

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

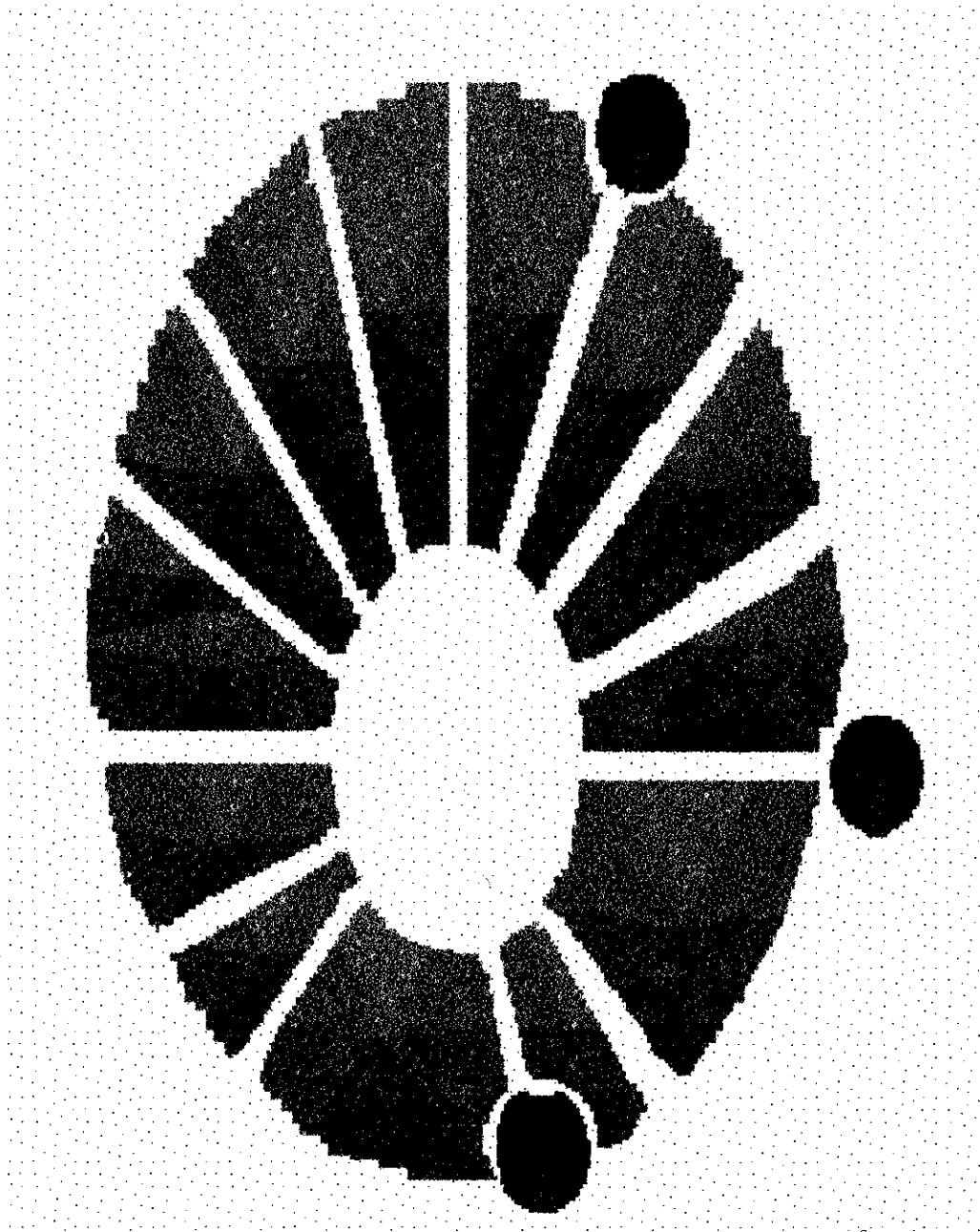
**Estudos sobre a estabilidade e estrutura do DNA
através da fotofísica de corantes intercalados.**

TESE DE DOUTORADO

Autor: Reinaldo Aparecido Bariccatti

Orientador: Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

Campinas 1998



Dedico este trabalho àqueles que me apoiaram durante esta caminhada rumo ao saber. Especialmente aos meus pais, Norma e Renaldo, à minha sogra Maria Hellenice, à minha querida esposa, Karen e ao meu filho, Rafael.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que, de uma maneira ou de outra, me auxiliaram neste estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine pela amizade, paciência, discussão e auxílio, sem o qual não seria possível a realização desta tese.

Aos colegas de grupo. José Antônio, Débora, Lauro, Diniz, Rita, Regina, Leandro, Carla, Márcio e Idê pelo estímulo e auxílio no transcorrer das pesquisas.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Sabadini pela amizade e auxílio.

Ao Prof. Dr. Carlos F. S. Bonafé pela utilização do equipamento de alta pressão e discussão.

Aos funcionários do Instituto de Química, que de maneira simples mas muito importante, permitiram o término desta tese, em especial à Cláudia, Helena, Cássia e Ercília

Ao CNPq e ao FAEP pelas bolsas concedidas.

Ao PADCT e FAPESP pela aquisição dos equipamentos utilizados nos experimentos.

À Deus por dar a oportunidade de poder compreender e vislumbrar sua obra.

Resumo

Estudos sobre a estabilidade e estrutura do DNA através da fotofísica de corantes intercalados.

Autor: Reinaldo Aparecido Baricatti

Orientador: Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

Palavras chave: Aiaranjado de acridina, azul de metileno, DNA, cloreto de guanidínio, pressão, transferência de energia, tempo de vida.

O DNA é uma das biomoléculas mais fascinantes que existe, sendo responsável pela síntese do RNA e, conseqüentemente, por toda a informação genética. Atualmente o estudo desta macromolécula tem tido um avanço considerável devido ao projeto GENOMA, pesquisas nas áreas de eletro-analítica, fluorescência e em seus derivados reativos. Apesar da importância deste biopolímero são poucas as técnicas que podem fornecer informações referentes à sua estabilidade e conformação *in vitro*. Esta dificuldade reside, em parte, ao meio em que o DNA se encontra e às suas propriedades espectroscópicas, pois é uma molécula não fluorescente e suas bandas de absorção eletrônica são pouco sensíveis às alterações do solvente e à sua estrutura.

Neste trabalho utilizou-se corantes intercaladores e fluorescentes como sondas que respondem às alterações no meio em que se encontram (DNA), havendo deslocamento da posição do máximo e da intensidade de absorção, variações no espectro e no tempo de vida de fluorescência. Algumas destas alterações podem ser atribuídas às interações dipolares entre diferentes corantes que induzem um processo de transferência de energia, o qual pode ser empregado para estimar a distância entre essas sondas.

As variáveis utilizadas neste estudo foram a presença de NaCl, GuCl, pressão e GuCl/pressão. A variação na concentração de NaCl provoca efeito diferente daquele observado para o GuCl. O primeiro altera o equilíbrio entre as espécies intercaladas e agregadas, enquanto com o segundo isso não ocorre. As características espectrais observadas na presença de GuCl são diferentes para a espécie livre em solução aquosa e intercalada, resultado de uma interação diferente entre o corante e o DNA, associada a uma desestruturação dessa macromolécula.

A pressão não altera o equilíbrio entre as espécies intercaladas e livres na ausência de GuCl. Porém, em presença deste sal o aumento da pressão induz o retorno das características espectrais do corante intercalado, atribuídas ao retorno estrutural do sítio de intercalação. Quando se usa o par de corantes e se aumenta a pressão observa-se uma alteração na eficiência de transferência de energia associada à aproximação entre os corantes, quer o GuCl esteja presente ou não.

ABSTRACT

Studies on the stability and structure of DNA through the photophysics of intercalated dyes

Author: Reinaldo Aparecido Bariccatti

Advisor: Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

Key words: Acridine orange, methylene blue, DNA, guanidinium hydrochloride, pressure, energy transfer, lifetime.

In this work one used intercalated and fluorescent dyes to probe alterations in the DNA structure due to change in its environment, using absorption and emission spectroscopy. Some of these alterations can be attributed to dipolar interactions between different dyes that are responsible for energy transfer. This process can be used to obtain the distance among those probes.

The variables used in this work were the presence of NaCl, guanidinium hydrochloride (GuCl), pressure and GuCl/pressure. The variation in the NaCl concentration causes a different effect from that observed for GuCl. NaCl alters the balance among the intercalated and aggregated species of the probes, while with the GuCl that doesn't happen. The spectral characteristics observed in the presence of GuCl are different for the free and intercalated species in aqueous solution, result of different interactions between the dyes and DNA, associated to a desestruturation of that macromolecule.

The pressure doesn't change the balance among the intercalated and free species in the absence of GuCl. However, in presence of this salt the increase of the pressure induces the return of the spectral characteristics of the inserted probe in DNA, attributed to the structural recovery of the intercalation sites. When a pair of donor and acceptor of energy is used and one increase the pressure it is observed an alteration in the efficiency of energy transfer associated to a close proximity of the dyes.

SUMÁRIO

<i>I INTRODUÇÃO</i>	<i>1</i>
<i>I.1 DNA</i>	<i>1</i>
<i>I.2 Intercalação e intercaladores</i>	<i>4</i>
<i>I.3 Transferência de energia</i>	<i>9</i>
<i>I.4 Decaimento temporal</i>	<i>12</i>
<i>II OBJETIVOS</i>	<i>14</i>
<i>III PARTE EXPERIMENTAL</i>	<i>15</i>
<i>III.1 Intercalação de AM em DNA</i>	<i>15</i>
<i>III.2 Transferência de energia entre AA e AM intercalados em DNA</i>	<i>16</i>
<i>III.3 Efeito da força iônica em sistemas contendo DNA, AA e AM</i>	<i>16</i>
<i>III.4 Planejamento fatorial com as variáveis: [AA], R e [NaCl]</i>	<i>17</i>
<i>III.5 Efeito do cloreto de guanidínio em soluções contendo AA</i>	<i>17</i>
<i>III.6 Efeito do cloreto de guanidínio no sistema DNA/AA/AM</i>	<i>17</i>
<i>III.7 Efeito da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AM</i>	<i>19</i>
<i>III.8 Efeito da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA</i>	<i>19</i>
<i>III.9 Efeito da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA/AM</i>	<i>19</i>
<i>III.10 Efeito do cloreto de guanidínio e da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA</i>	<i>19</i>
<i>III.11 Efeito do cloreto de guanidínio e da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA/AM</i>	<i>20</i>
<i>III.12 Desnaturação do DNA pela temperatura em presença de GuCl</i>	<i>20</i>
<i>III.13 Instrumentação</i>	<i>20</i>
<i>IV RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	<i>22</i>
<i>IV.1 Intercalação de AM em DNA</i>	<i>22</i>
<i>IV.2 Transferência de energia entre AA e AM intercalados em DNA</i>	<i>27</i>
<i>IV.3 Efeito da força iônica em sistemas contendo DNA, AA e AM</i>	<i>32</i>
<i>IV.4 Planejamento fatorial com três variáveis: [AA], R e [NaCl]</i>	<i>41</i>
<i>IV.5 Efeito do cloreto de guanidínio nas soluções contendo AA</i>	<i>46</i>
<i>IV.6 Efeito do cloreto de guanidínio nos sistemas DNA/AA e DNA/AA/AM</i>	<i>49</i>
<i>IV.7 Efeito da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AM</i>	<i>66</i>
<i>IV.8 Efeito da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA</i>	<i>68</i>
<i>IV.9 Efeito da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA/AM</i>	<i>72</i>
<i>IV.10 Efeito do cloreto de guanidínio e da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA</i>	<i>77</i>
<i>IV.11 Efeito do cloreto de guanidínio e da pressão hidrostática sobre o sistema DNA/AA/AM</i>	<i>84</i>
<i>IV.12 Desnaturação do DNA por temperatura, na presença de cloreto de guanidínio</i>	<i>89</i>
<i>V CONCLUSÕES</i>	<i>92</i>
<i>VI TRABALHOS FUTUROS</i>	<i>94</i>
<i>VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>95</i>

ÍNDICE DE FIGURA

FIGURA I.1.1 Estruturas de dupla hélice do DNA, nas formas A , B e Z : átomos de fósforo , oxigênio , nitrogênio e carbono	1
FIGURA I.2.1 Representação gráfica de AA intercalado em B DNA. As distorções ocorrem nos sítios próximos ao intercalador.....	4
FIGURA I.2.2 Intensidades das bandas de absorção em 492nm (■) e 430nm (●) versus pH.....	6
FIGURA I.2.3 Espectros de absorção de AA : forma (■) mono-protonada, (●) neutra e (▲) agregada... 7	7
FIGURA I.2.4 Representação estrutural do monômero (A) e dímero (B) do AA : carbono , nitrogênio e hidrogênio	7
FIGURA I.2.5 Espectros de absorção de AA : formas livre (▲) e intercalada (▼).....	8
FIGURA I.3.1 Representação esquemática da transferência não radiativa de energia entre um doador (D) e um aceptor (A).....	10
FIGURA III.13.1 Esquema do sistema de pressão hidrostática. Câmara (A), gerador de pressão (B), pistão do gerador (C), linha de etanol (D), reservatório de etanol (E), válvulas (F1 e F2) e manômetro (G).....	21
FIGURA III.13.2 Esquema da câmara de pressão. Câmara de pressão (A), entrada da linha de etanol (B), suporte que sustenta a janela de quartzo (C), janelas de quartzo (D), suporte para a cubeta (E), cubeta de quartzo (F), tubo de polietileno (selador da cubeta) (G), anel extrator (H) e anéis de vedação (I), (J) e (K).....	21
FIGURA IV.1.1 Espectros de absorção das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 6,5; \blacktriangle 10,7; \blacksquare 15,1; \bullet 21,7; \blacktriangle 25,3; \circlearrowleft 30,0; \bullet 35,0; \blacktriangle 38,5$ e $\blacksquare 43,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	22
FIGURA IV.1.2 Espectros de absorção das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 6,5; \blacktriangle 10,7; \blacksquare 15,1; \bullet 21,7; \blacktriangle 25,3; \circlearrowleft 30,0; \bullet 35,0; \blacktriangle 38,5$ e $\blacksquare 43,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	23
FIGURA IV.1.3 Espectros de excitação ($\lambda_{em.} = 690\text{nm}$) das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 10,7; \blacktriangle 15,1; \blacksquare 21,7; \bullet 25,3; \blacktriangle 30,0; \circlearrowleft 35,0; \bullet 38,5$ e $\blacktriangle 43,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	24
FIGURA IV.1.4 Espectros de emissão ($\lambda_{exc.} = 650\text{nm}$) das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 10,7; \blacktriangle 15,1; \blacksquare 21,7; \bullet 25,3; \blacktriangle 30,0; \circlearrowleft 35,0; \bullet 38,5$ e $\blacktriangle 43,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	25
FIGURA IV.1.5 Fórmulas estruturais dos cloridratos de AA e AM	25
FIGURA IV.2.1 Espectros de absorção das soluções de DNA, AA e AM , $I_{abs.}$ máxima do AA =504nm e $I_{abs.}$ máxima do AM =670nm e $I_{em.}$ máxima do AA =530nm.....	27
FIGURA IV.2.2 Área sob a banda de emissão em função de R	28
FIGURA IV.2.3 Curvas de decaimento temporal de fluorescência para as soluções DNA/ AA (—); DNA/ AA / AM com R = (—) 15,9 e (—) 9,9 e (—) para a lâmpada de N_2	28
FIGURA IV.2.4 Eficiências da transferência de energia obtidas através do tempo de vida (τ - ●) e da intensidade de emissão ($I_{em.}$ - ■) versus R	30
FIGURA IV.2.5 Sobreposição dos espectros de emissão de AA e de absorção de AM , normalizados.. 31	31
FIGURA IV.3.1 Espectros de absorção das soluções contendo DNA.....	32
FIGURA IV.3.2 Espectros de absorção das soluções DNA/ AA em unidades de absorbância (maior) e normalizado (menor). R =19,0; $[AA]=1,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[NaCl]=$ —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 mol.L^{-1}	33
FIGURA IV.3.3 Espectros de emissão das soluções DNA/ AA com diferentes $[NaCl]$: —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 mol.L^{-1} , R =19,0 e $[AA]=1,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	33
FIGURA IV.3.4 Curvas de decaimento temporal das soluções DNA/ AA com diferentes $[NaCl]$: —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 mol.L^{-1} e para a lâmpada de N_2 (em preto). R =19,0 e $[AA]=1,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	35
FIGURA IV.3.5 Espectros de absorção das soluções DNA/ AA / AM com diferentes $[NaCl]$. $[AA]=6,7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[AM]=7,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[S_{DNA}]=2,4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; R =19,0 e $[NaCl]=$ —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 mol.L^{-1}	36
FIGURA IV.3.6 Espectros de emissão para as soluções DNA/ AA / AM , com diferentes $[NaCl]$: —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 mol.L^{-1} e R =19,0.....	38
FIGURA IV.4.1 Espectros de absorção de soluções contendo AA , DNA e NaCl . $[AA]=3,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. 41	41
FIGURA IV.4.2 Espectros de absorção de soluções contendo AA , DNA e NaCl . $[AA]=3,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$	42
FIGURA IV.4.3 Efeitos nos espectros de absorção do AA para o sistema com $[NaCl]=0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, ■ $[AA]$; ● R ; ▲ $[NaCl]$; ◆ $[AA]/[NaCl]$; ▼ AA/R ; × $R/[NaCl]$ e / $[AA]/R/[NaCl]$	43

FIGURA IV.4.4 Efeitos nos espectros de absorção de AA para soluções com $[NaCl]= 1,0 mol.L^{-1}$; ■ [AA]; ● R; ▲ [NaCl]; ◆ [AA]/[NaCl]; ▼ AA/R; × R/[NaCl] e † [AA]/R/[NaCl].	43
FIGURA IV.4.5 Grau de polarização (P) espectral das soluções contendo DNA/AA. [AA] = $3,0 \times 10^{-5} mol.L$	44
FIGURA IV.5.1 Espectros de absorção das soluções AA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,001; ▲ 0,005; ■ 0,01; ● 0,05; ▲ 0,1 e ■ 0,5 mol.L ⁻¹	46
FIGURA IV.5.2 Espectros de absorção das soluções AA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,5; ▲ 0,7 e ■ 1,0 mol.L ⁻¹	47
FIGURA IV.5.3 Espectros de emissão das soluções AA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,001; ▲ 0,005; ■ 0,01; ● 0,05; ▲ 0,1 e ■ 0,5 mol.L ⁻¹ . O inserido foi normalizado pela I_{abs} em 490nm.	48
FIGURA IV.6.1 Espectros de absorção do DNA com diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,1; ▲ 0,5; ■ 1,0; ● 2,0 e ▲ 4,0 mol.L ⁻¹	49
FIGURA IV.6.2 Espectros de absorção de GuCl em várias concentrações: ■ 1,0; ● 0,1; ▲ 0,01; ■ 0,001 e ● 0,0001 mol.L ⁻¹	50
FIGURA IV.6.3 Espectros de absorção das soluções de DNA/AA com diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,1; ▲ 0,5; ■ 1,0; ● 2,0 e ▲ 4,0 mol.L ⁻¹ ; R=19,0	51
FIGURA IV.6.4 Espectros de absorção das soluções de AA sem GuCl (▲) e DNA/AA com diferentes [GuCl]: ■ 0 e ● 4,0 mol.L ⁻¹	52
FIGURA IV.6.5 Espectros de emissão das soluções de DNA/AA, em intensidades de emissão (maior) e normalizada (menor), com diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,1; ▲ 0,5; ■ 1,0; ● 2,0 e ▲ 4,0 mol.L ⁻¹ ; R=19,0	53
FIGURA IV.6.6 Espectros de emissão de soluções contendo AA sem GuCl (▲) e DNA/AA com diferentes [GuCl]: ■ 0 e ● 4,0 mol.L ⁻¹ (maior)	54
FIGURA IV.6.7 Curvas de decaimento das soluções contendo DNA/AA com diferentes [GuCl]: ● 0; ▲ 0,5 e ▼ 4,0 mol.L ⁻¹ , ■ decaimento temporal da lâmpada; R=19,0	55
FIGURA IV.6.8 Espectros de absorção das soluções contendo DNA/AA/AM e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,09; ▲ 0,36; ▼ 0,53; ■ 0,82; ● 1,09; ▲ 1,40; ▼ 1,67 e ■ 2,18 mol.L ⁻¹ ; R=17,1	56
FIGURA IV.6.9 Espectros de emissão normalizados pela I_{abs} em 490nm das soluções contendo DNA/AA/AM e diferentes [GuCl]: — 0; — 0,09; — 0,36; — 0,53; — 0,82; — 1,09; 1,40; — 1,67 e — 2,18 mol.L ⁻¹ ; R=17,1	57
FIGURA IV.6.10 Razão entre a área da banda de emissão e a intensidade de absorção ($\Sigma I_{em}/I_{abs,490}$) para as soluções contendo DNA/AA e DNA/AA/AM versus [GuCl]	58
FIGURA IV.6.11 Espectros de absorção de AM: sem DNA e GuCl (—) e com DNA em diferentes [GuCl]: — 0 e — 2,1 mol.L ⁻¹	59
FIGURA IV.6.12 Espectros de emissão de AM normalizados pela intensidade de absorção em 666nm, sem DNA e GuCl (—) e com DNA em diferentes [GuCl]: — 0; — 0,09; — 0,36; — 0,53; — 0,82; — 1,09; — 1,40; — 1,67 e — 2,18 mol.L ⁻¹ ; R=17,1	60
FIGURA IV.6.13 Curvas de decaimento temporal para as soluções contendo DNA/AA/AM e diferentes [GuCl]: 0, 0,5 e 4,0; R=17,1	61
FIGURA IV.6.14 Razão entre as porcentagens de sítios nas formas desestruturada e nativa, em função da [GuCl]	65
FIGURA IV.7.1 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AM em diferentes pressões: ■ 0, ● 680, ▲ 1370 e ■ 2050 atm; R=20,7	66
FIGURA IV.7.2 Espectros de emissão de uma solução contendo DNA/AM em diferentes pressões: 0, 680, 1370 e 2050 Kpsi; R=20,7	67
FIGURA IV.8.1 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA em diferentes pressões: ■ 0, ● 820, ▲ 1640 e ■ 2460 atm	68
FIGURA IV.8.2 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA em diferentes pressões: ■ 0, ● 820, ▲ 1640 e ■ 2460 atm	69
FIGURA IV.8.3 Espectros de emissão de uma solução contendo DNA/AA em diferentes pressões: — 0, — 410, — 820, — 1230, — 1640, — 2050 e — 2460 atm; R=23,0	69
FIGURA IV.8.4 Micrografias de DNA precipitado com 95% de etanol em meios com diferentes forças iônicas. A barra em cada FIGURA corresponde a 2000Å. (A) Fibras obtidas com 1mmol.L ⁻¹ de tampão Tris pH 7,5. (B) Fibras obtidas com 1mmol.L ⁻¹ de Tris pH 7,5 e 10mmol.L ⁻¹ de acetato de amônio. (C) Hastes obtidas com 1mmol.L ⁻¹ de Tris pH 7,5 e 0,5 mol.L ⁻¹ de acetato de amônio	70
FIGURA IV.8.5 Área sob a banda de emissão (de 500 a 650nm) em diferentes pressões ■ aumento e ● diminuição	71
FIGURA IV.9.1 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050 atm	72

FIGURA IV.9.2 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050atm; R=18,6.	73
FIGURA IV.9.3 Espectros de emissão de uma solução contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões: —0, —680, —1360 e —2050 atm; R=18,6.	73
FIGURA IV.9.4 Razão entre a área sob o espectro de emissão (ΣI_{em}) e a intensidade de absorção a 490nm (I_{abs}) versus pressão (atm) para o sistemas ■ DNA/AA e ● DNA/AA/AM.....	74
FIGURA IV.9.5 Eficiência de transferência de energia entre o doador e acceptor com a variação da pressão.....	75
FIGURA IV.9.6 Distância média entre o doador e acceptor com o aumento da pressão.....	75
FIGURA IV.10.1 Espectros de absorção das soluções de DNA/AA com 0,5mol.L ⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050 atm.	77
FIGURA IV.10.2 Espectros de absorção das soluções de DNA/AA com 0,5mol.L ⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050 atm; R=23,0.....	78
FIGURA IV.10.3 Espectros de emissão (normalizados pela I_{abs} em 490nm) das soluções de DNA/AA com 0,5mol.L ⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: : ■ 0, ● 410, ▲ 820, ■ 1230, ● 1640 e ▲ 2050atm; R=23,0.	78
FIGURA IV.10.4 Integral sob a banda de emissão para o sistema DNA/AA em diferentes pressões. [GuCl]: ■ 0; ● 0,5 e ▲ 2,0mol.L ⁻¹	79
FIGURA IV.10.5 Representação gráfica do átomo de sódio e da molécula GuCl: ● H; ● N; ● C; ● Na.	80
FIGURA IV.10.6 Constante de equilíbrio em função da pressão para diferentes [GuCl]: ■ 0,5 e ● 2,0mol.L ⁻¹	81
FIGURA IV.10.7 $\ln K_{eq}$ em função da pressão.	82
FIGURA IV.11.1 Espectros de absorção da solução de DNA/AA/AM e 0,5mol.L ⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: —0, — 1025 e — 2050atm; R=18,6.	84
FIGURA IV.11.2 Integral sob a banda de emissão para soluções contendo DNA/AA/AM e 0,5mol.L ⁻¹ de GuCl.....	85
FIGURA IV.11.3 Espectros de emissão da solução de DNA/AA/AM e 0,5mol.L ⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 340, ▲ 680, ■ 1025, ● 1370, ▲ 1710 e ■ 2050atm; R=18,6.	85
FIGURA IV.11.4 Integral sob a banda de emissão para soluções de ■ DNA/AA e ● DNA/AA/AM em diferentes pressões. [GuCl]=0,5mol.L ⁻¹	86
FIGURA IV.11.5 E_r versus pressão para o sistema DNA/AA/AM. [GuCl]=0,5mol.L ⁻¹	87
FIGURA IV.11.6 Distância entre o doador e acceptor em função da pressão para a solução contendo DNA/AA/AM. [GuCl]=0,5mol.L ⁻¹	87
FIGURA IV.12.1 Espectros de absorção para uma solução de DNA em diferentes temperaturas, 76 a 87°C de 1 em 1°C.....	89
FIGURA IV.12.2 Intensidade de absorção a 260nm com a temperatura para soluções contendo DNA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,3; ▲ 0,5; ▼ 2,0 e ◆ 5,0mol.L ⁻¹	90
FIGURA IV.12.3 Temperatura de desnaturação de DNA em função da [GuCl].	91

ÍNDICE DE TABELA

TABELA III.1.1 Volumes adicionados (mL) e concentrações (mol.L ⁻¹) das soluções de DNA/AM e R.	16
TABELA III.2.1 Massas (g) das soluções estoque, concentrações (mol.L ⁻¹) e R.	16
TABELA III.3.1 Volumes (mL) das soluções estoque.	17
TABELA III.6.1 Massas (g) das soluções estoque.	18
TABELA III.6.2 Massas (g) de GuCl.	18
TABELA III.6.3 Massas (g) de GuCl.	19
TABELA III.12.1 Volumes utilizados (mL) das soluções estoque.	20
TABELA IV.2.1 Tempos de vida (τ , ns).	29
TABELA IV.3.1 Áreas sob as bandas de emissão normalizadas pela intensidade de absorção em 490nm.	34
TABELA IV.3.2 Tempos de vida (τ , ns) obtidos para os sistemas DNA/AA em diferentes [NaCl] (mol.L ⁻¹).	35
TABELA IV.3.3 Rendimentos quânticos de alguns derivados de acridina em solução aquosa, intercalados entre pares de bases CG/CG, AT/AT, AT/CG e DNA	37
TABELA IV.3.4 Áreas sob o espectro de emissão (ΣI_{em}), razão entre a área sob o espectro de emissão e a intensidade de absorção a 490nm ($\Sigma I_{em}/I_{abs}$) e a eficiência de transferência de energia para o sistema DNA/AA/AM em diferentes [NaCl] (mol.L ⁻¹).	38
TABELA IV.3.5 Tempos de vida obtidos dos decaimentos temporais de AA no sistema DNA/AA/AM em diferentes [NaCl] e a eficiência de transferência de energia.	39
TABELA IV.4.1 Grau de polarização espectral médio (P) para as soluções utilizadas no planejamento fatorial.	45
TABELA IV.4.2 Efeito no grau de polarização devido à alteração de uma variável.	45
TABELA IV.5.1 Intensidades de absorção (I_{abs}), razão entre a área sob a banda de emissão e a intensidade de absorção ($\Sigma I_{em}/I_{abs}$) e variação percentual em relação a solução sem GuCl.	48
TABELA IV.6.1 Grau de polarização médio (P) obtido para os sistemas DNA/AA e AA com diferentes [GuCl].	54
TABELA IV.6.2 Tempos de vida (τ) da sonda AA no sistema DNA/AA com diferentes [GuCl].	55
TABELA IV.6.3 Eficiência de transferência de energia para o sistema DNA/AA/AM.	58
TABELA IV.6.4 Tempo de vida e eficiência da transferência de energia de AA para o sistema DNA/AA/AM e GuCl.	61
TABELA IV.6.5 Valores de ϕ , J, R ₀ e r para o sistema DNA/AA/AM e GuCl.	63
TABELA IV.6.6 Grau de polarização médio (P) para o sistema DNA/AA/AM e GuCl.	63
TABELA IV.6.7 Valores de pH para soluções contendo DNA e GuCl.	63
TABELA IV.11.1 Variações na distância (Δr , Å) e no volume (ΔV , cm ³ .mol ⁻¹) para o sistema DNA/AA/AM com a [GuCl] ($\Delta GuCl=0-0,09$ mol.L ⁻¹) e a pressão ($\Delta P=0-2050$ atm).	88
TABELA IV.12.1 Temperatura de desnaturação em função da [GuCl].	90

ABREVIATURAS

ε – coeficiente de absorção molar

λ – comprimento de onda

τ – tempo de vida

$\lambda_{\text{abs.}}$ – comprimento de onda de absorção

$\lambda_{\text{em.}}$ – comprimento de onda de emissão

[] – concentração

A – acceptor de energia

AA – alaranjado de acridina

AM – azul de metileno

D – doador de energia

E_f – eficiência de transferência de energia

$I_{\text{abs.}}$ – absorvância

$I_{\text{em.}}$ – Intensidade de emissão, em unidade arbitrária

K – constante de equilíbrio

K^2 – constante de orientação espacial entre o doador e acceptor de energia

K_{eq} – constante de equilíbrio experimental

ns – nanosegundos, 10^{-9} do segundo

P – grau de polarização

P_{DNA} – fosfato presente no DNA

R – constante dos gases

R – relação entre as concentrações de S_{DNA} e de intercaladores

R_0 – distância crítica

S_D – sítio de intercalação na forma desestruturada

S_{DNA} – sítio de intercalação do DNA ($P_{\text{DNA}}/2$)

S_N – sítio de intercalação na forma nativa

I INTRODUÇÃO

I.1 DNA

Em abril de 1953 a Nature publicou três artigos sobre a estrutura do DNA. O primeiro, escrito por Watson e Crick¹, propondo que o DNA era uma dupla hélice com fitas anti-paralelas unidas por pontes de hidrogênio entre bases complementares. Os outros dois detalhavam os estudos de difração de raios X das fibras de DNA (forma B^{2,3}) estabelecendo que cada volta da hélice possui um passo de 34Å, 10 pares de bases e diâmetro de 20Å. As duas cadeias mantêm-se unidas, em parte, por pontes de hidrogênio, estando cada grupo amino de uma base, em uma das fitas, ligado a um grupo ceto de outra base, na outra fita. Os pares de bases adjacentes estão afastados de 3,4Å, cada par de bases faz um ângulo de 36° em relação aos pares adjacentes, cada passo da dupla hélice possui um comprimento de 34Å e contém 10 pares de bases. Estes valores são válidos para a forma B do DNA com 92% de grau de hidratação (FIGURA I.1.1).

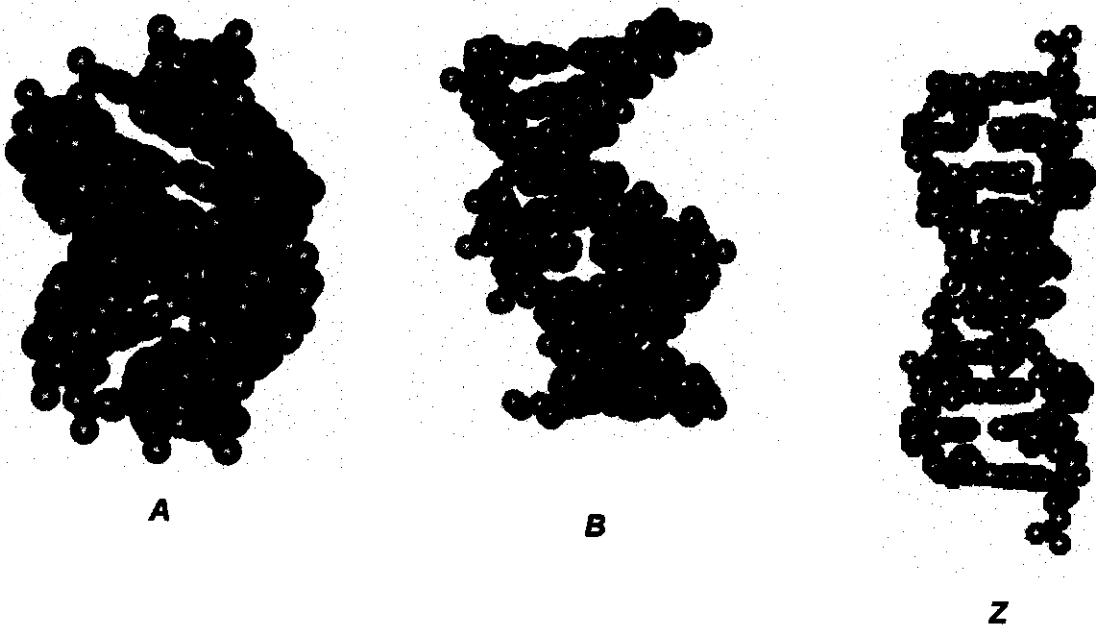


FIGURA I.1.1 Estruturas de dupla hélice do DNA, nas formas A, B e Z: átomos de fósforo, oxigênio, nitrogênio e carbono.

Existem várias conformações do DNA, três das quais são semelhantes entre si: A, B e C. Aquela comumente encontrada em solução e *in vivo* é a B que se converte em A quando o grau de hidratação é reduzido para menos de 75%. Elas diferem na disposição dos pares de bases, que não são perpendiculares ao eixo da hélice mas inclinados de $\approx 20^\circ$ (FIGURA I.1.1). Em conseqüência disto, o passo é reduzido para 28Å havendo 11 pares de bases por volta. A

conformação C se assemelha muito à A, possuindo passo de 33Å com nove pares de bases por volta. Além destas, existem as estruturas D e Z.

Estas conformações são estabilizadas em parte pelo solvente (água), que não é apenas um meio para manter os solutos dissolvidos sendo responsável, também, pela estabilização das estruturas secundária e terciária, sustentando os ácidos nucleicos, diminuindo a repulsão entre os grupos fosfato e, em parte, ordenando as bases nitrogenadas mediante interações hidrofóbicas.

O grau de hidratação do DNA é um fator importante para sua conformação, valores elevados favorece a forma B e a redução desta (ou também o aumento da força iônica) acarreta a transição da conformação B para C ou para A e, se as seqüências permitirem, para as conformações D e Z.

No caso do DNA o grau de solvatação (Γ) é um parâmetro que indica o número de moles de água por mol de nucleotídeos. A estrutura secundária desta macromolécula está intimamente relacionada a $\Gamma^{4,5}$ e, conseqüentemente, à atividade (a_w) da água, que diminui com o aumento da concentração de sal⁶. Embora a_w dependa da força iônica e não da natureza do cátion, este tem um efeito pronunciado na estrutura secundária do DNA, indicando que existe uma interação específica entre eles⁵.

Para sistemas contendo solventes orgânicos (etanol, isopropanol, dioxano, etc.) ocorre alteração na polaridade do meio, permitindo transições entre as conformações B e A e entre C e A, as quais podem ser monitoradas mediante dicróismo circular.⁷ A transição entre B e C é contínua, em concordância com a similaridade estrutural entre elas.

Os experimentos envolvendo equilíbrio de sedimentação, espectroscopia de IV e difração de raios X levam à conclusão que o DNA é altamente, mas não homoganeamente, solvatado, havendo duas camadas de hidratação, a primária e a secundária^{8,9}.

A primária consiste de 11 a 12 moléculas de água por nucleotídeo, estando as moléculas de água agrupadas em três classes: 1) ligadas aos grupos fosfato, 2) unidas aos grupos fosfodiéster+açúcar e 3) às bases. Resultados obtidos por espectroscopia de IV, para o DNA a menos de 65% no grau de hidratação, foram interpretados como hidratação do íon oxigênio do grupo fosfato, havendo 5 a 6 moléculas de água por nucleotídeo. Abaixo de 60% de hidratação, esse íon, agora do grupo fosfodiéster, e as furanoses estão parcialmente hidratados. A hidratação dos grupos funcionais amino, imino e ceto das bases ocorre em $\approx 65\%$ de hidratação com mais 8 a 9 moléculas de água. Quando o grau de hidratação está em torno de 80% a camada de hidratação primária do DNA é completa com ≈ 20 moléculas de água por nucleotídeo¹⁰.

A estrutura formada pelas moléculas de água na camada de hidratação primária é diferente daquela existente no "bulk" sendo que, das 20 moléculas de água existentes nesta camada apenas 8 ou 9 delas estão em contato direto com o DNA. Esta camada de hidratação

é impermeável aos cátions¹¹ e, quando a solução é resfriada abaixo de 0°C, não congela com a mesma estrutura da água pura¹².

Estudos utilizando dicroísmo circular e difração de raios X¹³ indicam que o DNA em solução aquosa não está na forma B com exatamente 10 pares de bases por passo, mas em uma conformação ligeiramente enrolada com um ângulo menor entre pares de bases sucessivos. Além disto, esta substância, como outros polinucleotídeos e polipeptídeos, possui dobras formando estruturas ordenadas secundárias e terciárias, associadas à blindagem de grupos que estariam expostos ao solvente, análogamente ao que ocorre em polímeros cujas cadeias estão distribuídas aleatoriamente.

Os cálculos sobre a energia de hidratação realizados para a conformação B podem ser usados para analisar as forças responsáveis pela estabilização da dupla hélice¹⁴ em solução. A maior energia (15Kcal/mol por par de base) está associada à diminuição da repulsão entre grupos fosfato adjacentes. A hidratação aumenta a atração entre as bases e estes grupos (12Kcal/mol por par de base) e influi no empilhamento das mesmas (7Kcal/mol por par de base).

A redução da repulsão entre os grupos fosfato se deve, principalmente, à diminuição da interação eletrostática; a atração entre esses grupos e as bases depende do forte aumento do componente eletrostático e, em menor grau, do aumento nas energias de polarização e dispersão. Na interação entre bases (empilhamento) a hidratação contribui principalmente para a estabilização através de efeitos de dispersão e eletrostático e um componente repulsivo (cerca 5Kcal/mol por par de base) deve ser vencido para que ocorra o empilhamento, resultando em uma estabilização de 7 a 10Kcal/mol por par de base, para o empilhamento de pares de bases G-C.

1.2 INTERCALAÇÃO E INTERCALADORES

As primeiras evidências sobre a intercalação de compostos aromáticos em DNA provieram de estudos hidrodinâmicos e de difração de raios X empregando derivados de acridina¹⁵. O complexo formado entre a substância aromática e o DNA apresenta um difratograma que indica um aumento da separação entre os pares de bases do DNA.

Segundo o modelo proposto, a intercalação ocorre entre os pares de bases adjacentes e são observadas as seguintes variações na estrutura do DNA: aumento do comprimento da dupla hélice, distorção da cadeia açúcar-fosfato e deformação da estrutura regular helicoidal nas proximidades dos sítios de intercalação, a qual deforma os sítios vizinhos, tornando-os impróprios para a intercalação (FIGURA 1.2.1).



FIGURA 1.2.1 Representação gráfica de AA intercalado em B DNA. As distorções ocorrem nos sítios próximos ao intercalador.

O alongamento do DNA em presença da proflavina indica que apenas 44% dos sítios de intercalação estão ocupados pelas moléculas deste composto; assim, dois sítios (um acima e outro abaixo daquele em que se encontra a espécie intercaladora) têm sua ocupação inviabilizada pela intercalação.

As forças atrativas envolvidas no processo de intercalação são de natureza hidrofóbica e devidas ao “empilhamento” dos anéis aromáticos do intercalador e dos pares de bases. Entretanto, é conhecido que, em alguns casos, a desnaturação do DNA não reduz substancialmente a ligação da espécie intercalada, fato que tem levado a um outro modelo o

qual envolve a sobreposição dos anéis aromáticos do intercalador e das bases adjacentes na mesma fita polinucleotídica, como acontece para a acridina¹⁶.

Hoje são conhecidas várias substâncias que podem interagir, via intercalação, com o DNA: psoralenos, cloroquina, cloropromazina, brometo de etídeo, iodeto de propídeo, antibióticos, corantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc. Devido ao sistema cromóforo do intercalante, sua interação com o DNA pode ser seguida por métodos espectroscópicos, os quais fornecem informações espectrais e cinéticas sobre o processo de intercalação. Estudos cinéticos mostram que este fenômeno, que ocorre na escala temporal de milissegundos, é precedido por um processo rápido de difusão e interação do intercalante com grupos fosfato, podendo haver a formação de complexos oligoméricos.

De modo geral, as modificações espectrais podem ocorrer nas intensidades e posições das bandas de absorção e de emissão, no tempo de vida e na polarização espectral. Em especial, para a proflavina, acriflavina, quinacrina e mostarda de quinacrina, o rendimento quântico da fluorescência depende fortemente do local em que a molécula se insere. No caso de proflavina e quinacrina, a supressão de fluorescência por regiões ricas em C-G foi atribuída a um complexo de transferência de elétrons. Para a proflavina o rendimento quântico é reduzido $\approx 33\%$ pela intercalação, mas o tempo de vida permanece constante quando comparado aos valores obtidos em solução aquosa.

A substância alaranjado de acridina (AA), em solução aquosa, possui um equilíbrio envolvendo três espécies (neutra, mono-protonada e di-protonada) no intervalo de pH entre 0 e 12. O pH de viragem do equilíbrio entre as espécies di e mono-protonada é ≈ 1 e o do equilíbrio entre as formas mono-protonada e neutra ocorre em $\approx 10,5$. A FIGURA I.2.2 mostra a dependência das intensidades máximas das bandas de absorção em 492 e 430nm, em função do pH.

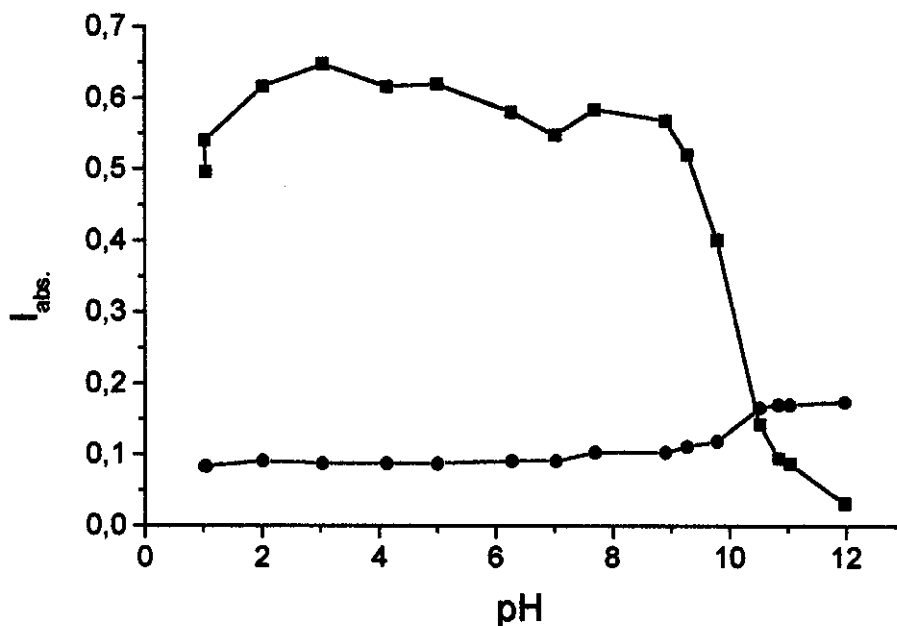


FIGURA I.2.2 Intensidades das bandas de absorção em 492nm (■) e 430nm (●) versus pH.

As diferenças espectrais para as diferentes formas deste corante são acentuadas. A espécie neutra possui uma banda com máximo em 430nm e a mono-protonada possui seu máximo em 492nm. Esta última é semelhante à da di-protonada (embora esta seja mais larga e menos intensa), a qual possui ainda outras duas bandas¹⁷ com máximos em 353 e 370nm, não observadas na FIGURA I.2.3.

Além dos equilíbrios mencionados há o aparecimento de um dímero, que se forma em solução aquosa quando a concentração de AA é $\approx 4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. Esta espécie se caracteriza pelo emparelhamento de duas moléculas de AA, cujos anéis aromáticos estão sobrepostos (FIGURA I.2.4). Quando isto ocorre há uma supressão acentuada da fluorescência e o surgimento de uma nova banda de absorção, com máximo em 472nm (FIGURA I.2.3), que se altera continuamente com o grau de agregação¹⁸: dímeros, trímeros ou oligômeros.

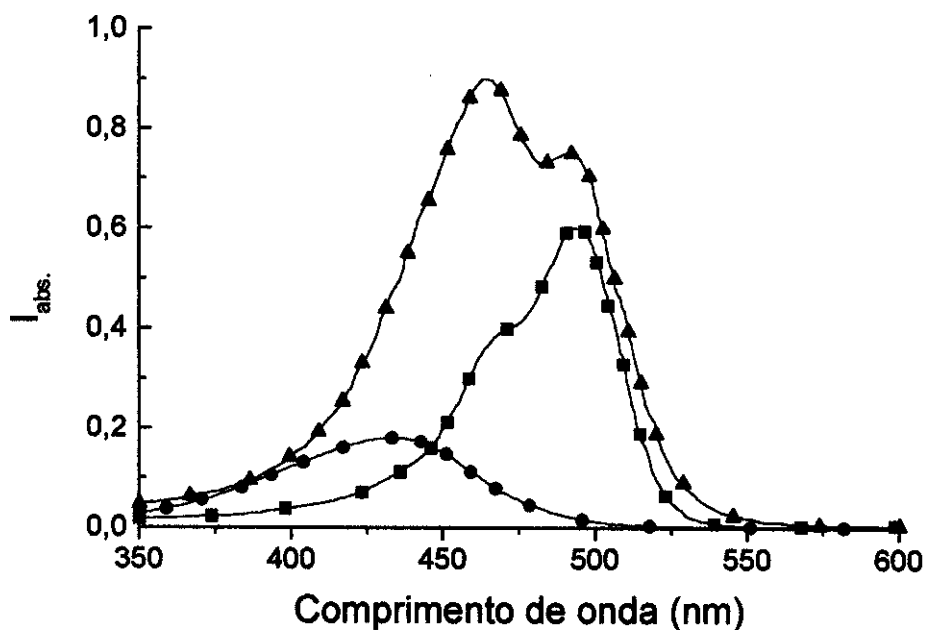


FIGURA 1.2.3 Espectros de absorção de AA: forma (■) mono-protonada, (●) neutra e (▲) agregada.

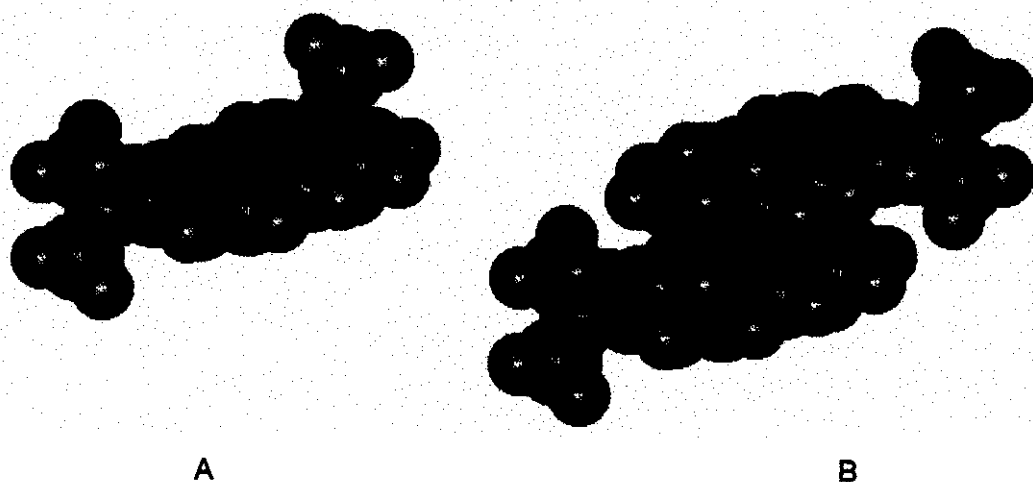


FIGURA 1.2.4 Representação estrutural do monômero (A) e dîmero (B) do AA: carbono, nitrogênio e hidrogênio.

As alterações que ocorrem nos espectros de absorção e emissão do AA na presença de DNA são: deslocamento do máximo de absorção para 503nm, diminuição da largura da banda de absorção à meia altura e aumento do rendimento quântico de 0,25 para 0,75. Elas indicam que cada molécula de AA se encontra alojada entre dois pares de base. A FIGURA 1.2.5 mostra os espectros de absorção das espécies livre e intercalada de AA.

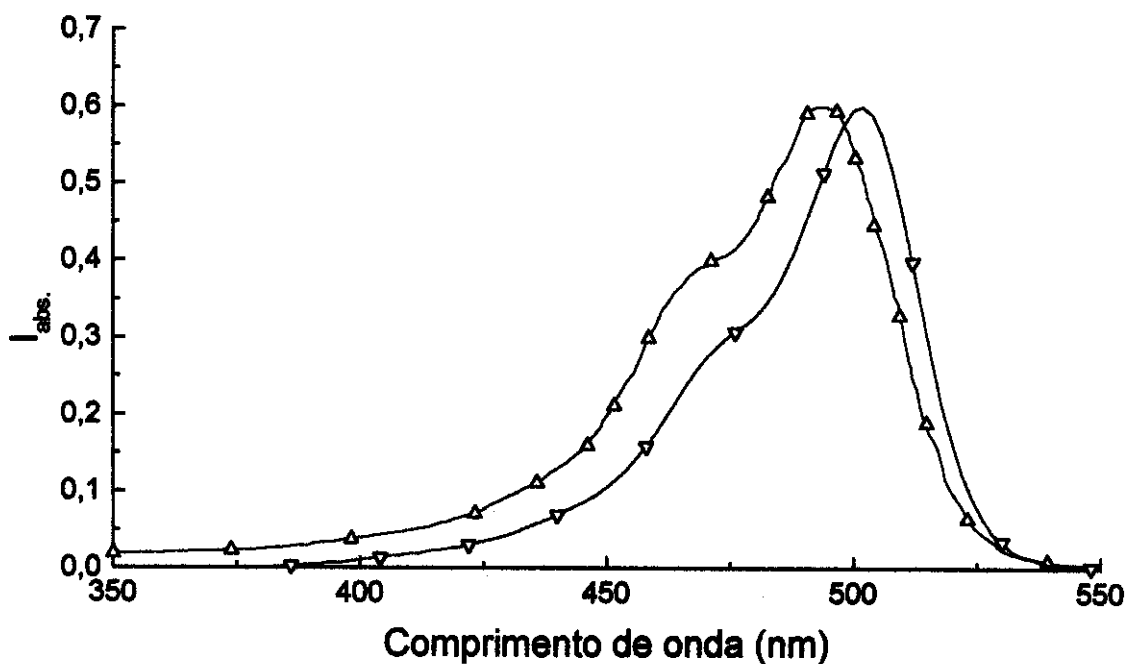


FIGURA I.2.5 Espectros de absorção de AA: formas livre (▲) e intercalada (▼).

A formação de agregados de AA em DNA também é possível. Entretanto, neste caso as moléculas não mais se encontram intercaladas e interagem com os grupos fosfato na superfície externa do DNA, resultando nas alterações espectrais mencionadas para o mesmo em solução aquosa. Contudo, no espectro de emissão há o surgimento de uma nova banda com máximo em $\approx 650\text{nm}$.

I.3 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

Estudos sobre transferência inter molecular de energia eletrônica tem se tornado uma ferramenta poderosa para compreender reações fotoquímicas, mecanismos de reações e parâmetros que caracterizam o estado excitado. Sem a transferência de energia eletrônica, o processo de fotossíntese não seria tão eficiente ou não poderia ocorrer, estando presente em um grande número de processos biológicos.

Essa transferência de energia pode ser classificada como:

- a) Radiativa.
- b) Não radiativa.
- c) Colisional.
- d) Migração excitônica.

O processo mais trivial é o primeiro, que ocorre em duas etapas: a luz emitida por uma molécula doadora "*D*" (primeira etapa) é reabsorvida por uma segunda molécula acceptora "*A*" (segunda etapa) que pode ser ou não idêntica à primeira. Neste processo não há interação entre as moléculas "*D*" e "*A*"; entretanto, há uma sobreposição entre os espectros de absorção do acceptor e emissão do doador. Este fenômeno pode ocorrer a uma grande distância e a probabilidade de reabsorver a luz emitida pelo doador à distância "*d*" do acceptor varia com " d^2 ". Este processo se caracteriza por: 1) uma invariância do tempo de vida do doador¹⁹, 2) uma mudança no formato do espectro de emissão do doador (que está relacionado ao espectro de absorção do acceptor) e 3) apresentar uma eficiência que depende da viscosidade do meio.

A transferência não radiativa de energia é um processo que ocorre em uma única etapa, envolvendo simultaneamente a passagem do doador para o estado fundamental e do acceptor para o estado excitado, não havendo emissão de luz. Para que este processo aconteça é necessário que haja uma interação ressonante entre os estados iniciais ($D^* + A$) e finais ($D + A^*$). Isto é satisfeito quando as energias de transição do doador ($D \rightarrow D^*$) e do acceptor ($A \rightarrow A^*$) são semelhantes (FIGURA I.3.1).

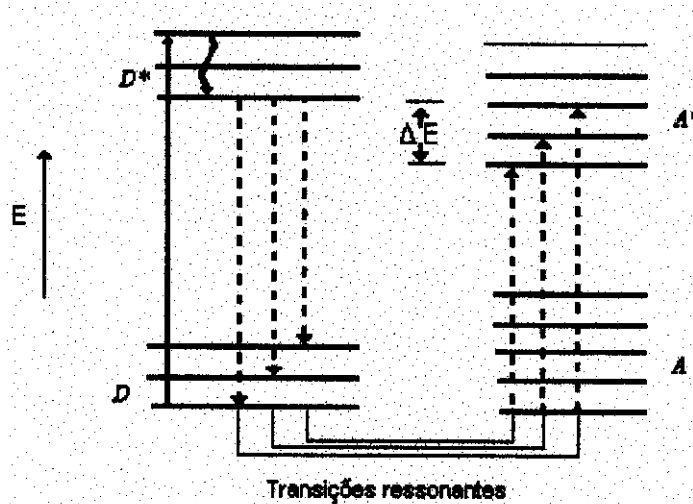


FIGURA I.3.1 Representação esquemática da transferência não radiativa de energia entre um doador (D) e um aceitador (A).

Se a transferência não radiativa de energia for mais lenta que a relaxação vibracional e a temperatura não for muito alta, o estado inicial terá doadores excitados e aceptores não excitados. Considerando que, de acordo com o princípio de Fraanck-Condon, as transições são adiabáticas (verticais), a energia transferida deve corresponder às frequências que são comuns aos espectros de emissão do doador e de absorção do aceitador, que é a região de sobreposição entre eles. Com o aumento dessa sobreposição, o número de possíveis estados acoplados aumenta, o mesmo ocorrendo com a probabilidade de transferência de energia.

A região de sobreposição espectral é matematicamente definida como:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) d\nu \quad \text{EQUAÇÃO I.3.1}$$

onde: F_D é a distribuição espectral da emissão do doador e ϵ_A é a de absorção do aceitador, normalizadas para a unidade e absorção molar. Ambas são expressas em cm^{-1} .

Desta forma, J é uma medida do número de possíveis estados finais associados às transições entre o doador e o aceitador.

Förster¹⁹ desenvolveu uma expressão quantitativa para a transferência de energia eletrônica devida à interação dipolo-dipolo utilizando parâmetros experimentais (EQUAÇÃO I.3.2).

$$K_{D^* \rightarrow A} = \frac{8,8 \times 10^{-25} K^2 \Phi_D}{n^4 \tau_D r^6} \int_0^{\infty} F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4} \quad \text{EQUAÇÃO I.3.2}$$

onde: ν é o número de onda, n é o índice de refração do solvente, K^2 é o fator de orientação entre o doador e o acceptor, Φ_D é o rendimento quântico de emissão do doador, τ_D é o tempo de vida do doador (em segundos) e r é a distância entre D e A (em centímetros).

Esta EQUAÇÃO se aplica para o caso em que o doador e acceptor estão bem separados (no mínimo 20\AA^{20}), exibem espectros largos e desestruturados, ocorra a sobreposição de espectros e não haja interação de D e A com moléculas do solvente.

A eficiência da transferência de energia (E_t) é expressa em termos da "distância crítica" R_0 (EQUAÇÕES 1.3.3 e 1.3.4), definida como a separação entre D e A para a qual a taxa de transferência de energia ($K_{D \rightarrow A}$) é igual a soma das taxas de todos os outros processos de relaxação (EQUAÇÃO 1.3.5), ou seja, é a distância para a qual o rendimento quântico do doador é reduzido de 50%.

$$E_t = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{EQUAÇÃO 1.3.3}$$

$$R_0^6 = \frac{8,8 \times 10^{-25} K^2 \Phi_D}{n^4} \int_0^\infty F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4} \quad \text{EQUAÇÃO 1.3.4}$$

$$K_{D \rightarrow A} = 1/\tau_D \quad \text{EQUAÇÃO 1.3.5}$$

Estas equações mostram que a eficiência de transferência de energia por interação dipolar não depende da força do oscilador do doador. Assim, R_0 não depende da absorbância do doador, mas sim de seu rendimento quântico, parâmetro que leva em consideração outros processos de desativação que ocorrem na molécula. Na prática, podem ser obtidos valores para R_0 entre 50 e 100\AA usando $\epsilon_A = 10.000 \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, sobreposição espectral significativa e rendimento quântico entre 0,1 e 1,0.

A validade da teoria de Förster foi testada por Latt et al.²¹, Stryer e Haugland²², Conrad e Brand²³, Chiu e Bersonh²⁴, entre outros, usando distâncias conhecidas entre o doador e acceptor.

A distância obtida via cálculos sobre transferência de energia depende da exatidão e validade de R_0 e da eficiência (E_t) do processo. A maior dificuldade neste caso é obter um valor para o fator de orientação K^2 , que normalmente não é conhecido. Os valores possíveis desta constante são 0 e 4 para osciladores que estão perpendiculares ou paralelos²⁵ e 2/3 quando possuem orientação aleatória. De modo geral este último é freqüentemente utilizado e fornece resultados satisfatórios, pois há um certo grau de liberdade rotacional do doador e acceptor, levando a aleatoriedade entre suas orientações.

1.4 DECAIMENTO TEMPORAL

O tempo de vida τ é aquele requerido para que o número de moléculas no estado excitado seja reduzido a $1/e$ (onde e é a base dos logaritmos neperianos), em virtude de processos de relaxação, radiativos (como fluorescência) ou não. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional ao número de moléculas no estado excitado e no caso mais simples é expressa como uma equação mono exponencial:

$$I = I_0 \times e^{-t/\tau} \quad \text{EQUAÇÃO 1.4.1}$$

onde: I e I_0 são as intensidades de fluorescência em um tempo t e em $t=0$, respectivamente e τ é o tempo de vida. Quando há mais de uma espécie fluorescente, com diferentes tempos de vida a equação vista se torna:

$$I = I_0 \times \sum a_i e^{-t/\tau_i} \quad \text{EQUAÇÃO 1.4.2}$$

onde: a_i é um fator pré-exponencial associada à espécie i .

Moléculas orgânicas em solução possuem tempos de vida entre 0,1 e 100nseg. Há dois métodos principais para a medida de τ : usando luz pulsada e medindo o deslocamento de fase quando a excitação da amostra é feita com luz contínua.

No método com luz pulsada a amostra é excitada por um pulso de luz de curta duração (largura a meia altura ≤ 10 nseg.) e a intensidade de fluorescência é graficada em escala semilog. Se o pulso de luz é suficientemente curto, comparado ao tempo de decaimento, o gráfico obtido será uma reta cuja inclinação é $-1/\tau_i$. Na prática é difícil obter um pulso de luz extremamente curto, que não influencie a forma do sinal fluorescente obtido, de modo que este se encontra convoluido com o do pulso de luz. A integral de convolução é dada por:

$$G(t) = \int I(t)F(t)dt \quad \text{EQUAÇÃO 1.4.3}$$

onde: $G(t)$ é a intensidade do sinal fluorescente observado, $I(t)$ é a intensidade do pulso de luz em função do tempo e $F(t)$ é a função real do decaimento fluorescente, que seria observada caso o pulso de luz tivesse duração infinitesimal. Na prática é possível obter a função $I(t)$ pela substituição da amostra por uma solução espalhadora e calcular a função $F(t)$.

A solução da EQUAÇÃO 1.4.3 não é um problema trivial. Se o comportamento da função $F(t)$ é conhecido como sendo mono-exponencial, a solução é simplificada, mas *a priori*

não se conhece a forma da função $F(t)$. Vários artigos mencionam métodos para “deconvoluir” $G(t)$, conhecendo-se $I(t)$ ^{26,27,28,29}.

Atualmente, um desses métodos implica em convoluir $I(t)$, assumindo que $F(t)$ é uma função contendo de uma a três exponenciais (como na EQUAÇÃO 1.4.2) e por via computacional variar a_i e τ_i até obter um ajuste, através do método de mínimos quadrados, entre a curva experimental ($G(t)$) e a calculada, conforme EQUAÇÃO 1.4.4.

$$\chi^2 = \frac{1}{N - d - 1} \sum_1^N \frac{(I(t)_{calc} - I(t)_{exp})^2}{s(t)^2} \quad \text{EQUAÇÃO 1.4.4}$$

onde: N é o número de canais analisados, d o número de parâmetros ajustados, $s(t)$ é o desvio padrão determinado pela medida do ruído no tempo t , e $I(t)_{calc}$ e $I(t)_{exp}$ são as intensidades de emissão calculada e experimental, respectivamente.

Valores de χ^2 entre 0,8 e 1,2 são considerados como indicativos de um bom ajuste de curva, enquanto valores até 1,5 podem ser aceitos para curvas ligeiramente distorcidas. Porém, o valor de χ^2 sozinho não é suficiente para indicar um bom ajuste sendo necessário, também, considerar a função de auto correlação (Cr_j) dada por:

$$Cr_j = \frac{\frac{1}{m} \sum_{i=p_1}^{p_1+m-1} r_i r_{i+j}}{\frac{1}{p_3} \sum_{i=p_1}^{p_2} [r_i]^2} \quad \text{EQUAÇÃO 1.4.5}$$

onde: $p_3 = p_2 - p_1 + 1$, sendo p_1 o primeiro e p_2 o último canal utilizado para efeito de cálculo. O valor superior de j é $p_2/2$ e m é definido como $p_3 - j$ e varia para cada soma.

Cr_j é a correlação entre o resíduo no canal i (r_i) e o resíduo no canal $i+j$ (r_{i+j}) somado sobre um número selecionado de i canais. O valor inicial de Cr_j é 1 e os demais valores devem possuir alta frequência e baixa amplitude de oscilação (próximo de zero). Quando isto ocorre pode-se afirmar que foi obtido um bom ajuste de curva.

Lâmpadas que possuem meio ativo constituído por N_2 ou H_2 fornecem pulsos de luz com largura à meia altura de 1,5 a 4nseg. Usualmente opera-se a lâmpada com alta taxa de repetição para obter um sinal médio. Entre as fontes que fornecem pulsos de luz com largura temporal <1nseg. podem ser citados lasers pulsados e síncrotrons.

Para a detecção do sinal são necessárias foto-multiplicadoras rápidas. Em alguns equipamentos elas são substituídas por placas com micro canais (“microchannel plates”) que possibilitam a detecção de sinais rápidos com maior eficiência.

II OBJETIVOS

Este trabalho tem os seguintes objetivos:

- 1) adquirir dados espectroscópicos de sondas intercaladas em DNA e correlacioná-los com a estabilidade e conformação da macromolécula.
- 2) caracterizar as alterações das propriedades espectroscópicas das sondas utilizadas com o efeito da variação de pressão, presença de cloreto de guanidínio e cloreto de sódio na estrutura do DNA.
- 3) verificar a influência de NaCl e GuCl na estrutura do DNA e no equilíbrio das espécies presentes.
- 4) analisar as perturbações na estrutura do DNA causadas por altas pressões, na presença e ausência de íons e correlacioná-las com equilíbrios entre estruturas do DNA.
- 5) observar as variações de volume do DNA com a pressão mediante transferência não radiativa de energia e comparar os resultados com cálculos envolvendo constantes de equilíbrio.

III PARTE EXPERIMENTAL

Foi utilizado DNA altamente polimerizado (10×10^3 a 15×10^3 kD), tipo I, marca Sigma, proveniente de timo de bezerro; o alaranjado de acridina (AA) foi obtido da British Drug House e o azul de metileno (AM) da Ecibra. O cloreto de guanidínio (GuCl, pureza = 99%), utilizado como agente desnaturante, foi obtido junto à Aldrich e purificado por recristalização em metanol a -10°C .

O alaranjado de acridina foi purificado mediante dissolução em uma mistura de água e etanol (1/1 v/v) e precipitado pela adição de uma solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, filtrado, lavado com água destilada e seco a 70°C .

Foram preparadas soluções diluídas da substância azul de metileno, proveniente de diferentes fornecedores, das quais foram obtidos os espectros de absorção para avaliar a relação das intensidades de absorção em 665 e 620nm. Foi utilizada, sem purificação, aquela que possuía relação superior a 2,0, indicando ausência da espécie desmetilada do corante³⁰.

A solução tampão foi preparada segundo a adição de 39,0mL de KH_2PO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e 61,0mL de Na_2HPO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ em um balão de 100mL.

As soluções utilizadas foram preparadas com água bi-destilada e para a limpeza da vidraria utilizou-se mistura sulfonítrica (1/1 v/v de ácido sulfúrico e nítrico concentrados), sendo lavadas com água comum e, por último, com água bi-destilada.

Para as soluções estoque de DNA dissolveu-se o DNA em água bi-destilada e deixou-se a solução em repouso em geladeira (2 a 3 dias). Depois, a solução foi homogeneizada por rotação (10rpm) e, para confirmar a homogeneidade, foram obtidos espectros de absorção de duas alíquotas, uma extraída do fundo e outra da superfície da amostra.

A concentração de fosfato presente (P_{DNA}) no DNA foi obtida por espectroscopia de absorção, utilizando $\epsilon=6600 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ (260nm) e a concentração de sítios de intercalação (S_{DNA}) é dada por $P_{\text{DNA}}/2$.

III.1 INTERCALAÇÃO DE AM EM DNA

Foram preparadas soluções estoque de AM, tampão fosfato (pH 7,0) e DNA, cujas concentrações são $1,03 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e $4,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (correspondente à de fosfato), respectivamente.

Após a adição dos volumes (TABELA III.1.1) em balões de 10mL, os quais foram completados com água bi-destilada, as soluções foram mantidas a $\cong 5^\circ\text{C}$ e protegidas da luz, durante 24h. A relação entre $[S_{\text{DNA}}]$ e $[\text{corante}]$ fornece o valor de R, que é o número de pares de bases por intercalador.

TABELA III.1.1 Volumes adicionados (mL) e concentrações (mol.L⁻¹) das soluções de DNA/AM e R.

Nº	V _{DNA}	V _{Tampão}	V _{AM}	[P _{DNA}] $\times 10^5$	[AM] $\times 10^7$	R
1	1,00	1,0	0,92	4,33	9,4	23,0
2	0,90	1,0	0,92	3,85	9,4	20,5
3	0,80	1,0	0,92	3,50	9,4	18,6
4	0,70	1,0	0,92	3,00	9,4	16,0
5	0,60	1,0	0,92	2,53	9,4	13,5
6	0,50	1,0	0,92	2,17	9,4	11,5
7	0,35	1,0	0,92	1,51	9,4	8,0
8	0,25	1,0	0,92	1,01	9,4	5,4
9	0,15	1,0	0,92	0,65	9,4	3,5
10	0	1,0	0,92	0,00	9,4	0

III.2 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE AA E AM INTERCALADOS EM DNA

Inicialmente foi preparada uma solução de DNA, utilizando 56mg de DNA em 25mL de água bi-distilada tamponada em pH 7. A concentração de fosfato do DNA na solução ($5,1 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) foi determinada por espectrofotometria.

As soluções estoque dos corantes AM ($2,3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e AA ($1,1 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹), foram misturadas na ordem: solução de DNA, solução de AA, solução de AM e água bi-distilada (para igualar o volume). A massa de cada solução estoque utilizada para obter a solução final está na TABELA III.2.1, juntamente com as concentrações e a razão R.

TABELA III.2.1 Massas (g) das soluções estoque, concentrações (mol.L⁻¹) e R.

Sol.	DNA	AA	AM	H ₂ O	[S _{DNA}] $\times 10^4$	[AA] $\times 10^5$	[AM] $\times 10^6$	R
1	0,9800	0,5932	1,5850	1,8378	4,96	1,31	74,2	5,7
2	0,9729	0,5925	1,1691	2,2281	4,96	1,32	54,7	7,3
3	0,9794	0,5901	0,9247	2,4784	4,98	1,31	43,3	9,9
4	0,9703	0,5930	0,7262	2,6983	4,92	1,32	34,0	10,7
5	0,9770	0,5951	0,5882	2,7962	4,99	1,33	27,5	12,4
6	0,9899	0,5926	0,4086	2,9651	5,05	1,32	19,1	15,9
7	0,9739	0,5932	0,2757	3,1745	4,91	1,31	12,9	19,3
8	0,9896	0,5929	0,1401	3,2750	5,01	1,31	6,5	25,8
9	0,9719	0,5920	0,0588	3,3696	4,93	1,31	2,8	31,3
10	0,9810	0,5923	0,0205	3,3889	4,98	1,32	1,0	35,2
11	0,9785	0,5930	0,0000	3,4331	4,95	1,31	0,0	37,8

III.3 EFEITO DA FORÇA IÔNICA EM SISTEMAS CONTENDO DNA, AA E AM

Foram utilizadas as soluções de: DNA (64,3mg/25mL), AM ($3,2 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹), AA ($2,8 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) e tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 7,0, utilizando fosfato monobásico de sódio (0,2 mol.L⁻¹) e fosfato dibásico de potássio (0,2 mol.L⁻¹)).

A partir destas soluções foram preparadas outras três utilizando os volumes indicados na TABELA III.3.1. De cada uma delas foram retiradas 6 alíquotas de 5mL, às quais foram adicionadas as seguintes massas de NaCl: 0; 0,03; 0,15; 0,28; 0,57 e 1,11g.

A concentração final de fosfato foi $\approx 4,8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

TABELA III.3.1 Volumes (mL) das soluções estoque.

Sistema	Sol. DNA	H ₂ O	Tampão	Sol. AA	Sol. AM
DNA	3,2	32,0	0,5	0,0	0,0
DNA/AA	3,2	16,3	0,5	16,5	0,0
DNA/AA/AM	3,2	16,3	0,5	8,5	8,0

III.4 PLANEJAMENTO FATORIAL COM AS VARIÁVEIS: [AA], R E [NaCl]

Das soluções de AA ($9,1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e DNA ($[S_{\text{DNA}}] = 1,08 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), tamponadas em pH 7, foram preparadas outras cujas variáveis [AA], $[S_{\text{DNA}}]$ e [NaCl], obedecem os níveis - e +, com as seguintes concentrações: [AA]=3,0 e $0,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; R= 10 e 20 e [NaCl]=0 e 0,5 mol.L^{-1} . Desta última solução foram retiradas alíquotas de 5mL e adicionadas 0,1425g de NaCl de modo que a concentração do sal $= 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

III.5 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO EM SOLUÇÕES CONTENDO AA

A) Da solução estoque ($[AA] = 5,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) tamponada em pH 7, foram retiradas três alíquotas de 25, 5 e 5mL e colocadas em balões de 50, 10 e 10mL, respectivamente. Aos balões de 10mL foram adicionadas 0,1006 e 0,4972g de GuCl, respectivamente, e em seguida completados os volumes, com água bi-distilada.

B) De cada balão de 10mL foi retirada uma alíquota de 1mL, colocada em balão de 10mL e seu volume completado com a solução contida no balão de 50mL.

C) Mais uma diluição foi feita seguindo o procedimento anterior. Entretanto, desta vez foram utilizadas as soluções mencionadas em B. Portanto, foram obtidas soluções cujas concentrações de GuCl são de 10 e 100 vezes menores em relação à inicial, e uma sétima solução sem GuCl.

D) Por último foram preparadas duas soluções com GuCl ($0,7$ e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e com as mesmas [AA] que as anteriores.

III.6 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO NO SISTEMA DNA/AA/AM

Nesta seção foram preparados dois conjuntos de soluções: no primeiro utilizou-se uma solução estoque de 64,3mg de DNA em 25mL de água bi-distilada.

As soluções estoque dos corantes foram preparadas em água bi-distilada, pesando-se 0,273mg de AM para 50mL e 0,335mg de AA para 100mL.

Utilizando estas soluções preparou-se três novas soluções. As massas de cada solução estoque utilizada estão indicadas na TABELA III.6.1.

TABELA III.6.1 Massas (g) das soluções estoque.

Sol.	DNA	AA	AM	Tampão	Água
DNA	3,2017			0,5088	31,9498
DNA/AA	3,1978	16,4777		0,4982	16,4664
DNA/AA/AM	3,1829	8,5219	8,0147	0,5042	16,3260

Estas soluções foram mantidas durante 24h a 5°C. De cada uma delas foram extraídas 6 alíquotas de 5mL e cada alíquota foi colocada em balão de 10mL, aos quais foi adicionada a massa de GuCl indicada na TABELA III.6.2.

TABELA III.6.2 Massas (g) de GuCl.

Soluções	DNA	DNA/AA	DNA/AA/AM
1	0,0	0,0	0,0
2	0,0559	0,0560	0,0470
3	0,2612	0,2579	0,2560
4	0,5305	0,5413	0,5091
5	0,9791	0,9800	0,9993
6	1,9609	1,9037	1,8893

No segundo conjunto preparou-se soluções contendo DNA/AA/AM e DNA/AA. Esta última foi utilizada para verificar o comportamento do AA na ausência do acceptor de energia. Para a solução contendo DNA/AA/AM pesou-se 13,9mg de DNA em 10mL de água bi-distilada, retirou-se 9,5mL ($[P_{DNA}] = 4,3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e adicionou-se em 50mL de uma solução tamponada ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ tampão fosfato) de AA ($5,9 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e AM ($6,7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

Para a solução contendo DNA/AA foi utilizada uma solução de DNA com 13,6mg de DNA em 10mL de água bi-distilada e a solução estoque de AA ($1,76 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), sendo usados os volumes 7,5; 12,0; 3,8 e 14,8mL de soluções de DNA, AA, tampão e água, respectivamente. As concentrações finais de P_{DNA} e AA são, $4,7 \times 10^{-4}$ e $5,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Todas essas soluções foram mantidas a 5°C, durante 24h. Em seguida foram retiradas alíquotas de 4,5mL da solução contendo DNA/AA/AM e 5,0mL da de DNA/AA. A cada uma destas foi adicionada a massa de GuCl expressa na TABELA III.6.3. Os cuidados de homogeneização e estocagem são iguais aos já descritos.

TABELA III.6.3 Massas (g) de GuCl.

Soluções	DNA/AA/AM	DNA/AA
1	0,0	0,0
2	0,0385	0,0384
3	0,153	0,1325
4	0,229	0,226
5	0,353	0,458
6	0,468	0,714
7	0,600	
8	0,718	
9	0,935	

III.7 EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AM

Das soluções estoque ($[P_{DNA}] = 1,8 \times 10^{-3}$, $[AM] = 2,5 \times 10^{-5}$ e $[tampão] = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) foram retirados 2,3mL de solução de DNA, 4,0mL de solução de AM e 0,5mL de solução tampão e colocados um balão de 10,0mL, completando o volume com água bi-destilada, mantidas em 5°C, por 24h antes de se obter os espectros.

III.8 EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA

Foram adicionados, em um balão, 9,2mL de uma solução de DNA ($[P_{DNA}] = 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$); 16,4mL de uma solução de AA ($2,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$); 0,5mL de tampão e 10mL de água bi-destilada. Esta solução foi mantida a 5°C, por 24h antes de sua utilização.

III.9 EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA/AM

Das soluções estoque de DNA ($[P_{DNA}] = 1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$); AA ($2,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e AM ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) foram utilizados 6,4; 5,7 e 5,3mL, respectivamente. Em seguida, adicionou-se 1mL de tampão e o volume final elevado a 25mL com água bi-destilada. Como as demais soluções ela foi estocada a 5°C, por 24h.

III.10 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO E DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA

Foram retiradas duas alíquotas de 5mL da solução mencionada em III.8, às quais foram adicionados 0,2438g e 1,0014g de GuCl, sendo mantidas a 5°C, durante 48h.

III.11 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO E DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA/AM

Foram colocados 0,4886g de GuCl em um balão de 10mL e o volume completado com a solução mencionada em III.9, mantida a 5°C.

III.12 DESNATURAÇÃO DO DNA PELA TEMPERATURA EM PRESENÇA DE GUCL

Das soluções estoque: DNA ($[P_{DNA}] = 9,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), tampão, GuCl ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) e NaCl ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$), foram retiradas as alíquotas (indicadas na TABELA III.12.1) e os volumes completados para 10mL.

TABELA III.12.1 Volumes utilizados (mL) das soluções estoque.

Solução	DNA	Tampão	GuCl	NaCl
1	0,5	1,0	0,0	1,0
2	0,5	1,0	0,5	1,0
3	0,5	1,0	1,0	1,0
4	0,5	1,0	3,0	1,0
5	0,5	1,0	5,0	1,0

Além destas foram preparadas soluções cujas concentrações de GuCl são maiores que $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Estas possuíam os mesmos volumes de solução de DNA, tampão e NaCl e 0,955; 1,910 e 4,775g de desnaturante. Os volumes foram completados para 10mL.

III.13 INSTRUMENTAÇÃO

Foram utilizados os equipamentos: espectrofotômetros de arranjo de diodos, marca HP (modelo 8452 A) e Varian (modelo Cary 2300); espectrofluorímetros marca AMINCO (modelo SPF-500C) e PTI (modelo LS-100).

As FIGURAS III.13.1 e III.13.2 mostram o sistema de alta pressão.

Para aumentar a pressão fecha-se a válvula F2 e abre-se a F1, preenchendo o gerador de pressão (B) com etanol do reservatório (E); em seguida, fecha-se a válvula F1 e abre-se a F2, e através do pistão (C) permite-se um fluxo de etanol pela linha (D).

Após extravasar um dado volume de etanol, para expelir possíveis bolhas de ar existente na linha, conecta-se a linha (D) na câmara (A). Acoplado a câmara ao fluorímetro ou espectrofotômetro e movendo o pistão (C) aumenta-se a pressão da câmara (A)

Na FIGURA III.13.2 observa-se o esquema da câmara de pressão, provida de janelas de quartzo. A pressão é transmitida da linha para a solução dentro da cubeta (F) através do selador de polietileno (G).

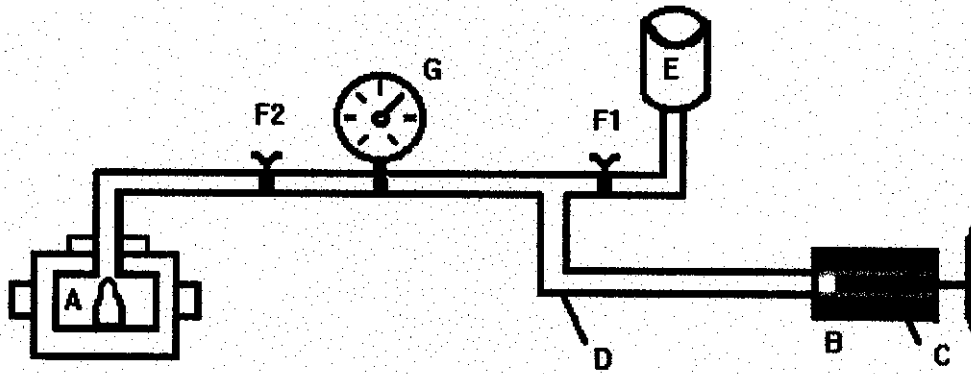


FIGURA III.13.1 Esquema do sistema de pressão hidrostática. Câmara (A), gerador de pressão (B), pistão do gerador (C), linha de etanol (D), reservatório de etanol (E), válvulas (F1 e F2) e manômetro (G).

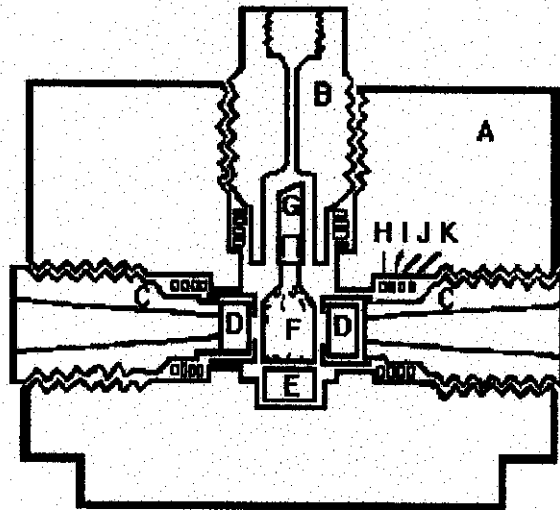


FIGURA III.13.2 Esquema da câmara de pressão. Câmara de pressão (A), entrada da linha de etanol (B), suporte que sustenta a janela de quartzo (C), janelas de quartzo (D), suporte para a cubeta (E), cubeta de quartzo (F), tubo de polietileno (selador da cubeta) (G), anel extrator (H) e anéis de vedação (I), (J) e (K).

Para a aquisição dos espectros de fluorescência o sistema de alta pressão foi acoplado ao fluorímetro através de dois cabos de fibra ótica de vidro e para obter os espectros de absorção a câmara foi colocada no compartimento de amostra do espectrofotômetro, sendo posicionada de modo a obter a melhor linha base (correspondendo a uma absorbância =0,4).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 INTERCALAÇÃO DE AM EM DNA

Na FIGURA IV.1.1 são mostrados os espectros de absorção na região do UV. Aumentando a concentração de DNA, observa-se que o AM tem menor absorbância na região onde a de DNA é máxima.

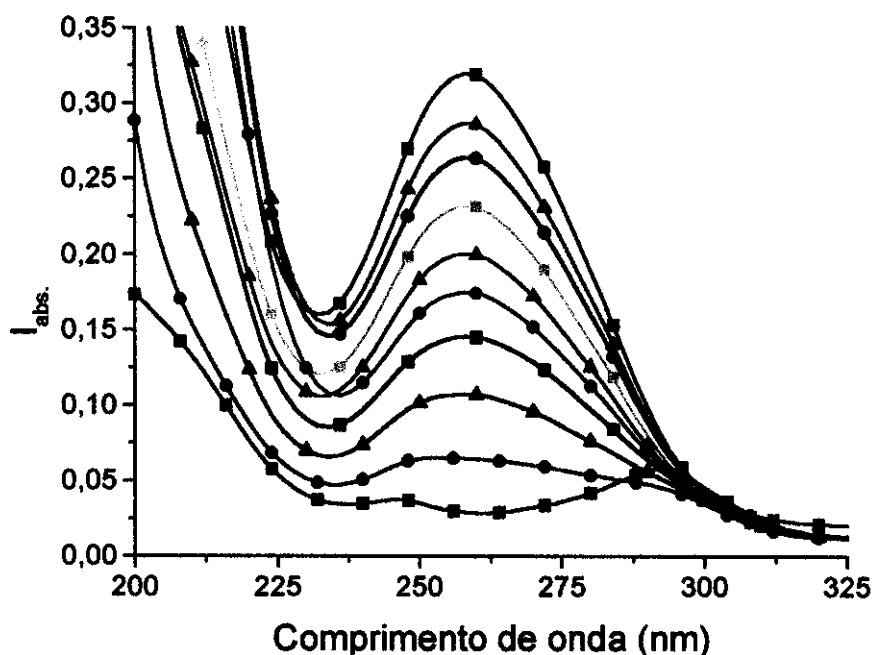


FIGURA IV.1.1 Espectros de absorção das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 6,5; \blacktriangle 10,7; \blacksquare 15,1; \bullet 21,7; \blacktriangle 25,3; \circledast 30,0; \bullet 35,0; \blacktriangle 38,5$ e $\blacksquare 43,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A FIGURA IV.1.2 mostra as alterações nos espectros de AM com adição de DNA. Ocorrem variações na intensidade de absorção superiores ao erro estimado (3,0%). Contudo, há dois conjuntos de espectros com máximos de absorção em 674 e outro em 669nm e valores médios na I_{abs} máxima igual a $0,0720 \pm 0,0013$ ($\bullet 21,7; \blacktriangle 25,3; \circledast 30,0; \bullet 35,0; \blacktriangle 38,5$ e $\blacksquare 43,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e $0,0676 \pm 0,0007$ ($\bullet 6,5; \blacktriangle 10,7$ e $\blacksquare 15,1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), respectivamente.

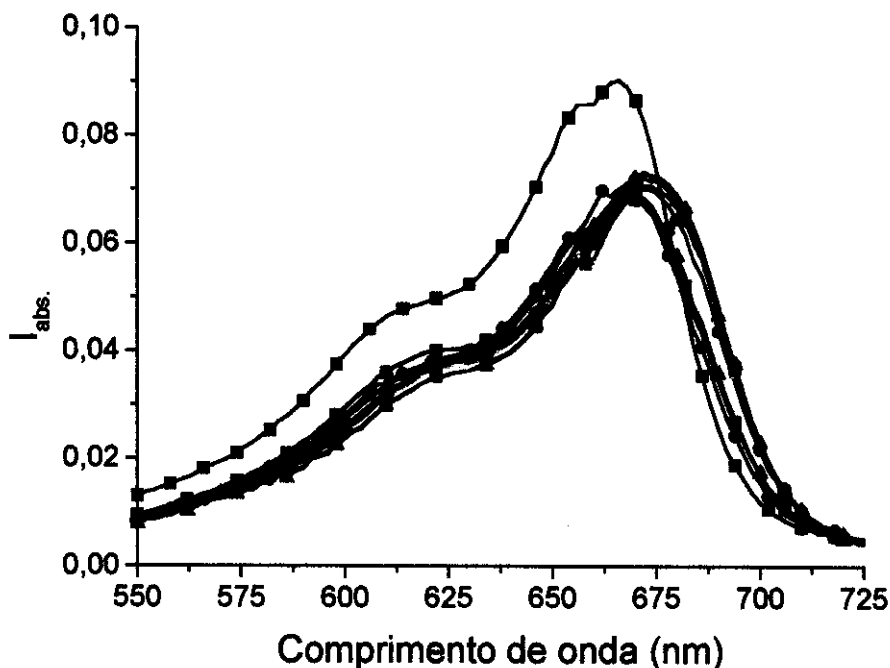


FIGURA IV.1.2 Espectros de absorção das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 6,5; \blacktriangle 10,7; \blacksquare 15,1; \bullet 21,7; \blacktriangle 25,3; \blacklozenge 30,0; \bullet 35,0; \blacktriangle 38,5$ e $\blacksquare 43,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Segundo Kelly³¹, o AM apresenta diferença nos espectros de absorção conforme esteja intercalado entre pares de bases AT-AT ou CG-CG. Quando entre AT-AT ele possui um deslocamento para o vermelho igual a 6nm, em relação ao corante em solução aquosa, e uma redução na intensidade de absorção igual a 23%. Quando entre CG-CG o deslocamento é igual a 9,5nm e a redução em I_{abs} é 26%. Como o DNA utilizado possui ambos os sítios de intercalação espera-se que haja variação no espectro de absorção de acordo com o sítio no qual o corante se encontra.

Assim, os resultados mostrados na FIGURA IV.1.2 indicam que para concentrações pequenas de DNA ($\bullet 6,5; \blacktriangle 10,7$ e $\blacksquare 15,1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) o corante AM se encontra intercalado nos sítios AT-AT, CG-CG e/ou CG-AT havendo um deslocamento para o vermelho que se acentua com o aumento na $[DNA]$, sugerindo uma intercalação preferencial das moléculas de AM nos sítios CG-CG.

Os espectros mostrados nas FIGURAS IV.1.3 e IV.1.4 são, respectivamente, de excitação e emissão desse corante. As intensidades de emissão decaem com aumento na $[DNA]$, indicando intercalação da sonda em regiões ricas em pares CG.

Um dos processos supressores de fluorescência é a transferência de elétrons. Seidel³² propôs que estes processos podem ocorrer em derivados de cumarina, existindo dois caminhos de desativação: subtraindo-se um elétron dos orbitais mais energéticos (oxidação) ou doando um elétron aos orbitais menos energéticos (redução), ambos para a molécula excitada.

Segundo este autor, um, outro ou ambos os mecanismos são operantes para sistemas contendo cumarina/nucleosídeo ou nucleotídeo. Em princípio, este processo poderia ser considerado também para moléculas de outras substâncias, incluindo azul de metileno.

Os estudos realizados por Kelly³¹, entretanto, mostraram que a supressão de fluorescência de AM é devido a regiões ricas em pares de bases CG, mas não em regiões contendo AT. Este autor não verificou a formação de produtos referentes à redução de AM singlete, indicando que a supressão não se deve a processos de oxi-redução.

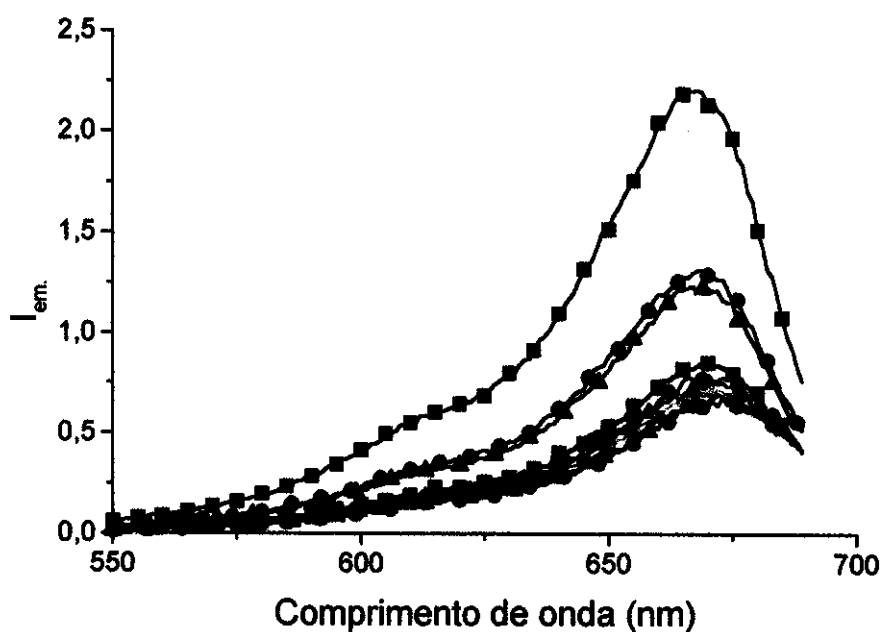


FIGURA IV.1.3 Espectros de excitação ($\lambda_{em} = 690\text{nm}$) das soluções contendo DNA e AM. $[\text{AM}] = 9,4 \times 10^{-7} \text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{P}_{\text{DNA}}] = \blacksquare 0,0; \bullet 10,7; \blacktriangle 15,1; \blacksquare 21,7; \bullet 25,3; \blacktriangle 30,0; \text{⊗} 35,0; \bullet 38,5$ e $\blacktriangle 43,3 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$.

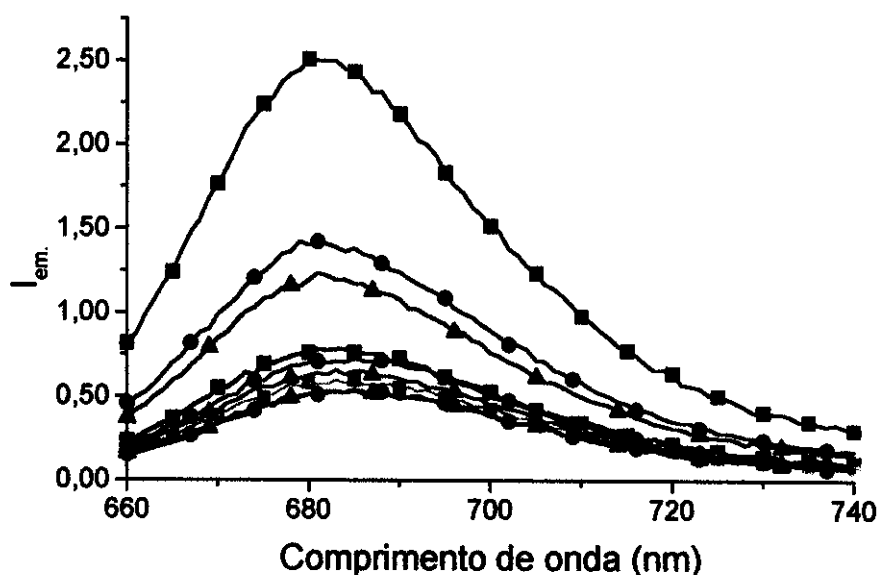


FIGURA IV.1.4 Espectros de emissão ($\lambda_{exc.} = 650\text{nm}$) das soluções contendo DNA e AM. $[AM]=9,4 \times 10^{-7}\text{mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] = \blacksquare 0,0; \bullet 10,7; \blacktriangle 15,1; \blacksquare 21,7; \bullet 25,3; \blacktriangle 30,0; \bullet 35,0; \bullet 38,5$ e $\blacktriangle 43,3 \times 10^{-5}\text{mol.L}^{-1}$.

Assim, os resultados indicam que a desativação das moléculas AM ocorre no estado excitado singlete via relaxação vibracional. Possivelmente ao sofrer intercalação este corante interage via pontes de hidrogênio com o grupo amino da guanina. Esta interação além de alterar o momento de dipolo ativa os modos de vibração do corante, via um acoplamento destes com os modos vibracionais do DNA.

Outro mecanismo que pode atuar é uma distorção conformacional no local do sítio de intercalação, a qual deixaria a sonda com um grau de liberdade maior que o observado em solução aquosa acentuando a desativação vibracional.

Independente do mecanismo a diferença no comportamento da emissão do corante AM e AA parece residir em suas características estruturais (FIGURA IV.1.5). O AA ao intercalar não possui nenhum hétero-átomo inserido no sítio de intercalação, enquanto o AM possui um átomo de nitrogênio que se encontra próximo das bases nitrogenadas. O átomo inserido na cavidade pode favorecer ou dificultar os processos de supressão de fluorescência.

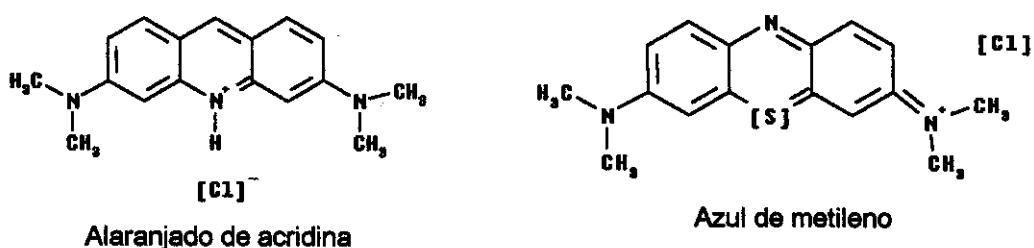


FIGURA IV.1.5 Fórmulas estruturais dos cloridratos de AA e AM.

Como neste trabalho o AM foi utilizado como acceptor de energia e não doador, a supressão de sua fluorescência não é crítica. Este corante foi escolhido devido à sobreposição de seu espectro de absorção com o de emissão do doador (AA). Além disso sua semelhança estrutural com o AA poderia favorecer a intercalação do AM em sítios semelhantes aos se encontra o AA.

IV.2 TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ENTRE AA E AM INTERCALADOS EM DNA

Os espectros de absorção (espectro mais intenso na cor vinho) e emissão (espectro mais intenso na cor verde) de cada solução contendo DNA e os corantes AA e AM são mostrados na FIGURA IV.2.1. Estes espectros foram obtidos para soluções com diferentes concentrações de AM, de modo a reduzir o número de sítios de intercalação que não se encontram ocupados. Para cada cor atribuída a um espectro de absorção há um correspondente na mesma cor para o espectro de emissão do AA. Observa-se que à medida em que aumenta a [AM] diminui a intensidade de emissão de AA, indicando um processo de transferência de energia.

Usui e Gotou³³, utilizando como doador o brometo de 10-dodecil-AA e como acceptor o AM, verificaram uma supressão na intensidade de fluorescência do doador com o aumento na [AM] em meio micelar (semelhante à observada na FIGURA IV.2.1), a qual foi atribuída à transferência de energia por interação dipolar.

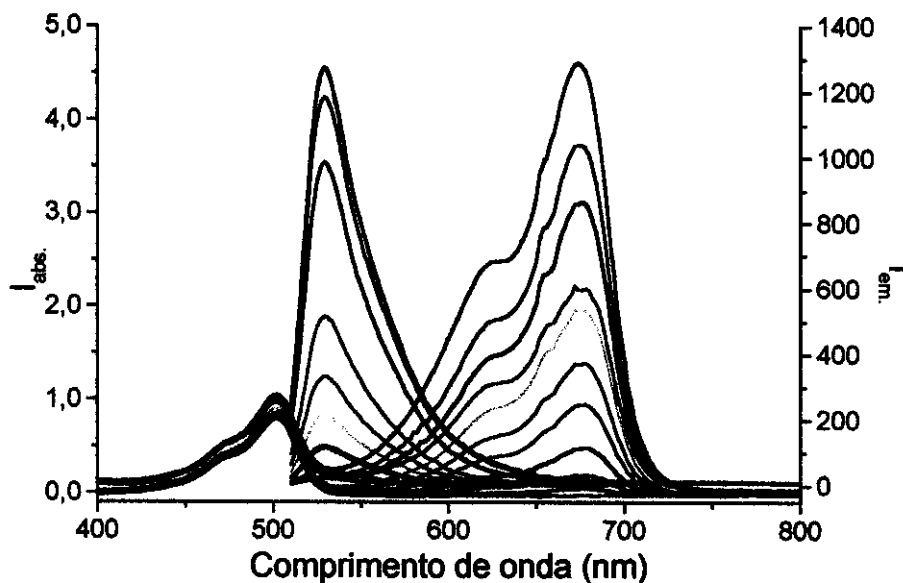


FIGURA IV.2.1 Espectros de absorção das soluções de DNA, AA e AM, I_{abs} máxima do AA=504nm e I_{abs} máxima do AM=670nm e I_{em} máxima do AA=530nm.

$[S_{DNA}] = 5,73 \pm 0,05 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[AA] = 1,31 \pm 0,01 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[AM] =$ —0; —0,10; —0,28; —0,65; —1,29; —1,91; 2,75; —3,40; —4,33; —5,47; — $7,42 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

A FIGURA IV.2.2 mostra a área sob a banda de emissão (entre 510 e 650nm) em função de R para as soluções mencionadas e a FIGURA IV.2.3 ilustra o decaimento temporal de I_{em} para algumas soluções utilizadas neste experimento.

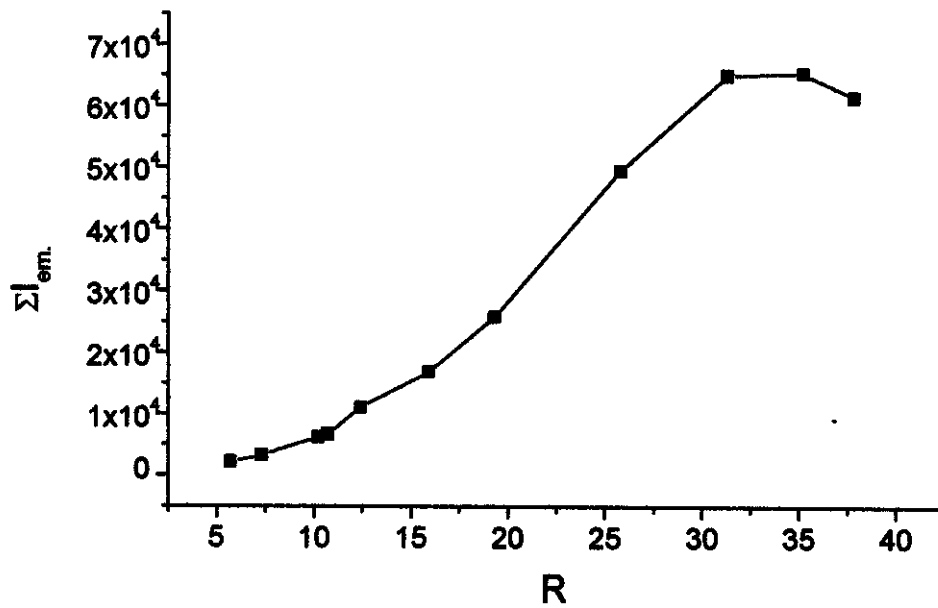


FIGURA IV.2.2 Área sob a banda de emissão em função de R.

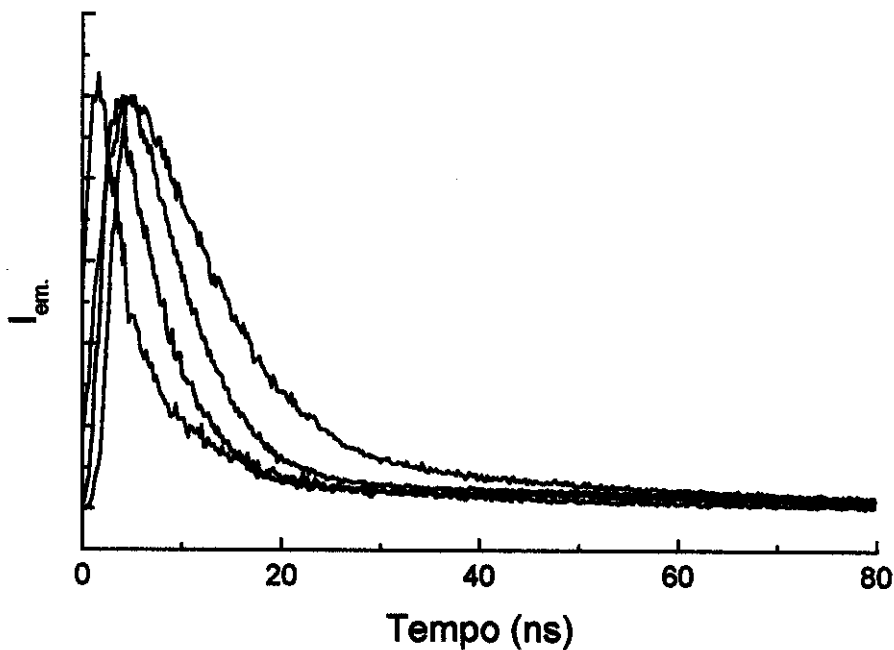


FIGURA IV.2.3 Curvas de decaimento temporal de fluorescência para as soluções DNA/AA (—); DNA/AA/AM com R= (—) 15,9 e (—) 9,9 e (—) para a lâmpada de N₂.

O tratamento mono-exponencial dessas curvas, forneceu o tempo de vida médio (média dos tempos de vida $-\tau-$ obtidos com os vários tratamentos em diferentes intervalos

temporais) e de seus desvios (TABELA IV.2.1). O valor de τ obtido para a solução que contém apenas AA e DNA ($R=37,8$) está próximo ao conseguido por Kubota³⁴ (5,2ns). Este valor é diferente daquele para a sonda em solução aquosa sem DNA, $1,81\pm 0,09$ ns (o valor estimado por Kubota³⁵ é 1,7ns). Os valores mostrados na TABELA IV.2.1 indicam uma redução no tempo de vida. Este resultado, juntamente com os valores de $I_{em.}$, reforça a suposição sobre a transferência não radiativa de energia. O menor valor do tempo de vida é inferior ao observado para a sonda em meio aquoso, o que descarta a possibilidade de uma desintercalação da sonda pois, caso isto ocorresse, deveria haver uma estabilização de τ ao redor de 1,8ns (valor correspondente ao tempo dela livre, em solução aquosa).

TABELA IV.2.1 Tempos de vida (τ , ns).

R	τ
5,7	$1,38\pm 0,12$
7,3	$1,78\pm 0,08$
9,9	$2,06\pm 0,04$
10,7	$2,50\pm 0,11$
12,4	$3,17\pm 0,12$
15,9	$3,49\pm 0,16$
19,3	$4,19\pm 0,08$
25,8	$4,78\pm 0,12$
31,3	$5,01\pm 0,06$
35,2	$5,07\pm 0,05$
37,8	$5,01\pm 0,05$

Para as soluções contendo o doador e acceptor sem DNA em concentrações próximas à agregação de ambos os corantes (1×10^{-5} mol.L⁻¹) não se verifica variação no tempo de vida do doador, indicando que a interação dipolar entre este e o acceptor não ocorre nestas condições. Assim, o DNA causa um efeito de aproximação entre eles, viabilizando a interação dipolar.

A FIGURA IV.2.4 compara valores da eficiência de transferência de energia (E_t) calculada através de τ e das integrais (áreas) da intensidade de emissão. Elas não possuem o mesmo comportamento, o que pode ser atribuído aos diferentes processos de transferência de energia que estão ocorrendo³⁶. Quando se considera τ existe apenas a transferência não radiativa de energia (via interação entre dipolos), enquanto que ao usar as áreas estão incluídas a transferência não radiativa e radiativa (relacionada à sobreposição dos espectros de absorção do acceptor e emissão do doador), havendo um decaimento mais acentuado para $R>20$.

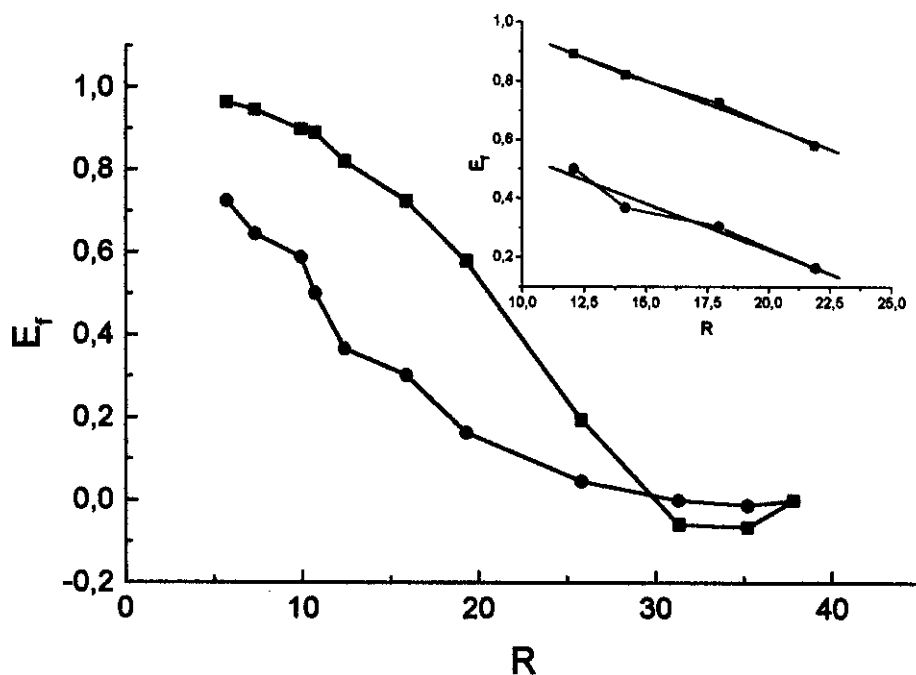


FIGURA IV.2.4 Eficiências da transferência de energia obtidas através do tempo de vida (τ - ●) e da intensidade de emissão (I_{em} - ■) versus R.

Os coeficientes angulares das retas ajustadas a essas curvas, para R entre 12 e 22 (gráfico menor), são semelhantes ($-0,032 \pm 0,005$ e $-0,031 \pm 0,002$, considerando τ e as áreas, respectivamente).

A FIGURA IV.2.5 mostra a sobreposição dos espectros de emissão de AA e de absorção de AM ambos normalizados (que permite calcular o valor da integral de recobrimento, $J(\lambda) = 6,07 \pm 0,34 \times 10^{-14} \text{ cm}^6/\text{mol}$) para [AM] constante e três concentrações de fosfato do DNA ($15,1$; $21,7$ e $25,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Utilizando ν em cm^{-1} , o valor de 1,4 para o índice de refração (valor obtido para o RNA), $K^2 = 2/3$ e um rendimento quântico médio $= 0,75$, a distância crítica (R_0) média calculada é $43,7 \pm 0,40 \text{ \AA}$.

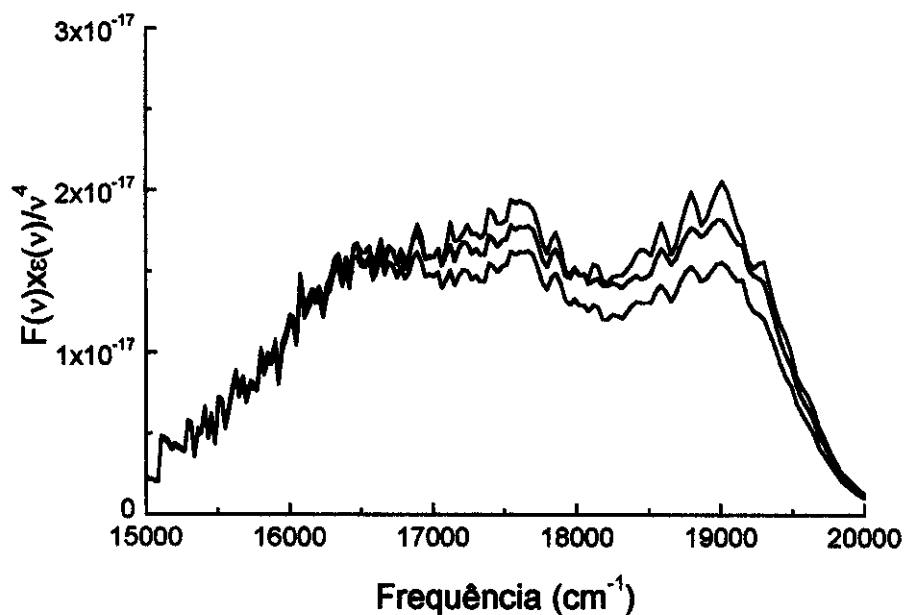


FIGURA IV.2.5 Sobreposição dos espectros de emissão de AA e de absorção de AM, normalizados.

R_0 é a distância para a qual o rendimento quântico de emissão do doador é reduzido pela metade quando na presença do aceptor. Quanto maior a interação dipolar maior será R_0 e, conseqüentemente, maior a distância entre o doador e aceptor. Todavia, tendo uma distância crítica fixa (44\AA) a transferência não radiativa de energia só ocorrerá quando a separação entre o doador e aceptor for inferior a $2R_0$ (88\AA). Este valor corresponde a 26,5 pares de bases, próximo do observado experimentalmente ($R < 30$, FIGURA IV.2.4).

IV.3 EFEITO DA FORÇA IÔNICA EM SISTEMAS CONTENDO DNA, AA E AM

A adição de sais inorgânicos causa alterações na estrutura do DNA^{37,38}, permitindo transições entre famílias (B→C e/ou B→Z).

A FIGURA IV.3.1 mostra os espectros de absorção de soluções contendo apenas DNA, com diferentes forças iônicas. As alterações espectrais, quando se adiciona NaCl são reprodutíveis, ocorrendo uma diminuição (8%) da intensidade da banda de absorção em 260nm quando se varia a concentração do NaCl de 0 para 4,0mol.L⁻¹.

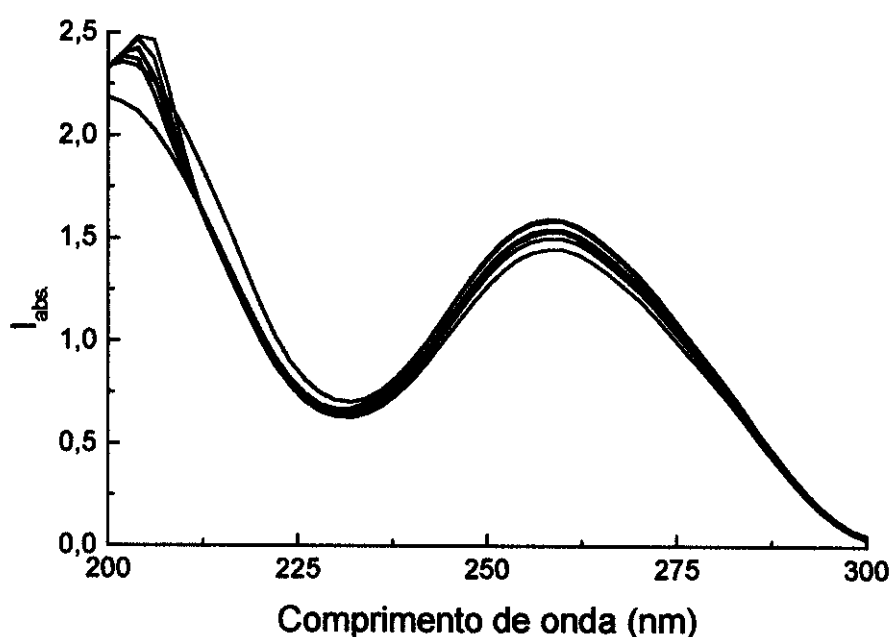


FIGURA IV.3.1 Espectros de absorção das soluções contendo DNA.

[S_{DNA}]=2,4x10⁻⁴mol.L⁻¹ ; [NaCl]= —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0mol.L⁻¹.

No gráfico maior da FIGURA IV.3.2 observa-se que a variação na [NaCl] altera a intensidade da banda de absorção de AA. O gráfico menor mostra pequena variação do máximo de absorção, insuficiente para indicar de maneira conclusiva que existe desintercalação total do AA, uma vez que este, quando livre e não agregado, em solução exibe máximo de absorção em 492nm.

Entretanto, um indicativo de que o AA está sofrendo desintercalação é dado pelo rendimento quântico, cujo valor diminui de 0,75 (quando intercalado) para 0,25 (monômero não intercalado) ou para zero (na forma de agregados).

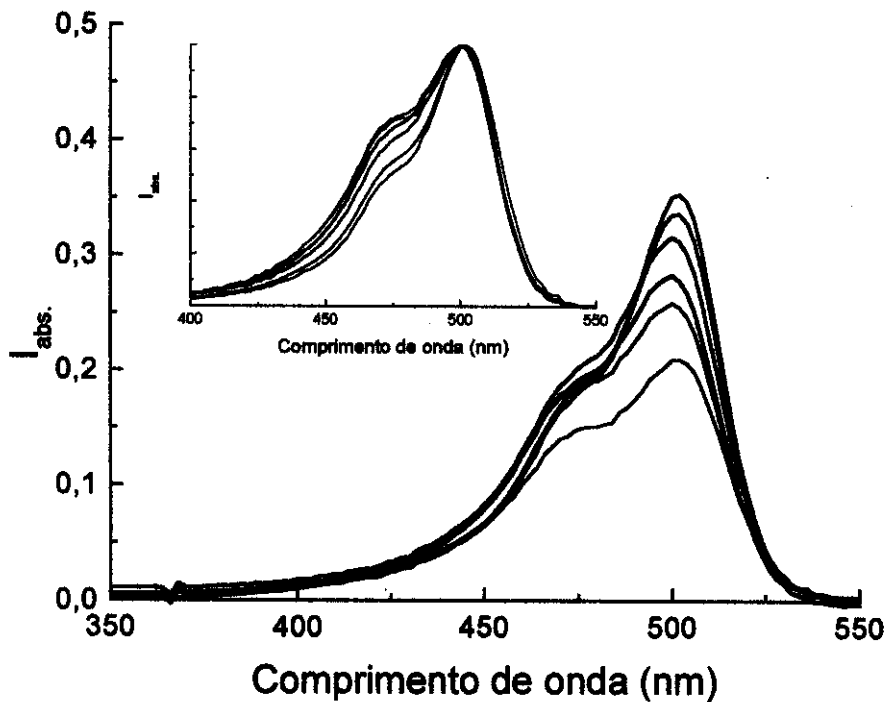


FIGURA IV.3.2 Espectros de absorção das soluções DNA/AA em unidades de absorvância (maior) e normalizado (menor). $R=19,0$; $[AA]=1,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $[NaCl]=0,0; -0,1; -0,5; -1,0; -2,0$ e $-4,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

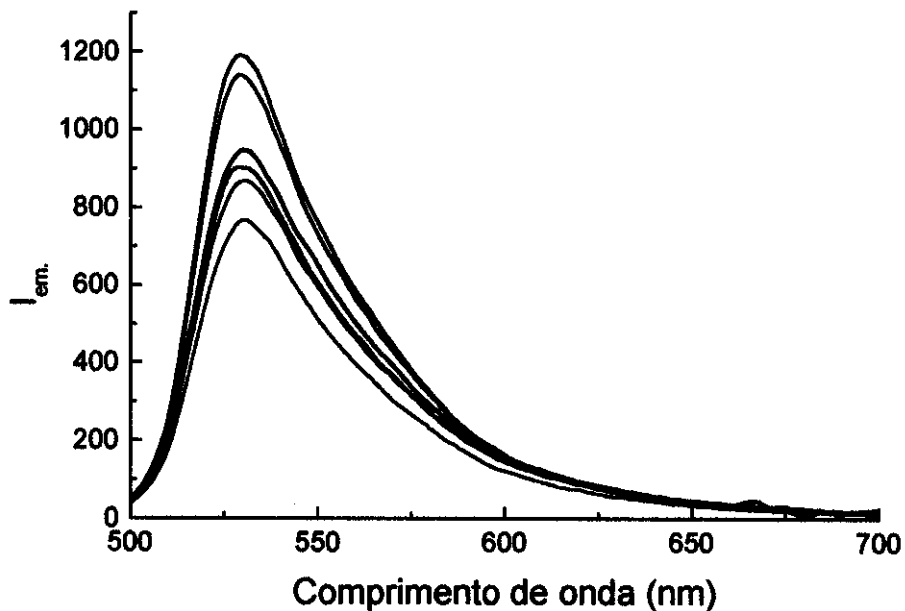


FIGURA IV.3.3 Espectros de emissão das soluções DNA/AA com diferentes $[NaCl]$: $-0,0; -0,1; -0,5; -1,0; -2,0$ e $-4,0 \text{ mol.L}^{-1}$, $R=19,0$ e $[AA]=1,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Os espectros de emissão de AA no sistema DNA/AA variando-se a [NaCl] são mostrados na FIGURA IV.3.3. A TABELA IV.3.1 apresenta os valores das áreas sob o espectro de emissão (500 a 700nm) divididos pelas intensidades de absorção obtidas em 490nm ($\lambda_{exc.}$).

TABELA IV.3.1 Áreas sob as bandas de emissão normalizadas pela intensidade de absorção em 490nm.

[NaCl] (mol.L ⁻¹)	$\Sigma I_{em.}$	$I_{abs.}(490nm)$	$\Sigma I_{em.}/I_{abs.}$
0,0	63158	0,239	$2,6 \times 10^5$
0,1	61355	0,258	$2,4 \times 10^5$
0,5	51486	0,243	$2,1 \times 10^5$
1,0	54431	0,229	$2,4 \times 10^5$
2,0	50080	0,205	$2,4 \times 10^5$
4,0	43219	0,155	$2,8 \times 10^5$

Observa-se que os valores de $\Sigma I_{em.}/I_{abs.}$ diminuem, atingindo um valor mínimo para a solução com 0,5mol.L⁻¹ de NaCl e, em seguida, aumentam com a concentração deste sal. Se existisse a desintercalação e agregação deveria ocorrer uma redução contínua na intensidade do espectro de emissão com aumento da [NaCl], até uma diminuição para 1/3 do valor inicial ou supressão total, fornecendo os valores da intensidade de emissão do AA livre e agregado, respectivamente.

As variações nas intensidades de absorção são atribuídas a uma desintercalação e posterior agregação parcial, alterando a razão na intensidade de absorção I_{470}/I_{492} e reduzindo a de emissão. Porém, a intensidade normalizada pela absorção não é reduzida acentuadamente, indicando que a espécie emissora está preferencialmente intercalada e não livre.

Robinson⁹ estudou a agregação de AA em solução aquosa e calculou que seu coeficiente de extinção molar, para agregados com elevada massa molar, é reduzido de 60.000mol⁻¹.L.cm⁻¹ (monômero) para ≈ 6500 mol⁻¹.L.cm⁻¹ (agregado) em 492nm. Foi, também, estimado que o máximo de absorção desses agregados ocorre em ≈ 450 nm ($\epsilon \approx 23.000$ mol⁻¹.L.cm⁻¹).

Assim, as alterações nos espectros de absorção do AA com a variação da força iônica se devem à desintercalação e agregação do AA, formando duas espécies em solução: uma agregada, responsável pela redução na intensidade de absorção em ≈ 505 nm e aumento da mesma intensidade em ≈ 460 nm e uma segunda, que permanece intercalada no DNA, com máximo em 505nm. As alterações nas intensidades de emissão normalizadas pela absorção são pequenas, já que o agregado absorve pouco no comprimento de onda de excitação

($6500\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$) e não emite, fornecendo os valores de $\Sigma I_{\text{em.}}/I_{\text{abs.}}$ (TABELA IV.3.1) que se devem, preferencialmente, à espécie não agregada e intercalada do AA.

A FIGURA IV.3.4 mostra as curvas de decaimento temporal para o sistema DNA/AA com diferentes $[\text{NaCl}]$. Foi utilizado tratamento mono-exponencial para a obtenção do tempo de vida do AA, cujos valores estão na TABELA IV.3.2.

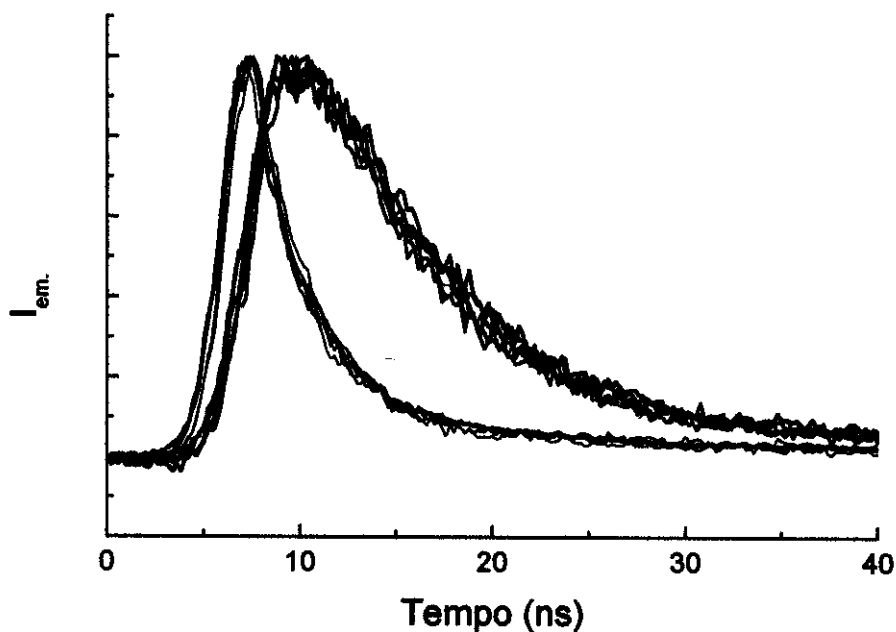


FIGURA IV.3.4 Curvas de decaimento temporal das soluções DNA/AA com diferentes $[\text{NaCl}]$: —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e para a lâmpada de N_2 (em preto). $R=19,0$ e $[\text{AA}]=1,2\times 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

TABELA IV.3.2 Tempos de vida (τ , ns) obtidos para os sistemas DNA/AA em diferentes $[\text{NaCl}]$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

$[\text{NaCl}]$	τ
0,0	$4,70\pm 0,10$
0,1	$4,69\pm 0,30$
0,5	$4,48\pm 0,28$
1,0	$4,33\pm 0,11$
2,0	$4,60\pm 0,13$
4,0	$4,71\pm 0,11$

A tendência do tempo de vida é a mesma observada quando ele é calculado através dos espectros de emissão. Porém, a variação entre esses valores foi <8,5%, inferior à observada quando se usa as intensidades de emissão. A agregação praticamente não altera os valores de τ pois a única espécie emissora é o AA intercalado, cuja concentração é reduzida.

Observa-se na FIGURA IV.3.5 os espectros de absorção para o sistema DNA/AA/AM. O corante AM sofre profundas alterações em seu espectro de absorção, aparecendo uma nova banda com máximo de absorção em $\approx 610\text{nm}$. Estas alterações são semelhantes às observadas para o AA, mas menos intensas. Verifica-se que o deslocamento do máximo de absorção para o azul da espécie intercalada está entre 2 e 4nm para o AA e entre 6 e 8nm para o AM. Os deslocamentos, para o vermelho, das bandas espectrais dos corantes AA e AM ao sofrerem intercalação são de 10nm e 12nm, respectivamente. Estes resultados sugerem que as moléculas de AM ($[\text{AM}] = 5,7 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$) sofrem desintercalação (deslocamento de máximo) e agregam (formação da nova banda) mais facilmente que o AA, quando se altera a concentração do sal.

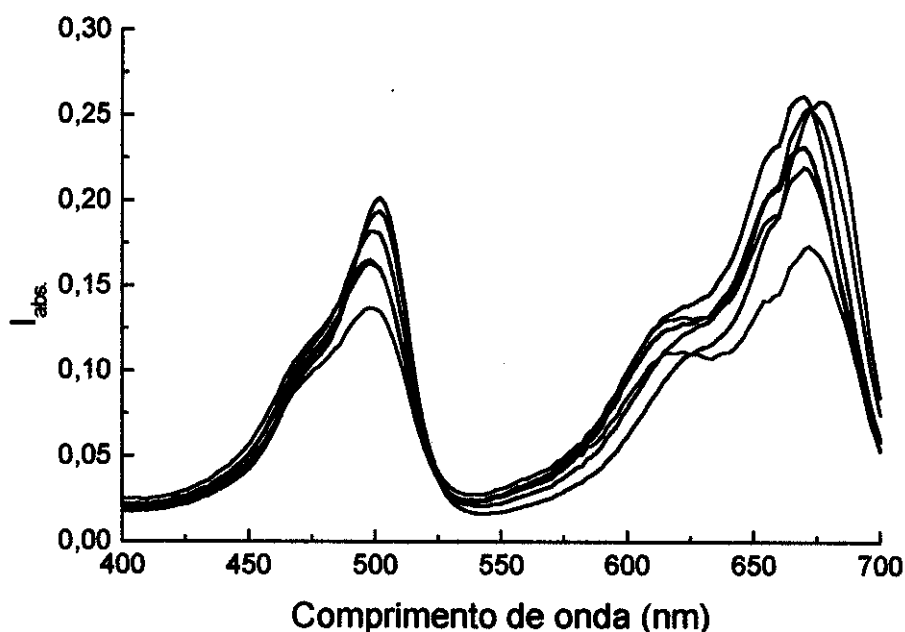


FIGURA IV.3.5 Espectros de absorção das soluções DNA/AA/AM com diferentes $[\text{NaCl}]$. $[\text{AA}] = 6,7 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$; $[\text{AM}] = 7,0 \times 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$; $[\text{S}_{\text{DNA}}] = 2,4 \times 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$; $R = 19,0$ e $[\text{NaCl}] = -0,0; -0,1; -0,5; -1,0; -2,0$ e $-4,0 \text{mol.L}^{-1}$.

A agregação observada para a sonda AM indica menor estabilidade em sua intercalação frente à adição de NaCl, a qual pode ser explicada em parte devido à estrutura molecular desse corante que possui o hétero-átomo inserido na cavidade do DNA aumentando a repulsão eletrostática e/ou estérica. Estes resultados mostram que interações específicas

entre o DNA e o AM (ligação de hidrogênio) não ocorrem, pois caso oposto a intercalação de AM seria mais estável que a de AA.

Como estes resultados excluem a possibilidade de que a sonda esteja sendo desativada vibracionalmente devido a uma interação específica com o DNA, parece que a hipótese de que a sonda intercalada possui liberdade vibracional maior que em solução aquosa é a mais provável. Assim, estas moléculas quando inseridas nos sítios de intercalação podem "sentir" esta cavidade de duas formas: a primeira, onde os modos de vibração (que levariam a uma supressão na fluorescência) são imobilizados, havendo um aumento no rendimento quântico de emissão ou uma segunda onde estas vibrações, devido a um volume livre ou existência de distorção dos sítios de intercalação, são ativadas levando a uma desativação vibracional do estado excitado.

A TABELA IV.3.3 resume os resultados obtidos por Kubota³⁹. Verifica-se que para derivados de acridina o aumento do tamanho e do número de grupos ligados aos anéis dos derivados de acridina aumenta o rendimento quântico da espécie intercalada. Segundo este modelo, a sonda ao intercalar na cavidade do DNA pode sofrer diferentes processos de relaxação (vibracional, transferência de elétrons, etc.) e, no caso dos derivados de acridina, parece haver uma relação entre o tamanho da sonda e o seu rendimento quântico, e uma diferença neste parâmetro quando a sonda está em diferentes sítios. Assim, estes derivados ao intercalarem preenchem e distorcem a cavidade de forma, alterando o volume livre. Quando este é grande, a sonda possui maior liberdade vibracional que a observada em solução aquosa, acentuando a supressão de fluorescência. Todavia, em contrapartida, a redução deste volume, devido à adição de grupos ao corante, reduz a vibração da sonda e acentua a intensidade de emissão. A intercalação da sonda entre pares CG, em geral reduz o rendimento quântico quando comparado ao intercalado entre pares AT. Isto talvez se deve à rigidez da cavidade pois, no caso, a cavidade contendo CG/CG e CG/AT possui uma rigidez maior que aquela contendo AT/AT. Exceções podem existir desde que a sonda possua uma estrutura propícia que se acomode de forma diferente nos sítios CG/CG, CG/AT e AT/AT.

TABELA IV.3.3 Rendimentos quânticos de alguns derivados de acridina em solução aquosa, intercalados entre pares de bases CG/CG, AT/AT, AT/CG e DNA

Corante	ϕ_{DNA}	$\phi_{CG/CG}$	$\phi_{AT/CG}$	$\phi_{AT/AT}$	Sol. Aquosa
9 amino acridina	$\cong 0,01$	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	0,98
AcNH ₂	0,07	<0,01	$\cong 0$	0,22	0,21
10 metil acridinium	<0,01	$\cong 0$	$\cong 0$	$\cong 0$	1,0
Ac[NH ₂] ₂	0,15	$\cong 0,01$	$\cong 0$	0,47	0,44
AcNMe ₂	0,12				0,13
Ac[NHMe] ₂	0,57				0,73
Ac[NH ₂ t] ₂	0,57				0,74
Ac[NMe ₂] ₂	0,75	0,81	0,70	0,77	0,25
Ac[NEt ₂] ₂	0,63				0,15

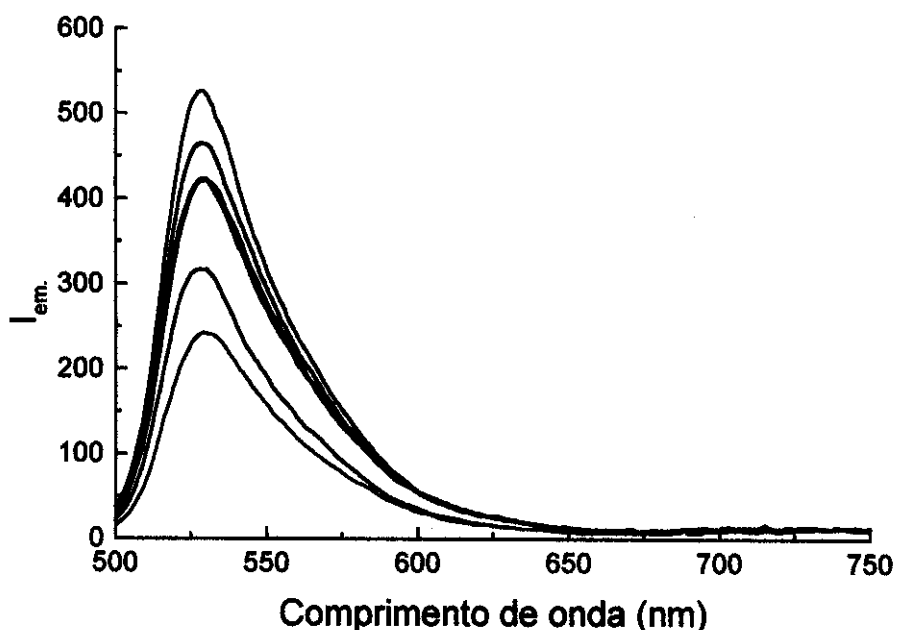


FIGURA IV.3.6 Espectros de emissão para as soluções DNA/AA/AM, com diferentes [NaCl]: —0,0; —0,1; —0,5; —1,0; —2,0 e —4,0 mol.L⁻¹ e R=19,0

Para o sistema DNA/AA/AM a intensidade de emissão aumenta com a [NaCl] (FIGURA IV.3.6), a qual está associada a separação entre *D* e *A*, causada pela variação na conformação do DNA e/ou pela desintercalação/agregação das sondas. Em princípio, os resultados mostrados na TABELA IV.3.4 indicam uma diminuição na eficiência de transferência de energia para as soluções com [NaCl] $\approx 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e, para aquelas com [NaCl] maiores, um aumento nesse parâmetro.

TABELA IV.3.4 Áreas sob o espectro de emissão ($\Sigma I_{em.}$), razão entre a área sob o espectro de emissão e a intensidade de absorção a 490nm ($\Sigma I_{em.}/I_{abs.}$) e a eficiência de transferência de energia para o sistema DNA/AA/AM em diferentes [NaCl] (mol.L⁻¹).

[NaCl]	$\Sigma I_{em.}$	$I_{abs.}$ em 490nm	$\Sigma I_{em.}/I_{abs.}$	Eficiência
0,0	17212	0,151	$1,14 \times 10^5$	0,53
0,1	27904	0,152	$1,84 \times 10^5$	0,25
0,5	25691	0,157	$1,64 \times 10^5$	0,33
1,0	23236	0,147	$1,58 \times 10^5$	0,36
2,0	23986	0,152	$1,57 \times 10^5$	0,36
4,0	13862	0,125	$1,11 \times 10^5$	0,55

A TABELA IV.3.5 ilustra os tempos de vida obtidos através do ajuste mono-exponencial das curvas de decaimento para essas soluções. A variação da [NaCl] não causa alteração do tempo de vida dentro do desvio observado, mas, a eficiência de transferência de energia tende se estabilizar em $\approx 0,12$ (valor 37% menor que o inicial). Esta TABELA indica que boa parte da transferência de energia é radiativa, pois há uma diferença acentuada entre os valores mostrados nesta TABELA e na TABELA IV.3.4. Assim, o doador e o acceptor estão separados por uma distância $>2 \times R_0$ e a adição de NaCl não favorece a aleatoriedade de configurações, ou seja, este sal permite uma desintercalação mas não uma distribuição aleatória das sondas. Regiões contendo AA ou AM continuam a preservar o respectivo corante.

TABELA IV.3.5 Tempos de vida obtidos dos decaimentos temporais de AA no sistema DNA/AA/AM em diferentes [NaCl] e a eficiência de transferência de energia.

[NaCl] (mol.L ⁻¹)	Tempo de vida (ns).	Eficiência
0,0	3,70±0,16	0,19
0,1	3,81±0,24	0,17
0,5	4,11±0,20	0,10
1,0	4,10±0,18	0,11
2,0	4,06±0,21	0,11
4,0	3,91±0,23	0,15

A TABELA IV.3.5 mostra que a distância entre *D* e *A* aumentou de 54,8 para 59,9Å, a qual pode ser devida à agregação.

Estes resultados indicam que há um comportamento antagônico entre o DNA/AA e NaCl. A única explicação plausível é uma desintercalação e agregação do AA que ocorre em soluções cuja concentrações de NaCl $<1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Para concentrações maiores há uma tendência de intercalação da sonda e aumento do tempo de vida (TABELA IV.3.2).

Em resumo, a variação da [NaCl] provoca mudanças estruturais no DNA que poderiam levar a uma alteração na taxa de transferência de energia entre o doador e o acceptor. Contudo, devido aos processos de desintercalação e agregação não é possível afirmar se tais alterações realmente ocorrem. Os resultados obtidos indicam que há dois processos distintos: o primeiro, uma desintercalação/agregação que causa pequena redução no tempo de vida e no rendimento quântico do sistema DNA/AA (TABELAS IV.3.1 e IV.3.2), aumentando a concentração do agregado do AA em DNA e o segundo, observado em $[\text{NaCl}] > 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, que favorece a intercalação.

Para o sistema contendo DNA/AA/AM não se observou variação significativa no tempo de vida do AA (TABELA IV.3.7) para valores de NaCl $\neq 0 \text{ mol.L}^{-1}$, indicando que a transferência de energia no mesmo continua a ocorrer independente da força iônica. Entretanto, estes dados indicam que essa eficiência é menor que a inicial.

A ausência de uma desintercalação total das sondas favorece o estudo deste sistema via transferência não radiativa de energia. Para isto seria necessário encontrar um par *DIA* que possua uma distância para a transferência de energia ($2R_0$) superior àquela para a qual os corantes se atraem, formando agregados. Em outras palavras, os corantes irão se agregar na presença do DNA caso a energia de interação entre as moléculas do corante seja superior à do corante/sítio. A agregação depende da distância entre os corantes e da concentração do sal e a intercalação, da concentração do sal e das características dos sítios.

IV.4 PLANEJAMENTO FATORIAL COM TRÊS VARIÁVEIS: [AA], R E [NaCl]

Os resultados anteriores, relacionados ao efeito de sais em sistemas contendo DNA, mostraram alterações significativas e complexas para serem analisadas por métodos univariados. Estas alterações serão quantificadas através do planejamento fatorial de dois níveis, cujas variáveis são: [NaCl]= 0 (-) e 0,5 (+) ou 0 (-) e 1,0 mol.L⁻¹ (+), [AA]= 3,0x10⁻⁶ (-) e 3,0x10⁻⁵ mol.L⁻¹ (+) e R= 10 (-) e 20 (+).

Nas FIGURAS IV.4.1 e IV.4.2 estão os espectros de absorção do AA em diferentes concentrações de AA, DNA e NaCl. Pode-se observar que existem mudanças de posição, intensidade e relação entre as intensidades de absorção a 474 e 492nm. Os espectros indicados em cor lilás, em ambas as Figuras, mostram mudanças significativas em ≈ 470 nm quanto alterada a concentração do AA, sugerindo possível desintercalação e agregação.

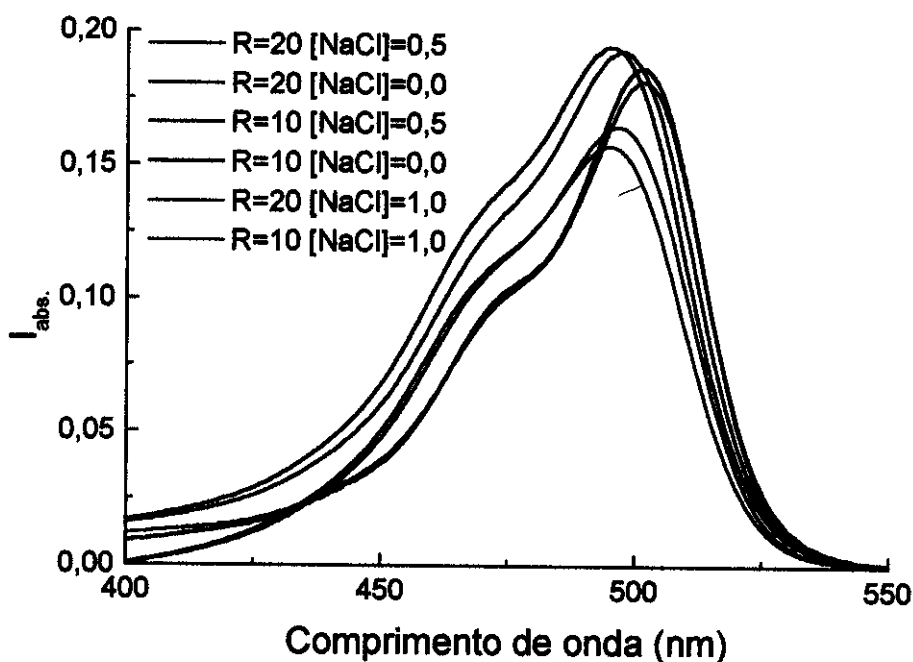


FIGURA IV.4.1 Espectros de absorção de soluções contendo AA, DNA e NaCl. [AA]= 3,0x10⁻⁶ mol.L⁻¹.

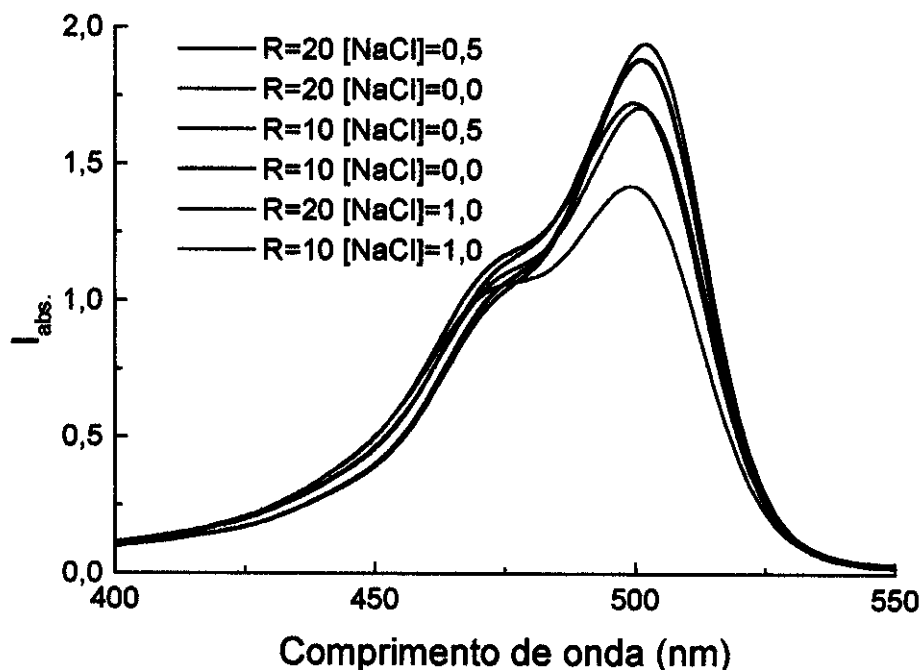


FIGURA IV.4.2 Espectros de absorção de soluções contendo AA, DNA e NaCl. $[AA]=3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Nas FIGURAS IV.4.3 e IV.4.4 observa-se os efeitos de cada variável nesse sistema. O erro estimado para a absorvância molar é $1500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, sendo os efeitos de primeira ordem mais significativos, em ambos os planejamentos, e devidos ao aumento nas concentrações de AA, de NaCl e de R. O efeito de segunda ordem mais pronunciado se refere à interação entre AA e NaCl, sendo que as alterações espectrais devidas às demais variáveis estão dentro do erro estimado.

Estas alterações são interpretadas como mudanças das relações entre as concentrações das espécies livres, intercaladas e agregadas do corante. A adição de AA desloca o equilíbrio para a forma intercalada, causando uma redução na intensidade de absorção abaixo de 490 nm e aumento na intensidade acima deste valor (■ FIGURAS IV.4.3 e IV.4.4). O mesmo é observado para a adição de DNA (aumento de R), apesar de menos intenso (● FIGURAS IV.4.3 e IV.4.4). A adição de NaCl (▲ FIGURA IV.4.3 e IV.4.4) provoca as mesmas alterações em ambos os experimentos, redução na concentração da espécie intercalada e aumento nas formas agregada e livre. Entretanto, esta alteração é proporcional à concentração de NaCl, pois o seu aumento intensificou a variação negativa observada em $\approx 510 \text{ nm}$. O coeficiente de extinção molar de AA intercalado em DNA é $\approx 60.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ e, porque a espécie agregada absorve muito pouco em 505 nm é possível estimar o quanto de AA desintercalou. Este valor é $\approx 10\%$ e 25% para soluções com $0,5$ e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente.

O efeito de segunda ordem entre AA e NaCl é pequeno (◆ FIGURAS IV.4.3 e IV.4.4), e favorece a intercalação do corante, cujas moléculas tendem a ficar em sítios nos quais a interação hidrofóbica é máxima.

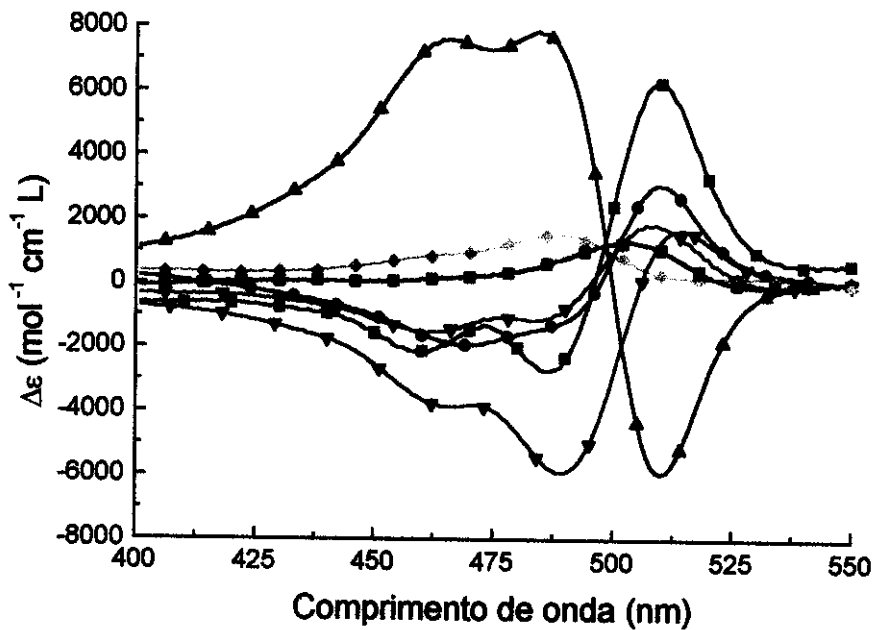


FIGURA IV.4.3 Efeitos nos espectros de absorção do AA para o sistema com $[NaCl]=0,5$ mol.L⁻¹, ■ [AA]; ● R; ▲ [NaCl]; ◆ [AA]/[NaCl]; ▼ AA/R; × R/[NaCl] e * [AA]/R/[NaCl].

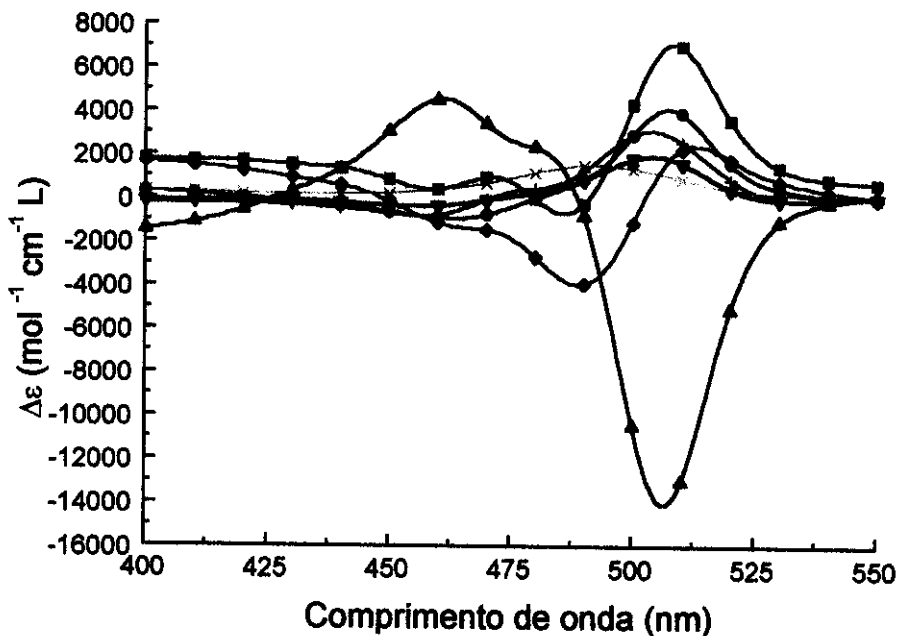


FIGURA IV.4.4 Efeitos nos espectros de absorção de AA para soluções com $[NaCl]= 1,0$ mol.L⁻¹; ■ [AA]; ● R; ▲ [NaCl]; ◆ [AA]/[NaCl]; ▼ AA/R; × R/[NaCl] e * [AA]/R/[NaCl].

Na TABELA IV.4.1 encontram-se valores para o grau de polarização médio relativo aos espectros de emissão de AA obtido das curvas mostradas na FIGURA IV.4.5. Estes valores, segundo Kubota e Steiner⁴⁰, não variam quando obtidos através da curva de decaimento ou do espectro de fluorescência polarizada. Em outro artigo Kubota³⁴ estimou em 0,44 o grau de polarização de AA e atribuiu a redução para $\approx 0,34$ aos movimentos das moléculas de corante nos sítios de intercalação, sem ocorrer distorção no DNA.

Na TABELA IV.4.2 encontram-se os efeitos no grau de polarização devidos à alteração de cada variável no sistema. Como pode ser observado a variação mais significativa se deve a R (distância entre as moléculas do corante). Segundo Paoletti e Pecq⁴¹ a variação no grau de polarização da fluorescência, para distâncias pequenas, se deve à transferência não radiativa de energia entre moléculas de uma mesma substância. Entretanto, não há variação no tempo de vida, pois essa transferência ocorre na escala de tempo de picosegundos. A distância crítica do AA intercalado em DNA é $37,0\text{Å}$ ³⁵ (usando $K^2 = 2/3$), associada a ≈ 11 pares de bases, próximo do valor escolhido para o nível - da variável R. Assim, é possível que esteja ocorrendo transferência de energia entre as moléculas de AA, reduzindo o grau de polarização.

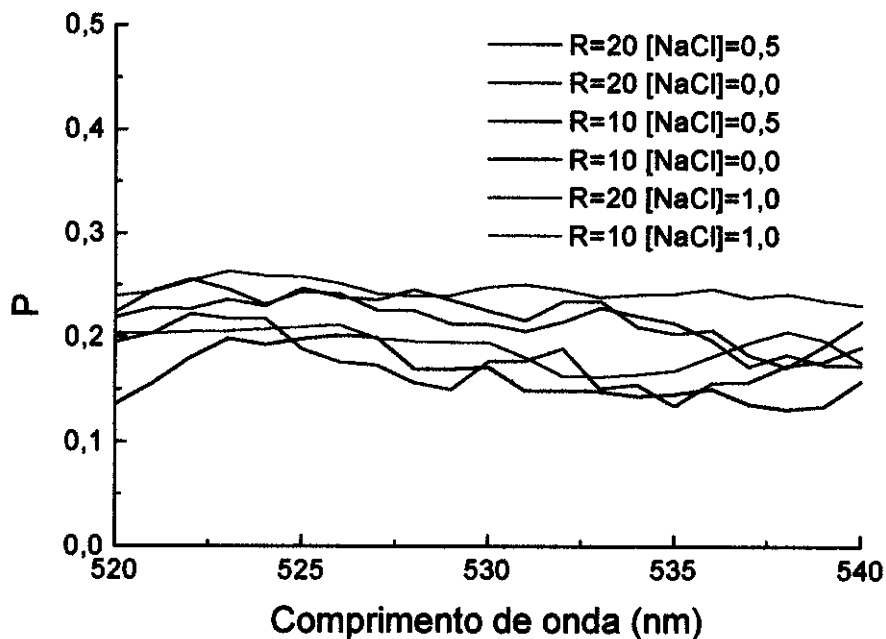


FIGURA IV.4.5 Grau de polarização (P) espectral das soluções contendo DNA/AA. [AA] = $3,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹

TABELA IV.4.1 Grau de polarização espectral médio (P) para as soluções utilizadas no planejamento fatorial.

[AA]	R	[NaCl]	P (525-535nm)
+	+	+	0,23±0,01
+	+	-	0,22±0,01
+	-	+	0,17±0,02
+	-	-	0,17±0,02
-	+	+	0,21±0,02
-	+	-	0,27±0,01
-	-	+	0,17±0,02
-	-	-	0,18±0,01
+	+	2+	0,25±0,01
+	-	2+	0,19±0,02
-	+	2+	0,22±0,01
-	-	2+	0,17±0,02

TABELA IV.4.2 Efeito no grau de polarização devido à alteração de uma variável.

Variável	Nível -/+	Nível -/2+
[AA]	-0,01	-0,03
R	0,06	0,06
[AA]/R	-0,01	-0,01
NaCl	-0,02	0,00
AA/[NaCl]	0,02	0,03
R/[NaCl]	-0,01	-0,01
[AA]/R/[NaCl]	0,02	0,01

Estes resultados indicam que NaCl favorece a desintercalação e a agregação das moléculas de corante. A variação no grau de polarização é pequena e se deve à aproximação entre duas moléculas do mesmo corante.

IV.5 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO NAS SOLUÇÕES CONTENDO AA

O cloreto de guanidínio desestrutura biomoléculas e reduz a tendência de formação de agregados, podendo fornecer informações referentes à ação de desnaturantes na estrutura do DNA, as quais podem ser comparadas às causadas por NaCl. Entretanto, GuCl pode, também, alterar as propriedades espectroscópicas dos corantes.

A FIGURA IV.5.1 mostra as mudanças observadas no espectro de absorção do AA com a variação na [GuCl]. Inicialmente há uma redução na intensidade de absorção e, em seguida, um aumento com a concentração. Estes fatos podem ser atribuídos à formação de um complexo entre AA e GuCl, com estequiometrias diferentes (relação corante/desnaturante de 1/1, 1/2, 1/3), cada qual com coeficientes de extinção molar característicos.

Outra observação interessante é que as variações nas intensidades de absorção das soluções com $[\text{GuCl}] > 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ são superiores a 14% (FIGURAS IV.5.1 e IV.5.2). Na FIGURA IV.5.2 são mostrados alguns espectros de absorção do AA em soluções com $[\text{GuCl}] >$ que $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

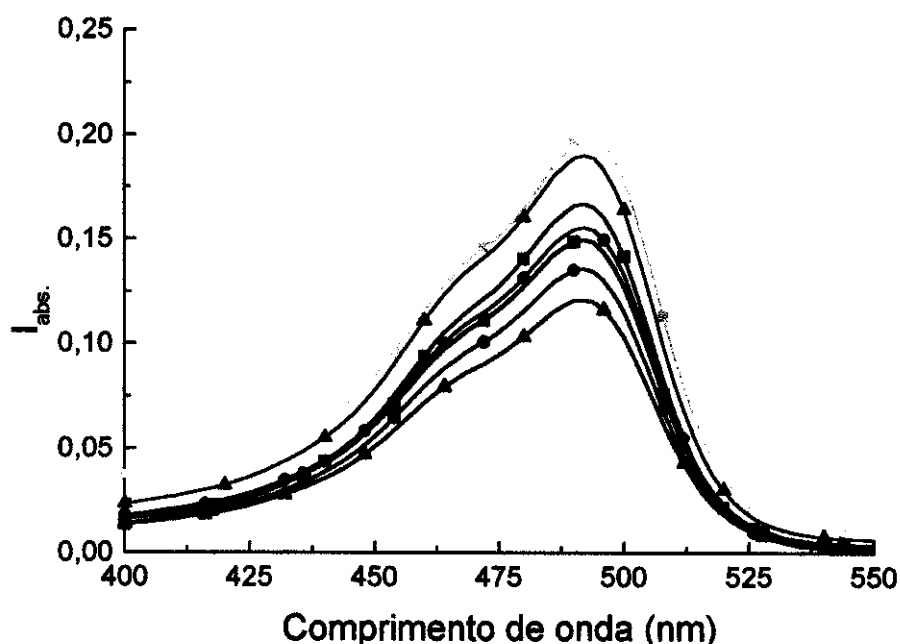


FIGURA IV.5.1 Espectros de absorção das soluções AA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,001; ▲ 0,005; ■ 0,01; ● 0,05; ▲ 0,1 e ○ 0,5 mol.L⁻¹.

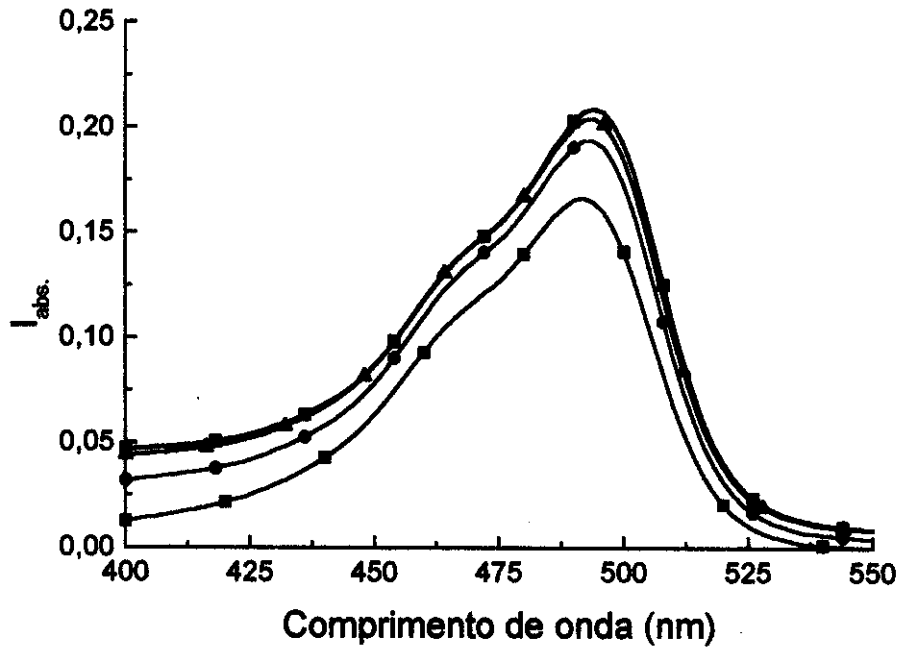


FIGURA IV.5.2 Espectros de absorção das soluções AA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,5; ▲ 0,7 e ■ 1,0 mol.L⁻¹.

As alterações nas intensidades de emissão são observadas na FIGURA IV.5.3, (principal), seguindo o mesmo comportamento nas de absorção. A normalização pela intensidade de absorção em 490nm (correspondente ao $\lambda_{exc.}$) foi necessária e os resultados são mostrados no gráfico menor da FIGURA IV.5.3 e na TABELA IV.5.1.

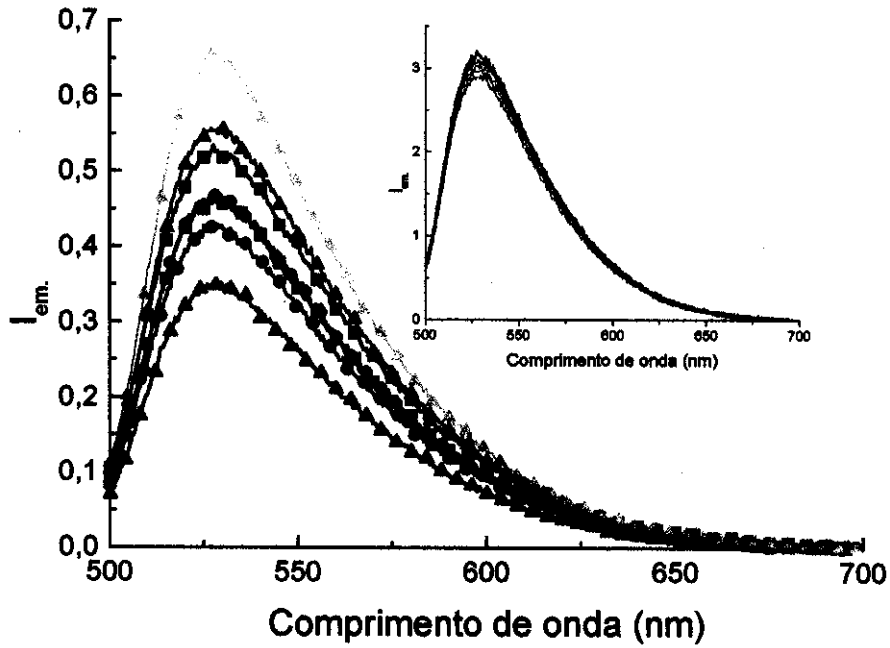


FIGURA IV.5.3 Espectros de emissão das soluções AA e diferentes $[\text{GuCl}]$: ■ 0; ● 0,001; ▲ 0,005; ■ 0,01; ● 0,05; ▲ 0,1 e ■ 0,5 mol.L⁻¹. O inserido foi normalizado pela $I_{\text{abs.}}$ em 490nm.

TABELA IV.5.1 Intensidades de absorção ($I_{\text{abs.}}$), razão entre a área sob a banda de emissão e a intensidade de absorção ($\Sigma I_{\text{em.}}/I_{\text{abs.}}$) e variação percentual em relação a solução sem GuCl.

$[\text{GuCl}]$ (mol.L ⁻¹)	$I_{\text{abs.}}$ (492nm)	$\Sigma I_{\text{em.}}/I_{\text{abs.}}$	% Δ
0	0,166	213	0
0,001	0,135	211	-0,9
0,005	0,121	193	-9,4
0,01	0,150	205	-3,8
0,05	0,154	200	-6,1
0,1	0,186	197	-7,5
0,5	0,200	211	-0,9

As alterações observadas indicam que GuCl possui interação específica com o AA, mudando sua intensidade de absorção; entretanto, o efeito causado na intensidade de emissão se deve principalmente à modificações na intensidade de absorção.

IV.6 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO NOS SISTEMAS DNA/AA E DNA/AA/AM

Na FIGURA IV.6.1 observa-se os espectros de absorção para soluções de DNA e GuCl. Eles indicam uma diminuição na intensidade de absorção a 260nm com o aumento da [GuCl] e formação de um ombro próximo a 230nm para concentrações altas (4,0mol.L⁻¹) desse sal. Segundo Tinoco^{42, 43} isto pode ser atribuído à variação na orientação relativa dos dipolos das bases do DNA, tal como acontece na desnaturação térmica do DNA ou à interação eletrostática entre íons e DNA.

Resultados obtidos por Levine⁴⁴ indicam que o ciano guanidínio, um derivado do cloreto de guanidínio, é cinco vezes mais eficiente que a uréia na desestruturação do DNA, quando submetidos à mesma temperatura (73°C).

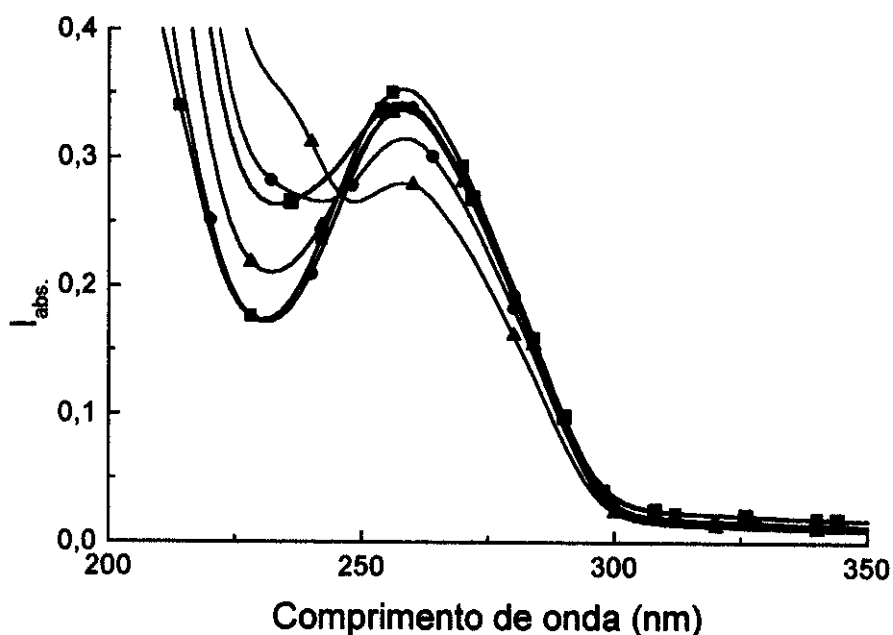


FIGURA IV.6.1 Espectros de absorção do DNA com diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,1; ▲ 0,5; ■ 1,0; ● 2,0 e ▲ 4,0mol.L⁻¹.

Como se observa na FIGURA IV.6.1 o hipocromismo torna-se acentuado para [GuCl]>1,0mol.L⁻¹ (redução de 22,9% para 4,0mol.L⁻¹ de GuCl), mais intensas que as obtidas com NaCl (redução de 9,8%). Para [GuCl]>1,0mol.L⁻¹ é possível a existência de certa porcentagem de DNA como uma fita simples, permitindo que as moléculas do desnaturante se aproximem o suficiente para interagir com o dipolo de transição das bases nitrogenadas, diminuindo seu coeficiente de extinção molar. Esta aproximação influencia o momento de

transição mais intensamente que o NaCl que não possui o efeito tão acentuado na desestruturação do DNA, pois apenas induz uma alteração entre as formas B ou D-DNA⁴⁵, insuficiente para aproximar os íons das bases.

Hammes e Swann⁴⁶ em estudos com GuCl verificou que a densidade de soluções aquosas contendo esta substância (a 25°C) é pouco alterada com a adição da mesma, passando de 0,9997 para 1,046 g×cm³, com a adição de 2,0mol.L⁻¹ deste sal. Este não causa apenas uma desestruturação do solvente que poderia ser responsável pela desnaturação de biomoléculas, também obtida em altas concentrações de NaCl, mas sim uma desestruturação local da camada de hidratação associada com outra interação.

Na FIGURA IV.6.2 observa-se que o espectro de absorção de GuCl possui um ombro próximo a 236nm (também observado na FIGURA IV.6.1).

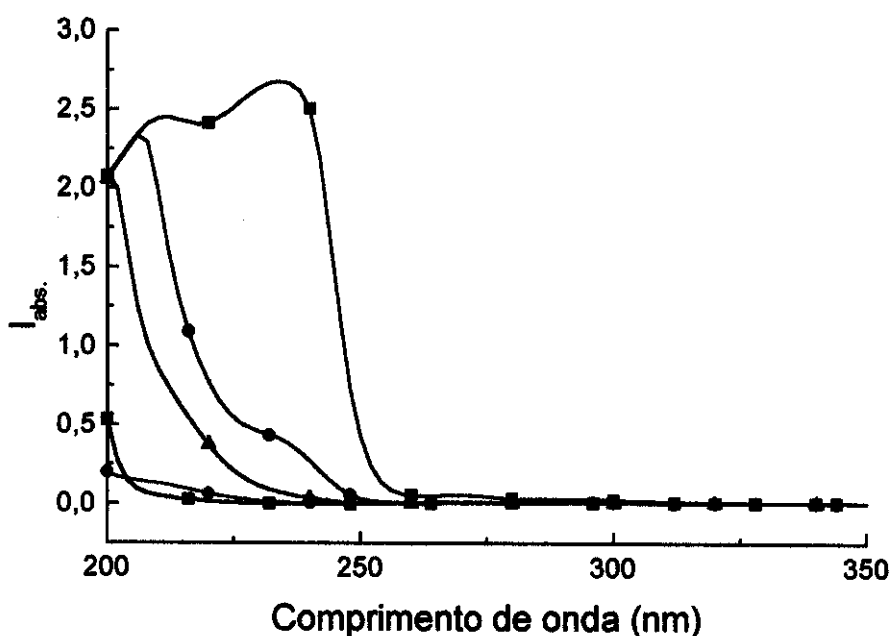


FIGURA IV.6.2 Espectros de absorção de GuCl em várias concentrações: ■ 1,0; ● 0,1; ▲ 0,01; ◻ 0,001 e ○ 0,0001mol.L⁻¹

Os espectros de absorção na região do visível para soluções contendo DNA e AA são mostrados na FIGURA IV.6.3.

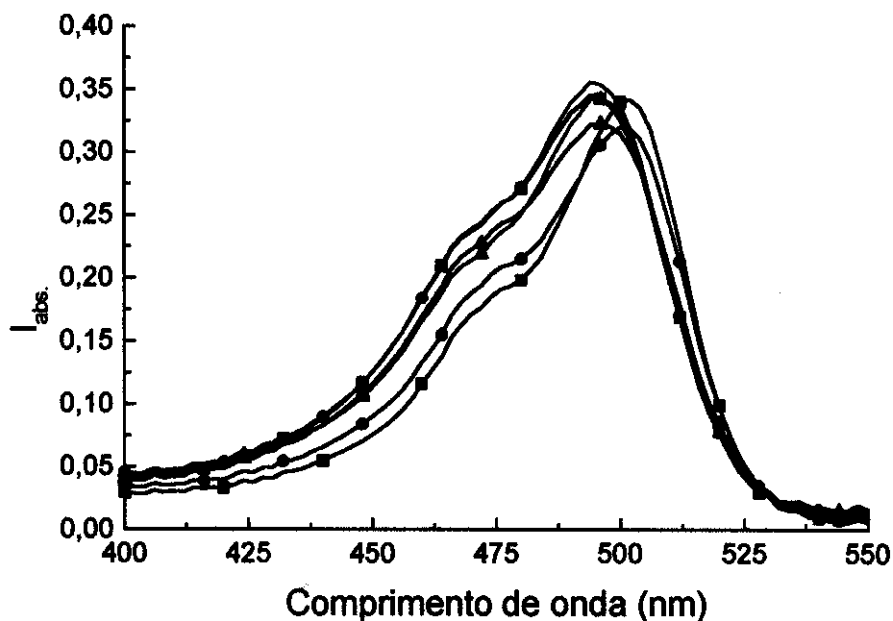


FIGURA IV.6.3 Espectros de absorção das soluções de DNA/AA com diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,1; ▲ 0,5; ■ 1,0; ● 2,0 e ▲ 4,0 mol.L⁻¹; R=19,0.

As alterações neste espectro indicam mudanças na polaridade do meio em que a sonda se encontra, com aumento da [GuCl], as quais não foram observadas na ausência do DNA. Para [GuCl]>1,0 mol.L⁻¹ as moléculas de AA se encontram em um meio cuja polaridade é maior que aquela observada no sítio de intercalação; contudo, esta não é igual à do meio aquoso, no qual deveria haver um deslocamento do máximo de absorção para 492 nm (FIGURA IV.6.4). Portanto, o corante AA se encontra em um meio onde a polaridade é intermediária entre a do sítio de intercalação e a do meio aquoso.

Outro resultado interessante observado na FIGURA IV.6.3 é que a intensidade de absorção do AA não aumentou tanto quanto à observada para a solução aquosa do corante em presença deste sal (FIGURA IV.5.1 e IV.5.2). Isto indica que o AA se encontra em uma região onde a concentração de GuCl é menor que a do meio aquoso na ausência de DNA.

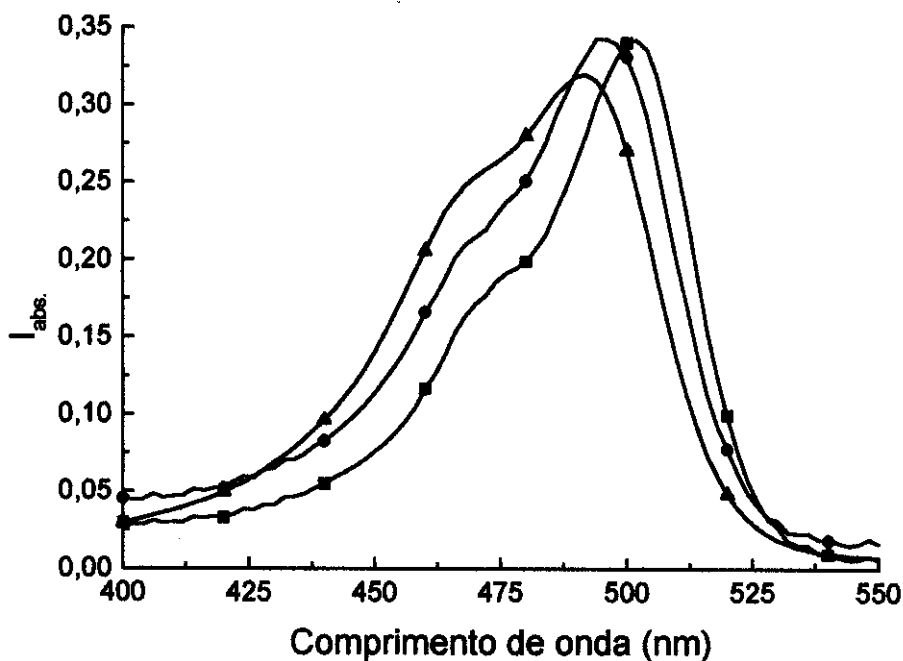


FIGURA IV.6.4 Espectros de absorção das soluções de AA sem GuCl (\blacktriangle) e DNA/AA com diferentes $[\text{GuCl}]$: \blacksquare 0 e \bullet $4,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

A fluorescência de AA intercalado em DNA diminui com a $[\text{GuCl}]$ até um valor quase constante, que ocorre quando $[\text{GuCl}] > 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (FIGURA IV.6.5). No gráfico menor desta FIGURA estão os espectros de emissão normalizados pela intensidade de emissão no máximo, onde se pode distinguir três conjuntos de espectros: o primeiro, com bandas mais estreitas e $[\text{GuCl}]$ iguais a $0,0$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (—); o segundo, com largura de banda intermediária ($[\text{GuCl}] = 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, —) e o terceiro, com bandas mais largas ($[\text{GuCl}] > 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ —).

A redução na intensidade de emissão da sonda para $[\text{GuCl}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ indica que pode estar ocorrendo maior desativação; entretanto, a banda possui uma largura próxima à do corante intercalado, indicando pouca interação com o solvente. Este alargamento é mais acentuado para soluções com $[\text{GuCl}] \geq 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, indicando maior interação sonda/solvente.

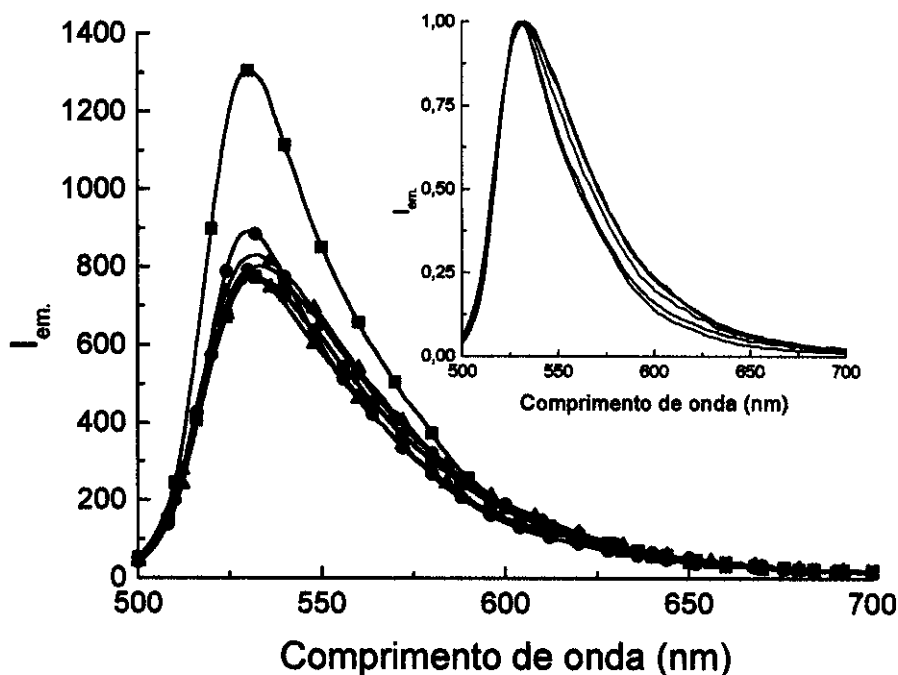


FIGURA IV.6.5 Espectros de emissão das soluções de DNA/AA, em intensidades de emissão (maior) e normalizada (menor), com diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,1; ▲ 0,5; ◆ 1,0; ● 2,0 e ▲ 4,0 mol.L⁻¹; R=19,0.

Na FIGURA IV.6.6 observam-se os espectros de emissão para AA em água e em solução de DNA, com e sem GuCl. Nota-se no gráfico principal que a intensidade de emissão do AA em solução aquosa é menos intensa que a observada na presença de DNA e 4,0 mol.L⁻¹ de GuCl. No gráfico menor as intensidades de emissão normalizadas pela intensidade de emissão no máximo mostram que o espectro de emissão do AA em solução aquosa tem banda ligeiramente mais larga que em DNA e 4,0 mol.L⁻¹ de GuCl. Com isto verifica-se que a sonda AA, quando na presença de DNA e 4,0 mol.L⁻¹ de GuCl, se encontra em um meio onde há um aumento da intensidade de emissão e redução da interação sonda/solvente, quando comparada com a mesma em solução aquosa.

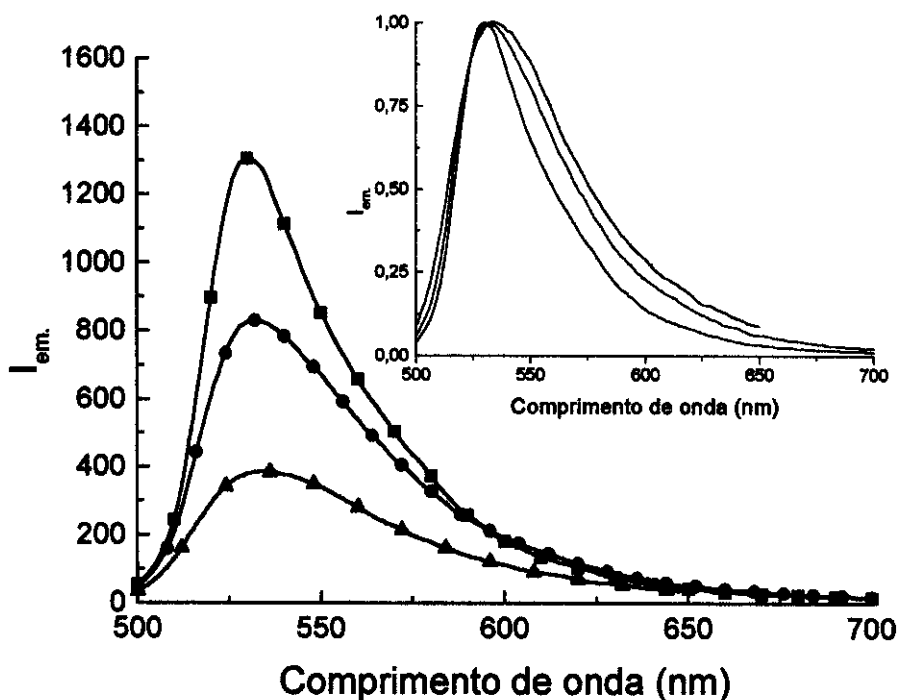


FIGURA IV.6.6 Espectros de emissão de soluções contendo AA sem GuCl (▲) e DNA/AA com diferentes [GuCl]: ■ 0 e ● 4,0 mol.L⁻¹ (maior).

Na TABELA IV.6.1 estão os valores do grau de polarização médio (P) para os espectros de excitação e emissão. Observa-se uma redução de P com o aumento da [GuCl], indicando que a sonda se encontra em um microambiente onde tem maior liberdade. Estes resultados mostram que a desestruturação é quase total quando $[GuCl] \cong 4$. Estes valores são menores dos observados quando se usa NaCl. Este sal atua apenas na desintercalação e agregação, enquanto que o GuCl causa uma desestruturação do DNA e/ou liberação parcial da sonda do sítio de intercalação.

TABELA IV.6.1 Grau de polarização médio (P) obtido para os sistemas DNA/AA e AA com diferentes [GuCl].

Sistema.	[GuCl] mol.L ⁻¹	$P_{exc.}$	$P_{em.}$
DNA/AA	0,0	0,22±0,02	
DNA/AA	0,1	0,21±0,02	0,23±0,02
DNA/AA	0,5	0,14±0,02	0,15±0,03
DNA/AA	1,0	0,10±0,02	0,13±0,03
DNA/AA	2,0	0,08±0,03	0,10±0,03
DNA/AA	4,0	0,06±0,02	0,08±0,03
AA	0,0	0,03±0,02	0,05±0,01

As curvas de decaimento temporal da fluorescência de AA no sistema DNA/AA são mostradas na FIGURA IV.6.7 e na TABELA IV.6.2 observa-se os tempos de vida (τ) obtidos a partir dessas curvas. Nota-se que estes tempos se estabilizam em $\approx 2,5$ ns, valor diferente do obtido para a sonda em água (1,8ns).

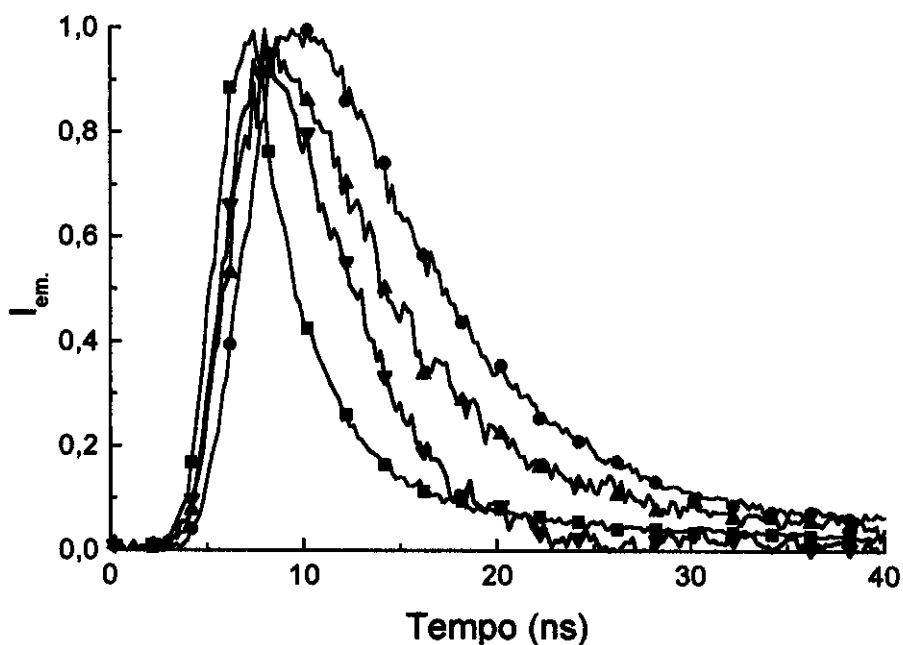


FIGURA IV.6.7 Curvas de decaimento das soluções contendo DNA/AA com diferentes [GuCl]: ● 0; ▲ 0,5 e ▼ 4,0 mol.L⁻¹, ■ decaimento temporal da lâmpada; R=19,0 .

TABELA IV.6.2 Tempos de vida (τ) da sonda AA no sistema DNA/AA com diferentes [GuCl].

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	τ (ns)
0,0	4,79±0,08
0,1	4,59±0,17
0,5	3,61±0,15
1,0	2,95±0,15
2,0	2,53±0,10
4,0	2,55±0,09

A redução deste tempo de vida pode ser atribuída a um equilíbrio entre as espécies livre e intercalada de AA. Para verificar isto foi feita a deconvolução de curvas no modo bi-

exponencial. Fixou-se τ_1 em 1,8ns (tempo de vida do AA em meio aquoso) e obteve-se τ_2 para as curvas de decaimento das soluções contendo DNA/AA e GuCl nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0mol.L⁻¹. Em nenhum dos tratamentos observou-se um tempo de vida próximo ao da espécie intercalada e o fator pré-exponencial para τ_1 sempre foi negativo com um desvio grande, indicando que esta deconvolução não é satisfatória, não indicando um equilíbrio entre estas espécies.

Observa-se na FIGURA IV.6.8 os espectros de absorção do sistema DNA/AA/AM. As alterações notadas indicam que ambos os corantes (AA e AM) estão "sentindo" a mudança no ambiente (DNA) causada pelo GuCl, mudando a posição dos respectivos máximos de absorção. Entretanto, os espectros do corante AM são mais sensíveis que os de AA ou seja, enquanto que as alterações na posição do máximo de absorção do AA são acentuadas a partir da terceira solução (espectro em verde), no AM estas alterações já ocorrem na segunda solução (espectro em vermelho).

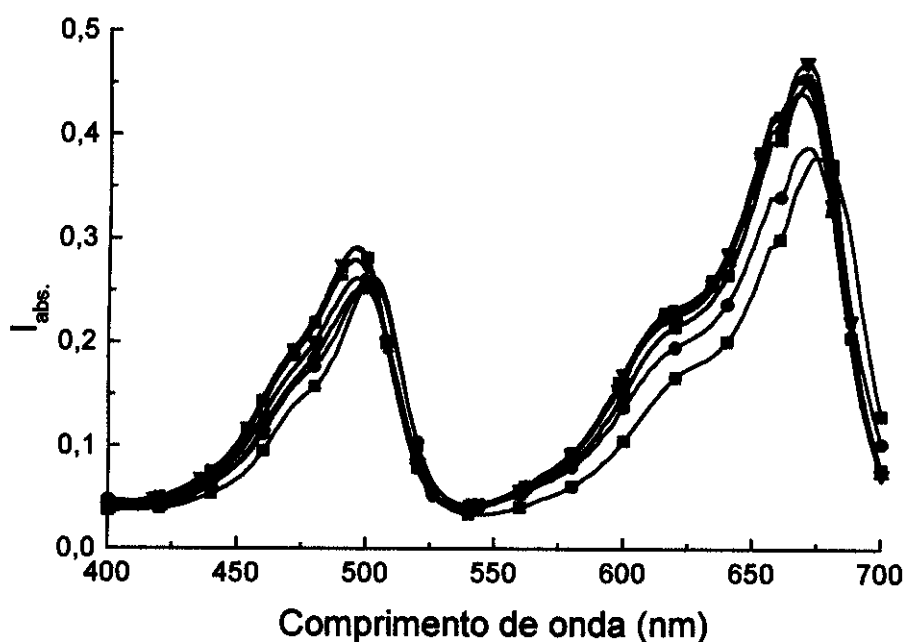


FIGURA IV.6.8 Espectros de absorção das soluções contendo DNA/AA/AM e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,09; ▲ 0,36; ▼ 0,53; ■ 0,82; ● 1,09; ▨ 1,40; ▼ 1,67 e ■ 2,18mol.L⁻¹; R=17,1.

Os espectros de emissão do AA normalizados pela I_{abs} em 490nm no sistema DNA/AA/AM estão na FIGURA IV.6.9, mostrando comportamento diferente daquele para a solução que contém apenas DNA/AA. As alterações nas áreas sob estes espectros estão na FIGURA IV.6.10. Cada ponto é a média de dois valores que representam as integrais das intensidades dos espectros de emissão normalizados pela absorção obtidos com uma

diferença de três dias do primeiro para o segundo espectro. Inicialmente há uma diminuição na intensidade de emissão para as soluções que contém DNA/AA e DNA/AA/AM. Em seguida, o comportamento do sistema contendo DNA/AA/AM difere daquele contendo DNA/AA, havendo um aumento na intensidade de emissão para a solução com $0,28\text{mol.L}^{-1}$.

Referente aos desvios padrão mostrados na FIGURA IV.6.10 para as soluções com DNA/AA e com DNA/AA/AM, observa-se que as soluções contendo apenas o doador exibem pequenas variações nas intensidades de emissão quando comparadas às que contém o doador e o acceptor e as com $[\text{GuCl}] > 0,28\text{mol.L}^{-1}$. Isto indica que nestas condições o DNA ou os corantes possuem maior liberdade de movimento, que reflete na distância entre as sondas e na transferência de energia. Quando $[\text{GuCl}] > 0,5\text{mol.L}^{-1}$ a intensidade média de emissão normalizada pela absorção para soluções contendo DNA, AA e AM mantém-se constante.

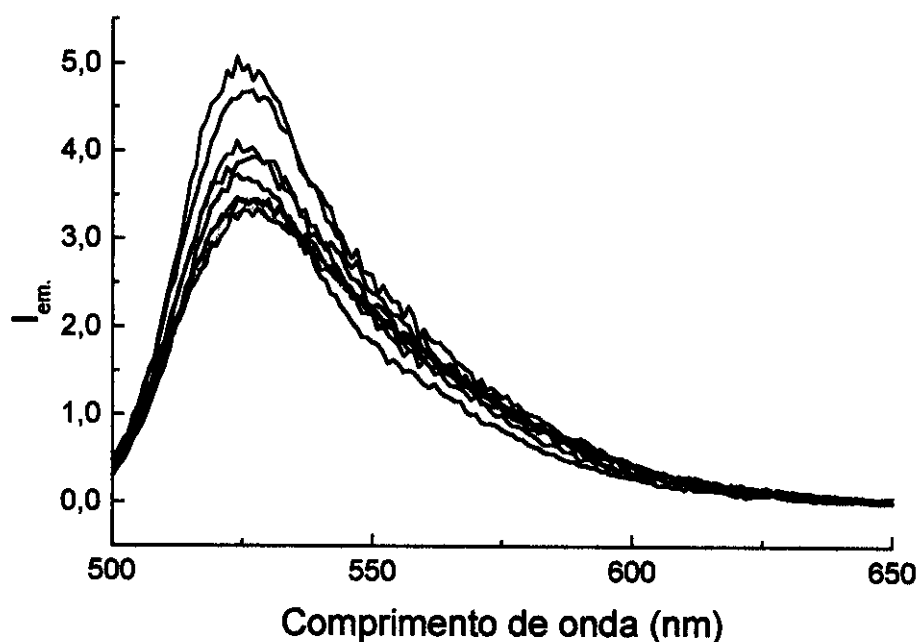


FIGURA IV.6.9 Espectros de emissão normalizados pela I_{abs} em 490nm das soluções contendo DNA/AA/AM e diferentes $[\text{GuCl}]$: — 0; — 0,09; — 0,36; — 0,53; — 0,82; — 1,09; — 1,40; — 1,67 e — 2,18 mol.L^{-1} ; $R=17,1$.

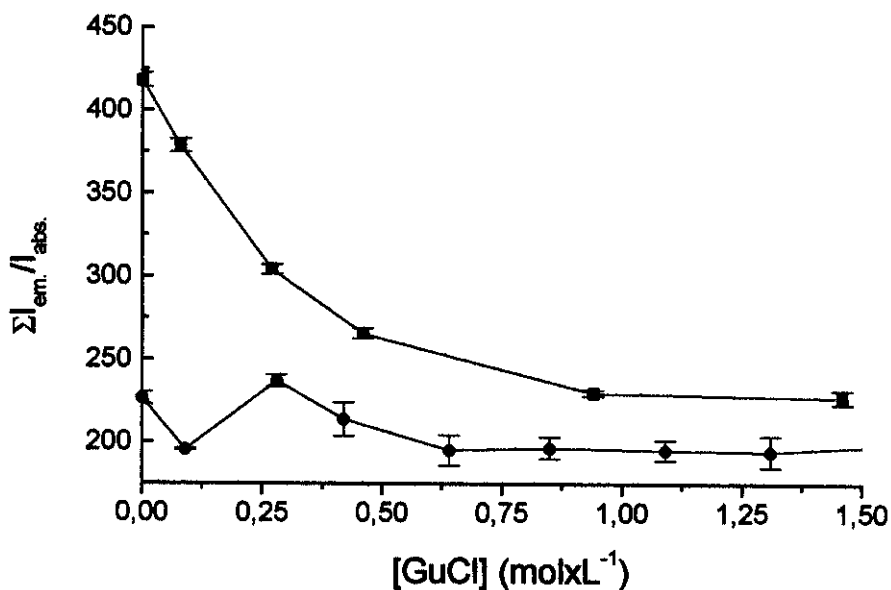


FIGURA IV.6.10 Razão entre a área da banda de emissão e a intensidade de absorção ($\Sigma I_{em}/I_{abs,490}$) para as soluções contendo DNA/AA e DNA/AA/AM versus [GuCl].

Com os dados da FIGURA IV.6.10 calculou-se a eficiência (E_f) de transferência de energia (TABELA IV.6.3). Inicialmente ($[GuCl]= 0$ e $0,09\text{mol.L}^{-1}$) não há uma variação de E_f e, para concentrações maiores, ocorre um decréscimo, estabilizando em $\approx 0,14$.

TABELA IV.6.3 Eficiência de transferência de energia para o sistema DNA/AA/AM.

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	Eficiência
0	0,46
0,09	0,48
0,36	0,22
0,53	0,20
0,82	0,21
1,09	0,14
1,40	0,14
1,67	0,15

Nas FIGURAS IV.6.11 e IV.6.12 estão os espectros de absorção e emissão (normalizada pela I_{abs} em 666nm , λ_{exc}) do acceptor AM em soluções com e sem DNA e em diferentes [GuCl]. Nos espectros de absorção há uma diferença de 4nm no máximo de

absorção entre os espectros do AM em solução aquosa (preto) e em DNA com $2,13\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl (verde), a qual aumenta para 12nm na ausência de GuCl (vermelho). Para os espectros de emissão (FIGURA IV.6.11) o aumento na [GuCl] causa um aumento na intensidade de emissão, indicando que o AM está se deslocando do sítio de intercalação. Entretanto, a tendência de estabilização do máximo de emissão (689nm) é diferente daquela para em solução aquosa (686nm). As diferenças nos espectros são menores que as observadas para a sonda AA; entretanto, elas também indicam uma diferença no meio em que o AM se encontra quando em solução contendo DNA e GuCl.

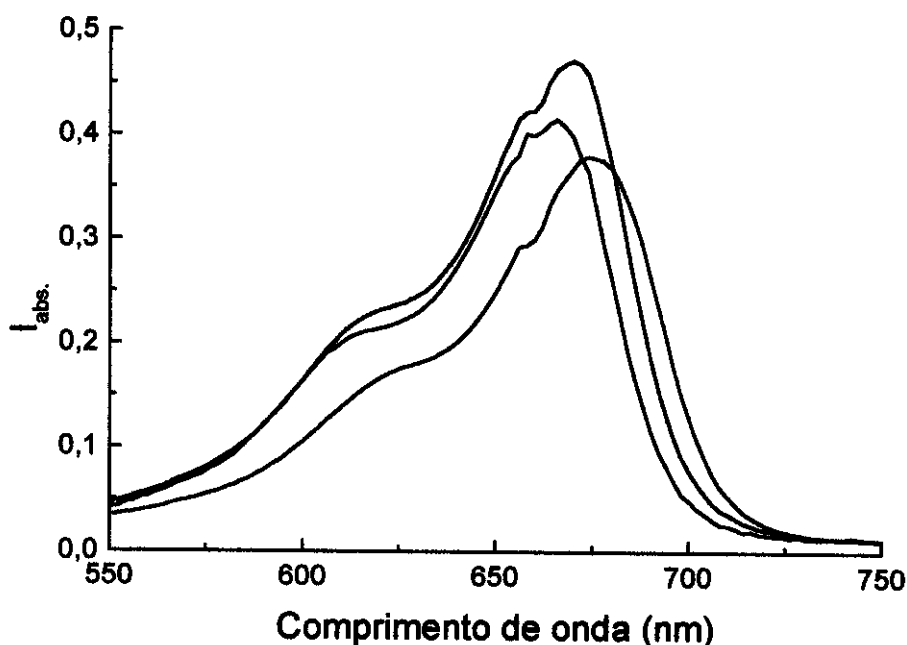


FIGURA IV.6.11 Espectros de absorção de AM: sem DNA e GuCl (—) e com DNA em diferentes [GuCl]: — 0 e — $2,1\text{mol.L}^{-1}$.

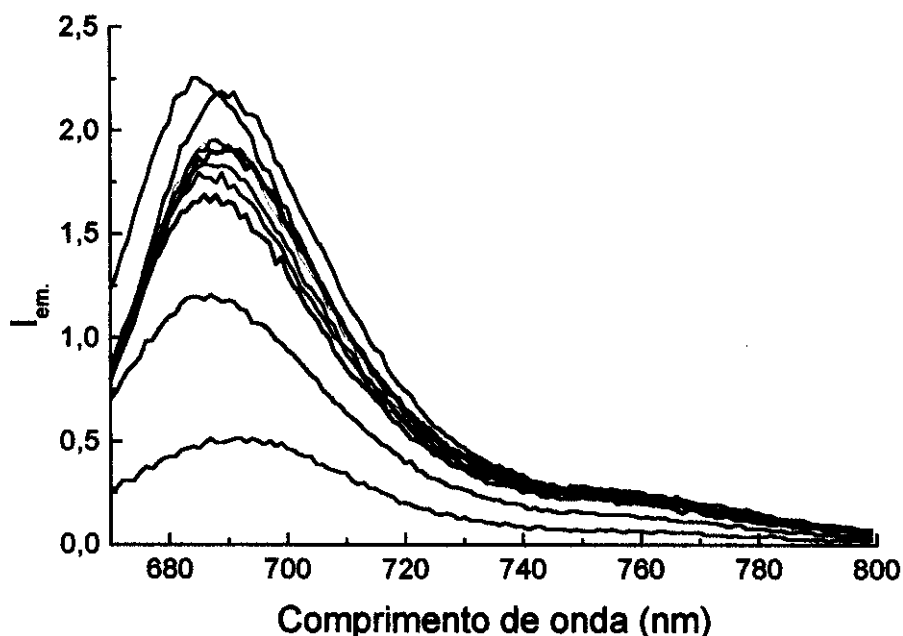


FIGURA IV.6.12 Espectros de emissão de AM normalizados pela intensidade de absorção em 666nm, sem DNA e GuCl (—) e com DNA em diferentes [GuCl]: — 0; — 0,09; — 0,36; — 0,53; — 0,82; — 1,09; — 1,40; — 1,67 e — 2,18mol.L⁻¹; R=17,1.

Os valores do tempo de vida para as soluções contendo DNA, AA e AM calculados através das curvas de decaimento mostradas na FIGURA IV.6.13 estão na TABELA IV.6.4. A tendência é semelhante à observada para a intensidade de emissão: há redução na eficiência de transferência de energia, indicando uma separação entre *D* e *A*. Entretanto, os valores iniciais para a eficiência da transferência de energia obtidos com o tempo de vida são diferentes daqueles obtidos mediante a intensidade de emissão (seção IV.2). A explicação mais plausível para este fato é a existência de transferência radiativa de energia. Contudo, os valores calculados convergem para $\approx 0,14$, indicando que a transferência radiativa está deixando de ocorrer prevalecendo apenas a não radiativa.

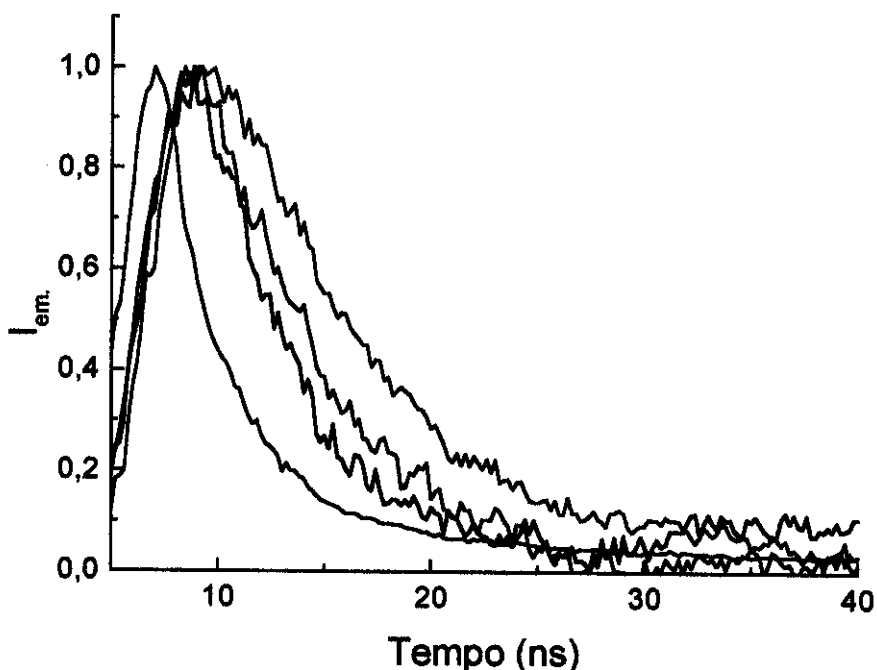


FIGURA IV.6.13 Curvas de decaimento temporal para as soluções contendo DNA/AA/AM e diferentes [GuCl]: 0, 0,5 e 4,0; R=17,1.

TABELA IV.6.4 Tempo de vida e eficiência da transferência de energia de AA para o sistema DNA/AA/AM e GuCl.

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	DNA/AA/AM τ (ns)	DNA/AA τ (ns)	Eficiência
0,0	3,67±0,15	4,79±0,08	0,23
0,1	3,79±0,09	4,59±0,17	0,17
0,5	3,13±0,14	3,61±0,15	0,13
1,0	2,50±0,10	2,95±0,15	0,15
2,0	2,09±0,13	2,53±0,10	0,17
4,0	2,20±0,18	2,55±0,09	0,14

As distâncias (r) em que ocorrem os processos de transferência radiativa são maiores que as calculadas para os processos não radiativos, devido às diferenças temporais em que eles ocorrem. Quando o doador e o aceptor estão separados infinitamente não há transferência de energia. À medida em que ambos se aproximam a probabilidade de absorção de fótons emitidos pelo doador aumenta até um máximo onde começam ocorrer interações dipolares entre ambos. Para $r < 2R_0$ há uma diminuição na intensidade da luz emitida pelo doador, devido a transferência não radiativa de energia, e uma diminuição na probabilidade de absorção de luz pelo aceptor. Assim, essa transferência é favorecida frente à radiativa pois naquela não há

emissão de luz ocorrendo, portanto, em tempos menores que aquele em que a molécula permanece no estado excitado, diminuindo a intensidade de luz emitida pelo doador e, conseqüentemente, a absorvida pelo acceptor, inviabilizando os processos radiativos.

Possivelmente, quando as sondas estão intercaladas no DNA há um conjunto de moléculas doadoras ou acceptoras que estão intercaladas em regiões ricas em pares de bases AT-AT ou CG-CG. Estas regiões possuem certa estrutura e podem estar separadas por distâncias superiores a $2R_0$, inviabilizando a transferência não radiativa de energia mas favorecendo a radiativa. Ao desestruturar o DNA, este inviabiliza a transferência radiativa de energia mas, ainda, permite a não radiativa.

Como se observa nas TABELAS IV.6.3 e .5.4 a eficiência de transferência de energia converge para um mesmo valor. Este resultado não foi observado em soluções contendo NaCl (TABELAS IV.3.3 e .3.4), onde as eficiências são bem diferentes, independente da concentração deste sal. Mesmo que a interação sonda/DNA fosse alterada acentuadamente quando se usa GuCl ou NaCl, era de se esperar que os processos de transferência radiativa energia continuasse operando, deste que a estrutura do DNA continuasse aproximadamente igual. Isto indica que mesmo que o GuCl provoque desintercalação, não deve haver nenhuma estrutura organizada do DNA que permita a existência do doador ou do acceptor à distância onde a transferência radiativa de energia ocorra. Ou seja, o DNA é desestruturado de forma que a distância entre o doador e o acceptor permite preferencialmente a interação dipolar; entretanto, não há nenhuma estrutura agregada do DNA com aceptores separados dos doadores de modo a se observar transferência radiativa.

Para explicar estes fatos considera-se o seguinte modelo fenomenológico: a molécula de DNA está enovelada. Ao se adicionar NaCl pode ocorrer uma alteração em sua conformação mas ainda esta é suficientemente estruturada de modo a permitir a transferência radiativa e a não radiativa. Quando se adiciona GuCl o enovelamento é desfeito facilitando a transferência de energia por interação dipolar (não radiativa), não havendo regiões onde o doador e o acceptor estão separados de modo a possibilitar a ocorrência dos processos radiativos.

Como já observado ocorrem alterações na posição do espectro de absorção de AM e no rendimento quântico de AA que podem alterar o valor de R_0 . Para investigar estas alterações foi calculado o valor de J e de ϕ para o sistema DNA/AA/AM com diferentes [GuCl], usando os espectros de absorção (Figura IV.6.8) e a variação na intensidade de emissão para o sistema DNA/AA (FIGURA IV.6.10). Os resultados são mostrados na TABELA IV.6.5. Ocorre separação (de 3,5 a 7,7Å) entre o doador e o acceptor com aumento da [GuCl] e ela existe mesmo quando [GuCl]=0,09mol.L⁻¹.

TABELA IV.6.5 Valores de ϕ , J , R_0 e r para o sistema DNA/AA/AM e GuCl.

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	ϕ	J (mol ⁻¹ .cm ²)	R_0 (Å)	r (Å)
0	0,75	$6,07 \times 10^{-14}$	43,7	53,4
0,09	0,66	$8,50 \times 10^{-14}$	45,2	58,9
0,28	0,54	$9,40 \times 10^{-14}$	44,5	61,1
0,42	0,49	$10,01 \times 10^{-14}$	44,2	59,0
0,85	0,42	$10,91 \times 10^{-14}$	43,7	56,9
1,31	0,40	$10,23 \times 10^{-14}$	42,9	58,1

Na TABELA IV.6.6 tem-se o grau de polarização médio para o sistema DNA/AA/AM, que é semelhante aos valores obtidos sem AM (TABELA IV.6.1). Isto indica que os sítios em que se encontram as moléculas de AA sofrem as mesmas alterações em ambos os sistemas.

TABELA IV.6.6 Grau de polarização médio (P) para o sistema DNA/AA/AM e GuCl.

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	P_{exc}	P_{em}
0,0	$0,22 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,03$
0,1	$0,21 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$
0,5	$0,13 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
1,0	$0,12 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$
2,0	$0,07 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,03$
4,0	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$

Estes resultados podem ser interpretados como devidos à alterações conformacionais no DNA, havendo ruptura das ligações de hidrogênio, alteração em seu empacotamento e separação entre D e A . É importante dizer que GuCl não causa alterações no pH (TABELA IV.6.7) suficientes para protonar a citidina⁴⁷ ($pK_a \cong 4,5$) e alterar a estrutura do DNA.

TABELA IV.6.7 Valores de pH para soluções contendo DNA e GuCl.

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	pH
-------------------------------	----

0,0	6,9
1,0	6,1
2,0	6,1
4,0	5,8

Em seu artigo Pritchard¹⁶ propôs um novo modelo de interação entre derivados de acridina e outras substâncias com estruturas semelhantes: elas interagem com os pares de bases e grupos fosfato de uma das fitas do DNA, devido ao fato que mesmo quando o DNA era desnaturado não se verificava uma redução do modo de ligação entre o corante e o DNA. Tal observação parece ser válida para o AA interagindo com o DNA na presença de GuCl, pois não se verificou o retorno das características espectroscópicas da sonda para aquela semelhante à observada na ausência do DNA e presença de GuCl (seção IV.5).

Portanto, os resultados aqui mostrados indicam que o GuCl desestrutura o DNA, provocando alterações nos espectros das sondas (absorção, excitação e emissão), no tempo de vida e no grau de polarização. Este último parâmetro permite estimar a porcentagem de desnaturação do DNA para cada concentração de GuCl e obter informações referentes ao equilíbrio entre os sítios que se encontram nas formas nativa e desestruturada. A relação entre P e a desestruturação do DNA foi estudada por Ellerton e Isenberg⁴⁸, verificando que P varia quando a sonda intercalada em DNA e a temperatura aumenta. O comportamento observado foi semelhante àquele quando da desnaturação térmica dessa macro-molécula, estudado mediante alterações nos espectros de absorção.

Assim, a desestruturação causada pelo desnaturante altera o grau de polarização, fornecendo informações sobre o equilíbrio:



EQUAÇÃO IV.6.1

onde: S_N , S_D e $GuCl$ indicam os sítios nativo, desestruturado e o GuCl, respectivamente.

Na FIGURA IV.6.14 obtém-se, através de ajuste linear, o valor da constante de equilíbrio para o sistema DNA/AA. Para isto considera-se a desestruturação do DNA está relacionada ao valor médio de P (TABELAS IV.6.1 e IV.6.4). Para $P=0,23$ e $0,04$ considera-se que o DNA está 100% na forma nativa e 100% na forma desestruturada, respectivamente. A razão S_D/S_N calculada e graficada em função da $[GuCl]$ forneceu a reta mostrada na FIGURA IV.6.14, cuja inclinação corresponde ao valor da constante de equilíbrio obtida (K_{eq}).

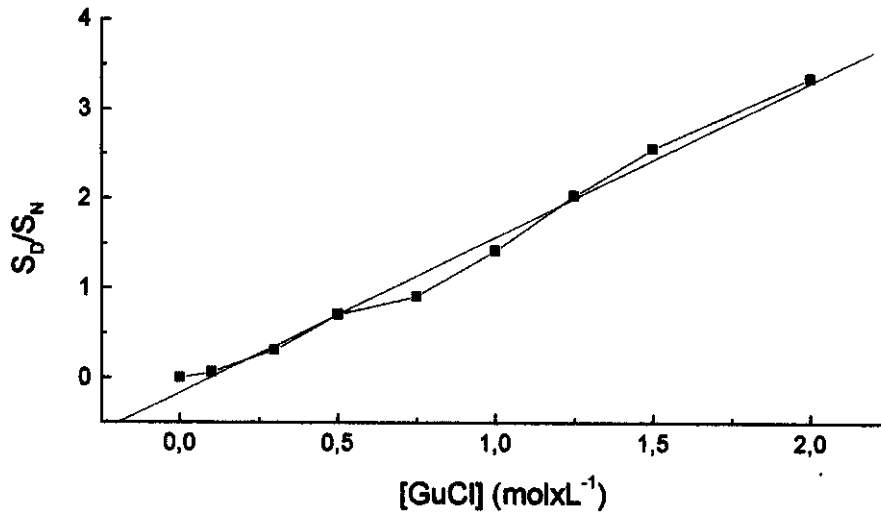


FIGURA IV.6.14 Razão entre as porcentagens de sítios nas formas desestruturada e nativa, em função da [GuCl].

O valor de ΔG envolvido neste processo foi estimado em $-1,36\text{KJ.mol}^{-1}$ utilizando a EQUAÇÃO IV.6.2 e considerando que $K_{\text{eq}} = 1,73$.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{\text{eq}} \qquad \text{EQUAÇÃO IV.6.2}$$

Este ΔG° não pode ser tomado como a energia livre de desestruturação do DNA, pois nesse equilíbrio foi desprezado outros equilíbrios que podem afetar o K_{eq} , como aqueles relativos ao corante AA ocupando os sítios nativos (S_N^{AA}) e desestruturados (S_D^{AA}), influenciados pela adição de GuCl e que podem ser descritos pelas EQUAÇÕES ⁴⁹:



IV.7 EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AM

A FIGURA IV.7.1 mostra os espectros de absorção da solução DNA/AM na região do visível, em diferentes pressões.

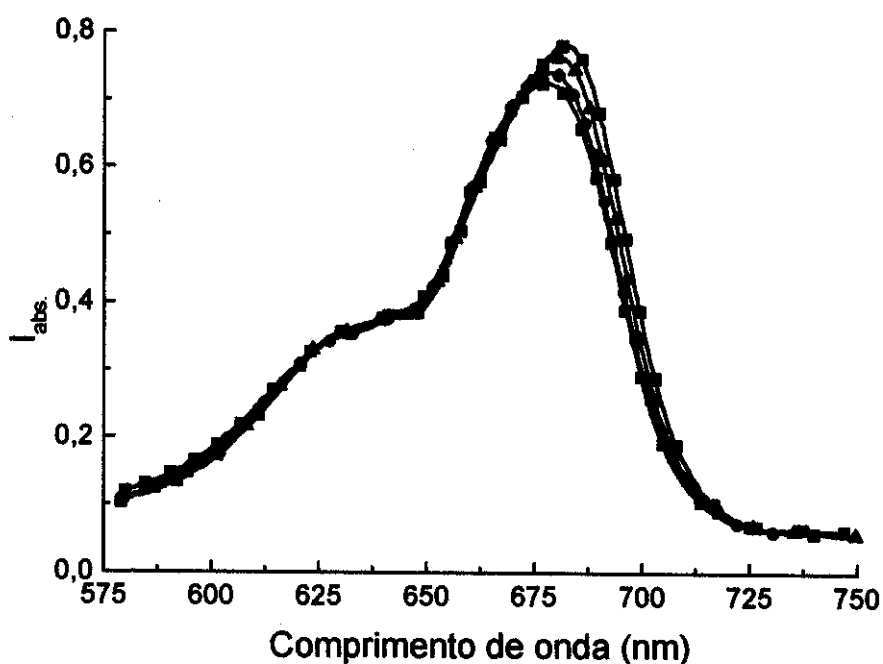


FIGURA IV.7.1 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AM em diferentes pressões: ■ 0, ● 680, ▲ 1370 e ◆ 2050atm; R=20,7.

Há um deslocamento do espectro de absorção para o vermelho, indicando um aumento na polaridade do meio em que o AM se encontra.

Estudos realizados por Macgregor^{50,51,52} indicaram que o DNA quando submetido a alta pressão tem sua estrutura estabilizada, havendo um aumento linear da temperatura de fusão com a pressão e uma variação no volume molar.

Na FIGURA IV.7.2 observa-se o efeito da pressão no espectro de emissão de AM intercalado em DNA. A diminuição da I_{em} com a pressão indica que este corante não sofre desintercalação e as interações que levam à supressão da fluorescência são favorecidas.

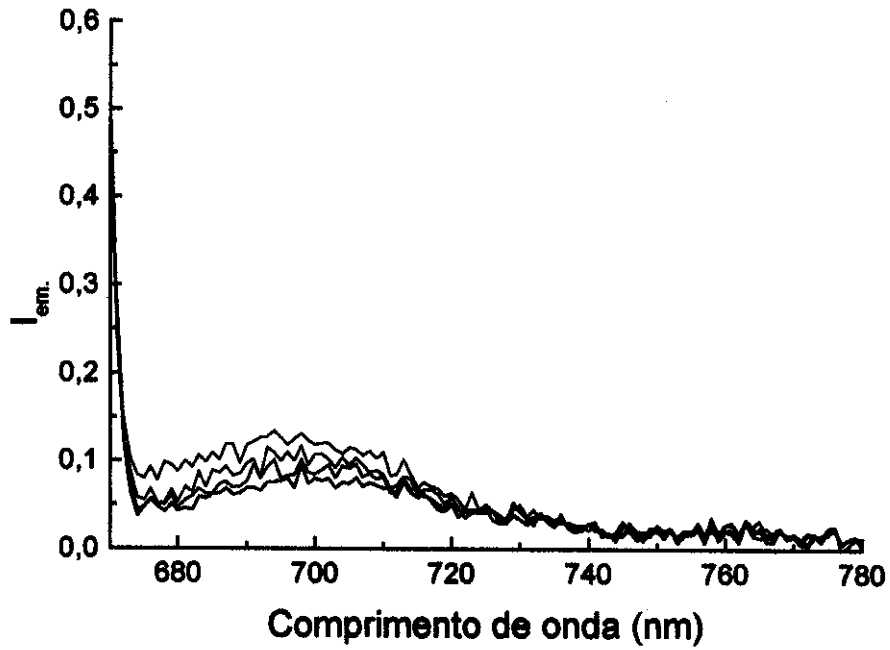


FIGURA IV.7.2 Espectros de emissão de uma solução contendo DNA/AM em diferentes pressões: 0, 680, 1370 e 2050 atm; $R=20,7$.

O deslocamento do máximo de absorção e a redução na intensidade de emissão da sonda pode indicar que esta se encontra inserida mais intensamente no sítio de intercalação.

IV.8 EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA

A FIGURA IV.8.1 mostra os espectros de absorção do DNA no sistema DNA/AA. A variação (8%) na intensidade de absorção com a pressão indica que este sistema possui uma orientação mais desorganizada entre os dipolos dos pares de bases ou há uma redução da interação entre os íons existentes no tampão e o DNA. Esta variação é da mesma ordem de grandeza, mas devida a um efeito contrário, ao observado quando se adiciona NaCl (FIGURA IV.3.1).

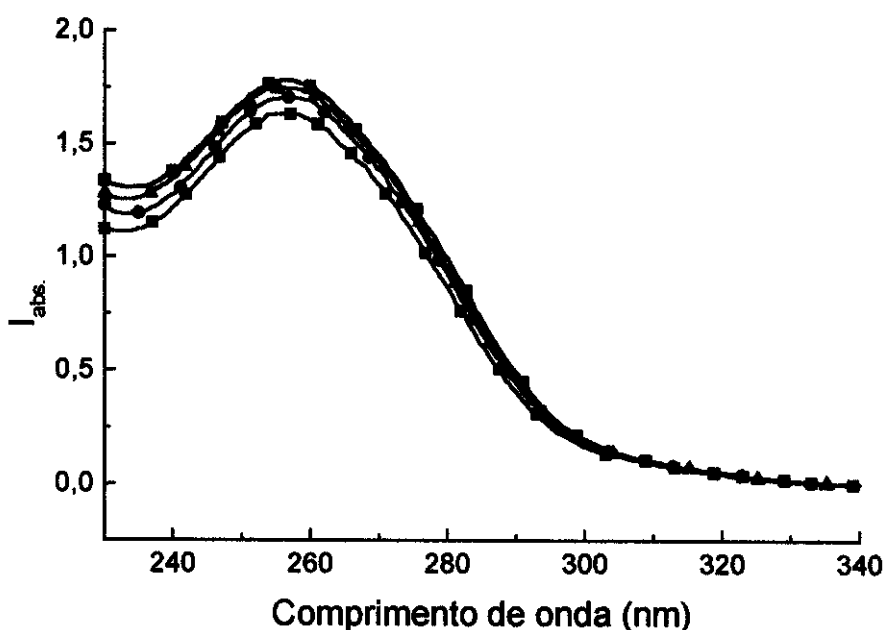


FIGURA IV.8.1 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA em diferentes pressões: ■ 0, ● 820, ▲ 1640 e ■ 2460 atm .

As variações no espectro de absorção de AA (FIGURA IV.8.2) são semelhantes, mas de menor intensidade, que as observadas no AM. A diferença estrutural entre as moléculas de AM e de AA parece ser a responsável por esta diferença. A molécula de AM possui dois heteroátomos no anel central, um de enxofre (na mesma posição que o de nitrogênio do AA) e outro de nitrogênio na posição oposta ao enxofre, de modo que ela é mais polarizável que a de AA. A diferença na polarizabilidade parece induzir maior sensibilidade do AM para monitorar alterações no ambiente em que se encontra através do espectro de absorção.

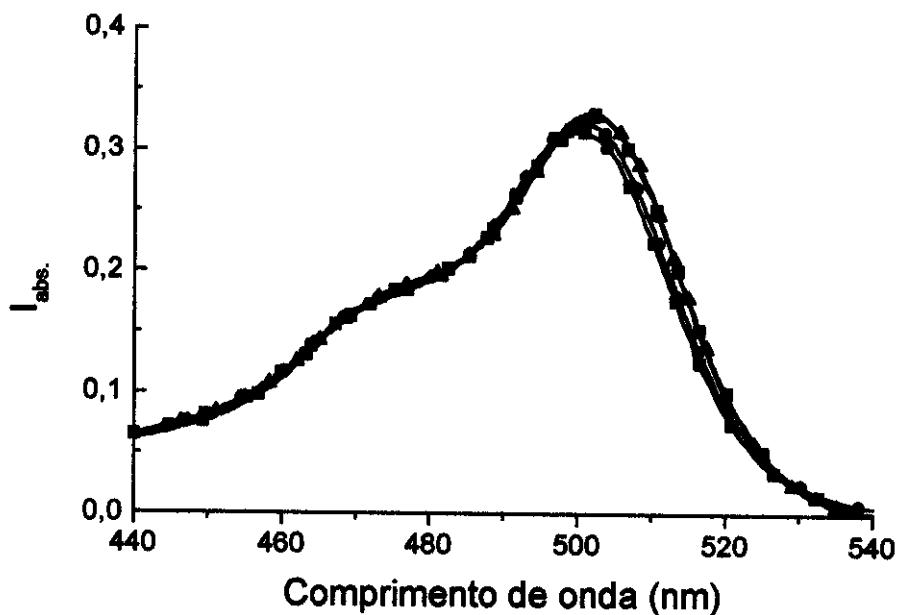


FIGURA IV.8.2 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA em diferentes pressões: ■ 0, ● 820, ▲ 1640 e ■ 2460 atm; $R=23,0$.

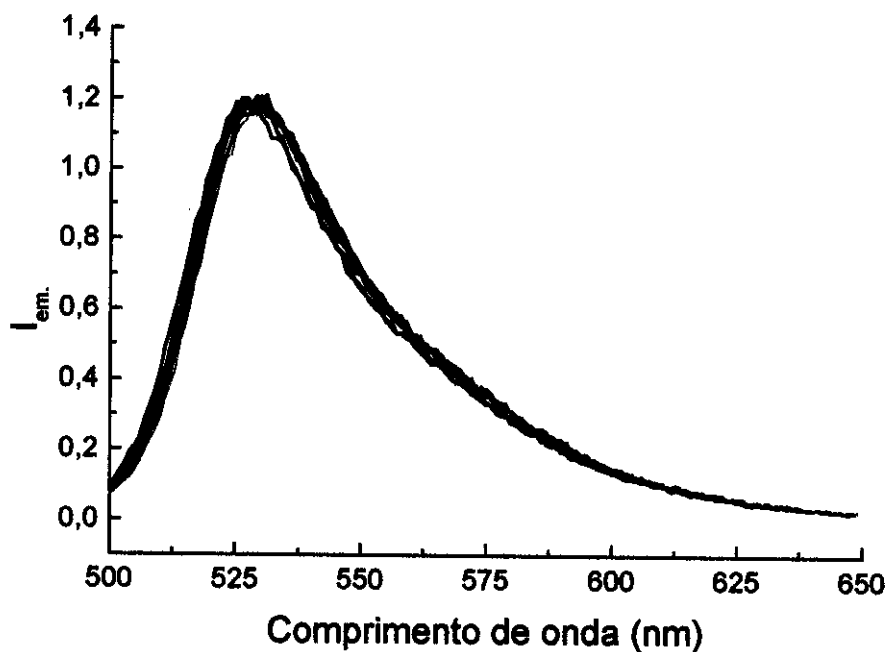


FIGURA IV.8.3 Espectros de emissão de uma solução contendo DNA/AA em diferentes pressões: —0, —410, —820, —1230, —1640, —2050 e —2460 atm; $R=23,0$.

Pode-se ver (FIGURA IV.8.3) que a I_{em} para as soluções contendo DNA e AA se altera muito pouco com a pressão. Isto indica que a rigidez do sítio em que o AA se encontra é praticamente a mesma. Assim, as alterações espectrais deste corante possuem as mesmas origens que as para o AM.

A molécula de DNA, quando em determinadas condições, se ordena em estruturas mais complexas. Por exemplo, quando se aumenta a concentração de sais, poli-peptídeos básicos, óxido de polietileno⁵³, polímeros inertes ou etanol, ela assume formas mais condensadas com diferentes morfologias, adotando estruturas super-espiraladas, em contas de rosário, haste e toroidais⁵⁴. Algumas delas são obtidas precipitando DNA com etanol em meios com diferentes forças iônicas. Na FIGURA IV.8.4 são visualizados os resultados obtidos por Eickbush⁵⁵ que representam algumas destas formas. A FIGURA IV.8.4 "A" corresponde ao DNA super espiralado, a "B" à estrutura de contas de rosário e na "C" às hastes. Estas estruturas possuem diferentes diâmetros: para o DNA super espiralado é cerca de 80Å, 150Å para a estrutura de contas de rosário e cerca de 2000Å para a haste.

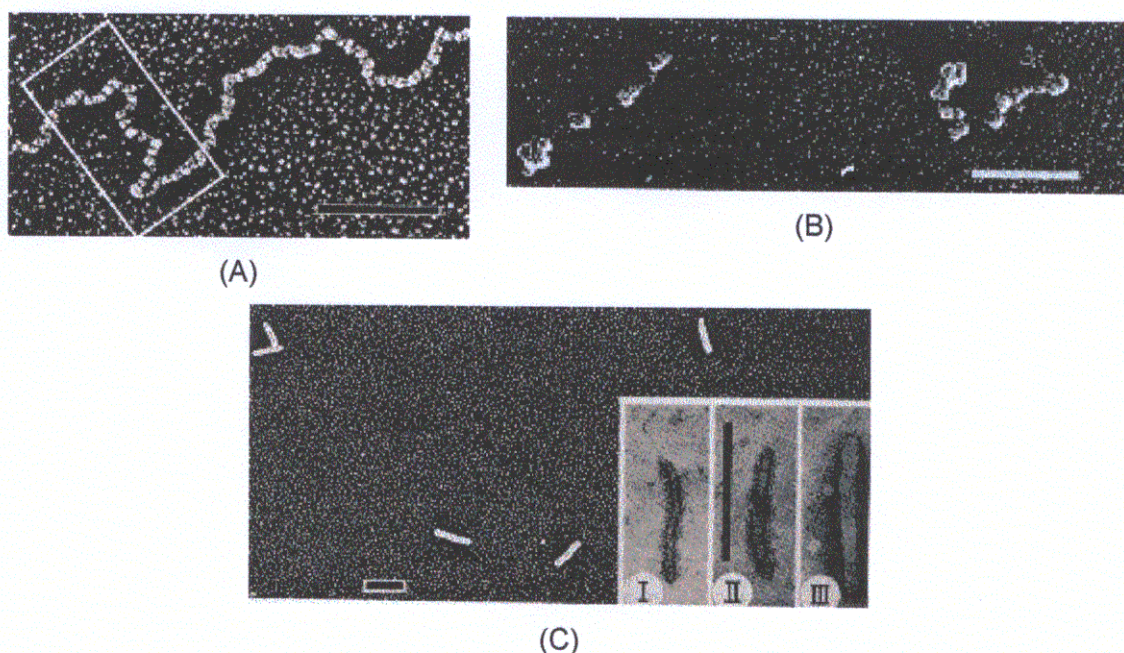


FIGURA IV.8.4 Micrografias de DNA precipitado com 95% de etanol em meios com diferentes forças iônicas. A barra em cada FIGURA corresponde a 2000Å. (A) Fibras obtidas com 1mmol.L^{-1} de tampão Tris pH 7,5. (B) Fibras obtidas com 1mmol.L^{-1} de Tris pH 7,5 e 10mmol.L^{-1} de acetato de amônio. (C) Hastes obtidas com 1mmol.L^{-1} de Tris pH 7,5 e $0,5\text{mol.L}^{-1}$ de acetato de amônio.

É possível que o DNA adote uma de suas formas mais compactas em solução aquosa, na qual ele ainda é uma dupla hélice pertencente a família B-DNA. Quando se aplica pressão os íons que rodeiam esta estrutura sofrem um aumento no grau de hidratação e se distanciam da estrutura do DNA, alterando o espectro de absorção. Esta redução na camada de íons que

rodeia o DNA também é sentida pela sonda que mostra um deslocamento batocrômico no espectro de absorção.

Na FIGURA IV.8.5 verifica-se que o sistema se comporta de maneira ligeiramente diferente (5,1% menor). Isto não se deve à degradação do DNA com o aumento de pressão, e sim, ao acesso das moléculas de corante às regiões cujas concentrações de sítios AT/CG são diferentes, refletindo nas intensidades de emissão. Quando a pressão aumenta, são desfeitas estruturas mais complexas com diferentes graus de empacotamentos, expondo regiões com diferentes concentrações de pares de bases à sonda. Ao reduzir a pressão, o DNA leva mais tempo para se reordenar, influenciando no rendimento quântico da sonda intercalada.

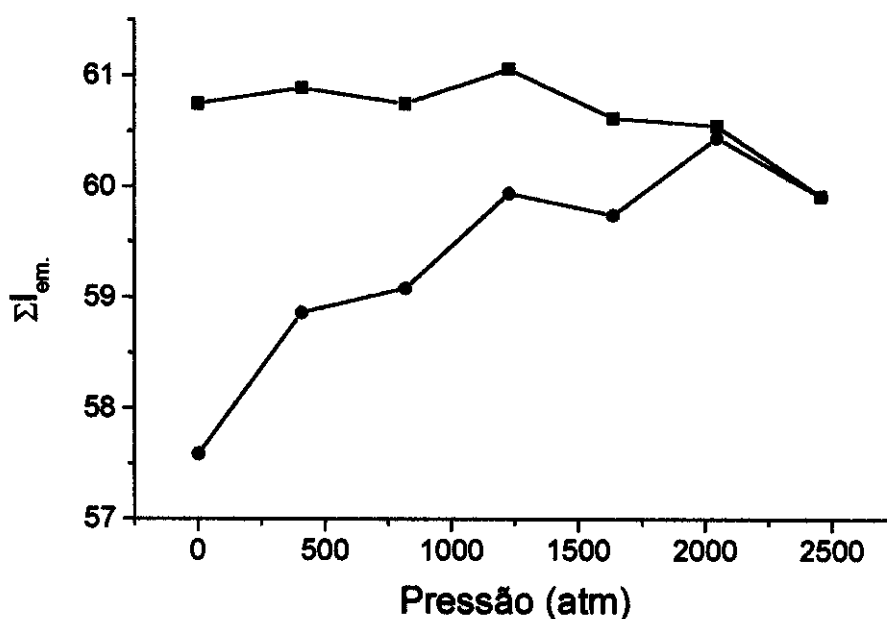


FIGURA IV.8.5 Área sob a banda de emissão (de 500 a 650nm) em diferentes pressões ■ aumento e ● diminuição.

IV.9 EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA/AM

Nas FIGURAS IV.9.1, IV.9.2 e IV.9.3 encontram-se os espectros de absorção e emissão das soluções contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões. Eles reproduzem as alterações espectrais observadas para os sistemas DNA/AA e DNA/AM. A supressão na fluorescência verificada na solução sem GuCl é maior que aquela relativa ao sistema DNA/AA.

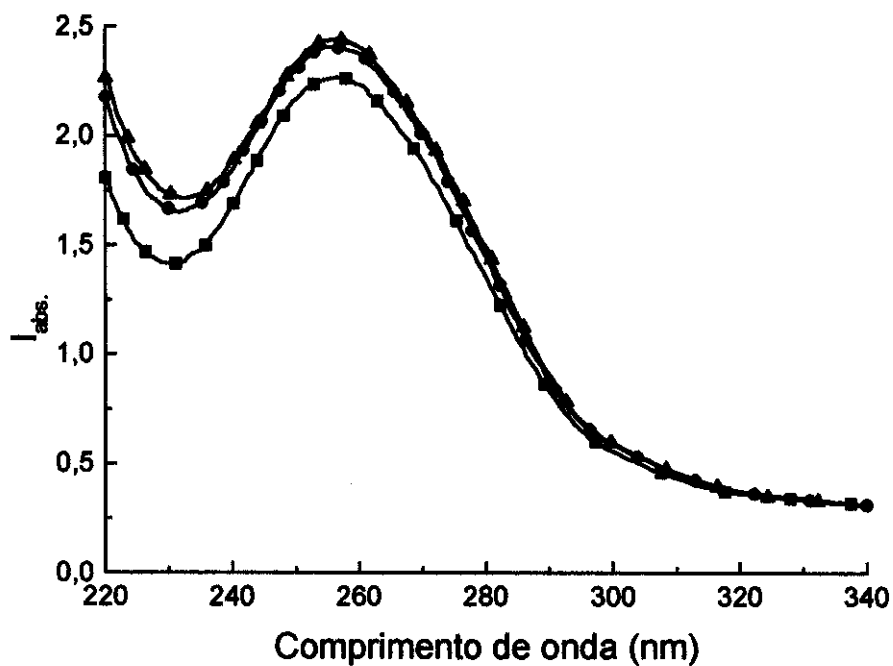


FIGURA IV.9.1 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050atm.

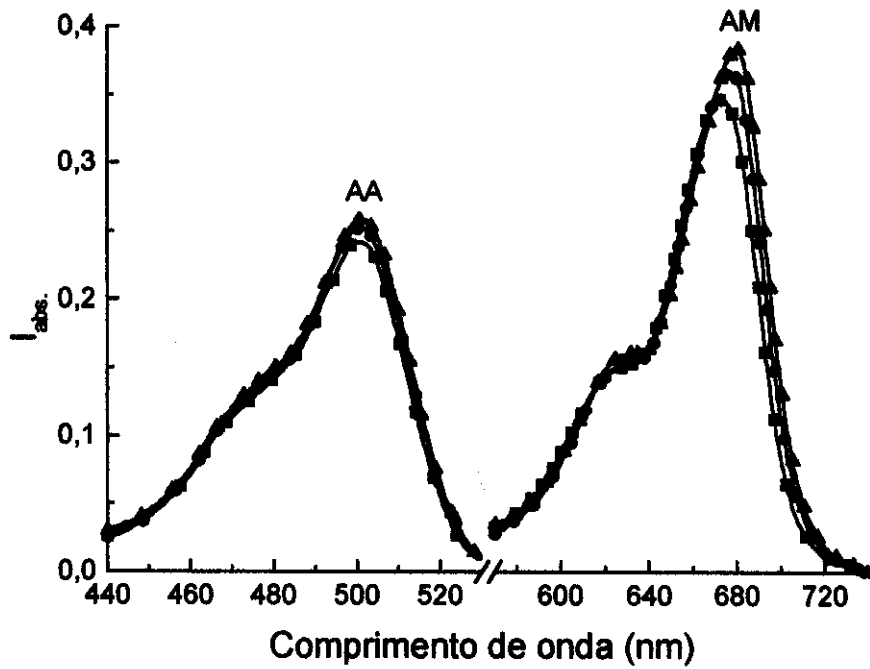


FIGURA IV.9.2 Espectros de absorção de uma solução contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050atm; R=18,6.

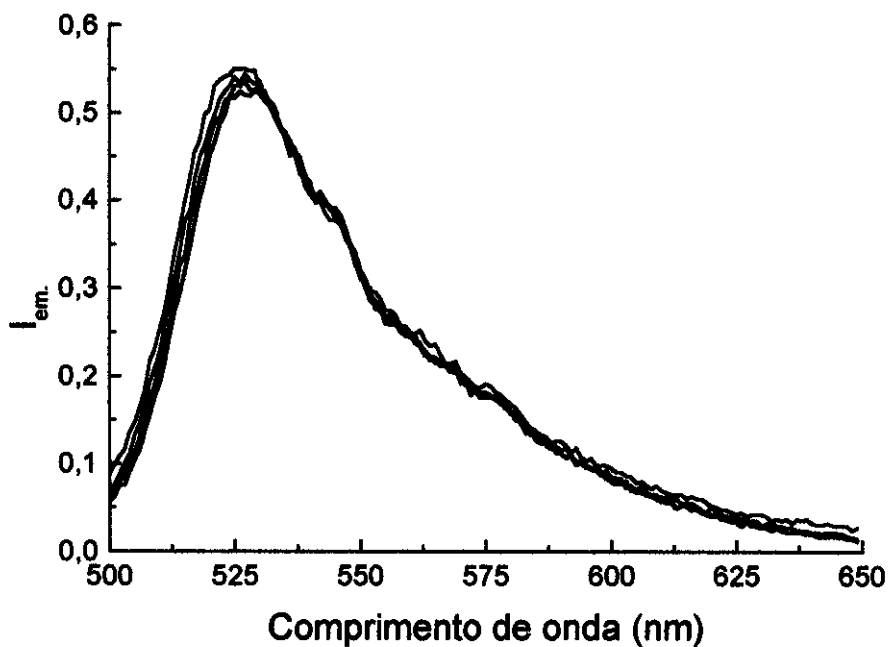


FIGURA IV.9.3 Espectros de emissão de uma solução contendo DNA/AA/AM em diferentes pressões: —0, -680, -1360 e -2050 atm; R=18,6.

A FIGURA IV.9.4 mostra a razão entre a área sob a banda de emissão e a intensidade de absorção em 490nm ($\Sigma I_{em.}/I_{abs.}$) com a pressão. Para as soluções contendo DNA/AA/AM há uma redução em I_{em} com o aumento de pressão, o que pode ser devido à aproximação entre o doador e o acceptor e/ou a uma alteração da integral de sobreposição dos espectros, pois ocorrem mudanças no espectro de absorção do acceptor. É possível isto ocorra por causa da transferência de energia pois o espectro de absorção de AM altera-se muito pouco entre 500 e 650nm, mas não o rendimento quântico de AA.

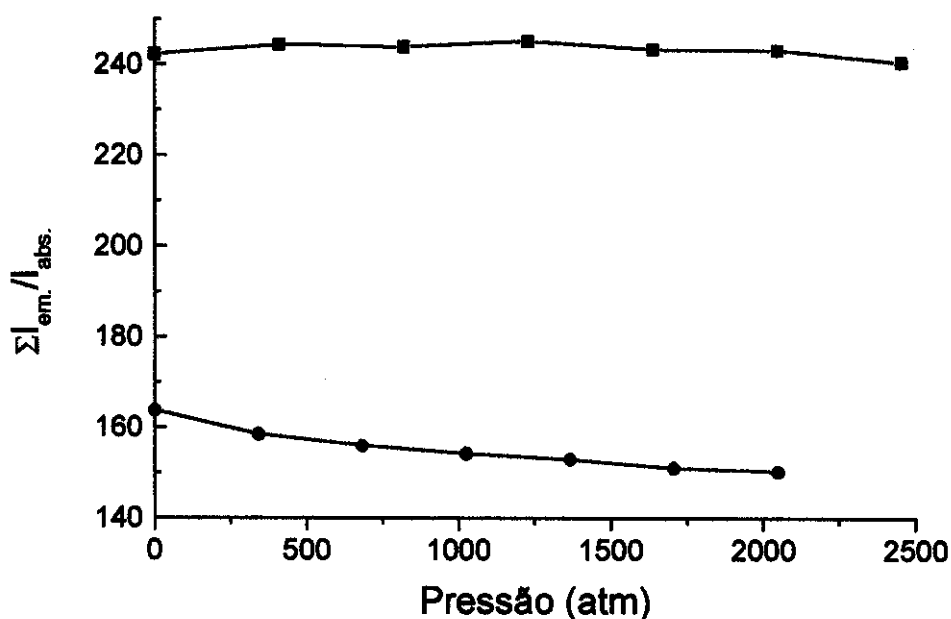


FIGURA IV.9.4 Razão entre a área sob o espectro de emissão ($\Sigma I_{em.}$) e a intensidade de absorção a 490nm ($I_{abs.}$) versus pressão (atm) para o sistemas ■ DNA/AA e ● DNA/AA/AM.

O valor do coeficiente de compressibilidade da água⁵⁶ é $4,94 \times 10^{-6} \text{ atm}^{-1}$, o que acarreta uma variação negativa de 1% no volume quando se altera a pressão de 0 a 2050atm. Como se observa na FIGURA IV.9.4 a variação na intensidade de emissão é $\approx 8,9\%$, maior que a esperada pela contração de volume da água.

Com os valores observados nessa FIGURA calcula-se a eficiência de transferência de energia (FIGURA IV.9.5) e a variação na distância entre o doador e acceptor (FIGURA IV.9.6). Há uma variação ao redor de 5%, a qual, segundo a FIGURA IV.2.4, corresponderia a uma redução no valor de R de 18,6 para algo próximo de 17.

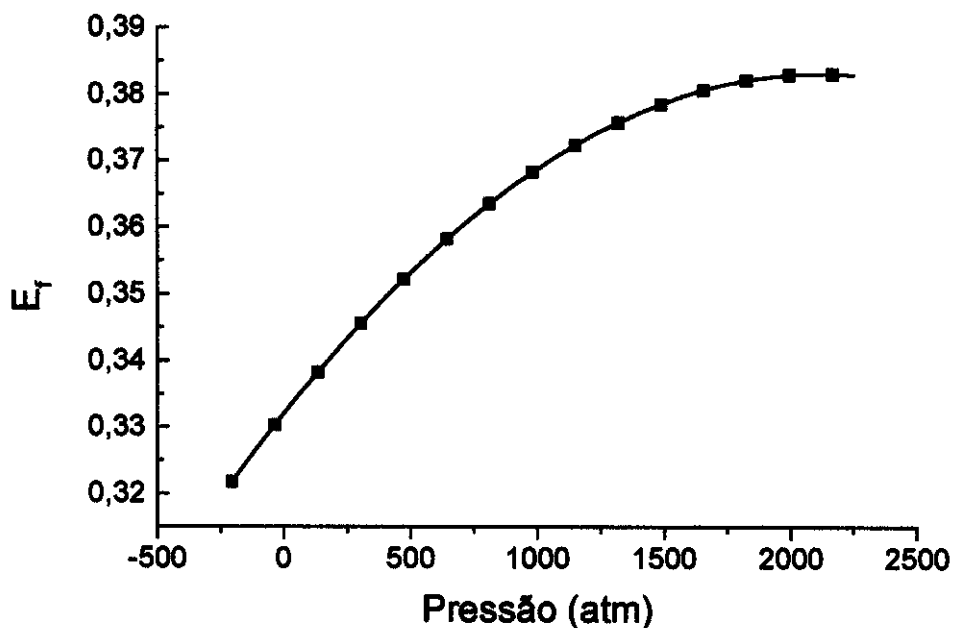


FIGURA IV.9.5 Eficiência de transferência de energia entre o doador e acceptor com a variação da pressão.

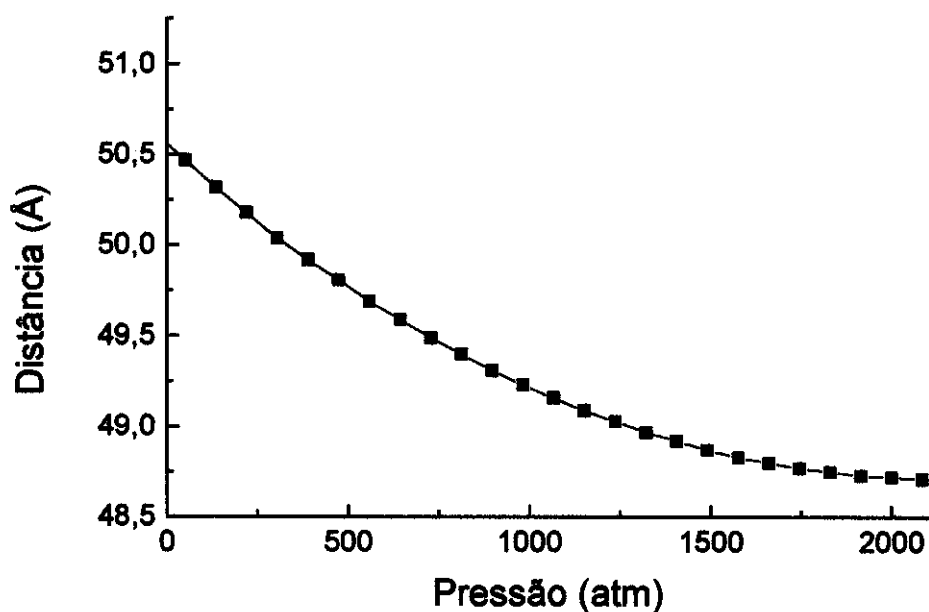


FIGURA IV.9.6 Distância média entre o doador e acceptor com o aumento da pressão.

Como já discutido (FIGURA IV.9.4) o aumento da pressão aumenta a hidratação do DNA alterando seu grau de ordenamento e suas estruturas complexas (super espiralada, contas de rosário e haste), que podem ser comprimidas formando estruturas mais compactas (entre uma mesma fita de DNA) e agregadas (entre diferentes fitas de DNA), reduzindo a

distância entre o doador e acceptor. A compactação do DNA pode ser atribuída à retirada de grupos iônicos, diminuindo as interações repulsivas em sua camada de hidratação e favorecendo a aproximação entre diferentes regiões da macromolécula. A distância entre o doador e acceptor parece se estabilizar para pressões $>1710\text{atm}$, sendo obtido um valor médio $=48,7\text{Å}$, menor que o valor inicial ($50,6\text{Å}$).

IV.10 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO E DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA

O aumento da pressão (FIGURA IV.10.1) incrementa a intensidade de absorção do DNA, sendo a variação da mesma ordem de grandeza daquela na ausência de GuCl.

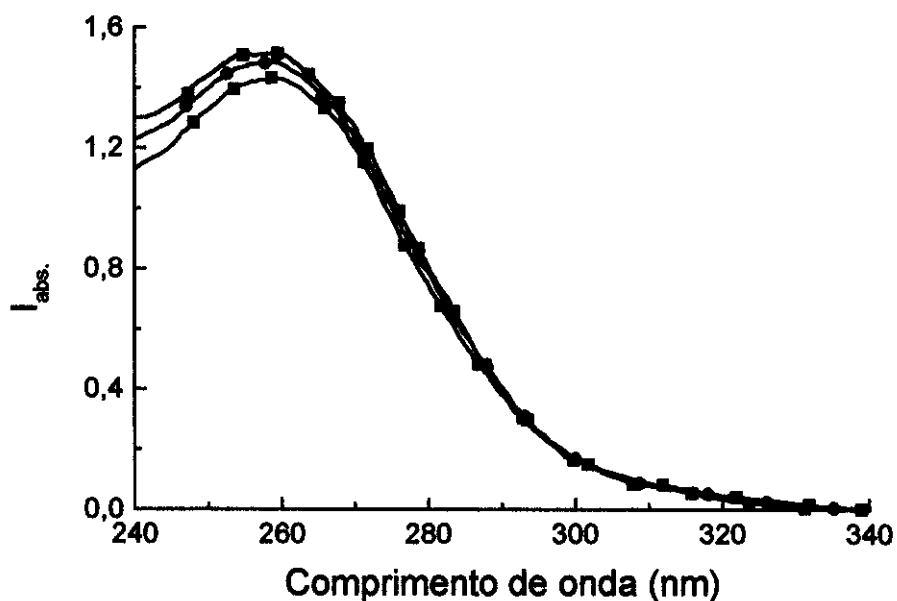


FIGURA IV.10.1 Espectros de absorção das soluções de DNA/AA com $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050 atm.

Na FIGURA IV.10.2 verifica-se a variação na posição do máximo de absorção para a banda do corante AA, mais acentuada que a observada sem GuCl (FIGURA IV.8.2).

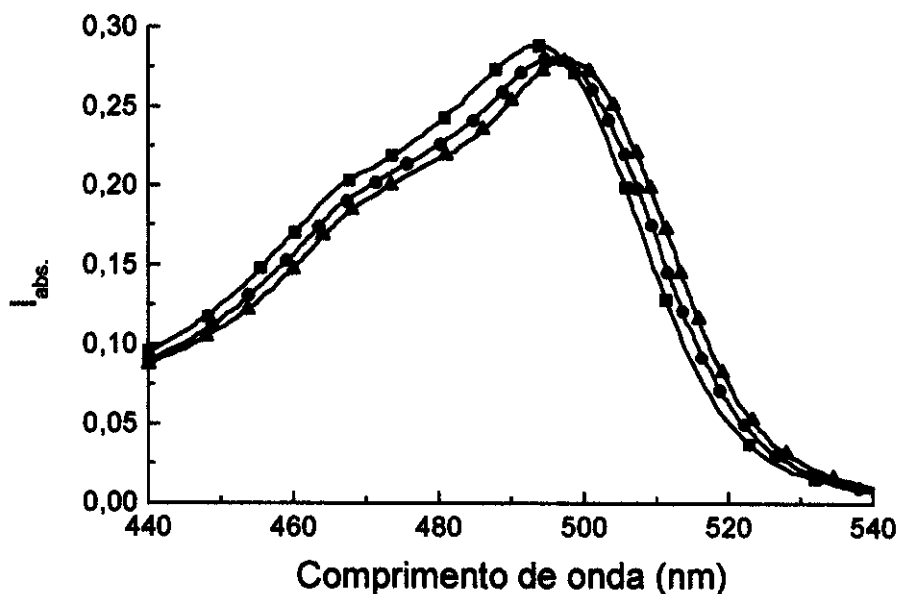


FIGURA IV.10.2 Espectros de absorção das soluções de DNA/AA com 0,5 mol.L⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 1230 e ▲ 2050 atm; R=23,0.

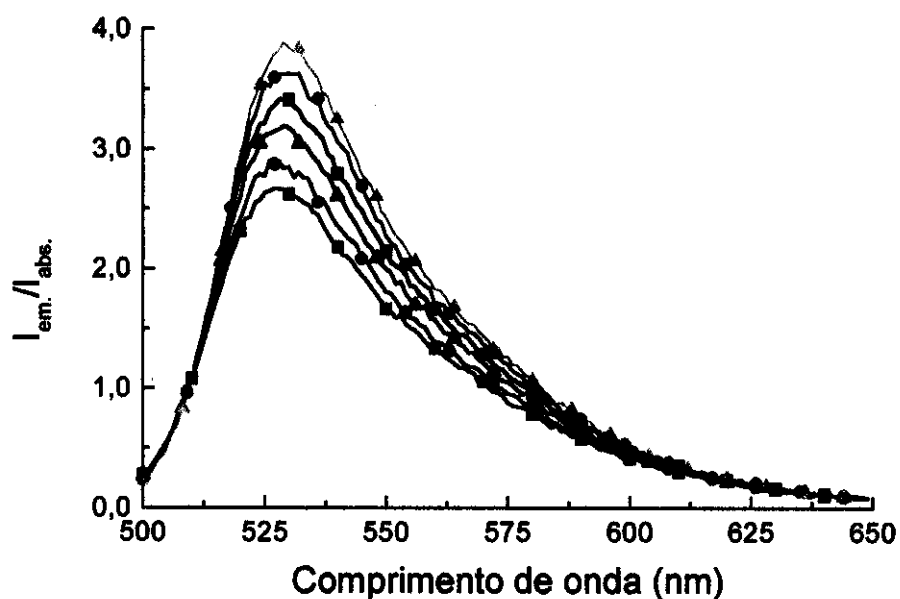


FIGURA IV.10.3 Espectros de emissão (normalizados pela I_{abs.} em 490nm) das soluções de DNA/AA com 0,5 mol.L⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 410, ▲ 820, ■ 1230, ● 1640 e ▲ 2050 atm; R=23,0.

A FIGURA IV.10.3 evidencia o aumento em I_{em.} com a pressão. Quando se utiliza o desnaturante GuCl (0,5 mol.L⁻¹) ocorre supressão na fluorescência, diminuindo o rendimento

quântico do AA de 0,75 para $\approx 0,45$ (FIGURA IV.6.5). Por outro lado, o aumento da pressão incrementa linearmente o rendimento quântico (FIGURA IV.10.4), sendo $\approx 0,62$ a 2050atm.

A FIGURA IV.10.4 mostra que a adição de GuCl ($0,5\text{mol.L}^{-1}$ para $2,0\text{mol.L}^{-1}$) altera o incremento da intensidade de emissão com a pressão, tornando-o menos acentuado. A pressão necessária para que o AA volte a apresentar rendimento quântico igual a 0,75 para o sistema DNA/AA + $0,5\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl é $\approx 4050\text{atm}$, enquanto que para o sistema com $2,0\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl, essa pressão é 13280atm , ou seja, o aumento de quatro vezes na [GuCl] provocou um aumento de 3,3 vezes na pressão necessária para restaurar a intensidade de emissão do AA na ausência de GuCl.

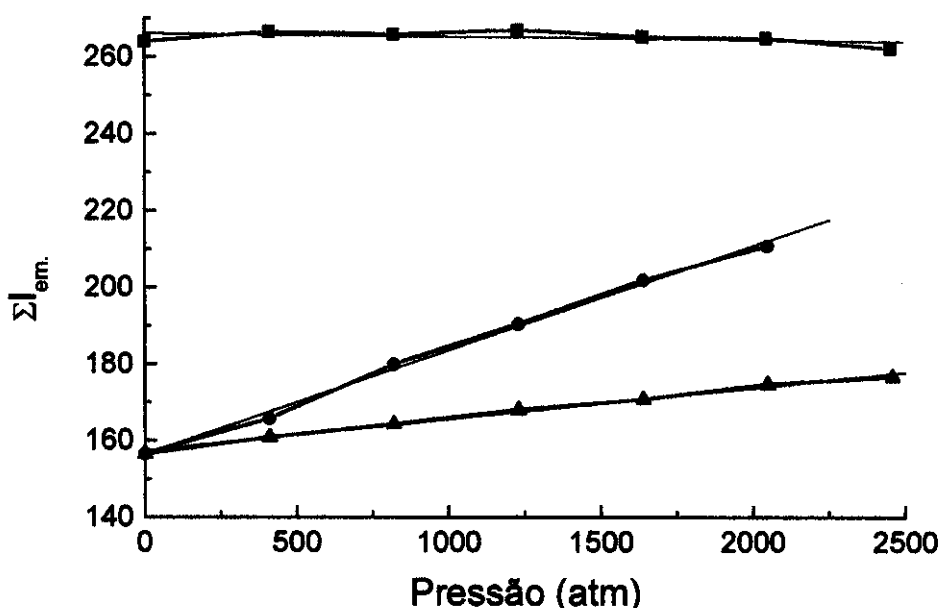


FIGURA IV.10.4 Integral sob a banda de emissão para o sistema DNA/AA em diferentes pressões. [GuCl]: ■ 0; ● 0,5 e ▲ 2,0mol.L⁻¹.

Uma possível explicação para este comportamento é que o corante AA só intercala após a expulsão do GuCl das proximidades dos sítios. Assim, com o aumento da concentração seria necessário remover um número maior de moléculas do desnaturante, para o que é necessária uma pressão maior.

Considerando que no DNA os grupos fosfato possuem carga negativa, espera-se que os cátions sejam atraídos por eles. Se o cátion é pequeno e altamente hidratado pode-se imaginar que eles se distribuem homoganeamente pela solução, inclusive na camada de hidratação secundária do DNA. Na camada primária isto não ocorre pois ela é impermeável a íons. Os cátions, altamente hidratados, presentes na segunda camada reduzem o grau de hidratação do DNA mas, devido à forte interação dos mesmos com moléculas de água livres e

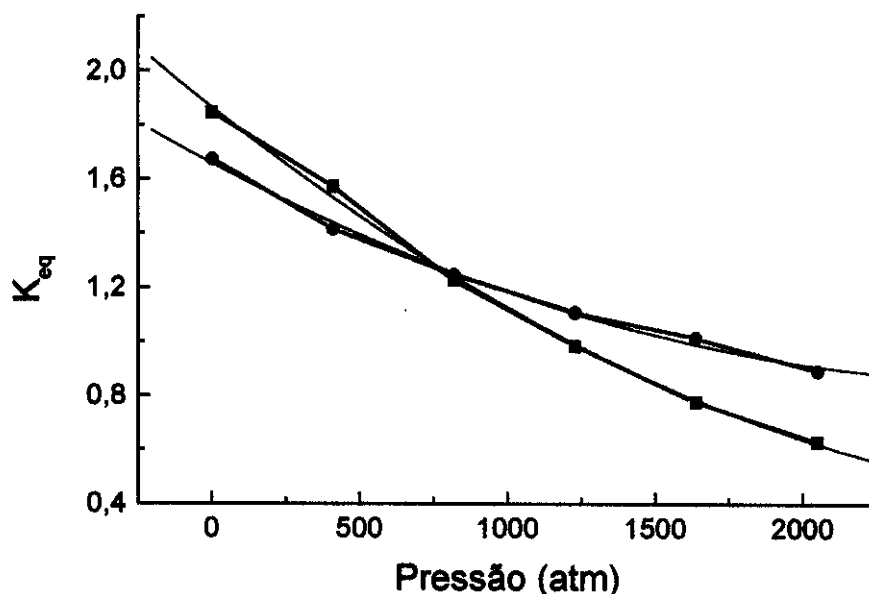


FIGURA IV.10.6 Constante de equilíbrio em função da pressão para diferentes [GuCl]: ■ 0,5 e ● 2,0 mol.L⁻¹.

Usando as curvas (verdes) ajustadas pode-se estimar os valores de ΔG com a pressão usando a EQUAÇÃO IV.10.1.

$$\Delta G = -RT \ln \frac{K_2}{K_1} \quad \text{EQUAÇÃO IV.10.1}$$

A variação na energia livre para a curva da FIGURA IV.10.6 é 2,67 kJ.mol⁻¹ (para 0,5 mol.L⁻¹ de GuCl) e 1,56 kJ.mol⁻¹ (para 2,0 mol.L⁻¹ de GuCl). Estes valores possuem a mesma grandeza que os observados anteriormente mas são de sinais opostos, indicando que o aumento de pressão fornece a mesma variação na energia livre que a adição de GuCl. Entretanto, o sentido do processo favorável é o inverso. Ou seja, o aumento da [GuCl] favorece a desestruturação do DNA enquanto que o aumento na pressão favorece a estrutura nativa.

Para a solução com 2,0 mol.L⁻¹ de GuCl verificou-se uma variação de 23% na porcentagem de sítio nativo a 1 atm para 36% a 2050 atm. Este último valor se aproximou do observado (52%) para a solução com 0,5 mol.L⁻¹ a 1 atm. O valor de 36% foi intermediário ao obtido para as soluções com 0,5 e 2,0 mol.L⁻¹ de GuCl.

Através dos gráficos mostrados na FIGURA IV.10.7 pode-se estimar a variação de volume associado ao sistema estudado.

$$\frac{\partial \ln K}{\partial P} = - \frac{\Delta V}{RT} \quad \text{EQUAÇÃO IV.10.2}$$

onde ΔV é a variação de volume padrão de reação, a variação em volume entre os estados padrões dos reagentes e produtos devido ao aumento de pressão, R a constante dos gases, T a temperatura, K a constante de equilíbrio e P a pressão.

Os coeficientes angulares das retas (FIGURA IV.10.7) são $5,36 \times 10^{-4}$ e $2,97 \times 10^{-4}$ correspondendo a $\Delta V = 13,1$ e $7,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ para as soluções com $0,5$ e $2,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

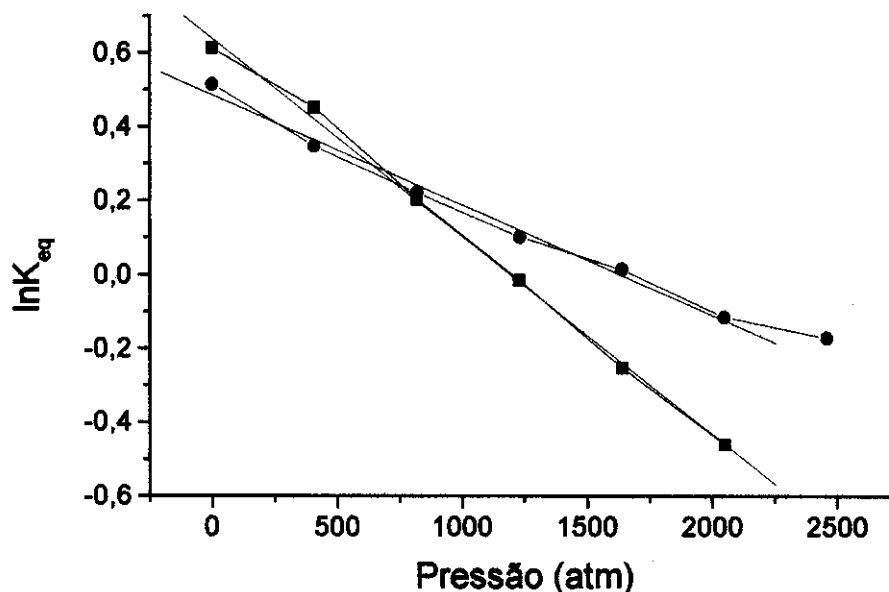
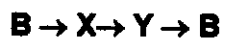


FIGURA IV.10.7 $\ln K_{eq}$ em função da pressão.

A adição de $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de GuCl às soluções contendo DNA e AA a 1 atm provoca redução significativa na intensidade de fluorescência. O grau de polarização pouco se altera, sofrendo uma variação mais acentuada conforme aumenta a $[\text{GuCl}]$. Associado a esta variação atribui-se um equilíbrio entre espécies, uma mais estruturada (alto grau de polarização) e outra menos estruturada (pequeno grau de polarização). A intensidade de emissão associada à espécie menos estruturada não sofre alterações significativas. O aumento na pressão incrementa a intensidade de emissão, indicando que a espécie menos estruturada está se convertendo na outra.

A adição de $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de GuCl altera a estrutura do B-DNA para uma forma "X" cuja intensidade de emissão varia, mas não ocorre alteração no grau de polarização. A adição posterior de GuCl desestrutura a forma "X" para a "Y", cujo grau de polarização é menor, indicando maior liberdade da sonda. O incremento na pressão, em presença de GuCl , estrutura o DNA de forma a se obter uma estrutura semelhante a B, restaurando a intensidade de emissão (EQUAÇÃO IV.10.3).



EQUAÇÃO IV.10.3

Segundo Ivanov⁵⁷ quando se adiciona pequenas quantidades de GuCl (10^{-4} - 10^{-5} mol.L⁻¹) a uma solução contendo DNA e 78% de etanol ocorre alteração no espectro de dicroísmo circular que caracteriza a conversão da forma A-DNA para a B-DNA, estabilizando esta última estrutura. Isto reforça a suposição de uma alteração entre estruturas do DNA para soluções cujas $[\text{GuCl}]$ são $\leq 0,1$ mol.L⁻¹.

IV.11 EFEITO DO CLORETO DE GUANIDÍNIO E DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O SISTEMA DNA/AA/AM

As alterações no espectro de absorção (FIGURA IV.11.1) são semelhantes àsquelas observadas quando da intercalação do AA e do AM, indicando que o aumento da pressão favorece este processo quando ambas as sondas estão presentes.

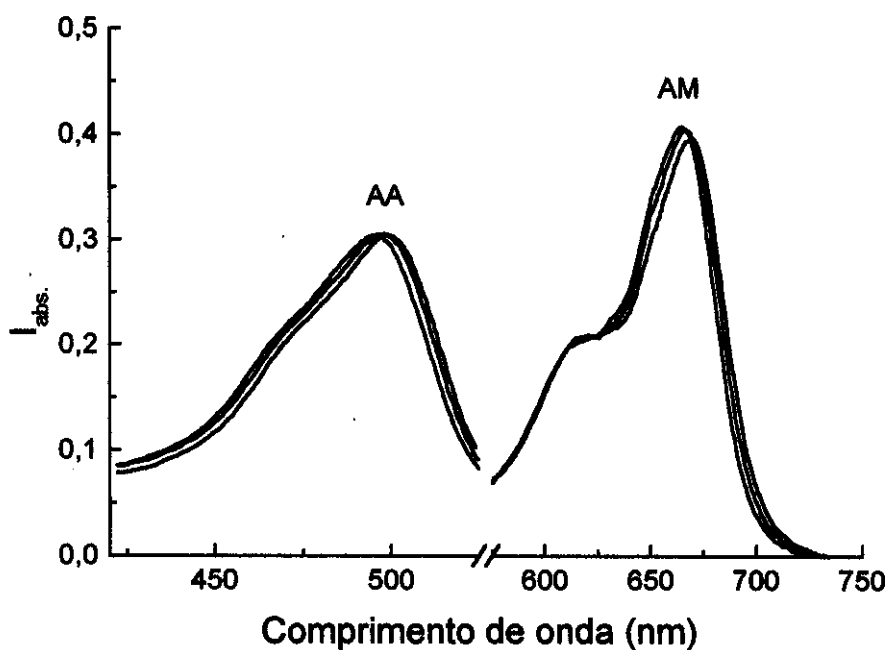


FIGURA IV.11.1 Espectros de absorção da solução de DNA/AA/AM e 0,5mol.L⁻¹ de GuCl em diferentes pressões: — 0, — 1025 e — 2050atm; R=18,6.

Na FIGURA IV.11.2 observa-se o gráfico da integral sob a banda de emissão do AA no sistema DNA/AA/AM, em função da pressão. Os espectros estão na FIGURA IV.11.3.

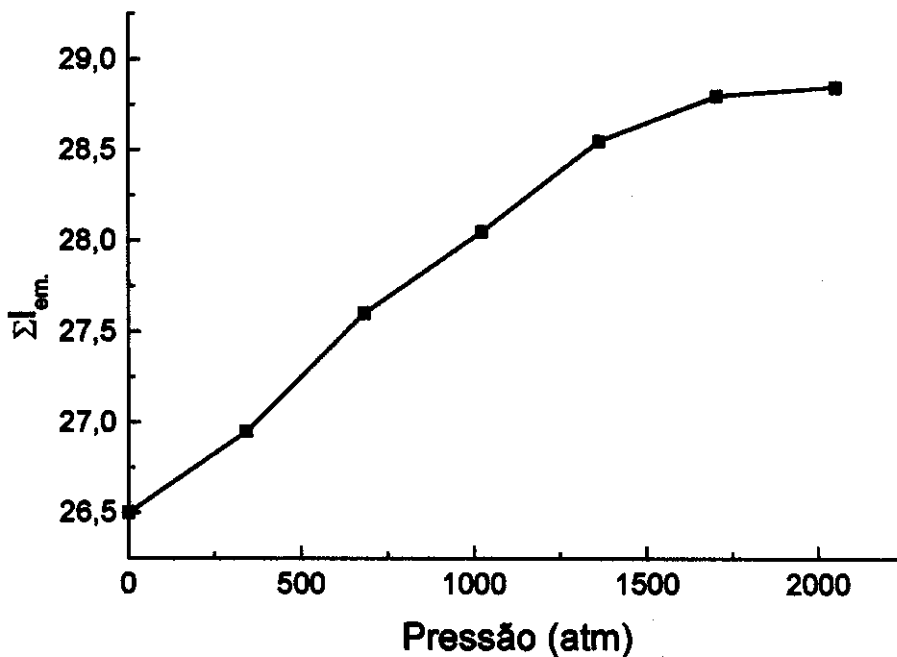


FIGURA IV.11.2 Integral sob a banda de emissão para soluções contendo DNA/AA/AM e $0,5\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl.

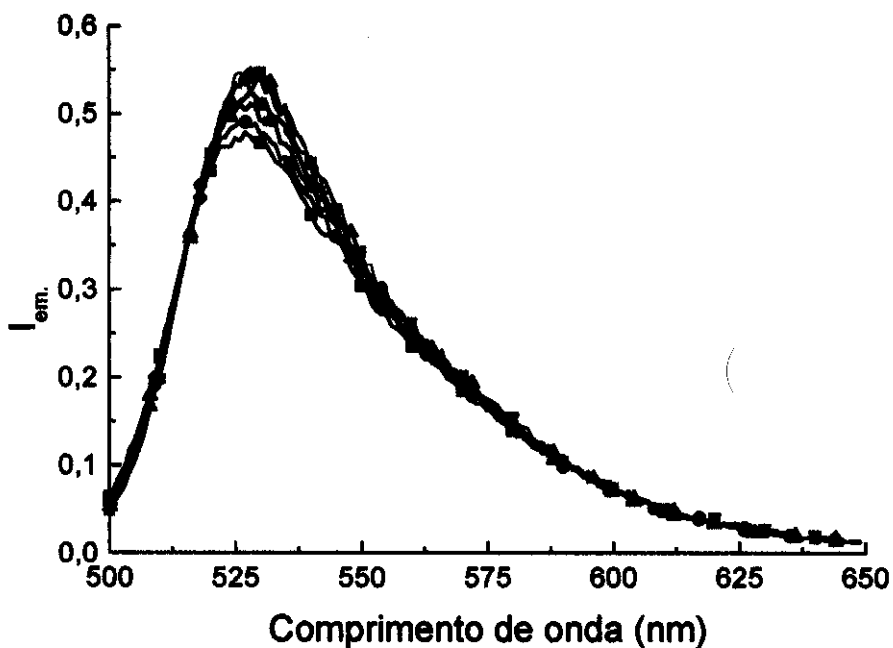


FIGURA IV.11.3 Espectros de emissão da solução de DNA/AA/AM e $0,5\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl em diferentes pressões: ■ 0, ● 340, ▲ 680, ■ 1025, ● 1370, ▲ 1710 e ■ 2050atm; R=18,6.

Na FIGURA IV.11.4 estão comparadas essas integrais para os sistemas DNA/AA/AM e DNA/AA. O aumento de I_{em} para o sistema com AM não é tão acentuado quanto o observado no sistema sem AM. Isto indica que há supressão de fluorescência quando a pressão aumenta. Portanto, enquanto no sistema DNA/AA existe aumento da I_{em} devido à intercalação, no sistema DNA/AA/AM existe supressão da fluorescência por causa da presença do acceptor. Observa-se que as inclinações das retas ajustadas são diferentes, indicando que o aumento de pressão afeta, também, a eficiência da transferência de energia.

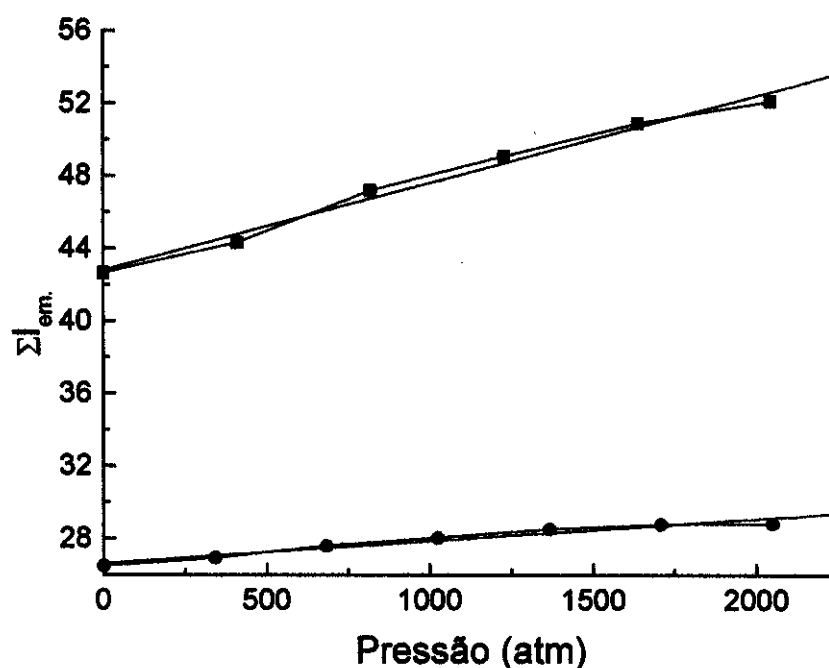


FIGURA IV.11.4 Integral sob a banda de emissão para soluções de ■ DNA/AA e ● DNA/AA/AM em diferentes pressões. $[GuCl]=0,5\text{mol.L}^{-1}$.

Estes dados mostram que há alteração na distância entre doador e acceptor, refletindo na eficiência de transferência de energia, calculada através da EQUAÇÃO IV.11.1.

$$E_f = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad \text{EQUAÇÃO IV.11.1}$$

onde E_f é a eficiência de transferência de energia, I e I_0 são as intensidades de emissão na presença e ausência do acceptor de energia, respectivamente.

A variação de E_f com a pressão está indicada na FIGURA IV.11.5.

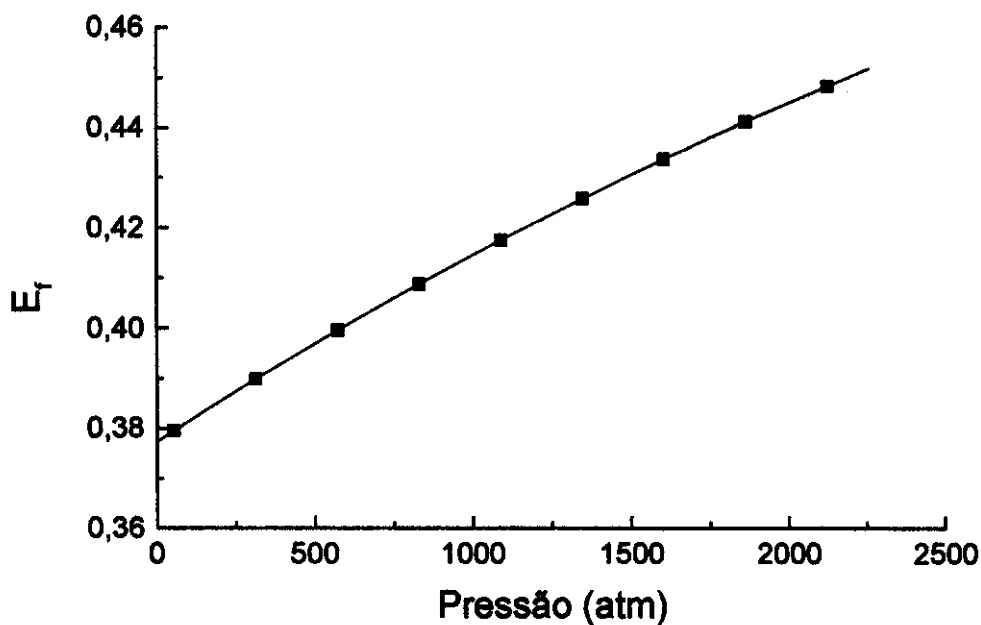


FIGURA IV.11.5 E_T versus pressão para o sistema DNA/AA/AM. $[\text{GuCl}] = 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

Usando E_T , $R_0 = 43,7 \text{ \AA}$ e a EQUAÇÃO I.3.3, obtém-se a distância (r) que separa o doador e o acceptor em função da pressão conforme indicado na FIGURA IV.11.6.

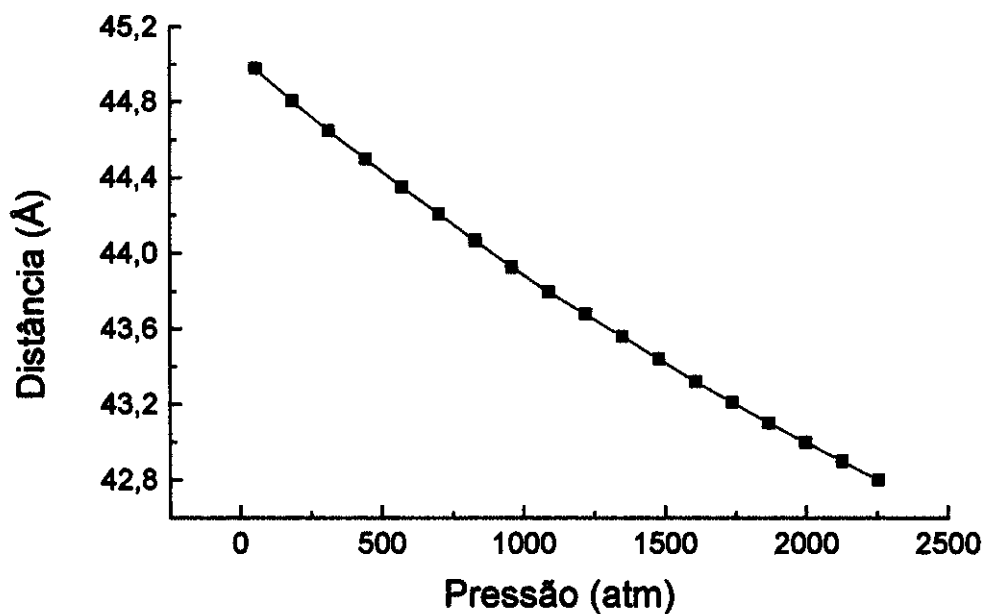


FIGURA IV.11.6 Distância entre o doador e acceptor em função da pressão para a solução contendo DNA/AA/AM. $[\text{GuCl}] = 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

Seria necessário uma pressão de 4050atm para restaurar a emissão da sonda na solução com $0,5\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl. Isso corresponde a uma variação de $\approx 4\text{Å}$ na distância entre o doador e o acceptor, valor próximo ao obtido quando se adiciona GuCl.

Resultados apresentados por Macgregor e Wu⁵⁰ mostram que o volume de transição hélice/coil do DNA varia com a concentração do sal, mas a pressão e concentração de GuCl utilizada neste trabalho não são suficientes para tal.

A TABELA IV.11.1 mostra a variação da distância r e do volume molar entre o doador e o acceptor com a pressão e a [GuCl].

TABELA IV.11.1 Variações na distância (Δr , Å) e no volume (ΔV , $\text{cm}^3.\text{mol}^{-1}$) para o sistema DNA/AA/AM com a [GuCl] ($\Delta\text{GuCl}=0-0,09\text{mol.L}^{-1}$) e a pressão ($\Delta P=0-2050\text{atm}$).

Condições	Δr	ΔV por DIA
ΔGuCl	5,5	236,0
ΔP	-2,0	-11,3
ΔP e $[\text{GuCl}]=0,5\text{mol.L}^{-1}$	-2,2	-15,1

A variação de volume $\Delta V= -15,1 \text{ cm}^3.\text{mol}^{-1}$ para a solução contendo $0,5\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl é próxima da obtida na seção IV.10.

Quando se estuda o sistema contendo GuCl não se verifica uma estabilização na redução da distância entre o doador e acceptor, contrariamente ao que ocorre na ausência deste sal. Neste último caso a distância é $\approx 2,0\text{Å}$, correspondente ao limite de compactação.

Estes resultados indicam que a adição de $0,09\text{mol.L}^{-1}$ de GuCl provoca um aumento de $5,5\text{Å}$ na distância entre o doador e acceptor. Quando a pressão atinge o valor de 2050atm, na solução contendo GuCl, a distância entre o doador e o acceptor é reduzida de $2,2\text{Å}$, quase o mesmo valor obtido na ausência de GuCl. Isto indica que a estrutura do DNA não é totalmente refeita pelo aumento de pressão quando o GuCl está presente e que o DNA interage com este sal de forma semelhante que o faz com outros íons.

Apenas o aumento da pressão não alterou o rendimento quântico de AA e nem diminuiu a concentração de espécies intercaladas, indicando que não há mudança nas características dos sítios de intercalação. Pode-se considerar que, na compactação, ocorre uma aproximação de dois segmentos diferentes do DNA.

IV.12 DESNATURAÇÃO DO DNA POR TEMPERATURA, NA PRESENÇA DE CLORETO DE GUANIDÍNIO

A FIGURA IV.12.1 mostra os espectros de absorção para uma solução de DNA, em diferentes temperaturas, enquanto a FIGURA IV.12.2 exibe a variação de I_{abs} em 260nm para as soluções de DNA contendo GuCl (os valores foram subtraídos da I_{abs} em 25°C).

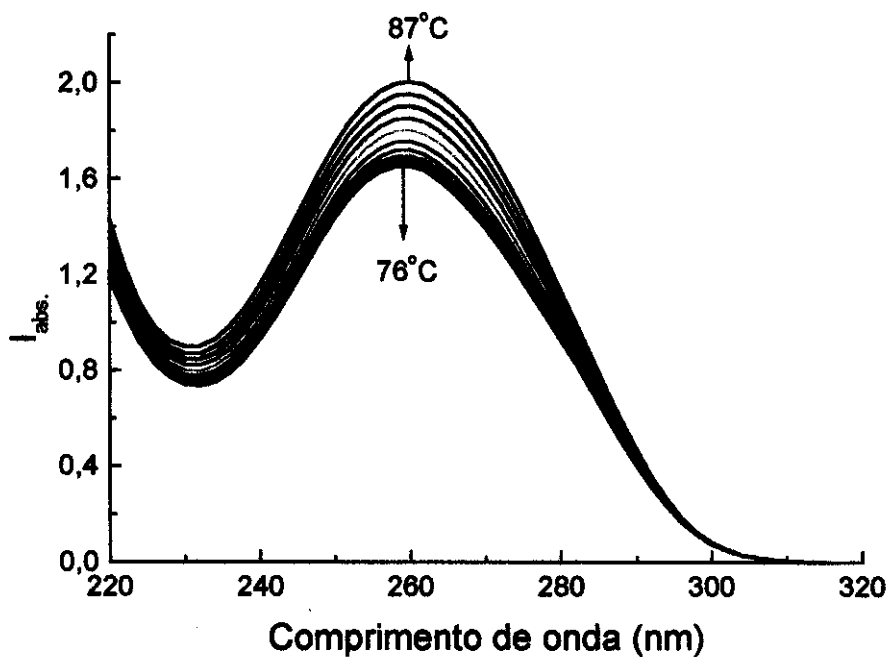


FIGURA IV.12.1 Espectros de absorção para uma solução de DNA em diferentes temperaturas, 76 a 87°C de 1 em 1°C.

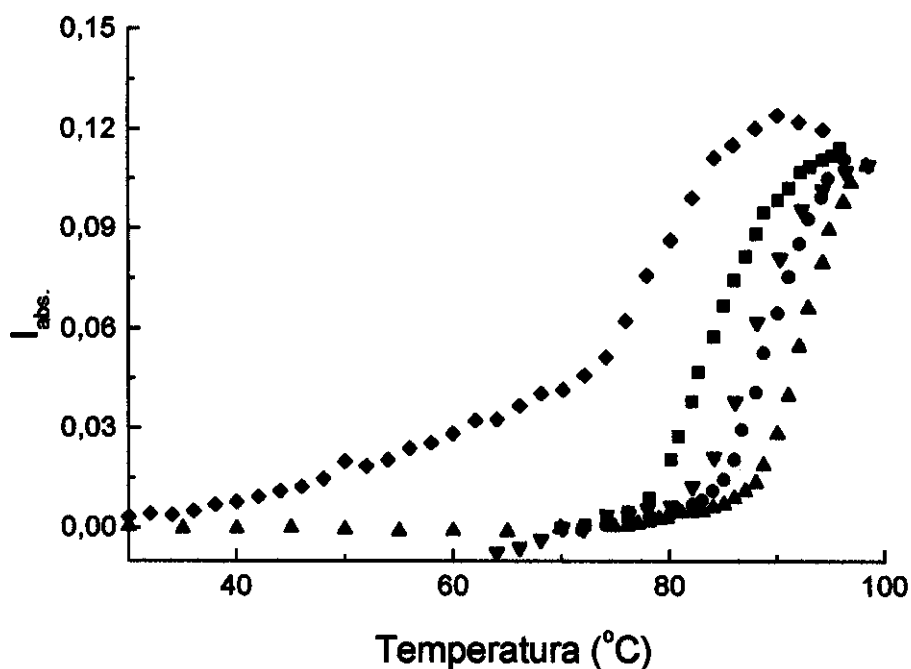


FIGURA IV.12.2 Intensidade de absorção a 260nm com a temperatura para soluções contendo DNA e diferentes [GuCl]: ■ 0; ● 0,3; ▲ 0,5; ▼ 2,0 e ◆ 5,0 mol.L⁻¹.

As temperaturas nas quais existe desnaturação (TABELA IV.12.1) são obtidas graficando-se as derivadas, obtidas em cada ponto, das curvas mostradas nessa FIGURA.

TABELA IV.12.1 Temperatura de desnaturação em função da [GuCl].

[GuCl] (mol.L ⁻¹)	T (°C)
0,00	81,8
0,05	87,4
0,10	87,8
0,30	91,2
0,50	92,1
1,00	90,8
2,00	87,2
5,00	76,4

A FIGURA IV.12.3 mostra essa temperatura em função da [GuCl].

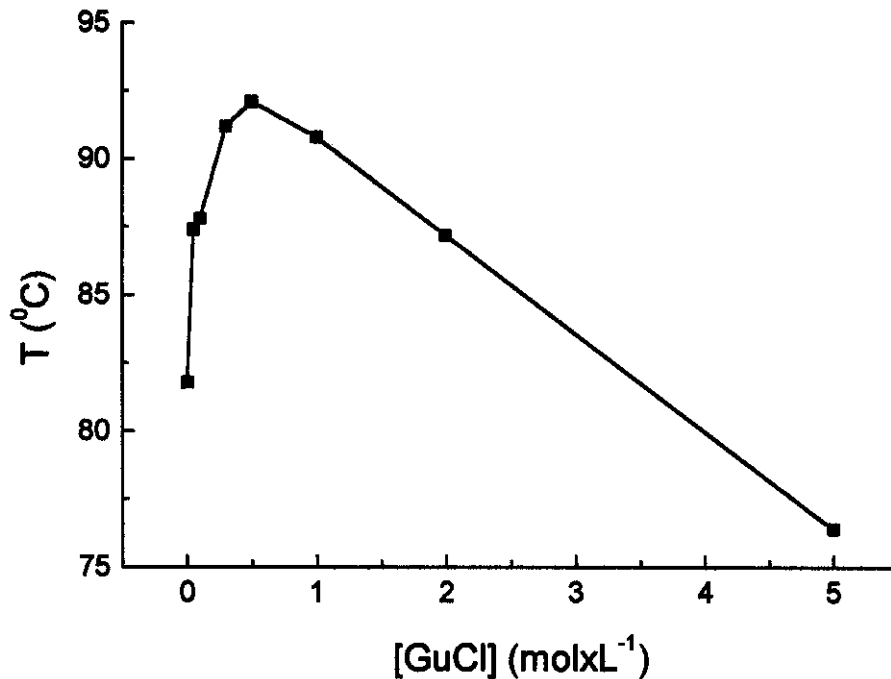


FIGURA IV.12.3 Temperatura de desnaturação de DNA em função da [GuCl].

Segundo Kumar⁵⁸ soluções salinas podem estabilizar termicamente a estrutura do DNA. Isto se deve principalmente ao efeito de eletro-construção da água, que seria também responsável pela estabilidade térmica do DNA com o aumento na [GuCl], observada inicialmente na FIGURA IV.12.3. Porém, ele não explica a redução que ocorre quando $[GuCl] > 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Neste caso há que se considerar, também, o efeito de desnaturação provocado por esta substância.

Na soluções com $[GuCl] > 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ observa-se o aparecimento de um ombro nas curvas mostradas na FIGURA IV.12.2, indicando que o DNA está parcialmente desnaturado (principalmente nas regiões terminais e ricas em pares AT, que estão ligadas por apenas 2 pontes de hidrogênio), o que afeta a temperatura de transição. Entretanto, mesmo quando $[GuCl] = 5 \text{ mol.L}^{-1}$ o DNA não está completamente desnaturado, mas devido à desnaturação parcial mencionada, a temperatura requerida para completar este processo é menor.

V CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu observar que é possível utilizar as técnicas de espectroscopia de luminescência estacionária e resolvida no tempo para investigar modificações estruturais no DNA. Para isto foram utilizadas sondas fluorescentes que não precisam estar covalentemente ligadas ao ácido nucleico, sendo que alterações espectrais podem ser interpretadas como modificações nos sítios onde as moléculas da sonda estão intercaladas.

A agregação dos corantes alaranjado de acridina e azul de metileno, ao se adicionar NaCl, não permite obter informações sobre a estabilidade e conformação do DNA.

O efeito de agregação sobre o AA deveria ser minimizado pela adição de GuCl, o que foi confirmado. Entretanto, este sal causou redução acentuada na intensidade de absorção do DNA. Este efeito é semelhante ao observado quando se adiciona NaCl quando $[\text{GuCl}] < 1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Para concentrações superiores, a redução na intensidade da banda de absorção do DNA se torna mais pronunciada e neste caso não se observa tal redução quando adicionado NaCl, indicando haver interação diferente ou mais intensa entre o GuCl e o DNA.

O grau de polarização da sonda AA intercalada em DNA reduz significativamente com o aumento da concentração de GuCl, indicando maior liberdade da mesma. Ocorrem alterações nos sítios de intercalação mas não se pode afirmar que as moléculas do corante sofrem desintercalação e passam para a fase aquosa.

Esta desestruturação causada pelo GuCl altera a eficiência (E_f) da transferência de energia entre o doador e acceptor quando obtida através do espectro de emissão, tendendo para valores semelhantes ao conseguido mediante medidas do tempo de vida. Isto é atribuído à separação entre estruturas compactas do DNA que existem em meio iônico (estrutura terciária) ao se adicionar GuCl, não ocorrendo para o NaCl.

Utilizando o modelo de Forster verificou-se que a distância entre o doador e acceptor, ao se adicionar GuCl, varia de $\approx 5\text{Å}$. A variação nessa distância causada pelo aumento da pressão em presença de GuCl é próxima à observada pelo mesmo incremento de pressão na ausência de GuCl (2,0 Å), indicando que a interação entre este sal e o DNA é semelhante à que ocorre quando se usa o tampão.

Pode-se considerar que existe um equilíbrio entre os sítios nativos e desestruturados e quando aumenta a concentração de GuCl há um deslocamento do mesmo em direção aos últimos. O contrário se observa quando aumenta a pressão, pois existe restauração das propriedades espectroscópicas da sonda intercalada. Este efeito é mais intenso quanto menor for a concentração de GuCl.

Observou-se três transições entre as estruturas do DNA, cada qual associada a uma variação do meio. A primeira ocorre quando se adiciona GuCl em concentrações $< 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, ocorrendo uma redução de 45% na intensidade de fluorescência ($I_{em.}$). Na segunda, conforme se aumenta a $[\text{GuCl}]$ para valores $> 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, não ocorre variações significativas na

intensidade de emissão, mas há alterações no grau de polarização associadas a uma desestruturação do DNA. Para a terceira, observada em soluções contendo GuCl, há um aumento no valor de I_{m} com a pressão, associado a uma reestruturação do DNA, similar à observada na ausência desse sal.

VI TRABALHOS FUTUROS

O trabalho aqui desenvolvido não possui similar segundo o levantamento bibliográfico, sendo um campo pouco pesquisado.

Como proposta de continuidade de trabalho pode-se estudar o efeito da adição de compostos orgânicos em solução de DNA com o intercalador AA e verificar qual o efeito na estabilidade da estrutura do DNA.

Entre os compostos utilizados cito os desestruturadores cloreto de guanidínio e uréia, os quais possuem diferenças marcantes em suas características desnaturantes. Estas diferenças talvez sejam devidas às características iônicas da primeira substância, sendo que a adição de um sal, tal como o NaCl, e uréia deveria aumentar o efeito desestruturador da uréia de forma se aproximar daquele observado para o cloreto de guanidínio, o qual pode ser monitorada pelo procedimento aqui desenvolvido.

Outra aplicação seria o monitoramento da estabilidade de complexo formado entre o DNA e lipossomas catiônicos. Ao se formar o complexo lipossoma/DNA espera-se que a sonda seja expulsa da cavidade, já que deve haver redução na hidratação do DNA pelo lipossoma. Alterações nas propriedades físicas e químicas da solução pode romper o complexo DNA/lipossoma, favorecendo a intercalação da sonda, sendo sua resposta proporcional a quantidade de complexo destruído.

Além destas, pode-se utilizar a sonda para verificar o efeito de outros solventes na estrutura do DNA, entretanto, neste estudo tem que se levar em consideração que a sonda também pode alterar as suas propriedades fotofísicas.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ J. D. Watson e F. H. C. Crick, "Molecular Structure of Nucleic Acids", *Nature*, 171, 737(1953)
- ² M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes e H. R. Wilson, "Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids", *Nature*, 171, 738(1953)
- ³ R. E. Franklin e R. G. Gosling, "Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate", *Nature*, 171, 740(1953)
- ⁴ J. Texter, "Nucleic Acid-Water Interactions", *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 33, 83(1978)
- ⁵ S. Hanlon, S. Brudno, T. T. Wu e B. Wolf, "Structural Transitions of Deoxyribonucleic Acid in Aqueous Electrolyte Solutions. I. Reference Spectra of Conformational Limits", *Biochemistry*, 14, 1648(1975)
- ⁶ B. Wolf e S. Hanlon, "Structural Transitions of Deoxyribonucleic Acid in Aqueous Electrolyte Solutions. II. The Role of Hydration", *Biochemistry*, 14, 1661(1975)
- ⁷ V. I. Ivanov, "Different Conformations of Double Stranded Nucleic Acid in Solution as Revealed by Circular Dichroism", *Biopolymers*, 12, 89(1973)
- ⁸ J. E. Hearst, "Effect of Temperature on the Buoyant Density of Bacterial and Viral DNA in CsCl", *Biopolymers*, 3, 57(1965)
- ⁹ M. Falk, K. A. Hartman Jr. e R. C. Lord, "Hydration of Deoxyribonucleic Acid. I A Gravimetric Study", *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3843(1962)
- ¹⁰ A. C. T. North e A. Rich, "X-Ray Diffraction Studies of Bacterial Viruses", *Nature*, 191, 1242(1961)
- ¹¹ M.-J. B. Tunis e J. E. Hearst, "Hydration of DNA. II. Base Composition Dependence of the Net Hydration of DNA", *Biopolymers*, 6, 1345(1968)
- ¹² M. Falk, A. G. Poole e C. G. Goymour, "Infrared Study of the State of Water in the Hydration Shell of DNA", *Can. J. Chem.*, 48, 1536(1970)
- ¹³ S. Bram, "The Secondary Structure of DNA in Solution and in Nucleohistone", *J. Mol. Biol.*, 58, 277(1971)
- ¹⁴ D. Perahia, M. S. Jhon e B. Pullman, "Theoretical Study of the Hydration of B-DNA", *Biochim. Biophys. Acta*, 474, 349(1977)
- ¹⁵ L. S. Lerman, "Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines", *J. Mol. Biol.*, 3, 18(1961)

-
- ¹⁶ N. J. Pritchard, A. Blake e A. R. Peacocke, "Modified Intercalation Model for the Interaction of Aminoacridines and DNA", *Nature*, 212, 1360(1966)
- ¹⁷ V. Zanker, "Über den Nachweis Definierter Reversibler Assoziate ("reversible Polymerisate") des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger Lösung", *Z. Physik. Chem.*, 199, 225(1952)
- ¹⁸ B. H. Robinson, A. Löffler e G. Schwarz, "Thermodynamic Behaviour of Acridine Orange in Solution", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 69, 56(1973)
- ¹⁹ T. Förster, "Transfer Mechanisms of Electronic Excitation", *Dis. Faraday Soc.*, 27, 7(1959)
- ²⁰ P. Wu e L. Brand, "Resonance Energy Transfer: Methods and Applications", *Anal. Biochem.*, 218, 1(1994)
- ²¹ S.A. Latt, H. T. Cheung e E. R. Blout, "Energy Transfer. A System with Relatively Fixed Donor-Acceptor Separation", *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 998(1965)
- ²² L. Stryer e R. P. Haugland, "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 719(1967)
- ²³ R. H. Conrad e L. Brand, "Intramolecular Transfer of Excitation from Tryptophan to 1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonamide in a Series of Model Compounds", *Biochemistry*, 7, 777(1968)
- ²⁴ H. C. Chiu e R. Bersohn, "Electronic Energy Transfer Between Tyrosine and Tryptophan in the Peptides Trp-(Pro)_n-Tyr", *Biopolymers*, 16, 277(1977)
- ²⁵ P. Wu e L. Brand, "Orientation in Steady-State and Time-Resolved Resonance Energy Transfer Measurements", *Biochemistry*, 31, 7939(1992)
- ²⁶ I. Isenberg, "On Theory of Fluorescence Decay Experiments. I. Nonrandom Distortions", *J. Chem. Phys.*, 59, 5696(1973)
- ²⁷ A. E. W. Knight e B. K. Selinger, "The Deconvolution of Fluorescence Decay Curves. A Non-Method for Real Data", *Spectrochim. Acta*, 27A, 1223(1971)
- ²⁸ W. R. Ware, L. J. Doemeny e T. L. Nemzek, "Deconvolution of Fluorescence and Phosphorescence Decay Curves. A Least-Squares Method", *J. Phys. Chem.* 77, 2038(1973)
- ²⁹ D. R. James e A. Siemiarczuk, "Stroboscopic Optical Boxcar Technique for the Determination of Fluorescence Lifetimes", *Rev. Sci. Instrum.*, 63, 1710(1992)
- ³⁰ K. Bergmann e C. T. O'Konski, "A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer, and Complexes with Montmorillonite", *J. Phys. Chem.*, 2, 2169(1963)

-
- ³¹ J. M. Kelly, W. J. M. Putten e D. J. McConnell, "Laser Flash Spectroscopy of Methylene Blue with Nucleic Acids", *Photochem. Photobiol.*, **45**, 167(1987)
- ³² C. A. M. Seidel, A. Schulz e M. H. M. Sauer, "Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies", *J. Phys. Chem.*, **100**, 5541(1996)
- ³³ Y. Usui e A. Gotou, "Migration of Singlet Excitation Energy from Acridine Orange-10-dodecyl Bromide to Methylene Blue in Micelles", *Photochem. Photobiol.*, **29**, 165(1978)
- ³⁴ Y. Kubota, "Studies of the DNA-Acridine Complexes. I. Fluorescence Depolarization", *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 2630(1973)
- ³⁵ Y. Kubota e R. F. Steiner, "Fluorescence Decay and Quantum Yield Characteristics of Acridine Orange and Proflavine Bound to DNA", *Biophys. Chem.*, **6**, 279(1997)
- ³⁶ J.B. Birks, "Photophysics of Aromatic Molecules", Wiley Interscience, London, 574, 1969
- ³⁷ F. M. Pohl e T. M. Jovin, "Salt-induced Co-operative Conformational Change of a Synthetic DNA: Equilibrium and Kinetic Studies with Poly(dG-dC)", *J. Mol. Biol.*, **67**, 375(1972)
- ³⁸ K. Itakura, H. Drew, T. Takano, S. Tanaka e R. E. Dickerson, "High-Salt d(CpGpCpG), a Left-Handed Z' DNA Double Helix", *Nature*, **286**, 567(1980)
- ³⁹ Y. Kubota, "Fluorescence Lifetime and Quantum Yields of Acridine Dyes", *Chem. Lett.*, 299(1973)
- ⁴⁰ Y. Kubota e R. F. Steiner, "Nanosecond Fluorescence Anisotropy of the DNA-Acridine Complexes", *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **50**, 1502(1977)
- ⁴¹ J. Paoletti e J.-B. L. Pecq, "Resonance Energy Transfer Between Ethidium Bromide Molecules Bound to Nucleic Acids", *J. Mol. Biol.*, **59**, 43(1971)
- ⁴² I. Tinoco Jr., "Hypochromism in Polynucleotides", *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4785(1960)
- ⁴³ I. Tinoco Jr., "Nucleic Acid Structures, Energetics, and Dynamics", *J. Phys. Chem.*, **100**, 13311(1996)
- ⁴⁴ L. Levine, J. A. Gordon e W. P. Jencks, "The Relationship of Structure to the Effectiveness of Denaturing Agents for Deoxyribonucleic Acid", *Biochemistry*, **2**, 168(1962)

- ⁴⁵ F. M. Pohl, "Polymorphism of a Synthetic DNA in Solution", *Nature*, 260, 365(1976)
- ⁴⁶ G. G. Hammes e J. C. Swann, "Influence of Denaturing Agents on Solvent Structure", *Biochemistry*, 6, 1591(1967)
- ⁴⁷ Herbert A. Sober, *Handbook of Biochemistry*, Chem. Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1970, G59
- ⁴⁸ N. F. Ellerton e I. Isenberg, "Fluorescence Polarization Study of DNA-Proflavine Complexes", *Biopolymers*, 8, 767(1969)
- ⁴⁹ M. J. Jezewska e W. Bujalowski, "Quantitative Analysis of Ligand-Macromolecule Interactions Using Differential Dynamic Quenching of the Ligand Fluorescence to Monitor the Binding", *Biophys. Chem.*, 64, 253(1997)
- ⁵⁰ J. Q. Wu e R. B. MacGregor Jr., "Pressure Dependence of the Melting Temperature of dA-dT Polymers", *Biochemistry*, 32, 12531(1993)
- ⁵¹ R. B. Macgregor Jr., Rajaf-Zadeh e J. Q. Wu, "Effect of Cations on the Volume of the Helix-Coil Transition of Poly[d(A-T)]", *Biochim. Biophys. Acta*, 1262, 52(1995)
- ⁵² R. B. MacGregor Jr., "Chain Length and Oligonucleotide Stability at High Pressure", *Biopolymers*, 38, 321(1996)
- ⁵³ U. K. Laemmli, "Characterization of DNA Condensates Induced by Poly(ethylene oxide) and Polylysine", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4288(1975)
- ⁵⁴ V. A. Bloomfield, "Condensation of DNA by Multivalent Cations: Considerations on Mechanism", *Biopolymers*, 31, 1471(1991)
- ⁵⁵ T. H. Eickbush e E. N. Moudrianakis, "The Compaction of DNA Helices into either Continuous Supercoils or Folded-Fiber Rods and Toroids", *Cell*, 13, 295(1978)
- ⁵⁶ P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, 5^a ed., Oxford University Press, p 104
- ⁵⁷ V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, E. E. Minyat, M. D. Frank-Kamenetskii e A. K. Schyolkina, "The B to A Transition of DNA in Solution", *J. Mol. Biol.*, 87, 817(1974)
- ⁵⁸ A. Kumar, "Alternate View on Thermal Stability of the DNA Duplex", *Biochemistry*, 34, 12921(1995)