade da luz polarizada horizontalmente. Dessa forma a anisotropia de fluorescência pode ser definida como:

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (1.14)$$

A anisotropia é uma quantidade adimensional que não depende da intensidade total da amostra, uma vez que a diferença $I_{//} - I_{\perp}$ é normalizada pela intensidade total dada por $I_{//} + 2I_{\perp}$. Assumindo que os dipolos de absorção e de emissão sejam paralelos, conclui-se que para $r = 0$ temos uma emissão totalmente despolarizada, representando uma alta mobilidade da molécula. O valor teórico máximo de anisotropia ($r = 0,4$) representa uma molécula totalmente imóvel.

Figura 1.9 - Esquema de medida de anisotropia pelo formato L



Fonte: (MARQUEZIN, 2004), p. 18.

A figura 1.9 representa de maneira esquemática medidas de anisotropia pelo formato L. V corresponde aos polarizadores na vertical e H na horizontal. VV e HH correspondem à excitação e emissão polarizadas paralelamente uma em relação à outra, enquanto VH e HV correspondem à excitação e emissão polarizadas perpendicularmente uma em relação à outra.

No formato L, ou canal único, o fluorímetro usa um único canal de emissão e os comprimentos de onda de excitação e emissão são geralmente selecionados por monocromadores. O feixe de excitação faz um ângulo de 90° com o feixe de emissão. O monocromador de excitação polariza parcialmente a luz incidente. Como resultado, a rotação do polarizador para as posições H e V dá origem a diferentes intensidades da luz incidente. De maneira similar, o monocromador de emissão tem eficiência diferente para transmissão da luz polarizada nas posições H e V. Conseqüentemente a rotação do polarizador de emissão muda a sensibilidade efetiva do canal de emissão. A sensibilidade pode ser corrigida pela razão das intensidades da luz de excitação polarizada verticalmente e horizontalmente. O fator G de correção é dado por:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (1.15)$$

onde I_{HV} representa a intensidade para o polarizador de emissão orientado na vertical quando a excitação foi horizontalmente polarizada e I_{HH} é a intensidade para o polarizador de emissão orientado na horizontal também para uma excitação horizontalmente polarizada. Dessa forma podemos escrever a equação 1.14 como:

$$R = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (1.16)$$

Os valores teóricos de anisotropia calculados a partir do ângulo β (equação 1.14) podem diferir dos valores obtidos experimentalmente. Diversos fatores podem provocar essa alteração, o mais comum é a difusão rotacional que desloca o dipolo de emissão do fluoróforo durante o tempo de vida do estado excitado. Podemos obter informações sobre a mudança angular relativa dos momentos do fluoróforo entre os tempos de absorção e emissão.

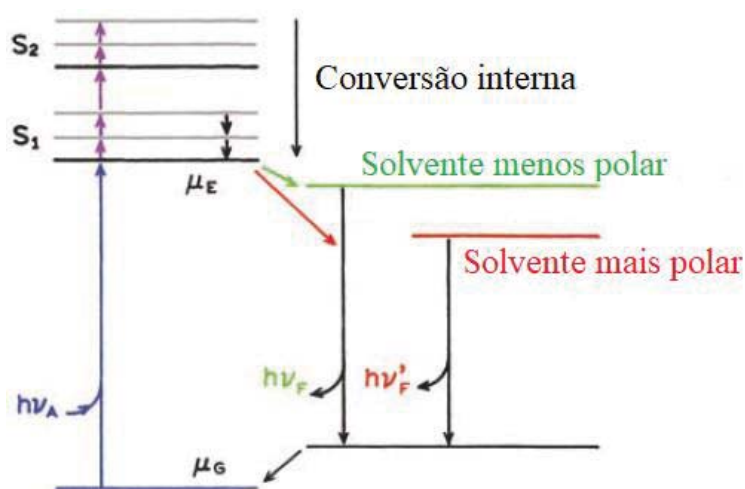
1.7. Efeitos de solvente

Os solventes utilizados na preparação da amostra a ser estudada podem modificar as propriedades espectrais dos fluoróforos, tanto na absorção óptica quanto na emissão fluorescente. Os efeitos de solvente podem ser classificados em efeitos gerais e

efeitos específicos. Os efeitos gerais se referem à polaridade do solvente. Já os efeitos específicos estão relacionados a interações químicas.

Quando o fluoróforo é excitado para o estado S_1 , geralmente para um nível vibracional dentro de S_1 , parte da energia vibracional é rapidamente perdida para o próprio solvente. Se o fluoróforo é ainda excitado para o estado S_2 ele rapidamente decai para o estado S_1 por conversão interna. Os efeitos do solvente mudam a emissão para um nível ainda mais baixo, conforme ilustrado na figura 1.10:

Figura 1.10 - Diagrama de Jablonski para fluorescência com efeitos de solvente.



Fonte: Adaptado de (LAKOWICZ, 2006), p. 206.

Do diagrama da figura 1.10 nota-se que quanto maior a polaridade do solvente menor a energia de emissão. Normalmente um fluoróforo tem um momento de dipolo maior no estado excitado μ_E do que no estado fundamental μ_G ; após a excitação os dipolos do solvente podem se reorientar em torno de μ_E , diminuindo a energia do estado excitado, deslocando a emissão para o vermelho, ou seja, para comprimentos de onda maiores. A polarizabilidade do fluoróforo, a qual resulta dessa reorientação dos dipolos do solvente, é função da constante dielétrica (ϵ) do solvente. A polarizabilidade do solvente pode ser descrita em função do índice de refração n .

Fluoróforos polares possuem maior sensibilidade à polaridade do solvente, ao contrário dos fluoróforos apolares, como anéis aromáticos sem substituições. Os espectros de absorção são menos sensíveis à polaridade do solvente, uma vez que a absorção é muito rápida (da ordem de 10^{-15} s) para que haja movimento do fluoróforo.

Os efeitos específicos dos solventes são produzidos por moléculas na vizinhança do fluoróforo e dependem das propriedades químicas específicas de ambos, fluoróforo e solvente. Esse efeito pode ser, por exemplo, devido à formação de ligações de hidrogênio, transferência de cargas, solvatação, entre outros. Solventes próticos, como exemplo da água, etanol e metanol, possuem facilidade para formar ligações de hidrogênio com o fluoróforo e promovem maior deslocamento de Stokes.

Uma indicação de efeito específico de solvente é quando se observa que a máxima emissão se desloca para o vermelho rapidamente com baixa porcentagem de adição do solvente polar, podendo surgir até mesmo uma segunda componente espectral. Diferente do efeito geral onde o deslocamento para o vermelho ocorre de maneira gradativa com o aumento da polaridade do solvente.

As interações específicas (por exemplo a ligação de hidrogênio) podem ocorrer tanto no estado fundamental quanto no estado excitado. Se a interação ocorre somente no estado excitado não haverá alteração nos espectros de absorção. Mas se a interação ocorre no estado fundamental, é esperada alguma mudança no espectro de absorção.

1.8. Sistemas miméticos para membrana celular: micelas e vesículas fosfolipídicas

Membranas modelo são amplamente estudadas com o intuito de entender a estrutura e aspectos dinâmicos das membranas biológicas (BAGATOLLI et al., 2010). A membrana biológica é fundamental para a manutenção da vida de uma célula, pois atua regulando a entrada de nutrientes, protegendo as organelas citoplasmáticas e excretando o que já não tem utilidade para a célula, ou mesmo secreções com funções no meio extracelular. Uma membrana natural é bastante complexa, contendo proteínas, oligossacarídeos, glicosídeos e lipídios. A maior fração dentre estes componentes é de lipídio; uma bicamada lipídica está presente em todas as membranas biológicas e, distribuídos na bicamada estão os demais componentes. Desta forma, substâncias lipossolúveis poderiam atravessar passivamente a membrana, enquanto íons e demais moléculas hidrossolúveis necessitam de transporte ativo para entrar/sair.

Dada essa complexidade natural das membranas biológicas, utiliza-se em Biofísica os modelos de membrana; tais modelos são formados por compostos anfífilicos, que se agregam em estruturas supramoleculares, constituindo regiões apolares e regiões polares. Propriedades dinâmicas da membrana podem ser melhor

compreendidas no nível molecular, sem a presença de proteínas ou outras macromoléculas.

Considerando que a bufotenina, bem como outras triptaminas, não transpõe a barreira hematoencefálica passivamente (MCBRIDE, 2000), o estudo destas moléculas em presença de modelos de membranas de célula auxilia na compreensão do tipo de interação que pode ocorrer entre bufotenina (óxido de bufotenina) e as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas das membranas. É fato que a seletividade natural da barreira hematoencefálica é o maior desafio na entrega de fármacos que devem agir no sistema nervoso central e tal desafio vem promovendo muitos estudos no sentido de encontrar meios de se entregar tais fármacos. Neste âmbito, o uso de nanopartículas a base de lipídios como nanocarreadores de drogas através da barreira tem se mostrado bastante eficiente (KHALEDIAN et al, 2022; ORTEGA, 2021; SHRESTHA et al, 2014; DUTTA et al, 2018)

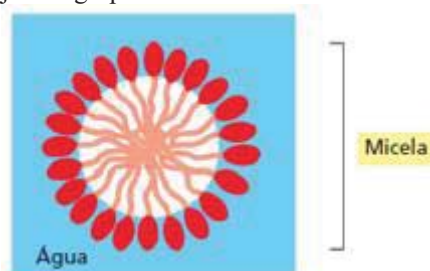
Desta forma, buscamos ampliar a compreensão das interações entre bufotenina e óxido de bufotenina com modelos de membrana biológica, mesmo porque há escassez de estudos desta natureza na literatura. Neste trabalho, são usadas micelas de surfactantes (detergentes, tensoativos) e vesículas fosfolipídicas como modelos para a membrana celular.

Micelas de surfactantes: surfactantes são moléculas que possuem um grupo polar ligado a uma cadeia hidrocarbônica apolar, ou seja, são anfifílicas pois possuem uma parte hidrofílica (solúvel em água) e outra hidrofóbica (não solúvel em água). Quando inseridas em ambiente polar se agregam, formando as micelas, de maneira que suas cadeias apolares não entrem em contato com o solvente; chamamos isso de efeito hidrofóbico. Para que os surfactantes formem as micelas (saindo da condição de dispersão no meio aquoso) é necessária uma concentração mínima, chamada de *concentração micelar crítica* (CMC), que é uma característica do próprio surfactante. Dessa forma a CMC é a menor concentração de surfactantes na qual as micelas se formam. Os valores da CMC dependem da: (1) hidrofobicidade e do tamanho da cadeia hidrocarbônica; no caso de cadeias curtas e pouco hidrofóbicas a força dirigida para a solvatação da cabeça polar é forte o bastante para dissolver todo o sal (surfactante + contra-íon) que se dissociou em meio aquoso; (2) da carga do surfactante; (3) do contra-íon, que blinda a carga do agregado, diminuindo a repulsão entre as cabeças dos monômeros; (4) das condições do meio como temperatura, pressão de vapor da água e

da concentração iônica. (MANIASSO, 2001; RIZZATTI; ZANETTE; MELLO, 2009; VAN STAM; DEPAEMELAERE; DE SCHRYVER, 1998).

O número de surfactantes que se agregam para formar as micelas é chamado de número de agregação. A estrutura formada é aproximadamente no formato esférico, exemplificado na figura 1.11, e não encerra água no seu interior.

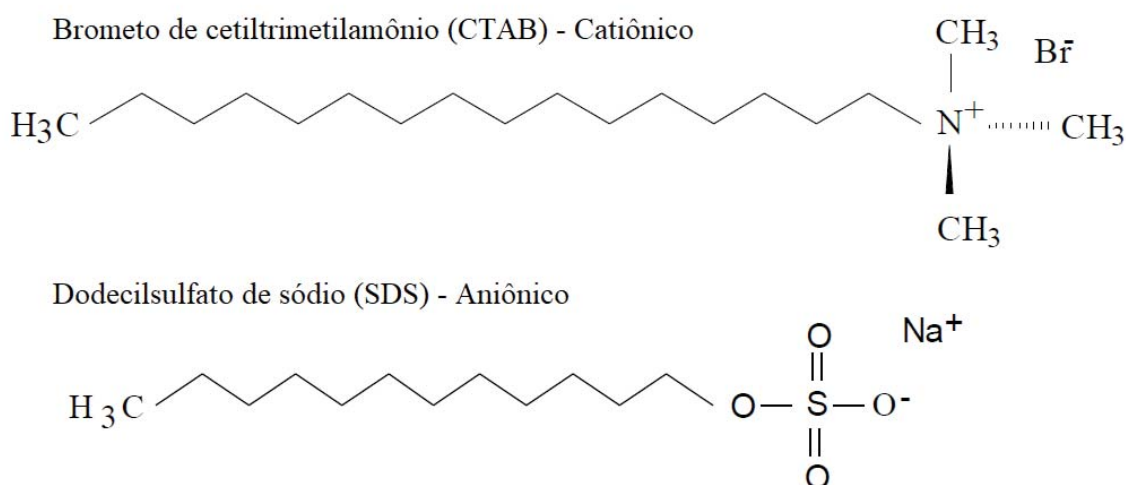
Figura 1.11 - Arranjo do agrupamento dos surfactantes em um ambiente aquoso.



Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2017), p. 569.

Os surfactantes podem ser classificados de acordo com a natureza do grupo hidrofílico: (1) Catiônicos, que possuem a parte hidrofílica composta por um átomo ou grupo carregado positivamente; (2) Aniônicos, que possuem a parte hidrofílica composta por um átomo ou grupo carregado negativamente; (3) *Zwitteriônicos*, que possuem um balanço total de cargas nulo; (4) Não-iônicos, que se caracterizam por ter uma estrutura polar que interage com a água principalmente por pontes de hidrogênio. Utilizamos nesse trabalho surfactantes catiônicos e aniônicos. A figura 1.12 mostra a estrutura molecular desses surfactantes:

Figura 1.12 - Estrutura molecular dos surfactantes CTAB e SDS.



Fonte: Adaptado de (MARQUEZIN, 2004), p. 24.

A tabela 1.1 mostra alguns parâmetros dos surfactantes utilizados:

Tabela 1.1 - Informações dos surfactantes utilizados.

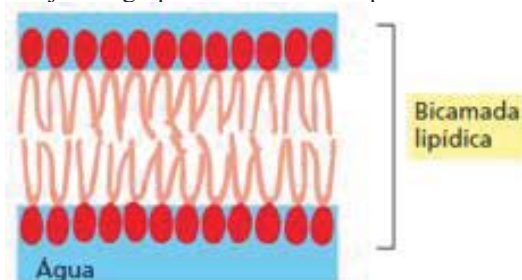
Surfactante	Fórmula	Número de agregação	CMC (mM)
CTAB	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}$	170	1,0
SDS	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}^-\text{Na}^+$	62	7,0 – 10,0

Fonte: (BHAIRI; MOHAN, 2001).

Como um parâmetro a mais no estudo das interações entre micelas de surfactantes e bufotenina e óxido de bufotenina, a carga elétrica líquida das micelas pode afetar a interação com ambas as moléculas. O óxido de bufotenina possui um momento de dipolo (devido à presença de um átomo de oxigênio a mais) que não é encontrado na estrutura da bufotenina e tal momento de dipolo poderia direcionar de modo diverso o posicionamento da molécula quando próxima da superfície carregada de uma micela, a depender da carga desta última. Além disso, um fator importante no estudo de micelas eletricamente carregadas é o valor do pH local. Na superfície da micela o valor do pH (pH local) pode ser até duas unidades menor (maior) do que o pH do meio (FORNÉS et al, 1999), devido à maior (menor) concentração de íons H^+ , atraídos (repelidos) pela superfície negativa (positiva) da micela. Este é um método eficiente para submeter a molécula de interesse a valores de pH abaixo (acima) dos valores comumente obtidos experimentalmente.

Vesículas fosfolipídicas: utilizados na produção das vesículas fosfolipídicas, os fosfolipídios são moléculas que possuem duas cadeias de ácidos graxos apolares ligadas a grupos polares, sendo também anfifílicas. Quando inseridas em ambientes polares (meio aquoso, por exemplo) agregam-se formando a bicamada lipídica, exemplificada na figura 1.13.

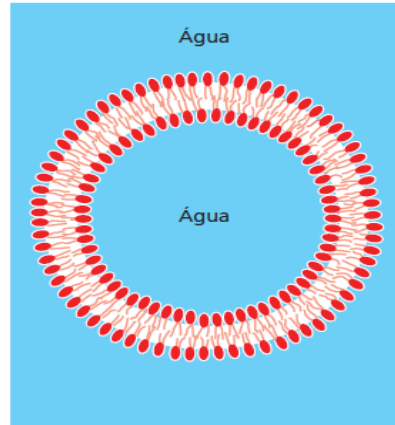
Figura 1.13 - Arranjo do agrupamento dos fosfolipídios em um ambiente aquoso.



Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2017), p. 569.

A bicamada lipídica por sua vez se curva para formar a vesícula, que encerra uma pequena quantidade de água em seu interior (figura 1.14). A vesícula é uma estrutura estável formada espontaneamente para evitar a exposição das caudas hidrofóbicas à água.

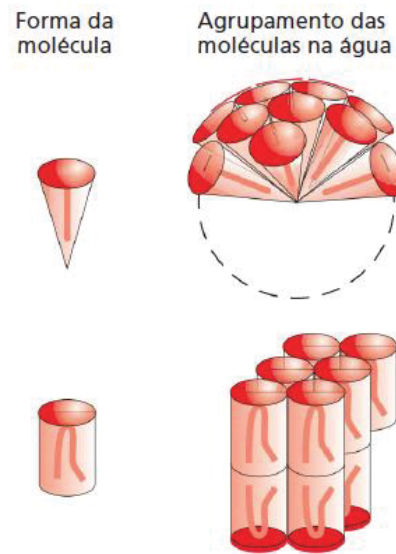
Figura 1.14 - Vesícula formada por fosfolipídios.



Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2017), p. 570.

Os surfactantes tendem a formar micelas pois suas cabeças polares ocupam áreas suficientemente grandes e suas cadeias graxas ocupam áreas menores, de modo que o formato geométrico de suas estruturas é representado por um cone. Já os fosfolipídios se associam formando vesículas pois a relação entre a área de ocupação das cabeças polares e das cadeias hidrofóbicas é praticamente a mesma, de forma que o resultado geométrico que representa a estrutura da molécula é uma forma cilíndrica. Essas representações geométricas e seus respectivos agrupamentos são ilustradas na figura 1.15:

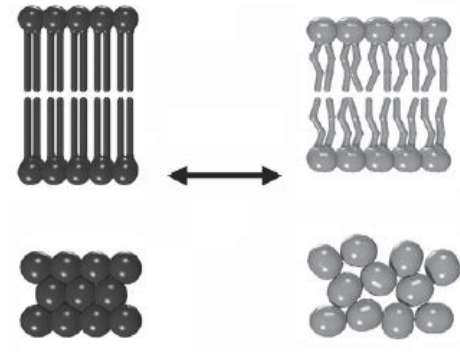
Figura 1.15 - Representação geométrica para os surfactantes e fosfolipídios com seus respectivos agrupamentos.



Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2017), p. 569.

Uma importante característica da bicamada lipídica é a sua fluidez, proporcionando processos de transporte através da membrana e atividades enzimáticas. Tal fluidez depende da composição da bicamada e de sua temperatura. Uma bicamada lipídica pode se apresentar em duas fases termodinâmicas distintas, o estado gel (rígido ordenado) e o estado líquido-cristalino (fluido). Denomina-se temperatura de transição de fase a temperatura na qual ocorre a mudança entre as fases. Na fase gel, onde a temperatura é inferior à temperatura de transição, as cadeias laterais dos lipídios assumem conformações estendidas e ordenadas, sendo a espessura da bicamada máxima. Para temperatura acima da temperatura de transição, fase líquido-cristalina, as cadeias carbônicas não apresentam ordenação lateral, pela sua grande mobilidade, e a área ocupada pelas cabeças polares na bicamada torna-se maior (HEIMBURG, 2007). A figura 1.16 representa essas duas fases distintas:

Figura 1.16 - Representação esquemática das fases termodinâmicas das bicamadas lipídicas.



Fonte: Adaptado de (HEIMBURG, 2007), p. 78.

A temperatura de transição de fase, em geral, aumenta com o comprimento e diminui com o grau de insaturação da cadeia carbônica (BEGLEY; VAZ, 2008).

Existe ainda uma outra fase, denominada fase *ripple*, que ocorre entre a fase gel e a fase fluida, especialmente em fosfolípidos; nesta fase a superfície da bicamada lipídica deixa de ser plana e apresenta ondulações com periodicidade bem definida (AKABORI; NAGLE, 2015).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o estudo das propriedades de absorção óptica e emissão fluorescente dos compostos 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltryptamina (Bufotenina) e *N*-óxido-5-hidroxi-*N,N*-dimetiltryptamina (Óxido de bufotenina), assim como suas interações com modelos de biomembrana.

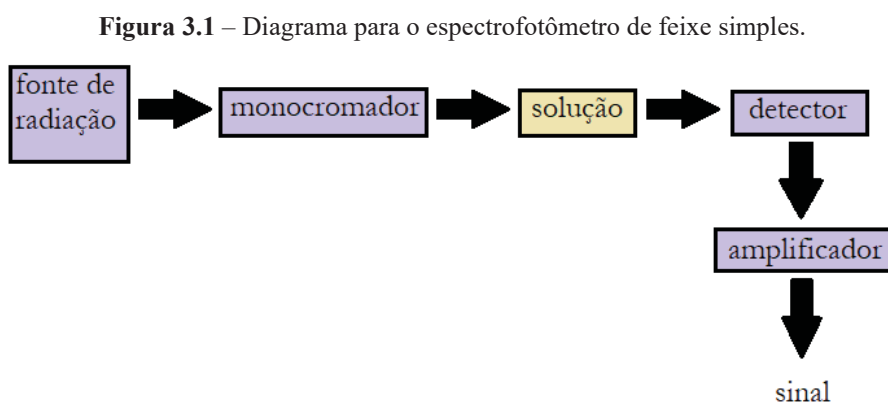
Como objetivos específicos temos:

- Obter espectros de absorção óptica da bufotenina e do óxido de bufotenina em diversos solventes e diversos valores de pH do meio;
- Obter espectros de emissão fluorescente da bufotenina e do óxido de bufotenina em diversos solventes, diversos valores de pH do meio, na presença de micelas de surfactantes e vesículas fosfolipídicas;
- Obter coeficientes de absorção molar e rendimento quântico de fluorescência da bufotenina e do óxido de bufotenina em diversos solventes;
- Obter valores de anisotropia de fluorescência da bufotenina e do óxido em diversos solventes, na presença de micelas de surfactantes e vesículas fosfolipídicas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

As medidas de absorção óptica foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis-NIR Lambda 1050 WB, fabricado pela PerkinElmer, disponível no laboratório do Grupo de Física de Materiais do IF/UFG. O intervalo de comprimento de onda de operação do equipamento é de 175 – 860 nm. A fonte de luz consiste em uma lâmpada de Tungstênio que opera acima de 320 nm e uma lâmpada de Deutério que opera abaixo de 320 nm. O espectrofotômetro foi utilizado no modo de feixe simples, que funciona de acordo com a figura 3.1 a seguir:



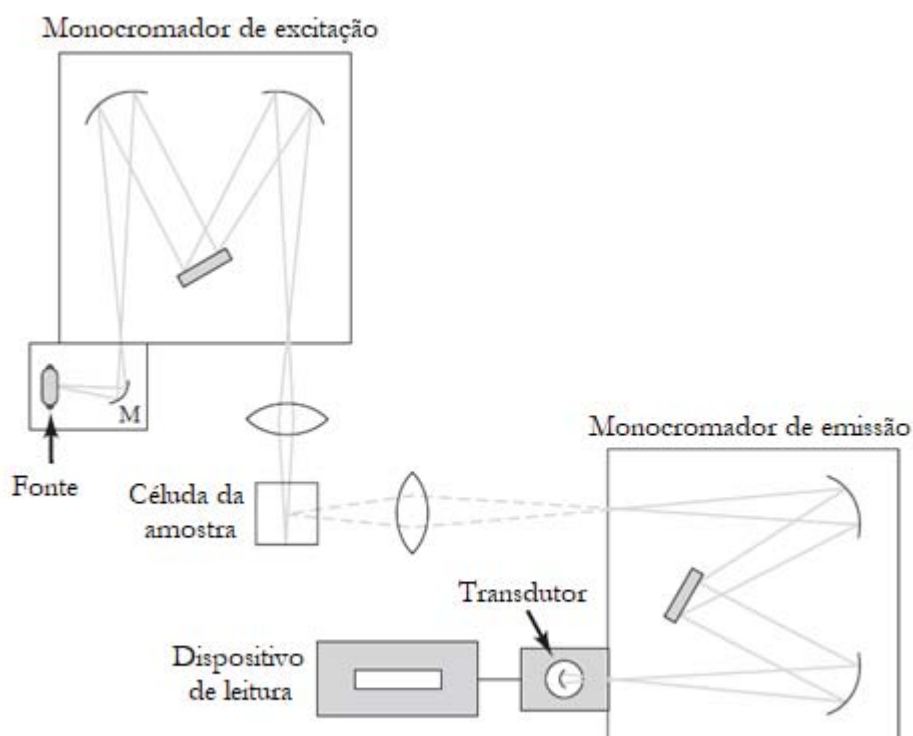
Fonte: Próprio autor.

O espectro do solvente, previamente medido, é subtraído dos espectros de absorção obtidos; o *software* PERKIN ELMER é responsável pela aquisição do espectro com a subtração do espectro do solvente.

Medidas de intensidade de fluorescência e anisotropia estática foram realizadas nos espectrofluorímetros: Fluorolog FL3-221, fabricado pela HORIBA – Jobin Yvon, disponível no Laboratório do Grupo de Física de Materiais do IF/UFG e F-7000, da Hitachi High-Tech, disponível no Laboratório de Biofísica do IF-UFG. O intervalo de comprimento de onda utilizado foi de 288 – 550 nm, onde a fonte de luz é uma lâmpada de xenônio.

A figura 3.2 representa de maneira esquemática o funcionamento do espectrofluorímetro:

Figura 3.2 – Diagrama para o espectrofluorímetro.



Fonte: Adaptado de (SKOOG; WEST; HOLLER, 2014), p. 787.

O feixe de luz de excitação, assim como o feixe de emissão, é controlado por um conjunto de fendas e um obturador. Monocromadores permitem a seleção do comprimento de onda desejado. A fotomultiplicadora (presente no dispositivo de leitura) pode ser ajustada na tensão, em Volts, desejada. Para medidas de anisotropia estática utilizam-se polarizadores nos feixes de excitação e emissão.

3.2. Preparação de amostra

As moléculas de 5-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina (bufotenina) e N-óxido-5-hidroxi-N, N-dimetiltriptamina (Óxido de bufotenina) foram obtidas através de métodos fitoquímicos pelo Instituto de Química – UFG, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lucília Kato. Ambas as moléculas foram isoladas a partir do extrato etanólico bruto das folhas de *Psychotria capitata* Ruiz & Pav. (Rubiaceae), espécie abundante no Cerrado Brasileiro (WAKUI, 2015). A estrutura dessas moléculas foi determinada através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (uni- e bidimensionais), Espectroscopia de Infravermelho e Espectrometria de Massas, conforme descrito por WAKUI, 2015.

Os estoques foram preparados solubilizando o pó (tanto de bufotenina quanto de óxido de bufotenina) em etanol, a uma concentração de 3,6 mM para a bufotenina e 3 mM para o óxido de bufotenina. Ambos os estoques são mantidos sob refrigeração, a -18 °C.

Os solventes utilizados para realização das medidas de absorção óptica e emissão fluorescente foram clorofórmio, etanol e metanol em grau espectroscópico, adquiridos da Merck. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi gentilmente cedido pelo prof. Antônio Alonso. O tampão Hepes, adquirido da Sigma-Aldrich, foi utilizado para medidas em solução aquosa, com pH 7,47 e concentração 10 mM. As constantes dielétricas para cada solvente se encontram na tabela 3.1 de acordo com a literatura (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001).

Tabela 3.1 – Valores de constante dielétrica para os solventes utilizados.

Solvente	Constante dielétrica (ϵ)
Clorofórmio	4,80
Etanol	25,10
Metanol	33,60
DMSO	46,70
Água	78,30

Fonte: (LAKOWICZ, 2006).

Em todos os experimentos envolvendo os solventes acima citados, a cubeta utilizada possui caminho óptico de 0,2 cm.

Nos experimentos com variação do pH do meio, a titulação foi realizada com ácido clorídrico (HCl) 6 M e hidróxido de sódio (NaOH), pela adição de pequenas alíquotas na solução com a amostra. Em um volume de 10 ml de bufotenina (óxido) a 10 μ M (40 μ M), em tampão Hepes 10 mM (5 mM) e pH 7,4 foram adicionados 50 μ l de HCl 6M, resultando em solução com pH \sim 2,0. A partir deste valor de pH foram adicionadas alíquotas de 5 μ l de NaOH; a cada adição era medido o pH do meio. Quando atingido o valor desejado de pH, um volume de 500 μ l de amostra era subtraído e transferido para uma cubeta de caminho óptico 0,2 cm para obtenção dos espectros de absorção e emissão. Este procedimento foi feito até valores de pH próximos de 12,00. O medidor de pH utilizado nesses experimentos é da marca Quimis.

Para preparação de micelas foram utilizados o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) de carga positiva e o Dodecilsulfato de sódio (SDS) de carga negativa, ambos adquiridos da Sigma-Aldrich. O preparo das soluções estoque é feito dissolvendo o surfactante (em pó) em água Milli-Q; a massa de surfactante foi aferida na balança analítica SHIMADZU - AUW220D disponível no Laboratório de Biofísica do IF/UFG. A concentração dos estoques foi de 0,5 M; para a dissolução completa dos surfactantes nas soluções estoque, o frasco contendo a amostra foi deixado em um banho de ultrassom durante aproximadamente 2 horas. Após este período, as soluções a 0,5 M apresentavam-se completamente homogêneas, sem espuma na interface ar/água e sem precipitações no fundo do frasco. O banho de ultrassom utilizado é da marca Eco-Sonics. Em um volume inicial de 3 ml de bufotenina (óxido) a 10 μ M (20 μ M), em uma cubeta de caminho óptico 1 cm, foram adicionadas pequenas alíquotas de SDS ou CTAB a 0,5 M com o objetivo de aumentar gradativamente a concentração de surfactante no sistema. As concentrações desejadas de surfactantes foram calculadas utilizando-se a equação de diluição $c_1v_1 = c_2v_2$, onde c_1 é a concentração molar do estoque, c_2 é a concentração molar desejada de surfactante na cubeta, v_2 é o volume final na cubeta e v_1 é o volume de surfactante a ser adicionado. A cada adição de surfactante na cubeta, esta era agitada delicadamente para que não houvesse a formação de espuma. A cubeta utilizada nestes experimentos apresenta caminho óptico de 1 cm.

O preparo das membranas fosfolipídicas, utilizando o fosfolipídio 1,2-dimiristoil-fosfatidil colina (DMPC), foi feito através do método de extrusão (HOPE et al., 1985). Calcula-se a massa de DMPC que deve ser utilizada para a concentração desejada, para determinado volume da solução tampão Hepes. Após a massa calculada ser aferida na balança analítica, adiciona-se clorofórmio sobre o lipídio (em pó), em um tubo de ensaio. O passo seguinte é adicionar um volume, já calculado, do estoque da molécula fluorescente (Bufotenina ou Óxido de bufotenina) que corresponda a uma concentração de 0,5% ou 1% em relação à concentração molar do lipídio. Na sequência, a amostra, dissolvida em clorofórmio é levada ao agitador (vortex); com o auxílio de um fluxo de nitrogênio ultrapuro para evaporar o clorofórmio, ocorre a formação de um pequeno filme lipídico no fundo do tubo de ensaio. O filme lipídico é então deixado em um ambiente de baixa pressão (câmara de vácuo) por algumas horas; retira-se o filme lipídico do vácuo para ser suspenso em solução aquosa e levado ao agitador de tubos, para ser feito vórtex, numa temperatura acima da temperatura de transição de fase do lipídio. O resultado até então são vesículas multilamelares. Para formação de vesículas

unilamelares é realizado o processo de extrusão através de membranas de policarbonato de 0,1 μm de diâmetro, do kit mini-extruder da Avanti Polar Lipids. O processo de extrusão é repetido por 21 vezes, e é realizado apenas com a parcela da amostra que será utilizada em um prazo de até 48 horas para realização dos experimentos. Nestes experimentos, a cubeta utilizada possui caminho óptico de 0,2 cm.

Como protocolo alternativo, também foram feitos experimentos com adição da bufotenina ou do óxido nas vesículas fosfolipídicas já extrusadas, na forma unilamelar. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença entre os dois protocolos de adição dos fluoróforos nas vesículas.

Nos experimentos envolvendo a transição de fase das vesículas fosfolipídicas, foi utilizado o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) como sonda fluorescente, gentilmente cedido pela profa. Maria Teresa Moura Lamy, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, com quem mantemos colaboração. O DPH, quando utilizado, foi adicionado ao clorofórmio, no momento do preparo dos filmes lipídicos. O estoque de DPH é de 1 mM em clorofórmio, mantido sob refrigeração a -18°C .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

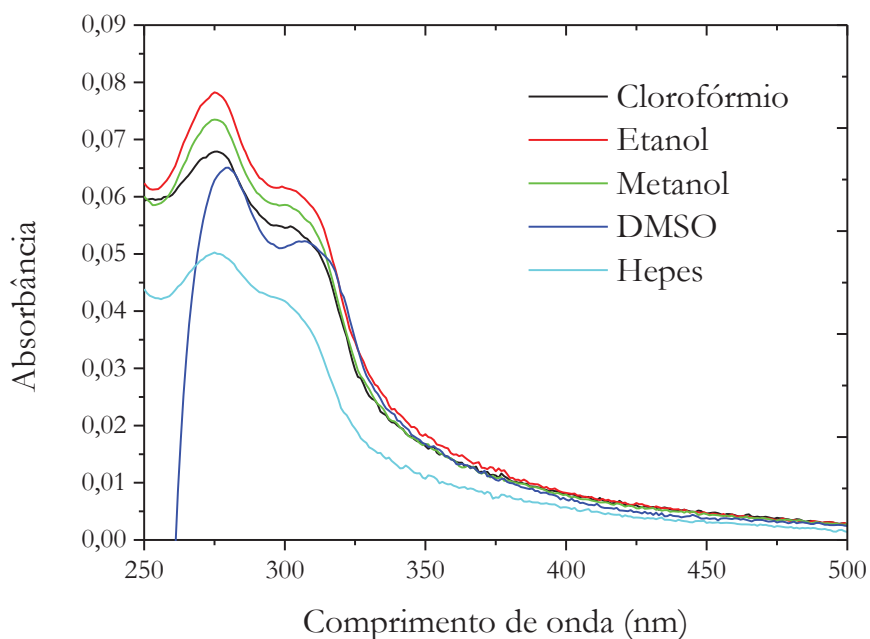
Apresentaremos, primeiramente, os resultados obtidos para a bufotenina em diversos solventes, em presença de micelas e em presença de vesículas fosfolipídicas. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos para o óxido de bufotenina nos mesmos sistemas.

4.1. Bufotenina em solventes

4.1.1. Espectros de absorção

Através dos experimentos de absorção óptica foram obtidos os espectros de absorção para a bufotenina em clorofórmio, etanol, metanol, DMSO e solução aquosa (Hepes) pH 7.47, 10 mM. As medidas foram realizadas nas concentrações 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM de bufotenina para todos os solventes; para o clorofórmio, etanol, metanol e DMSO foram realizadas também medidas na concentração de 5 μM ; para o Hepes uma medida em 160 μM foi realizada. A figura 4.1 mostra os espectros obtidos para a concentração de 80 μM .

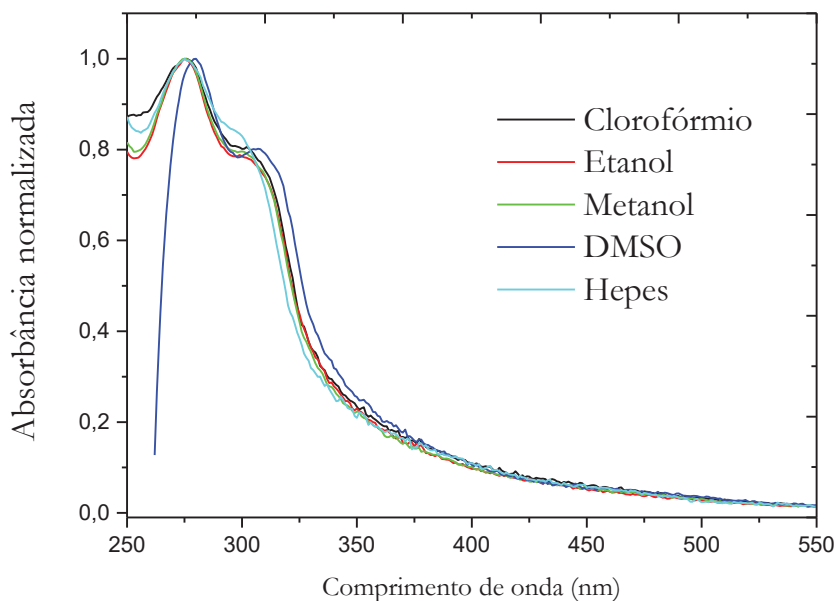
Figura 4.1 – Espectros de absorção da bufotenina (80 μM) em diversos solventes; cubeta de caminho óptico $l = 0,2$ cm.



Fonte: Próprio autor.

Para a bufotenina em Hepes os valores de absorção óptica se tornam menores quando comparados com os espectros nos demais solventes. A figura 4.2 a seguir mostra todos os espectros de absorção normalizados da bufotenina a 80 μM .

Figura 4.2 – Espectros de absorção normalizados da bufotenina (80 μM) em diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

Para todas as soluções a molécula apresenta duas bandas de absorção: a primeira centrada em 278 nm para o clorofórmio, etanol, metanol e Hepes e 280 nm para o DMSO; a segunda centrada em 305 nm para o clorofórmio, etanol e metanol, 309 nm para o DMSO e 300 nm para o Hepes. A absorção é máxima, para todas as soluções, na primeira banda. A tabela 4.1 contém os valores para os comprimentos de onda do máximo de absorção da bufotenina nos diversos solventes.

Tabela 4.1 – Posições do máximo comprimento de onda de absorção para a bufotenina em diversos solventes.

Solvente	Constante dielétrica (ϵ)	$\lambda_{m\acute{a}x}(\text{nm})$ 1 ^a banda	$\lambda_{m\acute{a}x}(\text{nm})$ 2 ^a banda
Clorofórmio	4,80	278	305
Etanol	25,10	278	305
Metanol	33,60	278	305
DMSO	46,70	280	309
Hepes	78,30	278	300

Fonte: Próprio autor.

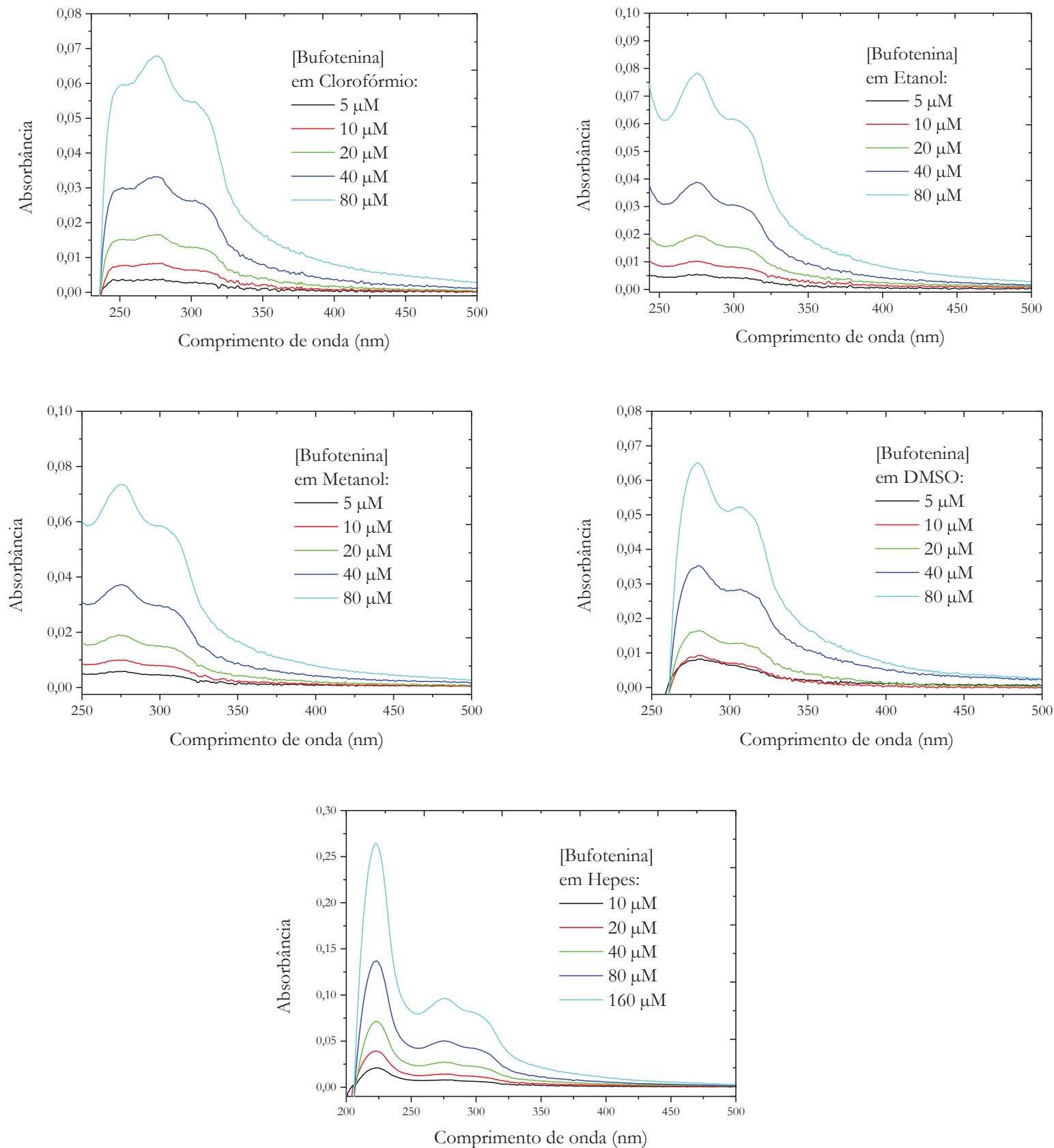
A mudança na posição do comprimento de onda do máximo de absorção devido à polaridade do meio é denominada solvatocromismo. No caso de um deslocamento espectral para o vermelho chamamos de solvatocromismo positivo. Esse comportamento é consequência da maior estabilização do estado excitado do que o estado fundamental do fluoróforo. Em geral compostos aromáticos (como é o caso da bufotenina) tendem a apresentar baixo solvatocromismo (REICHARDT; WELTON, 2010).

Em relação à primeira banda de absorção, não foi observado solvatocromismo entre clorofórmio, etanol, metanol e Hepes, soluções que apresentam diferentes polaridades. Observa-se que apenas em DMSO, a bufotenina apresenta um pequeno deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico); isso pode estar relacionado com o caráter aprótico (MARIANA, 2011) desse solvente.

Considerando a segunda banda de absorção, o deslocamento para o azul observado em Hepes (em relação ao clorofórmio, etanol e metanol) pode estar relacionado com as ligações de hidrogênio formadas entre o solvente e a bufotenina (SKOOG; DONALD, 1980); a ligação de hidrogênio entre as moléculas de água e a bufotenina confere maior estabilidade ao nível fundamental de energia, proporcionando rigidez estrutural à molécula e exigindo maior quantidade de energia para realizar a transição do estado fundamental para o estado excitado. Dessa forma é possível entender também o deslocamento para o vermelho do máximo de absorção da bufotenina em DMSO, uma vez que este solvente tem caráter aprótico.

Foram medidos os espectros de absorção da bufotenina em clorofórmio, etanol, metanol, DMSO e Hepes (figura 4.3), para diferentes concentrações:

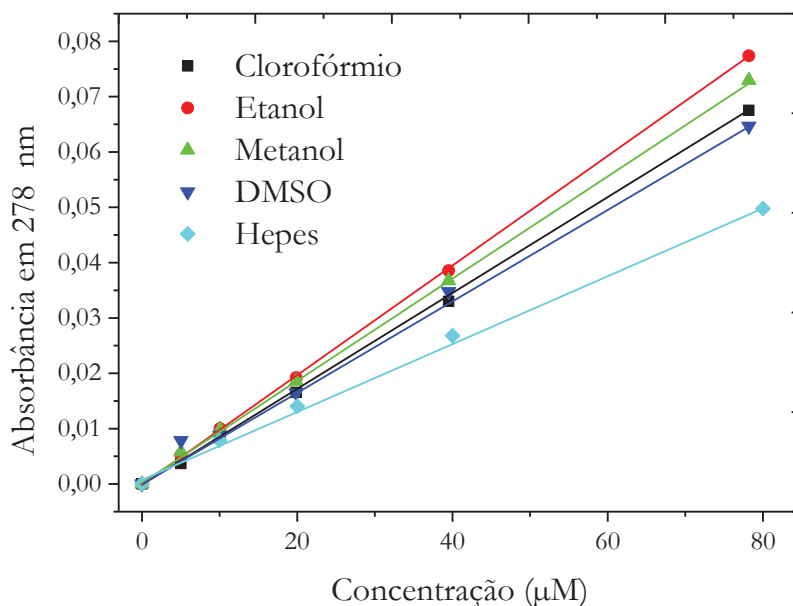
Figura 4.3 – Espectros de absorção da bufotenina em diversos solventes, em função da concentração; cubeta de caminho óptico $l = 0,2$ cm.



Fonte: Próprio autor.

É possível notar a diminuição da absorbância com a diminuição da concentração, resultado previsto pela lei de Lambert-Beer. A figura 4.4 mostra a dependência dos valores de absorção obtidos em 278 nm, com a concentração.

Figura 4.4 – Valores de absorbância da bufotenina em função da concentração e ajustes lineares para diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

Na faixa de concentração estudada, não foram observados desvios da Lei de Lambert-Beer. Obtivemos o coeficiente angular de cada curva através do ajuste linear. De posse dessa informação e do caminho óptico da luz, que foi de 0,2 cm de acordo com a dimensão da cubeta, utilizamos a equação 4.1 para calcular os coeficientes de absorção (ϵ) da bufotenina em cada solvente.

$$\epsilon l = A/c = \text{coeficiente angular} \quad (4.1)$$

onde l é o caminho óptico (em cm), A a absorbância e c a concentração da amostra (em M). Obtivemos os valores de ϵ descritos na tabela 4.2 a seguir:

Tabela 4.2 – Coeficiente de absorção da bufotenina em diversos solventes, para $\lambda = 278$ nm.

Solvente	ϵ ($cm^{-1}M^{-1}$)
Clorofórmio	4326 ± 36
Etanol	4935 ± 26
Metanol	4628 ± 35
DMSO	4073 ± 125
Hepes	2955 ± 75

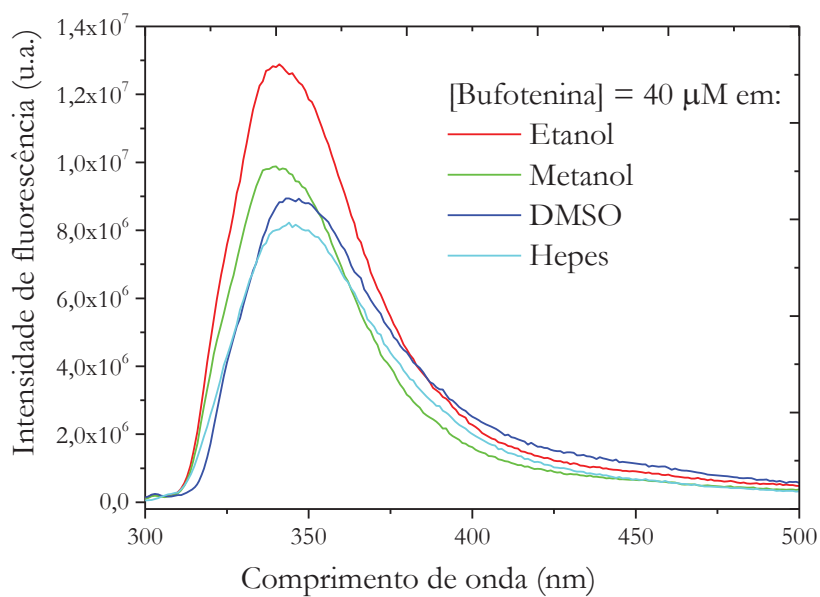
Fonte: Próprio autor.

O coeficiente de absorção molar está relacionado com a probabilidade de determinada transição eletrônica ocorrer; da tabela 4.2 acima, pode-se notar que o menor coeficiente de absorção molar para a bufotenina é observado em Hepes, enquanto para os demais solventes os valores de ϵ são maiores e semelhantes entre si. Esses resultados sugerem que a probabilidade de transição (em $\lambda = 278$ nm) é menor em solventes mais polares, como o DMSO e, sobretudo, solução aquosa.

4.1.2. Espectros de emissão fluorescente

Para obter o espectro de emissão a molécula foi excitada com um comprimento de onda de 278 nm em todos os solventes. A figura 4.5 mostra os espectros de emissão para a bufotenina em etanol, metanol, DMSO e Hepes em uma concentração de 40 μ M. Em presença de clorofórmio não foi detectada emissão fluorescente para a bufotenina.

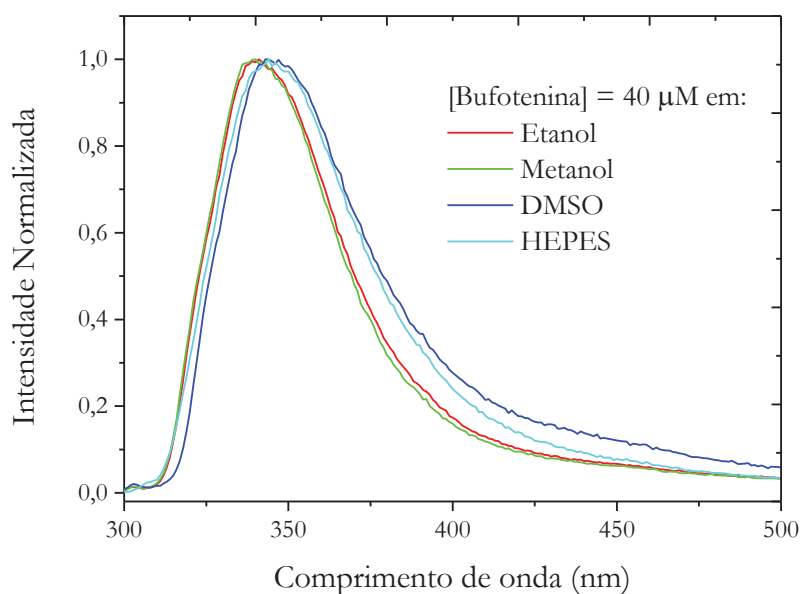
Figura 4.5 – Espectros de emissão fluorescente da bufotenina 40 μM em diversos solventes; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se que a intensidade de emissão fluorescente da molécula diminui com o aumento da polaridade do meio. A figura 4.6 contém os espectros de emissão normalizados para uma concentração de 40 μM para cada solvente:

Figura 4.6 – Espectros de emissão fluorescente normalizados da bufotenina 40 μM em diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

É possível notar um deslocamento do máximo de emissão entre os solventes; a tabela 4.3 a seguir mostra os valores referentes à posição do máximo comprimento de onda de emissão da bufotenina em cada solvente.

Tabela 4.3 – Posição do máximo comprimento de onda de emissão fluorescente para a bufotenina em diversos solventes.

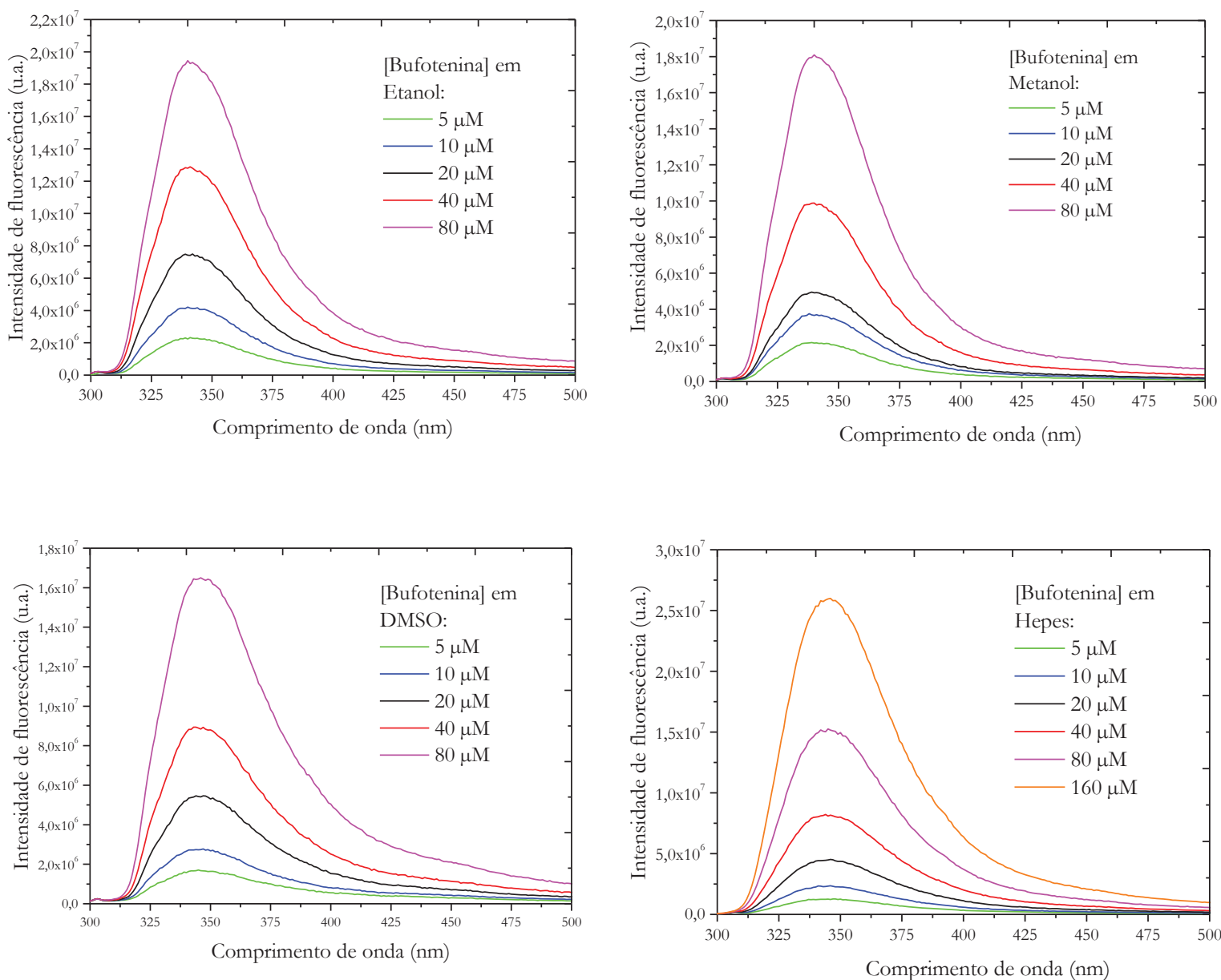
Solvente	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
Etanol	341
Metanol	340
DMSO	345
Hepes	345

Fonte: Próprio autor.

O deslocamento espectral é resultado de efeitos específicos do solvente, pela formação de ligações de hidrogênio e de complexos de transferência de cargas. Observa-se um deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico) com o aumento da polaridade do solvente; no processo de relaxação do primeiro estado excitado, as ligações de hidrogênio estabelecidas entre solvente e a amostra provocam uma diminuição da energia do estado excitado (TAKARA, 2006).

Foram obtidos os espectros de emissão da bufotenina em etanol, metanol, DMSO e Hepes (figura 4.7), para diferentes concentrações:

Figura 4.7 – Espectros de emissão da bufotenina em diversos solventes para diferentes concentrações; excitação em 278 nm.



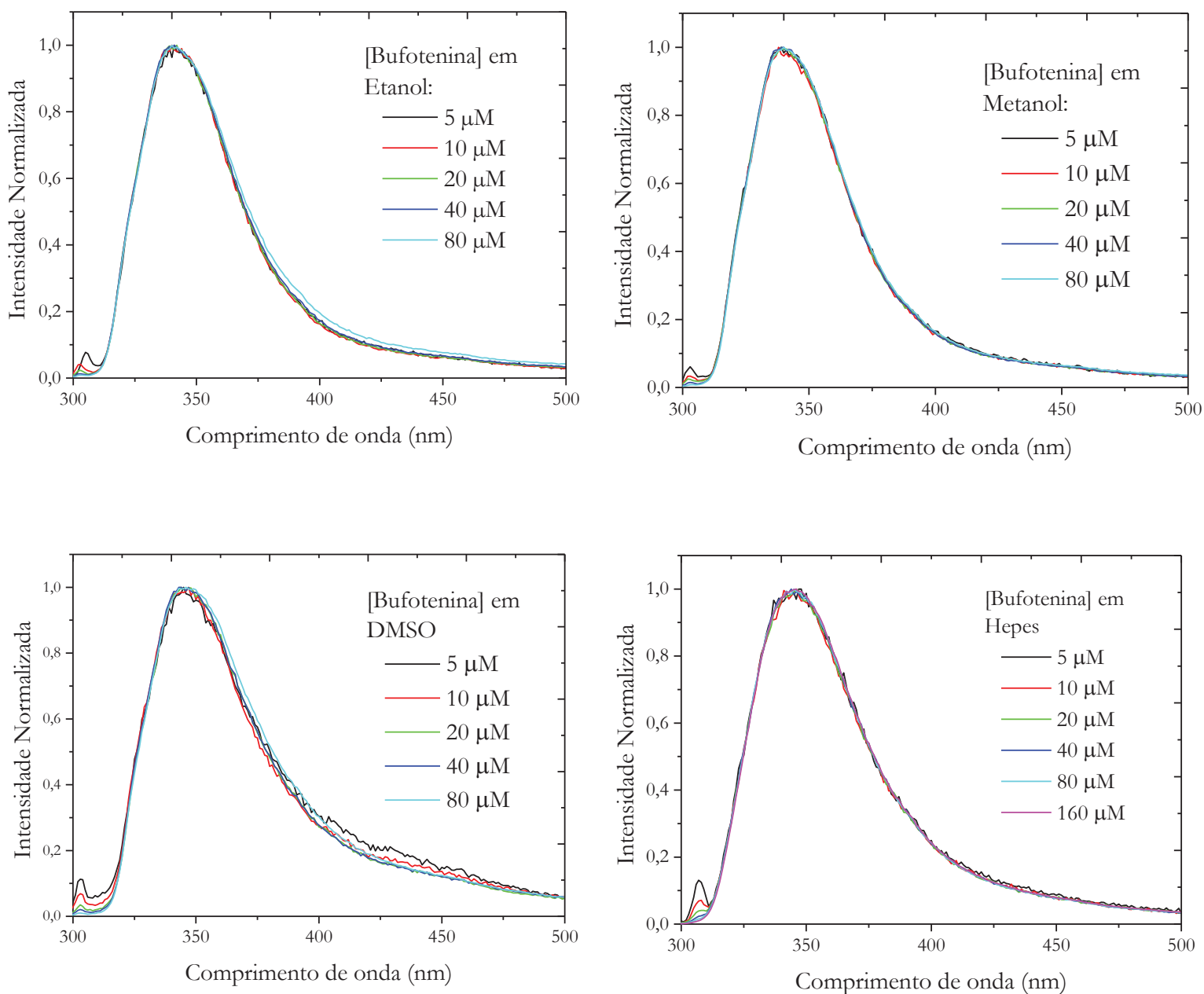
Fonte: Próprio autor.

Importante ressaltar que as diferenças entre os espectros de fluorescência da bufotenina em diferentes solventes são governadas pela polaridade dos solventes e não pelo caráter prótico ou aprótico destes.

Alterações na forma do espectro e/ou deslocamento espectral em concentrações elevadas podem indicar a ocorrência da formação de dímeros ou polímeros; alguns hidrocarbonetos aromáticos podem ainda formar excímeros, que são dímeros no estado excitado, obtidos pela colisão entre uma molécula excitada e uma não excitada,

detectados em concentrações relativamente altas de fluoróforo (VALEUR, 2001). A figura 4.8 mostra os espectros de emissão normalizados da bufotenina em diversos solventes:

Figura 4.8 – Espectros de emissão normalizados da bufotenina em diversos solventes para diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor.

Não foram observadas alterações na forma do espectro ou deslocamento espectral nas diversas concentrações da molécula de bufotenina em cada um dos

solventes, o que indica que a molécula permaneceu na forma monomérica; ou seja, para a faixa de concentração estudada não há sinal de agregação ou interação entre as moléculas de bufotenina.

Como parte do processo de caracterização espectroscópica, com dados de absorção óptica e emissão fluorescente calculamos o rendimento quântico da bufotenina nos diversos solventes através da equação 1.11 (tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Rendimento quântico da bufotenina calculado em diversos solventes.

Solvente	Rendimento quântico
Etanol	0,11939
Metanol	0,12208
DMSO	0,11698
Hepes	0,11766

Fonte: Próprio autor.

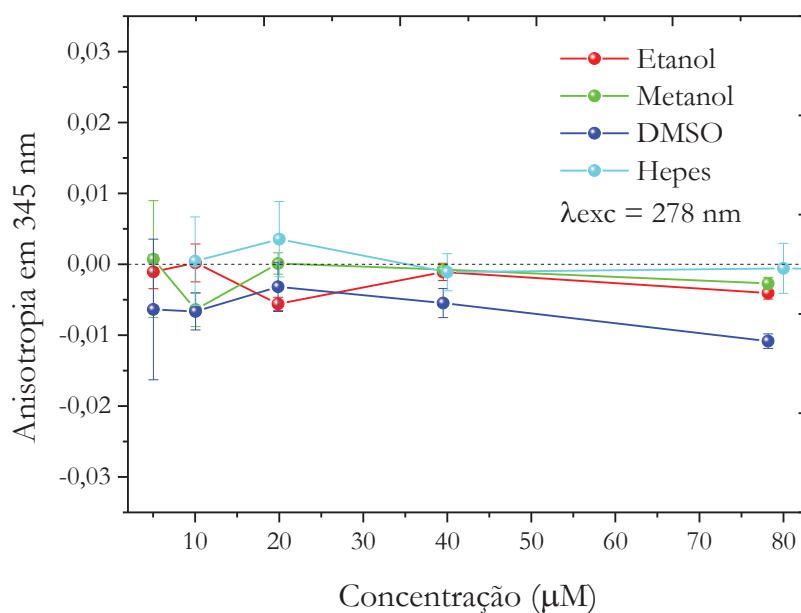
Os valores de rendimento quântico foram obtidos utilizando-se como referência a molécula de triptofano em solução tampão Hepes 5 mM, pH = 7,4. O valor encontrado na literatura para o rendimento quântico de fluorescência do triptofano é de 0,11 em solução tampão com pH ~ 7,4 (MARQUEZIN et al., 2003). Podemos observar que a molécula de bufotenina possui rendimento quântico muito semelhante ao do triptofano; os mesmos valores de rendimento quântico são observados em solventes menos polares.

4.1.3. Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência revela o deslocamento angular médio da molécula fluorescente que ocorre entre a absorção e a emissão de um fóton; esse deslocamento depende da taxa de difusão rotacional no estado excitado. A taxa de difusão rotacional depende das características do solvente e da molécula. Dessa maneira, medidas de anisotropia de fluorescência possibilitam investigar tamanho, forma e movimento rotacional da molécula, assim como possíveis restrições do movimento que podem ser impostas pelo solvente (fluidez do meio).

Foram realizadas medidas de anisotropia estática em função da concentração da bufotenina em etanol, metanol, DMSO e Hepes. A figura 4.9 mostra os resultados obtidos:

Figura 4.9 – Anisotropia em função da concentração de bufotenina em diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

Os valores de anisotropia obtidos para diferentes concentrações podem ser interpretados como flutuações em torno do zero, o que sugere uma livre movimentação da molécula em cada solvente. Estes resultados estão em bom acordo com os resultados obtidos da normalização dos espectros de emissão (figura 4.8), pois sugerem que não há formação de agregados de bufotenina na faixa de concentração estudada; agregados contribuiriam com um aumento nos valores de anisotropia, devido à sua menor movimentação no solvente, pois um agregado é maior, em volume, do que uma única molécula de bufotenina.

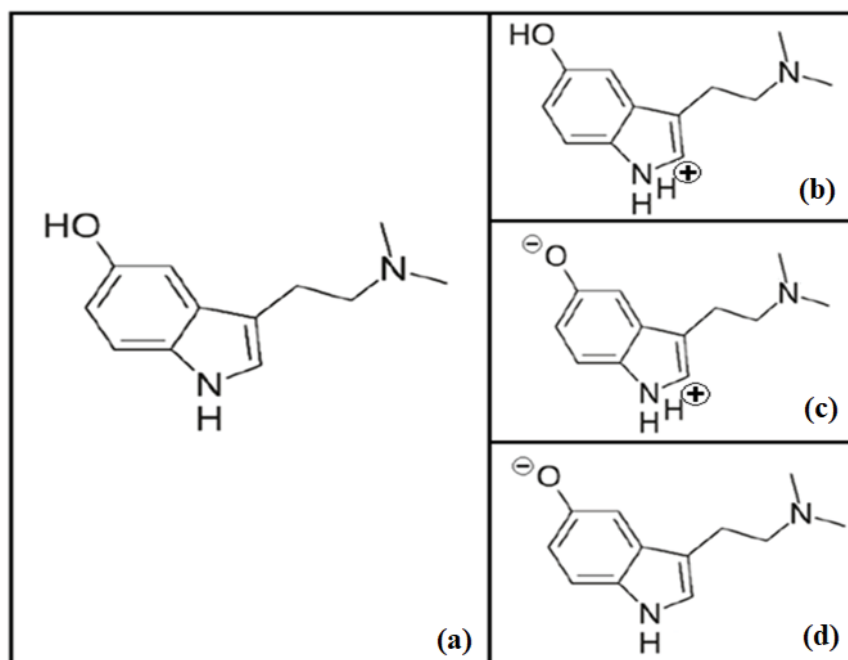
4.2. Bufotenina em solução aquosa com variação do pH

Medidas espectroscópicas de moléculas fluorescentes em função do pH do meio podem nos dar informações estruturais sobre o fluoróforo e a interação deste com o solvente. Os espectros de absorção de compostos que contém hidroxila e amino são dependentes de pH, devido às propriedades ácidas do grupo OH e ao caráter básico do grupo NH₂. Os espectros de fluorescência dos compostos aromáticos que contém esses grupos também dependem do pH, mas a natureza dessa dependência normalmente é diferente da dependência do pH dos espectros de absorção (GUILBAULT, 1990). Estudos de alterações da fluorescência em função do pH são utilizados (1) para distinguir compostos de estrutura semelhante; (2) como indicadores fluorescentes, onde

indicadores de pH por alteração na cor são de pouca utilidade em soluções turvas ou coloridas; (3) para determinação do pK_a aproximado de ácidos e bases em quantidades mínimas (WILLIAMS; BRIDGES, 1964).

A figura 4.10 a seguir mostra a estrutura molecular da bufotenina em suas formas neutra, protonada e desprotonada:

Figura 4.10 - Estrutura molecular da bufotenina em sua forma: (a) neutra, (b) protonada, (c) zwitteriônica e (d) desprotonada.



Fonte: Próprio autor.

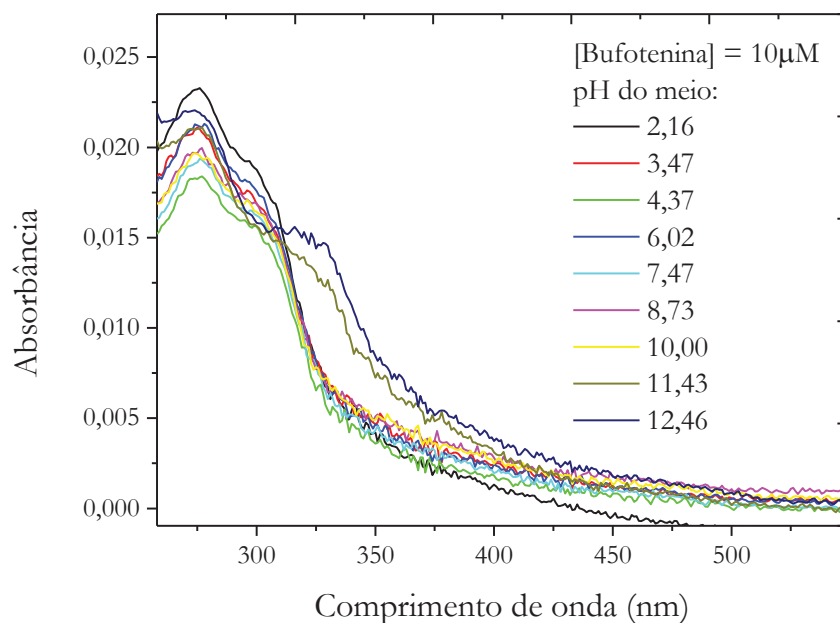
A forma protonada (b), com carga líquida positiva, predomina em valores de pH bastante ácidos, onde a concentração de H^+ é alta. Da mesma forma, para valores de pH básicos, haverá a predominância da forma desprotonada (d), com carga líquida negativa. A forma (a) ocorre com maior probabilidade que a forma (c), pois é mais fácil desprotonar o nitrogênio do que o oxigênio; no entanto, há também a ocorrência da forma *zwitteriônica* (c) durante o processo de variação do pH do meio.

Para compreender os diferentes sinais obtidos com a bufotenina em diferentes estados de protonação, realizamos experimentos de absorção óptica e emissão de fluorescência em função do pH do meio, a uma concentração de 10 μM de bufotenina, em meio aquoso (Hepes).

4.2.1. Espectros de absorção

A molécula de bufotenina, por ser um alcaloide indólico, possui um grupo amina que pode protonar em valores baixos de pH e um grupo hidroxila que pode desprotonar em valores altos de pH, o que pode proporcionar alterações nos espectros de absorção e fluorescência com a variação do pH do meio. A figura 4.11 mostra os espectros de absorção da bufotenina em Hepes para diversos valores de pH:

Figura 4.11 – Espectros de absorção da bufotenina (10 μM) em Hepes 10 mM para diversos valores de pH; caminho óptico $l = 0,2$ cm.

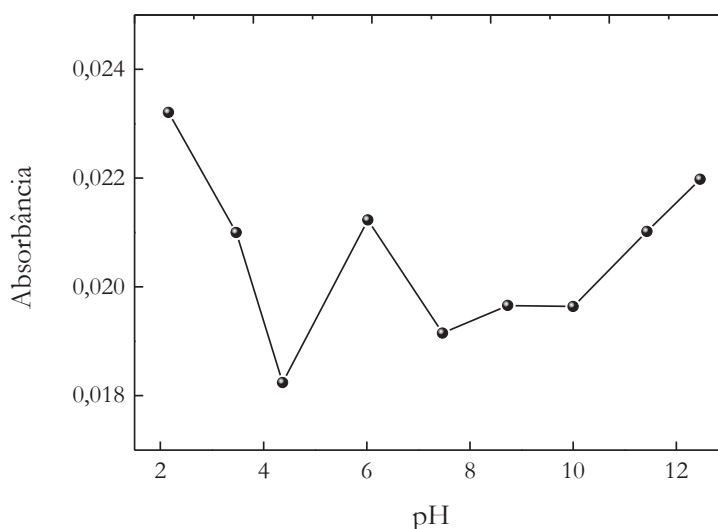


Fonte: Próprio autor.

Observa-se diferentes espectros de absorção para cada valor de pH do meio o que sugere a existência de espécies protonadas e desprotonadas da molécula de bufotenina.

A figura 4.12 mostra a absorbância da molécula de bufotenina na banda centrada em 278 nm em função do pH do meio.

Figura 4.12 – Absorbância máxima em função do pH do meio para a bufotenina (10 μ M) em Hepes 10 mM



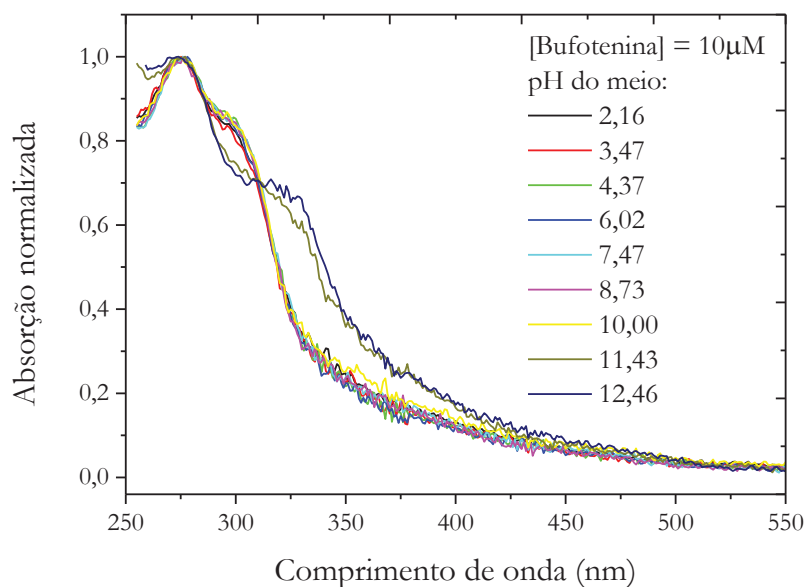
Fonte: Próprio autor.

Iniciamos as medidas de absorbância com o pH fisiológico da solução (7,4), para então adicionar o HCl diminuindo o pH para o valor de 2,16; a partir daí as medidas foram realizadas com o aumento gradativo do pH da solução com a adição de NaOH.

À medida que os valores de pH aumentam, de 2,16 para 4,37, a absorbância diminui, possivelmente pelo fato de as moléculas estarem protonadas em $\text{pH} = 2,16$ e a adição de NaOH iniciar um processo de desprotonação. Para valores de pH próximos ao fisiológico ocorre uma estabilização dos valores de absorbância (exceto pelo valor de $\text{pH} 6,02$) provavelmente pelo fato de que majoritariamente as moléculas se encontram na forma neutra e com ausência de processos de protonação/desprotonação. Para valores de pH acima de 10,00 observa-se um aumento dos valores de absorbância, pois a partir desse valor de pH, a molécula se encontra na forma desprotonada. O valor de absorbância para o $\text{pH} = 6,02$ gerou um ponto na curva fora do padrão discutido; possivelmente a molécula de bufotenina, na forma protonada, é mais sensível à polaridade do solvente. A titulação entre 4,37 e 6,02 para os valores de pH pode ser realizada com algum(ns) valor(es) intermediário(s), com a adição de alíquotas menores de NaOH. De uma forma geral conclui-se que a molécula possui maior absorbância em suas formas protonadas e desprotonadas em relação à sua forma neutra.

A figura 4.13 mostra os espectros de absorção normalizados da bufotenina em Hepes para diversos valores de pH:

Figura 4.13 – Espectros de absorção normalizados da bufotenina (10 μM) em Hepes para diversos valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

As alterações observadas nos espectros de absorção para diferentes valores de pH sugerem a existência de duas estruturas absorvedoras diferentes: (1) a molécula de bufotenina na forma neutra para valores de pH abaixo de 10,00; (2) a molécula na forma desprotonada para valores de pH acima de 10,00. Para valores de pH baixo o formato do espectro não possui alterações significativas em relação ao formato do espectro em pH fisiológico, o que pode indicar maior solubilidade em água em pH ácido comparada à solubilidade em pH básico.

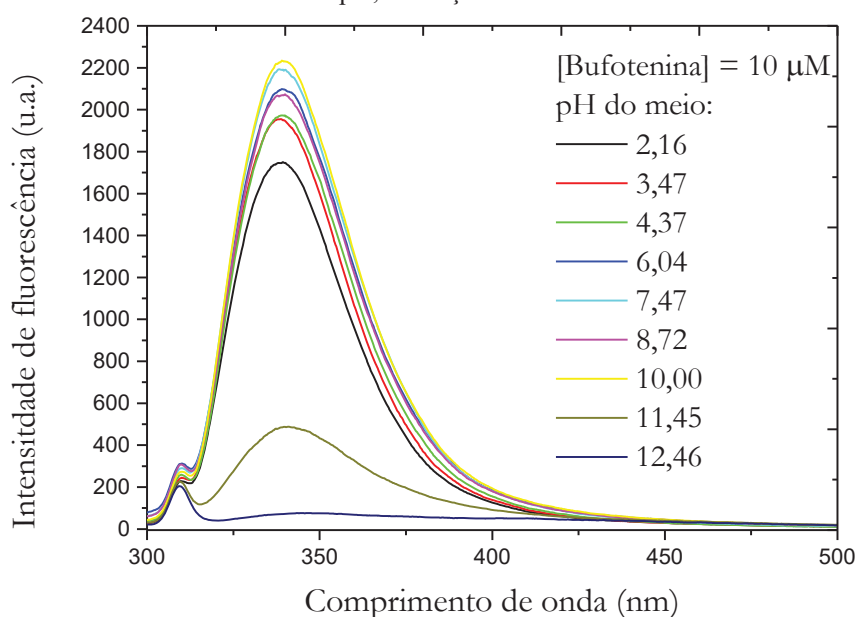
4.2.2. Espectros de emissão fluorescente

A fluorescência de compostos aromáticos com substituintes ácidos e/ou básicos no anel sofre alterações, tanto no comprimento de onda quanto na intensidade, para as formas ionizadas e não-ionizadas da molécula. As alterações se devem ao surgimento de formas ressonantes associadas às formas básicas e ácidas da molécula. Estudos com a molécula fluorescente triptofano indicam que grupos protonáveis e desprotonáveis contribuem para alterações no decaimento da fluorescência (MARQUEZIN et al., 2003), onde a transferência de elétrons atua como uma rota para desativação não radiativa do estado excitado da molécula (CALLIS; VIVIAN, 2003). No caso da bufotenina, a desprotonação do grupamento OH em valores de pH extremamente

básicos diminui consideravelmente a intensidade de fluorescência e tal processo poderia estar relacionado a uma possível transferência de carga do anel indol para o radical N-dimetil.

A figura 4.14 mostra os espectros de emissão da bufotenina em Hepes para diversos valores de pH. A amostra foi excitada com comprimento de onda de 278 nm em todos os experimentos.

Figura 4.14 – Espectros de emissão da bufotenina (10 μM) em Hepes 10 mM para diversos valores de pH; excitação em 278 nm.



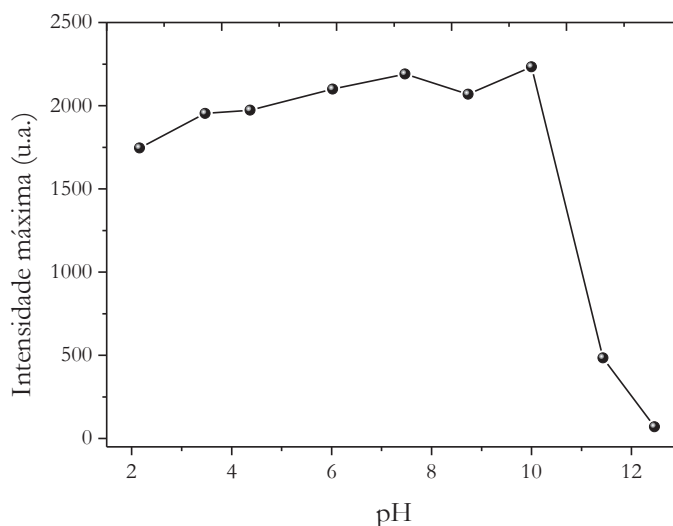
Fonte: Próprio autor.

Como a fluorescência estática é uma média da fluorescência de todas as moléculas, os resultados obtidos em um experimento de emissão em função do pH do meio refletem a forma predominante da molécula naquele pH. O pico observado em torno de 309 nm corresponde ao espalhamento Raman da água, quando excitada em 278 nm. É possível notar uma diminuição de fluorescência para pH = 11,45 e pH = 12,46. Em pH ácido, a protonação do nitrogênio do anel aromático origina estruturas ressonantes com o estado fundamental mais estável, evitando a desativação não radiativa, como consequência a intensidade de emissão de fluorescência se tornaria maior. Por outro lado, a desprotonação do grupo hidroxila causa o efeito oposto, diminuindo consideravelmente a intensidade de emissão de fluorescência. Como a molécula de bufotenina possui os dois sítios (protonável e desprotonável), a intensidade de emissão fluorescente pode diferir para cada valor de pH; observa-se que para valores

de pH básico (acima de 10,00) os sítios desprotonados são predominantes em relação aos mesmos sítios em seu estado protonado.

A molécula de bufotenina é fluorescente em uma ampla faixa de pH, como indicado na figura 4.15 que mostra a intensidade máxima de fluorescência em função do pH do meio:

Figura 4.15 – Intensidade máxima de fluorescência em função do pH do meio para a bufotenina (10 μ M).

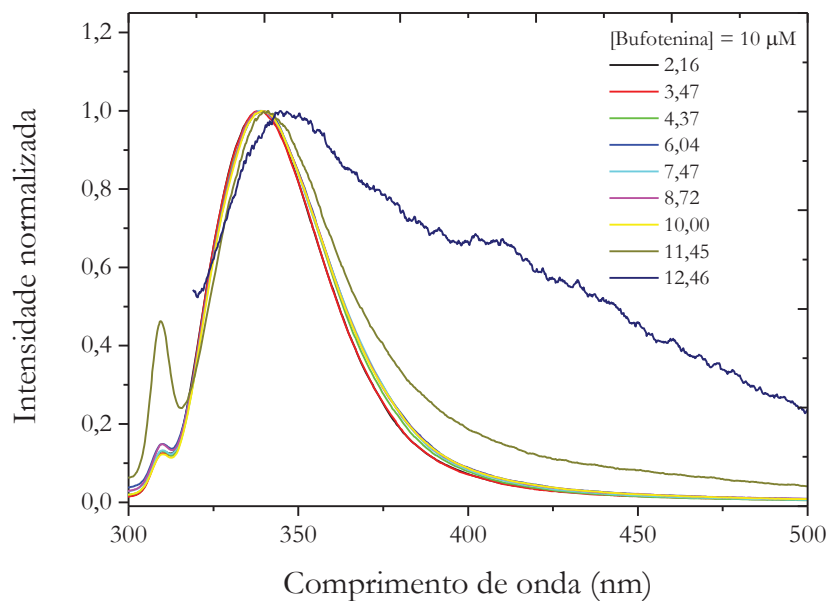


Fonte: Próprio autor.

Na região compreendida entre pH \sim 2,0 e pH \sim 10,0 observa-se ligeiro aumento na intensidade máxima com o aumento do pH, o que poderia ser explicado pelo fato de que a fluorescência do anel indol pode ser suprimida pela presença de prótons (íons H^+) no sistema (STEINER; KIRBY, 1969). Neste intervalo de pH sugere-se a predominância da bufotenina na forma neutra; já a queda acentuada na intensidade de fluorescência a partir de pH = 10,0 pode ser devida à formação da bufotenina aniônica, que desprotonou no grupo hidroxila com a adição de NaOH.

A figura 4.16 mostra os espectros de emissão normalizados da bufotenina em Hepes para diversos valores de pH:

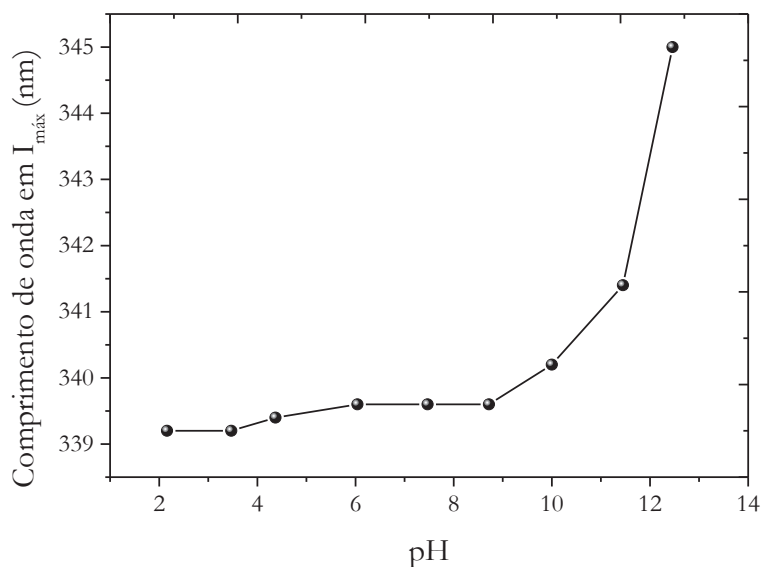
Figura 4.16 – Espectros de emissão normalizados da bufotenina (10 μM) em Hepes para diversos valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

O aumento do pH desloca a emissão máxima para o vermelho, como pode ser observado no gráfico da figura 4.17 a seguir:

Figura 4.17 – Comprimento de onda para a emissão máxima da bufotenina (10 μM) em Hepes para diversos valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

A predominância da forma aniônica da bufotenina em meio com pH acima de $\sim 9,0$ estabiliza o estado excitado, diminuindo sua energia, ao mesmo tempo em que diminui a intensidade de fluorescência. Em geral, a diminuição da intensidade de

fluorescência está associada à diminuição do tempo de vida do fluoróforo, na ausência de outras moléculas no sistema (LAKOWICZ, 2006). Assim, podemos afirmar que a forma aniônica da bufotenina diminui a taxa de desexcitação por fluorescência. Embora a energia do estado excitado seja estabilizada, possíveis ligações de hidrogênio entre a bufotenina e o meio solvente promoveriam com maior taxa a desexcitação da molécula por processos não radiativos, ou seja, há supressão de fluorescência por parte de ligações de hidrogênio entre o meio aquoso e a forma desprotonada da bufotenina.

4.3. Bufotenina em surfactantes

Surfactantes, popularmente conhecidos como detergentes, são moléculas anfífilas cujas estruturas moleculares são caracterizadas por duas regiões distintas: uma parte hidrofílica, que possui afinidade com a água, e uma outra hidrofóbica que tem afinidade com gorduras. Como consequência dessas características, essas substâncias podem atuar como agentes emulsificantes, tensoativos, dispersantes ou solubilizantes, conferindo enorme aplicabilidade industrial e científica (NITSCHKE; PASTORE, 2002; UENO et al., 2007; ZHANG et al., 2012) (AHMAD et al., 2021; CHANG et al., 2021; HALLEB et al., 2021; LI et al., 2021; QI et al., 2021; WANG et al., 2021; ZALDIVAR; CONDA-SHERIDAN; TAGLIAZUCCHI, 2021).

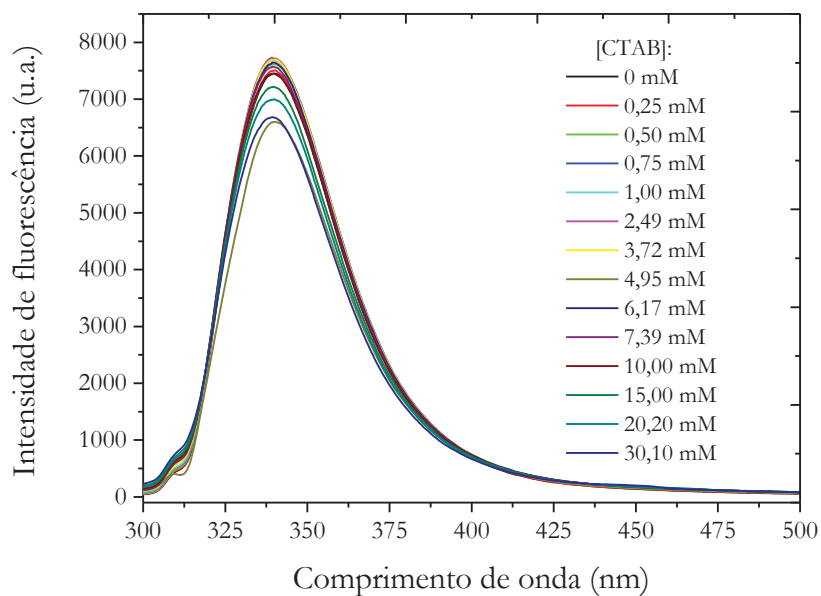
Os agregados resultantes da interação dessas moléculas anfífilas são utilizados como modelos, embora bastante rudimentares, de membranas biológicas, que podem ser monitorados através da fluorescência (MARQUEZIN et al., 2006)(SRIRAMA M. BHAIRI, CHANDRA MOHAN, SIBEL IBRYAMOVA, 2001)(VAN STAM; DEPAEMELAERE; DE SCHRYVER, 1998). Dessa forma realizamos experimentos com a bufotenina em surfactantes e micelas.

Os experimentos de emissão de fluorescência da bufotenina foram realizados na presença de dois surfactantes com carga e estruturas diferentes, ambos em solução com pH fisiológico, com a molécula na sua forma neutra, com ausência de sítios protonados ou desprotonados. A molécula, na concentração de 20 μM , foi excitada com um comprimento de onda de 278 nm em todos os experimentos. Verificamos possíveis interações da molécula de bufotenina com os agregados anfílicos do surfactante catiônico CTAB e do surfactante aniônico SDS; as interações podem ocorrer via interações coulombianas ou pelo efeito hidrofóbico.

4.3.1. CTAB

O Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi o surfactante catiônico utilizado. A figura 4.18 mostra o espectro de emissão da bufotenina em CTAB variando a concentração do surfactante.

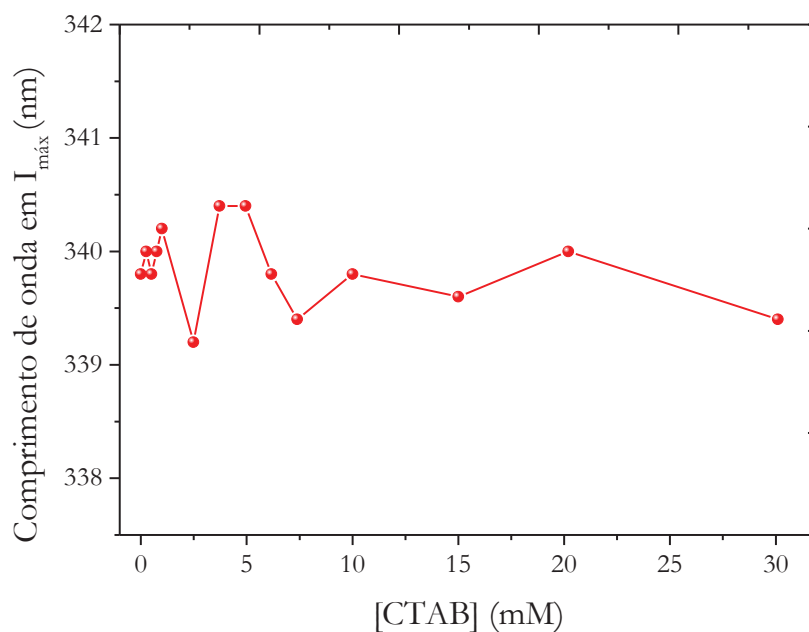
Figura 4.18 – Espectro de emissão da bufotenina em CTAB para diferentes concentrações do surfactante; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

Não foram observados deslocamentos espectrais na fluorescência da bufotenina para as diversas concentrações de surfactante empregadas; através do gráfico da figura 4.19 a seguir, podemos observar pequenas flutuações em torno de um comprimento de onda máximo de emissão:

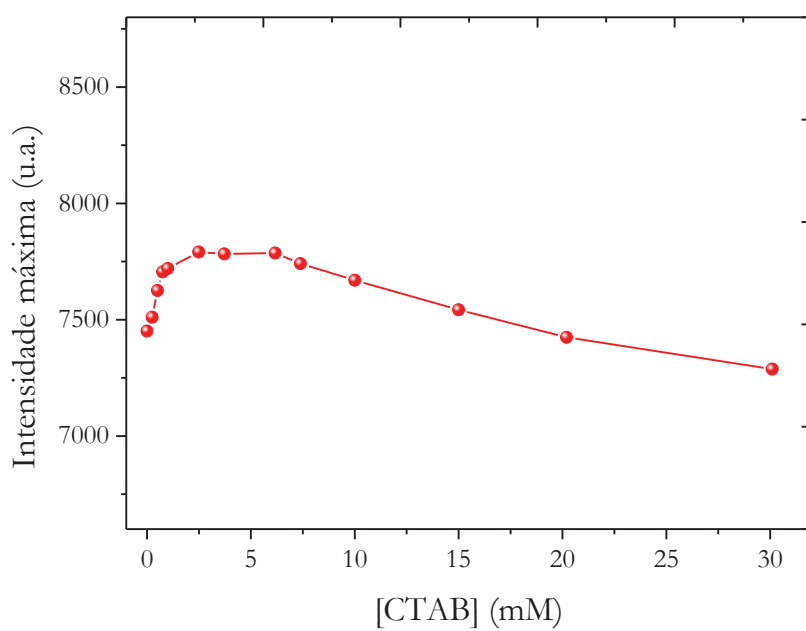
Figura 4.19 – Comprimento de onda para a emissão máxima da bufotenina em função da concentração de CTAB na amostra.



Fonte: Próprio autor.

A figura 4.20 mostra as variações da intensidade de emissão máxima em função da concentração do CTAB na amostra.

Figura 4.20 – Intensidade máxima de emissão da bufotenina em função da concentração de CTAB na amostra.



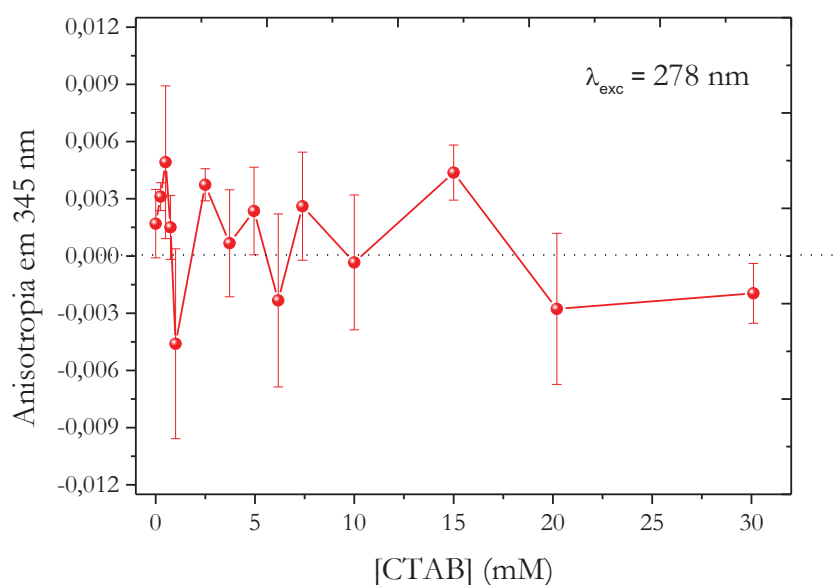
Fonte: Próprio autor.

Para a variação na concentração do surfactante, foram adicionadas pequenas alíquotas de uma solução estoque (de concentração mais alta), aumentando gradativamente o volume total da solução na cubeta. A diluição do composto acarreta uma diminuição da intensidade de fluorescência; assumindo que a fluorescência do composto varie linearmente com a concentração, foi realizada a correção na intensidade de fluorescência. A correção é feita multiplicando o espectro obtido para cada concentração pela razão entre o volume total de amostra (após a adição do surfactante) e o volume inicial (antes da adição do surfactante).

É possível notar um aumento acentuado na intensidade de fluorescência em valores de concentração de CTAB até 5 mM (a CMC do CTAB é de 1,0 mM), o que sugere que a molécula de bufotenina está interagindo com a micela, se posicionando na superfície externa da mesma. Esse aumento observado pode ser atribuído à diminuição das taxas de decaimento por processos não radiativos pois na presença de micelas a bufotenina possui menor contato com o solvente, o que diminui a desexcitação por supressão devido à formação de pontes de hidrogênio do fluoróforo com o solvente ou mesmo por colisão com as moléculas do solvente.

Foram realizadas medidas de anisotropia estática da bufotenina em função da concentração de CTAB. A figura 4.21 mostra os resultados obtidos.

Figura 4.21 – Anisotropia de fluorescência da bufotenina em função da concentração de CTAB na amostra.



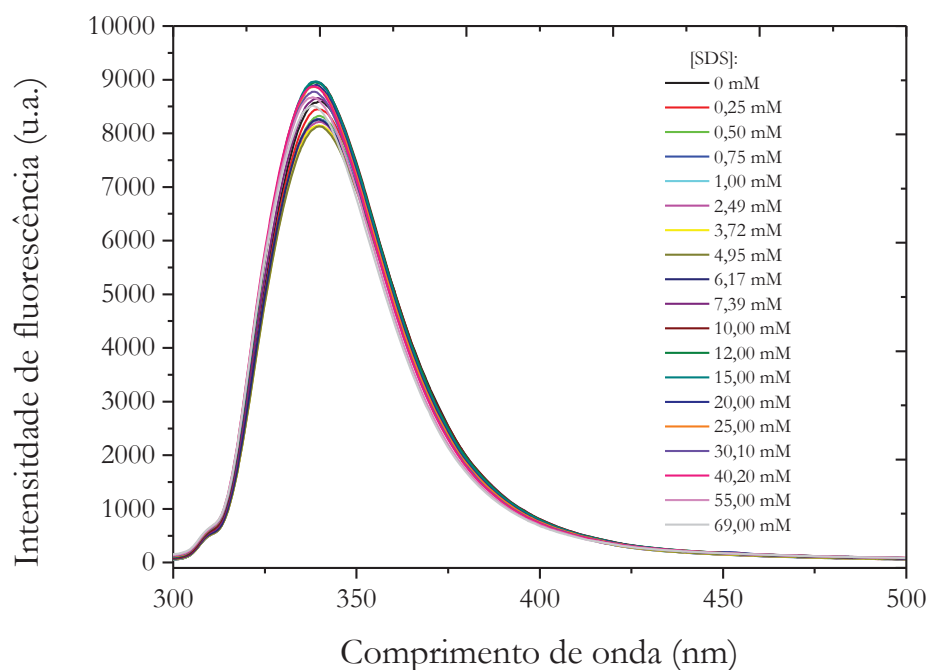
Fonte: Próprio autor.

Os valores de anisotropia obtidos para diferentes concentrações podem ser interpretados como flutuações em torno do zero, o que sugere uma livre movimentação da molécula em toda faixa de concentração de CTAB. Considerando que a bufotenina é sensível à presença das micelas, é possível que esta se localize na interface entre a porção hidrofílica do detergente e a água, onde teria maior mobilidade.

4.3.2. SDS

O Dodecilsulfato de sódio (SDS) foi o surfactante aniônico utilizado. A figura 4.22 mostra o espectro de emissão da bufotenina em SDS variando a concentração do surfactante:

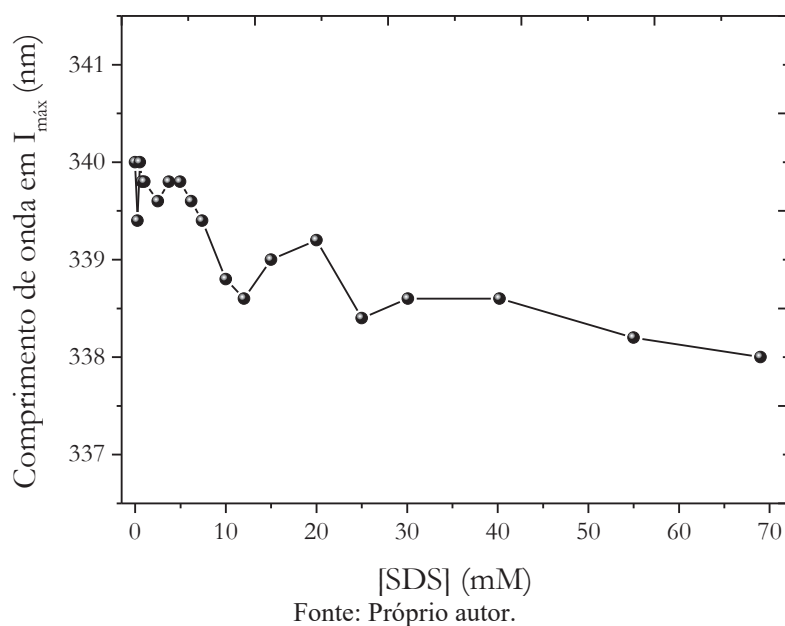
Figura 4.22 – Espectro de emissão da bufotenina em SDS para diferentes concentrações do surfactante; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

Foi possível observar um pequeno deslocamento espectral na fluorescência da bufotenina com a variação da concentração do SDS de 340 nm para 338 nm de acordo com a figura 4.23 a seguir:

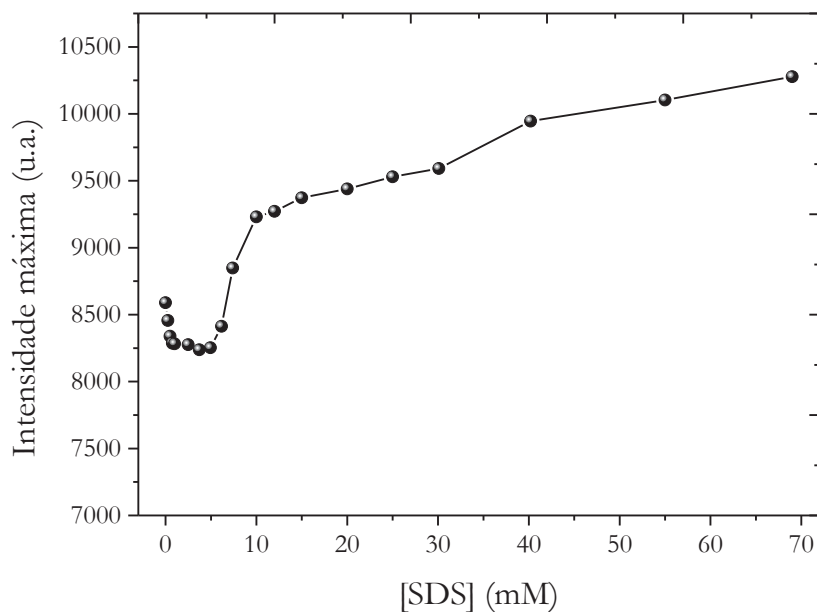
Figura 4.23 – Comprimento de onda para a emissão máxima da bufotenina em função da concentração de SDS na amostra.



O aumento da concentração de SDS proporciona um discreto deslocamento espectral para o azul. Foi discutido que em meio aquoso a emissão da bufotenina estaria deslocada para o vermelho pela formação de ligações de hidrogênio; dessa forma o deslocamento espectral para o azul sugere que a molécula de bufotenina está adentrando a região das cabeças polares dos surfactantes, o que reduziria seu contato com o meio aquoso.

A figura 4.24 mostra as variações da intensidade de emissão máxima (com a correção pelo efeito de diluição) em função da concentração do SDS na amostra:

Figura 4.24 – Intensidade máxima de emissão da bufotenina em função da concentração de SDS na amostra.

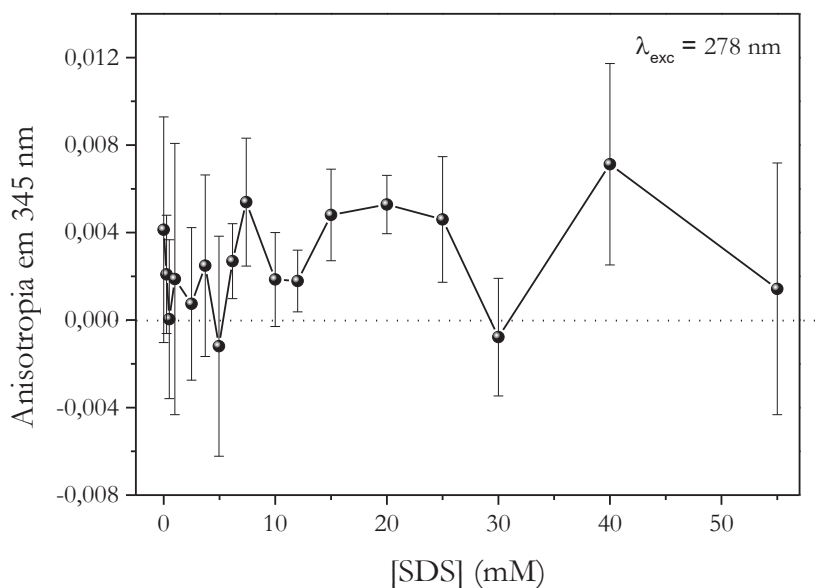


Fonte: Próprio autor.

Abaixo da CMC o acréscimo de SDS possivelmente faz com que ocorra a formação de agregados entre a bufotenina e o surfactante, o que proporciona uma pequena diminuição na intensidade de fluorescência; pode haver agregados na superfície (interface ar/água) com a cadeia hidrocarbônica exposta ao ar devido à sua hidrofobicidade. A partir da concentração de 7,0 mM referente à CMC do SDS, a intensidade de fluorescência aumenta, o que sugere que a bufotenina estaria adentrando a região das cabeças polares, como forma de minimizar a energia em relação às estruturas descritas antes da CMC. Essa configuração mais favorável energeticamente reduz a interação da bufotenina com o solvente, o que diminuiria a desexcitação por colisão com as moléculas do solvente, justificando o aumento na intensidade de fluorescência.

Foram realizadas medidas de anisotropia estática da bufotenina em função da concentração de SDS. A figura 4.25 mostra os resultados obtidos:

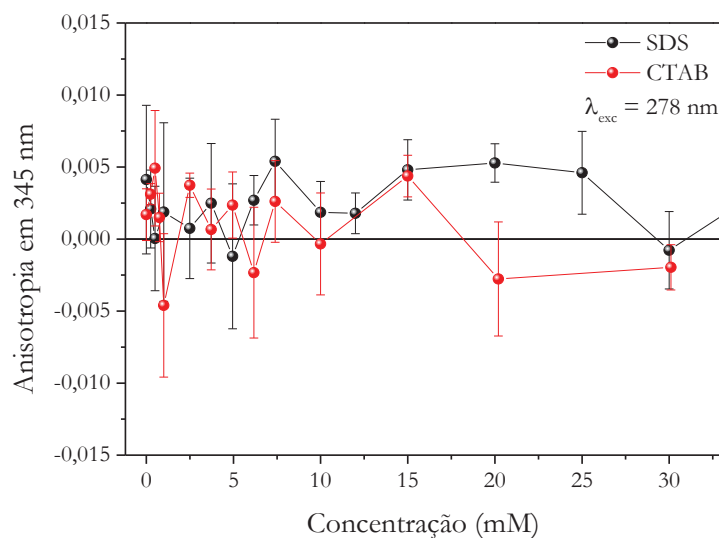
Figura 4.25 – Anisotropia de fluorescência da bufotenina em função da concentração de SDS na amostra.



Fonte: Próprio autor.

Os valores de anisotropia obtidos para a bufotenina em SDS podem ser interpretados como flutuações em torno do zero. Considerando os valores extremamente baixos de anisotropia, é possível concluir, assim como nas micelas de CTAB, que a bufotenina esteja localizada na interface entre a porção hidrofílica do SDS e a água, uma vez que sua mobilidade não é alterada durante a titulação com SDS, mesmo na fase pré-micelar. A figura 4.26 a seguir permite uma análise conjunta dos resultados de anisotropia da bufotenina em presença de SDS e CTAB:

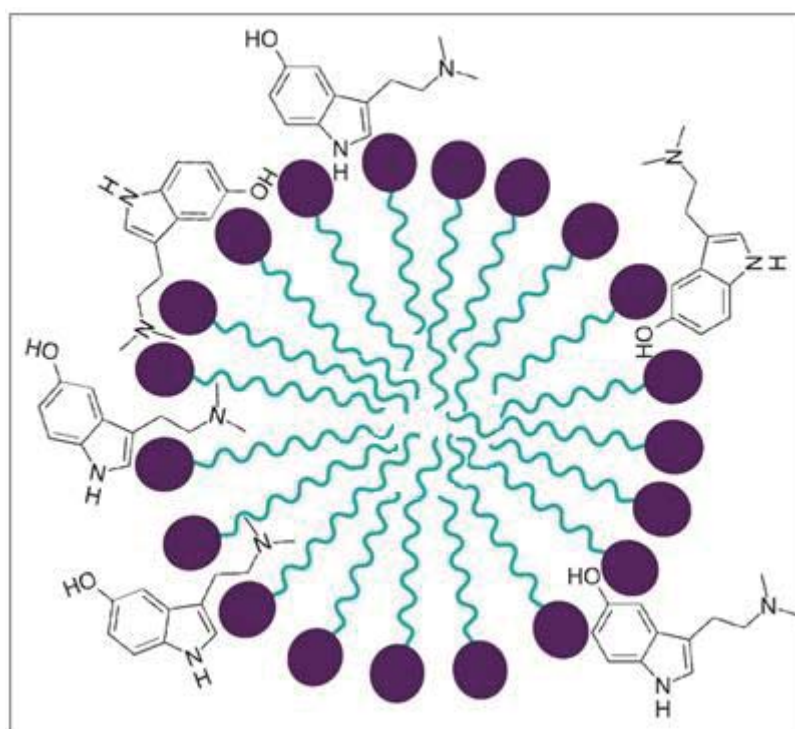
Figura 4.26 – Anisotropia de fluorescência da bufotenina em presença de SDS e CTAB.



Fonte: próprio autor.

Os resultados obtidos para a molécula de bufotenina em surfactantes, tanto no CTAB quanto no SDS, sugerem que a bufotenina se localiza da superfície externa da micela, pois se estivesse completamente inserida no interior, as caudas hidrofóbicas causariam restrições ao seu movimento, resultando em valores maiores de anisotropia. A figura 4.27 a seguir é uma representação esquemática de possíveis interações entre a bufotenina e a micela:

Figura 4.27 – Possíveis interações entre bufotenina e micela.



Fonte: Próprio autor.

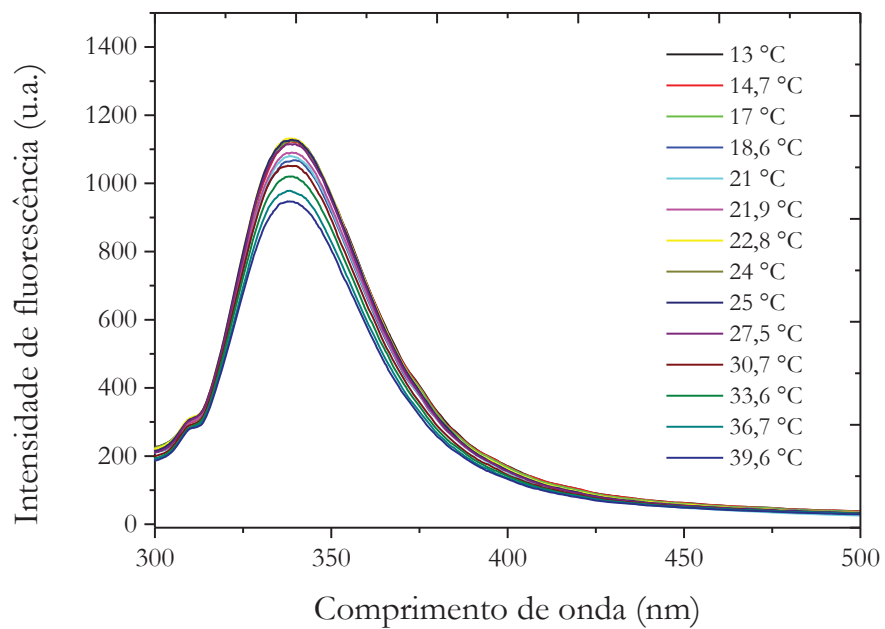
4.4. Bufotenina em DMPC

O estudo com membranas celulares modelos preparadas com fosfolipídios fornece informações importantes para compreensão de estruturas celulares mais complexas (CHAN; BOXER, 2007; SINGER; NICOLSON, 1972), uma vez que as informações celulares se relacionam com as propriedades da membrana celular.

O DMPC foi o fosfolipídio utilizado para o preparo das membranas modelos, a uma concentração de 1 mM, na qual foi inserida a molécula de bufotenina. No caso do DMPC utilizado neste trabalho, a temperatura de transição de fase ocorre por volta de 23 °C (KATSARAS; GUTBERLET, 2001; MARSH, 1990) A figura 4.28 a seguir

mostra os espectros de emissão fluorescente da bufotenina, cuja excitação foi feita em 278 nm:

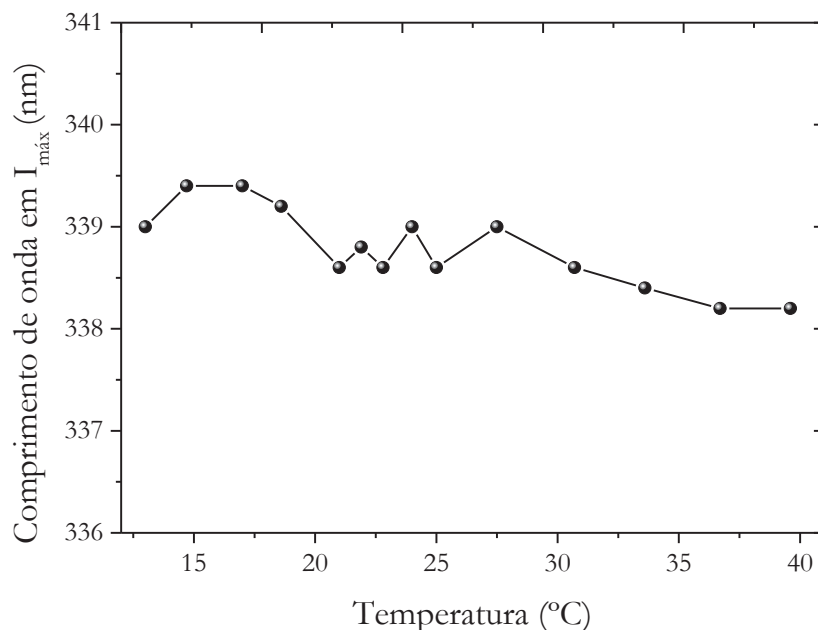
Figura 4.28 – Espectro de emissão da bufotenina a 10 μM em DMPC para diferentes temperaturas; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

Pela figura 4.29 podemos observar a dependência do comprimento de onda máximo de emissão com a temperatura:

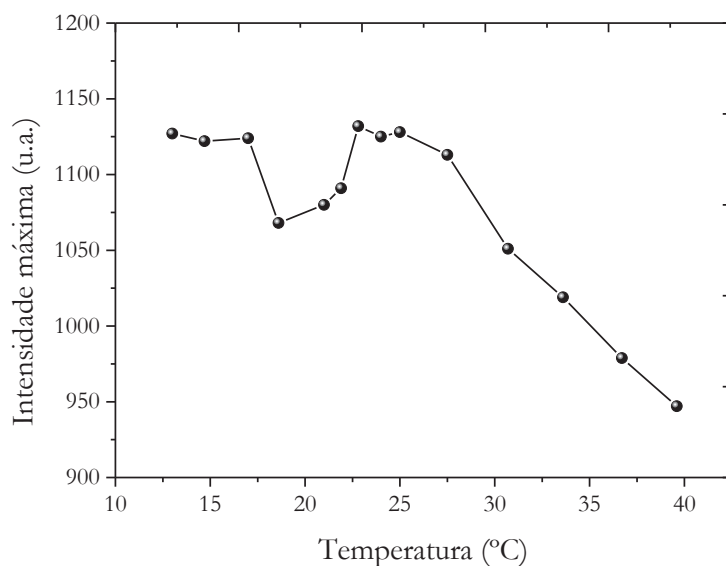
Figura 4.29 – Comprimento de onda para a emissão máxima da bufotenina em DMPC em função da temperatura.



Fonte: Próprio autor.

Considerando a margem de erro experimental, não há variação do máximo de emissão em função da temperatura do meio. No entanto, a intensidade de fluorescência se altera, conforme mostrado na figura 4.30 a seguir:

Figura 4.30 – Intensidade máxima de emissão da bufotenina em DMPC em função da temperatura.



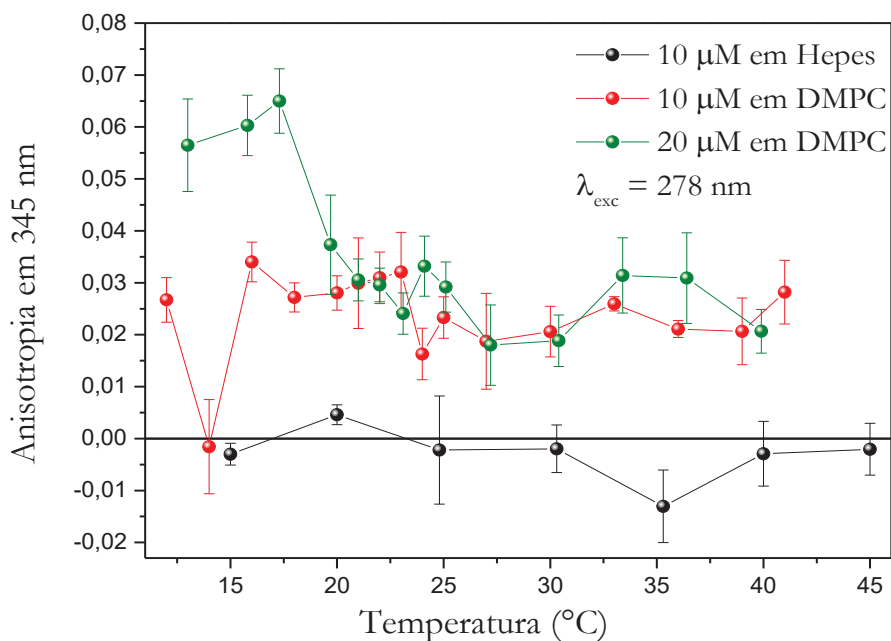
Fonte: Próprio autor.

É possível notar uma diminuição acentuada da intensidade de fluorescência com o aumento da temperatura, sobretudo a partir de ~ 25 °C. Em geral, a taxa de

desexcitação por fluorescência diminui com o aumento da temperatura do sistema (LAKOWICZ, 2006), o que explicaria parcialmente estes resultados. No entanto, considerando que as moléculas de água conseguem penetrar mais facilmente, e em maior quantidade, na região das cabeças polares quando na fase fluída da bicamada, sugere-se que seja este o efeito predominante e responsável pela diminuição da intensidade de fluorescência da bufotenina.

Foram realizadas medidas de anisotropia estática em função da temperatura para duas concentrações de bufotenina em presença de vesículas de DMPC e também para a bufotenina pura em solução tampão, na concentração de 10 μM . A figura 4.31 mostra os resultados obtidos:

Figura 4.31 – Anisotropia de fluorescência da bufotenina em DMPC e em Hepes em função da temperatura.



Fonte: Próprio autor.

As bicamadas lipídicas apresentam comportamento de fase em função da temperatura; como já mencionado, o DMPC tem temperatura de transição de fase aproximadamente em 23 $^{\circ}\text{C}$ e medidas de anisotropia de fluorescência de fluoróforos inseridos na bicamada são uma excelente forma de monitorar este comportamento de fase.

Para 10 μM de bufotenina, os resultados não refletem a transição de fase do DMPC; no entanto, os valores de anisotropia são maiores do que os valores observados

para a bufotenina livre em solução. Para 20 μM de bufotetina, observa-se diferença entre os valores de anisotropia na fase gel (abaixo de 23 $^{\circ}\text{C}$) e na fase fluída (acima de 23 $^{\circ}\text{C}$), mas com diminuição significativa já em 20 $^{\circ}\text{C}$, evidenciando que a bufotenina não está completamente inserida na bicamada, mas consegue monitorar a transição de fase, embora de forma pouco precisa.

Se a molécula de bufotenina se localizasse completamente inserida na região das cadeias graxas da bicamada lipídica, esperaríamos observar claramente a transição de fase através destas medidas de anisotropia. No entanto, os resultados obtidos sugerem que a bufotenina está localizada na interface cabeça polar/água e percebe a transição de fase de forma muito sutil.

Assim como na presença de micelas, também em DMPC a bufotenina estaria localizada na superfície externa da vesícula, onde o contato com as moléculas do solvente é menor em relação a bufotenina em meio aquoso. A anisotropia em meio aquoso é mostrada na curva em preto do gráfico 4.31, com valores fluando em torno do zero.

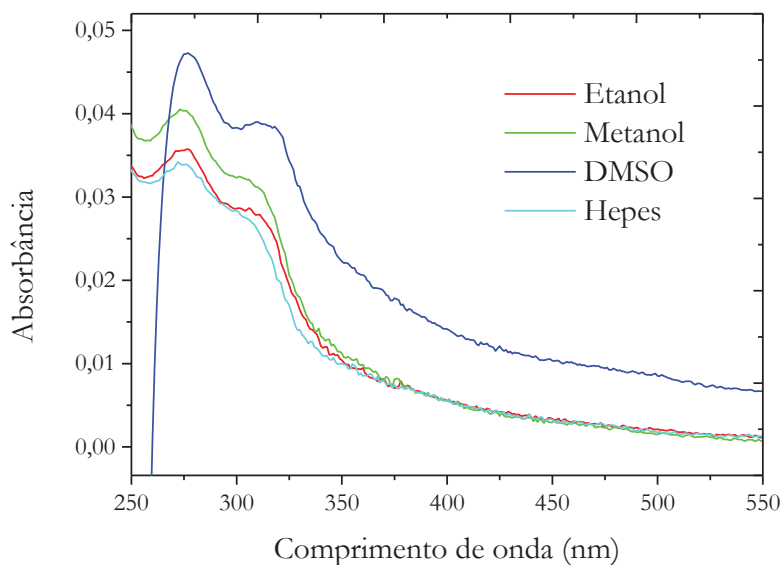
4.5. Óxido de bufotenina e solventes

Apresentaremos a seguir os resultados obtidos para a molécula de óxido de bufotenina. Foram realizados os mesmos experimentos descritos anteriormente para a bufotenina e os resultados obtidos são, na maior parte, muito semelhantes. A molécula de óxido de bufotenina, apresentada na figura 1.2 deste trabalho, difere da molécula de bufotenina apenas por um átomo de oxigênio em ligação com o nitrogênio externo ao indol.

4.5.1. Espectros de absorção

Através dos experimentos de absorção óptica foram obtidos os espectros de absorção para o óxido de bufotenina em etanol, metanol, DMSO e solução aquosa (Hepes) pH 7.47, 10 mM. As medidas foram realizadas nas concentrações 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM e 80 μM de óxido de bufotenina para todos os solventes. A figura 4.32 mostra os espectros obtidos para a concentração de 80 μM :

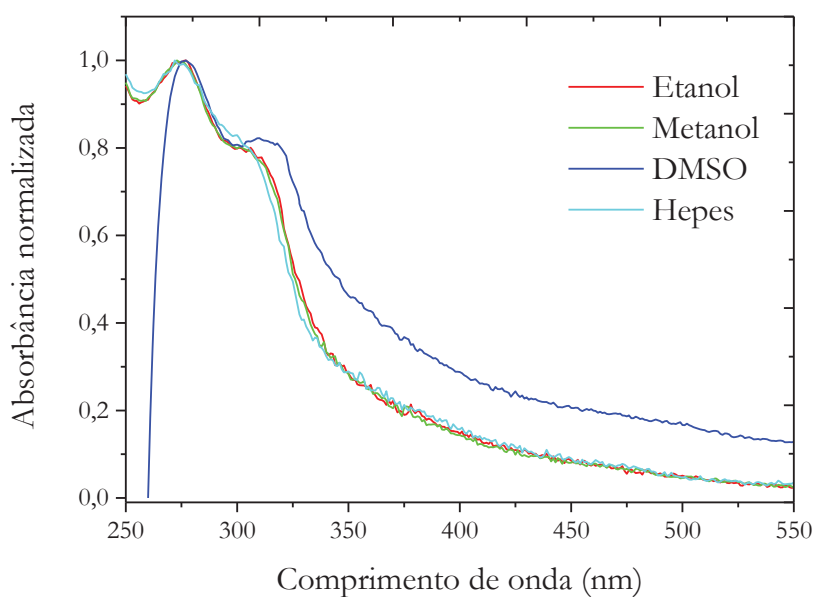
Figura 4.32 – Espectros de absorção do óxido de bufotenina (80 μM) em diversos solventes; cubeta de caminho óptico $l = 0,2$ cm.



Fonte: Próprio autor.

Não foi possível obter a curva de absorção óptica para o óxido em clorofórmio. A figura 4.33 mostra todos os espectros de absorção normalizados do óxido de bufotenina a 80 μM :

Figura 4.33 – Espectros de absorção normalizados do óxido de bufotenina (80 μM) em diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

Para todos os solventes a molécula apresenta duas bandas de absorção; os valores para os comprimentos de onda máximo de absorção estão descritos na tabela 4.5. A absorção é máxima, para todas as soluções, na primeira banda.

Tabela 4.5 – Posições do máximo comprimento de onda de absorção para o óxido de bufotenina em diversos solventes.

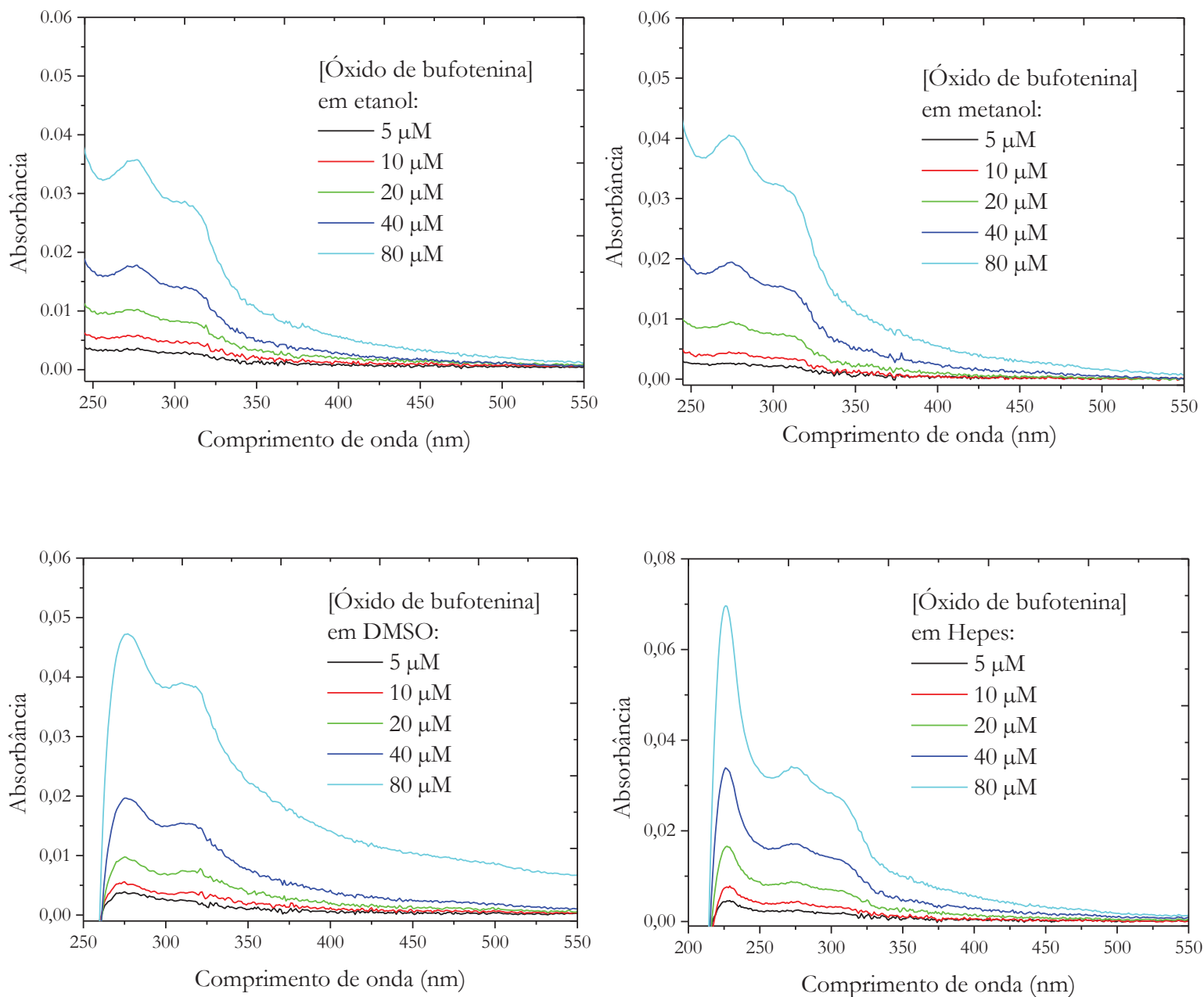
Solvente	Constante dielétrica (ϵ)	$\lambda_{m\acute{a}x}$(nm) 1^a banda	$\lambda_{m\acute{a}x}$(nm) 2^a banda
Etanol	25,10	275	307
Metanol	33,60	275	307
DMSO	46,70	276	313
Hepes	78,30	275	307

Fonte: Próprio autor.

Em relação à primeira banda de absorção não foi observado solvatocromismo. Para a segunda banda de absorção observa-se um deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico) do óxido de bufotenina em DMSO. De maneira análoga ao que foi discutido para a molécula de bufotenina, é o caráter prótico/aprótico dos solventes que governa o deslocamento espectral na banda de menor energia.

Foram medidos os espectros de absorção do óxido de bufotenina em etanol, metanol, DMSO e Hepes (figura 4.34), para diferentes concentrações, como forma de monitorar possível agregação entre as moléculas, em concentrações relativamente elevadas.

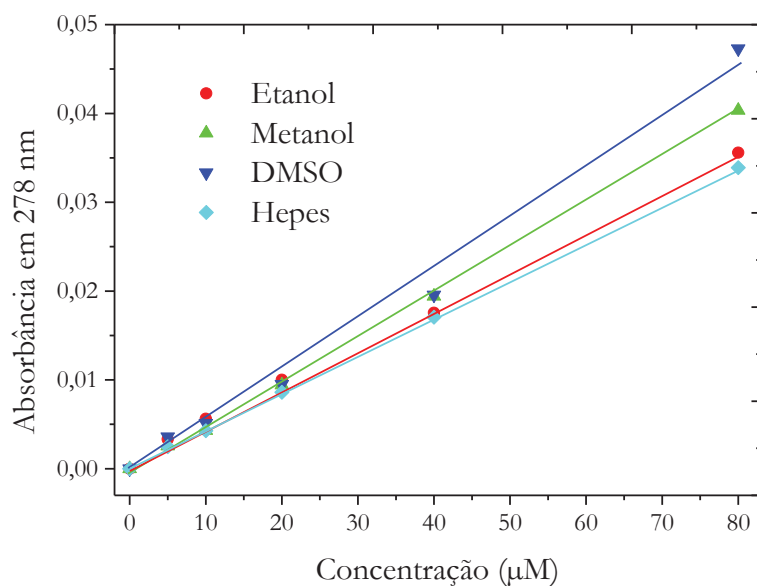
Figura 4.34 – Espectros de absorção do óxido de bufotenina em diversos solventes, em função da concentração; cubeta de caminho óptico $l = 0,2$ cm.



Fonte: Próprio autor.

É possível notar a diminuição da absorbância com a diminuição da concentração, resultado previsto pela lei de Lambert-Beer. A figura 4.35 a seguir mostra a dependência dos valores de absorção obtidos em 278 nm, com a concentração:

Figura 4.35 – Valores de absorbância do óxido de bufotenina em função da concentração e ajustes lineares para diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

De maneira análoga ao que foi realizado para a molécula de bufotenina, calculamos os coeficientes de absorção (ϵ) do óxido de bufotenina em cada solvente; os valores estão descritos na tabela 4.6 a seguir:

Tabela 4.6 – Coeficiente de absorção molar do óxido de bufotenina em diversos solventes.

Solvente	ϵ ($cm^{-1}M^{-1}$)
Etanol	2167 ± 9
Metanol	2526 ± 6
DMSO	2905 ± 29
Hepes	2110 ± 21

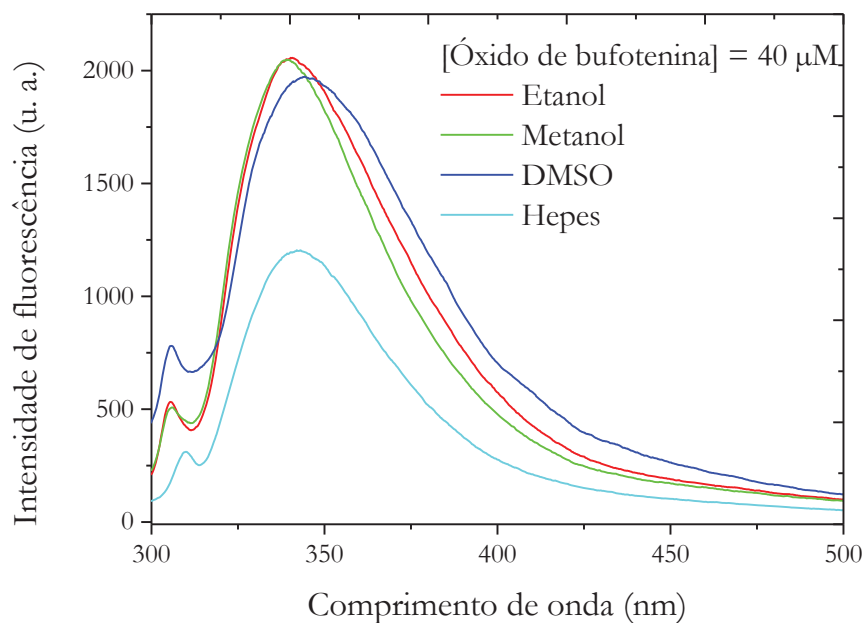
Fonte: Próprio autor.

Na comparação com a molécula de bufotenina, aqui o óxido de bufotenina apresenta coeficientes de absorção molar bastante baixos. Enquanto na bufotenina a absorção é mais alta em etanol, para o óxido a absorção mais alta ocorre em DMSO. A proximidade maior entre os valores de ϵ de ambas as moléculas é observada em presença de tampão Hepes. Também em Hepes é observada a menor absorção para ambas as moléculas. Para o óxido, não é possível encontrar correlação entre os valores de ϵ e a polaridade dos solventes ou o caráter prótico/aprótico destes.

4.5.2. Espectros de emissão fluorescente

Para obter o espectro de emissão a molécula foi excitada com um comprimento de onda de 278 nm em todos os solventes. A figura 4.36 mostra os espectros de emissão para o óxido de bufotenina em etanol, metanol, DMSO e Hepes em uma concentração de 40 μM :

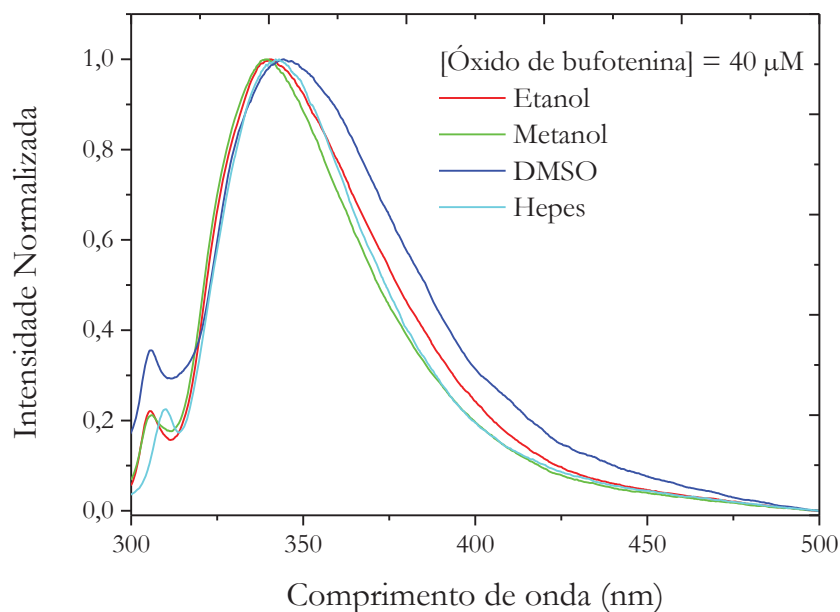
Figura 4.36 – Espectros de emissão fluorescente do óxido de bufotenina 40 μM em diversos solventes; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se que a intensidade de emissão fluorescente da molécula diminui em meio aquoso. A figura 4.37 contém os espectros de emissão normalizados para uma concentração de 40 μM de óxido de bufotenina para cada solvente:

Figura 4.37 – Espectros de emissão fluorescente normalizados do óxido de bufotenina 40 μM em diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

É possível notar um deslocamento do máximo de emissão entre os solventes; a tabela 4.7 mostra os valores referentes à posição do máximo comprimento de onda de emissão do óxido de bufotenina em cada solvente:

Tabela 4.7 – Posição do máximo comprimento de onda de emissão fluorescente para o óxido de bufotenina em diversos solventes.

Solvente	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
Etanol	340
Metanol	339
DMSO	345
Hepes	342

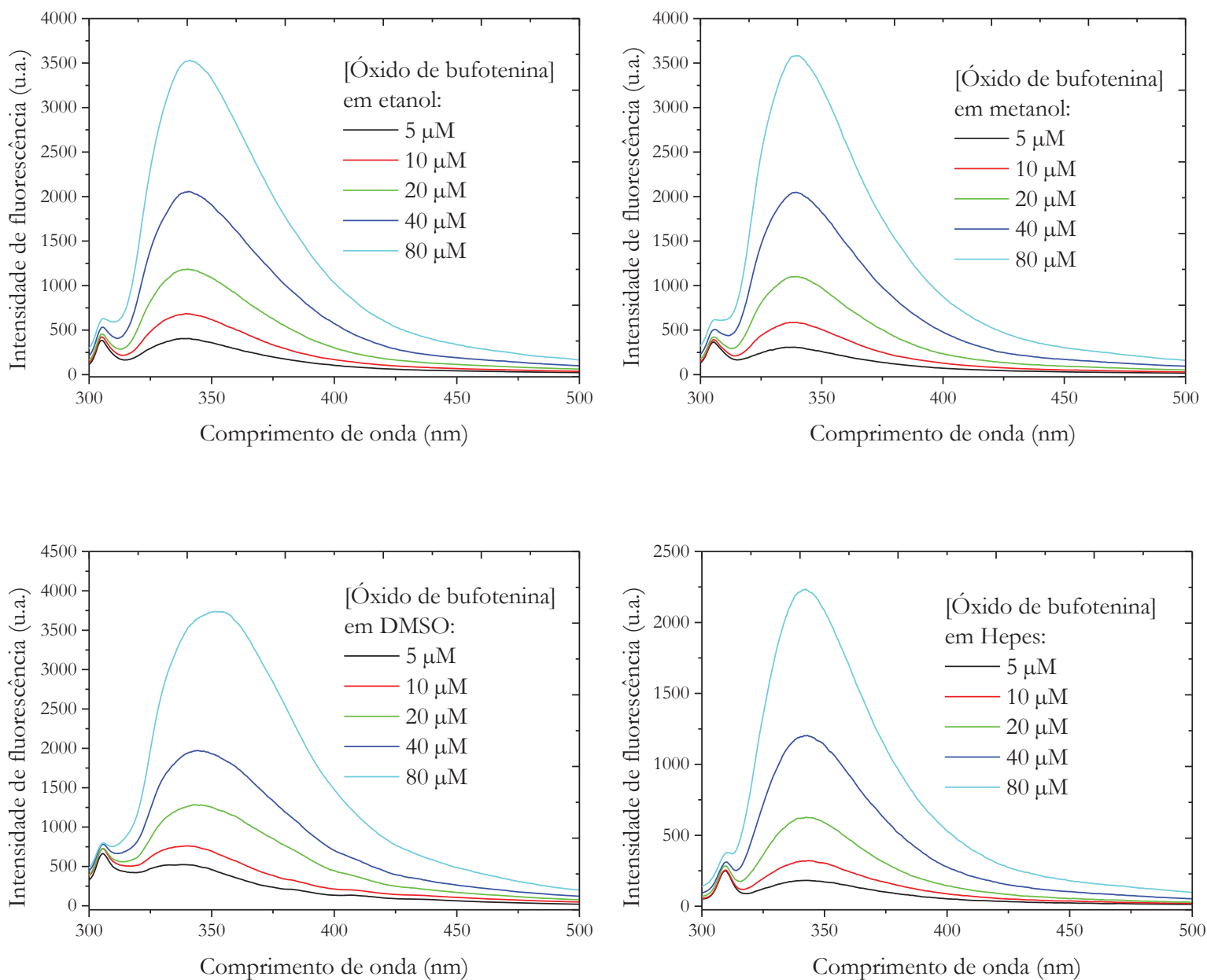
Fonte: Próprio autor.

O deslocamento espectral é resultado de efeitos específicos do solvente, pela formação de ligações de hidrogênio e de complexos de transferência de cargas. De maneira análoga ao que ocorre com a molécula de bufotenina, observa-se um deslocamento para o vermelho (deslocamento batocrômico) em presença de DMSO. Medindo a escala de polaridade dos solventes somente através da constante dielétrica, os resultados da tabela acima não podem ser explicados, pois a constante dielétrica da água é maior do que a do DMSO. No entanto, de maneira análoga à molécula de

bufotenina, se considerarmos que o DMSO é um solvente aprótico, os resultados de deslocamento espectral são perfeitamente explicados.

Continuando com a caracterização espectroscópica do óxido de bufotenina, foram obtidos os espectros de emissão em etanol, metanol, DMSO e Hepes (figura 4.38), para diferentes concentrações:

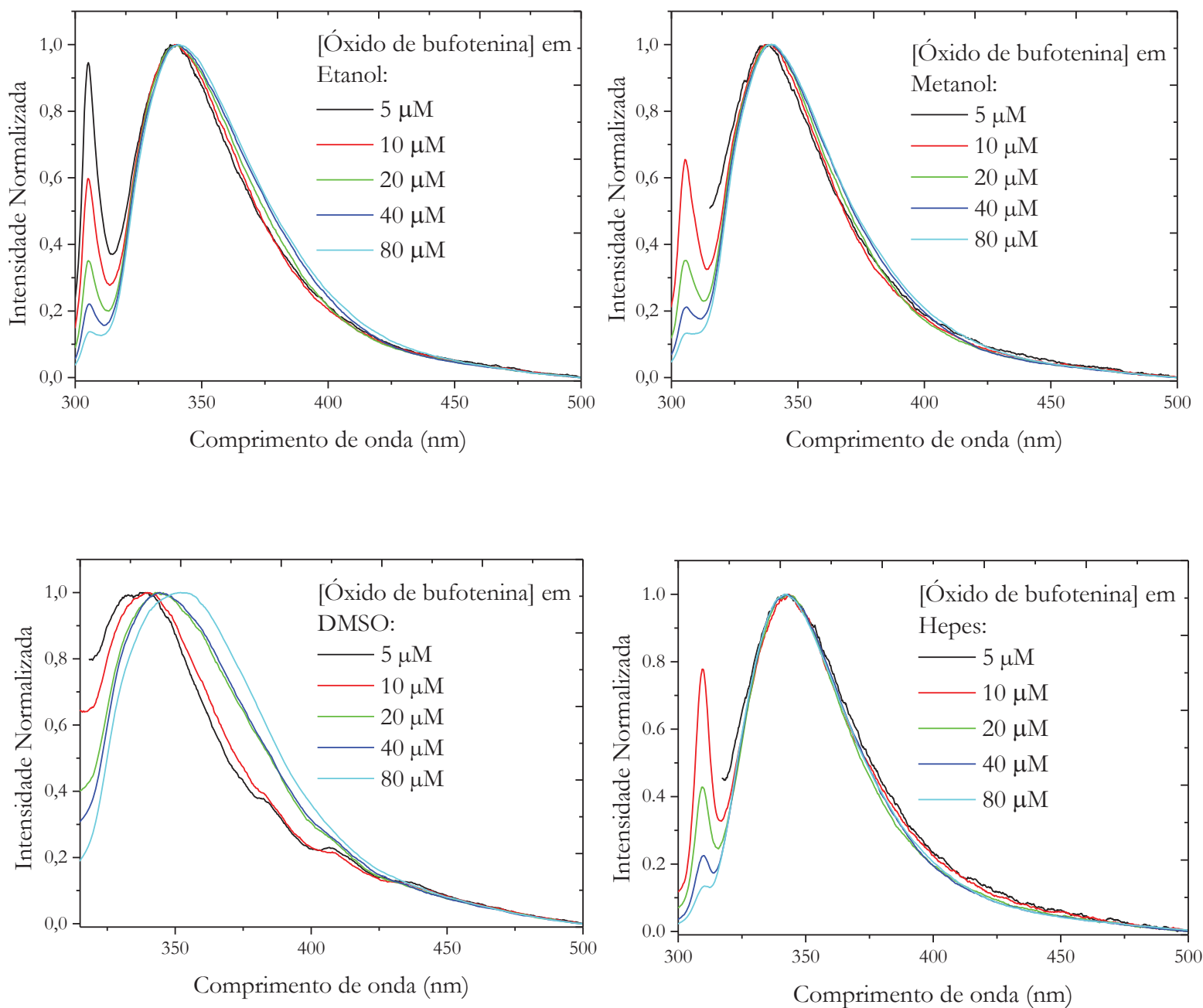
Figura 4.38 – Espectros de emissão do óxido de bufotenina em diversos solventes para diferentes concentrações; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

A figura 4.39 mostra os espectros de emissão normalizados do óxido de bufotenina em diversos solventes:

Figura 4.39 – Espectros de emissão normalizados do óxido de bufotenina em diversos solventes para diferentes concentrações.



Fonte: Próprio autor.

O deslocamento espectral observado para o óxido de bufotenina em DMSO sugere a formação de agregados ou interação entre as moléculas quando em presença deste solvente. Considerando que etanol, metanol e solução aquosa são solventes

próticos, a molécula de óxido de bufotenina estaria melhor solvatada nestes solventes devido às ligações de hidrogênio; o mesmo não ocorre com o óxido em presença de DMSO e há a possibilidade de agregação do composto.

Como parte do processo de caracterização espectroscópica, com dados de absorção óptica e emissão fluorescente calculamos o rendimento quântico do óxido de bufotenina nos diversos solventes (tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Rendimento quântico do óxido de bufotenina calculado em diversos solventes.

Solvente	Rendimento quântico
Etanol	0.00757
Metanol	0.03188
DMSO	0.03423
Hepes	0.00468

Fonte: Próprio autor.

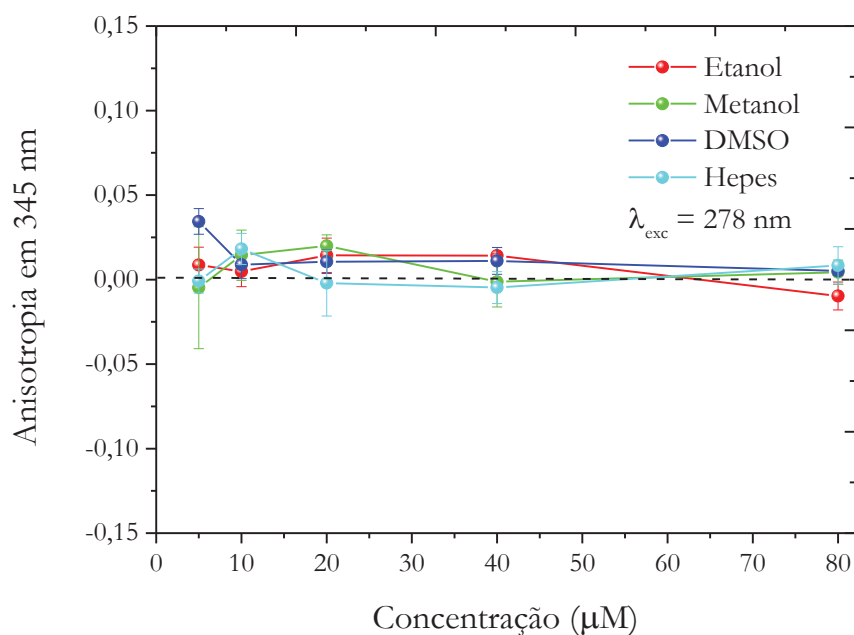
Novamente foi utilizado o triptofano (em solução aquosa) como referência no cálculo dos valores de rendimento quântico de fluorescência. Os valores encontrados para o óxido são extremamente baixos, chegando a valores menores que 1% em etanol e em tampão Hepes. O fato de o óxido apresentar tão baixo rendimento quântico de fluorescência tornou delicados os experimentos no fluorímetro, onde a sensibilidade da fotomultiplicadora estava sempre no limite superior.

Considerando que o óxido de bufotenina possui um oxigênio a mais em sua estrutura, é possível que processos de transferência de carga envolvendo esse oxigênio possam competir com a desexcitação por fluorescência, diminuindo assim o rendimento quântico do óxido em relação à bufotenina.

4.5.3. Anisotropia de fluorescência

Foram realizadas medidas de anisotropia estática em função da concentração do óxido de bufotenina em diversos meios solventes: etanol, metanol, DMSO e Hepes. A figura 4.40 a seguir mostra os resultados obtidos:

Figura 4.40 – Anisotropia em função da concentração de óxido de bufotenina em diversos solventes.



Fonte: Próprio autor.

Os valores de anisotropia obtidos para diferentes concentrações podem ser interpretados como flutuações em torno do zero, o que sugere uma livre movimentação da molécula em cada solvente. De modo muito semelhante ao discutido para a bufotenina, estes resultados sugerem que não há formação de agregados de óxido na faixa de concentração estudada; caso contrário, os valores de anisotropia seriam maiores e poderiam sofrer variações com o aumento da concentração da molécula no meio.

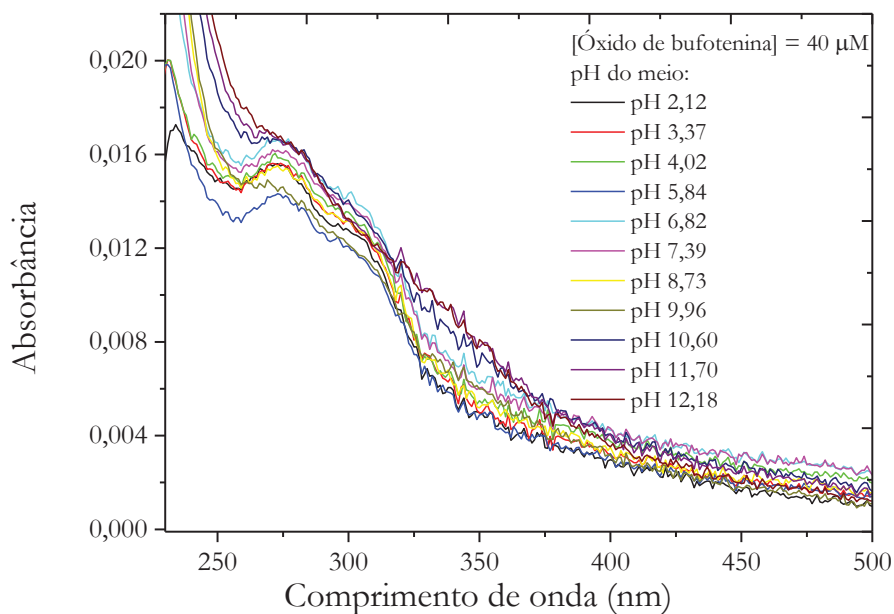
4.6. Óxido de bufotenina em solução aquosa com variação do pH

Como já mencionado na sessão 4.2 desta tese, estudos com variações no pH do meio são bastante úteis pois promovem a protonação/desprotonação de sítios protonáveis/desprotonáveis em diversas moléculas. A adição/subtração de cargas em uma molécula influencia sua estrutura eletrônica como um todo e possíveis alterações nos estados eletrônicos (fundamental e excitado) podem ser observadas em espectros de absorção óptica e de emissão fluorescente. Apresentamos a seguir, resultados para o óxido de bufotenina em tampão Hepes 5 mM, com variação do pH do meio.

4.6.1. Espectros de absorção

Considerando os valores baixos do coeficiente de absorção molecular do óxido de bufotenina, utilizamos a concentração de 40 μM . Os resultados são mostrados na figura 4.41 a seguir:

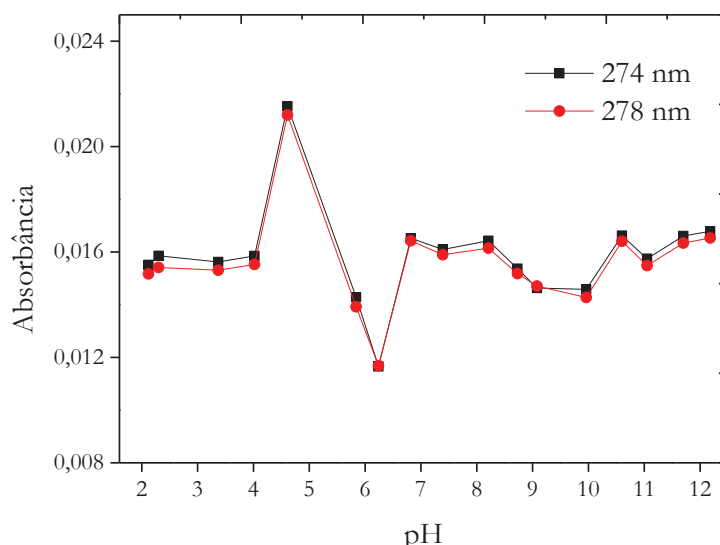
Figura 4.41 – Espectros de absorção do óxido de bufotenina (40 μM) em Hepes 5 mM para diversos valores de pH; caminho óptico $l = 0,2$ cm.



Fonte: Próprio autor.

Os valores de absorbância na região espectral de interesse, em torno das bandas centradas em 274 nm e ~ 307 nm parecem sofrer alteração significativa em função do pH; no entanto, como pode ser observado no gráfico da figura 4.42 a seguir, não há um padrão de variação conclusivo:

Figura 4.42 – Absorbância máxima em função do pH do meio para o óxido de bufotenina (40 μM) em Hepes 5 mM.

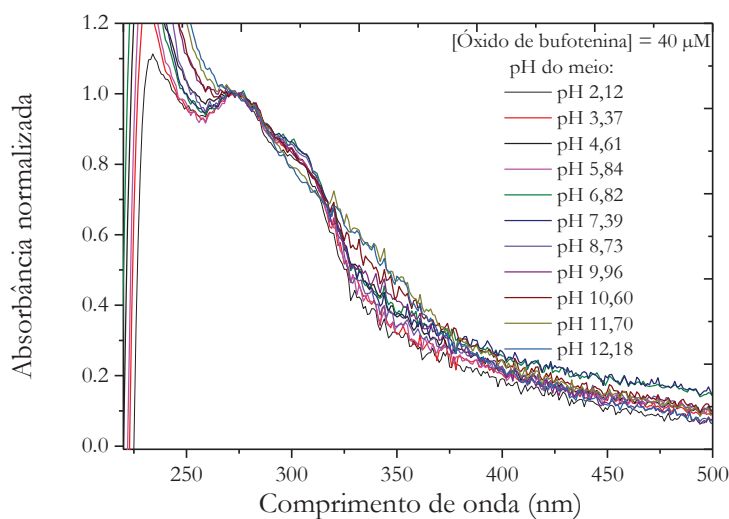


Fonte: Próprio autor.

Foram considerados os valores de absorbância em 274 nm, por ser este o comprimento de onda do pico de absorção, e em 278 nm, por ser este o comprimento de onda utilizado no fluorímetro para excitação da amostra. Como pode ser observado, os valores de absorbância são bastante próximos para estes dois comprimentos de onda.

Procedendo à normalização destes espectros, notamos discreta alteração na forma da banda de absorção a partir de pH = 10,60; a figura 4.43 a seguir mostra os espectros normalizados:

Figura 4.43 – Espectros de absorção normalizados do óxido de bufotenina (40 μM) em Hepes para diversos valores de pH.



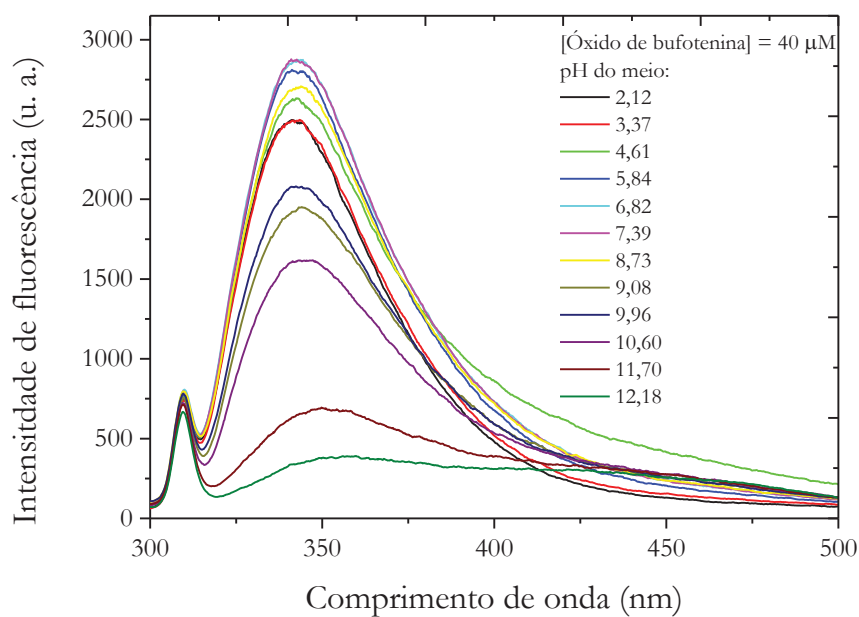
Fonte: Próprio autor.

Da mesma forma que foi observado para a bufotenina, o óxido de bufotenina também apresenta a forma aniônica (desprotonada) da molécula em valores de pH básicos, o que poderia ocasionar esta ligeira alteração na forma dos espectros de absorção iniciando em $\text{pH} = 10,60$. Os sítios protonáveis do óxido de bufotenina são os mesmos sítios da bufotenina.

4.6.2. Espectros de emissão fluorescente

Para a mesma amostra de óxido de bufotenina $40 \mu\text{M}$ foram obtidos espectros de emissão fluorescente, com excitação mantida em 278 nm . A figura 4.44 a seguir mostra os espectros obtidos:

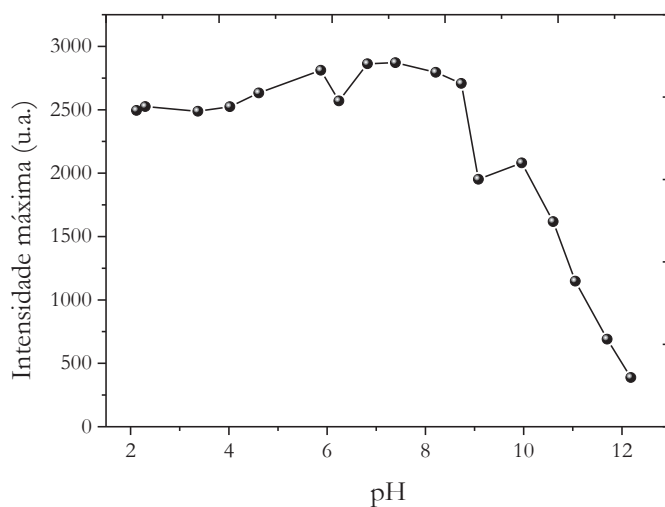
Figura 4.44 – Espectros de emissão do óxido de bufotenina ($40 \mu\text{M}$) em HEPES 5 mM para diversos valores de pH; excitação em 278 nm .



Fonte: Próprio autor.

É possível notar a diminuição da fluorescência com o aumento do pH do meio, de modo semelhante ao que ocorre com a molécula de bufotenina. Uma análise mais precisa nos permite apresentar graficamente a intensidade máxima de fluorescência em função do pH do meio (figura 4.45):

Figura 4.45 – Intensidade máxima de fluorescência em função do pH do meio para o óxido de bufotenina (40 μM).

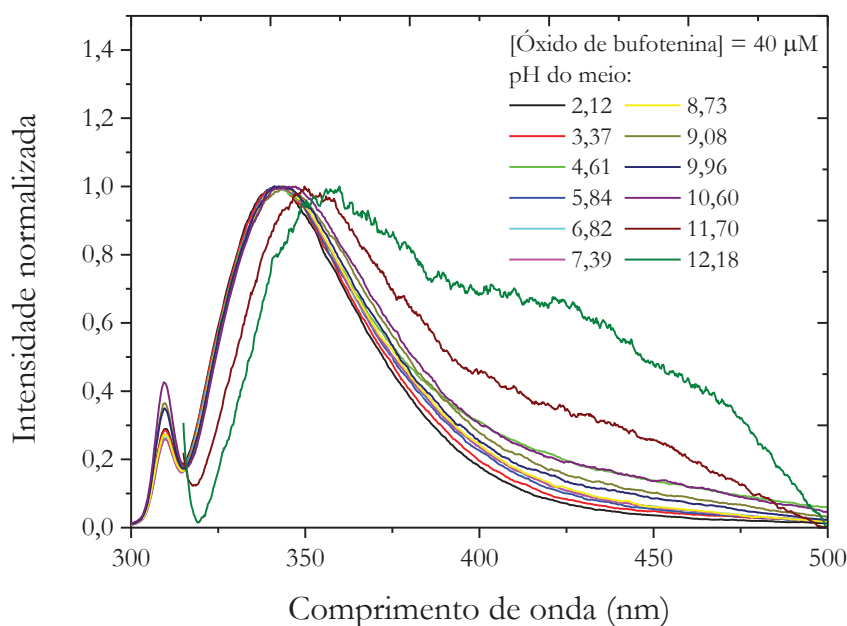


Fonte: Próprio autor.

Conforme já observado para a molécula de bufotenina, na região que vai de pH $\sim 2,0$ até pH $\sim 7,0$ há ligeiro aumento da fluorescência com o aumento do pH do meio, devido à supressão da fluorescência do indol pela alta concentração de íons H^+ no meio.

A intensidade máxima de fluorescência diminui drasticamente acima de pH $\sim 9,0$, indicando a predominância das espécies desprotonadas do óxido. O efeito da desprotonação da molécula é observado também através da alteração da forma do espectro de fluorescência, conforme mostra a figura 4.46 a seguir:

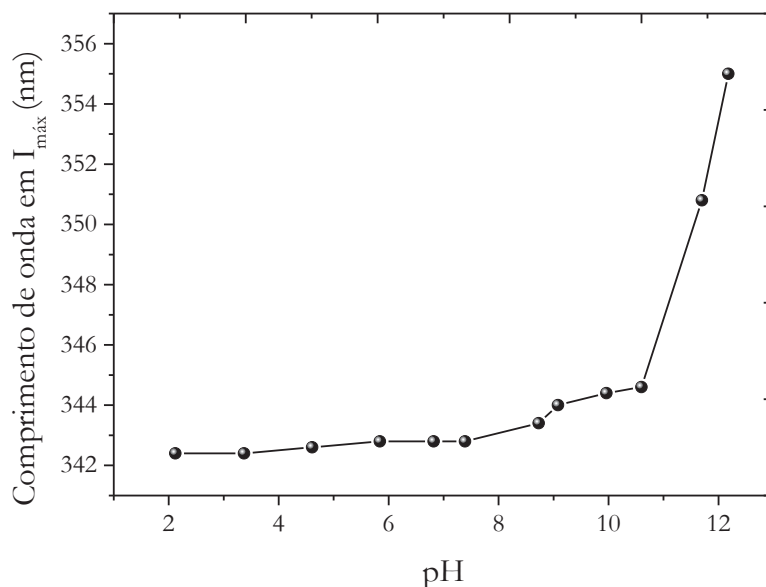
Figura 4.46 – Espectros de emissão normalizados do óxido de bufotenina (40 μM) em HEPES para diversos valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

Ainda acima de pH $\sim 9,0$ é observado acentuado deslocamento espectral para o vermelho; o gráfico da figura 4.47 a seguir mostra o comprimento de onda do máximo de emissão em função do pH do meio:

Figura 4.47 – Comprimento de onda para a emissão máxima do óxido de bufotenina ($40 \mu\text{M}$) em Hepes para diversos valores de pH.



Fonte: Próprio autor.

Podemos concluir que o comportamento do óxido de bufotenina quando da variação do pH do meio é análogo ao comportamento exibido pela molécula de bufotenina, uma vez que os sítios protonáveis são os mesmos em ambas as moléculas.

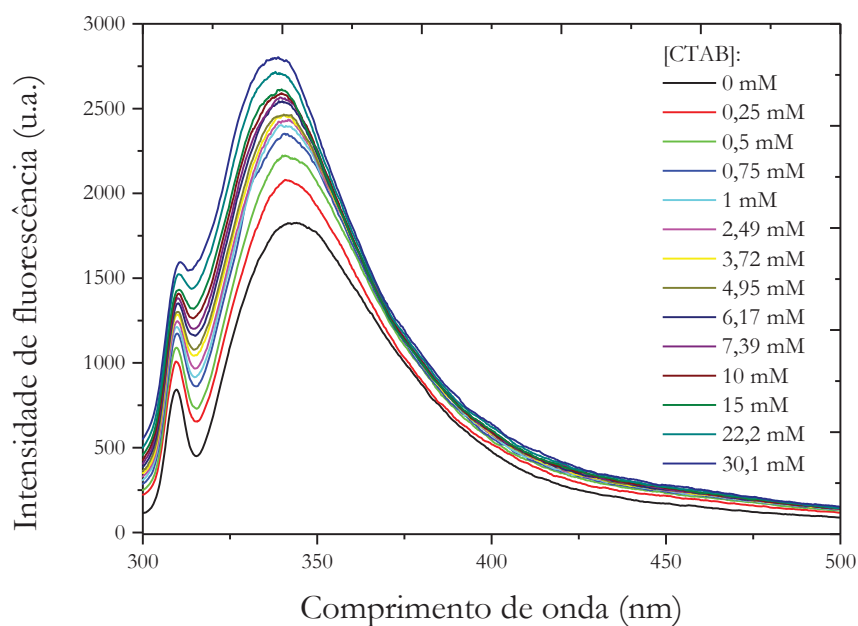
4.7. Óxido de bufotenina em surfactantes

Os experimentos de emissão de fluorescência do óxido de bufotenina foram realizados na presença de dois surfactantes com carga e estruturas diferentes, ambos em solução com pH fisiológico. A molécula, na concentração de $20 \mu\text{M}$, foi excitada com um comprimento de onda de 278 nm em todos os experimentos.

4.7.1. CTAB

O Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi o surfactante catiônico utilizado. A figura 4.48 mostra o espectro de emissão da bufotenina em CTAB variando a concentração do surfactante:

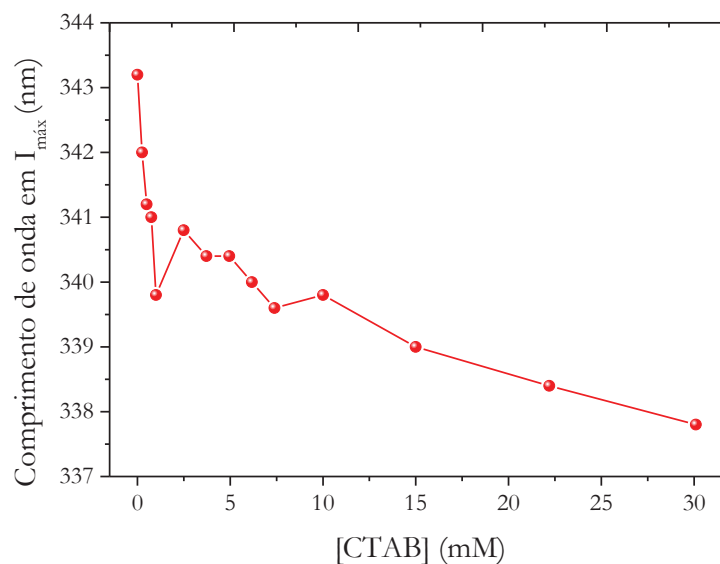
Figura 4.48 – Espectro de emissão do óxido de bufotenina em CTAB para diferentes concentrações do surfactante; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

A figura 4.49 mostra como o comprimento de onda para a emissão máxima, do óxido de bufotenina, em função da concentração de CTAB na amostra.

Figura 4.49 – Comprimento de onda para a emissão máxima do óxido de bufotenina em função da concentração de CTAB na amostra.



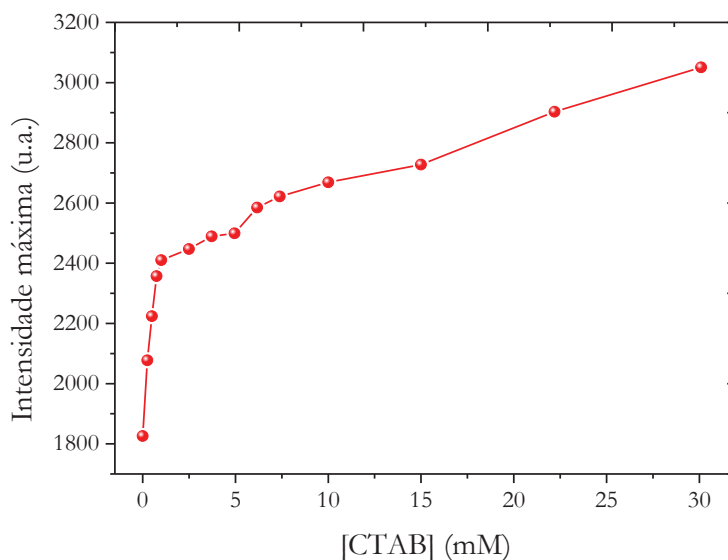
Fonte: Próprio autor.

É possível observar que o aumento da concentração de CTAB promove um deslocamento espectral para o azul, o que sugere que a molécula está reduzindo o seu

contato com o meio aquoso e, dessa forma, entrando na região das cabeças polares dos surfactantes.

A figura 4.50 mostra as variações da intensidade de emissão máxima (com a correção pelo efeito de diluição) em função da concentração do CTAB na amostra.

Figura 4.50 – Intensidade máxima de emissão do óxido de bufotenina em função da concentração de CTAB na amostra.

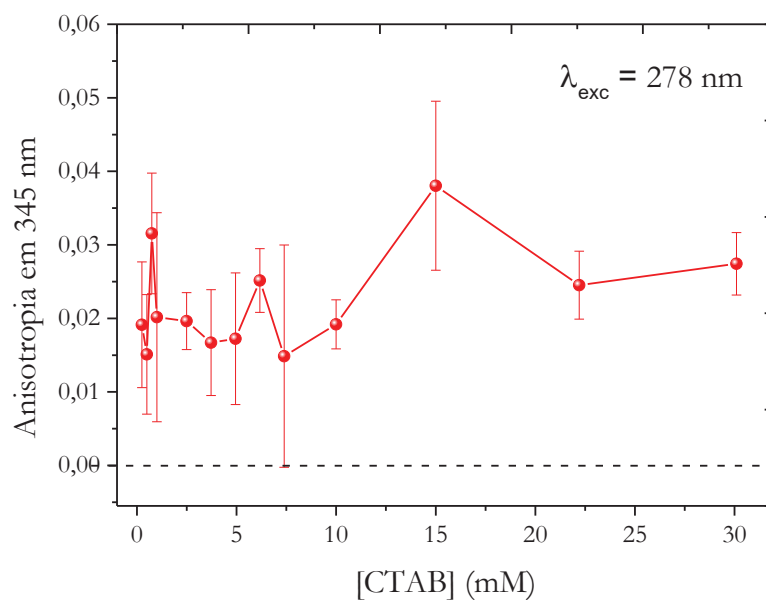


Fonte: Próprio autor.

O aumento da intensidade de fluorescência observado sugere que o óxido de bufotenina tende a entrar no meio micelar, reduzindo a interação da molécula com o meio aquoso, o que diminuiria a desexcitação por colisão com as moléculas do solvente, justificando o aumento na intensidade de fluorescência. Importante notar que a CMC do CTAB é 1mM e o aumento drástico da intensidade vai precisamente até 1 mM, e então começa a estabilizar, à medida que as micelas vão sendo formadas no meio. A partir da CMC, o número de micelas formadas aumenta gradativamente no meio, conforme se aumenta a concentração de CTAB.

Foram realizadas medidas de anisotropia estática para o óxido de bufotenina em função da concentração de CTAB. A figura 4.51 a seguir mostra os resultados obtidos:

Figura 4.51 – Anisotropia de fluorescência do óxido de bufotenina em função da concentração de CTAB na amostra.



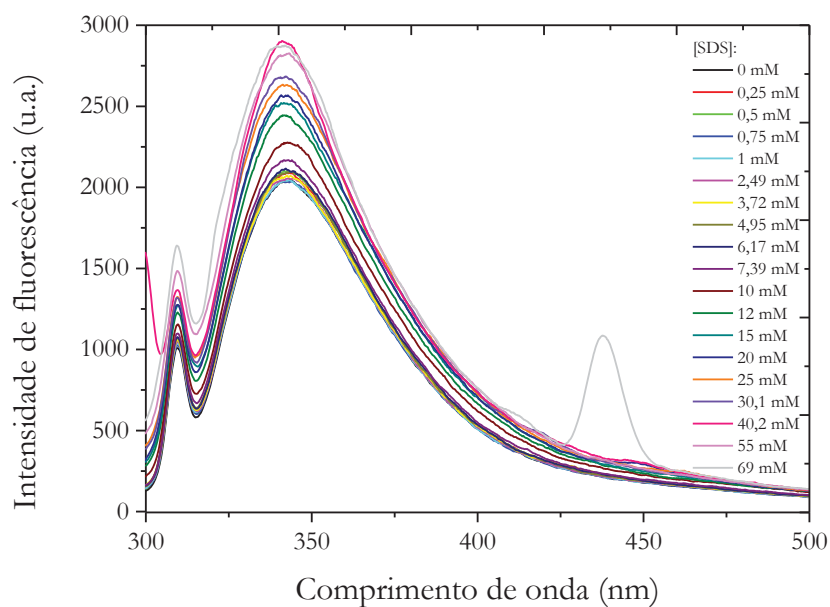
Fonte: Próprio autor.

Os valores de anisotropia obtidos para diferentes concentrações sugerem alguma restrição para o movimento do óxido de bufotenina; a molécula tende a entrar no meio micelar, se localizando, provavelmente, entre as partes polares do surfactante.

4.7.2. SDS

O Dodecilsulfato de sódio (SDS) foi o surfactante aniônico utilizado. A figura 4.52 mostra o espectro de emissão do óxido de bufotenina em SDS variando a concentração do surfactante:

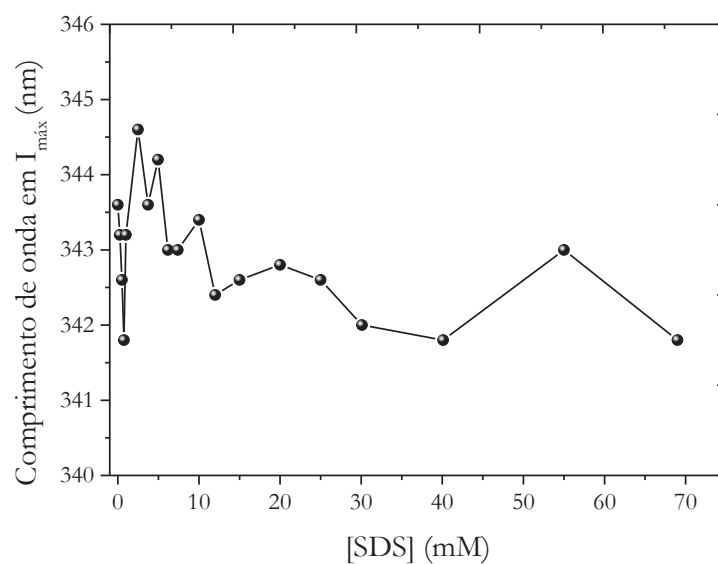
Figura 4.52 – Espectro de emissão do óxido de bufotenina em SDS para diferentes concentrações do surfactante; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

O comprimento de onda para a emissão máxima do óxido de bufotenina sofreu flutuações em torno de um comprimento de onda máximo de emissão com o aumento da concentração. A figura 4.53 mostra esse comportamento:

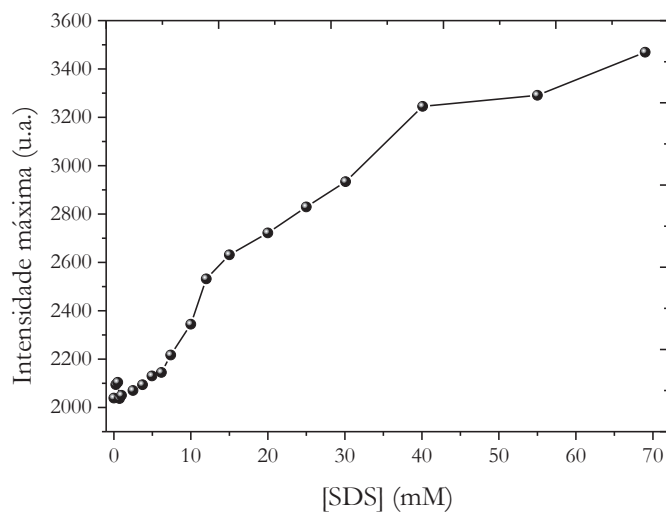
Figura 4.53 – Comprimento de onda para a emissão máxima do óxido de bufotenina em função da concentração de SDS na amostra.



Fonte: Próprio autor.

A figura 4.54 mostra as variações da intensidade de emissão máxima (com a correção pelo efeito de diluição) em função da concentração do SDS na amostra.

Figura 4.54– Intensidade máxima de emissão do óxido de bufotenina em função da concentração de SDS na amostra.

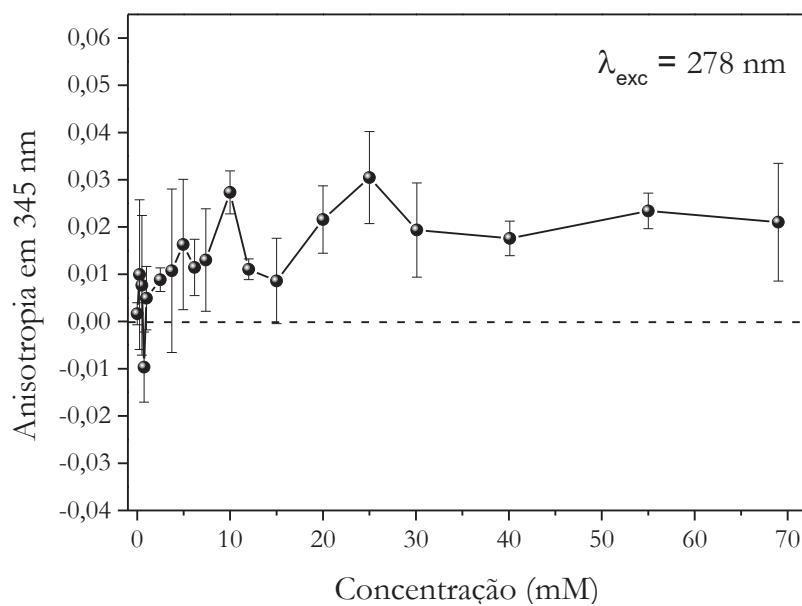


Fonte: Próprio autor.

De maneira semelhante ao que ocorre com o óxido de bufotenina quando inserido em CTAB, observa-se também aqui um aumento da intensidade de fluorescência com a concentração de SDS, sugerindo que o óxido de bufotenina tende a adentrar a região mais externa da micela.

Foram realizadas medidas de anisotropia estática em função da concentração do óxido de bufotenina em SDS. A figura 4.55 mostra os resultados obtidos:

Figura 4.55 – Anisotropia de fluorescência do óxido de bufotenina em função da concentração de SDS na amostra.



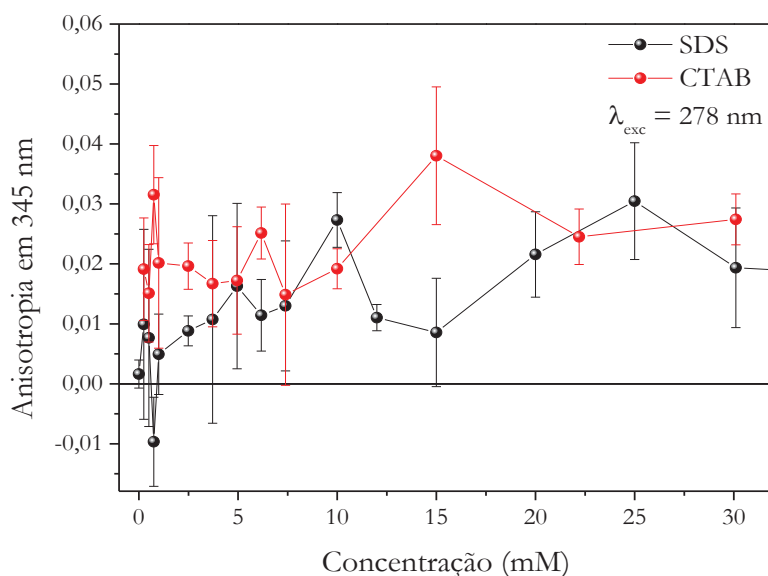
Fonte: Próprio autor.

Os valores de anisotropia obtidos para diferentes concentrações sugerem alguma restrição para o movimento do óxido de bufotenina, o que indica que a molécula não particiona totalmente na água e está interagindo com as micelas, de alguma forma.

Os resultados obtidos para a molécula de óxido de bufotenina em surfactantes, tanto no CTAB quanto no SDS, sugerem que a molécula tende a entrar no meio micelar, reduzindo seu contato com o solvente. De maneira análoga ao que ocorre com a molécula de bufotenina, os baixos valores de anisotropia sugerem que a localização do óxido de bufotenina seja na porção hidrofílica dos detergentes, pois as caudas hidrofóbicas causariam restrições ao seu movimento.

A figura 4.56 a seguir mostra conjuntamente os resultados para o óxido em presença de SDS e CTAB:

Figura 4.56 – Anisotropia de fluorescência do óxido de bufotenina em função da concentração de SDS e CTAB.



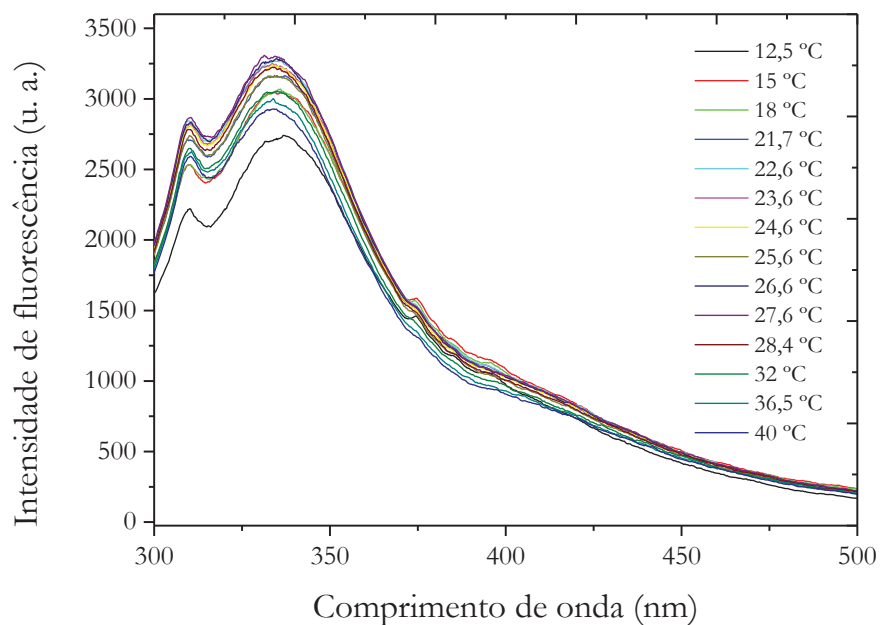
Fonte: próprio autor.

Os valores de anisotropia não refletem a CMC dos surfactantes, mas são relativamente maiores que os valores obtidos para a molécula de bufotenina nos mesmos sistemas (ver figura 4.26), sugerindo que o óxido interage mais fortemente com a superfície das micelas. A presença de um momento de dipolo na região da ligação entre o oxigênio e o nitrogênio externo ao indol (ver figura 1.2) poderia atrair mais fortemente o óxido para a superfície externa das micelas, aumentando ligeiramente os valores de anisotropia estática. Dessa forma, o modelo proposto na figura 4.27 é também aplicado ao óxido de bufotenina.

4.8. Óxido de bufotenina em DMPC

O DMPC foi o fosfolipídio utilizado para o preparo das membranas modelos, a uma concentração de 1 mM, na qual foi inserida a molécula de óxido de bufotenina a 20 μ M; A amostra foi excitada com um comprimento de onda de 278 nm em diversas temperaturas. A figura 4.57 a seguir mostra os espectros de emissão fluorescente em função da temperatura do meio:

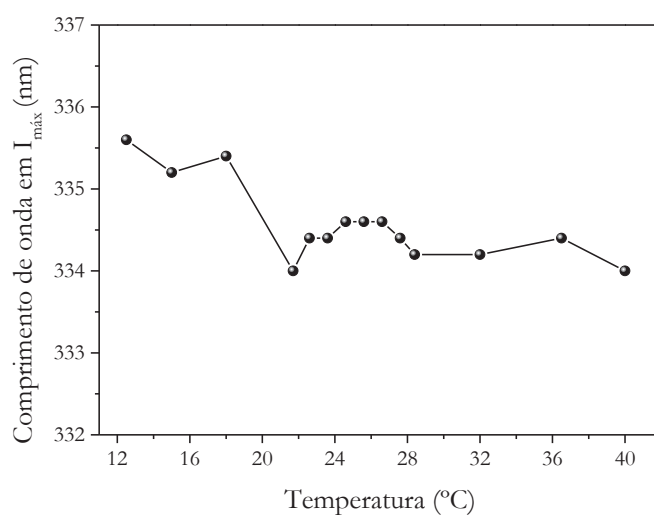
Figura 4.57 – Espectro de emissão do óxido de bufotenina a 20 μM em DMPC 1mM para diferentes temperaturas; excitação em 278 nm.



Fonte: Próprio autor.

A partir destes espectros, podemos analisar parâmetros como intensidade máxima de fluorescência, comprimento de onda do máximo e anisotropia estática, sempre em função da temperatura do meio. O gráfico da figura 4.58 a seguir mostra o máximo de emissão fluorescente do óxido em função da temperatura do meio:

Figura 4.58 – Comprimento de onda para a emissão máxima do óxido de bufotenina em função da temperatura.

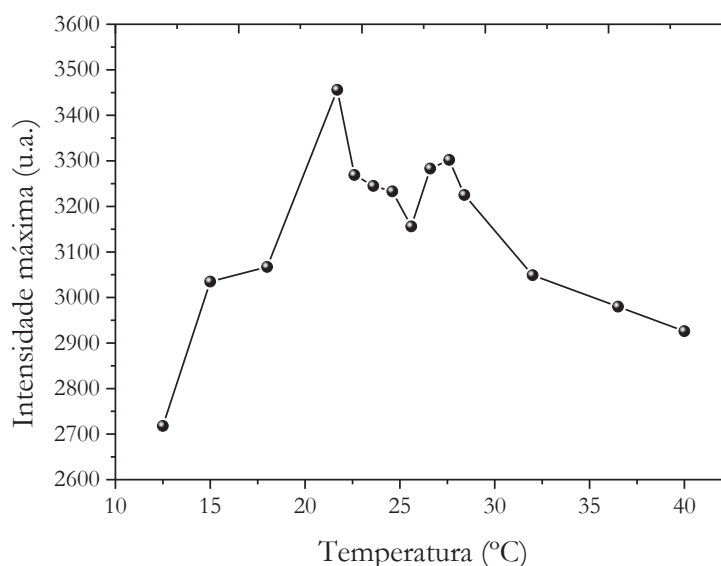


Fonte: Próprio autor.

De maneira análoga ao comportamento da bufotenina, não há variação significativa do máximo de emissão conforme a bicamada lipídica muda de fase, considerando uma margem de erro experimental. No entanto, os valores de comprimento de onda máximo para a bufotenina foram observados em torno de 339 nm, enquanto para o óxido os valores estão próximos a 335 nm, sugerindo então um deslocamento espectral para o azul.

Quanto à intensidade de fluorescência em função da temperatura do meio, para o óxido de bufotenina não há correlação direta deste parâmetro com a mudança de fase da bicamada lipídica, conforme mostra o gráfico da figura 4.59 a seguir:

Figura 4.59 – Intensidade máxima de emissão do óxido de bufotenina em DMPC em função da temperatura.



Fonte: Próprio autor.

Considerando a escala de intensidade do espectrofluorímetro, os valores do eixo y e observados no gráfico acima refletem um aumento expressivo na intensidade de fluorescência na faixa entre 12 °C e ~ 22°C; da mesma forma, ocorre diminuição da intensidade conforme a temperatura vai aumentando até ~ 40 °C. Em princípio, não há uma justificativa física plausível para este aumento de intensidade quando na fase gel da bicamada lipídica.

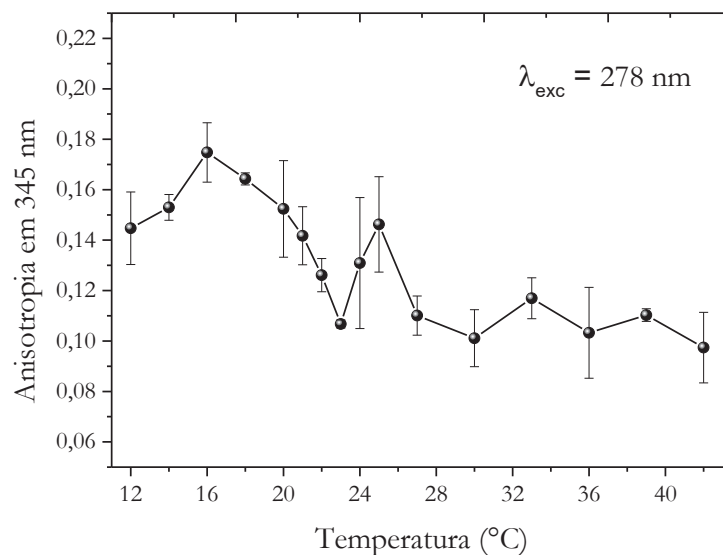
No entanto, considerando algumas limitações experimentais, é possível que os valores de intensidade se mostrem baixos para baixas temperaturas devido à condensação de água na superfície externa da cubeta contendo a amostra. A temperatura ambiente do laboratório onde são realizados os experimentos de fluorescência está em

torno de 24,5 °C a 26 °C. Quando utilizamos o banho térmico para controlar a temperatura da amostra na cubeta, pode ocorrer condensação de água na superfície externa da mesma, devido à sua diferença de temperatura em relação à temperatura ambiente. A condensação pode afetar a intensidade do feixe de excitação, bem como do feixe de emissão, diminuindo então os valores reais da intensidade de fluorescência. À medida que a temperatura do banho térmico vai aumentando e se aproximando da temperatura ambiente, este efeito deixa de ocorrer e são registrados então os valores reais de intensidade. A intensidade deste efeito varia significativamente com a umidade do ar no laboratório.

Após ~ 23 °C a intensidade de fluorescência diminui com o aumento de temperatura, de modo semelhante ao observado para a molécula de bufotenina em DMPC (ver gráfico da figura 4.30).

Foram realizadas medidas de anisotropia estática em função da temperatura para o óxido de bufotenina a 20 µM em presença de DMPC a 1 mM. A figura 4.60 a seguir mostra os resultados obtidos:

Figura 4.60 – Anisotropia de fluorescência do óxido de bufotenina 20 µM em função da temperatura na presença de vesículas de DMPC 1mM.

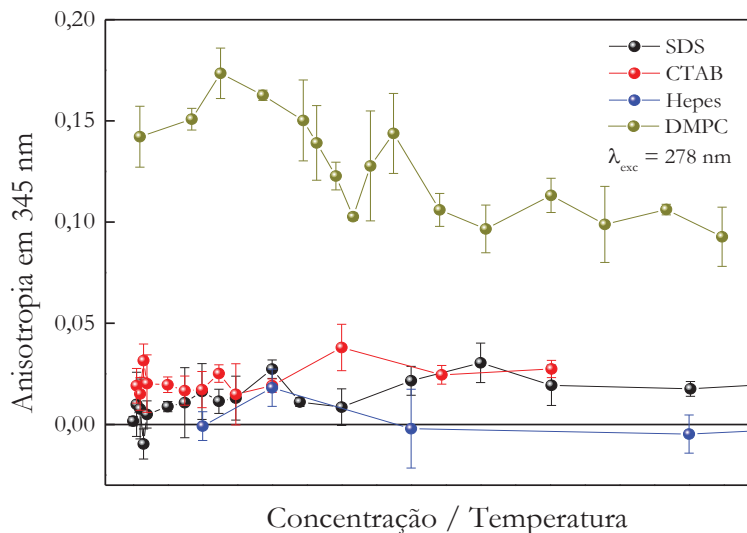


Fonte: Próprio autor.

Observando os resultados mostrados no gráfico anterior, não é possível distinguir claramente a diferença entre as duas fases da bicamada de DMCP. No entanto, os valores de anisotropia, quando comparados aos valores de anisotropia do óxido de bufotenina em solventes, ou mesmo em presença de micelas de CTAB e SDS,

são significativamente maiores; o gráfico apresentado na figura 4.61 a seguir mostra essas diferenças entre os valores de anisotropia para o óxido em diferentes meios:

Figura 4.61 – Valores de anisotropia para o óxido de bufotenina em diferentes meios.



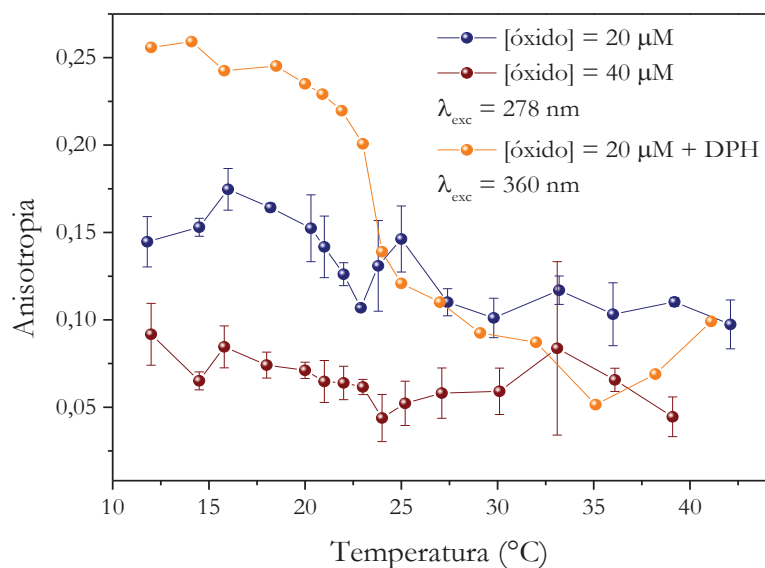
Fonte: próprio autor.

A curva em amarelo escuro corresponde a 20 μM de óxido de bufotenina em 1 mM de DMPC, com variação de temperatura do meio. A curva em azul corresponde à variação de concentração do óxido em Hepes; já as curvas em preto e em vermelho se referem a variações de concentração de SDS e CTAB, respectivamente, com concentração de óxido em 20 μM .

Pode-se concluir então que o óxido de bufotenina interage com as vesículas de DMPC e possivelmente está localizado na região das cabeças polares dos fosfolípidios, muito próximo à interface com o meio aquoso. Isso diminuiria a sensibilidade do óxido ao movimento das cadeias graxas dos fosfolípidios, justificando o fato de seus valores de anisotropia não refletirem a transição de fase do DMPC.

Foram realizados experimentos com o óxido de bufotenina 40 μM em presença de vesículas de DMPC; foi adicionada ainda a molécula fluorescente DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) ao sistema. Amplamente utilizado em estudos de fluidez de bicamadas lipídicas, o DPH se insere complementemente na região das cadeias graxas e reflete com grande precisão a transição de fase da bicamada (POOJARI et al., 2019; RANTAMÄKI et al., 2019). O gráfico da figura 4.62 a seguir mostra os valores de anisotropia do DPH e do óxido de bufotenina em função da temperatura do sistema:

Figura 4.62 – Anisotropia em função da temperatura para o DPH (430 nm) e para o óxido de bufotenina (345 nm) inseridos em vesículas de DMPC.



Fonte: Próprio autor.

É possível observar a transição de fase da bicamada através da anisotropia do DPH, monitorada em 430 nm, correspondendo ao máximo central de sua emissão fluorescente (LENTZ, 1989; SÁNCHEZ; DEL V. TURINA; PERILLO, 2007). De acordo com os resultados mostrados no gráfico anterior, uma concentração maior de óxido de bufotenina apresenta valores de anisotropia menores do que a concentração menor, indo na direção contrária aos resultados obtidos para a bufotenina (gráfico 4.31).

O objetivo dos experimentos em presença de vesículas de DMPC é estudar a interação da bufotenina e do óxido da bufotenina com modelos de membranas de célula, dada a importância biológica deste grupo de moléculas. A afinidade da bufotenina e do óxido por sistemas modelo de membrana, como micelas e vesículas, já se mostra baixa, dado que não há evidências, nos resultados apresentados neste trabalho, de que as moléculas se inseriram completamente nas referidas estruturas macromoleculares; tampouco a partição completa em água foi observada.

O modelo proposto neste trabalho é que ambas as moléculas se localizam na interface entre os grupos polares (tanto dos detergentes quanto dos fosfolípidios) e a água, tal como o esquema da figura 4.27.

No sentido de testar o modelo proposto, foram realizados estes experimentos com duas concentrações distintas de óxido de bufotenina (e também de bufotenina), com o objetivo de monitorar possíveis mudanças causadas à bicamada lipídica pela

presença das moléculas objeto deste estudo. E os resultados obtidos não mostram concordância entre si, nem correlação com a concentração de óxido de bufotenina (bufotenina), o que evidencia que as moléculas não atravessam a região das cabeças polares, uma vez que estudos mostraram que moléculas posicionadas na região das cabeças polares já contribuem para alterações significativas na fluidez da bicamada lipídica, enrijecendo a fase fluída ou fluidificando a fase gel, ou ainda deslocando a temperatura de transição de fase (MARQUEZIN et al., 2021; MENDANHA et al., 2017; ROZENFELD et al., 2017).

5. CONCLUSÕES

Dos espectros de absorção óptica para a bufotenina e para o óxido de bufotenina em diversos solventes, foram observadas duas bandas na região do ultravioleta. Com exceção do DMSO, a banda de maior energia está centrada em 278 nm para a bufotenina e em 275 nm para o óxido e a banda de menor energia está centrada em 305 nm para a bufotenina e em 307 para o óxido. Para ambas as moléculas em presença de DMSO foi observado um considerável deslocamento para o vermelho, sobretudo na banda de menor energia. Comparando os valores de constante dielétrica dos meios solventes utilizados, concluiu-se que é o caráter aprótico do DMSO que governa os deslocamentos espectrais observados nos espectros de absorção e não a polaridade do solvente.

Os coeficientes de absorção molar obtidos (em 278 nm) mostram maior taxa de absorção para a bufotenina (em diversos meios solventes) em relação à molécula de óxido de bufotenina. Para ambas as moléculas, o menor coeficiente de absorção molar foi em presença de solução tampão Hepes. Dentro da faixa de concentração estudada, nenhum desvio da Lei de Lambert-Beer foi observado.

Os espectros de emissão fluorescente apresentaram deslocamento para o vermelho do máximo de emissão com o aumento da polaridade do meio, para ambas as moléculas. Concluímos que as propriedades do estado excitado se mostram dependentes da polaridade do meio e não do caráter prótico/aprótico do solvente.

Especificamente para o óxido de bufotenina em presença de DMSO foi observado um deslocamento espectral considerável quando do aumento da concentração de óxido no meio, sugerindo que o caráter aprótico do DMSO facilitaria um processo de agregação, (ou de forte interação) entre as moléculas de óxido. Apesar desta conclusão, proveniente de dados de deslocamento espectral, os valores de anisotropia mostram que não há alteração de mobilidade em função da concentração, tanto para a bufotenina como para o óxido. Os valores baixos de anisotropia sugerem livre movimentação dos fluoróforos nos diversos meios solventes.

A molécula de óxido de bufotenina apresentou rendimento quântico de fluorescência bastante reduzido, com valores inferiores a 1% em etanol e Hepes, enquanto a molécula de bufotenina apresentou rendimento quântico de aproximadamente 12% em todos os solventes estudados. Nenhuma fluorescência foi observada para ambas as moléculas em presença de clorofórmio.

Analisando conjuntamente os resultados de deslocamento espectral e de intensidade de fluorescência, pudemos concluir que o átomo de oxigênio a mais na estrutura do óxido de bufotenina influencia diretamente na taxa de desexcitação por fluorescência, mas não altera a estrutura dos níveis de energia da molécula (comparando com a bufotenina). Processos de transferência de carga envolvendo este átomo de oxigênio poderiam competir com a desexcitação por processos radiativos, provocando a diminuição no rendimento quântico de fluorescência do óxido de bufotenina.

Dos estudos com variação de pH do meio, os resultados obtidos dos espectros de absorção óptica foram diferentes para a bufotenina e o óxido. Enquanto os valores de absorbância (em 278 nm) para a bufotenina sugerem a interconversão entre as espécies protonada, neutra e desprotonada, para o óxido de bufotenina não houve alteração significativa dos valores de absorbância (em 274 nm e 278 nm) em função do pH do meio. Dos espectros normalizados, notável alteração na forma do espectro após pH ~ 11,43 (10,60) pode ser observada para a bufotenina (o óxido de bufotenina), levando à conclusão de que a partir deste valor de pH há a predominância da forma desprotonada.

Já no caso dos espectros de emissão fluorescente, os resultados são os mesmos para ambas as moléculas: acentuado deslocamento espectral para o vermelho a partir de pH ~ 10,00; alteração na forma do espectro a partir de pH ~ 11,00 e diminuição da intensidade a partir de pH ~ 9,5. Ligeiro aumento na intensidade de fluorescência foi observado com o aumento dos valores de pH de ~ 2,0 até ~ 7,0 evidenciando a supressão de fluorescência dos fluoróforos devido às altas concentrações de íons H⁺ no meio. Concluímos, deste conjunto de resultados, que a forma aniônica da bufotenina e do óxido de bufotenina promove a estabilização do estado excitado ao mesmo tempo em que diminui a taxa de desexcitação por fluorescência.

Em relação aos experimentos de fluorescência em presença de micelas de surfactantes, concluímos que bufotenina e óxido se localizam na superfície das micelas, uma vez que os baixos valores de anisotropia (comparáveis aos valores obtidos quando em Hepes) não refletem inserção dos fluoróforos no ambiente micelar e variações na intensidade de fluorescência e deslocamento espectral evidenciam que os fluoróforos estão em um ambiente diferente do bulk.

A formação das micelas pôde ser vista claramente através dos dados de intensidade de fluorescência, tornando bufotenina e óxido sondas fluorescentes atrativas na determinação da CMC de surfactantes. As maiores variações na intensidade máxima de fluorescência foram observadas para o óxido de bufotenina em presença de micelas

de CTAB, levando-nos à conclusão de que o posicionamento da molécula de óxido na superfície da micela é influenciado pela carga da última, pois o momento de dipolo presente no óxido de bufotenina, devido à presença de um átomo de oxigênio, atuaria diretamente na orientação da mesma quando nas vizinhanças de uma superfície carregada.

Em presença de vesículas de DMPC, ambas as moléculas não se mostraram capazes de monitorar a transição de fase da bicamada lipídica; no entanto, comparando os valores de anisotropia estática, concluímos que, assim como em presença de micelas, as moléculas se encontram próximas à superfície da bicamada (na interface água/cabeças polares) e não completamente particionadas no meio solvente. Comparando bufotenina e óxido, as moléculas de óxido apresentam valores de anisotropia maiores, sugerindo que interagem mais fortemente com a superfície da bicamada lipídica, ou seja, estariam mais inseridas entre as cabeças polares dos fosfolipídios.

O uso das espectroscopias de absorção óptica e de fluorescência se mostrou bastante útil no estudo da bufotenina e do óxido de bufotenina em diferentes meios solventes bem como em presença de modelos de biomembrana. Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir enormemente com os processos de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Hafiz Mudaser; MURTAZA, Mobeen; KAMAL, Muhammad Shahzad; HUSSAIN, S. M. Shaki.; MAHMOUD, Mohamed. **Cationic gemini surfactants containing biphenyl spacer as shale swelling inhibitor**. *Journal of Molecular Liquids*, v. 325, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.115164.

AKABORI, Kiyotaka; NAGLE, John F. **Structure of the DMPC lipid bilayer ripple phase**. *Soft Matter*, v. 11, n. 5, p. 918–926, 2015. DOI: 10.1039/C4SM02335H. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4SM02335H>.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WILSON, John; WALTER, Peter; HUNT, Tim. **Biologia molecular da célula**. 6^a ed, 2017.

BAGATOLLI, Luis A.; IPSEN, John H.; SIMONSEN, Adam C.; MOURITSEN, Ole G. **An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes**. *Progress in Lipid Research*, v. 49, n. 4, p. 378–389, 2010. DOI: 10.1016/j.plipres.2010.05.001.

BARKER, Steven; MCILHENNY, Ethan; STRASSMAN, Rick. **A critical review of reports of endogenous psychedelic N, N-dimethyltryptamines in humans**. *Wiley Online Library*, 2012. DOI 10.1002/dta.422

BEGLEY, Tadhg P.; VAZ, Winchil L. C. **Lipid Bilayers: Properties**. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, p. 1–15, 2008. DOI: 10.1002/9780470048672.wecb281.

CALLIS, Patrick R.; VIVIAN, James T. **Understanding the variable fluorescence quantum yield of tryptophan in proteins using QM-MM simulations. Quenching by charge transfer to the peptide backbone**. *Chemical Physics Letters*, v. 369, n. 3–4, p. 409–414, 2003. DOI: 10.1016/S0009-2614(02)02046-8.

CHAN, Yee Hung M.; BOXER, Steven G. **Model membrane systems and their applications**. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, n. 6, p. 581–587, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.09.020.

CHANG, Ping; XU, Guang; CHEN, Yinping; GHOSH, Apurna; MORIDI, Mohammad Ali. **Improving coal powder wettability using electrolyte assisted surfactant**

solution. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 613, n. October 2020, p. 126042, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2020.126042.

DEZAN, Paul; CANAFF, Roger; BIANCHI, Roobert. **Fluorimetric Characteristics of Some Narcotic and Dangerous Drugs.** Bureau of Narcotics and Dangerous Drugs, 90 Church St., New York, N.Y. 10007. 1971

DUTTA, L. MUKHERJEE, B. CHAKRABORTY, T. KUMAR, M. MONDAL, L. BHATTACHARYA, S. GAONKAR, R. CHATTERJEE, D. **Lipid-based nanocarrier efficiently delivers highly water soluble drug across the blood-brain barrier into brain.** J. Pharm, 2018.

EMANUELE, Enzo; COLOMBO, Roberto; MARTINELLI, Valentina; BRONDINO, Natascia; MARINI, Mara; BOSO, Marianna; BARALE, Francesco; POLITI, Pierluigi. **Elevated urine levels of bufotenine in patients with autistic spectrum disorders and schizophrenia.** Neuroendocrinology Letters Volume 31, No. 1, 2010.

FISCHER, E; **Bufotenine in human urine.** Lancet, i, 890-891, 1961.

FISH, M. S.; JOHNSON, N. M.; HORNING, E. C. **Piptadenia Alkaloids. Indole Bases of P. peregrina (L.) Benth. and Related Species.** 1955.

FORNÉS, J. ITO, A. CURI, R. PROCOPIO, J. **pH fluctuations in unilamellar vesicles.** Phys. Chem. Chem. Phys, 1999.

FRICKE, J. LENZ, C.FELIX, W. **Production Options for Psilocybin: Making of the Magic.** Chemistry a European Journal, 2018.

GESSNER, Peter; PAGE, Irvine. **Behavioral effects of 5-methoxy-N:N-dimethyltryptamine, other tryptamines, and LSD.** Research Division, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, 1962.

GUILBAULT, George Gerry. **Practical fluorescence.** 2^a ed. New Orleans, Louisiana. v. 53, 1990.

HALLEB, Aymen; YOKOYAMA, Fumio; DAS NEVES, Marcos Antonio; NAKAJIMA, Mitsutoshi. **Effects of surfactants and oil-in-water emulsions on reverse osmosis membrane performance.** Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2021. DOI: 10.1007/s41207-020-00236-1.

HEIMBURG, Thomas. **Thermal Biophysics of Membranes**. Weinheim: Wiley, 2007. DOI: 10.1002/9783527611591.

HITT, M.; ETTINGER, D. D. **Toad toxicity**. New England Journal of medicine, 1986.

HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; WEBB, G.; CULLIS, P. R. **Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential**. BBA - Biomembranes, v. 812, n. 1, p. 55–65, 1985. DOI: 10.1016/0005-2736(85)90521-8.

ITO, Amando Siuti; BERARDI, Marina; PAZIN, Wallance Moreira. **Fluorescência e aplicações em Biofísica**. 1ª ed. São Paulo, 2016.

KARGBO, R. **Psilocybin Therapeutic Research: The Present and Future Paradigm**. ACS Med. Chem. Lett. 2020.

KATSARAS, John; GUTBERLET, T. **Lipid Bilayers: Structure and Interactions**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2001.

KHALEDIAN, S. DAYANI, M. FATAHIAN, A. FATAHIAN, R. MARTINEZ, F. **Efficiency of lipid-based nano drug delivery systems in crossing the blood–brain barrier: A review**. Journal of Molecular Liquids, Volume 346, 15 January 2022.

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Third Edit ed. Baltimore, USA: Springer, 2006.

LENTZ, Barry R. **Membrane “fluidity” as detected by diphenylhexatriene probes**. Chemistry and Physics of Lipids, v. 50, n. 3–4, p. 171–190, 1989. DOI: 10.1016/0009-3084(89)90049-2.

LENZ, C. DORNER, S. TROTTMANN, F. **Assessment of Bioactivity-Modulating Pseudo-Ring Formation in Psilocin and Related Tryptamines**. ChemBioChem an official journal of the EFMC, 2022.

LENZ, Claudius; DÖRNER, Sebastian; SHERWOOD, Alexander; HOFFMEISTER, Dirk. **Structure Elucidation and Spectroscopic Analysis of Chromophores Produced by Oxidative Psilocin Dimerization**, 2022. doi.org/10.1002/chem.202101382

LI, Xiaojiang; WANG, Li; LU, Hongsheng; WANG, Na; WANG, Baogang; HUANG, Zhiyu. **Using a switchable water to improve sustainable extraction for oil sands by**

low-concentration surfactant solution. Journal of Cleaner Production, v. 292, p. 126045, 2021. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.126045.

MAHMOOD, D.; ALENEZI, S.; ANWAR, J.; AZAM, F.; QURESHI, K.; JAREMKO, M. **New Paradigms of Old Psychedelics in Schizophrenia.** Pharmaceuticals 2022, 15, 640. <https://doi.org/10.3390/ph15050640>

MANIASSO, Nelson. **Micellar media in analytical chemistry.** Quimica Nova, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001. DOI: 10.1590/s0100-40422001000100015.

MARIANA, Mariana F. **Dimethylsulfoxide (CAS No. 67-68-5).** Revista Virtual de Quimica, v. 3, n. 4, p. 344–352, 2011. DOI: 10.5935/1984-6835.20110038.

MARQUEZIN, C. A.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; VANDRESEN, F.; DUARTE, E. L.; LAMY, M. T.; VEQUI-SUPLICY, C. C. **The interaction of a thiosemicarbazone derived from R - (+) - limonene with lipid membranes.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 234, n. September 2020, p. 105018, 2021. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2020.105018.

MARQUEZIN, Cássia Alessandra. **Ácido Orto-Aminobenzóico-Hexadecilamina: Uma Nova Sonda Fluorescente Para Biomembranas-Modelo.** Dissertação de mestrado, 2004.

MARQUEZIN, Cássia Alessandra; HIRATA, Izaura Yoshico; JULIANO, Luiz; ITO, Amando Siuiti. **Tryptophan as a Probe for Acid-Base Equilibria in Peptides.** Biopolymers - Peptide Science Section, v. 71, n. 5, p. 569–576, 2003. a. DOI: 10.1002/bip.10535.

MARQUEZIN, Cássia Alessandra; HIRATA, Izaura Yoshico; JULIANO, Luiz; ITO, Amando Siuiti. **Spectroscopic characterization of 2-amino-N-hexadecyl-benzamide (AHBA), a new fluorescence probe for membranes.** Biophysical Chemistry, v. 124, n. 2, p. 125–133, 2006. DOI: 10.1016/j.bpc.2006.06.002.

MARSH, D. **Handbook of lipids bilayers.** Boca Raton: CRC, 1990.

MCBRIDE, M. C. **Bufotenine: toward an understanding of possible psychoactive mechanisms.** Journal of psychoactive drugs, 2000.

MENDANHA, Sebastião Antonio; MARQUEZIN, Cássia Alessandra; ITO, Amando Siuiti; ALONSO, Antonio. **Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: A probe EPR and fluorescence spectroscopy study.** International

Journal of Pharmaceutics, v. 532, n. 1, p. 547–554, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.046.

MOREIRA, L. A. **Estudos visando à utilização da bufotenina obtida de sementes de Anadenanthera (Fabaceae: Mimosideae) na síntese de derivados triptamínicos.** Dissertação de Mestrado. UnB. 2011

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. **Biossurfactantes: Propriedades e aplicações.** Quimica Nova, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000500013.

ORTEGA, E. **Lipid nanoparticles for the transport of drugs like dopamine through the blood-brain barrier.** Journal of Nanoparticle Research, 2021.

Ott, J. **Pharmepéna-Psychonautics: Human Intranasal, Sublingual and Oral Pharmacology of 5-Methoxy-N, N-Dimethyl-Tryptamine.** Journal of psychoactive drugs, 2001.

PAZIN, Wallance Moreira. **Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo.** 2012. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (SP).

POOJARI, Chetan; WILKOSZ, Natalia; LIRA, Rafael B.; DIMOVA, Rumiana; JURKIEWICZ, Piotr; PETKA, Rafał; KEPCZYNSKI, Mariusz; RÓG, Tomasz. **Behavior of the DPH fluorescence probe in membranes perturbed by drugs.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 223, p. 104784, 2019. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104784.

QI, Panqing; SUN, Dejun; GAO, Jing; LIU, Shihua; WU, Tao; LI, Yujiang. **Demulsification and bio-souring control of alkaline-surfactant-polymer flooding produced water by *Gordonia* sp. TD-4.** Separation and Purification Technology, v. 263, n. October 2020, p. 118359, 2021. DOI: 10.1016/j.seppur.2021.118359.

QU, Shi-Jun; LIU, Quan-Wen; TAN, Chang-heng; JIANG, Shan-hao; ZHU, Da-Yuan. **New indole N-oxide alkaloids from *evodia fargessii*.** Planta Med, 2006.

RAMOS, Luciana Machado. Obtenção do alcalóide indólico bufotenina de sementes de *Anadenanthera* sp (Fabaceae: Mimosideae) do bioma Cerrado e sua utilização para síntese de substâncias bioativas. 2008. 82 f. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Universidade de Brasília, Brasília, 2008

RANTAMÄKI, Antti H.; CHEN, Wen; HYVÄRI, Paulus; HELMINEN, Jussi; PARTL,

Gabriel; KING, Alistair W. T.; WIEDMER, Susanne K. **Interactions of Ionic Liquids and Spirocyclic Compounds with Liposome Model Membranes. A Steady-State Fluorescence Anisotropy Study.** Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 18349, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-53893-w.

REICHARDT, Christian; WELTON, Thomas. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition.** DOI: 10.1002/9783527632220.

REYNOLDS, J. E.F. **Martindale-The extra pharmacopoeia.** London: Pharmaceutical Press, 1989.

RIZZATTI, Ivanise Ma; ZANETTE, Dilson R.; MELLO, Ligia C. **Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química.** Quimica Nova, v. 32, n. 2, p. 518–521, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000200041.

ROTH, B. L. CHOUDHARY, M. S. KHAN, N. ULUER, A. Z. **High-affinity Agonist Binding Is Not Sufficient for Agonist Efficacy at 5-Hydroxytryptamine_{2A} Receptors: Evidence in Favor of a Modified Ternary Complex Model.** The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997.

ROZENFELD, Julio H. K.; DUARTE, Evandro L.; OLIVEIRA, Tiago R.; LAMY, M. Teresa. **Structural insights on biologically relevant cationic membranes by ESR spectroscopy.** Biophysical Reviews, v. 9, n. 5, p. 633–647, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0304-4.

SÁNCHEZ, Julieta M.; DEL V. TURINA, Anahí; PERILLO, María A. **Spectroscopic probing of ortho-nitrophenol localization in phospholipid bilayers.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 89, n. 1, p. 56–62, 2007. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2007.08.004.

SHRESTHA, H. RAJNI Bala, R. ARORA, S. **Lipid-Based Drug Delivery Systems.** J. Pharm, 2014.

SINGER, S. ...; NICOLSON, Garth L. **Singer1972.** PdfScience, 1972.

SKOOG, Douglas; DONALD, West. **Principles of Instrumental Analysis.** 2^a ed.

SKOOG, Douglas; WEST, Donald; HOLLER, James. **Os fundamentos de química analítica.** 8^a ed.

SRIRAMA M. BHAIRI, CHANDRA MOHAN, SIBEL IBRYAMOVA, Travis LaFavor. **Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems**, 2007.

STEINER, Robert F.; KIRBY, Edward P. **Interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers**. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 73, n. 12, p. 4130–4135, 1969. DOI: 10.1021/j100846a015.

SUBRAMANIAN, Natarajan; DE OLIVEIRA, Francisco Severino. **Algumas Considerações sobre a Regra de Hund e a Estrutura Eletrônica de Átomos no Ensino de Química**. *Química Nova*, v. 20 n.3, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300013>.

TAKARA, Marcelo. **Propriedades Ópticas de Absorção e Emissão Fluorescente do Ácido orto-Aminobenzóico e seus Derivados em meio solvente Propriedades Ópticas de Absorção e Emissão Fluorescente do Ácido orto-Aminobenzóico e seus Derivados em meio solvente**. 2006.

TYLS, F. PÁLNENÍCK, T. HORÁČEK, J. **Summary of knowledge and new perspectives**. *European Neuropsychopharmacology* Volume 24, Issue 3, March 2014, Pages 342-356

TURNER, W. J. MERLIS, S. **Effect of some indolealkylamines on man**. *Neurol. Psychiatry* 1959.

UENO, Yoshinobu; HIRASHIMA, Naohide; INOH, Yoshikazu; FURUNO, Tadahide; NAKANISHI, Mamoru. **Characterization of biosurfactant-containing liposomes and their efficiency for gene transfection**. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 1, p. 169–172, 2007. DOI: 10.1248/bpb.30.169.

VALEUR, Bernard. **Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution . Methods and Applications**. v. 8, 2001.

VAN STAM, Jan; DEPAEMELAERE, Sigrid; DE SCHRYVER, Frans C. **Micellar Aggregation Numbers - A Fluorescence Study**. *Journal of Chemical Education*, v. 75, n. 1, p. 93, 1998. DOI: 10.1021/ed075p93.

VIGERELLI, Hugo; SCIANI, Juliana Mozer; EULA, Maria Andrea Camarano; SATO, Luciana Almeida; ANTONIAZZI, Marta M.; JARED, Carlos; PIMENTA, Daniel C.

Biological Effects and Biodistribution of Bufotenine on Mice. BioMed Research International. 2018. doi.org/10.1155/2018/1032638

VIGERELLI, Hugo; SCIANI, Juliana M.; PEREIRA, Patricia M. C.; LAVEZO, Aline A.; SILVA, Andrea C. R.; COLLACO, Rita C. O.; ROCHA, Thalita; BUENO, Thais C.; PIMENTA, Daniel C. **Bufotenine, a tryptophan-derived alkaloid, suppresses the symptoms and increases the survival rate of rabies-infected mice: the development of a pharmacological approach for rabies treatment.** Journal Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2020.

WAKUI, Vinícius Galvão. **Alcaloides de Psychotria capitata Ruiz & Pav. (Rubiaceae) : determinação estrutural e atividade biológica.** Dissertação de mestrado, 2015.

WANG, Qiyang et al. **Solid micellar Ru single-atom catalysts for the water-free hydrogenation of CO₂ to formic acid.** Applied Catalysis B: Environmental, v. 290, n. November 2020, p. 1–9, 2021. DOI: 10.1016/j.apcatb.2021.120036.

WEIL, Andrew; DAVIS, Wade. **Bufo alvarius: a potent hallucinogen of animal origin.** Journal of Ethnopharmacology 41 (1994).

WILLIAMS, R. T.; BRIDGES, J. W. **Fluorescence of Solutions: a Review.** Journal of clinical pathology, v. 17, p. 371–394, 1964. DOI: 10.1136/jcp.17.4.371.

ZALDIVAR, Gervasio; CONDA-SHERIDAN, Martin; TAGLIAZUCCHI, Mario. **Molecular basis for the morphological transitions of surfactant wormlike micelles triggered by encapsulated nonpolar molecules.** Langmuir, 2021. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c03421.

ZHANG, Qi; GAO, Zhinong; XU, Feng; TAI, Shuxin; LIU, Xueguo; MO, Shaobo; NIU, Fei. **Surface tension and aggregation properties of novel cationic gemini surfactants with diethylammonium headgroups and a diamido spacer.** Langmuir, v. 28, n. 33, p. 11979–11987, 2012. DOI: 10.1021/la3011212.