

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Reinaldo Aparecido Bariccatti e aprovado pela comissão julgadora.

Campinas, 06 de Outubro de 1993

Francisco B. T. Pessine

Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS SOBRE AS
SUBSTÂNCIAS
ALARANJADO DE ACRIDINA E DAUNOMICINA
INTERCALADAS EM ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO

Reinaldo Aparecido Bariccatti 239

Tese de Mestrado

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

*Aos meus pais, Renaldo e Norma,
pelo apoio, compreensão e ensinamentos.*

*A minha namorada, Karen,
pelo amor, carinho e alegria proporcionados*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine, pela orientação mas acima de tudo pela amizade, paciência, compreensão e incentivo.

Ao velho amigo Prof. Dr. Edvaldo Sabadini, pelos conselhos, atenção e incentivo.

Ao Prof. Dr. Nelson E. D. Caballero e sua orientada Giselle Z. Justo pelas sugestões e referências fornecidas.

À Prof^ª. Dr^ª. Teresa D. Z. Atvars por permitir a utilização da mesa digitalizadora.

Ao Prof. Dr. Celso A. Bertran pela amizade e sugestões.

Aos companheiros de pós-graduação Lauro, Idelazil, Márcio, Cláudia, Deborah, Leda, Adriana, José Antonio, Carmem, Márcia, João, Patrícia e Gilmar.

Aos colegas do instituto Edson, Cláudia, Helena, Cássia, Ercília e Márcia.

Aos amigos e funcionários Laurindo e Eliete pelo apoio na etapa final da tese.

Aos amigos Neto, Fernando e Dorival.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Fapesp, CNPq e PADCT pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
I) INTRODUÇÃO	3
I.1) Processos fotofísicos	3
I.1.1) Processos unimoleculares	3
I.2.1) Absorção	4
I.2.2) Fluorescência	4
I.3) Influência do meio nos espectros de fluorescência e absorção	4
I.4) Dímeros	7
I.4.1) Teoria exciton	7
I.4.2) Diagrama de energia para dímeros	9
I.4.3) Caminhos de absorção e emissão para dímeros	10
I.5) Ácido desoxiribonucleico	10
I.5.1) Estrutura e definição de termos	10
I.5.2) Aspectos dinâmicos da estrutura do DNA	14
I.5.3) O fenômeno da intercalação de algumas substâncias em DNA	15
II) PARTE EXPERIMENTAL	25
II.1) Reagentes	25
II.2) Equipamentos	25
II.3) Purificação da água	25
II.4) Preparação das soluções	25
II.4.1) Solução estoque de alaranjado de acridina	25
II.4.2) Soluções tampão	26
II.4.3) Soluções, com diferentes forças iônicas, contendo alaranjado de acridina	26
II.4.4) Soluções para estudos sobre o coeficiente de extinção de alaranjado de acridina	26
II.4.5) Soluções para estudos espectroscópicos sobre as espécies monomérica e dimérica de alaranjado de acridina	26
II.4.6) Soluções contendo daunomicina	27
II.4.7) Soluções utilizadas nos estudos sobre as interações entre alaranjado de acridina e as bases nitrogenadas	27
II.4.8) Soluções utilizadas nos estudos sobre as interações entre daunomicina e as bases nitrogenadas	27
II.4.9) Soluções, com diferentes forças iônicas, contendo daunomicina	27

II.4.10)	Solução estoque de DNA	27
II.4.11)	Soluções para estudos sobre o coeficiente de extinção de DNA	28
II.4.12)	Soluções para estudos sobre a influência da força iônica no coeficiente de extinção molar de DNA	28
II.4.13)	Soluções para estudos sobre a intercalação de alaranjado de acridina em DNA	28
II.4.14)	Soluções para estudos sobre a intercalação de daunomicina em DNA	29
II.4.15)	Soluções para estudos sobre a influência da força iônica no complexo DNA / agente intercalante (alaranjado de acridina e daunomicina)	29
III)	OBJETIVO	30
IV)	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
IV.1)	Influência do pH nos espectros de absorção e de emissão de soluções contendo alaranjado de acridina	31
IV.2)	Influência da concentração nos espectros de absorção e de emissão	32
IV.3)	Influência da força iônica nos espectros de absorção e de emissão de alaranjado de acridina	35
IV.4)	Influência da força iônica nos espectros de absorção e de emissão de daunomicina	38
IV.5)	Estudos espectroscópicos sobre as interações entre bases nitrogenadas e alaranjado de acridina	40
IV.6)	Estudos espectroscópicos sobre as interações entre bases nitrogenadas e daunomicina	41
IV.7)	Estudos sobre o coeficiente de extinção molar de DNA	42
IV.8)	Influência da força iônica nos espectros de absorção de DNA	43
IV.9)	Estudos espectroscópicos sobre interações de alaranjado de acridina com DNA	44
IV.10)	Estudos espectroscópicos sobre interações entre daunomicina e DNA	54
IV.11)	Influência da força iônica no complexo DNA/AAH ⁺	59
IV.12)	Influência da força iônica no complexo DNA/daunomicina	61
V)	CONCLUSÃO	64
VI)	BIBLIOGRAFIA	66

"Estudos espectroscópicos sobre as substâncias alaranjado de acridina e daunomicina intercaladas com ácido desoxiribonucleico (DNA)"

Autor : Reinaldo Aparecido Bariccatti

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

Resumo:

Este trabalho versa sobre o estudo espectroscópico, na região V/UV, das substâncias alaranjado de acridina e daunomicina conhecidas pela capacidade de interagir com DNA via intercalação de suas moléculas entre os pares de bases.

Em solução aquosa o agente intercalador pode se encontrar ligado ao DNA por intercalação e/ou por interação com a superfície externa do mesmo. No primeiro caso, a molécula é protegida do meio externo e mantida via forças hidrofóbicas e, no segundo, as interações são caracterizadas pela formação de agregados. Ocorrem modificações na intensidade e posição dos espectros de absorção e de emissão as quais permitem determinar as concentrações das espécies intercalada, agregada e monomérica. Para o alaranjado de acridina foram determinadas as constantes de equilíbrio entre essas espécies.

As mudanças espectrais observadas para a daunomicina foram mais acentuadas que aquelas para o alaranjado de acridina, o que pode ser atribuído, em parte, às diferentes interações envolvidas no fenômeno de intercalação. Estas modificações são revertidas quando aumenta a força iônica da solução, pois os íons podem expulsar o intercalador do local em que ele se encontra alojado. Este processo se mostrou mais intenso para o alaranjado de acridina que para a daunomicina, pois esta possui outras interações com a estrutura do DNA que lhe conferem maior estabilidade quanto à intercalação.

"Spectroscopic studies on acridine orange and daunomicine interactions with deoxyribonucleic acid (DNA)"

Author : Reinaldo Aparecido Bariccatti

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

Abstract:

This work is on V/UV spectroscopic investigation of acridine orange and daunomicine that are known by the ability of insert their aromatic system between base pairs of deoxyribonucleic acid (DNA).

There are two possible interactions between these substances and DNA: by intercalation between base pairs and/or at the external surface of the macromolecule. In the first case, the intercalator is protect from the hydrophilic environment and hold by hydrofobic forces and, in the second, the interaction is due the formation of aggregates held by electrostatic forces. One can observe modifications in both the intensity and position of the absorption and emission spectra which allow to determine the concentration of intercalate, aggregate and monomeric species. For acridine orange it was calculated the equilibrium constant between these species.

For daunomicine the spectral alterations were more pronounced than for acridine orange. When one increases the ionic strength of the solution the intercalator can be expelled from the hydrofobic cavity and the modifications are reverted. This process is more intense for acridine orange, due to stronger interactions of daunomicine and DNA that stabilizes the complex.

I) Introdução

I.1) Processos fotofísicos

São definidos como aqueles resultante da excitação eletrônica de uma ou de um sistema de moléculas por radiação não ionizante.

I.1.1) Processos unimoleculares

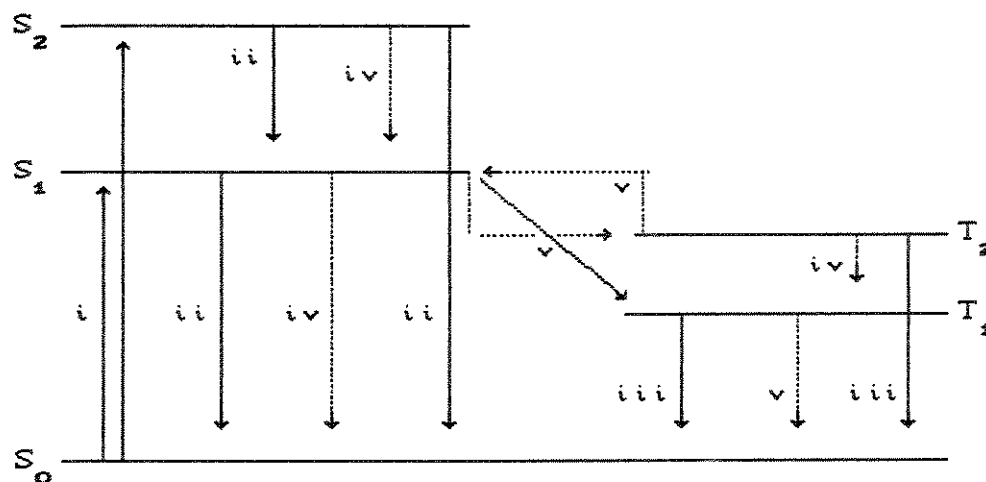
Ocorrem em moléculas isoladas na fase vapor ou em solução diluída em meio transparente:

a) Absorção: a molécula é excitada de um estado eletrônico de menor energia para outro de maior energia pela absorção de um ou mais fótons.

b) Emissão: a molécula é desexcitada do estado eletrônico de maior energia para o de menor energia pela emissão de um fóton. Uma transição radiativa entre estados com igual multiplicidade de spin é chamada fluorescência e fosforescência quando entre estados com diferentes multiplicidades.

c) Transições não radiativas entre níveis vibrônicos iso-energéticos: são precedidas por ativação ou desativação do estado eletrônico através de radiação térmica. Uma transição entre estados com mesma multiplicidade de spin é chamada de conversão interna e cruzamento inter-sistemas quando entre estados com diferentes multiplicidades.

A Figura 1.1 resume o que foi exposto.



- i) S_0-S_1 e S_0-S_p absorção
- ii) S_1-S_0 , S_p-S_0 e S_p-S_1 fluorescência
- iii) T_1-S_0 e T_q-S_0 fosforescência
- iv) S_p-S_1 , T_q-T_1 e S_1-S_0 conversão interna
- v) S_1-T_1 , S_1-T_q , T_1-S_0 e T_q-S_1 cruzamento inter-sistemas

Figura 1.1 Diagrama de energia e possíveis transições eletrônicas

I.2.1) Absorção

A energia total (E_t) de uma molécula no estado eletrônico fundamental (excluindo a energia translacional e a nuclear) é a soma de três componentes: a energia eletrônica (E_e), a vibracional (E_v) e a rotacional (E_r):

$$E_t = E_e + E_v + E_r \quad (2.1.1)$$

Analogamente, a energia total (E'_t) de uma molécula no estado eletrônico excitado é dada por:

$$E'_t = E'_e + E'_v + E'_r \quad (2.1.2)$$

Na absorção:

$$\Delta E_x = E'_x - E_x \quad (2.1.3)$$

onde x pode ser t, e, v ou r.

Transições envolvendo ΔE_e e ΔE_v fornecem espectros vibrônicos que ocorrem na região do visível e ultra-violeta, permitindo a obtenção de informações sobre os níveis vibracionais do estado eletrônico excitado.

A equação (2.1.4) fornece a absorbância de uma espécie M em solução:

$$\text{Absorbância} = \log I_0/I = \epsilon \cdot [M] \cdot d \quad (2.1.4)$$

onde I_0 , I , ϵ , d e $[M]$ são, respectivamente, as intensidades da radiação incidente e emergente da amostra, o coeficiente de extinção molar, o caminho óptico e a concentração do soluto.

I.2.2) Fluorescência

Desde que o tempo de vida da espécie excitada ao estado S_1 seja suficientemente grande para que ela alcance o equilíbrio térmico, a emissão ocorre primariamente do nível $v'=0$ para o nível $v''=m$ do estado S_0 , fornecendo informações sobre os níveis vibracionais deste.

I.3) Influência do meio nos espectros de fluorescência e absorção

Se $(\nu_{f0})_v$ e $(\nu_{fm})_v$ forem as frequências das transições 0-0 e de Frank-Condon no espectro de fluorescência da espécie na fase vapor e $(\nu_a)_v$ e $(\nu_{am})_v$ as correspondentes para o espectro de absorção podemos

escrever que:

$$\langle \nu_0 \rangle_v = 1/2 [\langle \nu_{am} \rangle_v + \langle \nu_{fm} \rangle_v] \quad (3.1)$$

Na fase vapor, as frequências das transições 0-0 de emissão e de absorção coincidem:

$$\langle \nu_f \rangle_v = \langle \nu_a \rangle_v = \langle \nu_0 \rangle_v \quad (3.2)$$

Em solução, ν_f é deslocada para menor energia:

$$\Delta\nu = \nu_a - \nu_f > 0 \quad (3.3)$$

Além disso, a absorbância aumenta e o espectro da espécie em solução apresenta bandas mais largas que o correspondente em fase vapor.

Há dois tipos de interações inter-moleculares responsáveis pela mudança espectral: 1) interação universal, devida à influência do solvente como um meio dielétrico, que depende da constante dielétrica ϵ e do índice de refração n do mesmo, sendo descrita pela teoria de Onsager e pelo princípio de Franck-Condon e 2) interação específica, como formação de pontes de hidrogênio, complexos ou exciplexos.

A Figura 3.1 mostra esquematicamente os níveis de energia envolvendo as transições 0-0 em uma molécula na fase vapor e em solução. Uma molécula de soluto com momento de dipolo μ em uma cavidade esférica de raio "a" em um meio de constante dielétrica estática ϵ polariza o meio dielétrico produzindo um campo reacional:

$$R = \frac{2\mu(\epsilon-1)}{a^3(2\epsilon+1)} = \frac{2\mu}{a^3} f(\epsilon) \quad (3.4)$$

onde: $f(\epsilon) = (\epsilon-1)/(\epsilon+1)$

A energia da molécula no estado S_0 , com momento de dipolo μ_0 em um solvente, é reduzida quando comparada à da molécula na fase vapor, devido ao campo reacional:

$$R = \frac{2\mu_0}{a^3} f(\epsilon) \quad (3.5)$$

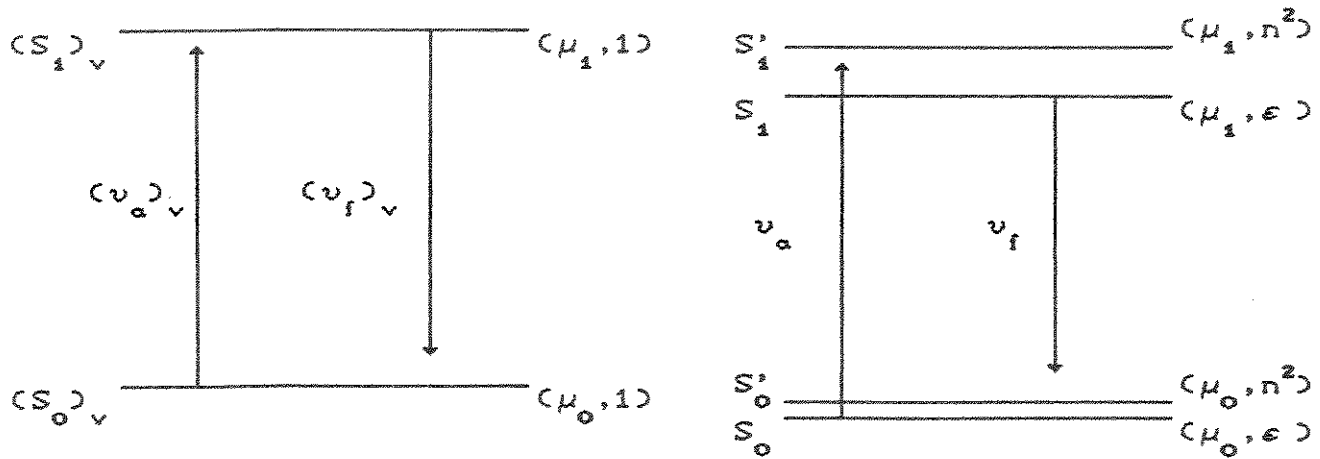


Figura 3.1 Influência do solvente na energia da transição 0-0

μ_0, μ_1 = momento de dipolo molecular em S_0 e S_1

ϵ = constante dielétrica estática

A transição 0-0 envolve o estado S_1' no qual a espécie tem momento de dipolo μ_1 (Figura 3.1). O princípio de Franck-Condon menciona que a transição eletrônica é muito mais rápida que o tempo de relaxação dielétrica τ_d do solvente, de modo que o campo reacional no estado S_1' é:

$$R_1' = \frac{2\mu_0 f(n^2)}{a^3} \quad (3.6)$$

onde n^2 é a constante dielétrica para alta frequência. A frequência da transição é dada por:

$$\nu_a = (\nu_a)_v + \frac{(R_1' - R_0)(\mu_1 - \mu_0)}{hc} \quad (3.7)$$

Se o tempo de vida τ_M do soluto no estado excitado for maior que o tempo de relaxação dielétrica, μ_1 polariza estaticamente o solvente, produzindo um campo reacional:

$$R_1 = \frac{2\mu_1 f(\epsilon)}{a^3} \quad (3.8)$$

e a energia será reduzida. A transição 0-0 ocorre de S_1 para S_0' onde o campo reacional é:

$$R_0' = \frac{2\mu f(n^2)}{a^3} \quad (3.9)$$

A relaxação dielétrica subsequente retorna a molécula a S_0 , emitindo luz com frequência:

$$\nu_f = (\nu_f)_v + \frac{(R'_0 - R'_1)(\mu_1 - \mu_0)}{hc} \quad (3.10)$$

A diferença de frequência entre as transições 0-0 dos espectros de absorção e fluorescência é:

$$\Delta\nu = \nu_a - \nu_f = \frac{2(\mu_1^2 - \mu_0^2)^2}{hca^3} \left[\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] \quad (3.11)$$

Para solventes não polares $\epsilon \approx n^2 \approx 0$ de modo que $\nu_a = \nu_f$.

Se o tempo de relaxação dielétrica do solvente τ_d for maior que τ_M , μ_1 polarizará parcialmente o solvente, ocorrendo emissão do estado S''_1 intermediário entre S'_1 e S_1 , produzindo um campo reacional:

$$R''_1 = \frac{2\mu_1 f(\epsilon')}{a^3} \quad (3.12)$$

onde $\epsilon \geq \epsilon' \geq n^2$. Neste caso a frequência de emissão aumenta:

$$\nu_f = (\nu_f)_v + \frac{(R'_0 - R''_1)(\mu_1 - \mu_0)}{hc} \quad (3.13)$$

I.4) Dímeros

I.4.1) Teoria exciton

Esta teoria possui ampla utilização em cristais e compostos moleculares como dímeros, trímeros e altos agregados formados através de forças de van der Waals e pontes de hidrôgeno. Se as unidades componentes destas espécies apresentarem transições eletrônicas suficientemente intensas poderá ocorrer separação dos estados eletrônicos excitados, com deslocamento ou desdobramento da banda de absorção e aumento da excitação ao estado excitado tripleto.

A função de onda do dímero no estado fundamental é dada por:

$$\Psi_g = \psi_u \psi_v \quad (4.1)$$

onde ψ_u e ψ_v são as funções de onda das moléculas u e v no estado fundamental.

O operador Hamiltoniano para o dímero é:

$$H = H_u + H_v + V_{uv} \quad (4.2)$$

onde H_u e H_v são os operadores para as moléculas isoladas e V_{uv} é o potencial de perturbação intermolecular.

A energia do estado fundamental do dímero é dada por:

$$E_g = \iint (\psi_u \psi_v)^* H \psi_u \psi_v \partial\tau_u \partial\tau_v \quad (4.3)$$

$$E_g = E_u + E_v + \iint (\psi_u \psi_v)^* (V_{uv}) \psi_u \psi_v \partial\tau_u \partial\tau_v \quad (4.4)$$

O último termo representa a energia de interação de van der Waals entre as moléculas u e v no estado fundamental. E_u e E_v são as energias das componentes isoladas nesse estado.

A função de onda associada ao estado excitado do dímero pode ser escrita como a combinação linear:

$$\psi_E = a\psi_u^+ \psi_v + b\psi_u \psi_v^+ \quad (4.5)$$

onde ψ_u^+ e ψ_v^+ representam as funções de onda dos estados excitados de u e v e a e b são coeficientes a serem determinados.

Assim, a energia do sistema será:

$$E_E = E_u^+ + E_v + \iint (\psi_u^+ \psi_v)^* (V_{uv}) \psi_u^+ \psi_v \partial\tau_u \partial\tau_v \\ \pm \iint (\psi_u^+ \psi_v^+)^* (V_{uv}) \psi_u \psi_v^+ \partial\tau_u \partial\tau_v \quad (4.6)$$

O último termo da equação (4.6) pode ser aproximado por:

$$E = [\vec{M}_u \cdot \vec{M}_v / r^3] - 3 [(\vec{M}_u \cdot \vec{r})(\vec{M}_v \cdot \vec{r}) / r^5] \quad (4.7)$$

e representa a energia de interação devido a troca de energia de excitação entre as moléculas u e v. \vec{M}_u e \vec{M}_v são os respectivos momentos de transição e \vec{r} é o vetor posição.

Indicando como ΔD a diferença entre as energias de interação de van der Waals que aparecem nas equações 4.4 e 4.6 obtemos a energia de transição para o dímero:

$$\Delta E_{\text{dímero}} = \Delta E_{\text{monômero}} + \Delta D \pm E \quad (4.8)$$

I. 4.2) Diagrama de energia para dímeros

Em um dímero, momentos de dipolos paralelos levam ao diagrama de níveis de energia mostrado na Figura 4.1 (A). À direita dos níveis de energia exciton E' e E'' estão os vetores que permitem estimar o momento de transição entre os estados fundamental e exciton do dímero.

O arranjo de dipolo fora de fase corresponde, eletrostaticamente, a um abaixamento da energia de modo que E' se torna menor que a energia de interação entre as componentes devido às forças de van der Waals. Quando os dipolos estão em fase E'' é deslocado para energias maiores. O momento de transição é dado pela soma dos momentos de transição individuais das componentes que interagem. Assim, é proibida a transição do estado fundamental a E' mas permitida para E'' .

Deste modo, no dímero ocorre deslocamento da transição singlete-singlete para o azul e aumento da população do estado triplete acompanhado da supressão de fluorescência.

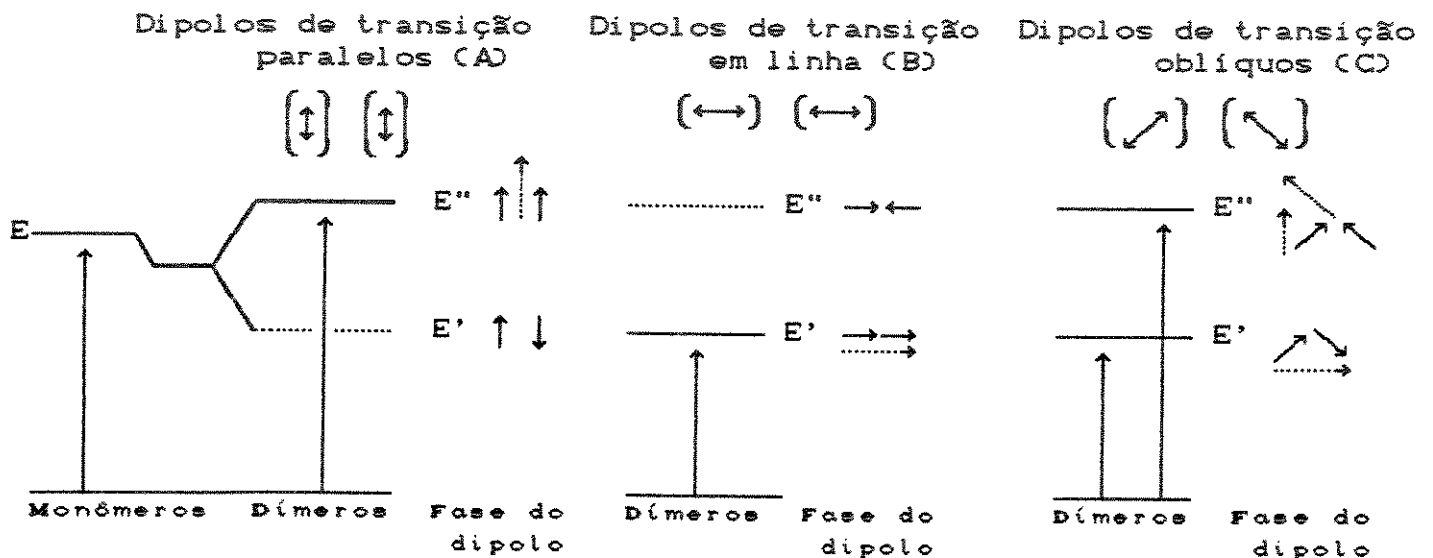


Figura 4.1 Esquema dos níveis de energia de dímeros cujos dipolos de transição são paralelos (A), em linha (B) e oblíquos (C)

A Figura 4.1 (B) mostra o diagrama de níveis de energia quando os dipolos estão alinhados. Pode-se ver que o arranjo em fase dos mesmos leva a uma atração eletrostática, produzindo um abaixamento de energia para E' , ao passo que o arranjo fora de fase causa repulsão produzindo o estado E'' e ocasionando deslocamento para o vermelho.

A Figura 4.1 (C) mostra o diagrama de energia quando os dipolos são oblíquos. Neste caso, o arranjo em fase dos mesmos é atrativo e leva à menor energia e o arranjo fora de fase é repulsivo causando um aumento de energia do estado excitado.

I.4.3) Caminhos de absorção e emissão para dímeros

Os caminhos de excitação e emissão em dímeros com momentos dipolares paralelos estão esquematizados na Figura 4.2. No monômero a absorção e emissão são permitidas por dipolo elétrico. No dímero a transição ao estado de menor energia (S'_D) é proibida enquanto é permitida a transição para S''_D . Como a separação entre esses estados depende do momento de transição dos componentes do dímero (Equação 4.8), que é praticamente nulo para a transição $S_0 \rightarrow T_1$, é de se esperar que os estados T_1 do monômero e do dímero tenham a mesma energia. Após a excitação ao estado S''_D ocorre conversão interna a S'_D o que impede a emissão de fluorescência a partir de S''_D . Dado que a transição de S'_D a S_D é formalmente proibida (mas pode existir com pequena probabilidade se o dímero tiver geometria distorcida) ocorre cruzamento inter-sistemas ao estado T_D , do qual o dímero pode fosforescer. Em consequência, haverá uma diminuição da intensidade de fluorescência do monômero com o aumento da concentração de dímeros.

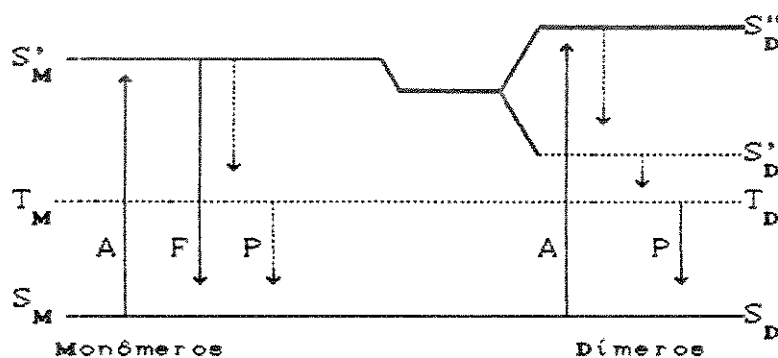


Figura 4.2 Caminhos de excitação/emissão do monômero e dímero

I.5) Ácido desoxiribonucleico

I.5.1) Estrutura e definição de termos

O DNA possui dois tipos de bases nitrogenadas: as purinas (adenina e guanina) que possuem um átomo de hidrogênio na posição 9 e as pirimidinas (timina e citosina) que possuem um átomo de hidrogênio na posição 1 (Figura 5.1 A). Nos nucleosídeos correspondentes estes hidrogênios são substituídos pela desoxiribose. Cada um deles, mais o açúcar fosfatado na posição 3', forma o nucleotídeo que constitui a unidade básica do DNA. Os nucleotídeos se unem, em uma mesma cadeia, através de ligações diéster que ligam o carbono 5' de uma desoxiribose ao carbono 3' de outra.

O polinucleotídeo formado por esta sequência de moléculas constitui uma das fitas que forma a dupla hélice do DNA. Esta é voltada para a direita, de modo que as duas fitas enroladas uma em torno da outra apresentam dez pares de bases a cada passo. A dupla hélice tem diâmetro de 20 Å, mostrando sulcos maiores ("major grooves") e menores ("minor grooves") que se caracterizam por possuir larguras e profundidades diferentes (Figura 5.1 B).

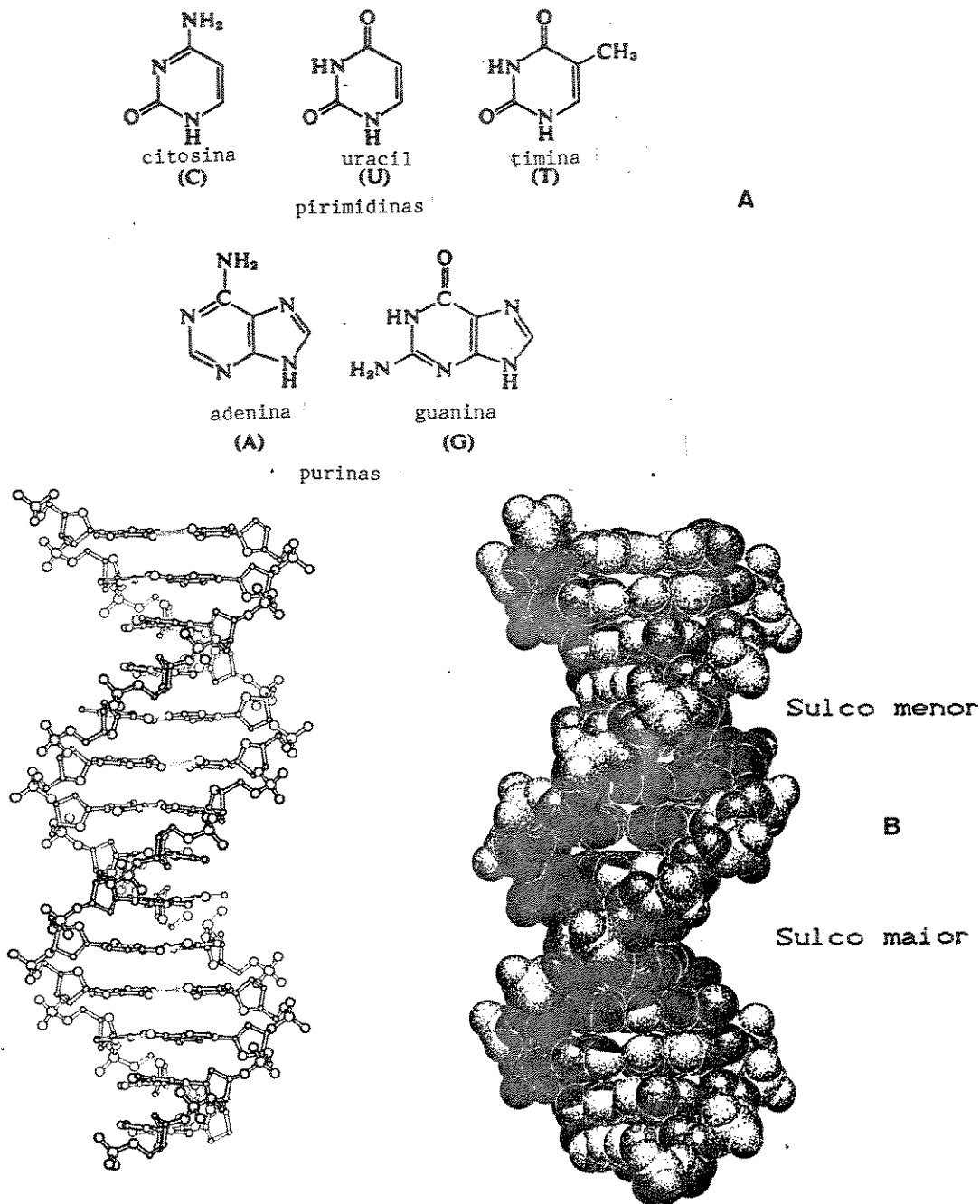


Figura 5.1 Representações das bases nitrogenadas (A) e dos sulcos (B) existentes no DNA

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 (Adenina-timina e guanina-citosina), conforme Figura 5.2. As ligações glicosídicas que unem cada par de bases à cadeia de açúcar-fosfato possuem a mesma distância entre si (10,85Å) e são simétricas em relação a um eixo binário localizado no plano do par de bases.

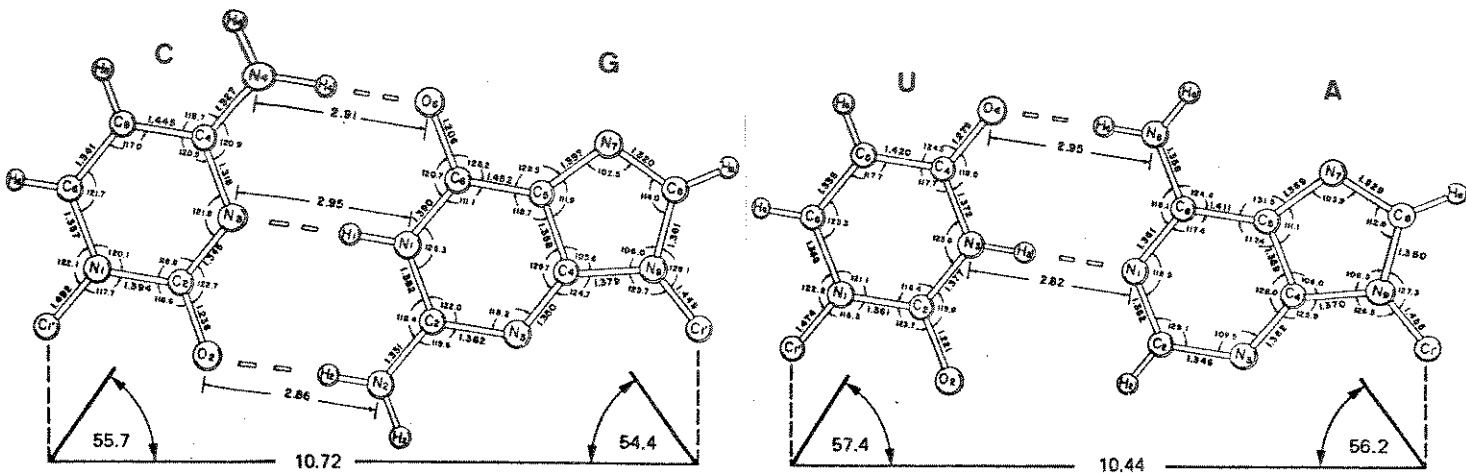
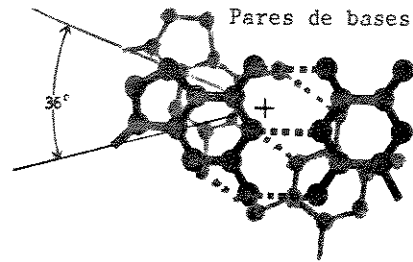


Figura 5.2 Representação das ligações de hidrogênio entre as bases do DNA

As duas fitas no DNA não são idênticas, mas complementares em termos de pareamento apropriado de bases. Assim, uma fita com ligação 5'-3' e sequência A, G, G, T, T, C, etc., possui uma outra complementar que apresenta ligação 3'-5' e sequência T, C, C, A, A, G, etc.

Os planos dos pares de bases adjacentes estão afastados de 3,4 Å, cada par de bases faz um ângulo de 36° em relação a seus vizinhos e cada passo da dupla hélice tem um comprimento de 34 Å. Estes valores são para a estrutura "B" do sal sódico de DNA encontrado em fibras com 92% de umidade. Em condições fisiológicas, o número de pares de bases por passo aumenta de 10,0 para 10,4.

Existem várias estruturas do DNA, três das quais são semelhantes: "A", "B" e "C". Aquela comumente encontrada em solução e in vivo é a "B" que se converte em "A" quando a umidade da fibra é reduzida para menos de 75%. A estrutura "A" difere da "B" na disposição dos pares de bases, que não são perpendiculares ao eixo da hélice, mas inclinados de $\approx 20^\circ$. Em consequência disto o passo da hélice é reduzido de 34 Å para 28 Å, existindo 11 pares de bases por passo, resultando num encurtamento de 25%. A estrutura "C" se assemelha muito à "B", possui passo de 33 Å, com nove pares de bases por passo. Além dessas, outra estrutura (denominada "Z", por causa do percurso em zigue-zague da cadeia de desoxiribose-fosfato) foi observada em cristais do hexanucleotídeo d(CpG)₆ e em fibras de polímeros alternados d(CG)_n.

A respeito dos espectros eletrônicos, todos os ácidos nucleicos apresentam forte absorção no ultravioleta, com máximo em $\approx 260\text{nm}$. Quando o DNA nativo é alterado, verifica-se um acentuado aumento da absorbância. Esta mudança reflete uma diminuição nas ligações por pontes de hidrogênio do DNA.

Uma propriedade física importante do DNA é a sua densidade super-helicoidal. Quando uma molécula de DNA apresenta exatamente um passo da hélice para cada 10 pares de bases, diz-se que ela está "relaxada", sem nenhum passo super-helicoidal. Entretanto, se as duas fitas da hélice estiverem muito enroladas, de modo que para cada 10 pares de bases exista mais de um passo da hélice, a molécula se torce em torno de si própria e torna-se positivamente super-enrolada. Em contraste, se o DNA está insuficientemente enrolado com menos de um passo para cada 10 pares de bases, a molécula torna-se negativamente super-enrolada.

O super-enrolamento pode ser desfeito através da clivagem de uma das fitas pela ação de uma desoxiribonuclease. Outra maneira de aliviar o super-enrolamento consiste em intercalar uma molécula planar, como o brometo de etídeo, entre pares de bases adjacentes. Essa intercalação distorce a super-espiral de 12° , de modo que para promover um desenrolamento de uma volta são necessárias 30 moléculas do intercalante. Quando o enrolamento negativo desta super-hélice é desfeito, a adição de mais moléculas de brometo de etídeo resulta na formação de novos enrolamentos super-helicoidais mas na direção positiva.

I.5.2) Aspectos dinâmicos da estrutura do DNA

Qual é a natureza dinâmica da estrutura do DNA que possibilita a intercalação? Como esta estrutura provoca a ruptura das pontes de hidrogênio dos pares de bases em temperaturas bem abaixo da temperatura de fusão?

Estas perguntas podem ser respondidas pela teoria proposta por Sobell [5] : quando em solução moléculas do solvente colidem constantemente com DNA ao longo de sua extensão. Embora a maioria destas moléculas transfira energia para o polímero, causando-lhe oscilações desordenadas na estrutura, esta não se propaga pelo polímero e é dissipada para a solução em virtude da viscosidade. Ocasionalmente, moléculas do solvente com momento apropriado (isto é, orientado ao longo do eixo do DNA) colidem com o DNA, produzindo um movimento harmônico no mesmo o qual permanece localizado em um sítio (causando mudança conformacional na estrutura açúcar-fosfato) ou se propaga ao longo da hélice. Quando este movimento tem baixa amplitude ele faz com que a estrutura do DNA varie entre a forma "B" e uma forma super helicoidal, para direita, que contém aproximadamente 10 pares de bases por volta e passo de 34Å, de forma a criar a mínima perturbação no DNA. Movimentos harmônicos de grande amplitude originam estruturas semelhantes mas que contém mais de 10 pares de bases por volta, cada um dos quais está mais inclinado em relação ao eixo da hélice. Estes movimentos poderiam contribuir para o aparente desenrolamento do DNA e para a inclinação dos pares de bases relativos ao eixo, observados para o polímero em solução.

Quando os movimentos mencionados são de pequena amplitude, o DNA se comporta como um corpo elástico que acumula energia tensional através de pequenas mudanças nos ângulos de torção que definem a geometria do esqueleto açúcar-fosfato. Estas mudanças são localizadas primariamente nos anéis furanose dos resíduos desoxiribose alternados. Normalmente o empacotamento do anel furanose no DNA "B" é C2' endo e a introdução da energia tensional à hélice altera a magnitude e direção deste empacotamento. Quando as oscilações tem grande amplitude, o aumento da energia tensional nas cadeias açúcar-fosfato faz com que o anel furanose tenda a ficar plano. Por fim, em uma amplitude de oscilação crítica, os resíduos de açúcar alternados se transformam bruscamente em uma conformação com C3' endo ocorrendo um desempilhamento parcial dos pares de bases pareados. Esta nova conformação (denominada DNA β

torcido) corresponde a uma distorção inelástica na estrutura do DNA, causada por uma oscilação transiente com alta energia localizada em um sítio específico da hélice. Ela é bastante flexível e poderia, durante seu tempo de vida, apresentar aumento das flutuações de energia as quais podem ser usadas na separação dos pares de bases, de modo a possibilitar a intercalação de moléculas de medicamentos e de corantes no DNA.

I.5.3) O fenômeno da intercalação de algumas substâncias em DNA

Substâncias que intercalam entre pares de bases do DNA são, geralmente, agentes citotóxicos e mutagênicos potentes, apresentando um grupo cromóforo formado por anéis aromáticos, planares, que podem se inserir na cavidade hidrofóbica dessa macromolécula, causando-lhe profundas alterações conformacionais. Algumas apresentam ação farmacológica importante sendo utilizadas, sozinhas ou combinadas, em quimioterapia de algumas neoplasias. Deste modo, torna-se extremamente importante o estudo das interações entre DNA e essas substâncias com vistas ao entendimento dos equilíbrios envolvidos no processo de intercalação, a estrutura dos complexos formados, as alterações estruturais no DNA provocadas pela acomodação de moléculas entre os pares de bases, ao mecanismo da intercalação, etc. Portanto, pode-se afirmar que a investigação desses complexos formados é de interesse em química, bioquímica, biofísica, farmacologia e medicina.

Uma evidência sobre a intercalação de compostos aromáticos, em que o plano molecular da espécie inserida se encontra paralelo às bases pareadas, proveio de estudos hidrodinâmicos e de difração de raio-X empregando derivados de acridina [6]. O complexo formado fornece um difratograma o qual indica um aumento da separação entre os pares de bases do DNA. De acordo com este modelo, o DNA aumenta de comprimento, a cadeia açúcar-fosfato é distorcida e a estrutura regular helicoidal é deformada à medida em que a substância intercalante se aloja entre os pares de bases. Em particular, quando a molécula de acridina se insere entre pares de bases AT-AT, dobra a distância entre estes, ocasionando forte distorção nos sítios vizinhos.

Hoje se conhece várias substâncias que podem interagir, via intercalação, com o DNA: psoralenos, cloroquina, cloropromazina, brometo de etídeo, iodeto de propídeo, antibióticos, corantes, etc. As fórmulas estruturais de algumas delas, relacionadas a este trabalho,

estão mostradas na Figura 5.3.

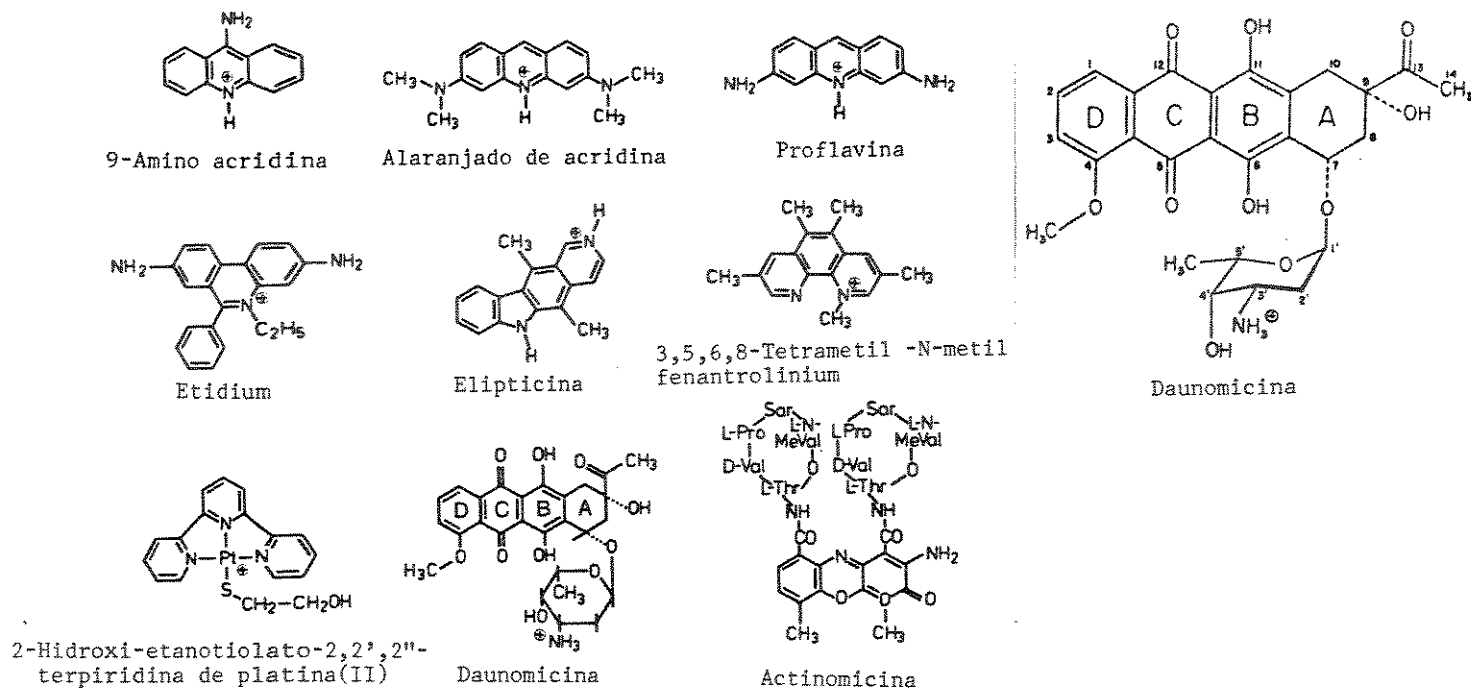


Figura 5.3 Fórmulas estruturais de alguns compostos intercalantes

Por causa do sistema cromóforo do agente intercalante, sua interação com o DNA pode ser seguida por métodos espectroscópicos os quais fornecem informações espectrais, cinéticas e termodinâmicas sobre o processo de intercalação. Estudos cinéticos mostram que este fenômeno, que ocorre na escala temporal de milisegundos, é precedido por um processo rápido de difusão e interação com grupos fosfato (carregados negativamente) existentes na superfície externa do DNA, onde pode haver a formação de complexos oligoméricos.

Medidas de alongamento do DNA em presença de proflavina mostram que apenas 44% dos sítios de intercalação teoricamente disponíveis estão ocupados pelas moléculas desse composto indicando que, basicamente, um entre cada dois sítios tem a sua ocupação inviabilizada pela intercalação que ocorre no sítio adjacente. Assim, pode-se dizer que nem todos os sítios disponíveis à intercalação podem ser usados e isto provavelmente se deve à distorção dos nucleotídeos vizinhos à aquele que interage com o intercalador, como é mostrado na Figura 5.4.

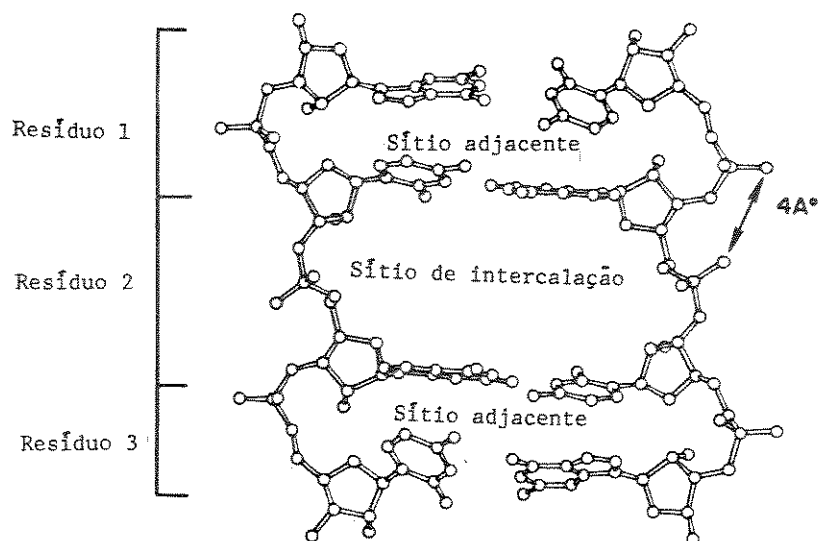


Figura 5.4 Distorsão dos sítios vizinhos causada pela molécula intercaladora

O aumento da separação entre as bases pareadas, que ocorre em virtude da intercalação, pode ser visualizado como uma combinação de alongamento e desenrolamento da conformação "B" do DNA, sendo preservada a ligação açúcar-fosfato. Quando uma molécula se insere entre os pares de bases há um desenrolamento, no local da interação, que pode ser de 10° a 20° por molécula intercalada de modo que, se este processo envolver um número grande de moléculas, pode dar origem a uma hélice cujos passos são voltados para a esquerda, e não para a direita como é típico da conformação "B".

As forças atrativas envolvidas no processo de intercalação são, primariamente, de natureza hidrofóbica e surgem em virtude do "empilhamento" dos anéis aromáticos da espécie intercaladora e dos pares de bases do DNA. Entretanto, é conhecido que, em alguns casos, a desnaturação do DNA não reduz substancialmente a ligação da espécie a ser intercalada, fato que tem levado a um outro modelo para esse processo e que envolve a sobreposição dos anéis aromáticos do intercalador e das bases adjacentes na mesma fita polinucleotídica, como acontece para a acridina [7].

As propriedades espectroscópicas desta substância e de alguns de seus derivados tem sido estudadas desde 1960, observando-se que são alteradas quando ela interage com DNA nativos ou polinucleotídeos

sintéticos. De modo geral, podem ocorrer modificações nas intensidades e posições das bandas de absorção e de emissão, no tempo de vida da espécie excitada e na polarização espectral. Em particular, no caso de proflavina, acriflavina, quinacrina e mostarda de quinacrina, o rendimento quântico da fluorescência depende fortemente do local em que a molécula se insere, isto é, entre quais pares de bases ocorre a intercalação, ou seja, da composição apresentada pelo DNA. Para essas moléculas, esse parâmetro aumenta quando a intercalação acontece entre AT-AT e diminui quando pelo menos um dos pares for CG. No caso de proflavina e quinacrina, a supressão de fluorescência por regiões ricas em CG foi atribuída a um complexo de transferência de cargas em que o corante atua como receptor e a guanina como doador de elétrons. Além disso, observa-se que há um deslocamento do máximo de absorção para λ maiores e diminuição da absorbância enquanto que o espectro de fluorescência desloca-se para comprimentos de onda menores. Para a proflavina intercalada o rendimento quântico de fluorescência diminui de um fator de três e o tempo de vida permanece constante, quando comparados aos valores obtidos em solução aquosa.

A curva de relaxação (isto é, intensidade de emissão versus tempo) da proflavina ligada ao DNA (razão [fosfato] / [intercalante] = 420) mostrou ser uma função não exponencial sendo que o desvio da exponencialidade varia monotonicamente com o conteúdo de bases CG. Para DNA de *Micrococcus lysodeikticus* (ML, que apresenta 72% de pares de bases CG) foi observado um componente muito rápido ($\tau < 1\text{ns}$) na curva de emissão (atribuído às moléculas intercaladas entre CG-CG) e outro, com tempo de vida maior ($\approx 4,3\text{ns}$) cujo responsável é o complexo formado entre o corante e os pares de bases AT-AT. Estas descobertas demonstram claramente a presença de sítios de intercalação distintos. Enquanto acridina se acomoda preferencialmente entre AT-AT, acriflavina e proflavina não exibem seletividade na intercalação [8].

A substância antineoplásica daunomicina (antibiótico pertencente à classe das antraciclina) é amplamente utilizada sozinha ou em combinação com outras substâncias (com as quais apresenta um efeito cooperativo facilitando a ligação das mesmas ao DNA) como agente quimioterápico no tratamento de alguns tipos de leucemia e tumores sólidos. Ela insere seus anéis aromáticos entre dois pares de bases adjacentes no DNA, distorcendo a estrutura do mesmo, desenrolando-o de $\approx 12^\circ$ e aumentando a distância entre os pares de bases para quase o

dobro do valor original (3,4Å). Sua constante de associação está na faixa de 10^6 M^{-1} com parâmetros de exclusão 3,0 a 3,5 (que correspondem aos valores médios relativos aos números de pares de bases obstruídos por apenas uma molécula intercalada) [9]. A geometria do complexo daunomicina-hexanucleotídeo mostra que o cromóforo é inserido com o eixo maior perpendicular às ligações por pontes de hidrogênio entre os pares de bases adjacentes, em contraste com alguns complexos formados por outras substâncias intercaladoras nos quais o eixo molecular maior é paralelo às referidas ligações. O anel "D" da daunomicina projeta-se sobre o sulco maior ("major groove") do DNA e o anel "A" (não aromático), juntamente com a daunosamina (com a qual está ligado), ocupam o sulco menor ("minor groove"), inviabilizando, no mínimo, os três sítios de intercalação mais próximos. Este complexo é estabilizado por interações via pontes de hidrogênio envolvendo os grupos hidroxila e carbonila de C9. O complexo formado faz com que a daunomicina provoque a supressão da síntese de DNA e RNA inibindo a multiplicação celular. A título de exemplo, a concentração mínima dessa substância necessária para a inibição do crescimento celular de *Bacillus subtilis* e de *Escherichia coli* é mostrada na Tabela 5.1 [10]. Não foi mencionado se essa inibição é devida à interferência na síntese do RNA ou se se trata de um efeito puramente bacteriostático.

Inibidor	[Inibidor] ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Actinomicina D	0,02	>50
Cromomicina A ₃	0,01	>100
Mitramicina	0,01	>20
Olivomicina	0,5	>20
Cinerubicina	2	>50
Daunomicina	5	15
Nogalamicina	1	50
Proflavina	2	>50
Alaranjado de acridina	>100	>100

Tabela 5.1 Concentração inibitória mínima de alguns antibióticos e acridinas

Além disso, alguns desses compostos apresentam atividade mutagênica e carcinogênica. A Tabela 5.2 ([11]) mostra alguns tipos de tumores

desenvolvidos em ratos após administração de daunomicina e adriamicina.

	Daunomicina		Adriamicina	0,9% de NaCl (5 de 20 animais desenvolvem tumor)
	10mg/Kg (12/15 animais desenvolvem tumor)	5mg/Kg (15/18 animais desenvolvem tumor)	5mg/Kg (15/17 animais desenvolvem tumor)	
Tumores mamários				
Fibroadenoma	6	12	16	1
Carcinoma	5	2	3	2
Carcinoma adrenal			1	
Carcinoma epidermoide		1		
Liposarcoma		1		
Tumores malignos não classificados	2			
Lipoma		1		1
Schwannoma			1	
Pólipo cervical				1

Tabela 5.2 Tipos de tumores desenvolvidos em ratos após administrar solução contendo daunomicina, adriamicina e soro fisiológico

A utilização de daunomicina como agente quimioterápico em humanos provoca alguns efeitos colaterais indesejáveis como arritmia cardíaca, cardiomiopatia e atividade imuno-supressiva, predispondo as pessoas à infecções. Em razão disto, tem sido estudado o encapsulamento deste composto em um vetor como o próprio DNA, a concanavalina A, dextranas, anticorpos, etc. Esta substância uma vez administrada pode se distribuir em outros sítios como membranas e proteínas, já que ela se liga reversivelmente tanto ao carregador como ao DNA. Estudos via irradiação com luz UV/V ($\lambda = 240-600\text{nm}$) no complexo DNA/daunomicina indicam a formação de uma ligação irreversível entre ambos (semelhante ao que ocorre na fotoadição entre psoralenos e DNA) com pequeno rendimento quântico. Foi verificado que este processo depende da força iônica e da concentração de O_2 . Contudo, a intensidade de luz necessária para formar o fotoproduto causa alterações profundas no DNA, como ruptura da cadeia no local em que ocorreu a reação, desnaturação e enrolamento do ácido nucleico, etc. [12].

As antraciclinas (adriamicina e daunomicina), quando em pequenas quantidades, facilitam a ligação de actinomicina D ao poli(dAdT), um

duplex ao qual esse antibiótico não se liga na ausência daquelas substâncias. Todavia, esse efeito sinérgico não é geral e não ocorre, por exemplo, para o brometo de etídeo (outro intercalador muito comum e que exibe ação contra a esquistossomose) e o alaranjado de acridina. A interação cooperativa entre os antibióticos foi interpretada como resultante de uma distorção induzida pela adriamicina na hélice do poli(dAdT). poli(dAdT) facilitando a ligação de actinomicina D. Ambas as substâncias (adriamicina e daunomicina) mostraram exibir ligações cooperativas em soluções com força iônica comparável àquela existente em líquidos fisiológicos (contendo 0,9%, em massa, de NaCl), mas quando o sal está em concentrações iguais a 0,01 e 1,0 M ambas as drogas interagem com o DNA de maneira não cooperativa. Este efeito é contrário ao observado na actinomicina D cujo grau de cooperatividade parece aumentar com a redução da força iônica. A interação de outro antibiótico, a distamicina (que também intercala no DNA) é insensível à concentração de íons [13].

Foi verificado que adriamicina exibe maior grau de cooperatividade que daunomicina, donde se especula que a ligação de hidrogênio adicional no grupo hidroxila do C14 da adriamicina estabiliza o complexo DNA-intercalador [13].

A Tabela 5.3 sumariza as constantes de equilíbrio e o parâmetro de exclusão n (isto é, o número de pares de bases inviabilizados pela intercalação) para a daunomicina quando é alterada a porcentagem de pares de bases CG, relativas ao DNA de alguns microorganismos. Estes resultados mostram claramente que a daunomicina apresenta maior seletividade à intercalação entre pares de base CG. A razão entre as constantes de interação de daunomicina com DNA do *Micrococcus lysodeikticus* (ML, que contém 72% de pares de bases CG) e *Chlostridium perfringens* (CP, que contém 31% de pares CG) pode ser definida como $\alpha = K_{ML} / K_{CP} = 3,9$ [14].

DNA	%CG	K ($\times 10^5 M^{-1}$)	n
poli(dG-dC)	100	37,0	2,8
<i>M. lysodeikticus</i>	72	15,0	3,1
<i>E. Coli</i>	50	7,1	3,3
Timo de bezerro	42	6,6	3,6
<i>C. perfringens</i>	31	3,9	3,0

Tabela 5.3 Constantes de equilíbrio e parâmetros de exclusão de daunomicina

O parâmetro α fornece uma medida quantitativa sobre a especificidade da interação das substâncias mencionadas com as bases, possibilitando descobrir qual é a composição do DNA no local da intercalação. Este parâmetro é semelhante a:

$$\alpha' = r_{ML} / r_{CP}$$

onde r_{ML} e r_{CP} são as razões entre as concentrações das espécies intercaladas e dos pares de bases para *M. lysodeikticus* e *C. perfringens*, respectivamente. A Tabela 5.4 apresenta os valores de α previstos em vários modelos que descrevem a especificidade da interação de daunomicina com DNA [14].

Sequências de sítios	Probabilidade	α
1 sítio CG	f	2,3
1 sítio AT	$1-f$	0,4
1 sítio CG/AT, AT/CG ou CG/CG	$2f-f^2$	1,75
2 sítios CG adjacentes	f^2	5,4
3 sítios CG	f^3	12,5
3 sítios AT/CG/CG, CG/AT/CG, CG/CG/AT	$3f^2-3f^3$	2,2
3 sítios AT/CG/CG, CG/CG/AT, CG/CG/CG	$2f^2-f^3$	4,1

Tabela 5.4 Valores de α previstos em vários modelos para interação específica

f indica a probabilidade da espécie intercaladora interagir com um par específico de bases. Assim, se uma substância intercala unicamente entre pares de bases CG α seria f_{ML} / f_{CP} ($0,72/0,31 = 2,3$), onde f_{ML} e f_{CP} são as porcentagens de bases CG em *M. lysodeikticus* e *C.*

perfringens respectivamente. Para uma espécie que intercala entre dois sítios CG adjacentes α seria f_{ML}^2 / f_{CP}^2 ($0,71^2 / 0,31^2 = 5,4$). Assim, conhecendo o valor de α pode-se ter uma idéia sobre entre que pares de bases ocorre a intercalação de uma dada molécula.

A estrutura do complexo daunomicina-oligonucleotídeo tem sido resolvida, mediante difração de raios X, em escala atômica, fornecendo algumas informações sobre a ligação específica da daunomicina. Duas moléculas desta substância estão unidas à forma helicoidal dos hexâmeros auto-complementares d(CGTACG), cada uma das quais intercalada entre os pares de bases CG existentes nas extremidades das fitas. No sulco maior um íon sódio hidratado é coordenado ao N7 da molécula de guanina existente acima do intercalador e aos átomos de oxigênio O4 e O5 da molécula de daunomicina. No sulco menor, o átomo de oxigênio do grupo carbonila ligado ao carbono C13 da molécula de daunomicina interage via ponte de hidrogênio com uma molécula de água compartilhada, também, por essa ligação à molécula de citosina colocada acima do intercalador. O grupo hidroxila em C9 participa em duas pontes de hidrogênio: uma delas com o átomo de nitrogênio N2 e a outra com N3 da guanina abaixo do intercalador. Quando a guanina for substituída por adenina esta participa de apenas uma ponte de hidrogênio (Figura 5.5) [3].

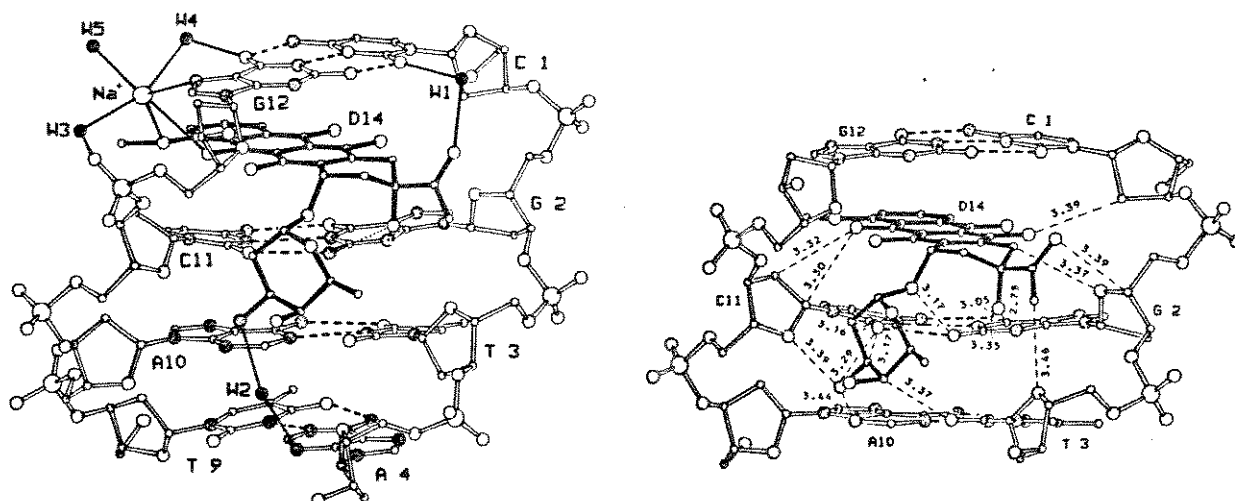


Figura 5.5 Estrutura do complexo daunomicina / d(CGTACG)

O comportamento da substância daunomicina tem sido intensamente investigado em sistemas biológicos. Como exemplo podemos citar os

trabalhos realizados por Frezard e Garnier-Suillerot [15] os quais compararam a ligação de daunomicina com DNA purificado e com o núcleo celular, utilizando espectroscopia de fluorescência. Chaires e col. [16] avaliaram o efeito causado pela interação eletrostática entre intercalador e intercalante na energia livre de ligação do DNA com algumas antraciclinas (doxorubicina, hidroxirubicina e daunomicina) utilizando métodos de titulação fluorescente e diálise. A caracterização termodinâmica (isto é, a determinação de ΔG° , ΔH° e ΔS°) dos complexos formados entre a daunomicina e vários duplexes poliméricos (poli [d(AT)] · poli [d(AT)]; poli [d(CG)] · poli [d(CG)]; poli [d(A)] · poli [d(T)], etc.) foi feita por Remeta e col. [17], através de espectroscopia de absorção e de emissão e calorimetria.

Dada à sensibilidade da técnica, medidas espectroscópicas baseadas na absorção e, particularmente, na fluorescência molecular são adequadas ao estudo de moléculas biológicas. A emissão pode ser devida ou à biomolécula em si (chamada de emissão primária) ou a uma substância ligada à biomolécula (e, neste caso, é chamada de emissão secundária). No primeiro caso é necessária radiação UV para excitar o sistema e a informação conseguida está relacionada à própria molécula excitada. No segundo, as propriedades de emissão (rendimento quântico, tempo de vida, alterações na intensidade e na posição das bandas espectrais, etc.) dependem do mecanismo de interação da substância com a biomolécula.

II) Parte experimental

II.1) Reagentes

Alaranjado de acridina (3, 6 -bis (dimetil amino) acridina, British Drug House)

Cloridrato de daunomicina (Farmitalia Carlo Erba)

DNA de timo de bezerro (Sigma)

O alaranjado de acridina, na forma de cloridrato, foi purificado mediante dissolução em uma mistura de água e etanol (1/1 v/v) e precipitado pela adição de solução aquosa de NaOH 0,1M. A seguir o sólido foi lavado com água destilada, seco a 70°C e armazenado sob vácuo em um recipiente protegido da luz. A pureza do composto foi verificada pelo ponto de fusão (181°C).

As demais substâncias foram empregadas sem purificação.

II.2) Equipamentos

Espectrofluorímetro marca SLM-AMINCO, modelo SPF-500C

Espectrofotômetros de absorção V/UV marca Intralab, modelo DMS100 e Varian, modelo Cary 2300

Microbalança marca Mettler, modelo ME22

Balança analítica, marca Fisher Scientific, modelo A-250

pHmetro marca Digimed, modelo DMPH2

II.3) Purificação da água

Todas as soluções foram preparadas utilizando água bi ou tri destilada, segundo o procedimento normal de destilação.

II.4) Preparação das soluções

II.4.1) Solução estoque de alaranjado de acridina

Pesou-se o corante na microbalança e a massa foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 50ml e completado o volume com água.

II.4.2) Soluções tampão

Foram preparadas as seguintes soluções tampão:

a) Kolthoff-Vleeschhouwer [18]

Na_2CO_3 (0,05M) + $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (0,05M) 9,2 \leq pH \leq 11,0

Na_2HPO_4 (0,1M) + NaOH (0,1M) 11,0 \leq pH \leq 12,0

b) tampão fosfato [19]

39,0ml KH_2PO_4 (0,2M) + 61,0ml K_2HPO_4 (0,2M) pH=7,0

Para o acerto de pH entre 1 e 10 foram empregadas as soluções de Clark-Lubs [18]:

HCl (0,2M) em KCl (0,2M) 1,0 \leq pH \leq 2,2

HCl (0,1M) + hidrogenoftalato de potássio (0,1M) 2,2 \leq pH \leq 3,8

NaOH (0,1M) + hidrogenoftalato de potássio (0,1M) 4,0 \leq pH \leq 6,0

NaOH (0,1M) + dihidrogenoftalato de potássio (0,1M) 6,0 \leq pH \leq 8,0

NaOH (0,1M) + H_3BO_3 (0,1M) em KCl 0,1M 7,8 \leq pH \leq 10,0

Foram retiradas alíquotas de 2,5ml da solução estoque de alaranjado de acridina, transferidas para balões de 25ml, completado o volume de cada um deles com as soluções tampão e medidos os valores de pH. Logo em seguida foram registrados os espectros de absorção.

II.4.3) Soluções, com diferentes forças iônicas, contendo alaranjado de acridina

Foram retiradas alíquotas de 10ml da solução estoque de alaranjado de acridina e a cada uma delas adicionada uma diferente massa de NaCl.

II.4.4) Soluções para estudos sobre o coeficiente de extinção molar de alaranjado de acridina

Foram preparadas soluções com diversas concentrações de alaranjado de acridina e registrados os espectros de absorção. A seguir, foi adicionado a cada uma delas NaOH sólido de modo a obter a espécie desprotonada do corante, sendo novamente registrados os espectros de absorção.

II.4.5) Soluções para estudos espectroscópicos sobre as espécies monomérica e dimérica de alaranjado de acridina

Foram preparadas soluções de concentrações conhecidas (entre 10^{-4} a 10^{-6} M) e, em seguida, obtidos os espectros de absorção e de emissão.

II.4.6) Soluções contendo daunomicina

Foi conseguida uma solução aquosa desta substância (empregada em tratamento quimioterápico no Hospital de Clínicas da UNICAMP) e a concentração da mesma foi determinada através de espectro de absorção sendo usado o coeficiente de extinção mencionado no trabalho de Chaires e col. [20]. A seguir, esta solução foi diluída para se obter a concentração desejada e o acerto do pH (7,1) foi feito com o tampão fosfato.

II.4.7) Soluções utilizadas nos estudos sobre as interações entre alaranjado de acridina e as bases nitrogenadas

Volumes iguais de solução estoque do corante foram colocados em balões de 10ml. A cada um deles, separadamente, foi acrescentada determinada massa de adenina, guanina, timina e o nucleosídeo de citidina. As soluções foram homogeneizadas e registrados os espectros de absorção e de emissão.

II.4.8) Soluções utilizadas nos estudos sobre as interações entre daunomicina com as bases nitrogenadas

Foi preparada uma solução de daunomicina por diluição da solução estoque a qual foi dividida em cinco partes iguais e a cada uma delas foi adicionada uma quantidade conhecida de cada uma das bases nitrogenadas. A última foi utilizada como referência na obtenção dos espectros de absorção e emissão.

II.4.9) Soluções, com diferentes forças iônicas, contendo daunomicina

O procedimento adotado foi o mesmo descrito para as soluções de alaranjado de acridina, sendo usadas alíquotas de 5ml.

II.4.10) Solução estoque de DNA

O DNA foi pesado em microbalança e colocado em um tubo de ensaio com boca arrolhável. Em seguida foi adicionada determinada massa de água tri-destilada (pesada em uma balança analítica). O tubo foi tapado, envolvido em papel alumínio e colocado em um segundo tubo de ensaio maior adaptável a um rota evaporador.

Este conjunto foi colocado em uma geladeira ($\approx 5^{\circ}\text{C}$) por dois dias após o que o recipiente foi acoplado a um rota evaporador, colocado em um banho de gelo e movimentado com uma rotação de 10 a 15rpm durante

5hs. A seguir, o recipiente foi retirado do aparelho e girado uma vez mais para homogeneizar a solução. Esta foi monitorada obtendo-se os espectros de absorção na região do UV das soluções coletadas na superfície e no fundo do tubo. A concentração do DNA foi determinada espectroscopicamente utilizando o coeficiente de extinção fornecido por Kubista e col. [21].

II.4.11) Soluções para estudos sobre o coeficiente de extinção de DNA

Foi preparada a solução estoque de DNA cuja concentração foi determinada através do espectro UV utilizando uma cubeta com 0,1cm de caminho ótico. Preparou-se várias outras soluções por diluição da solução estoque utilizando água tri-destilada. As diluições foram feitas em balões de 10ml através da pesagem da massa de água e da massa da solução estoque de DNA.

A seguir estas soluções foram deixadas em repouso por uma noite em geladeira (temperatura $\approx 5^{\circ}\text{C}$) e, no dia seguinte, obtidos os espectros de absorção em cubetas com 1cm de caminho ótico.

II.4.12) Soluções para estudos sobre a influência da força iônica no coeficiente de extinção molar de DNA

Foi retirada uma alíquota da solução estoque de DNA e feita a diluição para obter uma concentração de fosfato igual a $8,1 \times 10^{-5}\text{M}$. Esta solução foi dividida em quatro volumes iguais a 10ml e a cada um deles foi adicionada uma dada massa de NaCl.

Estas soluções foram deixadas em repouso por uma noite e, a seguir, obtidos os espectros de absorção.

II.4.13) Soluções para estudos sobre a intercalação de alaranjado de acridina em DNA

Com as soluções estoque de DNA e de agente intercalante foram preparadas várias soluções do complexo DNA/alaranjado de acridina usando o seguinte procedimento:

- 1) Foram adicionados volumes constantes da solução estoque do corante em balões de 10ml.
- 2) A cada um destes balões foram adicionadas massas diferentes e pré-estabelecidas de solução de DNA.
- 3) As diferenças entre as massas totais (massa de solução de DNA + massa de solução de alaranjado de acridina) em cada balão foram

igualadas pela adição de água tri-destilada (efeito de diluição). Os balões foram envolvidos em papel alumínio, colocados na geladeira por uma noite e os espectros de absorção e emissão obtidos no dia seguinte.

II.4.14) Soluções para estudos sobre a intercalação de daunomicina em DNA

O procedimento adotado no preparo das soluções foi idêntico ao anteriormente descrito.

II.4.15) Soluções para estudos sobre a influência da força iônica no complexo DNA/agente intercalante (alaranjado de acridina e daunomicina)

As soluções contendo DNA e o agente intercalante foram divididas em alíquotas iguais e a cada uma delas foi adicionada determinada massa de NaCl e obtidos os espectros de absorção e de emissão.

III) Objetivo

O objetivo deste trabalho é estudar e compreender as interações, via intercalação, que ocorrem entre duas substâncias que apresentam atividade carcinogênica e mutagênica e o ácido desoxiribonucleico (DNA).

Para isto foram utilizadas as técnicas de espectrofotometria de absorção e emissão na região do UV/VIS, pois tais substâncias, sob intercalação, apresentam modificações em seus espectros. Foi necessário estudar as características espectrais das espécies intercalantes em soluções com diversos valores de pH e força iônica para verificar a possível formação de agregados e complexos com o DNA.

No transcorrer dos estudos foram obtidas as constantes de equilíbrio dos diversos processos que ocorrem entre a substância intercalante e o DNA.

IV) Resultados e Discussão

IV.1) Influência do pH nos espectros de absorção e de emissão de soluções contendo alaranjado de acridina

IV.1.1) Espectros de absorção

O corante alaranjado de acridina (AA) pode apresentar diferentes espécies em solução, dependendo de sua concentração, da natureza do solvente e da acidez da mesma. Em solução aquosa ($1 \leq \text{pH} \leq 10$) e em concentrações $\leq 10^{-5} \text{M}$ existe apenas o monômero cuja molécula se encontra na forma mono-protonada (AAH^+), exibindo máximo de absorção em $\approx 492 \text{nm}$. Em soluções com $\text{pH} \geq 10$ forma-se a espécie neutra (AA^0) que possui um máximo de absorção em $\approx 430 \text{nm}$ existindo, ainda, uma outra espécie, di-protonada (AAH_2^{2+}), que aparece em soluções extremamente ácidas ($\text{pH} < 1$), e cujo espectro de absorção é semelhante ao da espécie mono-protonada diferindo deste pelo aparecimento de outras duas bandas com máximos em 353 e 370nm.

A Figura IV.1 mostra a variação da intensidade relativa de absorção em função do pH, isto é, à medida em que ocorre inter-conversão entre as espécies neutra e mono-protonada do corante. Todas as intensidades de absorção em 492nm, para a espécie mono-protonada, e em 430nm, para a neutra, foram divididas pelo valor de intensidade de absorção (0,407) em 492nm da solução cujo $\text{pH}=3,0$.

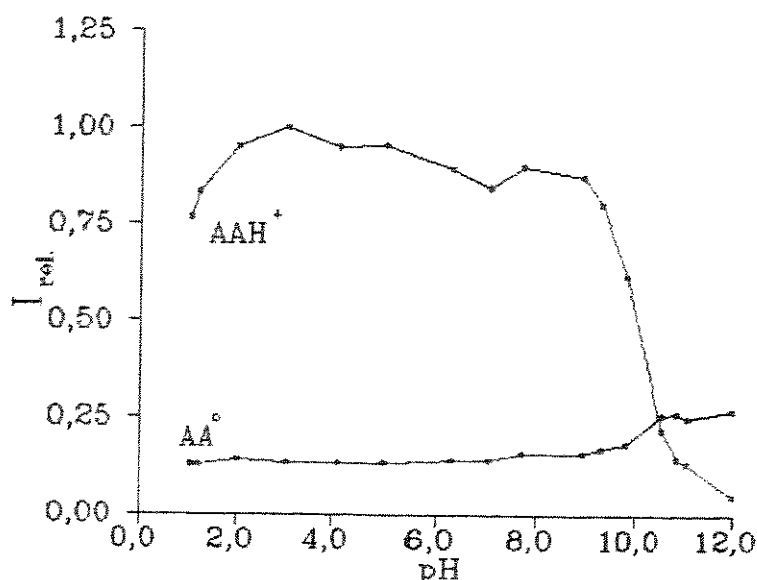


Figura IV.1 I_{rel} de absorção das espécies neutra (AA^0) e monoprotionada (AAH^+) do corante alaranjado de acridina vs pH

Moulic e col. [22] estudaram essa interconversão obtendo uma constante de equilíbrio igual a $(3,19 \pm 0,21) \times 10^4 M^{-1}$ em um intervalo de pH entre 10,0 e 11,5. Como pode ser visto na Figura IV.1 a viragem do corante ($AAH^+ \rightleftharpoons AA^0$) ocorre no referido intervalo, concordando com os dados mencionados na literatura.

A Figura IV.2 mostra os espectros de absorção obtidos para as soluções com diferentes valores de pH. Observa-se que, à medida em que a acidez do meio aumenta, há uma redução na intensidade da banda em 430nm (devida a uma transição $n-\pi^*$ associada à espécie neutra) e aumento daquela com máximo em 492nm (atribuída à transição $\pi-\pi^*$ e associada à espécie mono-protonada). Portanto, a protonação da molécula de AA ocorre no átomo de nitrogênio localizado no anel central (sendo responsável pela transição $n-\pi^*$) e que possui caráter básico maior que os demais nitrogênios (devido à hibridização sp^2 daquele e à ressonância dos elétrons π com o anel aromático).

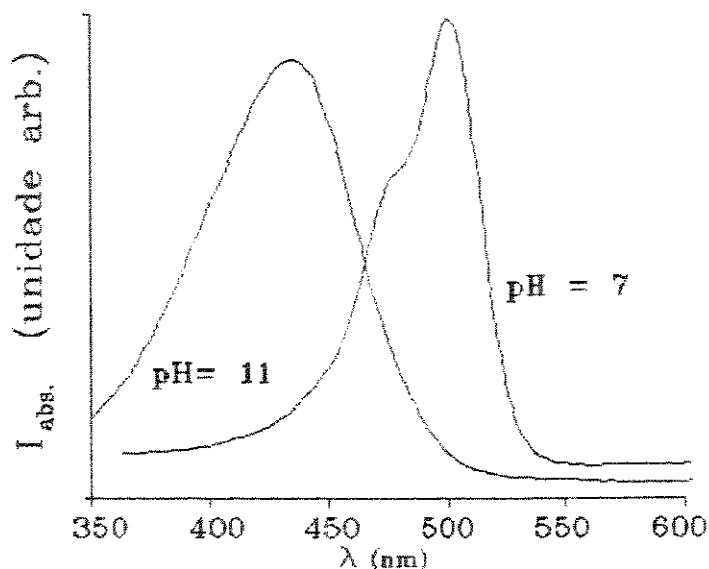


Figura IV.2 Espectros de absorção de AA^0 em $pH=11$ e de AAH^+ em $pH=7$ (os fatores de multiplicação para o espectro da solução em $pH=11$ e em $pH=7$ são, respectivamente, 3,3 e 1) $[AA]=6,2 \times 10^{-6} M$

IV.2) Influência da concentração nos espectros de absorção e de emissão

IV.2.1) Espectros de absorção

Em concentrações $< 1 \times 10^{-5} M$ e pH neutro a espécie predominante do corante alaranjado de acridina em solução é o monômero (AAH^+) sendo que, em concentrações maiores, predominam agregados (dímeros $(AAH^+)_2$,

trímeros $(AAH^+)_3$ e agregados de maior ordem). A Figura IV.3 ilustra os espectros de absorção para estas espécies, mostrando que monômeros e dímeros possuem bandas com máximo em $\approx 492\text{nm}$ e $\approx 472\text{nm}$, respectivamente.

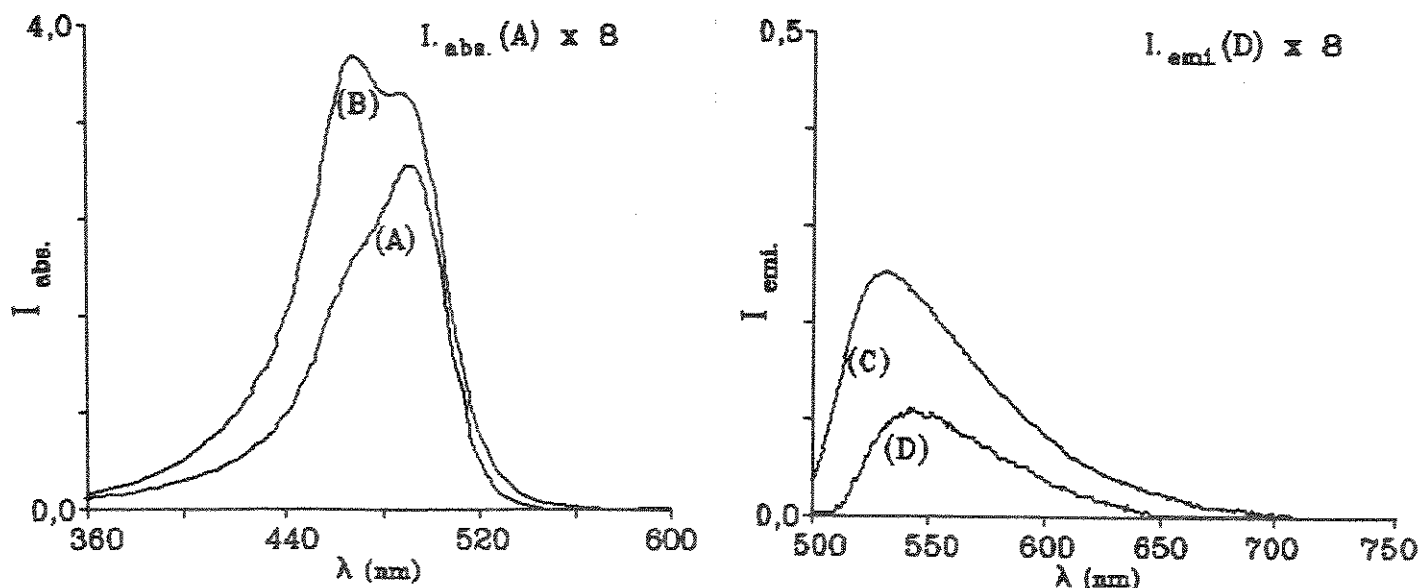


Figura IV.3 Espectros de absorção de AAH^+ (A), do agregado (B) e de fluorescência ($\lambda_{exc.} = 492\text{nm}$) de AAH^+ (C) e do agregado (D)

Robinson e col. [23], estudaram a auto-agregação do AAH^+ em solução aquosa verificando que o coeficiente de extinção molar (determinado em 492nm) para o monômero, dímero e altos agregados é, respectivamente, 60000 , 15000 e $6500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, quando em soluções contendo 10% (v/v) de metanol e dioxano. Em solução aquosa, a 25°C , há um ponto isosbético em concentrações baixas ($1-5 \times 10^{-5}\text{M}$), correspondendo ao equilíbrio $AAH^+ \rightleftharpoons (AAH^+)_2$. Porém, quando a concentração de AAH^+ aumenta, modificam-se continuamente a forma e a intensidade das bandas espectrais, indicando a existência de uma terceira espécie que corresponde a agregados de maior ordem.

Evidentemente haverá uma dada concentração em que existirão, no equilíbrio, as três espécies solvatadas: o monômero, o dímero e o trímero ou altos agregados, as quais são responsáveis pela contínua alteração que ocorre nos espectros de absorção do alaranjado de acridina.

Blears e Danyluk [24] estudaram, com espectroscopia na região IV, o complexo formado pelo agregado, mostrando que no dímero com estrutura tipo sanduíche os prótons 1, 9 e os metilênicos dos monômeros se

encontram mais próximos do centro do anel adjacente que os prótons 4, 5 e 6 (Figura IV.4).

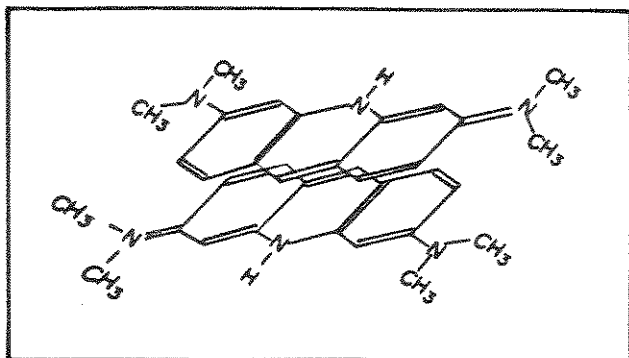


Figura IV.4 Estrutura do dímero de AA

A diferença observada entre os espectros de absorção do agregado e do monômero pode ser explicada pela teoria do exciton [2]; segundo esta, o aparecimento da nova banda em λ menores é devido à combinação linear dos estados eletrônicos excitados das moléculas constituintes do agregado, desdobrando o estado eletrônico excitado em dois novos estados (chamados de estados excitônicos). Neste caso, a energia de transição é dada por:

$$\Delta E_{\text{agr.}} = \Delta E_{\text{mon.}} + \Delta D \pm E$$

onde: $\Delta E_{\text{agr.}}$ é a energia de transição do agregado, $\Delta E_{\text{mon.}}$ é a energia de transição do monômero, ΔD é a diferença de energia de van der Waals em virtude da formação do agregado e E é a diferença de energia entre os estados excitônicos

A transição ao estado excitônico de menor energia é proibida pelo fato de que as interações entre os monômeros constituintes fornecem um momento dipolar total nulo. O estado eletrônico excitônico de maior energia corresponde ao dímero com momento dipolar total não nulo. Neste caso, a transição é permitida e ocorre em comprimento de onda menor que o da transição associada à espécie monomérica.

IV.2.2) Espectros de emissão

A Figura IV.3 mostra, também, que a presença de dímeros em solução influencia a intensidade e a largura da banda de emissão do monômero, sendo que quando os primeiros estão em concentrações muito altas verifica-se a supressão quase completa da fluorescência do monômero. Este fenômeno, e o aumento de intensidade de emissão da fosforescência [25] quando em baixas temperaturas, é atribuído, segundo a teoria exciton [2], à conversão interna entre os estados exciton e ao cruzamento inter-sistemas do estado de menor energia exciton para o estado tripleto.

IV.3) Influência da força iônica nos espectros de absorção e de emissão de alaranjado de acridina

IV.3.1) Espectros de absorção

Foi obtido o valor de $5,68 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar (ϵ) de AAH^+ em solução aquosa variando-se a concentração do mesmo em diferentes soluções (Figura IV.5). Este coeficiente depende de uma série de fatores, entre os quais a força iônica, a concentração de agregados e a natureza do solvente.

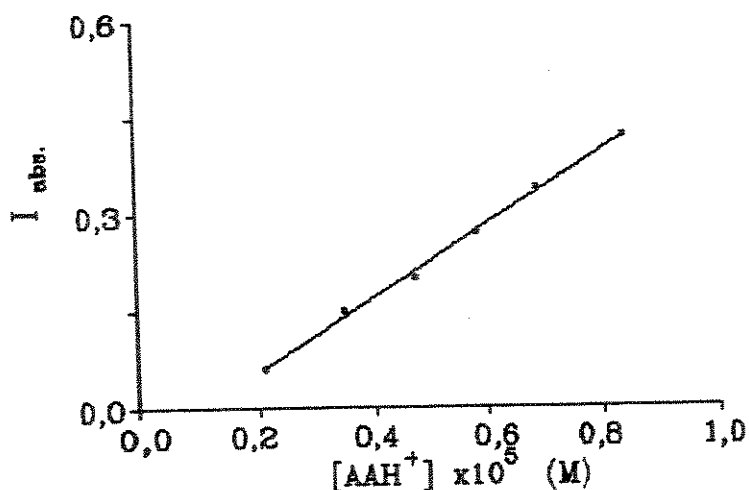


Figura IV.5 $I_{\text{máx.}}$ de absorção (em 492nm) da solução de AAH^+ vs $[\text{AAH}^+]$

A Figura IV.6 mostra os gráficos de $I_{rel.}$ vs $[NaCl]$ relativos aos máximos de intensidades de absorção e de emissão dos espectros do corante mencionado. As intensidades relativas desses espectros foram obtidas dividindo-se as de absorção e de emissão de cada solução com diferentes concentrações de NaCl, respectivamente, pela intensidade de absorção (0,341) e de emissão (0,084) daquela cuja $[NaCl]=0$

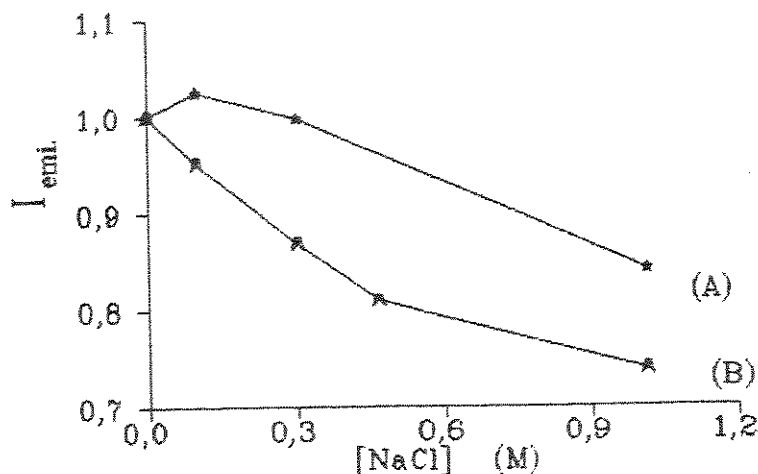


Figura IV.6 $I_{rel.}$ de absorção ($\lambda_{abs.} = 492nm$) (A) e emissão ($\lambda_{exc.} = 492nm$, $\lambda_{em.} = 530nm$) (B) de AAH^+ vs $[NaCl]$ ($[AAH^+] = 5,7 \times 10^{-6} M$)

Para $[NaCl] > 0,1M$ foi observada uma crescente diminuição na intensidade da banda de absorção em 492nm, mantendo-se constante a intensidade em 470nm. Isto ocorre porque o aumento de força iônica causa uma variação na constante de equilíbrio das espécies monômero/dímero favorecendo a formação do último. Estudos semelhantes foram feitos por Barone [26] indicando que em soluções aquosas ocorre a formação de agregados de AAH^+ quando são adicionados ao meio LiCl, NaCl ou CsCl. Os íons Cl^- causam um efeito de blindagem sobre a carga positiva de AAH^+ , favorecendo as interações de Van der Waals entre os monômeros formando, assim, o dímero.

IV.3.2) Espectros de emissão

Verifica-se nestes espectros uma redução monotônica de $I_{máx.}$ com o aumento da força iônica (Figura IV.6) a qual se deve exclusivamente à formação de agregados que suprimem a fluorescência.

IV.3.3) Estudos sobre a constante de equilíbrio entre o monômero e o dímero

Além dos coeficientes de extinção molar das espécies monoméricas e agregadas, Robinson e col. [23] obtiveram os espectros de absorção das três espécies de alaranjado de acridina presentes em equilíbrio e as respectivas constantes para soluções com diferentes forças iônicas (Figura IV.7).

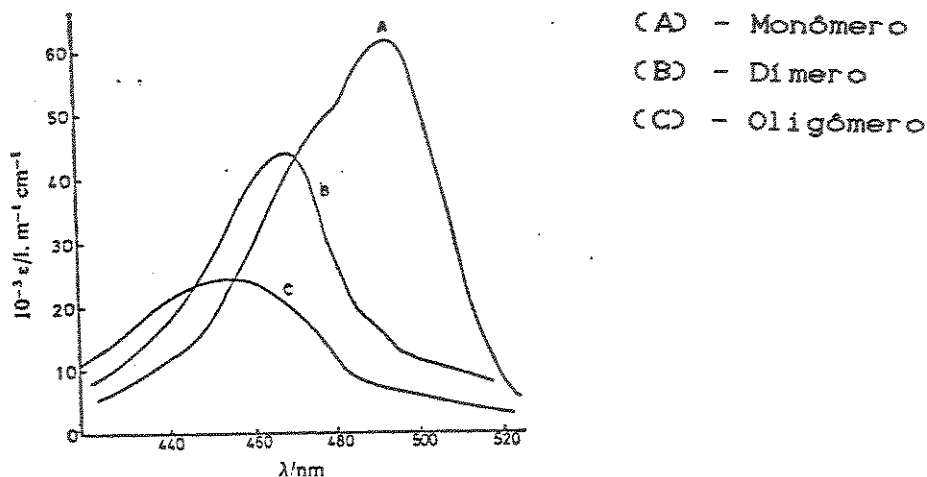


Figura IV.7 Espectros de absorção de monômeros, dímeros e oligômeros de AAH^+ em solução aquosa

Comparando esses espectros e os obtidos neste trabalho, verifica-se que há, em realidade, apenas duas espécies presentes em equilíbrio: o monômero e dímero. Sabe-se que a intensidade de emissão é nula para o dímero, em razão do que pode-se afirmar que a espécie emissora é o monômero.

Utilizando a constante do equilíbrio monômero \rightleftharpoons dímero dada por Robinson e col. [23] e a conservação de massa pode-se obter a concentração do monômero para a solução em que a força iônica é nula. Em seguida, conhecendo as intensidades das bandas de emissão para as soluções com força iônica $I \neq 0$ é possível obter $[AAH^+]$ para cada uma delas e a constante de equilíbrio, conforme mostram as equações seguintes:

$$K_i = \frac{[(AAH^+)_2]}{[AAH^+]^2}$$

$$K_c = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

$$I_i / I_0 \times [AAH^+]_0 = [AAH^+]$$

$$C_i = [AAH^+] + 2 \times [(AAH^+)_2]$$

onde K_i e K_c são as constantes de equilíbrio para a solução com força iônica i e 0; C_i é a concentração analítica de AA; $[AAH^+]$ e $[(AAH^+)_2]$

são as concentrações do monômero e dímero e I_i e I_0 são as intensidades de emissão à força iônica i e 0 , respectivamente.

Os resultados obtidos, juntamente com os conseguidos por Robinson e col. [23], estão mostrados na Tabela IV.1.

[NaCl] M	Robinson $K \times 10^{-4} M^{-1}$	Obtido $K \times 10^{-4} M^{-1}$
0,0	1,0	—
0,10	1,4	1,43
0,25	2,2	—
0,30	—	2,40
0,47	—	3,33
0,50	3,2	—
1,00	—	4,82

TabelaIV.1 Constantes de equilíbrio $(AAH^+)_1 \rightleftharpoons (AAH^+)_2$ em meios com diferentes [NaCl]

A concordância entre os resultados mostrados nesta Tabela, indica que a fluorimetria é uma técnica adequada à obtenção de constantes de equilíbrio para sistemas semelhantes.

IV.4) Influência da força iônica nos espectros de absorção e de emissão de daunomicina

IV.4.1) Espectros de absorção

Não foi verificada nenhuma alteração acentuada no valor de $I_{máx.}$ e na posição da banda de absorção, com a força iônica, como pode ser visto na Figura IV.8. As intensidades relativas foram obtidas dividindo as intensidades de absorção (0,319 em $\lambda=498nm$) e de emissão (3,254 em $\lambda=595nm$) de cada solução pelos valores obtidos para solução de daunomicina cuja [NaCl]=0.

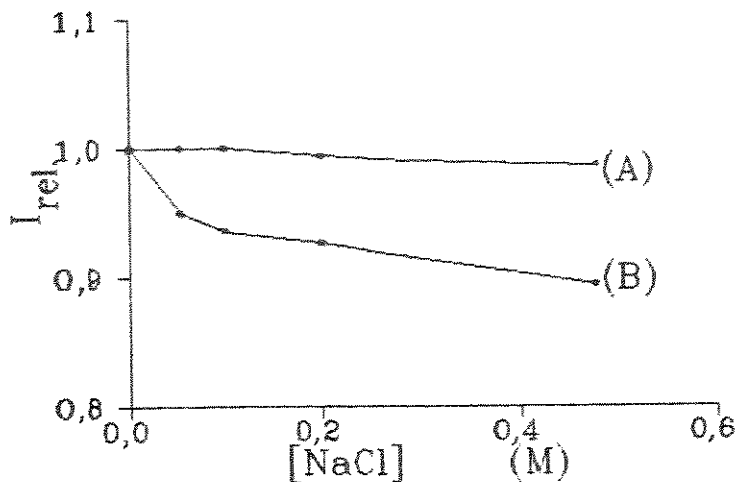


Figura IV.8 $I_{rel.}$ de absorção (A) e de emissão ($\lambda_{exc.} = 498nm$) (B) de daunomicina vs [NaCl] ([daunomicina] = $2,81 \times 10^{-5} M$)

IV.4.2) Espectros de emissão

A Figura IV.8 indica que existe supressão da fluorescência, havendo desativação da espécie excitada. Isto se deve à formação de agregados em solução, em virtude do equilíbrio mencionado.

A literatura mostra vários experimentos feitos para verificar o comportamento do espectro de absorção de daunomicina com sua concentração [20, 27, 28]. Chaires e col. [20] obtiveram o valor de $11500 M^{-1} cm^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar aparente do monômero e, através do gráfico de ϵ vs [Dau], foi possível obter a expressão que relaciona ϵ com [Dau] em concentrações suficientemente elevadas para formar agregados:

$$\epsilon = -897,1 \ln [Dau] + 1931$$

Menziozzi e col. [28] obtiveram $\epsilon = 12960 \pm 60$ e $8840 \pm 140 M^{-1} cm^{-1}$ para o monômero e o dímero, respectivamente, cuja diferença é $\approx 13\%$.

IV.4.3) Estudos sobre a formação de dímeros

Para comprovar se a supressão de fluorescência se deve à formação de dímeros foram realizados estudos semelhantes ao efetuados com o corante AA. Primeiro supuzemos que o dímero de daunomicina não emite

luz. A constante de dimerização fornecida por Menozzi e col. [28] para a substância em tampão fosfato (força iônica=0,05; pH 7) é $(12,98 \pm 1,74) \times 10^3 M^{-1}$ e em tampão fosfato + NaCl (força iônica=0,196; pH 7) é $(16,07 \pm 1,53) \times 10^3 M^{-1}$. Com estes valores e os resultados mostrados na Tabela IV.2 calculamos a constante do equilíbrio monômero \rightleftharpoons dímero (para solução com força iônica=0,20) como sendo igual a $17,67 \times 10^3 M^{-1}$.

[NaCl] M	[Dau] $10^5 M$	$I_{em.}$	[Mon] $10^5 M$	[Dím] $10^5 M$
0,00	2,81	3,254	1,88	0,465
0,20	2,81	3,015	1,74	0,535

Tabela IV.2 Intensidades de emissão e concentrações do monômero e do dímero para duas soluções de daunomicina ($2,81 \times 10^{-5} M$) com forças iônicas diferentes

O erro observado é $\approx 10\%$ (praticamente o mesmo obtido por Menozzi [28]), ou seja, o valor encontrado está dentro do desvio padrão da medida e, portanto, é provável que a supressão de fluorescência se deva à formação de dímeros e estes emitam muito fracamente.

IV.5) Estudos espectroscópicos sobre as interações entre bases nitrogenadas e alaranjado de acridina

IV.5.1) Espectros de absorção

As intensidades espectrais obtidas para as soluções contendo as bases nitrogenadas adenina, citidina e timina e o corante AA não mostraram variações acentuadas quando comparadas com aquelas conseguidas para solução aquosa contendo AAH^+ . As mudanças mais intensas ocorreram com as soluções de guanina/ AAH^+ , conforme mostra a Figura IV.9. As intensidades relativas foram calculadas dividindo as intensidades de absorção (0,558 em $\lambda=492nm$) e emissão (0,565 em $\lambda=530nm$) para várias soluções pela respectivas intensidades da solução cuja [Guanina]=0.

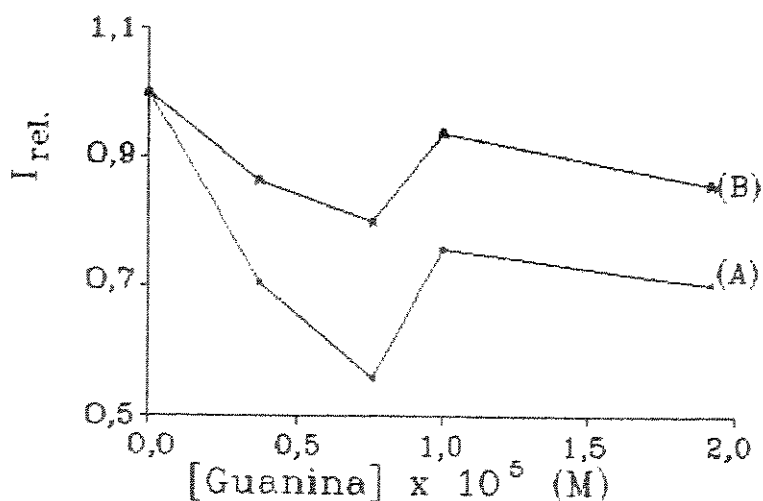


Figura IV.9 I_{rel.} de absorção (A) e de emissão ($\lambda_{exc.} = 492nm$) (B) de AAH⁺ vs [guanina] ([AAH⁺] = $1,0 \times 10^{-5}$ M)

A Tabela IV.3 mostra a solubilidade das bases mencionadas em água.

Substância	Solubilidade (g/l)
Adenina	0,5
Citidina	solúvel
Guanina	insolúvel
Timina	4,0

Tabela IV.3 Solubilidade das bases nitrogenadas em água

A guanina é insolúvel em água e ao ser adicionada na solução de AAH⁺ provoca a coprecipitação do corante, diminuindo sua concentração efetiva e causando as variações observadas na Figura IV.9. Para [guanina] $\geq 10^{-6}$ M a solução deixa de ser translúcida, aumentando a absorção e a intensidade de emissão.

IV.6) Estudos espectroscópicos sobre as interações entre bases nitrogenadas e daunomicina

IV.6.1) Espectros de absorção

A Tabela IV.4 mostra que houve pequena mudança (-4,5%) nas intensidades das bandas de absorção de todas as soluções contendo bases nitrogenadas, quando comparadas àquelas contendo apenas o corante.

[Dau] = $2,95 \cdot 10^{-5}$ M			
Base	[Base]/[Dau]	I _{abs.}	I _{em.}
Guanina	1,92	0,436	0,291
Citidina	2,05	0,440	0,285
Timina	1,99	0,442	0,282
Adenina	2,01	0,444	0,285
Ref	0,00	0,464	0,297

Tabela IV.4 Intensidades de absorção e de emissão de daunomicina em presença e ausência de bases nitrogenadas

Conforme veremos adiante, as alterações espectrais que ocorrem quando AA ou daunomicina são adicionadas a soluções contendo DNA não podem ser atribuídas às interações com as respectivas bases nitrogenadas, pois as mudanças aqui observadas são desprezíveis quando comparadas àquelas ocorridas durante a intercalação.

IV.7) Estudos sobre o coeficiente de extinção molar de DNA

Foi realizado um estudo para determinar o valor do coeficiente de extinção molar (ϵ) do DNA nas condições utilizadas nestes experimentos. Para tal, foi alterada a concentração de DNA, adotando o valor de ϵ mencionado na literatura para obter uma concentração inicial e em seguida foram feitas soluções a partir da solução estoque e obtido, graficamente, o coeficiente de extinção, conforme mostra a Figura IV.10. O valor obtido ($6608 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) difere muito pouco (0,63%) daquele apresentado na literatura (6650 e $6600 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) [21, 29].

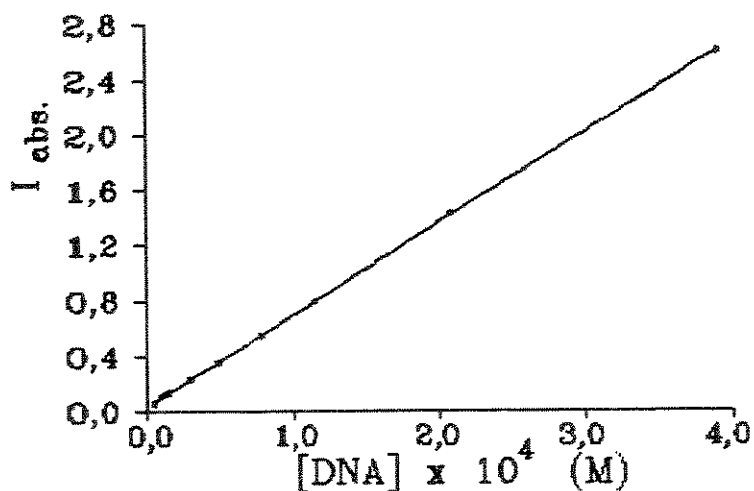


Figura IV.10 I_{máx.} de absorção ($\lambda=260\text{nm}$) de solução de DNA vs [DNA]

Este estudo foi necessário para verificar se o valor de ϵ para as soluções com DNA, preparadas em meios cuja força iônica $I \neq 0$ (tampão fosfato, tampão citrato, etc.) era diferente daquele obtido em água tri-destilada, pois é conhecido que a força iônica afeta o espectro de absorção do DNA.

Para as soluções estoque de DNA a razão $I_{\text{abs.}}(260\text{nm})/I_{\text{abs.}}(280\text{nm})$ foi utilizada para verificar a pureza e integridade do DNA. Os valores obtidos (1,85-1,93) foram comparados àqueles mencionados na literatura [30] (1,8-2,0) e aceitos em estudos sobre interações entre substâncias químicas e o DNA. Fredericq e col. [31] já haviam utilizado esse parâmetro para determinar a porcentagem de bases no DNA, através de um gráfico de porcentagem molar de adenina ou timina em função de $I_{\text{abs.}}(260\text{nm})/I_{\text{abs.}}(280\text{nm})$ para a solução com pH 3,0 concordando com os dados conseguidos por análise química do DNA.

IV.8) Influência da força iônica nos espectros de absorção de DNA

A diminuição dos valores de ϵ para as soluções contendo DNA quando aumenta $[\text{NaCl}]$ (Figura IV.11) é ocasionada pelo aumento das interações via pontes de hidrogênio entre os pares de bases. Este efeito se deve, em parte, à blindagem dos grupos fosfato pelo íons Na^+ , o que diminui a repulsão fosfato-fosfato e aproxima as fitas complementares. Este resultado é oposto ao obtido na desnaturação desse ácido nucleico quando ocorre aumento da intensidade de absorção do DNA.

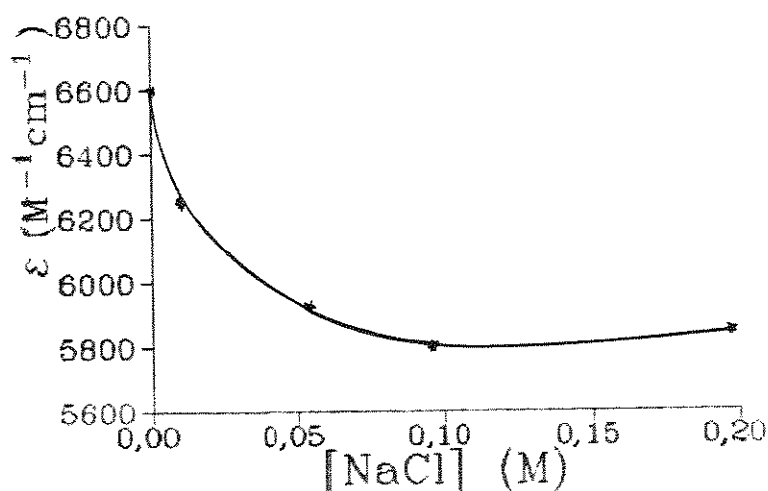


Figura IV.11 Coeficiente de extinção molar (ϵ em $\lambda=260\text{nm}$) de DNA vs $[\text{NaCl}]$

IV.9) Estudos espectroscópicos sobre interações de alaranjado de acridina com DNA

A cada par de bases existente no DNA corresponde um par de grupo fosfato e, portanto, um sítio passível de ser ocupado por uma espécie intercalante. Assim, calculando a razão R entre a concentração do grupo fosfato (obtida espectroscopicamente) e a da substância intercalante em solução, é possível conhecer quantos sítios disponíveis para intercalação existem em uma determinada amostra.

IV.9.1) Espectros de absorção

A principal modificação observada nestes espectros foi uma redução na largura da banda de absorção com máximo em 492nm e um deslocamento (≈ 10 nm) da mesma em direção ao vermelho (Figura IV.12). Este deslocamento está associado à intercalação da espécie AAH^+ , que sai de um meio hidrofílico (solução aquosa) para uma cavidade hidrofóbica (interior do DNA). Deste modo, como a absorção de luz é devida a uma transição $\pi-\pi^*$, o estado excitado é mais estabilizado que o fundamental e, portanto, ocorre o deslocamento mencionado.

A redução na largura da banda se deve à proteção da espécie intercalada pelo microambiente hidrofóbico existente na cavidade do DNA.

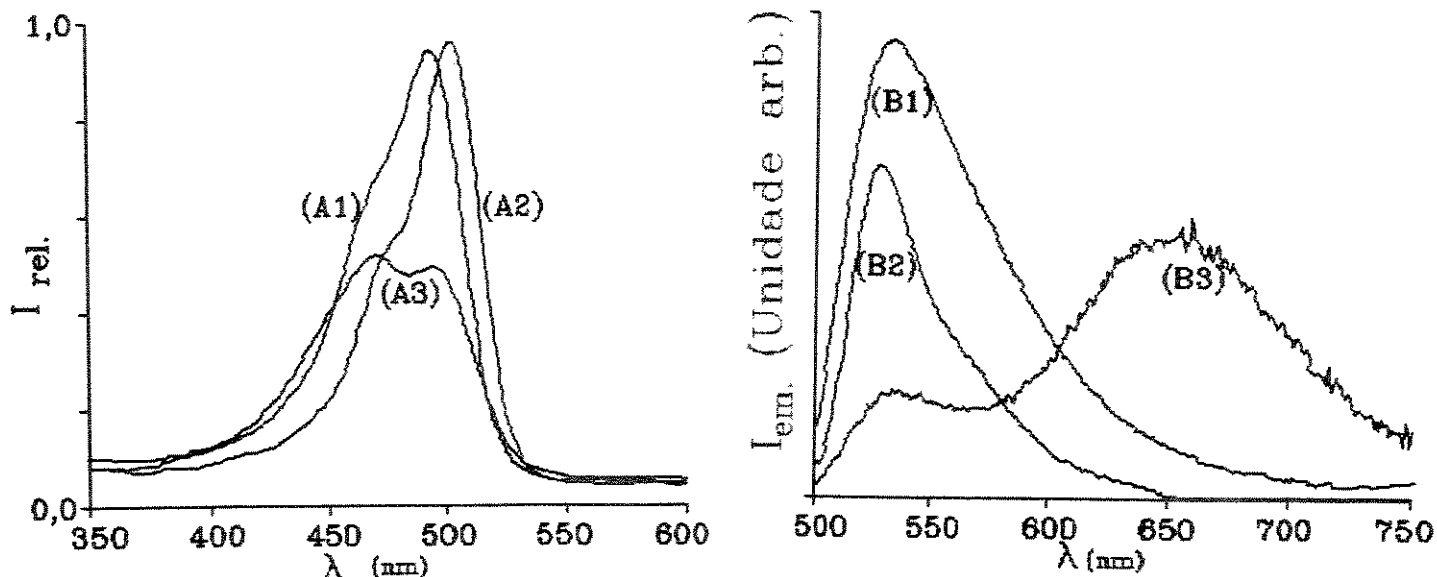


Figura IV.12 Espectros de absorção (A) e de emissão (B) de AAH^+ não intercalado (A1, B1, $\lambda_{exc.} = 500$ nm), intercalado (A2, B2, $\lambda_{exc.} = 500$ nm) e do agregado (A3, B3, $\lambda_{exc.} = 473$ nm) em DNA (fatores de multiplicação para os espectros de emissão: B1=5, B2=1 e B3=10)

As intensidades relativas de absorção dos espectros mostrados nessa foram obtidas admitindo que o máximo da intensidade de absorção do espectro A2 é 1.

A intercalação ocorre de modo que a molécula de corante fica paralela ao plano definido pelas bases pareadas e o grupo NH^+ (existente no anel aromático central da molécula de corante) está direcionado ao grupo fosfato.

Sobell [5], em estudos envolvendo complexos de AAH^+ e proflavina intercalados em guanosina (3'-5') iodocitidil notou, via difração de R-X, algumas diferenças na estrutura formada por estes dois agentes intercalantes:

1) a proflavina intercala com o eixo molecular maior paralelo ao par de bases pareado, formando pontes de hidrogênio entre seu grupo amino e os átomos de oxigênio dos grupos fosfato. Entretanto, isso não é possível para a espécie AAH^+ visto que ela possui os átomos de hidrogênio dos grupos amino substituídos por radicais metila.

2) os pares de bases acima e abaixo da molécula de proflavina fazem um ângulo igual a 36° , enquanto que com AAH^+ este valor é reduzido para 10° .

3) os átomos de oxigênio em fitas diferentes do DNA tem uma separação de $15,3 \text{ \AA}$ quando o corante é proflavina e $17,3 \text{ \AA}$ no caso de AAH^+ , de modo que a formação de pontes de hidrogênio é favorecida no primeiro caso (Figura IV.13).

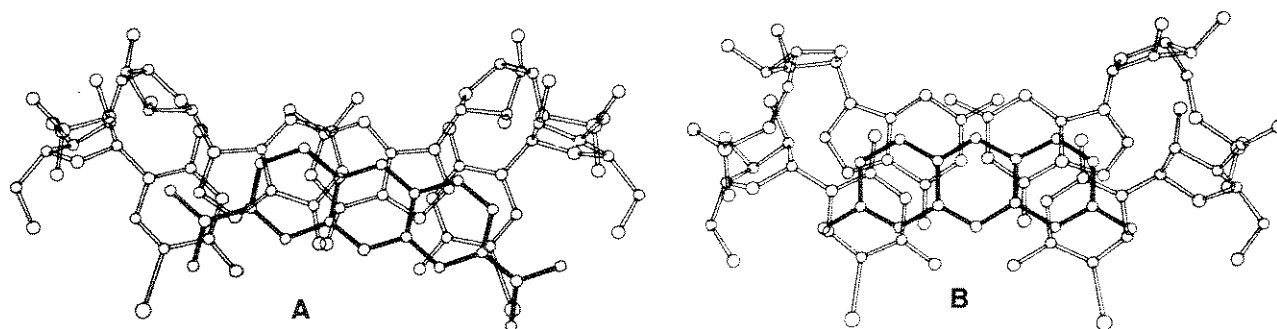


Figura IV.13 Vista superior da geometria de intercalação de AAH^+ (A) e de proflavina (B) em guanosina (3'-5') iodocitidil

É possível, espectroscopicamente, verificar a existência de agregados de AAH^+ em diferentes meios, quer exista intercalação ou não. Para valores de $R \approx 4$ verifica-se o aparecimento de uma banda de absorção em 472 nm , o que sugere a formação de agregados de AAH^+ (Figura IV.12). Nota-se que esta estrutura não se mantém quando R varia, sendo que para

$1 \leq R \leq 2$ a banda é mais larga, menos intensa e deslocada para o vermelho quando comparada àquela quando $R \approx 4$ (Figura IV.12). Segundo Robinson e col. [23] este fato é atribuído à diferença espectral que existe entre o dímero e outros agregados de AAH^+ .

IV.9.2) Espectros de emissão

A Figura IV.14 mostra a intensidade relativa de emissão em 530nm de AAH^+ vs R, calculada dividindo todas as intensidades de emissão nesse comprimento de onda pela intensidade de emissão, nesse mesmo λ , da solução de AA sem o DNA. A concentração do corante foi mantida fixa ($6,0 \times 10^{-6} M$) em todas soluções.

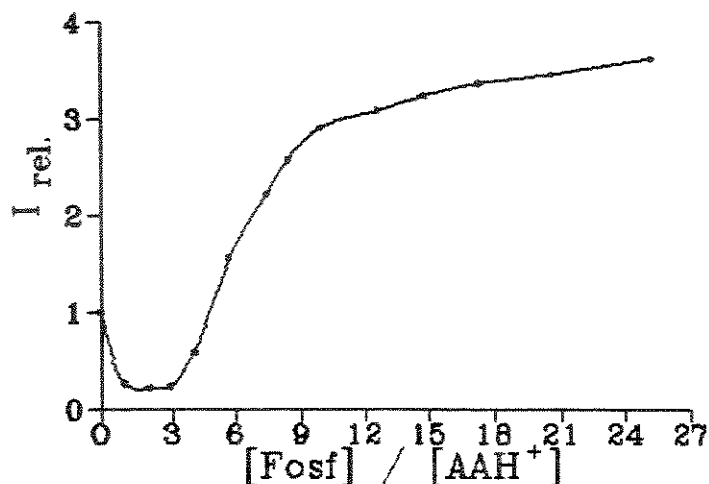


Figura IV.14 $I_{rel.}$ de emissão ($\lambda_{exc.} = 500nm$) de AAH^+ vs R

Observamos uma intensidade mínima de emissão para $1,0 \leq R \leq 3,0$, valores estes característicos da formação de agregados, conforme já verificado no espectro de absorção. Além disso apareceu uma nova banda de emissão em $\approx 640nm$ (Figura IV.11), o qual não existe em solução aquosa, e que pode ser atribuída a um excímero [32]. Quando $R > 3,0$ verificamos um aumento de $I_{rel.}$ de até $\approx 4,0$ quando comparado com a da substância em solução aquosa.

Como o sítio disponível para intercalação (isto é, o espaço entre dois pares de bases adjacentes) possui altura média de $3,4\text{\AA}$ e a molécula intercalante tem espessura igual a $3,5\text{\AA}$, não é possível a intercalação do dímero ou do agregado. Deste modo, admitimos que esta espécie se encontra na parte externa do DNA interagindo com os grupos fosfato. Isto ocorre para quinacrina e mostarda de quinacrina [33], que também exibem dois modos de interação com o DNA.

A intensidade de emissão é mínima para $R=1,0$, correspondendo a uma espécie AAH^+ para cada grupo fosfato. Isto indica que esta pode formar

agregados na superfície externa do DNA com estequiometria de 1 AAH⁺ para 1 grupo fosfato. De acordo com o espectro de absorção, tais agregados são predominantemente oligômeros. O valor R=3,0 implica que para cada três grupos fosfato existe 1 molécula de intercalante e o agregado predominante é o dímero (conforme visto no espectro de absorção). Assim, o DNA permite a existência de agregados cujas estequiometrias são 1/1, 2/1 e 3/1 (fosfato/AAH⁺) e a inexistência do agregado relativo à estequiometria 4/1 talvez seja devida à intercalação de AAH⁺ quando esta estequiometria é alcançada pois, neste caso, cada AAH⁺ inviabiliza, em média, dois sítios de intercalação, deixando um sítio não obstruído (isto é, livre) acima e outro abaixo da estrutura dimérica formada. Portanto, se uma terceira molécula de AAH⁺ (monômero) "ligar-se" a um grupo fosfato logo acima deste sítio livre, formará uma estrutura contendo 3 pares de grupos fosfato para esta molécula do corante, relação esta necessária para que haja intercalação.

A banda de emissão observada em $\approx 640\text{nm}$ é atribuída, segundo Motoda e Kubota [32] à emissão fluorescente do excímero, pois a intensidade da mesma é função da temperatura. Deste modo, esses autores concluíram que o dímero ou oligômero no estado triplete é excitado vibracionalmente até o estado do excímero, o qual fluoresce.

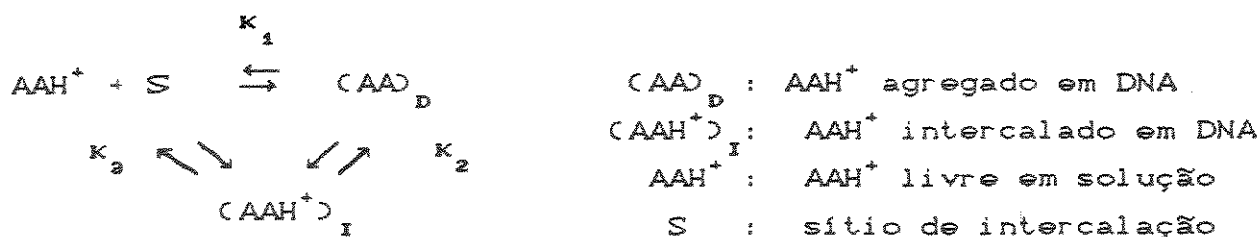
O aumento da intensidade de emissão quando $R > 3$ é devido às moléculas do corante intercaladas, isoladas do meio aquoso e protegidas contra colisões desativadoras.

Para cada sítio ocupado ocorre distorção nos seus vizinhos incapacitando-os à intercalação de modo que existem mais de dois pares de grupos fosfatos distorcidos.

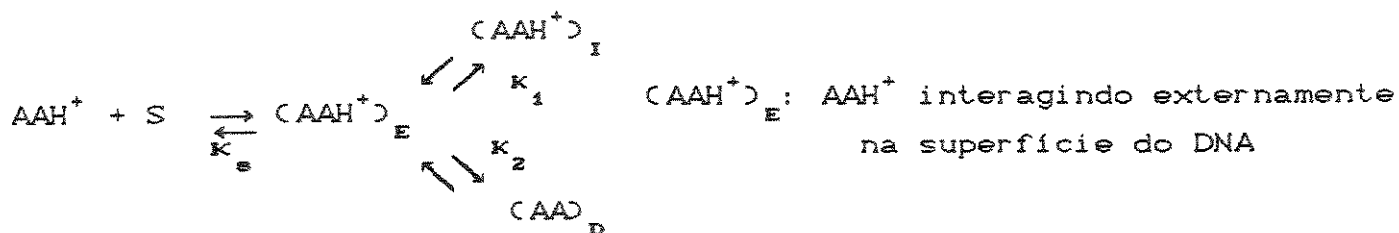
Observando os resultados mostrados na Figura IV.14 vemos um aumento da intensidade de emissão que é constante até $R=9$ sendo que, para valores maiores, a variação nessa intensidade decresce. Isto está associado à estrutura molecular empregada na intercalação. No primeiro caso ($R < 9$), esta ocorre às custas de moléculas de AA agregadas na superfície externa do DNA, variando bruscamente a intensidade de emissão (lembrando que o agregado não emite) à medida que estas são destruídas e intercaladas. No segundo caso ($9 < R < 25$), a intercalação envolve os monômeros (AAH⁺) existentes em solução e na superfície do DNA. Como estes emitem, a variação na intensidade de emissão, à medida que ocorre a intercalação, não é tão acentuada quanto aquela que ocorre

às custas de moléculas do agregado.

A intercalação de moléculas aromáticas em DNA é um processo controlado termodinamicamente e, neste caso, podemos considerar os seguintes mecanismos [29]:



ou [34]:



A seguir, iremos discutir e verificar qual dos dois processos é mais compatível com os dados mostrados na Figura IV.14.

IV.9.3) Obtenção das constantes de equilíbrio

Para a obtenção das constantes de equilíbrio foram utilizadas as seguintes equações:

a) AAH^+ em solução aquosa: $\lambda_{exc.} = 500nm$ $\lambda_{em.} = 530nm$ $\lambda_{abs.} = 492nm$

$$60000 [AAH^+] + 15000 [(AAH^+)_2] = 0,3313$$

$$1 \times 10^4 = [(AAH^+)_2] / [AAH^+]^2$$

Daí:

$$[AAH^+] = 5,448 \times 10^{-6}M \quad e \quad [(AAH^+)_2] = 2,964 \times 10^{-7}M$$

b) AAH^+ em solução aquosa com DNA:

$$[AAH^+] + [(AAH^+)_I] + 2 \times [(AAH^+)_2] = C_T$$

$$60000 [AAH^+] + 15000 [(AAH^+)_2] + 42000 [(AAH^+)_I] = I_{abs.}$$

$$C_T = [AAH^+] + 2 \times [(AAH^+)_2] \quad (\text{em solução aquosa sem DNA})$$

Como o dímero não emite temos:

$$F_I [(AAH^+)_I] + F_M [AAH^+] = I_{em.}$$

onde :

C_T é a concentração total de AA

$[(AAH^+)_I]$ é a concentração de AAH^+ intercalado

F_I e F_M são as intensidades de fluorescência de AAH^+ intercalado e do monômero livre dividido pela concentração total de cada espécie, respectivamente.

A intensidade de emissão da espécie intercalada foi obtida através da extrapolação do gráfico de $I_{máx.}$ de emissão vs $1/R$ (Figura IV.15).

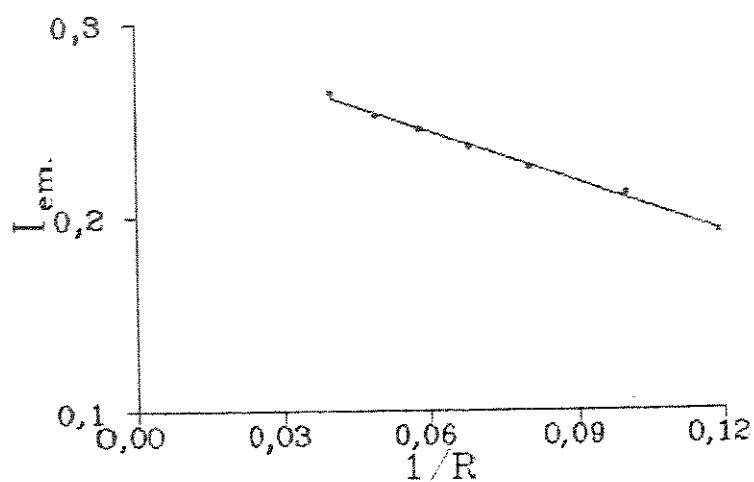


Figura IV.15 $I_{máx.}$ de emissão de AAH^+ vs $1/R$ ($\lambda_{exc.} = 500nm$, $\lambda_{em.} = 530nm$)

A intensidade de emissão máxima obtida por extrapolação foi igual a 0,2965, correspondendo a um aumento de 4,12 vezes quando comparado com a intensidade de emissão do AAH^+ livre. Este valor é satisfatório, pois para uma solução três vezes mais diluída (com $R > 40$) a mesma relação foi igual a 3,95. A diferença entre esses valores é 4% e pode ser atribuída às concentrações de dímeros que existem em ambas soluções aquosas sem DNA.

Dividindo o valor da intensidade máxima de emissão obtida no parágrafo anterior (0,2965) pela concentração total de AAH^+ e a intensidade de emissão de AAH^+ em solução aquosa pela concentração da

espécie monomérica, obtemos $F_I = 49100M^{-1}$ e $F_M = 13200M^{-1}$, que correspondem às intensidades de emissão das espécies intercalada e livre por mol de substância, respectivamente.

Nestas equações foi admitido que o monômero livre em solução possui o mesmo espectro de absorção e de emissão daquele "ligado" externamente ao DNA (sem formar dímeros); com isso e usando as equações anteriores, e os valores mostrados Tabela IV.5, foram obtidos $[AAH^+]$, $[(AAH^+)_2]$ e $[(AAH^+)_1]$ para valores de $R > 6$, mostrados na Tabela IV.6. Para valores de $R < 6$ a concentração de oligômero se torna apreciável e os valores de concentrações obtidos possuem grande erro devido à inexistência de equações que levem em consideração a presença desta espécie.

No	[Fosf] $10^5 M$	[S] $10^5 M$	R	$I_{Abs.}$	$I_{Em.}$
0	0,000	0,00	0,00	0,3278	0,0726
1	0,596	0,298	0,992	0,1401	0,0196
2	1,208	0,604	2,000	0,1602	0,0158
3	1,755	0,878	2,905	0,1978	0,0176
4	2,427	1,214	4,018	0,2256	0,0429
5	3,452	1,726	5,715	0,2568	0,1119
6	4,461	2,231	7,385	0,2655	0,1589
7	5,064	2,532	8,383	0,2682	0,1893
8	6,064	3,008	10,039	0,2682	0,2113
9	7,588	3,794	12,562	0,2661	0,2256
10	8,927	4,464	14,779	0,2640	0,2357
11	10,440	5,220	17,283	0,2632	0,2440
12	12,382	6,191	20,498	0,2662	0,2506
13	15,142	7,571	25,068	0,2675	0,2619

Tabela IV.5 [Fosf], [S], R, $I_{Abs.}$ e $I_{Em.}$

N _o	[AAH ⁺] 10 ⁶ M	[(AAH ⁺) _I] 10 ⁶ M	[(AAH ⁺) ₂] 10 ⁶ M	[S _L] 10 ⁵ M	[P _L] 10 ⁵ M
5	3,074	1,453	0,757	1,290	3,301
6	2,511	2,561	0,484	1,462	4,364
7	2,079	3,296	0,332	1,543	4,998
8	1,722	3,841	0,239	1,856	5,968
9	1,441	4,207	0,196	2,532	7,549
10	1,228	4,470	0,171	3,122	8,893
11	1,073	4,681	0,143	3,816	10,411
12	0,928	4,854	0,129	4,735	12,356
13	0,743	5,134	0,082	6,031	15,126

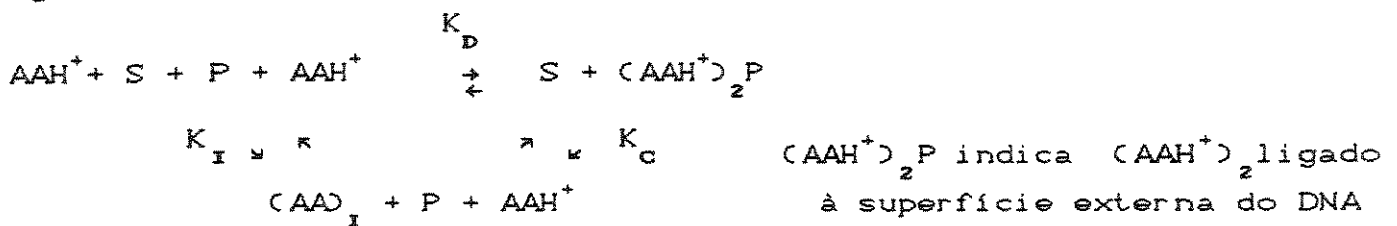
Tabela IV.6 [AAH⁺], [(AAH⁺)_I], [(AAH⁺)₂], [S_L] e [P_L]

Usando as equações seguintes e os valores de [AAH⁺], [(AAH⁺)_I] e [(AAH⁺)₂] podemos obter as concentrações de sítios ([S_L]) e de fosfato ([P_L]) disponíveis para intercalação e dimerização, respectivamente. Os resultados estão na Tabela IV.6.

$$[S_L] = ([P]_T / 2) - 3 [(AAH^+)_I] - [(AAH^+)_2]$$

$$[P_L] = [P]_T - 2 [(AAH^+)_2]$$

O equilíbrio mais provável de estar correto é o primeiro [29]. Neste a intercalação envolve um ciclo associado a três equilíbrios três constantes: K_I (constante de intercalação), K_D (constante de dimerização) e K_C (constante de inter-conversão intercalado/dimerizado):



Assim, é possível obter essas constantes através de gráficos de [(AAH⁺)_I] / [AAH⁺] vs [S_L] (A), [(AAH⁺)₂] / [AAH⁺]² vs [P_L] (B) e [(AAH⁺)_I] [AAH⁺] / [(AAH⁺)₂] vs [S_L] / [P_L] (C), mostrados na Figura IV.16. Os valores obtidos são: K_I = 1,102 × 10⁵ M⁻¹, K_D = 1,072 × 10⁹ M⁻² e K_C = 1,070 × 10⁻⁴ M¹.

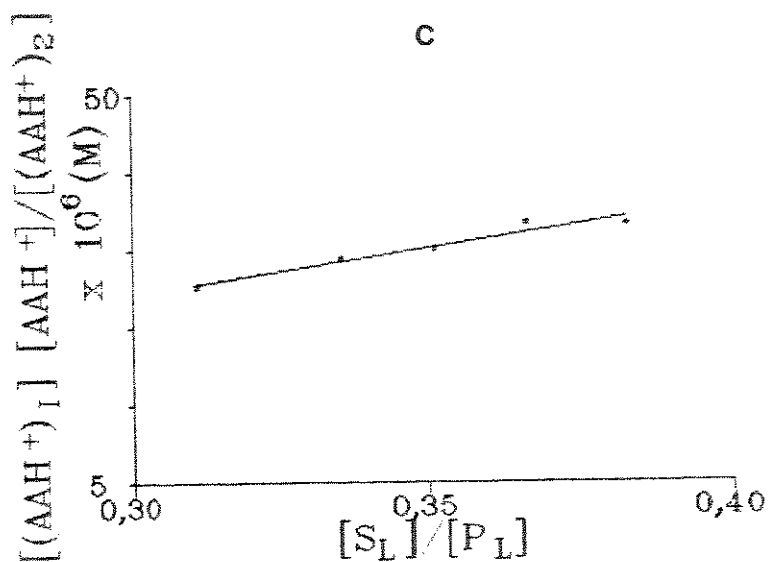
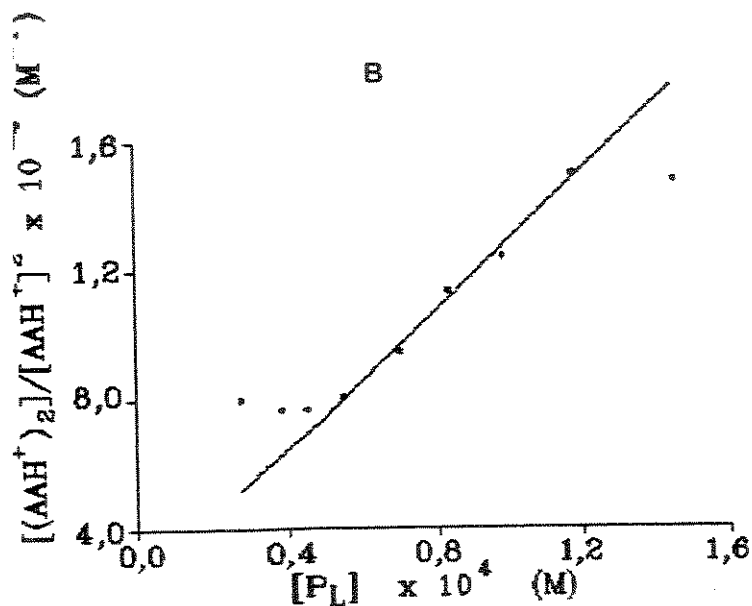
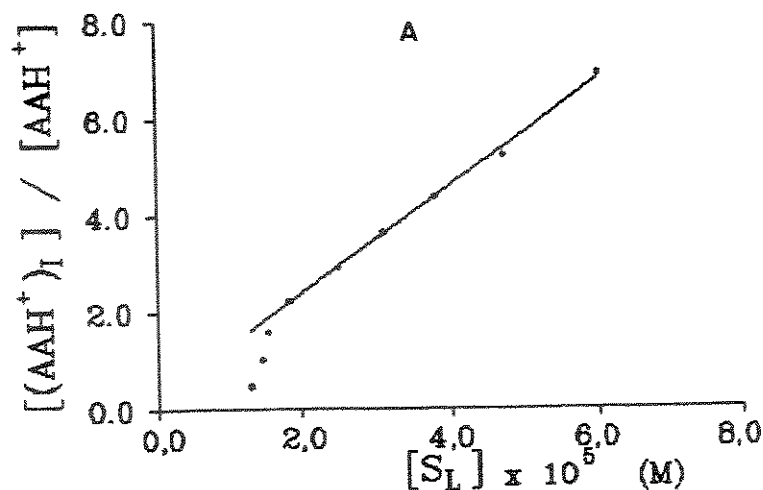


Figura IV.16 (A) $[(AAH^+)_I] / [AAH^+]$ vs $[S_L]$, (B) $[(AAH^+)_2] / [AAH^+]^2$ vs $[P_L]$ e (C) $[(AAH^+)_I] [AAH^+] / [(AAH^+)_2]$ vs $[S_L] / [P_L]$

Para que o equilíbrio seja mantido é necessário que $K_I/K_D = K_C = 1,028 \cdot 10^{-4} M^1$, concordando com o valor de K_C calculado ($1,07 \cdot 10^{-4} MD$).

Esta discussão foi feita considerando que:

- a) $(AAH^+)_2$ interage na proporção de um AAH^+ por grupo fosfato.
- b) ao se formar o dímero, o sítio de intercalação é obstruído impedindo a intercalação da espécie AAH^+ .
- d) uma vez intercalado AAH^+ distorce os sítios vizinhos, inviabilizando-os.

Assim, existem duas possibilidades para interação de AAH^+ com DNA: a primeira quando três sítios estão livres e a segunda quando um monômero AAH^+ interage eletrostaticamente com um grupo fosfato, permanecendo na parte externa do DNA e possibilitando a formação de um dímero.

Verificamos que o mecanismo cíclico proposto anteriormente só é válido para $6 < R < 20$, conforme pode ser visto na Figura IV.16. Não foi possível obter as concentrações das espécies presentes no meio para $R < 6$ por causa da formação de complexos oligoméricos que não são considerados no sistema de equações utilizado para a obtenção dos valores de concentração das diversas espécies presentes no meio.

Observamos que, aos quatro primeiros pontos do gráfico corresponde uma razão $[(AAH^+)_2] / [AAH^+]^2 = 7,86 \cdot 10^4 M^{-1}$ (Figura IV.16 (B)). Este valor constante pode ser atribuído ao fato de que para $R < 6$ a agregação é dominante e a intercalação é reduzida. Assim, o conjunto de 3 equilíbrios mostrado anteriormente pode ser aproximado por um único equilíbrio cuja constante é K_D . Situação semelhante ocorre para $R > 25$ quando o único equilíbrio existente se refere à intercalação.

Foi utilizado outro método para calcular o valor de K_I , obtido através do gráfico de Scatchard [36] (r/C_f vs r onde r é o valor médio do número de moles de moléculas intercaladas/número de moles de sítios de intercalação e C_f é a concentração de moléculas não intercaladas), mostrado na Figura IV.17. Obtemos $K_I = 3,53 \cdot 10^5 M^{-1}$ e $n = 0,325$ que nos fornece um valor médio de 3 sítios obstruídos por molécula de AA intercalada.

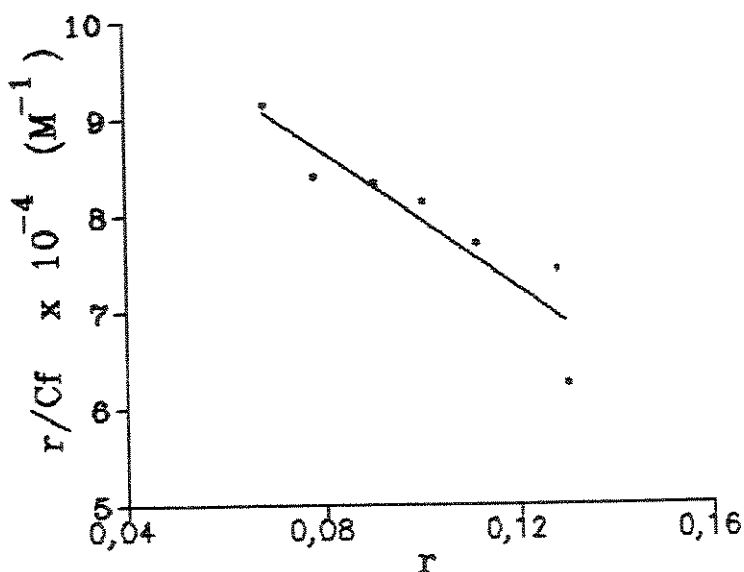


Figura IV.17 r/C_f vs r

A Tabela IV.7 sumariza os valores de K_I encontrados na literatura.

K_I $10^{-5} M^{-1}$	Meio	Método	Referência
30	0,002 M (NaCl)	Diálise/Abs.	32
12	0,020 M (NaCl)	Diálise/Abs.	32
1,3	0,200 M (NaCl)	Diálise/Abs.	32
1,4	0,200 M (NaCl)	Diálise/Abs.	26
1,8	0,200 M (NaCl)	Diálise/Abs.) Isot. Lig.	26

Tabela IV.7 Valores para K_I obtido através da técnica de diálise e absorção (Diálise/Abs.) e por isoterma de ligação (Isot. Lig.).

Como pode ser visto, para as soluções com menor [NaCl], não há concordância entre os valores de K_I obtidos por outros métodos com o calculado neste trabalho. Em realidade essa comparação é prejudicada pelo fato de não existirem valores publicados para sistemas em que a força iônica do meio se deve unicamente à [DNA] e [AAH⁺] e para pequenos valores de R ($R < 25$).

IV.10) Estudos espectroscópicos sobre interações entre daunomicina e DNA

IV.10.1) Espectros de absorção

Observamos um deslocamento do máximo de absorção para a região do vermelho, semelhante ao verificado para AA e uma acentuada diminuição na intensidade de absorção (Figura IV.18), diferente do observado com o AA.

Estes fatos parecem indicar que a interação do grupo cromóforo de daunomicina com o DNA é mais acentuada que no caso do AAH⁺. De acordo com Chaires e col. [37] ocorre, para daunomicina intercalada, uma diminuição do coeficiente de extinção molar de $11500 M^{-1} cm^{-1}$ para $7000 M^{-1} cm^{-1}$.

Outras possíveis razões para os fenômenos observados é a desprotonação do cloridrato de daunomicina, formação de pontes de hidrogênio (através dos grupos fenóis) ou de complexo de transferência de carga. É preciso lembrar que a cavidade existente no interior da

dupla hélice do DNA constitui um ambiente hidrofóbico, tornando-o mais propício a ser ocupado por espécies que não se encontram protonadas.

As intensidades relativas dos espectros mostrados Figura IV.18 foram obtidas admitindo que as intensidades máximas de absorção e emissão dos respectivos espectros da substância daunomicina sem DNA eram unitárias.

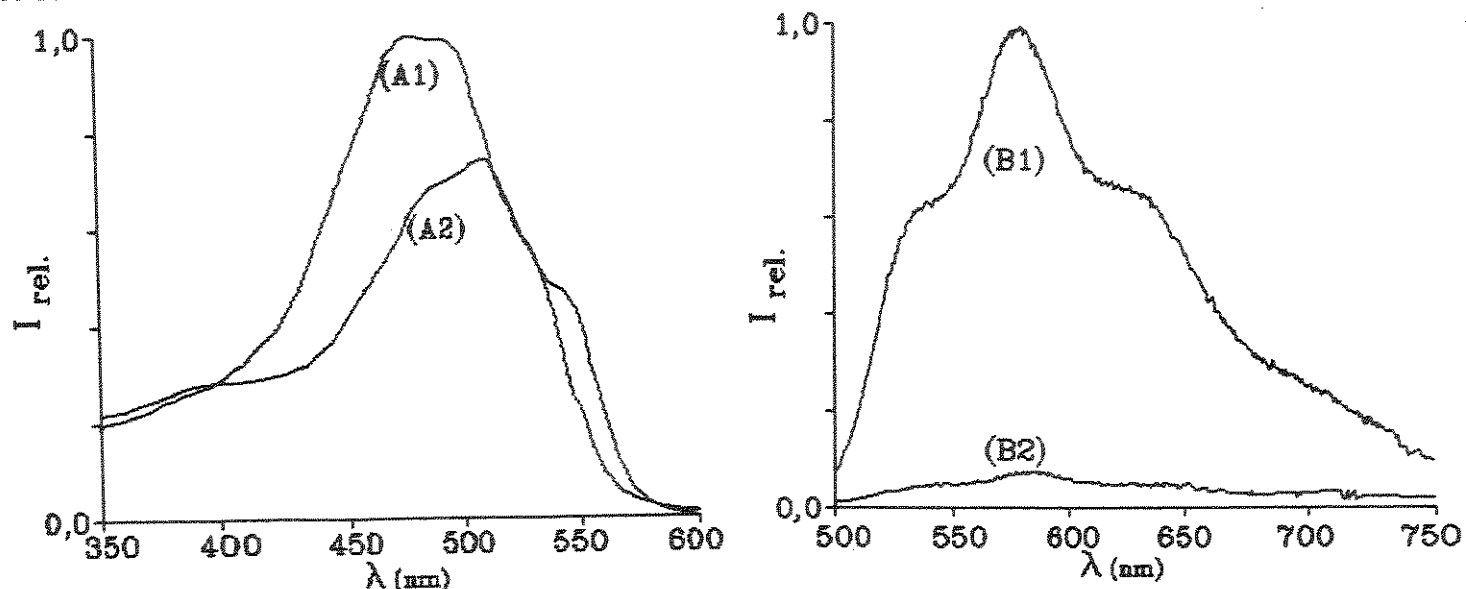


Figura IV.18 Espectros de absorção (A) e de emissão ($\lambda_{exc.} = 498\text{nm}$) (B) de daunomicina não intercalada (A1, B1) e intercalada (A2, B2) ($[daunomicina] = 3,0 \times 10^{-5} M$)

IV.10.2) Espectros de emissão

Como pode ser visto na Figura IV.19, a intercalação de daunomicina reduz a intensidade de fluorescência que atinge um valor mínimo quando $R \approx 6,5$. Neste caso, a intercalação ocorre com estequiometria de uma molécula do composto para 3,5 pares de base. Segundo Saenger [38], a parte aromática da molécula intercala entre pares de bases CG e a parte não aromática pode interagir com pares AT a uma distância de dois pares de bases do local de intercalação, impedindo que uma segunda molécula intercale no sítio vizinho da posição ocupada pela primeira.

A Figura IV.19 mostra que a supressão da fluorescência ocorre continuamente, mas podemos admitir que há dois processos responsáveis por isso: a) intercalação de daunomicina em sítios com diferentes pares de bases (CG-CG, AT-AT e CG-AT), sendo que estes levam à supressão de fluorescência em intensidades diferentes (CG-CG=95%, AT-AT=60%) e b) agregação. Esta é evidenciada nos cálculos de concentração de substância que teve sua emissão suprimida ($[D_s]$), que, dividida pela

concentração total de sítios disponíveis à intercalação ($[S]$), fornece os valores de 1/1, 1/1 e 2/1 para o 1.º, 2.º e 3.º pontos da curva mostrada na Figura IV.19, respectivamente. Estes valores são diferentes de 3/1 ou 4/1 característicos da intercalação. Assim, é de se esperar que outra interação não intercalativa esteja ocorrendo entre o DNA e a daunomicina. É necessário dizer que os cálculos foram feitos admitindo-se que a supressão da fluorescência da daunomicina é $\approx 100\%$ quando a mesma intercala entre pares CG-CG, conforme visto na introdução, em virtude da seletividade exibida por esta substância na intercalação e ao fato de que se esta ocorresse entre pares de bases AT-AT a referida supressão seria de apenas 60%.

Em qualquer caso verificamos que o equilíbrio de intercalação é deslocado em direção à formação do complexo DNA/Dau, pois a intensidade de emissão (Figura IV.19) praticamente se estabiliza em $R \approx 7$. Este comportamento é oposto ao observado para AAH^+ .

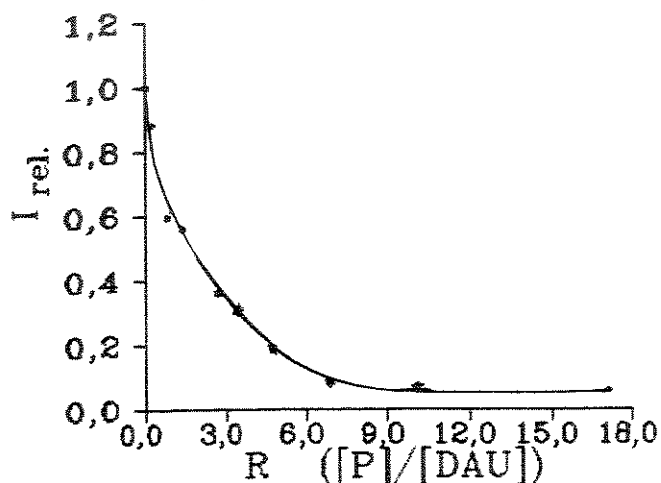


Figura IV.19 $I_{rel.}$ de emissão ($\lambda_{exc.} = 498nm$) de daunomicina vs R

Na Figura IV.19 as intensidades relativas foram obtidas dividindo-se a intensidade de emissão em $\lambda = 595nm$ pela intensidade de emissão, nesse mesmo λ , de uma solução sem DNA e com a mesma concentração de daunomicina.

A diminuição de $I_{rel.}$ com R poderia ser atribuída a um (ou mais) dos processos seguintes:

a) transferência de energia entre os estados S_1 de DNA e da daunomicina.

b) cruzamento inter-sistemas do estado singlete para o estado triplete da daunomicina, quando esta forma complexo ou ponte de hidrogênio com o DNA.

c) diferentes espécies em solução.

A primeira pode ser descartada pelo fato de que há uma grande diferença entre as energias dos estados S1 de DNA e de daunomicina, o que torna improvável a referida transferência de energia. Para a verificação da segunda seria preciso resfriar a amostra a 77K e registrar o espectro de fosforescência, o que será investigado no futuro. Finalmente, para verificar se a hipótese c está correta foram registrados os espectros de absorção e emissão de daunomicina, em soluções aquosas neutra (pH 7) e básica (pH 11).

A Figura IV.20 mostra que a espécie desprotonada de daunomicina não apresenta emissão intensa, o que pode estar associado à desprotonação dos grupos fenólicos ($pK_a = 9,89$) que fazem parte do sistema cromóforo dessa molécula.

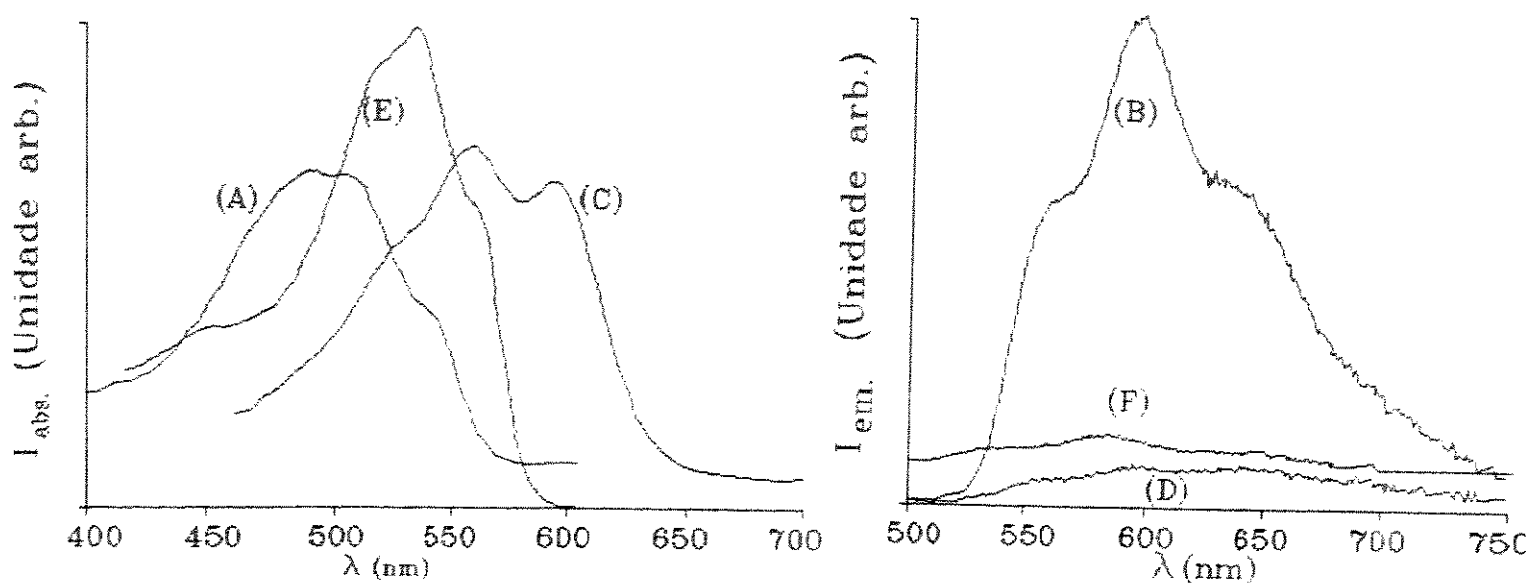


Figura IV.20 Espectros de daunomicina não intercalada em pH=7 (A=Abs., B=Em.) $\lambda_{exc.} = 490nm$; não intercalada em pH=11 (C=Abs., D=Em.) $\lambda_{exc.} = 490nm$; intercalada em pH=7 (E=Abs., F=Em.) $\lambda_{exc.} = 498nm$ (fatores de multiplicação =1)

Estudos realizados por Patel utilizando RMN [39] indicam que os prótons do anel "D" da molécula de daunomicina sofrem um pequeno deslocamento quando comparados com a mesma livre em solução aquosa, o qual não é suficiente para indicar a sobreposição deste anel com os pares de bases do DNA. Assim, os autores concluem que os anéis que sofrem sobreposição com as bases do DNA são os anéis "C" ou "B" (os quais contém os grupos cetônicos e fenólicos, respectivamente).

Como pode ser verificado nos resultados sobre a influência da força iônica o intercalante não sofre desprotonação, pois ao ser expulso da cavidade em virtude do aumento da força iônica, apresenta espectros de absorção e de emissão originais. Assim, não é possível que apenas a variação da força iônica seja responsável pela protonação do cromóforo.

Em vista do exposto, a explicação mais plausível para estas modificações é a interação entre os grupos fenólicos, via ponte de hidrogênio, com os grupos fosfato ou com as bases nitrogenadas de ambas as fitas. Esta interação seria favorecida pela intercalação que coloca o eixo maior do cromóforo ortogonal ao plano das bases pareadas, orientando ambos os grupos OH em posição adequado àquela interação. Esta poderia explicar a supressão da síntese de DNA bem como a do RNA associado, pois as pontes de hidrogênio existentes entre a molécula de daunomicina e o DNA dificultam a separação de ambas as fitas da dupla hélice, causando erros ou impedindo a sua transcrição quando separadas. É provável que os grupamentos OH fenólicos interajam com as bases do DNA, já que é observado variação na intensidade de fluorescência à medida que ocorre a intercalação em sítios com diferentes combinações de bases purinas e pirimidinas.

Segundo Saenger [40], o valor de pK_a para os vários nucleosídeos mono-fosfatados situa-se entre 6,62 e 6,67. Portanto, o grupo fosfato é uma base mais fraca que o grupo fenol, que não é desprotonado mas pode interagir via pontes de hidrogênio. Esta interação deve ser favorecida pelas forças hidrofóbicas que facilitam a aproximação dos grupos fenólicos da daunomicina aos grupos fosfato ou bases do DNA ocasionando as alterações espectrais.

O gráfico mostrado na Figura IV.19 permitiria obter a constante de equilíbrio da daunomicina analogamente ao que foi feito com AAH^+ . Entretanto, isto não foi possível devido à grande divergência entre as constantes de dimerização fornecidas pela literatura ($33,3 \times 10^3 M^{-1}$ [20], $12,98 \times 10^3 M^{-1}$ [28] e $570 M^{-1}$ [27]) e aos valores de ϵ (11500, 12960 e $10000 M^{-1} cm^{-1}$). Contudo, se a constante K_D , os valores de intensidade de emissão da daunomicina intercalada em diferentes sítios (CG-CG e AT-AT) e os respectivos valores de ϵ forem conhecidos, podemos obter as concentrações de substância intercalada nos diferentes sítios, de forma semelhante ao realizado para AAH^+ , desde que não consideremos os agregados que se formam quando a concentração de daunomicina é elevada.

Admitindo que o último ponto da curva mostrada na Figura IV.19 é devido à daunomicina totalmente intercalada calculamos $K_I = 1,29 \times 10^6 M^{-1}$. Este valor concorda com aqueles mencionados na literatura (entre $1,3 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^7 M^{-1}$, quando a concentração do sal está entre 0,05 e 0,01 M [37]).

Para a obtenção de um valor mais apurado seria necessário conseguir os valores corretos de K_D em solução aquosa, de ϵ para os complexos formados nos sítios AT-AT e CG-CG e conhecer a estrutura e a estequiometria dos mesmos.

IV.11) Influência da força iônica no complexo DNA/AAH⁺

IV.11.1) Espectros de absorção

Neste experimento foi utilizado $R=1,78$ o que permitiu o aparecimento do dímero ligado ao DNA. Quando foi adicionado NaCl verificou-se a destruição do agregado através do desaparecimento da banda com máximo em 472nm. Além disso, a banda de absorção do monômero se desloca para comprimentos de onda maiores, até $\lambda=495nm$. Isto mostra que intercalação ocorre à medida em que o agregado vai sendo destruído, até que $[NaCl]=0,1M$.

Utilizando o mesmo cálculo anterior e os dados da Figura IV.21, obtivemos as concentrações das espécies presentes no meio para algumas concentrações de NaCl (Tabela IV.8).

[NaCl] M	[AAH ⁺] 10^6 M	[(AAH ⁺) ₂] 10^6 M	[(AAH ⁺) _I] 10^6 M	K_I $10^{-4} M^{-1}$
0,027	3,55	0,74	0,49	1,87
0,051	4,11	0,42	0,57	1,95
0,083	4,49	0,28	0,48	1,43
0,104	4,74	0,17	0,44	1,24
0,280	4,86	0,26	0,16	0,38
0,507	4,96	0,28	0,01	0,02

Tabela IV.8 [AAH⁺], [(AAH⁺)₂], [(AAH⁺)_I] e K_I em diferentes [NaCl]

Assim, à medida que aumenta a concentração de sal, o mesmo ocorre com a concentração do monômero AAH⁺ enquanto a do dímero é reduzida até um valor mínimo a partir do qual começa novamente a aumentar. Este comportamento está associado à destruição do complexo dimérico

existente na superfície do DNA e a um aumento de monômeros em solução, para em $[NaCl] > 0,1M$ aparecem, em solução, dímeros de AAH^+ .

A constante de equilíbrio de intercalação varia com a força iônica (Figura IV.21). A diminuição da $[AAH^+]$ intercalados e da constante de equilíbrio de intercalação se deve à blindagem dos grupos fosfatos. Com isto ocorre destruição do complexo intercalador formado entre DNA e AAH^+ pois este é mantido, em parte, por atração eletrostática entre a carga positiva do grupo amino e a negativa dos grupos fosfato.

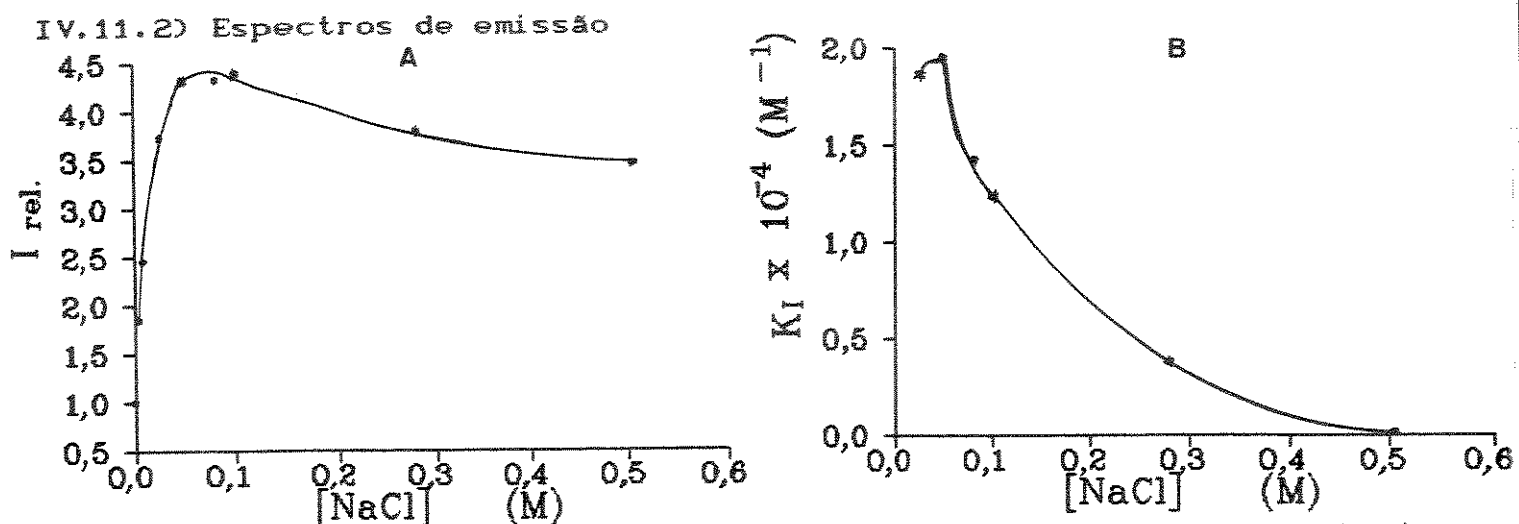


Figura IV.21 A) $I_{rel.}$ de emissão ($\lambda_{exc.} = 500nm$) vs $[NaCl]$ B) Constante de equilíbrio de intercalação vs $[NaCl]$

Na Figura IV.21 as intensidades relativas de emissão foram obtidas através da divisão da intensidade de emissão das soluções contendo NaCl pela intensidade de emissão da solução sem NaCl, todas elas em $\lambda = 530nm$.

Tendo em vista a redução na voltagem da fotomultiplicadora (de 1000V para 950V), necessária à obtenção de um bom sinal quando a concentração de dímeros é pequena, os valores de F_I e F_M foram recalculados da seguinte maneira:

a) F_M foi calculado fazendo-se a divisão da intensidade de fluorescência, obtida nas novas condições, pela concentração da espécie monomérica AAH^+ .

b) a seguir foi calculada a porcentagem de variação dividindo o valor de F_M anterior pelo novo valor de F_M .

c) o novo valor de F_I foi obtido multiplicando-se o valor anterior pela porcentagem conseguida em b).

Os valores de K_I (Tabela IV.8) diminuem com o aumento da força iônica. Não só os valores absolutos, mas também a variação nos valores de K_I são menores que aqueles mencionados na Tabela IV.7, embora a

tendência observada seja a mesma. Essa discrepância pode, em parte, ser devida aos diferentes métodos empregados, R diferente, temperatura.

IV.12) Influência da força iônica no complexo DNA/daunomicina

IV.12.1) Espectros de absorção

A absorvância de daunomicina varia monotonicamente com a força iônica (Figuras IV.22 e IV.23), mas $\lambda_{\text{máx.}}$ se mantém constante contrariamente ao que ocorre para o complexo DNA/AAH⁺ em soluções com força iônica semelhante.

Na Figura IV.22 as intensidades de ambos os espectros foram divididas pela intensidade de absorção (0,245) do espectro B em 504nm.

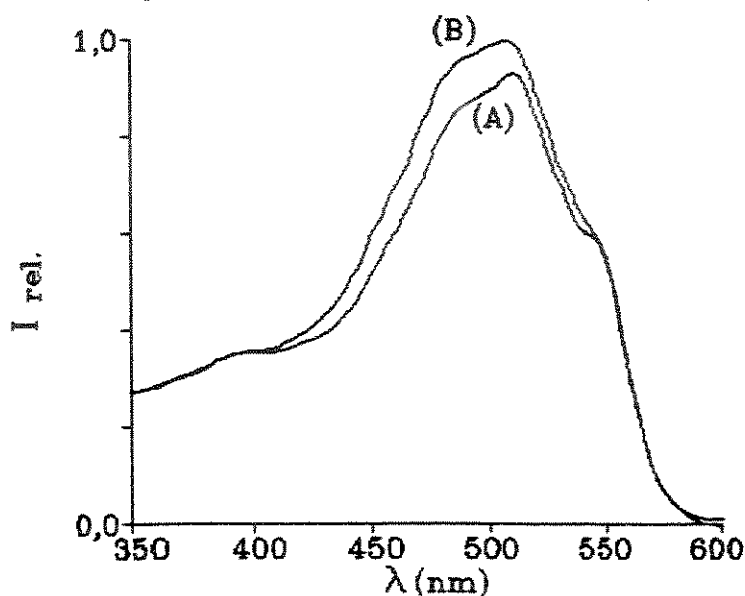


Figura IV.22 Espectros de absorção de daunomicina intercalada (A) sem NaCl e (B) com [NaCl] = 0,49M

Empregamos, neste caso, a mesma solução utilizada para a obtenção do espectro mencionado no item II.4.14 e que corresponde a $R=8,91$. Entretanto, o espectro de absorção da solução contendo [NaCl] $\cong 0,5M$ possui contorno de banda e deslocamento semelhantes aos de uma solução de DNA/daunomicina com $3,0 < R < 4,2$ indicando assim, que está ocorrendo a desintercalação. Este fenômeno não é tão intenso quanto aquele verificado para o complexo formado entre DNA e AAH⁺, o qual exibe completa desintercalação (88 %) quando a concentração de NaCl é tão pequena quanto 0,28M.

IV.12.2) Espectros de emissão

Verificamos um aumento na intensidade de emissão (Figura IV.23) quando foi feita a primeira adição do sal indicando que a substância está sendo desalojada da cavidade hidrofóbica do DNA.

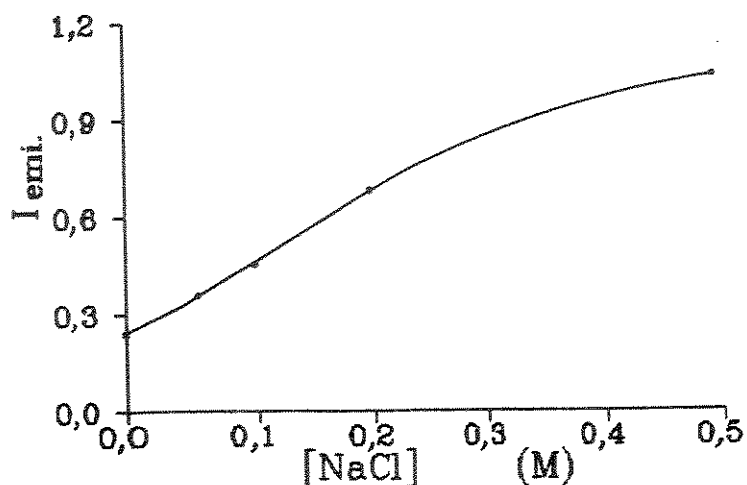


Figura IV.23 I_{máx.} de emissão ($\lambda_{exc.} = 498\text{nm}$ e $\lambda_{em.} = 595\text{nm}$) para daunomicina intercalada vs [NaCl]

Comparando os resultados apresentados neste item com aqueles relativos à intercalação de daunomicina em DNA, verificamos que o espectro de emissão do complexo daunomicina/DNA em solução contendo [NaCl] $\cong 0,5\text{M}$ possui intensidade intermediária entre aquela da solução de DNA/daunomicina com um $R=3,0$ e aquela com $R=4,2$.

A adição de NaCl desintercala moléculas de daunomicina mas este processo não é tão eficaz quanto aquele que ocorre para o complexo AA/DNA porque as forças envolvidas são de natureza e intensidade diferente das forças responsáveis pela intercalação de daunomicina. Neste caso, a intercalação ocorre com o eixo maior da molécula de daunomicina ortogonal ao plano das bases. Existem duas pontes de hidrogênio adicionais: uma delas entre o grupo OH de C9 e o resíduo guanina abaixo da molécula de daunomicina e a outra envolvendo o grupo $-C=O$, também de C9, uma molécula de água e a base citosina acima da molécula intercalada [38]. Ambas fortalecem a interação com o DNA enquanto, conforme vimos, o complexo AA/DNA é estabilizado por forças eletrostáticas. Assim, o efeito causado pela força iônica será menos pronunciado no caso do complexo Dau/DNA. Em realidade, existência de pontes de hidrogênio em complexos deste tipo já tinha sido observada para a proflavina [41]. Assim, a interação via pontes de hidrogênio

entre as bases nitrogenadas do DNA e os grupos OH fenólicos da daunomicina deve depender das bases entre as quais a intercalação ocorre. Estes grupos formam uma ponte de hidrogênio intramolecular quando a molécula se encontra livre em solução mas, quando ela se intercala estes grupos podem formar uma ponte de hidrogênio intermolecular com os elétrons π das bases CG ou com o átomo N2 ou O6 de guanina e O2 de citosina. Este é, talvez, um dos motivos que confere seletividade de daunomicina por pares de bases CG, ao contrário de AAH⁺ que apresenta pouca seletividade na intercalação [14, 42].

V) Conclusão

As pequenas mudanças ocorridas nos espectros de absorção e emissão das soluções contendo as bases nitrogenadas e a substância intercaladora (AA e daunomicina) indicam que não é a interação direta entre a base e a molécula intercaladora a responsável pelas modificações espectrais. Na verdade é a estrutura em dupla hélice do DNA que possibilita, em virtude de interações hidrofóbicas, a estabilização do complexo formado.

Estudando o composto AA em solução aquosa verificamos que a espécie intercaladora é o monômero AAH^+ pois as alterações nos espectros de absorção e emissão desta molécula, quando intercalada, podem ser explicadas pela interação entre soluto e solvente. A cavidade do DNA se comporta como se fosse um meio hidrofóbico, a intensidade de emissão aumenta e o máximo de absorção se desloca para o vermelho devido a maior estabilização do estado excitado quando comparado ao fundamental.

Estudos alterando a força iônica mostram que, em solução aquosa sem DNA, as moléculas a serem intercaladas se agregam à medida que aumenta a concentração de íons. A variação dos valores das constantes de equilíbrio (K_I , K_D e K_C) são fortemente dependentes da concentração de íons em solução e concordam com aqueles obtidos por outros pesquisadores. [29, 34]

Para a daunomicina foi possível obter apenas o valor da constante K_I pois esta substância não apresenta fluorescência quando intercalada ou agregada. O valor encontrado ($1,3 \times 10^6 M^{-1}$) concorda com os conseguidos em outros trabalhos nos quais a força iônica é diferente. Isto indica que a concentração de sal pouco influencia o valor de K_I devido à característica não eletrostática da interação.

Os agregados de AAH^+ existentes na superfície do DNA são desfeitos quando aumenta a força iônica, indicando a interação eletrostática entre o AAH^+ e o DNA. Estes sais podem impedir a intercalação quando em alta concentração. O efeito predominante, para desintercalarem, é a repulsão eletrostática entre a superfície carregada de contra íons do DNA e a carga de mesmo sinal da substância intercaladora.

A supressão da fluorescência da daunomicina quando esta se encontra em meio básico ($pH \approx 11$) se deve à desprotonação dos grupos fenólicos do seu cromóforo originando uma espécie cujas características espectrais são diferentes daquelas em pH neutro. Isto indica que as interações

entre esta substância e o DNA são diferentes daquelas existentes entre AA. Enquanto o complexo AA/DNA é estabilizado por interações eletrostáticas, o complexo Dau/DNA tem a sua estabilidade reforçada por pontes de hidrogênio.

VI) Bibliografia

- 1) J. B. Birks, "Photophysics of Aromatic Molecules", Wiley Interscience, New York (1970), págs. 29, 40-100
- 2) M. Kasha et al, "The exciton model in molecular spectroscopy", Pure Appl. Chem., 11, 371 (1965)
- 3) W. Saenger, "Principles of nucleic acid structure", Springer-Verlag, Heidelberg (1984), págs. 350-361
- 4) E. L. Smith, "Bioquímica, Aspecto Geral", Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1985), págs. 120-142
- 5) H. M. Sobell, "Structural and dynamic aspects of drug intercalation into DNA and RNA", em "Nucleic acid geometry and dynamics", Ed. R. H. Sarma, Pergamon Press, New York (1980), págs. 289-323
- 6) L. S. Lerman, "Structural considerations in the interaction of DNA and acridines", J. Mol. Biol. 3, 18, (1961)
- 7) N. J. Pritchard et al, "Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA", Nature, 212, 1360 (1966)
- 8) S. Georghiou, "Interaction of acridine drugs with DNA and nucleotides", Photochem. Photobiol., 26, 59 (1977)
- 9) G. Floser e D. Haarer, "The photochemistry of daunomycin in solution and intercalated into DNA studied by photochemical hole burning", Chem. Phys. Lett., 147, 288 (1988)
- 10) W. Kersten et al, "Physicochemical properties of complexes between deoxyribonucleic acid and antibiotics which affect ribonucleic acid synthesis (actinomycin, daunomycin, cinerubin, nogalamycin, chromomycin, mithramycin, and olivomycin), Biochemistry, 5, 237 (1966)
- 11) H. Marquardt et al, "Tumorigenicity in vivo and induction of malignant transformation and mutagenesis in cell cultures by adriamycin and daunomycin", Cancer Res., 36, 2065 (1976)
- 12) P.J. Gray e D. R. Phillips, "Ultraviolet induced binding of daunomycin to DNA", Photochem. Photobiol., 32, 621 (1980)
- 13) D. E. Graves e T. R. Krugh, "Adriamycin and daunomycin bind in a cooperative manner to deoxyribonucleic acid", Biochemistry, 22, 3941 (1983)
- 14) J. B. Chaires et al, "Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction", Biochemistry, 26, 8227 (1987)

- 15) F. Frezard e A. Garnier-Suillerot, "Comparison of the binding of anthracycline derivatives to purified DNA and to nuclei", *Biochim. Biophys. Acta*, 1036, 121 (1990)
- 16) J. B. Chaires et al, "Dissection of the energy of anthracycline antibiotic binding to DNA: Eletrostatic contributions", *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 5360 (1993)
- 17) D. P. Remeta et al, "Thermodynamic characterization of daunomycin-DNA interactions: Comparison of complete binding profiles for a series of DNA host duplexes", *Biochemistry*, 32, 5064 (1993)
- 18) O. A. Ohlweiler, "Química Analítica Quantitativa", Livros Técnicos e Científicos Editora, São Paulo (1974), págs. 59-63
- 19) G. Gomori, "Methods in Enzymology", 1, 134 (1955)
- 20) J. B. Chaires et al, "Self-association of daunomycin", *Biochemistry*, 21, 3927 (1982)
- 21) M. Kubista et al, "Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy", *Biochemistry*, 26, 4545 (1987)
- 22) S. P. Moulic et al, "pH effect on acridine orange dye", *Indian J. Chem.*, 15A, 345 (1977)
- 23) B. H. Robinson et al, "Thermodynamic behavior of acridine orange in solution", *J. Chem. Soc. Far. Trans. I*, 69, 56 (1973)
- 24) D. J. Blears e S. S. Danyluk, "The agregation of acridine orange in aqueous solution", *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 1084 (1966)
- 25) E. G. McRae e M. Kasha, "Enhancement of phosphorescence ability upon aggregation of dye molecules", *J. Chem. Phys.*, 28, 721 (1958)
- 26) G. Barone, *Ric. Sci. Rend., Sez. A6*, 87 (1964)
- 27) V. Barthelemy-Clavey et al, "Self-association of daunorubicin", *FEBS Lett.*, 46, 5 (1974)
- 28) M. Menozzi et al, "Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution", *J. Pharm. Sci.*, 73, 766 (1984)
- 29) N. Kure et al, "Kinetics of the interaction between DNA and acridine orange", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61, 643 (1988)
- 30) J. Marmur, "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms", *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1961)
- 31) E. Fredericq et al, "The ultraviolet spectrum of deoxyribonucleic acids and their constituents", *J. Mol. Biol.*, 3, 11 (1961)
- 32) Y. Motoda e Y. Kubota, "Delayed excimer fluorescence of acridine orange bound to DNA", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52, 693 (1979)

- 33) A. Andreoni et al, "Structural studies in biological molecules via laser-induced fluorescence: acridine-DNA complexes", em "Chemical and biochemical applications of lasers", ed. C. B. Moore, Academic Press, New York (1979), vol. IV, págs. 1-30
- 34) M. Sakoda et al, "Kinetic studies on acridine orange-DNA interaction", *J. Biochem.*, 71, 891 (1972)
- 35) R. W. Armstrong et al, "The interaction between acridine dyes and deoxyribonucleic acid", *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 3174 (1970)
- 36) G. Scatchard, "The attractions of proteins for small molecules and ions", *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 51, 660 (1949)
- 37) J. B. Chaires et al, "Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: Equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid", *Biochemistry*, 21, 3933 (1982)
- 38) Ref. 3, págs. 360-361
- 39) D. Patel, "NMR studies of structure and dynamics of synthetic DNA and RNA duplexes and their antibiotic intercalation complexes in solution", em "Nucleic acid geometry and dynamics", editor R. H. Sarma, Pergamon Press, New York (1980), págs. 185-231
- 40) Ref. 3, pág. 110
- 41) Ref. 5, pág. 298
- 42) M. Manfait et al, "Interaction of adriamycin as studied by resonance Raman spectroscopy", *Nucleic Acids Res.*, 10, 3803 (1982)