

MILTON ROQUE BUGS

Monitoramento de Propriedades Fotofísicas e
Fotico-Químicas da Interação do Brometo de Etidio
ao DNA por Fotoacústica, Fluorescência e FTIR



1910001004



unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

**MONITORAMENTO DE PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E
FÍSICO-QUÍMICAS DA INTERAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO
AO DNA POR FOTOACÚSTICA, FLUORESCÊNCIA E FTIR**

MILTON ROQUE BUGS

**Tese apresentada ao Departamento de
Física do Instituto de Biociências, Letras
e Ciências Exatas, para a obtenção do
Título de DOUTOR EM BIOFÍSICA
MOLECULAR, Área de concentração:
BIOFÍSICA MOLECULAR.**

São José do Rio Preto – SP

2001



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA

MONITORAMENTO DE PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E
FÍSICO-QUÍMICAS DA INTERAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO
AO DNA POR FOTOACÚSTICA, FLUORESCÊNCIA E FTIR

MILTON ROQUE BUGS



T1004/01

Tese apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, para a obtenção do Título de DOUTOR EM BIOFÍSICA MOLECULAR, Área de concentração: BIOFÍSICA MOLECULAR.

Orientador: Prof. Dr. MARINÔNIO LOPES CORNÉLIO

São José do Rio Preto – SP

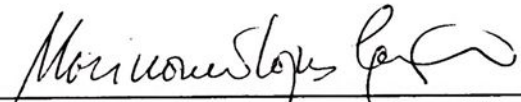
2001

**MONITORAMENTO DE PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E FÍSICO-
QUÍMICAS DA INTERAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO AO DNA POR
FOTOACÚSTICA, FLUORESCÊNCIA E FTIR**

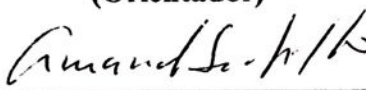
MILTON ROQUE BUGS

Tese apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, para a obtenção do Título de DOUTOR EM BIOFÍSICA MOLECULAR, Área de concentração: BIOFÍSICA MOLECULAR.

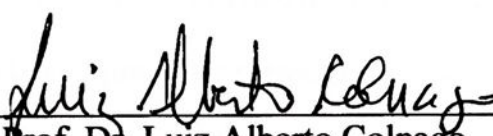
Membros da Banca:



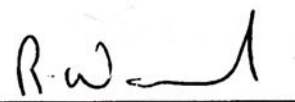
Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
DF-IBILCE-UNESP
(Orientador)



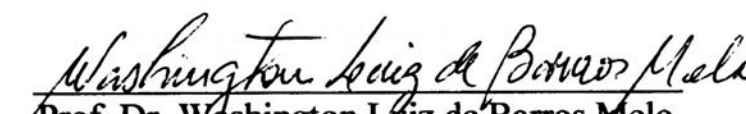
Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
FFCLRP-USP



Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago
EMBRAPA – São Carlos - SP



Prof. Dr. Richard John Ward
FFCLRP-USP



Prof. Dr. Washington Luiz de Barros Melo
EMBRAPA – São Carlos - SP

São José do Rio Preto
29 de junho de 2001



A esposa e amiga RAQUEL pelo apoio com as palavras corretas nos momentos mais difíceis, e principalmente pelo ser mais importante de nossas vidas: a MARIANE.

A MARIANE que apesar de tão pura em seus atos me fez ver a vida de uma outra maneira.

Aos meus pais, OTTMAR (*in memoriam*) e ARMINDA que me ensinaram os valores fundamentais que regem a minha vida

A ELISEU, ANA MARIA e aos meus sobrinhos GUSTAVO e THOMAS

Aos meus sogros JOÃO e GRACIA

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS



A FAPESP pelo apoio financeiro, Proc. 96/07843-6.

Ao orientador **Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio** pela orientação e amizade, onde as discussões e sugestões foram sempre úteis e importantes para a minha formação.

Ao **Prof. Dr. Washington Luiz de Barros Melo**, pela ajuda nos programas do sistema de aquisição e sugestões na elaboração da parte eletrônica do sistema fotoacústico.

Ao **Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto** por sua atenção, discussões e sugestões muito úteis ao trabalho.

Ao **Prof. Dr. Richard John Ward** do Departamento de Química da FFCLRP-USP pelas discussões e uso do espectrofluorímetro SLM-AMINCO 8100 (Proc. FAPESP nº 96/11165-3).

Ao **Prof. Dr. Raghuvir K. Arni** pelo seu apoio.

Ao **Prof. Dr. João Ruggiero Neto** pelas sugestões e discussões ao trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Fosey** pelo seu apoio e amizade e discussões.

Ao **Prof. Dr. Jorge Chahine** pela ajuda com o *chip* da Motorola-USA.

Ao **Prof. Dr. Gustavo** do Departamento de Química do IBILCE pelo uso do espectrofotômetro Cary 100 scan (Proc. FAPESP nº 96/08279-7).

Ao **Prof. Dr. Márcio Tiera** do Departamento de Química do IBILCE pelo uso do espectrofluorímetro Hitachi F-4500.

A secretária **Ilva Cecílio Bernardes** por resolver todos os problemas burocráticos necessários e imprevistos.



Aos técnicos **Antônio Aparecido Barbosa** pelas usinagens das peças e pela paciência na confecção da câmara fotoacústica, e ao **Paulo Roberto Salinas** pela ajuda e solução dos diversos problemas.

Ao técnico **João Jesuíno Demilio** do Departamento de Engenharia de Alimentos pela ajuda na confecção das peças.

Ao **Guilherme Dworak** da Seção Técnica de Informática, pela ajuda nos problemas com os computadores do laboratório.

Ao amigo **Carlos Roberto Benatti** e família.

Aos funcionários da Pós-Graduação: **Nanci Queiroz de Assis Pereira, Rosemar Rosa de Carvalho Brena, Genoefa De Biagi, Oscar José Marques e Rosana Miguel Gomes Ferro.**

Aos colegas **Hamilton, Fábio e Rubens** da Bioquímica do Departamento de Química do IBILCE, pela ajuda nos experimentos.

Aos colegas **Flávio, Fátima, Valmir, Leandra**, pela amizade e convivência no Departamento.

Aos funcionários e professores do Departamento de Física.

E ao **BRASIL** que precisa de pessoas que acreditam neste País.



MUITO OBRIGADO



Índice

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1 – Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	8
2 – Teoria.....	10
2.1 Interação da Radiação com a Macromolécula.....	11
2.2 O Efeito Fotoacústico.....	16
2.1.1 O Modelo de Rosencwaig – Gersho.....	17
2.3 Princípios de Fluorescência.....	25
2.3.1 Fluorescência Resolvida no Tempo com Frequência Modulada.....	28
2.3.2 Princípio da Correlação Cruzada.....	29
2.4 FTIR.....	30
3 – Materiais e Métodos.....	36
3.1 Obtenção das Amostras.....	36
3.2 Fluorescência Estática.....	38
3.3 Fluorescência Resolvida no Tempo.....	39
3.4 FTIR.....	39
3.5 Construção do Espectrômetro Fotoacústico.....	41
3.6 A Câmara Fotoacústica.....	43
3.6.1 Modelo da Câmara Fotoacústica Utilizada.....	45
3.6.2 Parâmetros do Sistema de Aquisição de Dados.....	47



4 – Resultados e Discussões.....	49
4.1. Propriedades Fotofísicas do Complexo DNA-Eb.....	51
4.1.1. Fluorescência Resolvida no Tempo.....	51
4.1.1.1. Medidas do Tempo de Vida do	
Estado Singlete.....	52
4.1.1.2. Rendimento Quântico de Fluorescência.....	56
4.1.2 Fotoacústica em Amostras Líquidas.....	58
4.1.2.1 Medidas do Tempo de Vida do	
Estado Triplete.....	67
4.2. Equilíbrio de Ligação do Complexo DNA-Eb.....	76
4.2.1. Evidências de dois modos de ligações do	
complexo DNA-Eb.....	76
4.2.2. Titulação de SDS.....	88
4.2.3. Modelo de interação do Complexo DNA-Eb.....	102
4.2.4. Titulação com CHAPS e TRITON.....	105
4.2.5. Rendimento Quântico de Fluorescência	
por Fotoacústica.....	107
4.3. Medidas de FTIR do complexo DNA-Eb.....	110
 5 – Conclusões	120
 Bibliografia.....	126
 Apêndice A	130
 Montagem da Parte Eletrônica de Controle e Aquisição	
de Dados do Espectrômetro Fotoacústico.....	130



RESUMO

A espectroscopia fotoacústica (PAS) e de fluorescência estática e resolvida no tempo, somadas ao FTIR foram empregadas no estudo da interação do etídio ao DNA em soluções aquosa e filmes. Foi investigado o efeito do sal sobre o estado do DNA monitorando-se a resposta do etídio.

A construção do espectrômetro fotoacústico possibilitou investigar as propriedades fotofísicas e físico-químicas do complexo DNA-Eb. O uso da técnica fotoacústica aplicada a material biológico em solução foi um avanço em relação ao existente na literatura.

Os resultados obtidos com a fluorescência indicam a intercalação do Eb ao DNA devido ao aumento no tempo de vida do estado singleto do Eb livre de $1,65 \pm 0,04$ ns para ~ 21 ns quando intercalado ao DNA.

A força iônica tem um papel muito importante na estabilidade, conformação e ligação do etídio ao DNA, verificamos que os experimentos resolvidos no tempo em duas janelas temporais distintas foram fundamentais na investigação do efeito da força iônica sobre o estado do DNA.

PAS foi aplicado neste mesmo sistema para determinar o tempo de vida do estado tripleto do etídio livre e intercalado, que é pouco explorado na literatura e tem como vantagem sobre o singleto, a possibilidade de acompanhar movimentos mais lentos da molécula de DNA. O tempo de vida encontrado para o estado tripleto do etídio livre ficou em torno de 0,30 ms e intercalado entre os pares de bases do DNA em 10 mM de NaBr em torno de 20 ms para uma razão molar DNA:Eb de 5, e com o aumento da força iônica até 150 mM de NaBr este tempo caiu para valores próximos de 2 ms.

Da interação do complexo DNA-Eb, determinamos o valor da constante de ligação utilizando o modelo de McGhee-von Hippel, o valor encontrado foi de $3,38 \times 10^8 \text{ M}(\text{bp})^{-1}$ e o número de sítios excluídos 2. O interessante surgimento de dois pontos isobésticos, foi o indício experimental de dois modos de ligação do Eb ao DNA. O SDS foi usado para remover o Eb ligado fracamente ao DNA. Os resultados foram confirmados em comparação com a titulação de SDS ao Eb estudado por fluorescência e PAS corroborando a remoção dos Eb ligados fracamente ao DNA. O valor encontrado para a constante de dissociação foi $0,43 \pm 0,04$ mM de Eb, indicando que $21,5 \pm 2$ % dos etídios ligados externamente foram removidos pelo SDS. O valor da constante de ligação foi recalculado



sendo de $1,20 \times 10^9 \text{ M(bp)}^{-1}$ e de sítios excluídos de 2,57. O valor da constante indica uma alta afinidade do Eb por intercalar-se entre os pares de bases do DNA. Os dados de associação e dissociação do complexo DNA-Eb possibilitou inferir um modelo de interação deste complexo.

A eficiência quântica de fluorescência do Eb obtido pelas duas técnicas foram de $\phi_{\text{FL}} = 0,90 \pm 0,02$ e $\phi_{\text{FL(PAS)}} = 0,87 \pm 0,03$, e o $\phi_{\text{FL(PAS)}} = 0,04 \pm 0,01$ quando ancorado ao grupo fosfato do DNA, que reforça os dois modos de ligação ao DNA.

Os resultados com FTIR demostraram duas bandas de vibrações importantes, em 3187 cm^{-1} que corresponde ao estiramento simétrico do grupo *NH* das bases, e a banda em 1225 cm^{-1} que corresponde ao estiramento assimétrico do grupo fosfato, sugerindo a proximidade do etídio com os pares de bases do DNA, devido a compactação da dupla hélice do DNA, induzidas pela titulação de NaBr.

O conjunto desses resultados demonstraram a viabilidade da aplicação da PAS no estudo de propriedades fotofísicas e físico-químicas do complexo DNA-Eb. A técnica PAS portanto abre a possibilidade do estudo de amostras que não possuem decaimentos radiativos, ou seja, possibilita tanto o estudo de fármacos que não são fluorescentes, quanto de proteínas que não apresentem espectros de emissão.

ABSTRACT

Photoacoustic (PA), static and time resolved fluorescence together with FTIR spectroscopy, were used to investigate the DNA-Eb interaction both in aqueous solution and films. The ionic strength effect on the DNA state was monitored through ethidium as a probe.

The construction of the photoacoustic spectrometer permitted the investigation of the photophysical and physical-chemical properties of the DNA-Eb complex. The use of photoacoustic spectroscopy (PAS) applied to biological samples in physiological solution represents an advance in relation to quoted literature.

The increment of the singlet state lifetime of the ethidium from 1.65 ± 0.04 ns to ~ 21 ns, obtained through fluorescence indicate the of Eb into DNA. Two distinct ionic strength were applied to the complex DNA-Eb without changing the time response of the Eb, indicating that modifications on DNA state should occur in different time scale.

PAS was used to determine the triplet lifetime state of the ethidium both in the free and intercalated states, which little is reported in the literature and has the advantage of enabling the monitoration of slow motions of DNA. The free Eb triplet lifetime was around 0.30 ms and when intercalated between the base pairs of DNA increased to 20 ms at 5 DNA:Eb molar ratio. At a NaBr concentration of 150 mM the lifetime decreased around 2 ms.

The McGhee-von Hippel model was applied to find physical-chemical properties of the DNA-Eb complex. The binding constant was $3.38 \times 10^8 \text{ M(bp)}^{-1}$ and the excluded site was 2. Interestingly, the appearance of two isosbestic point provided experimental evidence of two mode of Eb binding to DNA. SDS was used to remove the weakly bound Eb to DNA, and the results obtained through titration of SDS to DNA-Eb complex monitored by fluorescence and PAS confirmed the two binding modes. The dissociation binding constant was 0.43 ± 0.04 mM of Eb, indicating that $21.5 \pm 2\%$ of externally bound Eb was removed by SDS. The corrected binding constant was $1.2 \times 10^9 \text{ M(bp)}^{-1}$ and the number of excluded sites was 2.57, indicating highly affinity of Eb binding to DNA. From the association and dissociation data a model of the DNA-Eb complex interaction was developed.

The Eb fluorescence quantum yield was $\phi_{FL} = 0.90 \pm 0.02$ and $\phi_{FL(PAS)} = 0.87 \pm 0.03$, and $\phi_{FL(PAS)} = 0.04 \pm 0.01$ when bound to the DNA phosphate group, which provides an additional evidence for the two binding modes of Eb to DNA.

FTIR results indicate two important infrared markers bands at 3187 cm^{-1} which correspond to symmetrical stretching vibration of *NH* group of the base pairs, and at 1225 cm^{-1} which corresponds to the asymmetrical stretching vibration in phosphate group. Changes in these bands suggests proximity of the Eb with the base pairs of DNA due the compactation of DNA double helix induced by NaBr titration.

These results demonstrate the feasibility of application of PAS in the photophysical and physical-chemical study of DNA-Eb complex. The PAS technique has an advantage in the study of samples which do not demonstrate radiative decay, and permit the study of non-fluorescent drugs and proteins which do not have emission spectrum.

LISTA DE ABREVIATURAS

Eb	Brometo de etídio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ct-DNA	Calf thymus DNA
NaBr	Brometo de sódio
PAS	Espectroscopia Fotoacústica
FTIR	Transformada de Fourier no Infravermelho
α_i	Fração de etídio ligado ou removido
A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
G	Guanina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulphonate
Triton X-100	iso-octyllphenoxy-polyethoxyethanol
cmc	Concentração micelar crítica
Po	Pressão ambiente
To	Temperatura ambiente
γ	Razão dos calores específicos
κ	Condutividade térmica do material
α	Coeficiente de difusão térmica do material
σ	Coeficiente complexo de difusão térmica do material
μ	Comprimento de difusão térmica do material



α	Difusividade térmica do material
β	Coefficiente de absorção ótica.
ϕ	Modulação de fase
τ_s	Tempo de vida do estado singleto
τ	Tempo de vida do estado tripleto
ω	Frequência angular de modulação
L	Comprimento da amostra
L_β	Comprimento de absorção ótica
L_g	Comprimento do gás no porta amostra
μ_a	Comprimento de difusão térmica da amostra
ϕ_{FI}	Rendimento quântico (ou eficiência quântica) de fluorescência
ϕ_{NR}	Eficiência da conversão de fótons absorvidos em calor
$\phi_{FI(PAS)}$	Rendimento quântico de fluorescência por fotoacústica
ϕ_{isc}	Eficiência quântica do cruzamento intersistema
E_S	Energia de transição do estado singleto
E_T	Energia de transição do estado tripleto
A_{PAS}	Amplitude do sinal fotoacústico
K_d	Constante de dissociação
K	Constante de associação



Introdução

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Os processos biofísicos que envolvem uma molécula biológica demonstram a importância da necessidade de elucidação das interações em nível molecular, fornecendo os princípios básicos na tentativa de desvendar os mecanismos que envolvem as interações entre macromoléculas biológicas. As pesquisas em biofísica demonstraram que aos poucos estamos conhecendo os mecanismos moleculares dos processos biológicos fundamentais. Nas últimas duas décadas aumentou o interesse em estudar intercalantes de hidrocarbonetos aromáticos complexados a dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA) em solução aquosa. O conceito de que o DNA pode ser o alvo farmacológico no estudo do funcionamento de drogas não é novo. Como a estrutura do DNA é bem conhecida, torna-se um bom candidato para novos projetos de drogas, ou seja, *o drug design*. O resultado de muitos anos de pesquisa possibilitou o conhecimento do preparo de novas drogas que se ligam no DNA, com as características e propriedades das ligações muito precisas. Portanto fica muito claro a necessidade do uso das técnicas de bioquímica e biofísica para caracterizar o processo de ligação de uma droga ao DNA.



Neste trabalho, investigamos a interação do intercalante brometo de etídio ao DNA via as propriedades fotofísicas e físico-química deste intercalante, com a espectroscopia fotoacústica (PAS), a espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo, e a espectroscopia no infravermelho (FTIR). O efeito fotoacústico, que tem como fonte de calor decaimentos não-radiativos, no qual geram o sinal fotoacústico, a PAS vem a ser uma técnica complementar a espectroscopia de fluorescência que monitora os decaimentos radiativos, podendo assim monitorar os estados singletos e tripletos, a temperatura ambiente. A fosforescência devido a estados tripletos de ácidos nucleicos complexados, é observada geralmente a baixa temperatura (Eisinger and Lamola, 1971). A espectroscopia no infravermelho fornece informações das vibrações moleculares das ligações químicas da interação do etídio ao DNA.

Os ácidos desoxirribonucleicos são constituídos de apenas quatro diferentes tipos de unidades monoméricas simples, os desoxirribonucleotídeos: adenina, guanina, timina e a citosina, conforme mostra a figura 1.1. O DNA é uma macromolécula filamentar muito longa, composta de um grande número de desoxirribonucleotídeos, cada um composto de uma base, um açúcar e um grupamento fosfato, conforme está ilustrado na figura 1.2. As bases das moléculas de DNA portam as informações genéticas, o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural. Todo o DNA celular dos organismos procarióticos e eucarióticos é constituído de duas cadeias helicoidais polinucleotídicas enroladas em torno de um eixo comum. Os dois filamentos da dupla hélice correm em direções opostas. O suporte ose-fosfato de cada filamento fica do lado externo da dupla hélice, enquanto as purinas e pirimidinas estão do lado interno. As duas cadeias são mantidas juntas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases. A adenina (A) está sempre pareada com a timina

(T) por duas pontes de hidrogênio, e a guanina (G) sempre com a citosina (C) por três pontes de hidrogênio. Assim, uma das hélices é o complemento da outra (Lehninger *et al.*, 1995; Stryer, 1996).

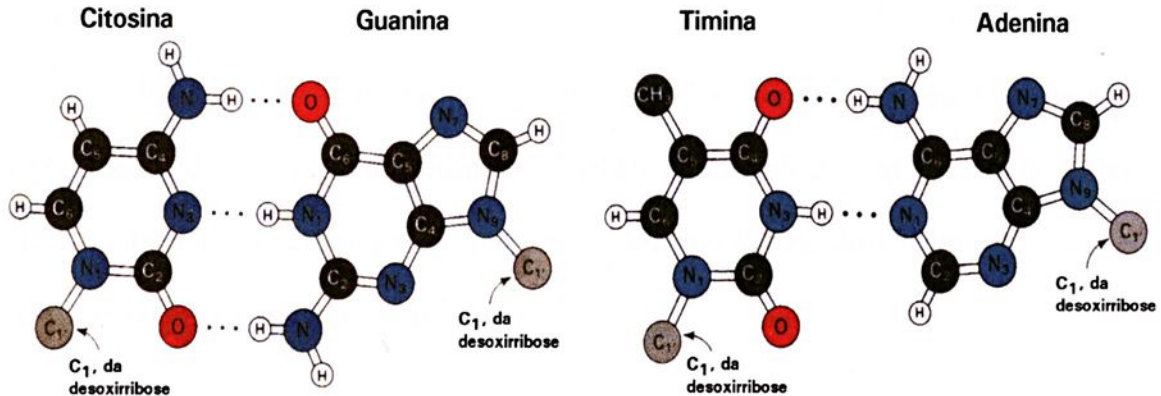


Figura 1.1: Modelo em esferas e bastões dos pares de bases do DNA, as purinas são a adenina e a guanina, e as pirimidinas são a timina e a citosina (De Stryer, 1996).

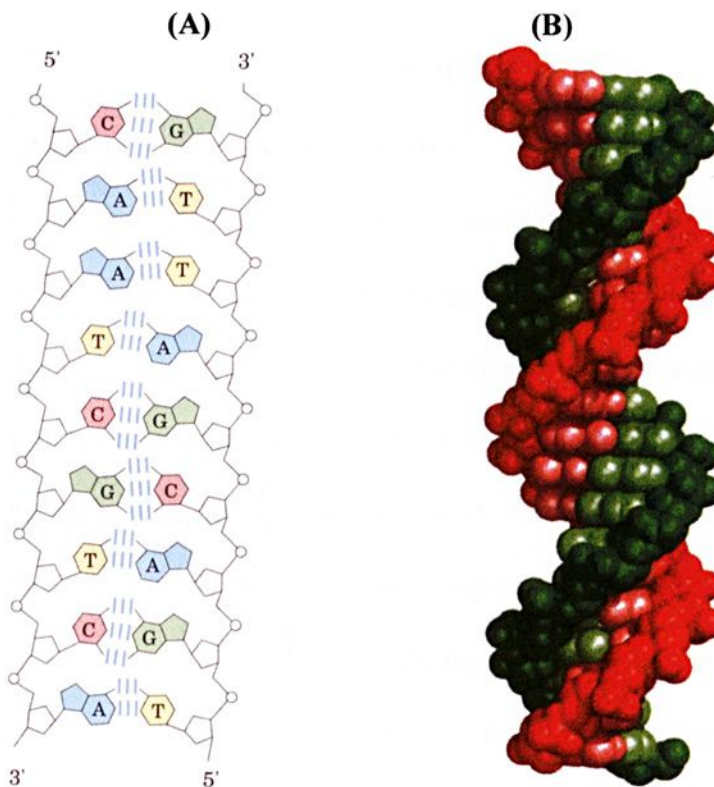


Figura 1.2: Ilustração da dupla hélice do DNA, composto de uma base, um açúcar e um grupamento fosfato, (A) Modelo esquelético, e (B) Modelo compacto (De Lehninger *et al.*, 1995; Stryer, 1996).

Algumas drogas quando intercalam ao DNA passam a fluorescer mais do que no ambiente aquoso. Os intercalantes clássicos como a *acridine orange*, brometo de etídio (figura 1.3) e a proflavina são usados para estudos com o DNA, com seus mecanismos de intercalação citados na literatura (Douthart *et al.*, 1973; Lohman *et al.*, 1978; Wilson and Lopp, 1979; Geacintov *et al.*, 1981; Winson *et al.*, 1985; Kapuscinski and Darzynkiewicz, 1987; Lee and Galley, 1988; Nordmeier, 1992; Meyer-Almes and Porschke, 1993). O brometo de etídio possui três anéis principais chamado fenantridina e um anel secundário fenil que está perpendicular ao anel principal.

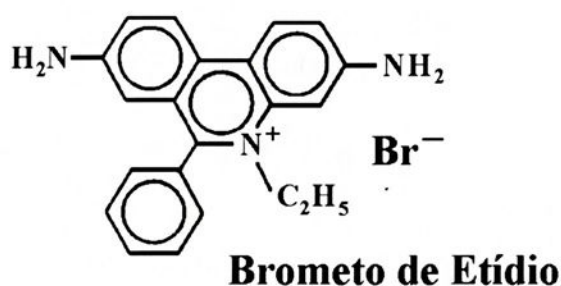


Figura 1.3: Fórmula estrutural do brometo de etídio.

O espaço e o ambiente hidrofóbico entre os pares de base do DNA permite que o etídio intercale, como mostra a figura 1.4. A interação entre o etídio e os pares de base aumenta o acoplamento eletrônico entre eles. Este acoplamento no entanto é mais evidente com a redução do espaço entre os pares de base. Esta redução é obtida pelo aumento da força iônica, ou seja, pelo aumento da concentração de contra-íons na solução. Os contra-íons de carga positiva interagem sobre os grupos fosfatos do DNA carregados negativamente. Este efeito conhecido por blindagem do grupo fosfato, diminui a intensidade da força eletrostática repulsiva entre os fosfatos, reduzindo assim o espaço entre os pares de bases, aproximando-se mais do etídio, portanto aumentando o acoplamento. Esta condição altera o micro ambiente dos pares de bases refletindo-se sobre os decaimentos radiativos e não radiativos do etídio.

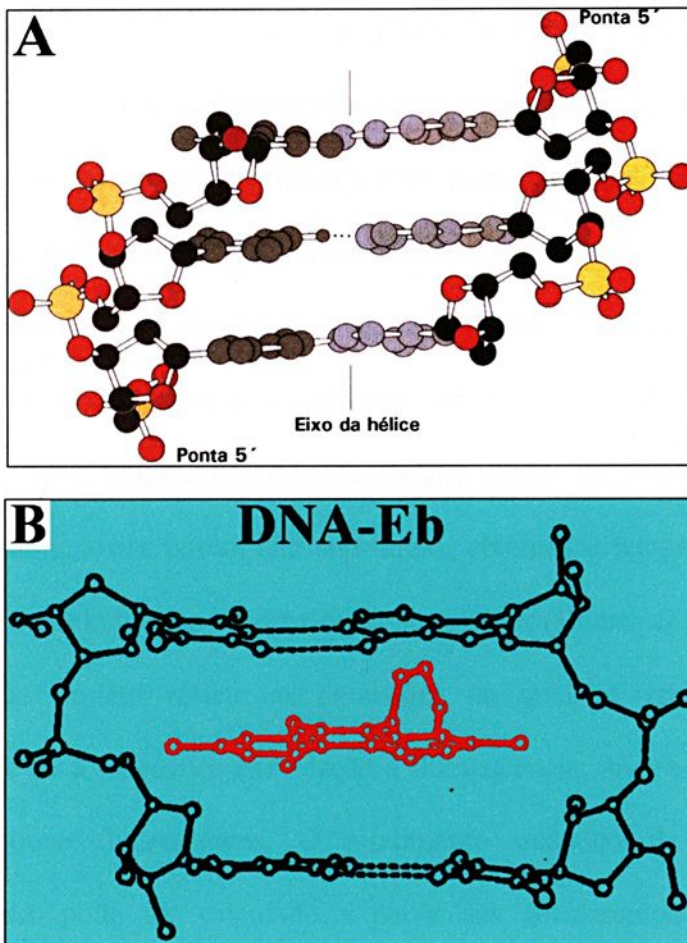


Figura 1.4: (A) O espaço e o ambiente hidrofóbico entre os pares de bases do DNA permite a intercalação do etídio, e (B) a intercalação (De Stryer, 1996; Daune, 1999).

A espectroscopia ótica está baseada na relação de Bohr-Einstein $\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$.

Esta relação vincula os estados de energia molecular E_i com a frequência ν da radiação eletromagnética. Os estados de energia de uma molécula estão resumidos em um diagrama de níveis de energia, o diagrama de Jablonski (Jablonski, 1935), que ilustra de modo geral, todos os princípios envolvidos nas espectroscopias.

A espectroscopia de fluorescência possibilita a exploração de importantes aspectos, como dinâmica e estrutura de moléculas biológicas. A espectroscopia de fluorescência é muito sensível, já que no estado excitado, os cromóforos são geralmente mais reativos do

que no estado fundamental, e portanto as perturbações físicas e químicas exercem uma grande influência sobre a emissão fluorescente e suas propriedades correlacionadas.

✧ O efeito fotoacústico que dá origem a PAS fornece dados associados aos estados singletos e tripletos da amostra. PAS fornece dados de amplitude e fase relacionados a amostra. A amplitude reflete a conversão de energia luminosa monocromática modulada em calor, a fase por sua vez está associada aos processos de relaxação da amostra. Da diferença de fase do sinal fotoacústico de uma amostra com o seu estado tripleto suprimido em relação a mesma amostra porém não suprimido, obtemos o tempo de vida do estado tripleto através do modelo teórico desenvolvido por Hunter (Hunter *et al.*, 1974). O tempo de vida do estado tripleto reflete as condições na qual se encontra a droga. A complementaridade da fotoacústica em relação a fluorescência, favorece a PAS no estudo com amostra pouco fluorescentes. O rendimento quântico de fluorescência por fotoacústica também pode ser calculado a partir dos decaimentos não radiativos da molécula.

✧ A espectroscopia no infravermelho corresponde aos possíveis modos de vibração da amostra em estudo. Quando uma certa ligação química absorve em determinada frequência, tal frequência caracteriza esta ligação. Podemos relacionar processos de interação a esta ligação quando sua frequência característica sofrer mudanças. Esta mudança assinala estruturalmente a região da molécula envolvida na interação.

A molécula do DNA fornece várias possibilidades de interação com um fármaco, dependendo da sua estereo química, carga e afinidade. Com estas características é possível que um fármaco, tenha a sua disposição, mais que um sítio de ligação ao DNA. De modo que, quando saturado o primeiro sítio o fármaco liga-se a um segundo sítio, até que todas as possibilidades tenham sido utilizadas pelo fármaco. A afinidade de uma ligação fornece



a razão de droga ligada e livre de uma interação DNA-droga, na qual podemos determinar quão forte a atividade biológica desta droga. Por exemplo, a taxa de dissociação de uma droga do DNA está relacionado com sua atividade farmacológica (Muller and Crothers, 1968). Várias técnicas são empregadas no estudo da cinética de dissociação de uma droga ao DNA. Muller e Crothers (Muller and Crothers, 1968), apresentaram o uso de surfatante na dissociação de um ligante a um sítio de ligação. O método mais simples e muito usado é a indução da dissociação pelo surfatante dodecil sulfato de sódio (SDS).

As diversas mudanças encontradas no tempo de vida do estado singleto e tripleto, o surgimento de dois pontos isobéctico e alterações na frequência de grupos vibracionais, possibilitou uma larga investigação da interação do etídio ao DNA.

1.1. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi a aplicação da espectroscopia fotoacústica na área de biofísica molecular. Neste sentido a montagem do espectrômetro fotoacústico tem por etapa principal a elaboração de uma câmara fotoacústica adequada para solução aquosa. A técnica fotoacústica tem bons resultados em materiais sólidos, com espectros de absorção bem definidos e caraterísticos, mas em solução aquosa tem uma dependência com a concentração, que geralmente torna a sua aplicação em amostras biológicas nem sempre factível. Por isto a elaboração de uma câmara fotoacústica com um bom sinal relacionado diretamente com a concentração da amostra biológica é fundamental, já que a maioria das amostras biológicas são usualmente monitoradas por outras técnicas espectroscópicas com uma concentração em torno de μM . Atualmente o uso do artifício de melhorar o meio de



propagação da onda térmica pela adição de gel ou a utilização de um polímero para a deposição da amostra para melhorar o sinal fotoacústico tem sido amplamente utilizado. No entanto, este artifício acaba descaracterizando o ambiente fisiológico da amostra. Assim uma condição aquosa para a amostra é fundamental para o estudo das interações de moléculas biológicas, e um avanço com a técnica fotoacústica.

Outra parte deste trabalho consistiu no estudo das propriedades fotofísicas e fisico-químicas da interação do complexo DNA-Eb, na qual estabeleceu-se uma relação entre o comportamento dos decaimentos radiativos e não-radiativos. As propriedades fotofísicas relacionam-se aos tempos de vida do estado tripleto com o micro ambiente onde o etídio se encontra, e as fisico-químicas ao equilíbrio da reação do DNA com o Eb, com o interessante aparecimento de dois pontos isobéstico, relacionado a dois modos de ligação do etídio ao DNA.

Usamos também a técnica de FTIR para estudar as mudanças das vibrações das ligações químicas do DNA e do complexo DNA-Eb com a adição da força iônica ao meio. Introduzimos um novo procedimento para a obtenção de filmes para a técnica de transmitância, usando o cartão com tela na qual gera um filme fino da amostra. Os dados obtidos caracterizaram a importância de alguns grupos na flexibilidade conformacional do DNA.

Com este conjunto de medidas realizadas com as técnicas aqui empregadas esperamos que mais um passo tenha sido dado em direção do esclarecimento dos processos de interação do complexo DNA-Eb, que pode ser estendidas para outros fármacos, e principalmente pelos interessantes resultados obtidos com a introdução da espectroscopia fotoacústica no estudo de macromoléculas biológicas em solução aquosa.



Teoria



CAPÍTULO 2

2. TEORIA

Neste capítulo é apresentada a teoria que envolve a espectroscopia fotoacústica, espectroscopia de fluorescência e a espectroscopia no infravermelho com a Transformada de Fourier (FTIR), com ênfase nas propriedades que foram mais exploradas no decorrer do trabalho. A princípio discutem-se os princípios básicos da fotoacústica e da fluorescência relacionadas as propriedades fotofísicas dos estados excitados. Também discutimos com mais detalhes a teoria fotoacústica e trabalhos relacionados, que são fundamentais para a elaboração e montagem da parte principal desta técnica, que é a câmara fotoacústica.

2.1. Interação da Radiação com a Macromolécula

As ondas eletromagnéticas são geradas quando uma carga elétrica for acelerada. De acordo com a teoria eletromagnética clássica, se uma carga oscila com um movimento harmônico simples de frequência f , irradia energia na forma de ondas eletromagnéticas de mesma frequência. As diferenças entre os diversos tipos de ondas eletromagnéticas são as frequências e os comprimentos de onda. Os campos elétrico (E) e magnético (H) oscilantes associados à onda eletromagnética são mutuamente perpendiculares e perpendiculares à



direção de propagação da onda, conforme está ilustrado na figura 2.1. As moléculas podem absorver e emitir fótons, sofrendo uma transição entre os níveis de energia. A mecânica quântica permite prever as três características mensuráveis de uma transição: a energia, a intensidade e a direção, na qual são observada em qualquer espectroscopia aplicada a macromoléculas. De um modo geral, as técnicas espectroscópicas, baseadas na interação de uma onda eletromagnética com a macromolécula, nada mais são do que uma aplicação da mecânica quântica, que é a base da nossa teoria atual da natureza.

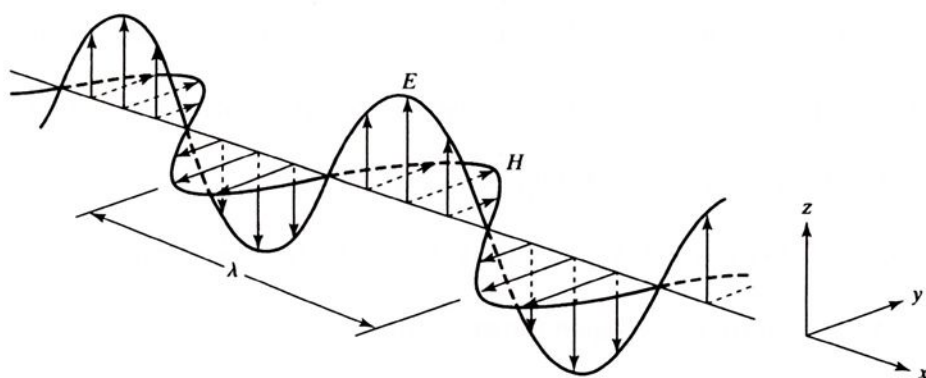


Figura 2.1: Os vetores campo elétrico e campo magnético.

Um feixe de luz é monocromático quando repete a forma senoidal no tempo com a mesma frequência ν e o mesmo comprimento de onda λ . Na mecânica quântica, a luz também tem propriedades de uma partícula e a energia destas partículas, ou fótons, depende da frequência clássica através da lei de Planck:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

onde a constante de Planck h é $6,6261 \times 10^{-34}$ J.s.

Os átomos e as moléculas possuem níveis de energia discretos, podendo absorver e emitir um fóton com uma energia que está compatível com a diferença de energia entre níveis ocupados e não ocupados. A distribuição eletrônica em uma molécula é a principal

responsável pelas ligações químicas, a distribuição de cargas que produz um momento de dipolo, as forças entre moléculas que conduz a associação ou a solvatação, a interação com a luz na indução fotoquímica, etc... Todas estas relações dependem criticamente de como o elétron está distribuído na molécula. Assim, podemos descrever o comportamento do elétron em um átomo usando a mecânica quântica. Esta descrição encontra-se muito bem fundamentada em vários livros de mecânica quântica, e também não é o intuito deste trabalho demonstrar tais tratamentos. Os três números quânticos n , l e m caracterizam uma função de onda, ou seja a distribuição eletrônica; l , m caracterizam a parte angular da função, enquanto que n caracteriza a dependência com a distância. Os números quânticos são chamados de: número quântico principal, n ; número quântico momento angular, l ; e o número quântico magnético, m . Resultados experimentais bem como as considerações teóricas indicam que um elétron têm um momento magnético intrínseco, o quarto número quântico, chamado de número quântico de *spin*, m_s . Em átomos com apenas um elétron, este momento magnético tem efeitos extremamente pequenos nos níveis de energia, mas quando consideramos mais do que um elétron em um átomo, este efeito de *spin* torna-se importante e pode ser facilmente escrito pela equação de Schrödinger, apesar de não ter uma solução exata.

A figura 2.2 mostra a notação da distribuição eletrônica em átomos de muitos elétrons. Para átomos de muitos elétrons, usamos o princípio de exclusão de Pauli, onde um orbital pode conter no máximo dois elétrons, e neste caso eles devem ter *spins* antiparalelos ($\uparrow\downarrow$).

O princípio de exclusão de Pauli representa uma propriedade de elétrons e não de átomos. É importante lembrar que as regras de seleção não proíbem totalmente as transições que as violam mas simplesmente tornam tais transições muito pouco prováveis.



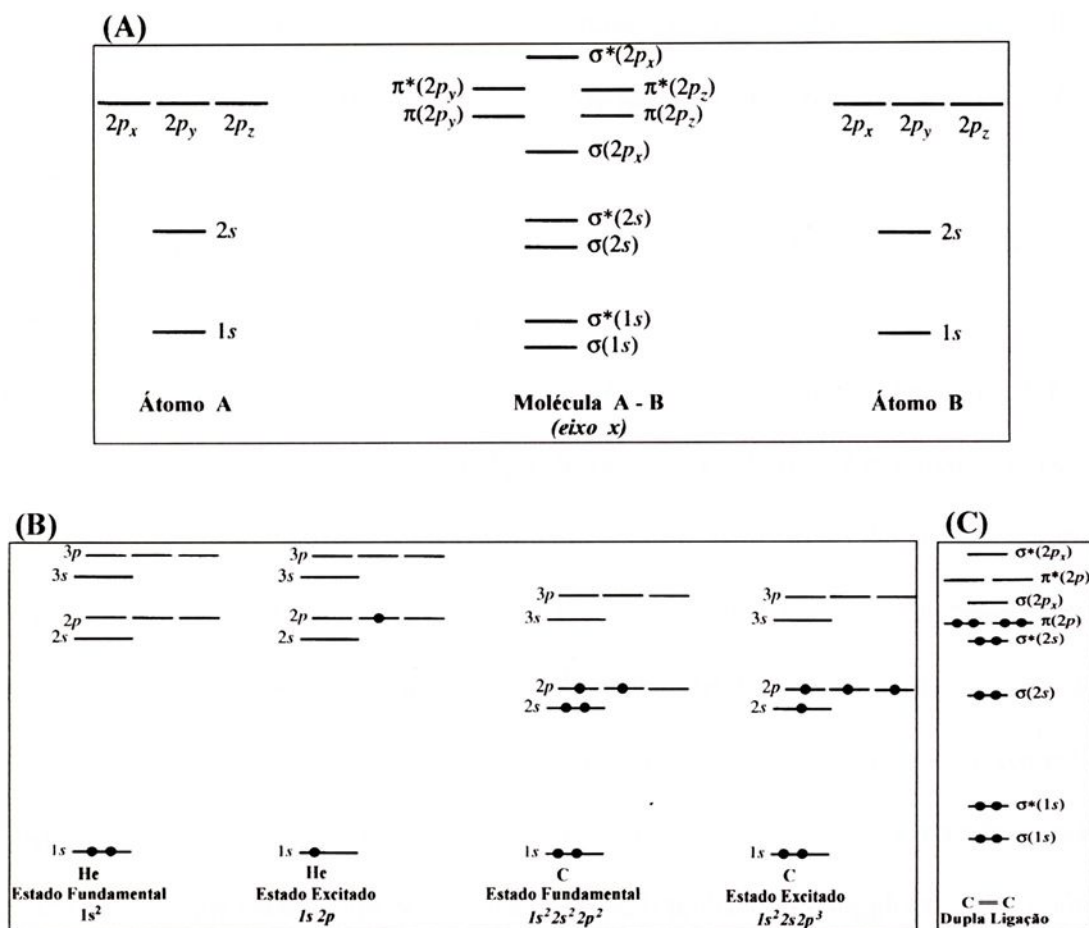


Figura 2.2: Notação dos orbitais eletrônicos em átomos de muito elétrons. (A) Modelo dos níveis de energia ocupados pelo elétron numa molécula diatômica. (B) e (C) Dois elétrons são colocados em cada orbital, de acordo com o princípio de exclusão de Pauli.

Se uma transição não pode ocorrer pelo mecanismo normal de emissão de radiação por um momento de dipolo elétrico oscilante, existe no entanto, uma probabilidade muito pequena para que ocorra a transição por emissão de radiação a partir de um momento de dipolo magnético oscilante. Isto pode acontecer através de oscilações na orientação do momento angular de *spin* ou do momento de dipolo magnético do elétron. Se um átomo for excitado para um estado do qual ele só possa retornar ao estado fundamental através de uma dessas transições altamente inibidas, ele poderá permanecer nesse estado excitado durante uma fração de segundo considerável, em vez de decair à taxa de transição típica de 10^8 s^{-1} . Este estado excitado, metaestável, retorna ao estado fundamental com a emissão retardada do

fóton na forma de fosforescência. Na prática é pouco provável a fosforescência de átomos porque o estado metaestável relaxa-se sem a emissão de fóton, com a transferência de sua energia para o meio.

Na maioria das moléculas, a absorção de um fóton conduz a uma transição de um estado fundamental singlete a um estado excitado singlete. Geralmente, existirá um estado tripleto de energia um pouco menor que a deste estado excitado singlete. Em uma excitação eletrônica, um elétron de uma ligação por par de elétrons é excitado a um estado de maior energia. Se o elétron excitado tiver um *spin* antiparalelo ao de seu companheiro, o estado excitado será um singlete, porém, se o *spin* do elétron excitado for paralelo ao seu companheiro, o estado será um tripleto. Logo após o salto quântico primário, uma série de eventos extremamente rápidos ocorre antes que qualquer reação fotoquímica ou emissão de radiação luminescente possa ocorrer. Primeiramente existe a conversão interna: independente de que estado superior excitado singlete tenha sido atingido no salto quântico primário, frequentemente existe uma transferência de energia rápida, sem emissão de energia, ao estado singlete excitado de mais baixa energia. Em segundo lugar, existe o cruzamento intersistemas, que é o decaimento do estado singlete excitado para um estado de tripleto excitado de menor energia. Parte desta energia é transferida ao estado tripleto através de um processo sem a emissão de radiação. Assim cada fóton absorvido por uma molécula poliatômica tem uma probabilidade de bipartição entre os estados de energia mais baixos excitados singlete e tripleto da molécula.

Quando uma molécula é irradiada por fótons, e com a absorção destes fótons, a energia absorvida excita os estados de energia vibracional ou vibracional-rotacional quando a irradiação eletromagnética está na região do infravermelho, e quando a energia absorvida excita um nível eletrônico a irradiação eletromagnética está na região do



visível ou ultravioleta. A diferença de energia entre o mais baixo estado vibracional-rotacional do estado eletrônico S_0 e S_1 , é da ordem de 80 kcal mol^{-1} , figura 2.3. A diferença de energia entre os níveis vibracionais é da ordem de 10 kcal mol^{-1} , porém a diferença energética rotacional é da ordem de 1 kcal mol^{-1} ou menor, portanto muitos níveis rotacionais são populados (Cantor and Schimmel, 1980).

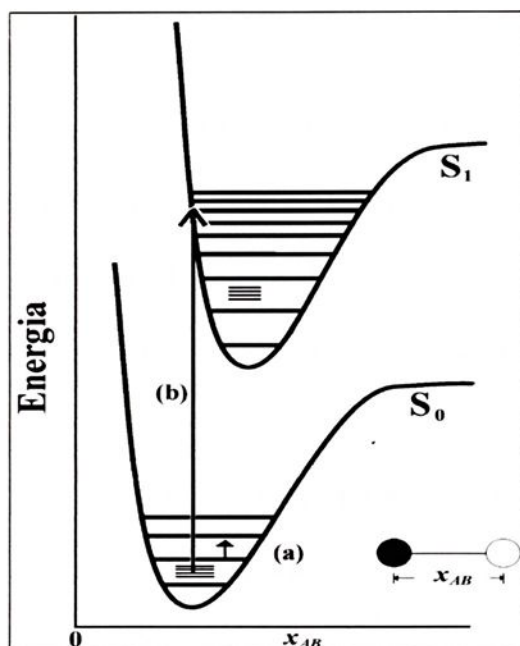


Figura 2.3: Níveis de energia de uma molécula diatômica. A curva da energia potencial é em função da distância internuclear (X_{AB}). Os dois estados eletrônicos mostrados diferem em energia potencial e posição. Para cada estado eletrônico existe a possibilidade dos níveis vibracionais (linhas longas) e os rotacionais (linhas curtas). A possível transição eletrônica é mostrada em (b) e a transição vibracional no estado eletrônico de mais baixa energia S_0 em (a).

2.2. O Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico foi descoberto em 1880 por Alexander Graham Bell (Bell, 1880). Quando um feixe modulado de radiação eletromagnética incide sobre uma amostra, parte de sua energia é absorvida e convertida em calor pelo processo de decaimento não

radiativo. O calor que está sendo gerado pela amostra origina um aumento de pressão e consequentemente uma onda acústica, que se propaga, e é detectado por um transdutor.

2.2.1 O Modelo de Rosencwaig - Gersho

O sinal fotoacústico é produzido pela condução do calor da amostra para o gás da câmara, ou seja, um mecanismo de difusão térmica descrito no modelo teórico de Rosencwaig & Gersho (Rosencwaig and Gersho, 1976). Há outros mecanismos que podem estar presentes no sinal fotoacústico como a difusão térmica, expansão térmica, flexão termoelástica e o efeito fotobárico, mas que são desconsiderados pela teoria de Rosencwaig & Gersho.

Um refinamento da teoria de Rosencwaig & Gersho foi sugerida por McDonald & Wetsel (McDonald and Wetsel, 1978), para um segundo mecanismo de geração do sinal fotoacústico, a expansão térmica da amostra. O modelo proposto era semelhante a um pistão composto, onde a vibração mecânica da superfície da amostra, gera um sinal, devido a expansão térmica. O modelo faz um tratamento mais exato do sinal fotoacústico, mas os dados mais refinados do modelo se comparam aos resultados finais da teoria básica de Rosencwaig & Gersho. O modelo teórico unidimensional de Rosencwaig & Gersho, leva em conta somente a difusão térmica, e faz um tratamento dos dados para uma amostra sólida. A figura 2.4 mostra uma ilustração da Espectroscopia Fotoacústica (PAS), conforme o tratamento feito por Rosencwaig & Gersho (Rosencwaig and Gersho, 1976; Rosencwaig, 1980).



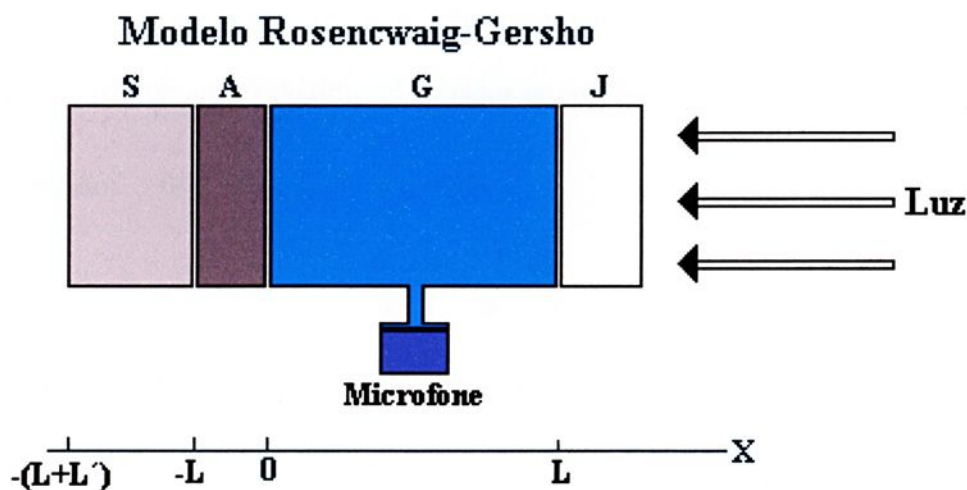


Figura 2.4: Geometria de uma câmara fotoacústica cilíndrica simples. Onde temos: Amostra (A), Suporte da amostra (S), Gás da câmara (G) e a Janela de entrada da luz (J).

Considerando uma fonte de luz monocromática, senoidal e modulada, com um comprimento de onda (λ) e com uma intensidade incidindo sobre a amostra, temos:

$$I = \frac{1}{2} I_o (1 + \cos \omega t) \quad (2.2)$$

onde I_o é a intensidade de luz incidente. Considerando-se que teremos uma absorção da luz em algum ponto x da amostra, e o coeficiente de absorção ótica da amostra é dado por β , a densidade de calor produzida será:

$$\frac{1}{2} \beta I_o e^{\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (2.3)$$

A partir da figura 2.4, temos um modelo de uma câmara fotoacústica cilíndrica, onde a amostra A , com formato cilíndrico de diâmetro D e espessura L , está colocada no suporte da amostra de maneira que sua superfície frontal esteja em contato direto com o gás dentro da câmara, e sua superfície traseira esteja em contato com o suporte, que deve ser um mau condutor térmico comparado a amostra. Partindo de um princípio de que o gás

e o suporte não absorvam luz, teremos três regiões de distribuição de calor na câmara.

Assim teremos três equações de difusão de calor no interior da câmara:

1 - Para a região: $0 \leq X \leq L$ (G = gás)

$$\frac{\partial^2 T_G}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_G} \frac{\partial T_G}{\partial t} \quad (2.4)$$

2 - Para a região: $-L \leq X \leq 0$ (A = amostra)

$$\frac{\partial^2 T_A}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_A} \frac{\partial T_A}{\partial t} - \frac{\beta_A I_0 \eta_A}{2\kappa_A} e^{\beta_A x} (1 + e^{i\omega t}) \quad (2.5)$$

3 - Para a região: $-(L+L') \leq X \leq -L$ (s = suporte da amostra)

$$\frac{\partial^2 T_s}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial T_s}{\partial t} \quad (2.6)$$

onde T é a temperatura e η é a eficiência na qual a luz absorvida em um comprimento de onda λ é convertido em calor pelo processo de relaxamento não radiativo.

Considerando que uma fina camada muito próxima à superfície da amostra tem um comportamento de um gás ideal e o restante do gás uma situação adiabática, que não possui entrada ou saída de calor do sistema. Podemos fazer um tratamento matemático nas equações 2.4, 2.5 e 2.6, levando em conta as condições de contorno da geometria da câmara, temperatura e um fluxo de calor contínuo, temos que ΔP representa a complexa sobreposição de ondas da variação senoidal da pressão, pela expressão:

$$\Delta P = \frac{\beta_A I_0 \gamma P_0}{2\sqrt{2}\kappa_A L_G a_G T_0 (\beta_A^2 - \sigma_A^2)} x \quad (2.7)$$

$$\frac{[e^{\sigma_A L_A} (r_A - 1)(b_{SA} + 1) - e^{-\sigma_A L_A} (r_A + 1)(b_{SA} - 1) + 2e^{-\beta_A L_A} (b_{SA} - r_A)]}{[e^{\sigma_A L_A} (b_{GA} + 1)(b_{SA} + 1) - e^{-\sigma_A L_A} (b_{GA} - 1)(b_{SA} - 1)]}$$

$$\text{sendo: } b_{GA} = \frac{\kappa_G a_G}{\kappa_A a_A} ; \quad b_{SA} = \frac{\kappa_S a_S}{\kappa_A a_A} ; \quad r_A = \frac{(1-i)\beta_A}{2a_A} ; \quad \sigma_A = (1+i)a_A ; \quad a = \sqrt{\frac{\omega}{2\alpha}}$$

- γ é a razão dos calores específicos.
 P_0 e T_0 , pressão e temperatura ambiente.
 κ condutividade térmica do material.
 a coeficiente de difusão térmica do material.
 σ coeficiente complexo de difusão térmica do material.
 α difusividade térmica do material
 β coeficiente de absorção ótica.

Com a equação 2.7, podemos calcular a magnitude e a fase da onda de pressão acústica produzida na célula pelo efeito fotoacústico. A equação 2.7, torna-se difícil de interpretar, porque temos uma expressão matemática um pouco complicada, mas podemos torná-la relativamente simples quando passamos a analisar a amostra como sendo opticamente transparente ou opticamente opaca, ou seja, os casos especiais da teoria fotoacústica (Rosencwaig, 1980). Da equação 2.7, definimos

$$Y = \frac{\gamma P_0 I_0}{2\sqrt{2} T_0 L_G} \quad (2.8)$$

que sempre aparece na equação 2.7 como um fator constante. Também podemos definir o coeficiente de absorção ótica como

$$L_\beta = \frac{1}{\beta}$$

1 – Sólidos opticamente transparentes ($L_\beta > L$)

Neste caso o comprimento de absorção ótica L_β é maior que o comprimento da amostra L . A luz não é completamente absorvida pela amostra, e ainda temos alguma luz transmitida através da mesma.

Caso 1a: Sólido termicamente fino. ($\mu \gg L$; $\mu > L_\beta$)

O comprimento de difusão térmica do material μ , é muito maior que o comprimento da amostra, e maior que o comprimento de absorção ótica. Fazendo, $e^{-\beta L} \approx 1 - \beta L$; $e^{\pm \sigma L} \approx 1$; $|r| > 1$, na equação 2.6, teremos:

$$\Delta P = \frac{Y}{2a_G a_S \kappa_S} (\beta - 2ab - i\beta) \approx \frac{(1-i)\beta L}{2a_G} \left(\frac{\mu_S}{\kappa_S} \right) Y \quad (2.9)$$

O sinal acústico é proporcional à βL , desde que μ_S/a_G seja proporcional à $1/\omega$, logo o sinal acústico tem uma dependência ω^{-1} . Para o caso de termicamente fino $\mu \gg L$, a propriedade térmica do material de suporte passa a influenciar o sinal da expressão de ΔP .

Caso 1b: Sólido termicamente fino. ($\mu > L$; $\mu < L_\beta$)

O comprimento de difusão térmica do material é maior que o comprimento da amostra, e menor que o comprimento de absorção ótica. Fazendo $e^{-\beta L} \approx 1 - \beta L$, $e^{\pm \sigma L} \approx (1 \pm \sigma L)$, e $|r| < 1$ na equação 2.7, teremos:

$$\Delta P = \frac{\beta L Y}{4\kappa a_G a^3 b} [(\beta^2 + 2a^2) + i(\beta^2 - 2a^2)] \approx \frac{(1-i)\beta L}{2a_G} \left(\frac{\mu_S}{\kappa_S} \right) Y \quad (2.10)$$

O sinal acústico é novamente proporcional à βL , e varia com ω^{-1} , e depende da propriedade térmica do material de suporte. A equação 2.10 é idêntica à equação 2.9.

Caso 1c: Sólido termicamente espesso. ($\mu < L$; $\mu \ll L_\beta$)

O comprimento de difusão térmica do material é menor que o comprimento da amostra, e muito menor que o comprimento de absorção ótica. Fazendo $e^{-\beta L} \approx 1 - \beta L$, $e^{-\sigma L} \approx 0$, e $|r| \ll 1$ na equação 2.7. O sinal acústico então fica:

$$\Delta P \approx -i \frac{\beta \mu}{2a_G} \left(\frac{\mu}{\kappa} \right) Y \quad (2.11)$$

Aqui o sinal é proporcional à $\beta \mu$, e não a βL . Isto é, somente a luz absorvida dentro do primeiro comprimento de difusão térmica contribui para o sinal, portanto a luz é absorvida completamente no comprimento L da amostra. Além disso, desde que $\mu < L$, a propriedade térmica do material de suporte presente na equação 2.10, é substituída pelo da amostra. A dependência de ΔP com a frequência é $\omega^{-3/2}$.

Amostras opticamente transparentes, como nos casos citados acima, demonstram uma inigualável capacidade da espectroscopia fotoacústica, em obter uma absorção de camadas (chamado usualmente como *depth profile*) dentro da amostra. Para materiais de baixa difusividade térmica esta camada pode ser pequena em torno de 0,1 μm para frequências de 10-100 kHz. Então quando diminuimos a frequência de modulação, aumentamos o comprimento da difusividade térmica e obtemos dados de regiões internas da absorção ótica do material. Em aproximadamente 5 Hz podemos obter dados na faixa de 10-100 μm para materiais com baixa difusividade térmica e de 1-10 mm para materiais com alta difusividade térmica. A capacidade de analisar a profundidade é única e abre a possibilidade em estudar camadas, materiais amorfos e em determinar espessuras de camadas finas (filme).

2 – Sólidos opticamente Opacos ($L_\beta \ll L$)

O comprimento de absorção ótica é muito menor que o comprimento da amostra. Neste caso, a maior parte da luz é absorvida dentro de uma distancia que é pequena comparada a L , e essencialmente nenhuma luz é transmitida.

Caso 2a: Sólido termicamente fino. ($\mu \gg L; \mu \gg L_\beta$)

O comprimento de difusão térmica do material é muito maior que o comprimento da amostra, e muito maior que o comprimento de absorção ótica. Fazendo $e^{-\beta L} \approx 0$; $e^{\pm \sigma L} \approx 1$ e $|r| \gg 1$, na equação 2.7, teremos:

$$\Delta P \approx \frac{(1-i)}{2a_G} \left(\frac{\mu_s}{\kappa_s} \right) Y \quad (2.12)$$

Neste caso, temos uma opacidade fotoacústica assim como uma opacidade ótica, no sentido de que o sinal acústico é independente do coeficiente de absorção ótica (β). Este é o caso para um absorvedor muito escuro como o papel carbono. O sinal é muito forte, dependendo das propriedades térmicas do material de suporte, e varia como ω^{-1} .

Caso 2b: Sólido termicamente espesso. ($\mu < L; \mu > L_\beta$)

O comprimento de difusão térmica do material é menor que o comprimento da amostra, e maior que o comprimento de absorção ótica. Fazendo $e^{-\beta L} \approx 0$; $e^{-\sigma L} \approx 0$ e $|r| > 1$, na equação 2.7, teremos:

$$\Delta P \approx \frac{Y}{2a_G a \kappa \beta} (\beta - 2a - i\beta) \approx \frac{(1-i)}{2a_G} \left(\frac{\mu}{\kappa} \right) Y \quad (2.13)$$

A equação 2.13 é análoga a equação 2.12, mas os parâmetros térmicos do suporte são substituídos pelo da amostra. Novamente o sinal acústico é independente do coeficiente de absorção ótica (β), e varia como ω^{-1} .

Caso 2c: Sólido termicamente espesso. ($\mu \ll L$; $\mu < L_\beta$)

O comprimento de difusão térmica do material é muito menor que o comprimento da amostra, e menor que o comprimento de absorção ótica. Fazendo $e^{-\beta L} \approx 0$; $e^{-\sigma L} \approx 0$ e $|r| < 1$, na equação 2.7, teremos:

$$\Delta P = \frac{-i\beta Y}{4a_G a^3 \kappa} (2a - \beta + i\beta) \approx \frac{-i\beta \mu}{2a_G} \left(\frac{\mu}{\kappa} \right) Y \quad (2.14)$$

Este é um caso muito importante e interessante. Opticamente estamos tratando com um sólido muito opaco ($\beta L \gg 1$). Assim, ainda que o sólido seja opticamente opaco, o sinal fotoacústico é proporcional ao do coeficiente de absorção ótica (β). Como no caso 1c, o sinal é também dependente das propriedades térmicas da amostra e varia como $\omega^{-3/2}$.

Os seis casos especiais podem ser resumidos em uma representação esquemática da teoria fotoacústica, como mostra a figura 2.5.

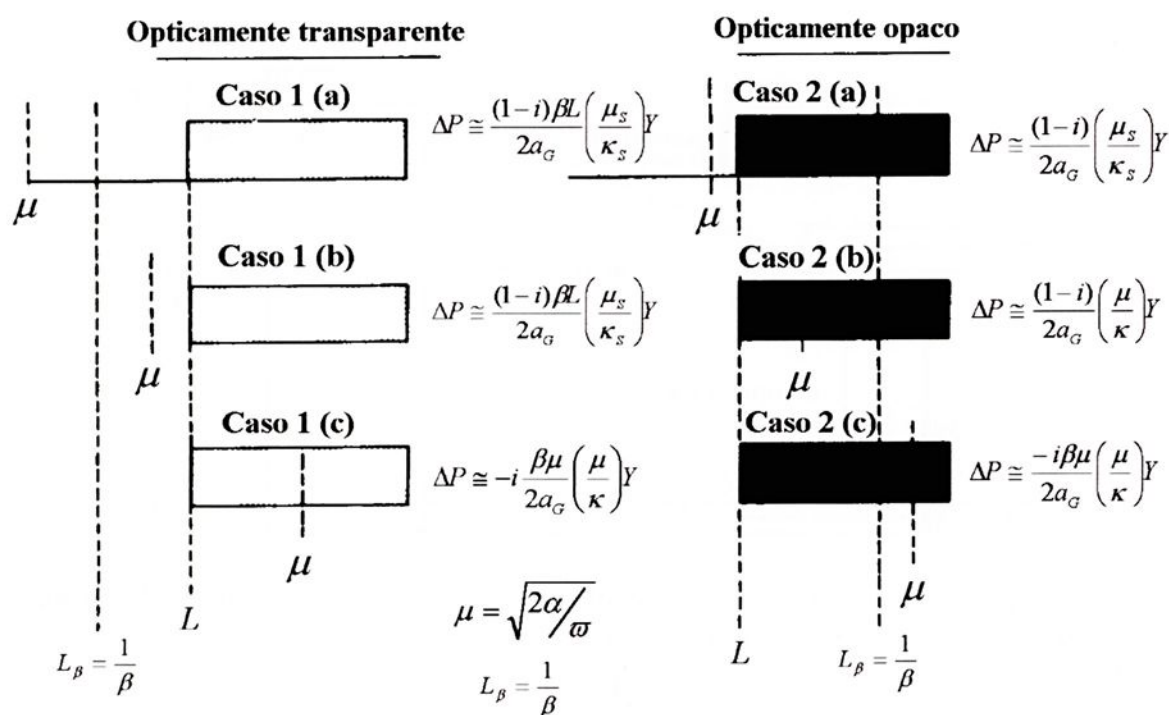


Figura 2.5: Representação esquemática dos seis casos especiais da teoria fotoacústica.

2.3 Princípios de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência baseia-se na emissão de fótons que acompanha o decaimento de um átomo ou molécula eletronicamente excitado, do primeiro estado singleto excitado para o estado fundamental. As informações relacionadas a compreensão da teoria de fluorescência foram baseadas na literatura usual da área (Cantor and Schimmel, 1980; Lakowicz, 1983). Um diagrama de energia dos estados eletrônicos usado para explicar o primeiro processo fotofísico, com os estados singleto e tripleto, é mostrado na figura 2.6. O diagrama de Jablonski, vai ilustrar de um modo geral, todos os princípios das espectroscopias utilizadas.

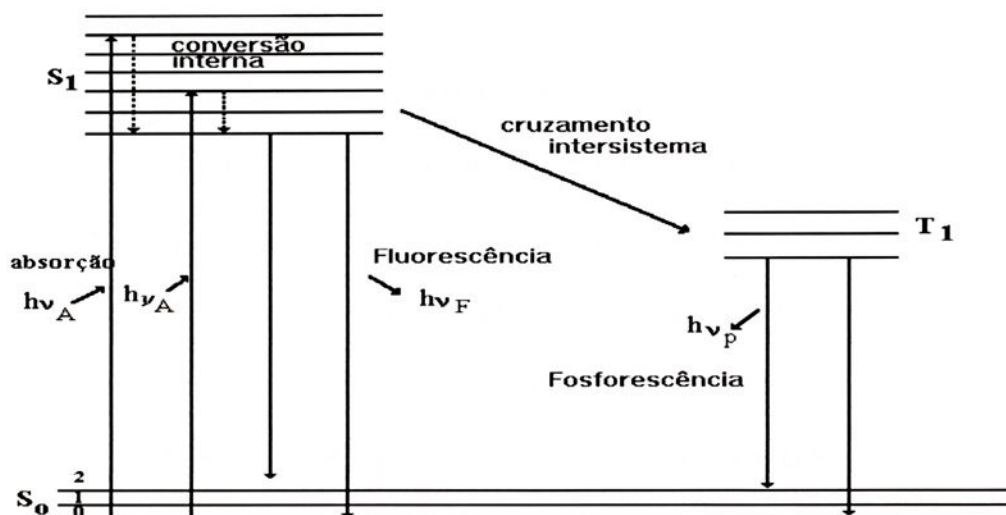


Figura 2.6: Diagrama de Jablonski, ilustrando a absorção da luz, os processos de decaimento radiativos e a conversão interna no estado excitado, onde : S_0 é o estado fundamental; S_1 o primeiro estado singlete excitado; T_1 o primeiro estado tripleto excitado e seus subníveis vibracionais.

A interação de uma molécula com a radiação eletromagnética é primeiramente uma absorção. O processo de absorção ocorre em um intervalo de tempo de $10^{-15} - 10^{-14}$ s para excitar o estado $S_1, S_2 \dots S_n$, incluindo os níveis vibracionais, que de acordo com a aproximação de Franck-Condon, este intervalo de tempo é muito pequeno para que possa ocorrer um deslocamento de núcleos atômicos durante a absorção. Dos altos estados singletos excitado $S_2, \dots S_n$ para decaírem ao estado S_1 , o processo ocorre entre $10^{-13} - 10^{-12}$ s. A energia previamente armazenada em $S_1, \dots S_n$ é convertida em calor pelo processo de relaxação vibracional, ou seja, a conversão interna. O tempo de vida de fluorescência, que é o intervalo de tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado, tem valores típicos ocorrendo em 10^{-8} e 10^{-9} s, isto porque os elétrons do estado singlete excitado e do estado fundamental possuem spins anti-paralelos, que é a transição permitida. Assim a conversão interna é completada antes da emissão fluorescente. Neste intervalo de tempo, pode ocorrer uma grande variedade de processos moleculares que podem ter influência sobre o tempo de vida, afetando as características espectrais do

fluoróforo, tais como: reações de protonações e desprotonações, relaxação do solvente, mudanças locais de conformação e quaisquer processos de translação ou rotação (que são melhores vistos na faixa de milisegundos). Como a emissão fluorescente resulta geralmente do nível vibracional mais baixo do primeiro estado singlete excitado, teremos uma perda de energia por conversão interna, assim o fluoróforo sempre irá emitir a um comprimento de onda maior do que o de excitação, o chamado deslocamento de Stokes, que também é influenciado pelas perdas dos decaimentos dos níveis vibracionais de S_0 e também pela ação do solvente sobre o fluoróforo. A forma espectral de fluorescência pode variar dependendo da estrutura química do fluoróforo e do meio que o envolve.

As moléculas no estado S_1 podem ainda sofrer conversão para o primeiro estado tripleto T_1 , conhecido como o cruzamento intersistemas, por causa dos elétrons não estarem pareados, ou seja, seus *spins* possuem a mesma orientação. A transição do estado tripleto para o estado fundamental é proibida pela regra de seleção de Pauli, para isto acontecer os *spins* dos elétrons precisam ser invertidos, resultando em uma taxa muito pequena em relação a taxa de fluorescência.

Uma forma de se relacionar as taxas de decaimento radiativos e não radiativos de um processo de absorção é através do rendimento quântico. Assim o rendimento quântico é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos.



2.3.1 Fluorescência Resolvida no Tempo com Frequência Modulada

A metodologia e desenvolvimento da fluorometria de pulso e fluorometria de fase e modulação, estão detalhadas na literatura (Gratton and Limkeman, 1983; Chen *et al.*, 1987; Lakovicz, 1991).

Quando uma molécula emite fluorescência, contém informações espectrais desta molécula e do tempo de vida simultaneamente. A espectroscopia resolvida no tempo é uma ótima ferramenta de investigação em bioquímica, biofísica e físico-química. A técnica proporciona vantagens significativas no entendimento da estrutura e da dinâmica de macromoléculas biológicas. Nos últimos anos, o uso do método da modulação da fase de fluorescência, proporcionou uma rápida e precisa determinação do tempo de vida, que é uma das vantagens da técnica comparada com o método pulsado. Porém, requer várias frequências de modulações para se obter a mesma informação obtida em uma amostragem do sinal de decaimento.

Assim temos dois métodos pelo qual podemos medir tempos de vida de fluorescência: a fluorimetria de pulso, que tem suas medidas realizadas no domínio do tempo; e a fluorimetria de fase e modulação, que são relacionados ao domínio da frequência. O princípio básico da fluorimetria de pulso consiste em uma amostra sendo excitada por um rápido pulso de luz ou raio *laser*, e coletado o seu decaimento por um contador de fóton. A fluorimetria de fase e modulação incorpora uma fonte de excitação modulada, que causa na amostra uma forma de onda da emissão de fluorescência deslocada em fase e com uma diferença na amplitude em relação a onda de excitação, que podemos relacionar com a fase um fator de modulação.



$$\tan \phi = \omega \tau_s \quad (2.15)$$

$$m = \frac{M_F}{M_E} = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega \tau_s)^2}} \quad (2.16)$$

sendo, M_F a modulação da fluorescência, M_E a modulação da excitação, ϕ a modulação de fase, τ_s tempo de vida do estado singlete, e ω a frequência angular de modulação.

A fluoremetria de fase e modulação, geralmente usa uma excitação eletro-óptica para modular uma onda contínua da fonte de excitação (lâmpada ou raio *laser*). Mudanças de fase e o fator de modulação podem ser determinados usando uma correlação cruzada entre ambos.

2.3.2 Princípio da Correlação Cruzada

Quando temos uma sonda fluorescente excitada por uma fonte de luz senoidal e modulada, e com uma frequência angular $\omega = 2\pi f$, a fluorescência emitida terá a mesma frequência de modulação da excitação, mas com uma mudança na fase em relação a fonte de excitação. A mudança de fase ϕ , e o fator de modulação m , são relacionados ao tempo de vida τ de fluorescência do estado excitado. A frequência angular ω é da ordem de $1/\tau_s$.

A intensidade de luz emitida pode ser descrita como:

$$F(t) = F_0[1 + M_F \cos(\omega t + \phi)] \quad (2.17)$$

onde, F_0 é a média da intensidade de fluorescência. O método da correlação cruzada consiste em multiplicar a função emitida por um sinal senoidal, a frequência ω_c , é um pouco diferente de ω .

$$C(t) = C_0[1 + M_c \cos(\omega_c t + \phi_c)] \quad (2.18)$$

assim, o sinal resultante vai gerar uma nova função,

$$V(t) = F_0 C_0 [1 + M_F \cos(\omega t + \phi) + M_c \cos(\omega_c t + \phi_c) + M_F M_c \cos(\omega t + \phi) \cos(\omega_c t + \phi_c)] \quad (2.19)$$

o último termo da equação 2.19 pode ser rescrito, usando uma relação trigonométrica,

$$\frac{M_F M_c}{2} = [\cos(\Delta\omega t + \Delta\phi) + \cos(\omega_c t + \omega t + \phi + \phi_c)] \quad (2.20)$$

onde, $\Delta\omega = \omega_c - \omega$ e $\Delta\phi = \phi_c - \phi$. Se ω_c é muito próximo a ω ($\omega_c \approx \omega \Rightarrow \Delta\omega \approx 0$), então temos que a equação 2.19 contém um termo constante, mais um termo de frequência ω , mais um termo de frequência 2ω , mais um termo de frequência $\Delta\omega$. O termo de frequência $\Delta\omega$ contém todas as informações da fase e modulação do sinal original de fluorescência.

O sinal para modular a fonte de luz e a fotomultiplicadora são gerados por dois sintetizadores de frequência. Os dois sintetizadores possuem uma faixa de frequência na qual podem gerar a capacidade de resolução do tempo de vida, que pode chegar a picosegundos. O ruído decorrente da fase, que é o único parâmetro importante nesta configuração de sistema, deve ser minimizado ao máximo, e para isto, devemos determinar um erro mínimo na estatística de aquisição de sinal.

2.4 FTIR

A espectroscopia no infravermelho está baseada nas transições dos estados vibracionais. Quando a radiação eletromagnética na região do infravermelho é absorvida

por uma molécula, os seus átomos possuem vários modos de vibrações como por exemplo o estiramento e o dobramento, devido a mudança do momento de dipolo da molécula, como mostrado na figura 2.7. O FTIR ao contrário de outras técnicas, pode monitorar a absorção de todas as ligações de uma biomolécula, e com a vantagem de não precisar de uma sonda para interagir com a biomolécula, ou seja, uma técnica não invasiva. Em uma molécula temos várias ligações químicas, que ao serem irradiadas com uma radiação eletromagnética na região do infravermelho tem uma vibração associada para cada ligação.

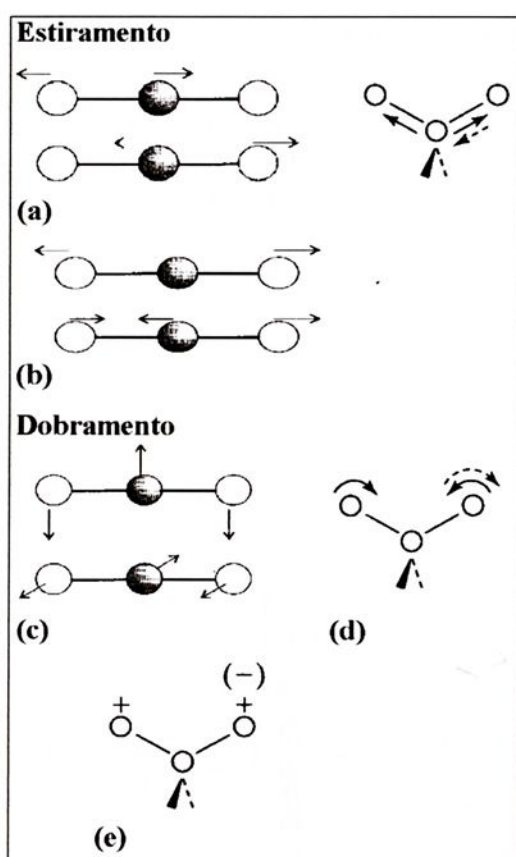


Figura 2.7: Ilustração das vibrações de estiramento e dobramento de átomos linear e não linear. (a) modos de estiramento, (b) estiramentos simétrico e não simétrico, (c) dobramento perpendicular, (d) dobramento no plano, (e) dobramento fora do plano.

A espectroscopia no infravermelho consiste de uma radiação na região do infravermelho passando através da amostra. Parte desta radiação é absorvida pela amostra e parte é

transmitida. O espectro resultante pode ser expresso em termos da absorção ou da transmissão, criando a impressão digital molecular da amostra.

O espectrômetro FTIR não usa um monocromador mas sim um interferômetro. O uso do interferômetro de Michelson que gera um interferograma, possibilita medidas rápidas e simultâneas de todas as frequências de vibrações de uma amostra. Assim com um espectro de frequências definidas, a decodificação deste espectro passou a ser feito com uma ferramenta matemática chamada de Transformada de Fourier, tornando assim a união da espectroscopia no infravermelho com a Transformada de Fourier (FTIR).

A figura 2.8 mostra de uma maneira simplificada o FTIR. Após o número de ondas chegar ao detetor, este leva o sinal ao computador, que já transforma este sinal em um espectro de FTIR. A figura 2.9 ilustra o método de transmissão com uma amostra depositada em um cartão. Este cartão tem em sua parte central por onde passa o feixe de infravermelho, uma circunferência na qual temos o filme. Este filme pode ser de qualquer material como por exemplo: plásticos, óleos e também de DNA e proteínas.

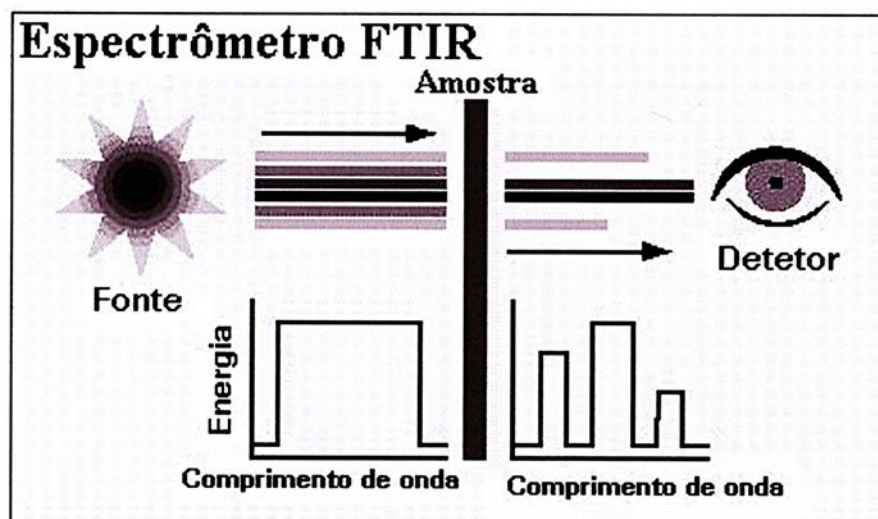


Figura 2.8: Ilustração simplificado de um espectrômetro de infravermelho, com a fonte, a amostra e o detetor.

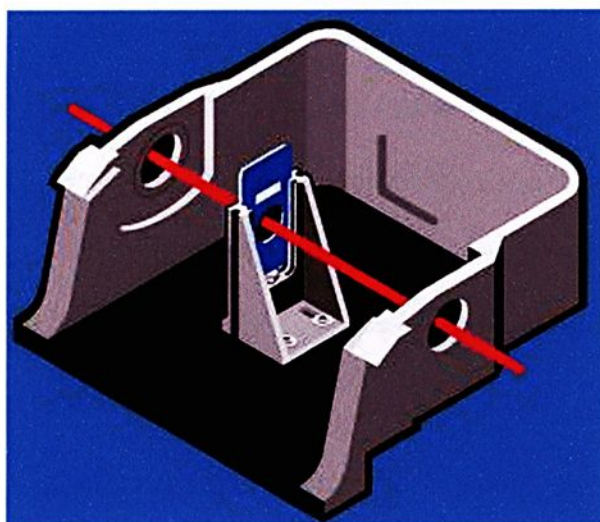


Figura 2.9: Ilustração do método de transmitância no infravermelho com cartão.

Em cada espectro de infravermelho de uma amostra temos regiões na qual a contribuição de H_2O e CO_2 são bem características, como mostra a figura 2.10. Quando a transmitância de uma amostra de proteína é feita em solução aquosa esta banda aparece justamente na região da banda de maior interesse, que são as bandas das amidas, que estão relacionadas as vibrações dos peptídios que fornece informações da estruturas secundárias de polipeptídios e das proteínas.

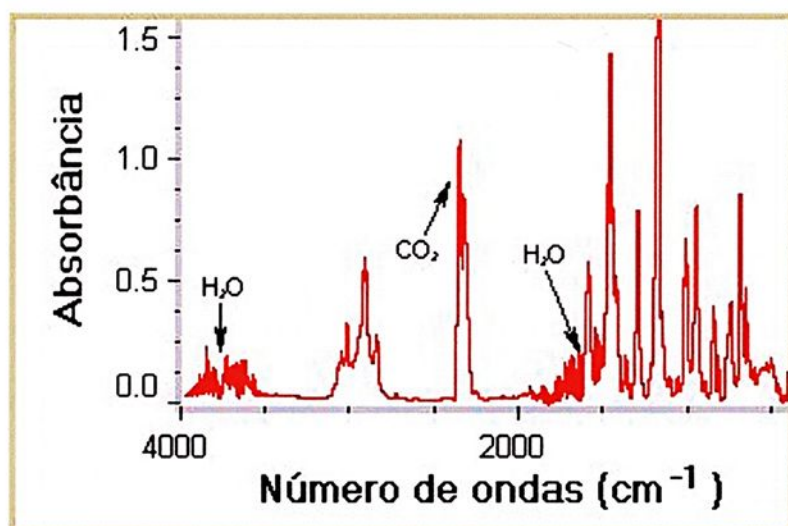


Figura 2.10: Espectro de infravermelho de uma amostra qualquer, mostrando as bandas de absorção características de H_2O e CO_2 .

Para minimizar a contribuição da água no espectro, geralmente temos que diminuir ao máximo o caminho ótico da amostra ($\sim 6 \mu\text{m}$) e uma quantidade da amostra entre 10 a 100 mg/ml de proteína se faz necessário. Em seguida temos que fazer um espectro somente da água (tampão) para ser subtraído digitalmente do espectro da amostra. Assim temos um espectro que representa somente as vibrações moleculares da proteína. Esta relação também é válida para o estudo do DNA.

Como a espectroscopia FTIR monitora a absorção de todas as ligações da biomolécula, e não necessita de sondas adicionais como outras técnicas, para interagir com a amostra, isto garante que a mudança vibracional em um espectro de infravermelho está relacionado somente com a interação da amostra em relação ao processo em estudo.

Um hidrogênio ligado em uma biomolécula pode mudar a frequência característica dos grupos vibracionais (van Holde *et al.*, 1998), conforme está ilustrado na figura 2.11, podemos notar as mudanças nas frequências das bandas de vibrações ocasionadas pela ligação do hidrogênio. A figura 2.11 mostra algumas bandas típicas de absorção no infravermelho em moléculas biológicas, as quais estão associadas a proteínas como também ao DNA. O FTIR é portanto particularmente uma valiosa ferramenta na análise das ligações de hidrogênio das bases do DNA. Bandas de vibração na região entre $3700 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ e também em $1750 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ são indicativos de uma ligação de hidrogênio.

A análise mais usada em estudos de estruturas de proteínas são as amidas I e II (região de vibração entre $1720 - 1480 \text{ cm}^{-1}$) e a amida III (região em torno de 1300 cm^{-1}). A amida I surge principalmente da vibração do estiramento da ligação $C=O$, já a amida II é primeiramente uma vibração do dobramento da ligação $N-H$ com a contribuição da vibração de estiramento de $C-N$.

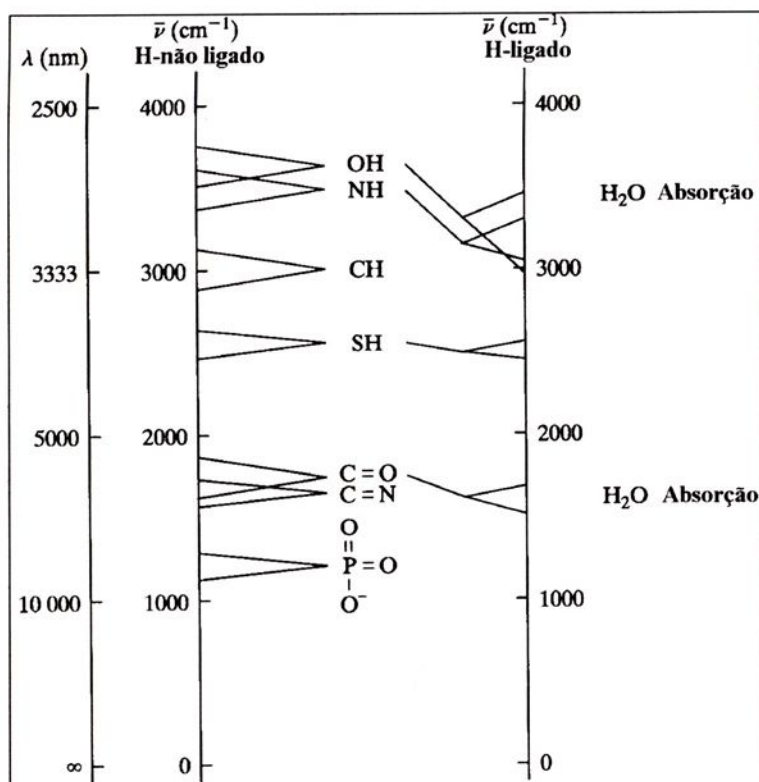


Figura 2.11: Algumas bandas típicas de absorção no infravermelho em moléculas biológicas.

Portanto o espectro de FTIR caracteriza a amostra em questão, já que temos grupos vibracionais de ligações muito semelhantes tanto em proteínas quanto em DNA. Apesar de termos uma distinção na análise entre DNA e proteínas fundamentadas na literatura para cada caso, tornando assim uma análise independente para cada tipo de amostra.

Materiais e Métodos



CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Amostras

As amostras de Brometo de Etídio (Eb) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), Sonicated Calf Thymus DNA (ct-DNA) (Amesham Pharmacia Biotech, USA), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Amesham Pharmacia Biotech, USA) Triton X-100 (Amesham Pharmacia Biotech, USA), CHAPS (Amesham Pharmacia Biotech, USA), foram usadas como recebidas dos fabricantes. As amostras foram preparadas em tampão com 25 mM de Tris-HCl (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7,0 com NaBr (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). O coeficiente de extinção molar usado para calcular a concentração do etídio foi de $5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 480 nm. O coeficiente de extinção molar usado para calcular a concentração do DNA foi de $12850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 260 nm. A relação das absorvâncias em A_{260} / A_{280} obteve um valor de 1,93, que mostra um DNA sem contaminação por proteína. Nos experimentos de fluorescência resolvida no tempo, a concentração do etídio foi mantida em $19,8 \text{ } \mu\text{M}$ e o DNA variou de $8,36 \text{ } \mu\text{M}$ a $56,8 \text{ } \mu\text{M}$, obtendo uma razão molar DNA:Eb entre 0,42 e 2,87. A concentração do etídio

foi ajustada para uma intensidade de absorbância em 0,1. A concentração de NaBr variou de 10 mM a 116,85 mM. Para os experimentos PAS na determinação do tempo de vida do estado tripleto, a concentração do etídio foi mantida em 1,65 mM e o DNA variou de 0,84 mM a 9,1 mM, obtendo uma razão molar DNA:Eb entre 0,5 e 5. Nos experimento de titulação com PAS, a concentração de etídio foi fixada em 2,0 mM, enquanto que a concentração de DNA variou de 0 a 11,06 mM, obtendo uma razão molar DNA:Eb entre 0 e 5,53. A titulação de SDS variou de uma concentração de 0 a 30,98 mM. A titulação de CHAPS variou de uma concentração de 0 a 18 mM. A titulação de Triton X-100 variou de uma concentração de 0 a 1,5 mM. Para os experimentos de FTIR, o etídio foi mantido em 400 μ M e o DNA em 400 μ M e 2 mM, obtendo uma razão molar DNA:Eb de 1 e 5.

Todos os experimentos PAS para os tempos de vidas do estado tripleto foram repetidos em triplicatas e um valor médio foi obtido, com as estimadas barras de erros. Para os experimentos PAS com a titulação de equilíbrio do DNA ao Eb foram repetidas em triplicatas, com a reprodução dos dados. Foram usadas microseringas Hamilton (Hamilton Company, Nevada, USA) em todas as titulações para garantir a minimização dos erros em relação a concentração. O volume da amostra sempre foi mantido constante em todos os experimentos PAS, com as correções das concentrações em relação ao volume em cada titulação. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente de 25 °C.

3.2 Fluorescência Estática

Os experimentos dos espectros de emissão foram realizados no espectrofluorímetro SLM-AMINCO 8100 (SLM-Aminco Inc., Urbana, IL) e no espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Japão), o comprimento de onda de excitação do



brometo de etídio foi de 480 nm, a velocidade de varredura do espectro foi de 360 nm/min, a largura de banda do monocromador de emissão e excitação de 8 nm. O caminho óptico foi de 1cm.

3.3 Fluorescência Resolvida no Tempo

As medidas realizadas de fluorescência resolvida no tempo foram obtidas com o K2 ISS *phase/modulation frequency-domain fluorimeter*. Este fluorímetro é equipado com uma lâmpada de xenônio de 300 Watts. As amostras foram excitadas com um monocromador em 480 nm, abertura da fenda de 8 nm e selecionadas com um filtro de 550 nm. A densidade ótica das amostras foi mantida em 0,1. A luz foi modulada numa frequência de 1 - 150 MHz. Foi usado um espalhador de tempo zero (glicogênio, com densidade ótica de 0,23) para determinar o tempo de vida do brometo de etídio livre. O dados coletados foram analisados com ISS *software*. Para cada frequência usada, os dados foram coletados e analisados usando um desvio padrão de 0,05 % para a fase (τ_p), e de 0,004 % para a modulação (τ_m). Em cada caso, o parâmetro de melhor ajuste foi obtido minimizando o valor do χ^2 reduzido (mínimo quadrado não linear), assumindo a existência de um ou dois tempos de vida.

3.4 FTIR

Os dados de FTIR do complexo DNA-Eb com a titulação de NaBr foram obtidos com o espectrômetro da Nicolet Nexus 670 FTIR (Nicolet Instrument Co, Madison, WI, USA)



equipado com detetor de DTGS-KBr, *Beamsplitter* e janelas de KBr. Uma amostra de 30 μl retirada da solução estoque foi colocada em um cartão de transmitância com uma tela (*IR screen cell sampling card* - Janos Technology Inc., Townshend, VT, USA), figura 3.1, e mantidos por 3 horas em um ambiente fechado com sílica gel. Este processo resulta em um filme fino da amostra do complexo DNA-Eb. Foi feito um espectro de absorbância da amostra em solução e comparado com o espectro da amostra do filme após ser dissolvida em meio aquoso. Estes espectros foram praticamente idênticos, comprovando que o DNA não está desnaturado quando está no filme. A água é um forte absorvedor da radiação no infravermelho, logo necessita-se minimizar o máximo possível o caminho ótico de amostras em meio aquoso. O compartimento da amostra do FTIR foi purgado continuamente com nitrogênio para eliminar o vapor de água e CO_2 . O espectro do tampão foi obtido nas mesmas condições das amostras, e subtraído digitalmente do espectro da amostra. Todos os espectros de FTIR foram coletados com uma resolução de 4 cm^{-1} . O número de aquisições depende da concentração da amostra, assim para uma concentração de 400 μM de DNA, 128 aquisições foram suficientes para obtermos um bom espectro, em relação ao sinal-ruído.

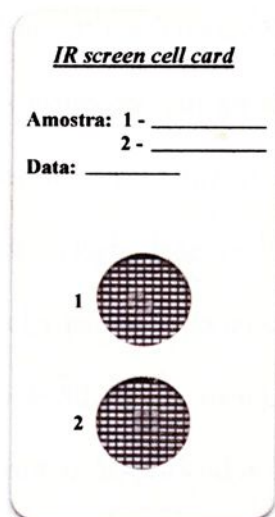


Figura 3.1: Cartão de transmitância com tela (*IR screen cell sampling card*).

3.5 Construção do Espectrômetro Fotoacústico

O espectrômetro fotoacústico construído, com seu diagrama de bloco mostrado na figura 3.2, foi elaborado de acordo com dados da literatura (Rosencwaig, 1980; Garty *et al.*, 1982; Murphy *et al.*, 1990; Narayanan *et al.*, 1997; Kurian *et al.*, 1997). A fonte de alimentação (Modelo 68811, Oriel Instruments, Stratford, U.S.A), alimenta uma lâmpada de xenônio (Modelo 6259, Oriel Instruments, Stratford, U.S.A). Esta fonte de luz branca possui uma lâmpada de 300 watts (Modelo 66011, Oriel Instruments, Stratford, U.S.A), que produz uma radiação nas regiões espectrais do ultravioleta próximo, visível e infravermelho próximo. A luz é colimada por uma lente na fenda de entrada do monocromador (Model 77200, Oriel Instruments, Stratford, U.S.A). O monocromador libera uma luz monocromática de comprimento de onda definido pela rede de difração, no visível. A luz após passar pelo monocromador é focada com uma lente de quartzo na fibra óptica (Modelo 77565, Oriel Instruments, Stratford, U.S.A). O feixe monocromático é então modulado mecanicamente (Modelo SR540 chopper controller, Stanford Research Systems, California, U.S.A). A fibra ótica conduz a luz modulada até a câmara fotoacústica. A câmara fotoacústica fornecerá um sinal, que é captado pelo microfone (Modelo 4190, Brüel & Kjaer, Naerum, Denmark), e acoplado ao pré-amplificador do microfone (Modelo 2669, Brüel & Kjaer, Naerum, Denmark). A sensibilidade do microfone é de 49,1 mV/Pa. O sinal elétrico de saída da câmara fotoacústica é levado a um pré-amplificador com ganho máximo de 50 dB (decibéis), (Modelo 5935L, Brüel & Kjaer, Naerum, Denmark), que distribui para o amplificador *Lock-in* (Modelo SR530, Stanford Research Systems, California, U.S.A) e para o osciloscópio digital (Modelo TDS 220, Tektronix Inc., Wilsonville, U.S.A).



O sinal do *Lock-in* e do osciloscópio digital é coletado pelo sistema de aquisição de dados (computador PC, Pentium 133 MHz), através da interface serial RS 232 ou da paralela GPIB (General Purpose Interface Bus). O sistema de aquisição de dados, através de *software* controla o *Lock-in*, e o monocromador através de um motor de passo (Modelo 23PM-C108, Astrosyn - Minebea Co. Ltd., Tailândia), que por sua vez movimenta a rede de difração. Este motor é controlado através do *drive do motor de passo* (Modelo Crow DC 5A, desenvolvido no laboratório). O espectro de emissão da lâmpada foi obtido através de um papel de carbono, que serve para subtrair do sinal da amostra a contribuição da lâmpada. A figura 3.3 mostra a fotografia do laboratório com todos os equipamentos montados e utilizados na aquisição e processamento dos dados da espectroscopia fotoacústica.

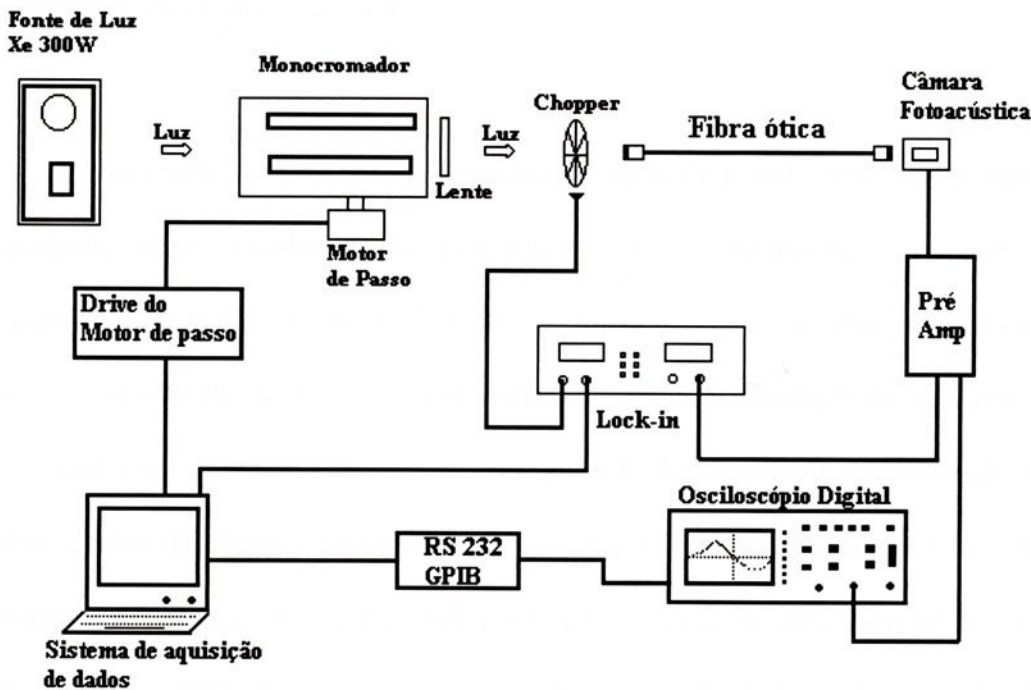


Figura 3.2: Diagrama em blocos do espectrômetro fotoacústico montado no laboratório.

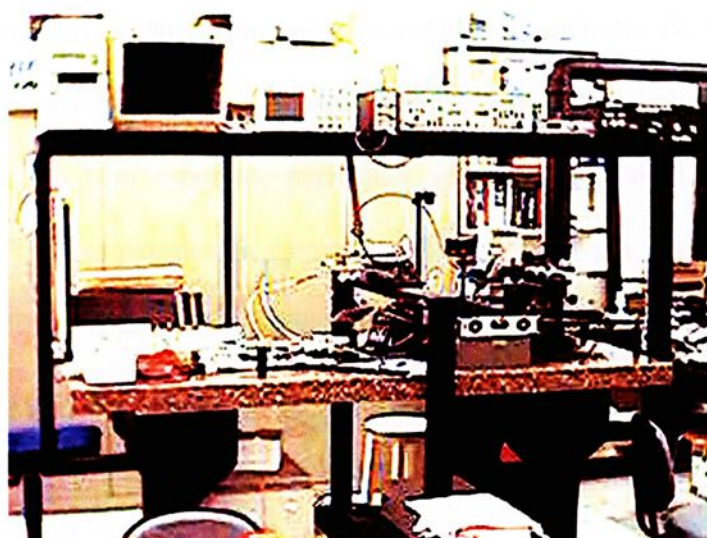


Figura 3.3: Fotografia do laboratório, com os equipamentos da espectroscopia fotoacústica.

3.6 A Câmara Fotoacústica

A construção de uma câmara fotoacústica, varia de acordo com o experimento que se pretende fazer, geralmente, é constituída por um microfone com sensibilidade apropriada para a amplitude do sinal. A câmara fotoacústica desenvolvida observa critérios já estabelecidos na literatura, como: isolamento acústico; minimização do sinal proveniente da interação com as paredes da câmara; configuração do microfone; maximização do sinal acústico dentro da câmara, com a relação $L_g > 2\mu_a$ e $r > 2L_g$ (onde r é o raio do porta amostra); e um modelo de câmara apropriado para amostra líquida (Aamodt *et al.*, 1977; Tam and Wong, 1980; Rosencwaig, 1980; Cahen, 1981; Beck, 1985; McDonald, 1986). A geometria de uma câmara fotoacústica é que determina suas principais características.

Na elaboração de uma câmara fotoacústica, devemos considerar certos aspectos, para que na sua construção possa fornecer um bom sinal fotoacústico (Rosencwaig, 1980).

Assim, um bom isolamento acústico, minimiza os ruídos provenientes do meio, já que o sinal fotoacústico é muito menor que o ruído externo. Também é conveniente que as paredes da câmara sejam bem espessas, para que minimizem o sinal proveniente da interação da radiação com as paredes da câmara, ou seja, o calor por elas absorvido, não gere um falso sinal fotoacústico. As vibrações mecânicas, oriundas de diversas fontes também devem ser consideradas. Estes problemas, são amenizados ou praticamente inexistentes quando usamos um amplificador Lock-in para a análise do sinal, pois teremos a resposta do sinal associado a frequência de modulação.

O microfone mais utilizado são os planos, pois são bastantes sensíveis e fornecem uma boa resposta em um grande intervalo de frequência, possibilitando experimentos com diferentes frequências de modulação. O microfone deve ser posicionado o mais próximo possível da amostra.

Nas paredes internas da câmara, geralmente se usa alumínio ou aço inoxidável, polidos. O material do porta amostra deve ser um péssimo condutor de calor, e que geralmente é feito em acrílico.

Em uma câmara fotoacústica, o sinal varia inversamente com o volume, assim o volume interno da câmara deve ser o menor possível. No entanto, deve-se tomar cuidado para não minimizar este volume até o ponto, em que o sinal acústico produzido na amostra, sofra uma dissipação nas paredes da câmara, antes de chegar ao microfone (Rosencwaig, 1980).



3.6.1 Modelo da Câmara Fotoacústica Utilizada

Tomando como base os dados fornecidos pela literatura citada acima, chegamos a um protótipo, conforme está ilustrado na figura 3.4. A câmara apresenta duas partes: uma onde se localiza o microfone e o pré-amplificador; a outra, que é acoplada na parte do microfone, onde está localizada a câmara fotoacústica. A câmara fotoacústica foi projetada para que o *porta amostra* seja adequado a vários tipos de experimentos, bastando para isto somente trocá-lo.

O corpo da câmara, onde se localiza o microfone, foi feito de alumínio, e possui uma forma cilíndrica, onde o microfone é alojado e fixado com anéis (*O-ring*).

A câmara fotoacústica com uma forma cilíndrica, foi feito em um bloco quadrado de aço inox. A parte interna da câmara possui um furo vazado dos dois lados de 16mm, para a *janela* e para o *porta amostra*. O volume sensível da câmara fotoacústica fica entre a *janela* e o *porta amostra*. Ela possui um duto com 1,0 mm de diâmetro, permitindo a ligação ao microfone, que se encontra na outra parte da câmara.

A janela superior da câmara, feito em metal de latão, possui uma abertura central do diâmetro da fibra ótica, e roscas milimétricas na parte externa. O material usado na janela de passagem da luz é o quartzo, que não absorve na região que estamos trabalhando com as amostras.

O *porta amostra*, localizado na parte inferior da câmara, é feito de acrílico, de modo que a transmissão de calor que pode ocorrer da amostra não gere sinal fotoacústico. O *porta amostra* também permite um amplo ajuste de formas e tamanhos para diversos tipos de experimentos, bastando para isto manter a forma cilíndrica da parte em contato com a câmara e manipular o restante de acordo com o experimento. No espaço oposto ao



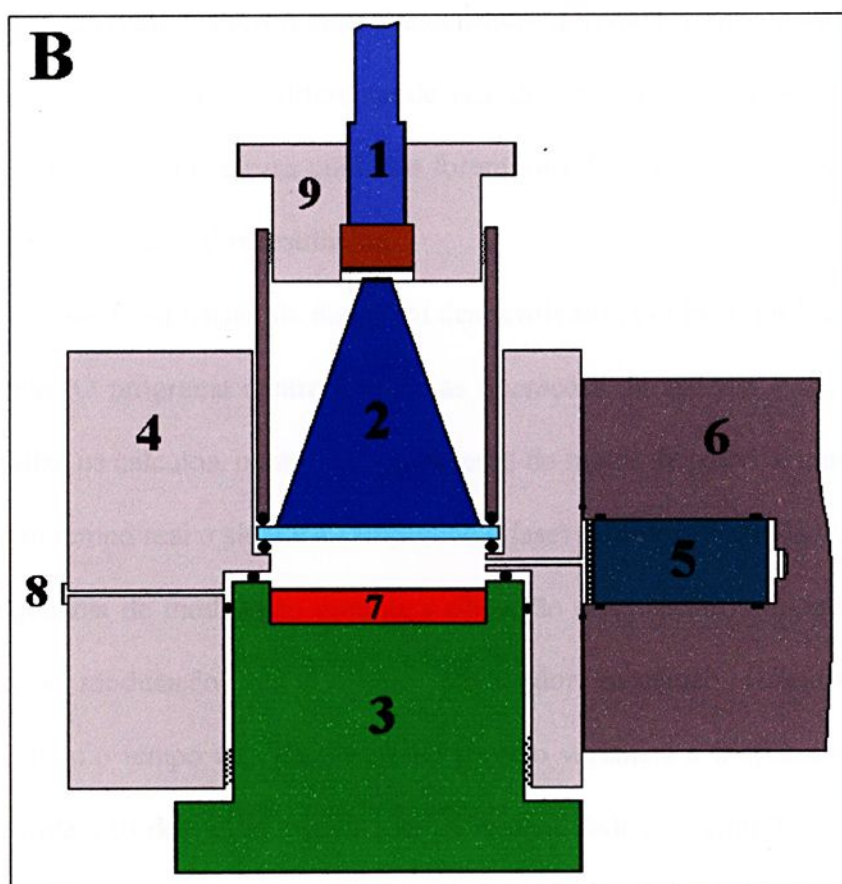
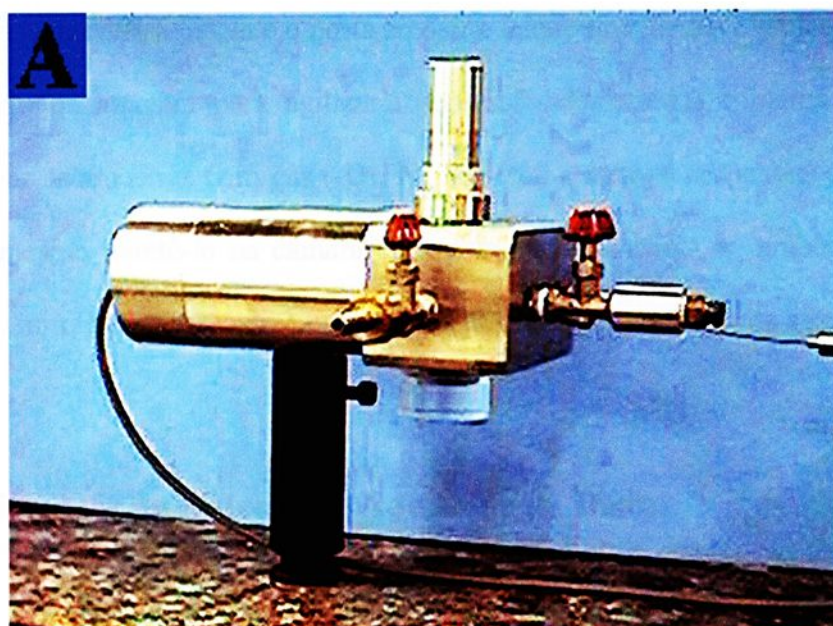


Figura 3.4: A câmara fotoacústica desenvolvida. (A) Fotografia, e (B) desenho em corte perpendicular. 1 – fibra ótica; 2 – feixe de luz e janela de quartzo; 3 – porta amostra; 4 – corpo em aço inox da câmara; 5 – microfone; 6 – corpo em alumínio do microfone; 7 – amostra; 8 – entrada de gás para o compartimento da amostra; 9 – fixador e ajustador da fibra ótica.

duto do microfone entre a janela e o porta amostra, temos as entradas e saídas de gás para o compartimento da amostra para agilizar a supressão dos estados tripletos. Esta entrada permite purgar as amostras com gás (O_2 , N_2 , Ar, etc...), através da passagem do gás pela amostra ou mesmo mantê-lo na câmara com uma pressão baixa, e também fazer baixo vácuo (~ 600 mm Hg) nas amostras para termos um efeito de remoção de gás da amostra.

3.6.2 Parâmetros do Sistema de Aquisição de Dados

Para que se possa analisar o sinal fotoacústico, devemos conhecer parâmetros como a composição em frequência e a diferença de fase do sinal em relação ao pulso de luz de excitação da amostra, assim alguns cuidados foram tomados durante os experimentos para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

O programa de aquisição de dados foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Washington Luiz de Barros Melo. O programa controla todas as operações do sistema PAS, como: ler os sinais PA, realiza os cálculos, controla o movimento do motor de passo, e mostra na tela do computador em tempo real o sinal PA (amplitude e fase) da amostra estudada.

A frequência de modulação durante a obtenção dos espectros fotoacústicos foram obtidos com a modulação da luz pelo modulador mecânico (*Chopper*). Para os experimentos com o tempo de vida do estado tripleto variamos a frequência de 10 – 400 Hz, e para a obtenção dos espectros fotoacústicos associados ao equilíbrio de ligação do complexo DNA-Eb a frequência de modulação foi mantida em 10 Hz para que a quantidade de luz incidente fosse constante. Para cada ponto de aquisição mantemos uma média de 30 pontos.

Para verificar a resolução espectral da câmara, coletamos vários espectros, onde variamos a abertura da fenda de entrada e da saída do monocromador. Mantemos o ganho do pré-amplificador em 50 dB, e a abertura da fenda entre 1,5 mm à 3,1 mm, o que corresponde a uma resolução espectral entre 5 à 10 nm, na qual forneceu um sinal fotoacústico em torno de 60 à 70 mV em papel carbono na frequência de modulação de 10 Hz em 480 nm.

A contribuição do espectro da lâmpada geralmente é corrigido no espectro da amostra com o uso do espectro de corpo negro, que geralmente é usado o papel carbono, mas que em amostras líquidas usamos uma solução aquosa com tinta de nanquim. O espectro deste corpo negro (tinta de nanquim) corresponde a combinação da lâmpada e do monocromador, que serve como uma linha de base do sistema e é normalizado em relação a cada amostra, e subtraído do sinal da amostra.

Nos experimentos PAS o volume de gás na câmara fotoacústica é de 1 cm³, e um volume de 200 µl de amostra no porta amostra, totaliza uma espessura de 2 mm. Nos experimentos para determinar o tempo de vida do estado tripleto, primeiramente conectamos por 10 minutos uma bomba de baixo vácuo ao compartimento da câmara com a amostra, em seguida o gás N₂ foi purgado no compartimento por mais 10 minutos, e logo após a medida foi realizada. Novamente o vácuo foi realizado ao compartimento da câmara por mais 10 minutos e purgado com o gás O₂ no compartimento por mais 10 minutos, e logo após realizada a medida. Cada resultado apresentado é uma média de três conjuntos de medidas em cada razão molar, e para cada força iônica.

Para evitar a possível degradação do DNA e do intercalante pela luz, foi construído um mecanismo para impedir que a luz impingisse a amostra durante o processo de vácuo e quando a amostra está sendo purgada com o gás.



Resultados e Discussões

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro passo em direção a obter os dados fotoacústicos foi montar o espectrômetro fotoacústico. Todas as partes que originalmente estavam separadas foram organizadas e agrupadas com a finalidade de otimizar a operação do sistema. Assim, as partes eletrônicas de interfaceamento e o *driver* de controle foram as primeiras partes elaboradas e montadas, mostradas no Apêndice A. Como a parte principal de um sistema fotoacústico é a câmara fotoacústica, a qual determina a qualidade e a resolução dos dados, foi a que necessitou mais empenho no decorrer do projeto. Elaboramos 4 protótipos até chegarmos numa câmara que apresentou uma ótima resposta em amostras biológicas em soluções aquosa.

Após a padronização do equipamento fotoacústico com os vários teste feitos com a câmara fotoacústica em relação a geometria e a concentração da amostra, partimos para as medidas das propriedades fotofísicas do complexo DNA-Eb. Estes resultados com o tempo de vida do estado tripleto do etídio livre e intercalado ao DNA em quatro condições de força iônica foi comparado aos dados de fluorescência resolvida no tempo.



Os dados associado ao equilíbrio de ligação do complexo DNA-Eb mostraram uma evidência dos dois modo de ligação deste complexo. Com a remoção dos Eb ancorados fracamente ao longo da dupla fita do DNA pelo SDS, possibilitou descrever um modelo para esta interação. A obtenção dos resultados de rendimento quântico de fluorescência por fotoacústica mostraram dois rendimentos quânticos bem distintos, relacionados a duas maneiras de interação do Eb ao DNA.

As propriedades fotofísicas obtidas com a fluorescência resolvida no tempo e a fotoacústica do complexo DNA-Eb foram bem distintas, não apenas pelo tempo de vida observado, mas principalmente frente a titulação da força iônica, indicando a necessidade de uma janela temporal adequada para monitorar o evento. O tempo de vida do estado tripleto monitorado indicava a existência de movimentos na molécula de DNA. O uso do FTIR possibilitou identificar os grupos estruturais do DNA que estavam envolvidos nestes movimentos.

4.1 PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DO COMPLEXO DNA-Eb

4.1.1 Fluorescência Resolvida no Tempo

O tempo de vida do estado singleto encontrado para o brometo de etídio foi de 1,65 $\pm$ 0,04 ns em solução aquosa, mostrando-se em concordância com o valor encontrado na literatura que é de 1,7 ns (Burns, 1969; Atherton and Beaumont, 1993; Pal *et al.*, 1998).



A figura 4.1 mostra um dos gráficos obtido das medidas de fase e modulação com o fluorímetro K2 ISS, a linha sólida representa o ajuste calculado teoricamente, assumindo a existência de dois tempos de vida.

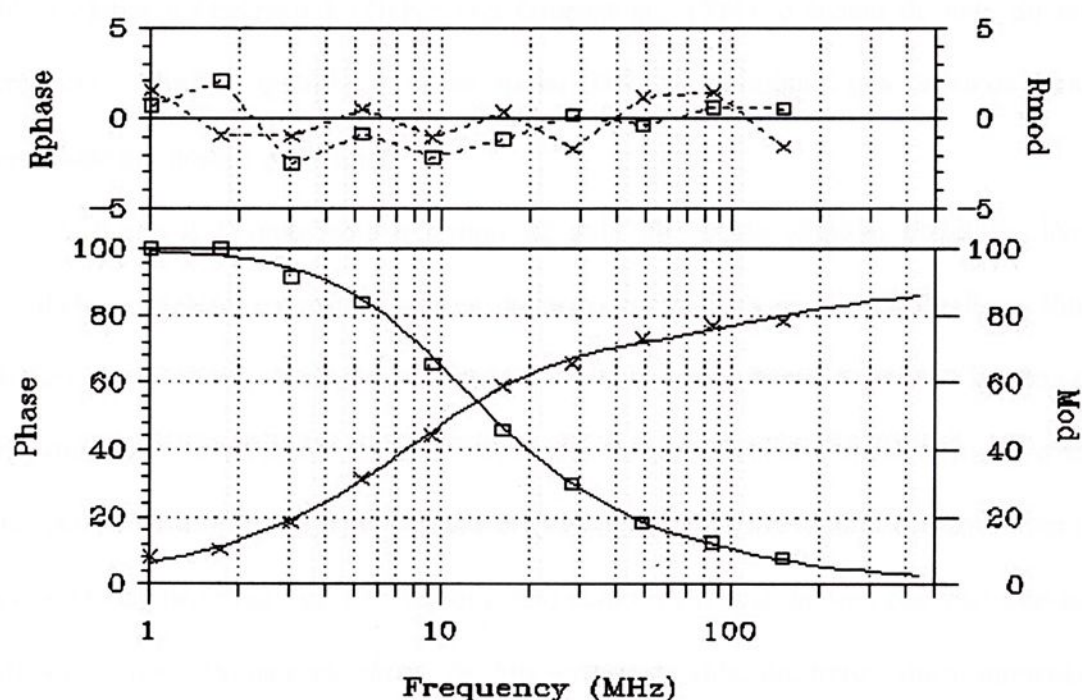


Figura 4.1: Exemplo de uma medidas de fase e modulação obtida do complexo DNA-Eb com seus respectivos resíduos. A linha sólida representa o melhor ajuste, assumindo a existência de dois tempos de vida. O x representa a fase e o $\square$ representa a modulação dos dados experimentais.

4.1.1.1 Medidas do Tempo de Vida do Estado Singlete

A dependência do tempo de decaimento do etídio em relação a razão molar DNA:Eb e a força iônica foi primeiramente estudado por Burns (Burns, 1969), mencionado por Olmstead e Kearns (Olmstead and Kearns, 1977), e demonstrado também por Atherton e Beaumont (Atherton and Beaumont, 1984). Neste ultimo estudo, a variação da intensidade de emissão de fluorescência foi atribuída a supressão do etídio ligado a um

sítio secundário. Entretanto, como também foi demonstrado por Heller e Greenstock (Heller and Greenstock, 1994), não foi detectado uma componente de tempo de vida de algum estado intermediário. No estudo de Atherton e Beaumont (Atherton and Beaumont, 1984) e Heller e Greenstock (Heller and Greenstock, 1994), o tempo de vida do etídio intercalado diminui quando a razão molar DNA:Eb diminui, nos mesmos valores encontrados em nossos experimentos.

A figura 4.2, representa o tempo de vida do estado singlete do etídio livre e intercalado ao DNA, em varias razões molares, e em duas condições de força iônica. Podemos notar duas populações distintas referindo-se ao fármaco livre e ligado, com comportamentos semelhantes nas duas condições de força iônica. Para determinar o valor do tempo de vida do Eb livre foi usado o glicogênio como referência de tempo zero. O tempo de vida encontrado de 1,65 ns foi usado como referência de uma das duas curvas de decaimento, que assumia a existência de dois tempos de vida, um livre e outro intercalado. Podemos notar que o tempo de vida do etídio intercalado independe da força iônica, e aumenta quando aumenta a razão molar, que está de acordo com a literatura (Atherton and Beaumont, 1984; Heller and Greenstock, 1994). No gráfico também podemos ressaltar que quando titulamos o DNA até uma razão de 2,8 pares de base para cada etídio em 50 mM de NaBr, temos uma diminuição no tempo de vida, chegando a zero, isto representa um cancelamento da população de etídio livre, na prática todos os etídios estão intercalados ou ligados. Esta mesma análise não foi possível para 100 mM de NaBr, porque não se chegou nesta mesma razão molar, mas que a princípio deve ter o mesmo comportamento.

A variação crescente do tempo de vida do etídio quando intercalado de 19 ns para 21 ns pode estar indicando uma terceira população de acordo com Atherton e Beaumont



(Atherton and Beaumont, 1984), que pode não estar totalmente inserida nas bases do DNA, mas ocupando de alguma maneira este espaço. Também pode estar indicando um efeito do sal sobre a conformação do DNA sem que esta janela temporal consiga discriminá-la, ou simplesmente uma dependência em relação a razão molar.

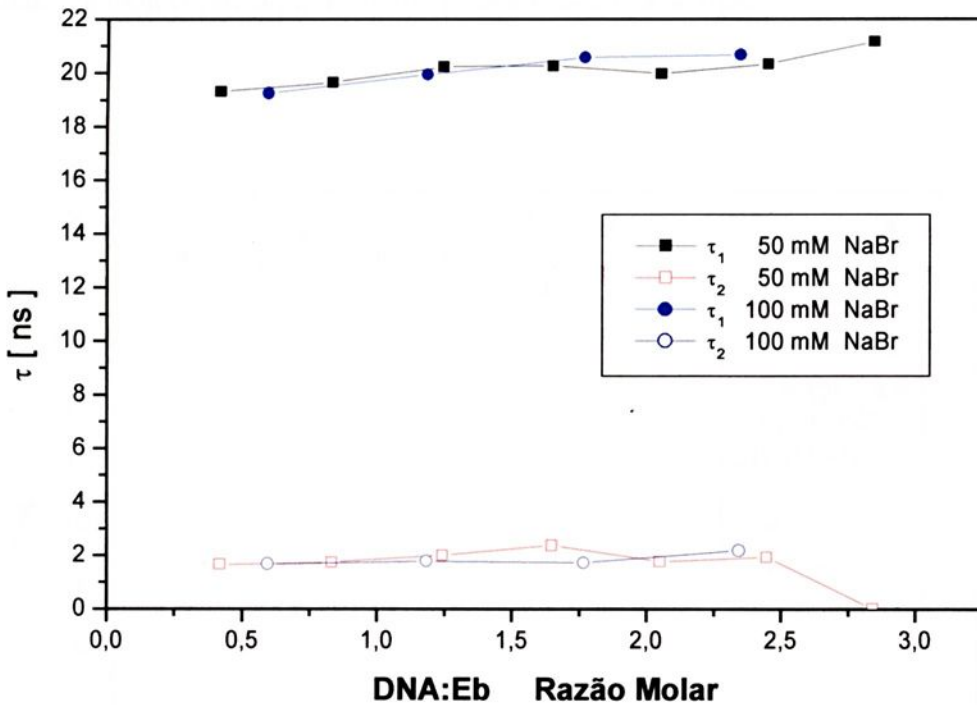


Figura 4.2: Tempo de vida do estado singleto em função da razão molar DNA:Eb, em duas condições de força iônica, 50 mM e 100 mM de NaBr.

A figura 4.3, mostra uma titulação de força iônica para uma razão molar DNA:Eb de 2,5. Podemos notar que a força iônica não acarreta mudanças nos tempos de vidas do estado singleto, mantendo as duas populações bem distintas. Variando a força iônica de 0 até atingir 150 mM de NaBr, que está dentro de uma condição fisiológica, podemos notar pelo gráfico da figura 4.3, que a força iônica não afeta o tempo de vida do estado singleto do etídio livre e intercalado. Este resultado está parcialmente de acordo com o trabalho

realizado por Byrne e de Mello (Byrne and de Mello, 1998), que sugere uma dependência do tempo de vida com a concentração da força iônica, e uma independência da razão molar. No entanto, as condições de medida realizadas por Byrne e de Mello em 50 mM, se assemelham as nossas, os tempos são equivalentes, porém a discrepância surge quando a condição da concentração salina está em 1 M, que está fora da nossa proposta, que é trabalhar em uma condição que simule as condições fisiológicas.

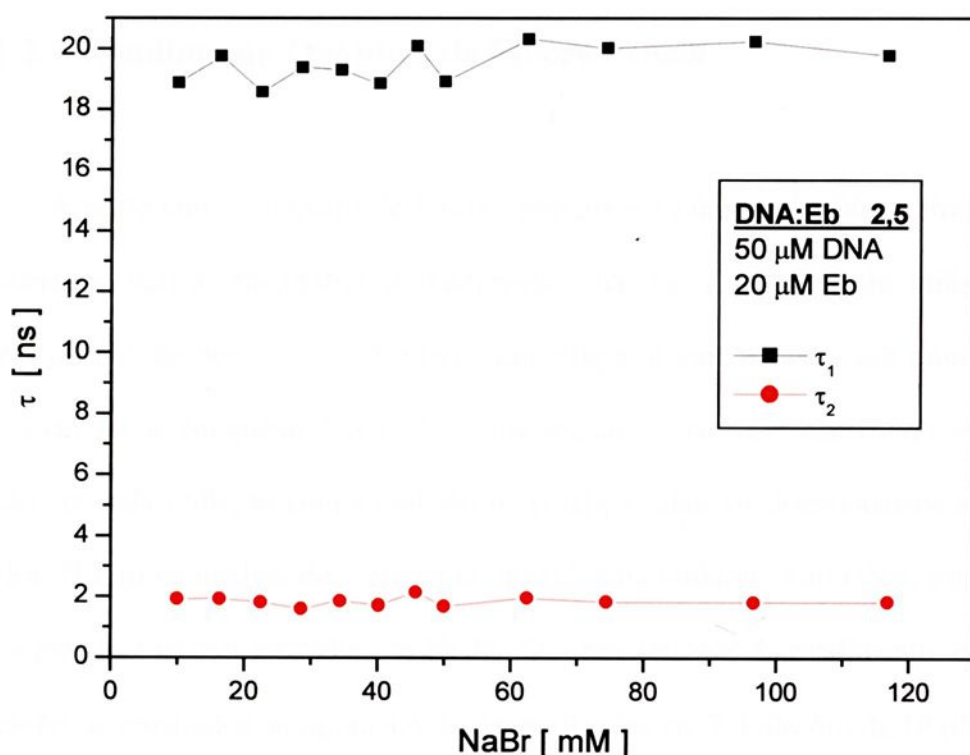


Figura 4.3: Tempo de vida do estado singlete em função da força iônica. Razão molar DNA:Eb de 2,5.

Os dados de fluorescência resolvida no tempo, aqui apresentados, foram coletados e analisados usando um desvio padrão de 0,05 % para a fase (τ_f), e de 0,004 % para a modulação (τ_m), assumindo a existência de um ou dois tempos de vida. Estudos

apresentados por Byrne e de Mello (Byrne and de Mello, 1998), introduzem mais uma componente de decaimento, quando a coleta de dados é feita com um desvio padrão maior. O modelo de Byrne e de Mello (Byrne and de Mello, 1998) permite a existência de um termo que descreve a emissão de fluorescência do etídio ligado a um sítio secundário ao longo do esqueleto do DNA. A variação da amplitude do sinal de fluorescência com baixa precisão estatística, com duas componentes de decaimento longo, pode ser interpretada como uma mudança no decaimento de uma componente intermediária.

4.1.1.2 Rendimento Quântico de Fluorescência

A razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos é o rendimento quântico. Na prática o rendimento quântico é determinado utilizando uma amostra padrão, no nosso caso o Eb livre, em relação a uma amostra sob estudo, que em nosso caso foi o complexo DNA-Eb. Comparando-se as áreas abaixo do espectro de emissão em cada titulação com a emissão da condição anterior determinamos a eficiência quântica. O erro na medida do rendimento quântico na titulação com DNA, está em torno de 2 % para as três concentrações de NaBr. Os experimentos do rendimento quântico de fluorescência, mostrados na figura 4.6, foram realizados em 7 titulações de 10 μM de DNA em três diferentes concentrações de NaBr (10 mM, 50 mM e 100 mM de NaBr). A concentração do brometo de etídio foi de 97,5 μM .

Comparando os valores obtidos para os rendimentos quânticos, observamos um valor quase que estabilizado nas três condições de força iônica de $\phi_{\text{FI}} = 0,90$, indicando que temos um modo de decaimento constante e independente da força iônica. Observamos



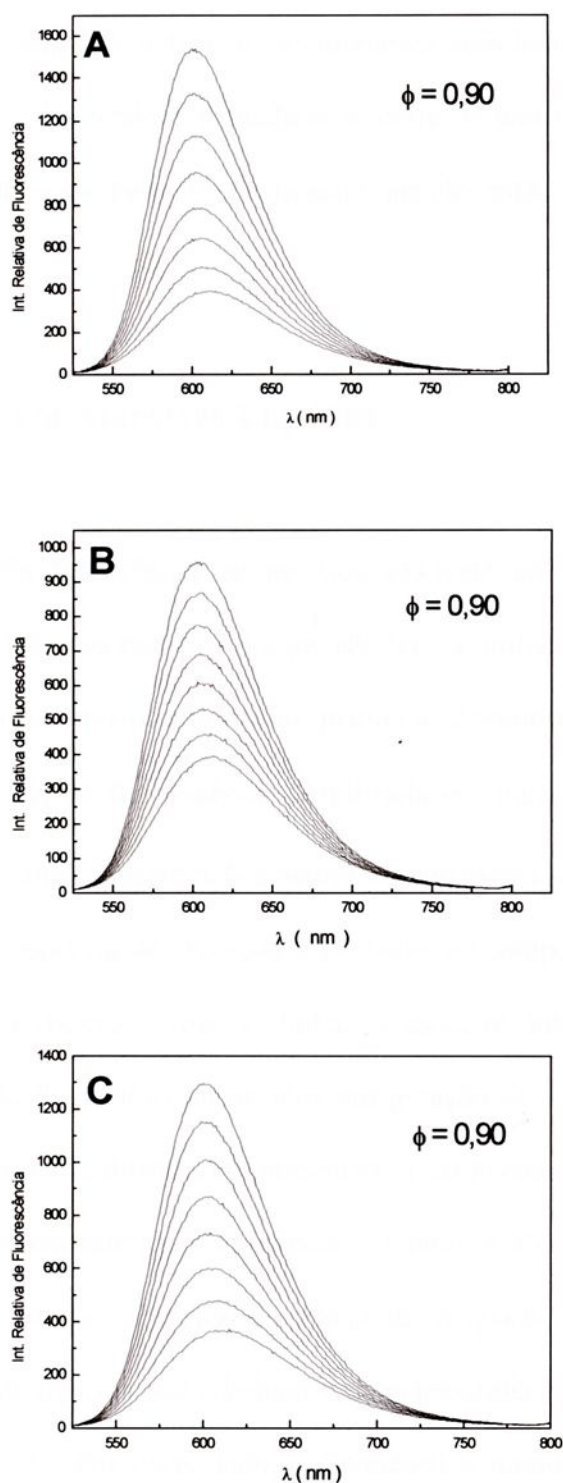


Figura 4.4: Intensidade do sinal de fluorescência do brometo de etídio ($97,5 \mu\text{M}$) livre e na presença de várias alíquotas de DNA. (A) 10 mM de NaBr, (B) 50 mM de NaBr, e (C) 100 mM de NaBr; a eficiência quântica $\phi_{\text{FI}} = 0,90$.

também das curvas mostradas na figura 4.4 um deslocamento de ± 10 nm para comprimento de ondas menores, indicando um ambiente mais hidrofóbica para o Eb após a intercalação, ou seja, os Eb tendem a localizar-se entre os pares de bases do DNA, pois seus rendimentos quântico são bem altos indicando que eles estão em uma região apolar.

4.1.2 Fotoacústica em Amostras Líquidas

A espectroscopia fotoacústica se mostrou eficiente em investigar processos de absorção em líquidos, uma das razões é porque não temos problemas com o espalhamento inelástico como ocorre com as outras técnicas quando a concentração da solução é elevada ($\sim M$). A espectroscopia de fluorescência é utilizada em medidas quando temos baixa concentração, mas com altas concentrações ocorre espalhamento, impedindo seu uso.

A PAS tem um espectro de absorção semelhante ao comportamento do espectro da absorbância, ou seja, a mesma forma de linha. O espectro fotoacústico é gerado pela eficiência da conversão dos fótons absorvidos em geração de calor, enquanto que o da absorbância de um espectrofotômetro, é representado pelo percentual de luz transmitida na amostra, ou seu complementar, a absorbância. Como a PAS mede o calor gerado internamente na amostra após a absorção de uma certa energia na forma de fótons, também podemos dizer que é um método que combina a espectroscopia óptica e a calorimetria, ou seja, um fotocalorímetro. Por outro lado, a fotoacústica monitora os decaimentos não radiativos, que torna esta técnica complementar a fluorescência, tendo então a capacidade de monitorar tanto amostras fluorescentes quanto não fluorescentes.



Temos dois modos experimentais pelo qual podemos obter um sinal fotoacústico de uma amostra em solução. Podemos considerar uma solução como um material sólido, na qual teremos um tratamento teórico do modelo de Rosencwaig & Gersho (RG) (Rosencwaig and Gersho, 1976), mas levando em conta parâmetros apropriados inseridos quando necessários como a difusividade térmica e a condutividade de calor para água e outros líquidos. Quando uma amostra líquida é iluminada por uma luz modulada, irá gerar calor periodicamente dentro da solução através do processo de absorção óptica, difundindo o calor através da interface líquido-gás, perturbando o gás na interface e criando um distúrbio acústico que é detectado pelo transdutor. Um outro modo de detectar sinal fotoacústico de líquido seria o uso do transdutor diretamente em contato com a amostra.

Conforme Alexander Graham Bell (Bell, 1880), um processo de absorção é o primeiro passo para gerar o efeito fotoacústico, ou seja, uma transformação da energia luminosa absorvida em energia mecânica. A interação de uma molécula com a radiação eletromagnética é primariamente devido a absorção, e considerando apenas o primeiro estado eletrônico excitado ($S_0 \rightarrow S_1$), teremos o decaimento deste estado excitado por:

1. Fluorescência.
2. Não radiativos (geração de calor).

Quando uma luz monocromática modulada impingir uma amostra em um sistema hermeticamente fechado, a geração de calor irá acompanhar a frequência de modulação de forma periódica. A frequência de modulação é baixa comparada com a velocidade dos processos de decaimentos,

1. Conversão interna
 2. Processo de competição
- 2 a - cruzamento intersistema

- 2 b - reações fotoquímicas
- 3. Transições radiativas (fluorescência)
- 4. Transições não radiativas (conversão interna)

No caso em que o gás está mantido em um sistema fechado, o volume é constante, mas a pressão do gás muda periodicamente, e acaba gerando uma onda que corresponde a uma onda sonora, que é detectado pelo transdutor (microfone).

Numa câmara fotoacústica, confeccionada para trabalhar com amostras líquidas é essencial que a camada de gás esteja acima da amostra. Após um aquecimento local no interior da amostra, o calor é difundido para a superfície da mesma. No limite entre a amostra e o gás, a onda de calor passa para o gás e torna-se uma onda de pressão. Este sistema é chamado de câmara fotoacústica com gás acoplado.

Quando temos um suporte para depositar a amostra, devemos levar em conta as propriedades térmicas do suporte, da amostra e também do gás. Considerações teóricas da literatura básica, mostram que a onda de calor estimula uma fina camada na interface gás-amostra, do qual teremos mudanças periódicas atrelados a modulação da frequência do *chopper* em $\omega = 2\pi f$.

A luz quando atravessa uma amostra acondicionada entre duas janelas paralelas, terá sua intensidade I diminuída em relação a intensidade inicial I_0 , figura 4.5. Empiricamente, a Lei de Beer-Lambert governa o processo de absorção. Logo, a equação que expressa a Lei de Beer-Lambert é:

$$-dI = \alpha I dz \quad (4.1)$$

onde α é uma constante de proporcionalidade, e depende da concentração e do coeficiente de extinção.

$$I = I_0 e^{-\alpha z} \quad (4.2)$$

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \alpha z \quad (4.3)$$

e como: $\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = 2,303 \cdot \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$, e $\alpha = 2.303 \cdot c \cdot \varepsilon$

logo temos pela Lei de Beer-Lambert, que a absorção é, $A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$.

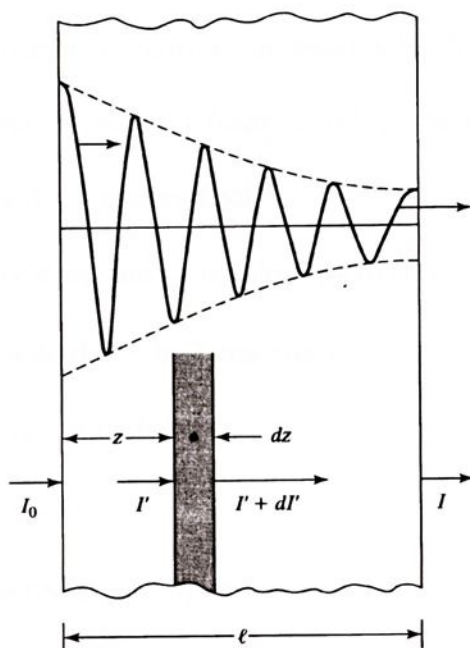


Figura 4.5: Um feixe de luz monocromática transmitido em uma amostra absorvedora, a intensidade apresenta um decaimento exponencial de acordo com a Lei de Beer-Lambert.

Assim podemos relacionar a PAS, com a luz absorvida pela amostra, que também se relaciona ao coeficiente de absorção β (Perkampus, 1992) por:

$$A = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = 2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (4.4)$$

$$\beta = \frac{A}{d} = 2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \quad (4.5)$$

$$\beta = 2,303 \cdot \epsilon \cdot c \quad (4.6)$$

onde a dimensão de β é " cm^{-1} ", ϵ é o coeficiente de extinção molar e c a concentração da amostra, e d o caminho ótico. Se o sinal PAS é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção, podemos obter o espectro fotoacústico, correspondente ao espectro de absorção, plotando o sinal PAS em função do comprimento de onda.

Quando a molécula apresenta decaimentos dos estados $S_2, S_3 \dots S_n$ para o estado S_1 , o tempo de vida de S_1 é longo quando comparado aos outros estados. Portanto vários mecanismos de decaimento podem ocorrer dos estados $S_2, S_3 \dots S_n$, mas as considerações em relação a estes mecanismos devem ser feitas em relação ao rendimento quântico:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Decaimento radiativo = fluorescência | ϕ_{FI} |
| 2. Cruzamento intersistema para o estado tripleto com: | ϕ_{ISC} |
| a - decaimento radiativo = fosforescência | ϕ_{Fo} |
| b - decaimento não radiativo | ϕ_{nr} |
| 3. Reações fotoquímicas | ϕ_{rf} |
| 4. Decaimentos não radiativos $S_1 \rightarrow S_0$ | ϕ_{NR} |

Os processos 2b e 4 são os desejáveis em PAS. Todos os outros mecanismos competem com o PAS, mas não contribuem com o sinal fotoacústico. Em temperatura ambiente, supõem-se que o processo 2a não ocorra, ou seja, $\phi_{Fo} = 0$. Assim podemos determinar o rendimento quântico absoluto como:

$$\phi_{NR} = 1 - \phi_{FI} \quad (4.7)$$

onde ϕ_{NR} é o rendimento quântico dos decaimentos não radiativos.

Podemos ter um cálculo teórico do sinal fotoacústico a partir da solução completa do modelo RG, quando conhecemos os dados ópticos e térmicos da amostra. Para uma

análise mais apropriada, devemos levar em consideração casos limites, para investigar substâncias sólidas e líquidas quando usamos a teoria RG.

Como L_β é o comprimento de absorção óptica, e μ_a o comprimento de difusão térmica da amostra:

$$L_\beta = \frac{1}{\beta} \quad [\text{cm}] \quad (4.8)$$

$$\mu_a = \sqrt{\frac{2\alpha_a}{\omega}} \quad [\text{cm}] \quad (4.9)$$

onde α é a difusividade térmica da amostra.

Assim podemos classificar as amostras comparando L_β com L (espessura da amostra):

1. Opticamente transparente $L_\beta > L$
2. Opticamente opaco $L_\beta < L$

Ainda podemos classificar a amostra quanto ao seu aspecto térmico:

Amostra termicamente fina $\mu_a > L$

Amostra termicamente espessa $\mu_a < L$

No nosso caso, podemos calcular e definir os parâmetros da amostra utilizada, considerando que: como a amostra é líquida e o solvente é a água, adotamos o comprimento de difusão térmica $\mu_a = 0,0021$ cm da água obtido a 100 Hz (Rosencwaig, 1980), porque como o material predominante na solução é a água, tomamos o μ_a da água como referência. O valor do comprimento de difusão térmica para a nossa amostra pode ser calculado para as outras frequências utilizando:



$$\mu = \sqrt{\frac{2\alpha}{\omega}} \quad [\text{cm}], \quad \text{assim temos que para :} \quad 10 \text{ Hz temos } \mu = 6,6 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$100 \text{ Hz temos } \mu = 2,1 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$800 \text{ Hz temos } \mu = 0,7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

Podemos notar que quando a frequência de modulação ω aumenta, o comprimento da difusão térmica μ diminui. O comprimento da difusão térmica para 10 Hz, onde $\mu = 6,6 \times 10^{-3} \text{ cm}$, garante que o sinal fotoacústico está sendo gerado na amostra em baixa frequência, já que a espessura da amostra do nosso experimento é $L = 0,20 \text{ cm}$.

Calculando-se o coeficiente de absorção óptica da amostra temos que:

$$\beta = 2,303 \cdot \epsilon \cdot c$$

$$\beta = 2,303 \cdot 5700 \cdot 1,65 \text{ mM}$$

$$\beta = 21,6597 \text{ cm}^{-1}$$

A partir do valor de β conhecemos o valor de L_β , logo:

$$L_\beta = 1 / \beta$$

$$L_\beta = 0,046 \text{ cm}$$

Podemos analisar as condições da nossa amostra. As diversas combinações possíveis entre L_β , β e μ_a , determinam os casos especiais.

Para amostra opticamente transparente espera-se que $L_\beta > L$.

1 – ($\mu_a \gg L$; $\mu_a > L_\beta$) → não, não.

2 – ($\mu_a > L$; $\mu_a < L_\beta$) → não, sim.

3 – ($\mu_a < L$; $\mu_a \ll L_\beta$) → sim, não.



Para amostra opticamente opaco espera-se que $L_\beta \ll L$.

1 – ($\mu_a \gg L$; $\mu_a \gg L_\beta$) $\rightarrow$ não, não.

2 – ($\mu_a < L$; $\mu_a > L_\beta$) $\rightarrow$ sim, não.

3 – ($\mu_a \ll L$; $\mu_a < L_\beta$) $\rightarrow$ sim, sim.

Pela análise acima, temos uma condição adequada para a amostra, onde $\mu_a \ll L$; $\mu_a < L_\beta$.

Para uma condição onde $L_\beta < L$ espera-se que o logaritmo do sinal fotoacústico e da frequência, varie com:

ω^{-1} em varredura de frequência baixa.

$\omega^{-3/2}$ em varredura de frequência alta.

A teoria fotoacústica também prediz para uma amostra opaca ($L_\beta < L$), que o sinal PAS irá variar com ω^{-1} quando $\mu_a > L_\beta$, e com $\omega^{-3/2}$ quando $\mu_a < L_\beta$. No nosso caso a dependência com ω ficou mais próximo de $\omega^{-3/2}$, ver figura 4.6, indicando que a profundidade de penetração óptica de 0,046 cm é maior do que o comprimento de difusão térmica da amostra.

O gráfico da figura 4.6 mostra o comportamento da amplitude do sinal fotoacústico para diferentes frequências de modulação. A inclinação da reta através de um ajuste linear mostra a dependência de $\omega = -1,36$. Esta figura tem como finalidade mostrar que a amostra está opticamente opaca, e bem próximo da região ($L_\beta \ll L$) e termicamente espessa ($L_\beta > \mu_a$) pelos casos limites da teoria RG, de modo que o material do porta amostra não tem influência significativa na amplitude ou fase do sinal fotoacústico, além do que, o material do porta amostra não absorve nesta região espectral. A concentração da amostra mantida

em 1,65 mM faz com que a espessura da amostra seja $L > L_\beta$ e garante que o sinal fotoacústico está sendo gerado dentro da espessura L da amostra.

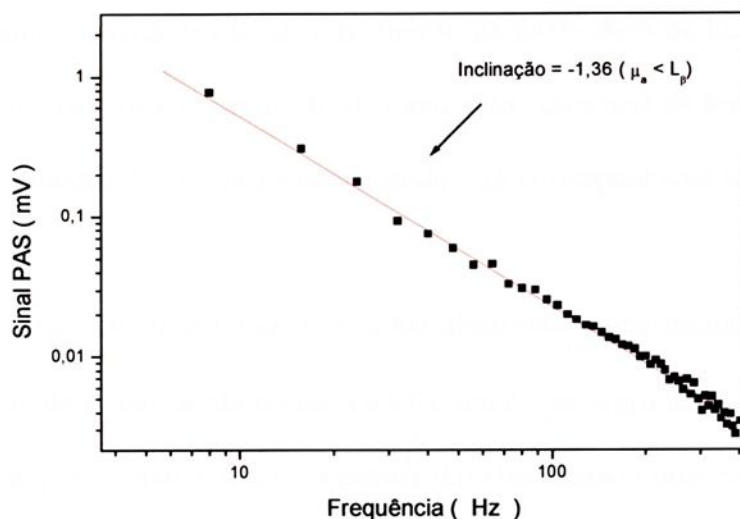


Figura 4.9: O gráfico mostra uma escala logarítmica da amplitude e da frequência do sinal fotoacústico para diferentes frequências de modulação, a inclinação da reta através de um ajuste linear mostra uma dependência de $\omega = -1,36$.

Devemos considerar também que a câmara fotoacústica é um gerador de ressonância de *Helmholtz*, que tem uma alta sensibilidade em frequências específicas, assim para utilizar a técnica de fotoacústica, estas frequências de ressonância devem estar em valores altos para permitir medidas de frequência com o *chopper* variando nas regiões de interesse. Isto pode ser feito variando-se o comprimento do duto que liga o microfone e também fazendo com que o volume de gás da câmara seja o menor possível. Uma câmara onde a frequência de ressonância está acima dos 2000 Hz, o volume deve ser preservado entre 1-2 cm³.

O volume da câmara desenvolvida é de 1,0 cm³, e a região de ressonância encontra-se acima de 500 Hz. No entanto utilizamos para o nosso caso a região de até 400 Hz para a caracterização da amostra.

Quando $\mu_a < L_\beta$, temos uma correlação linear entre o sinal fotoacústico e o coeficiente de absorção obtido, veja a equação 2.11 e 2.14 (caso 1c e caso 2c). Quando temos $\mu_a > L_\beta$, o sinal é saturado e torna-se independente do coeficiente de absorção β da substância. Assim o sinal acaba sendo uma função da intensidade de luz que é irradiada na amostra, logo teremos uma distribuição da intensidade espectral da fonte de luz, e o sinal fotoacústico em função do comprimento de onda será correspondente ao espectro da fonte de luz.

Numa substância onde temos toda a luz absorvida na espessura da amostra, temos um valor de β muito grande nesta região, ou seja, um corpo negro ideal, e que geralmente é usado o papel carbono, mas que em amostras líquidas usamos uma solução aquosa com tinta de nanquim. O espectro deste corpo negro (tinta de nanquim) corresponde a combinação da lâmpada e do monocromador, que serve como uma linha de base do sistema e é normalizado em relação a cada amostra, e subtraído do sinal da amostra.

4.1.2.1 Medidas do Tempo de Vida do Estado Tripleto

Uma das áreas mais promissoras do uso da PAS é no estudo de sistemas biológicos, porque a maioria dos materiais são muitas vezes um pouco difícil de investigar por outras técnicas óptica. Na literatura tem sido mostrado vários trabalhos com a aplicação da PAS no estudo de proteínas, mostrando a viabilidade da técnica nesta área (Rosencwaig, 1980; Kurian *et al.*, 1997; Abbruzzetti *et al.*, 2000 a; Abbruzzetti *et al.*, 2000 b) A aplicação da PAS na área da biofísica molecular é extremamente nova, sendo estes dados pioneiros na conjugação da técnica e da área de pesquisa. O estado tripleto em temperatura ambiente, é

muito difícil de ser avaliado por fosforescência, já que moléculas que possuem anéis aromáticos não fosforescem em solução, no entanto é factível em PAS. O mecanismo de fosforescência tem origem no processo de cruzamento entre sistemas, mas nem sempre o relaxamento do estado tripleto excitado ocorre por decaimento não radiativo.

Na geração do calor através dos decaimentos não radiativos, podemos encontrar duas fontes; uma devido ao estado singleto e a outra ao tripleto. Estes decaimentos comparativamente são considerados rápido e lento, respectivamente. Na metodologia utilizada aplicamos dois gases no ambiente da câmara com a finalidade de distinguir a contribuição destas duas fontes de calor. Utilizamos o N_2 como gás inerte que permite a existência das duas fontes de calor, e o O_2 como agente supressor do estado tripleto. A ausência da contribuição do estado tripleto modifica a resposta da fase. A diferença de fase medida nestas duas condições revelam a contribuição da fonte lenta, bem como do tempo de vida do estado tripleto. Isto é conseguido através da simulação da equação 4.10 com os dados experimentais da diferença de fase do sinal fotoacústico. Com o diagrama de Jablonski, figura 4.7, podemos visualizar com mais detalhes os decaimentos por fluorescência e as fontes de geração de calor do primeiro estado excitado. Portanto, temos uma fase que corresponde ao singleto e ao tripleto, e a outra fase que corresponde somente ao singleto, logo quando fazemos a diferença das fase teremos somente uma relação do ângulo de fase ao estado tripleto. O modelo teórico foi desenvolvido por Hunter (Hunter *et al.*, 1974), e testado sua aplicabilidade por Moore (Moore *et al.*, 1982) e Ouzafe *et al.*, 1992). Podemos relacionar esta diferença de fase a expressão teórica (Moore *et al.*, 1982). Da diferença de fase entre as medidas, obtemos o tempo de vida do estado tripleto, utilizando a equação 4.10.



$$\tan \theta = \frac{\omega \tau}{(1 + R(1 + \omega^2 \tau^2))} \quad (4.10)$$

$$R = \frac{(h\nu - \phi_{Fl} E_S - \phi_{isc} E_T)}{\phi_{isc} E_T} \quad (4.11)$$

onde $h\nu$ e ω são a energia e a frequência angular de modulação da luz de excitação, E_S e E_T são as energias das transições dos estados singlete e tripleto e τ o tempo de vida do estado tripleto, ϕ_{Fl} e ϕ_{isc} são a eficiência quântica de fluorescência e do cruzamento intersistema.

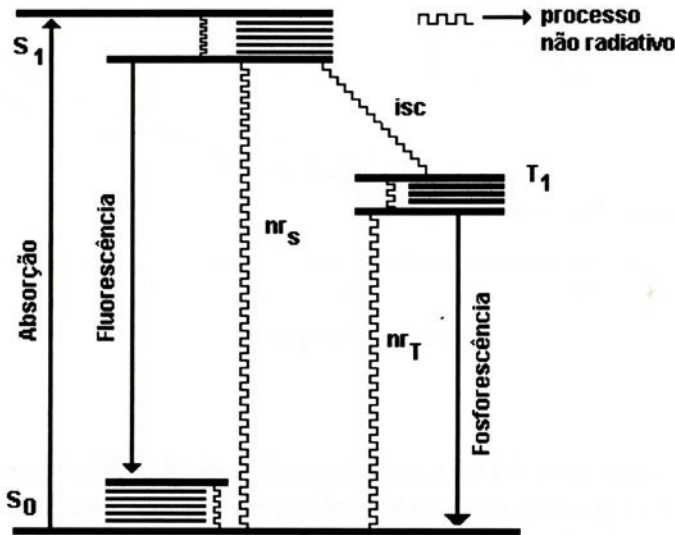


Figura 4.7: Diagrama de Jablonski do primeiro estado excitado de uma molécula aromática, onde podemos visualizar os decaimentos por fluorescência e as fontes de geração de calor de S_1 para S_0 .

Os experimentos para determinar o tempo de vida do estado tripleto do etídio, livre e intercalado com o DNA foram excitados em 480 nm (2,58 eV), que é o pico máximo de absorção do Eb. O gráfico da figura 4.8, mostra o comportamento da fase do sinal fotoacústico gerado da amostra purgada durante 10 minutos com N_2 e O_2 . Da diferença de fase entre as medidas, figura 4.9, obtemos o tempo de vida do estado tripleto, utilizando a equação 4.10. A figura 4.9 mostra o tempo de vida do estado tripleto para uma razão molar DNA:Eb de 5,52 em quatro condições de força iônica.

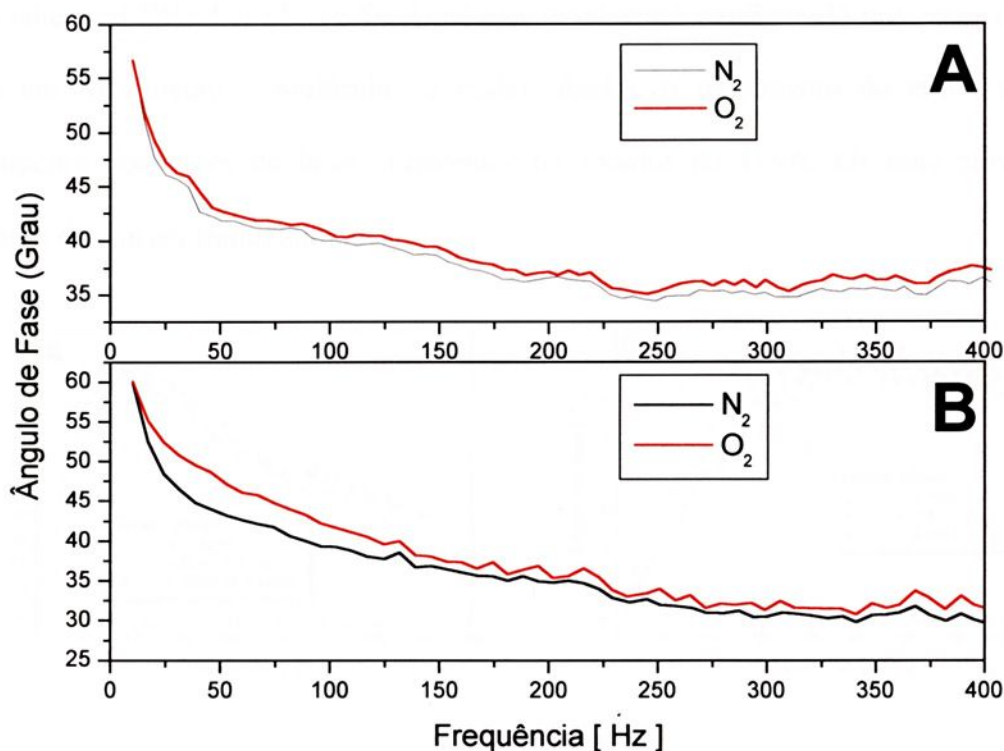


Figura 4.8: Diferença da fase do sinal fotoacústico. (A) Eb livre com 150 mM de NaBr, e (B) intercalado ao DNA com 10 mM de NaBr, ambos com uma razão molar DNA:Eb de 5. A linha preta representa a amostra com N_2 , com a contribuição do decaimento do estado singlete e tripleto, e a linha vermelha representa a amostra com O_2 , somente com a contribuição do decaimento do estado singlete.

Olmsted e Kearns (Olmsted and Kearns, 1977) atribuí o aumento no tempo de vida quando intercalado ao caminho do decaimento não radiativo do estado excitado, envolvendo a transferência de próton do grupo amina (NH_2) do brometo de etídio para o solvente, que é inibido após a intercalação. Eles também demonstraram que o aumento da fluorescência do brometo de etídio não está relacionada a viscosidade do meio, já que o rendimento quântico e o tempo de vida do brometo de etídio são muito similares em meios de viscosidades diferentes.

No processo de intercalação o etídio comporta-se substancialmente como um par de base adicional (Wahl *et al.*, 1970). Qualquer movimento configurado nos pares de bases, trará um movimento a molécula de etídio. Assim, o movimento do etídio reflete o movimento dos pares de bases adjacentes no interior do DNA. Os dois movimentos portanto devem ser muito similares.

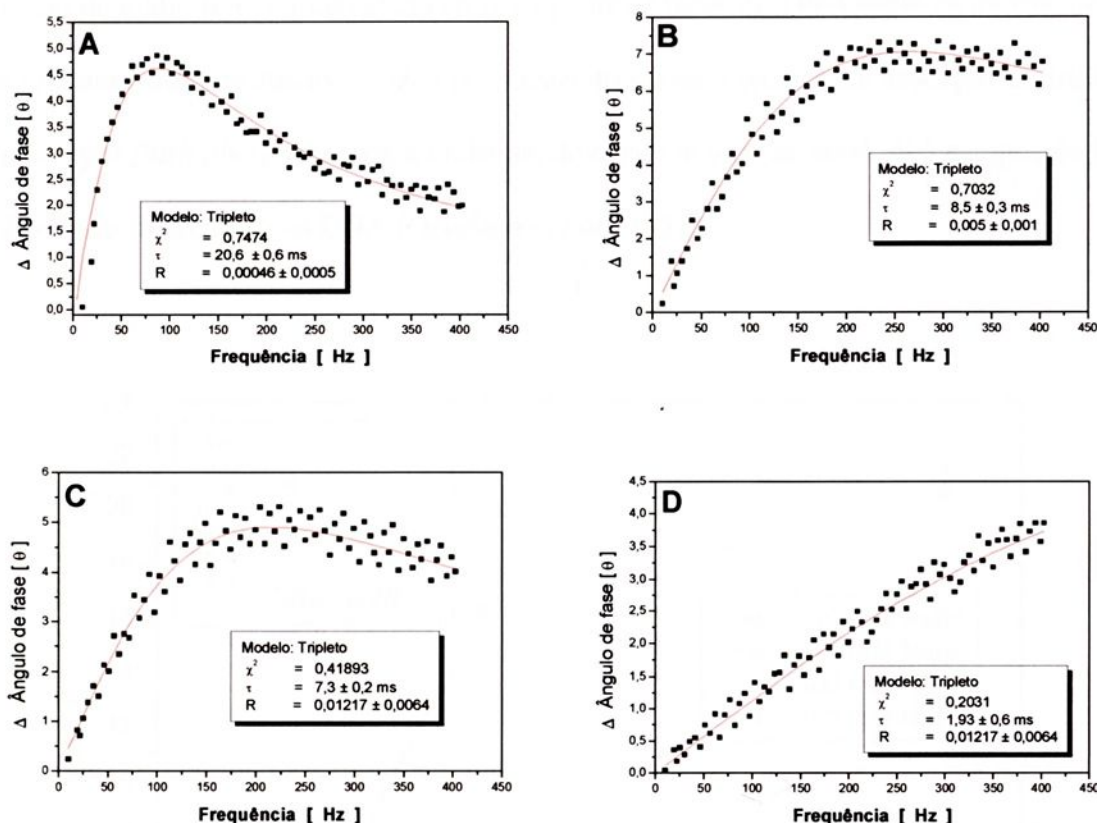


Figura 4.9: Determinação do tempo de vida do estado tripleto do brometo de etídio. A concentração de 9,1 mM de DNA e 1,65 mM de Eb, dando uma razão molar de 5,52. A excitação foi 480 nm. (A) 10mM de NaBr, $\tau = 20,6 \text{ ms}$; (B) 50mM de NaBr, $\tau = 8,5 \text{ ms}$; (C) 100mM de NaBr, $\tau = 7,3 \text{ ms}$; (D) 150mM de NaBr, $\tau = 1,93 \text{ ms}$.

A figura 4.10 mostra o tempo de vida do estado tripleto do complexo DNA-Eb, em quatro condições de força iônica. A inserção desta figura mostra o tempo de vida do estado tripleto do Eb livre. Percebe-se que quanto maior a força iônica maior o tempo de vida do Eb livre, este efeito está relacionado diretamente ao aumento da viscosidade da solução

devido ao aumento da força iônica (Weast, 1987). O tempo de vida encontrado para o estado tripleto do etídio livre foi da ordem de $0,30 \pm 0,04$ ms e intercalado entre os pares de bases do DNA em 10 mM de NaBr foi em torno de 20 ms para uma razão molar DNA:Eb de 5, e com o aumento da titulação até 150 mM de NaBr este tempo caiu para valores próximos de 2 ms. Os valores encontrados para os tempos de vida do estado tripleto do etídio livre e intercalado entre os pares de bases do DNA estão na mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos por Geacintov com a técnica de absorção de tripleto-tripletto por *flash photolysis* para a molécula de *acridine orange*, sendo 0,5 ms quando livre e 20-35 ms intercalado ao DNA (Geacintov *et al.*, 1981).

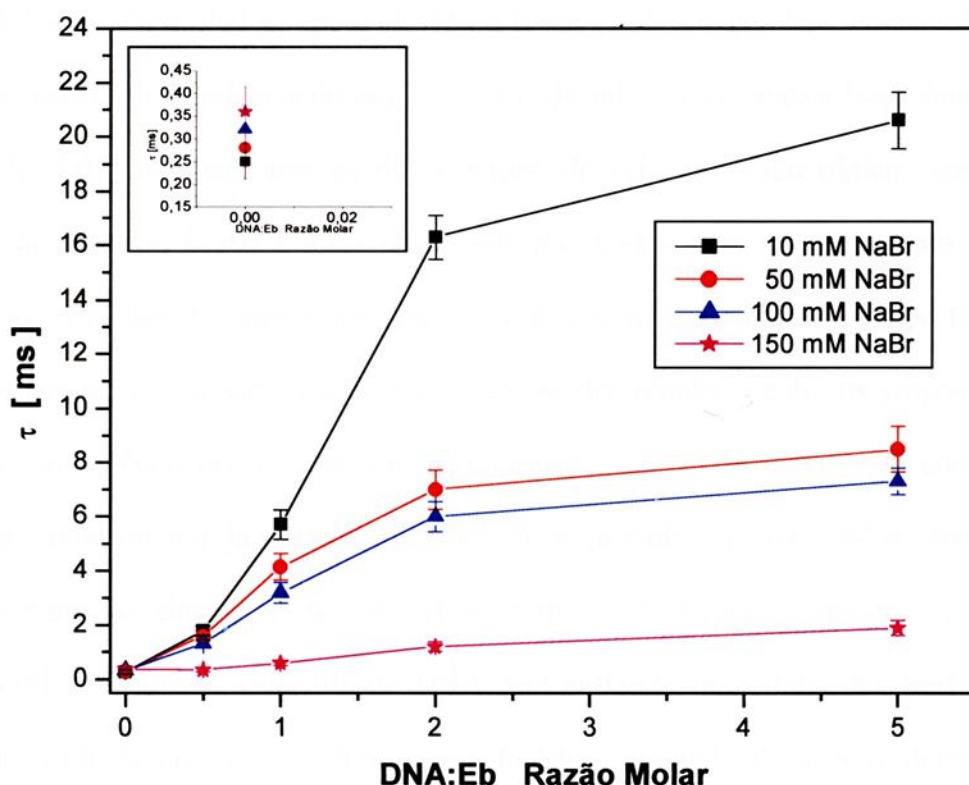


Figura 4.10: Tempo de vida do estado tripleto do complexo DNA-Eb, em quatro condições de força iônica. A inserção mostra o tempo de vida do estado tripleto do Eb livre.

O tempo de vida do estado tripleto do Eb livre é esperado ser menor do que quando intercalado, isto pode ser entendido como a perda do movimento Browniano do Eb devido a intercalação, ou ao aumento da viscosidade na solução devido ao aumento da razão molar.

O comportamento do tempo de vida do etídio é influenciado por duas variáveis, a razão molar e a força iônica. A razão molar indica a disponibilidade de pares de bases por intercalante, enquanto que a força iônica representa a disponibilidade de íons e contra-íons na solução. Sendo responsável pela blindagem da molécula de DNA, sua conformação e estabilidade.

O tempo de vida na condição de 10 mM de NaBr, é maior em relação as outras condições de força iônica, isto é devido a presença de poucos íons na solução que são responsáveis pela blindagem do grupo fosfato. Quando aumentamos a força iônica, para 50 mM de NaBr, notamos uma queda no tempo de vida do estado tripleto, em relação a condição anterior. Como a força iônica está relacionada com a concentração de íons na solução, estes íons habitualmente chamados de contra íons blindam o grupo fosfato, esta blindagem reduz a intensidade de força eletrostática repulsiva entre os grupos fosfatos e como consequência ocorre uma redução no espaçamento entre as bases, fazendo com que haja um relaxamento da estrutura do DNA. A força iônica em 100 mM de NaBr tem um comportamento similar a de 50 mM de NaBr. Nas duas concentrações, de 50 mM e 100 mM de NaBr, a molécula de DNA está sofrendo uma flutuação conformacional, devido a blindagem dos íons aos grupos fosfatos, passando de uma conformação mais rígida para uma mais flexível, justificando assim os tempos de vida dos estados tripletos. Na concentração de 150 mM de NaBr, notamos um relaxamento maior do esqueleto do DNA, e em consequência um tempo de vida menor do estado tripleto.



O efeito da força iônica sobre a molécula de DNA, aqui investigado utilizando o tempo de vida do estado tripleto do etídio, indica que a molécula de DNA sofre uma mudança conformacional, passando do estado rígido para flexível. Topologicamente representa uma compactação na estrutura do DNA, o que leva esta molécula a uma maior mobilidade do que quando rígida, e portanto representado pela diminuição do tempo de vida do estado tripleto do etídio.

O efeito do intercalante quando interage com o DNA, resume-se no alongamento do DNA, isto quando a cadeia do DNA está na forma linear (Daune, 1999a). Quando a razão molar é alta, indica que existe uma maior disponibilidade de sítios para cada intercalante, assim com tal disponibilidade todos os intercalantes tem acesso aos pares de bases do DNA. Após a intercalação sua mobilidade é restrita, isto é indicado pelo tempo de vida maior quando comparado ao Eb livre. A razão molar DNA:Eb utilizada variou entre uma quantidade de etídio mais disponível, para menos disponível em solução ao número de pares de base. Sugere-se então que na condição mais disponível, todos os sítios estejam ocupados e isto contribua para a rigidez do DNA, juntamente com a baixa força iônica. Este alongamento, portanto, representa um *stress* estrutural no DNA.

O efeito da força iônica pode ser melhor entendida se considerarmos que o DNA se comporta como um polieletrólito. Define-se o polieletrólito como um polímero que possui uma distribuição linear de carga de mesmo sinal. Em uma molécula de DNA cada grupo fosfato contribui negativamente em condição fisiológica, e sua distribuição ocorre ao longo da molécula.

Quando numa solução tem-se íons e polieletrólitos simultaneamente deve-se ter um número igual de cargas positivas e negativas que satisfaça a condição de neutralidade. Para que a neutralidade seja mantida, o volume ao redor do polieletrólito deve conter íons de

sinal oposto aos do polieletrólito. Estes íons que fazem esta compensação são conhecidos por contra íons e são cátions tais como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , para o caso do DNA.

As forças atrativas e repulsivas entre as cargas terão um papel importante na conformação adotada pelo polieletrólito. A repulsão entre as cargas do polieletrólito favorecerá a conformação estendida em baixa força iônica. Portanto quanto menor a força iônica mais estendido se encontra o polieletrólito, e quanto maior a força iônica menos estendido ele será. Assim, o comprimento l da cadeia de um polieletrólito pode ser alterado pela mudança do número de íons na solução. Quando temos uma deformação numa cadeia polieletrólita, podemos ter uma alteração na densidade de carga e um termo que represente esta mudança da energia livre eletrostática deve ser incluído na formulação mecânica da deformação. O número de contra íons e o potencial elétrico são portanto alterados, e isto explica porque os parâmetros dependem da condição iônica. Assim, se há repulsão entre os grupos fosfatos, o polieletrólito se apresenta mais rígido, e o aumento da força iônica contribui para a blindagem dos grupos fosfatos e consequentemente o empacotamento do DNA, pela redução da rigidez local.

O aumento da força iônica indica uma maior disponibilidade de contra íons na solução, a interação destes com o grupo fosfato diminui a rigidez local por blindar eletrostaticamente o grupo fosfato o que induz um empacotamento do DNA, implicando numa relaxação estrutural da molécula, isto é detectado pelo movimento relativo das bases que comprimem o fármaco intercalado entre as mesma, daí uma diminuição no tempo de vida, devido a uma maior restrição na mobilidade do fármaco e um movimento similar as das bases do DNA (Misra *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1995; Daune, 1999b). A dependência do sal no efeito eletrostático é o maior fator na determinação da estabilidade, estrutura e comportamento das ligações dos ácidos nucleicos. Estes efeitos surgem da forte atração



eletrostática das moléculas altamente carregadas, na qual exercem sobre os íons carregados positivamente, os contra íons, e com a repulsão dos íons carregados negativamente (Sharp and Honig, 1995).

4.2 EQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO DO COMPLEXO DNA-Eb

4.2.1 Evidências de dois modos de ligações do complexo DNA-Eb

Estudos recentes (Heller and Greenstock, 1994; Byrne and de Melo, 1998) sugerem cautela ao inferir uma variação na população de fármaco ligado ou livre com seus respectivos tempos de vida. A interação do etídio ao DNA tem sido de grande ajuda na elucidação dos processos de ligação de fármaco-DNA. A clássica interação de intercalação de fármacos entre os pares de bases do DNA, onde uma relação linear é rara, é mais seguro e eficaz o uso do método da exclusão de vizinhos, *neighbor exclusion principle*, desenvolvido por McGhee e von Hippel (McGhee and von Hippel, 1974), e Crothers (Crothers, 1968), onde cada segundo sítio ao longo da cadeia polieletrólita permanece desocupado.

Há um interesse especial na fluorescência do etídio, pois este demonstra o comportamento desta clássica intercalação. Por sua vez, quando os sítios de ligação estão saturados pelo etídio, podemos ter uma segunda ligação do etídio aos sítios externos, mais precisamente ao longo dos grupos fosfatos (Le Pecq and Paoletti, 1967; Douthart *et al.*, 1973; Yguerabide and Ceballos, 1995; Byrne and de Mello, 1998). A verdadeira natureza desta ligação secundária é até o momento objeto de discussão.



Todas as estruturas e os processos biológicos dependem do efeito combinado de interações covalentes e não covalentes. As três ligações não covalente fundamentais são as ligações eletrostática, as pontes de hidrogênios, e as ligações de van der Waals. Elas diferem em geometria, força e especificidade. As interações não covalentes resultantes são importantes nos processos biológicos. A interação entre um ligante e o ácido nucléico produz uma mudança na absorção óptica do ligante, e pode ser usada para monitorar o processo de interação. Na maioria dos casos de interação está envolvido um mecanismo reversível. A determinação da constante de equilíbrio de ligação pode descrever as forças intermoleculares, como por exemplo as interações entre cargas e dipolo permanente (ion-ion, ion-dipolo e dipolo-dipolo), um dipolo induzido (ion-interação com a molécula, dipolo-interação com a molécula, e interação entre dois dipolos induzidos). A análise das mudanças espectrais pode revelar consideráveis detalhes da arquitetura de novos fármacos, do tamanho do sítio de ligação e da termodinâmica do complexo.

A presente discussão envolvendo a interação DNA-Eb, geralmente é analisada por absorbância ou fluorescência, e aqui analisamos por espectroscopia fotoacústica. Monitorando a interação DNA-Eb, com métodos espectroscópicos usuais, onde temos o fato do espectro de fluorescência e absorção do ligante livre alterar-se quando intercala com o DNA com a mudança batocrômica (Le Pecq and Paoletti, 1967; Tsai *et al.*, 1977). O estudo desta interação é útil para propor um modelo dos mecanismos de ligação do Eb ao DNA (Cuniberti and Guenza, 1990), nas quais suas propriedades de ligação servem como ponto de partida para muitos outros fármacos. O espectro de absorção do complexo DNA-Eb é simultaneamente mudado para um comprimento de onda maior (deslocamento batocrômico) com a diminuição do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{\max}$ em $\lambda_{\max}$ (efeito hipocrômico). Contudo, isto não permite afirmar o modo pelo qual o fármaco interage com

o DNA, se por intercalação ou externamente aos grupos fosfatos, já que ambas podem induzir qualitativamente um efeito similar (Li and Crothers, 1969).

Quando titulamos o DNA ao Eb, temos uma queda na intensidade e uma mudança do sinal fotoacústico para comprimento de onda maiores, figura 4.11. Isto mostra que há uma interação entre a droga e o DNA, embora não se especifique o modo de interação. Como a PAS e fluorescência são complementares, espera-se que com a queda do sinal PAS haja um aumento no sinal de fluorescência, de acordo com a literatura, e após a formação do complexo DNA-Eb este possui um sinal de fluorescência mais intenso (Le Pecq and Paoletti, 1967).

A amplitude do sinal fotoacústico, A_{PAS} , medido em um determinado comprimento de onda reflete as parcelas de etídio livre e ligado ao DNA, pela relação:

$$A_{PAS} = A_{PAS_f} + A_{PAS_b} = \epsilon_f \cdot C_f + \epsilon_b \cdot C_b \quad (4.12)$$

onde, A_{PAS_f} e A_{PAS_b} são a amplitude do sinal fotoacústico do etídio livre e intercalado, respectivamente; $C = C_f + C_b$ é a concentração total de etídio, C_f e C_b são a concentração de etídio livre e ligado, respectivamente; e ϵ_f e ϵ_b os coeficientes de extinção molar livre e intercalado do etídio, respectivamente. Uma análise da ligação requer a determinação de C_f , e conseqüentemente o número de moléculas de Eb ligados r , que representa a quantidade de etídio ligado por unidade de DNA em função da titulação de DNA. Para determinar ϵ_b requer-se a extrapolação de DNA a altas concentrações, assegurando que todos os etídios estejam ligados. O gráfico da figura 4.12, fornece a relação para determinar ϵ_b .

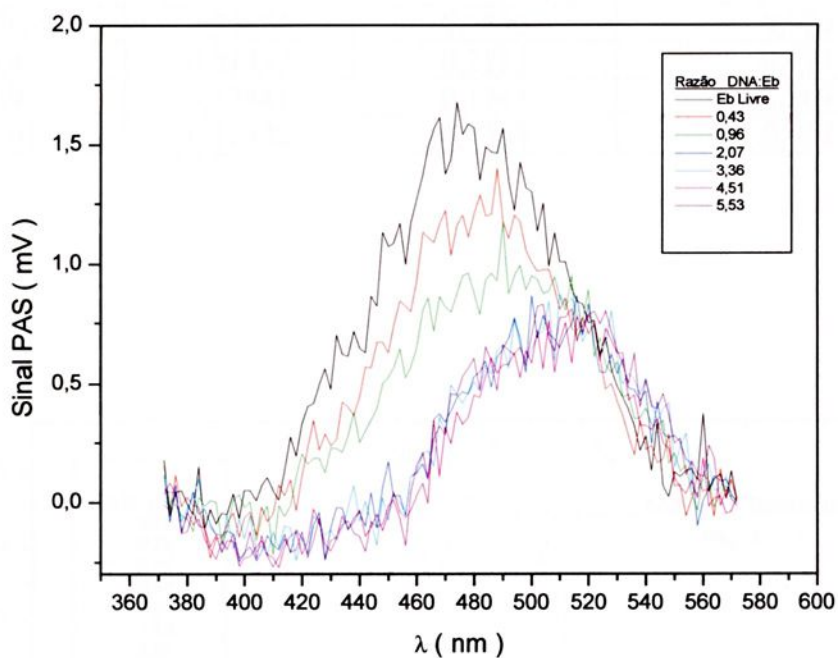
$\epsilon_f = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e do gráfico temos: $\epsilon_b = 2920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

que está de acordo com os dados da literatura (Douthart *et al.*, 1973).



A figura 4.11 representa o espectro fotoacústico da titulação de DNA em uma solução de 2 mM de etídio. Podemos notar que com o aumento do DNA na solução temos uma diminuição da amplitude do sinal PAS, indicando que os etídios estão intercalando entre os pares de bases do DNA. Dos dados obtidos pela espectroscopia fotoacústica, figura 4.11 (A), foram suprimidas três curvas com a finalidade de facilitar a visualização do decréscimo da intensidade do sinal PAS. O sinal obtido é aparentemente ruidoso, mas expressa as flutuações do sinal fotoacústico da amostra líquida. Ao simularmos o sinal PAS por uma gaussiana (Poston and Harris, 1987), podemos suprimir as flutuações do sinal da amostra líquida. Para demonstrar a confiabilidade do ajuste do sinal fotoacústico, representado na figura 4.11 (B), por uma gaussiana, integramos a área da curva dos quatros primeiros espectros da figura 4.11 (A), e comparamos com a área obtida pela integral da gaussiana, conforme mostra a tabela 4.1. Podemos notar que as áreas obtidas diferem uma da outra na ordem de 0,06 % e o coeficiente de correlação entre a curva teórica e a experimental forneceu um valor entre 0,95 e 0,97 que é um valor razoável. Esta diferença do valor de correlação é devido a mudança batocrômica que ocorre com a curva após a intercalação do Eb ao DNA. Isto mostra que o ajuste foi capaz de suprimir as flutuações do sinal fotoacústico sem alterar o padrão do espectro, assim iremos analisar o sinal fotoacústico utilizando a gaussiana do espectro.

(A)



(B)

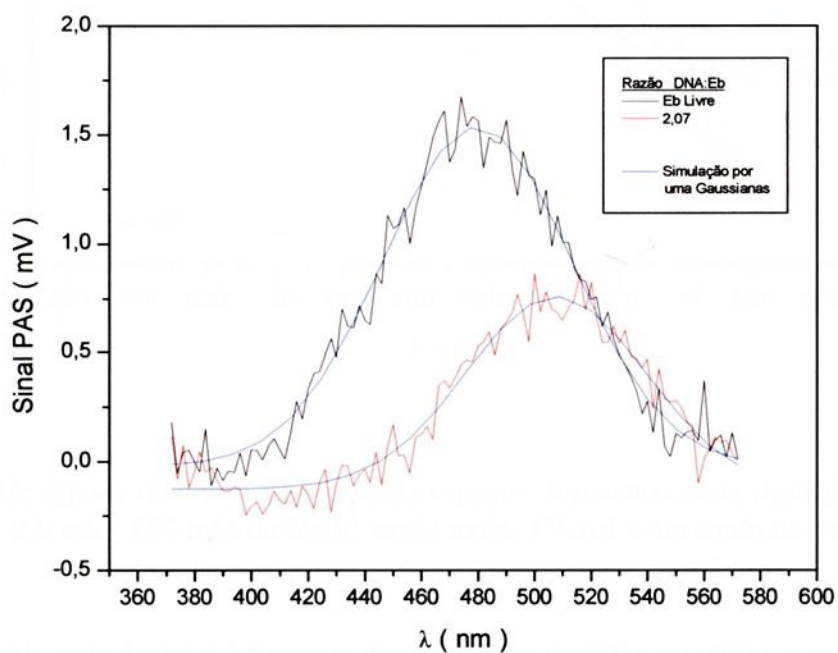


Figura 4.11 : (A) Espectro fotoacústico da titulação de DNA a 2,0 mM de Etídio. (B) Espectro fotoacústico do etídio livre e intercalado, com a simulação por uma gaussiana.

Tabela 4.1: Comparações das áreas dos espectros fotoacústicos com as áreas das curvas gaussianas.

Razão DNA:Eb	Área PAS	Área da Gaussiana	Coeficiente de Correlação
Livre	0,24624	0,2462	0,976
0,43	0,21357	0,2135	0,973
0,96	0,17441	0,1745	0,969
2,07	0,12922	0,1293	0,952

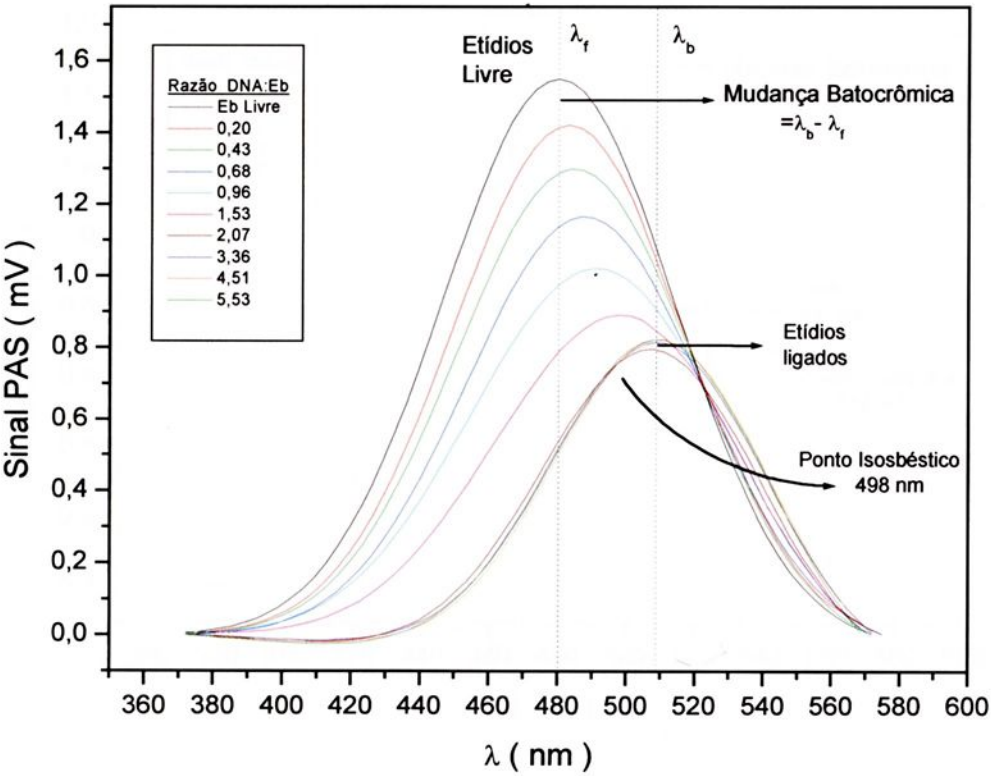


Figura 4.12: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico da titulação de DNA ao etídio. Eb = 2,0 mM, 150 mM de NaBr, razão molar DNA:Eb variando de 0 a 5,53.

O gráfico da figura 4.12 mostra dez titulações de DNA ao etídio, a uma força iônica de 150 mM de NaBr, numa razão de 0 a 5,53 pares de base para cada etídio, assim pode-se considerar que todos os Eb disponíveis devem estar intercalados ou ligados ao DNA.

O resultado obtido indica uma intercalação do etídio ao DNA, evidenciado pela mudança batocrômica de 28 nm na banda de absorção do etídio, e uma redução de 48,5 % na amplitude do sinal, efeito hipocrômico. Notamos no entanto a presença de dois pontos isobésticos, um em 522 nm, com $\epsilon_{522} = 2560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e outro em 498 nm, com $\epsilon_{498} = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

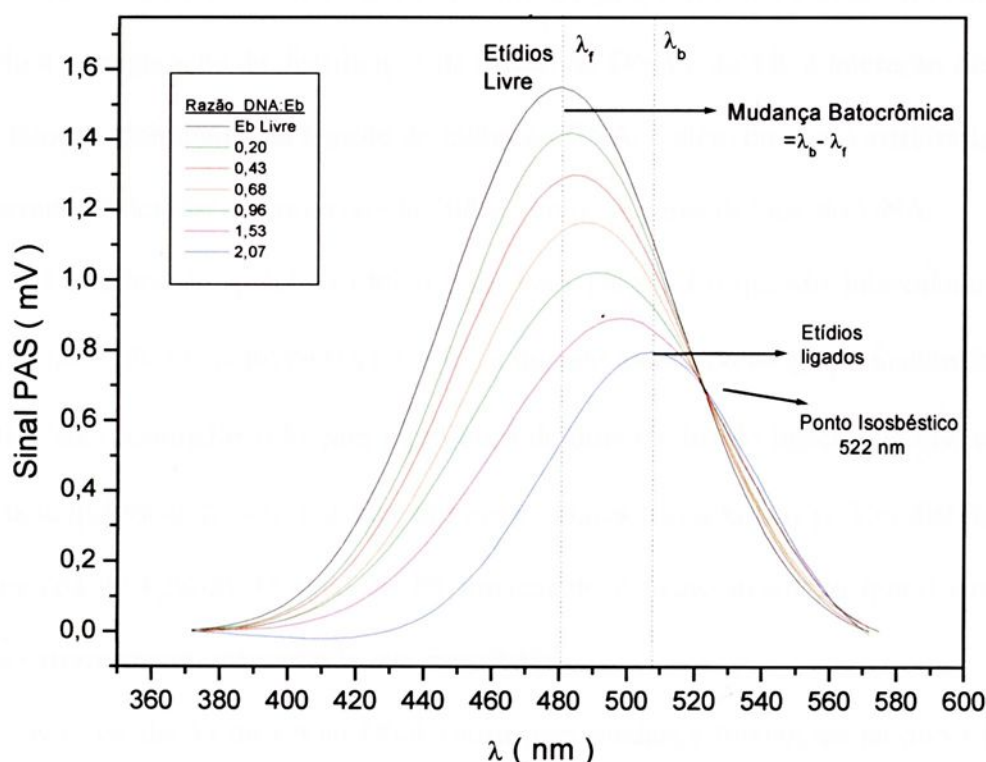


Figura 4.13: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico da titulação de DNA ao etídio, 2,0 mM de Eb, 150 mM de NaBr, e a razão molar DNA:Eb variando de 0 a 2,07.

Os dois pontos isobésticos indicados na figura 4.12 e 4.13 sugerem duas populações distintas. As superposições das curvas a partir da razão de 2,07 pares de base indica que todos os etídios estão ligados de alguma forma ao DNA. O ct-DNA na forma B, apresenta a quantidade de 41 % dos pares de base na forma G-C (Müller and Crothers,

1968). Assim os dados do gráfico da figura 4.13 sugerem que o etídio liga randomicamente ao DNA, não mantendo preferência na ligação nos pares de base da forma A-T, T-A, C-G ou G-C, mas somente na possibilidade de uma inserção. O DNA tem um grupo carregado negativamente, e o responsável por isso é o grupo fosfato (Voet and Voet, 1995), o etídio tem carga positiva (Bresloff and Crothers, 1981) portanto tendo afinidade ao DNA. A interação do etídio com o DNA tem primeiramente uma atração eletrostática, e em seguida uma intercalação do etídio entre as bases do DNA, já que o etídio é altamente hidrofóbico. Devido a configuração da distribuição de cargas do DNA e do Eb, a interação eletrostática é um fator predominante na ligação do etídio ao DNA, e além do que a estrutura planar do Eb permite posicionar-se com certa facilidade entre os pares de base do DNA.

O rendimento quântico obtido com PAS para o Eb quando intercalado entre os pares de bases do DNA foi de $0,87 \pm 0,01$, e quando associado ao grupo fosfato foi de $0,04 \pm 0,01$. Estes resultados reforçam a presença de dois modos de ligação, já que estas duas eficiência quânticas podem elucidar porque as outras técnicas não podem distinguir estes dois modos de ligação. O sinal do Eb intercalado é muito maior do que o sinal do Eb ligado externamente, mascarando sua contribuição.

A intercalação do Eb ao DNA causa uma mudança topológica na dupla hélice do DNA. A primeira evidência de uma intercalação de uma molécula aromática planar, a *acridine orange*, entre os pares de bases do DNA foi mostrado por Lerman (Lerman, 1961). A distância entre moléculas aromáticas pode ser determinada pelo raio de van der Waals (na ordem de $3,4 \text{ \AA}$), onde dois pares de bases adjacentes do DNA estarão a $6,8 \text{ \AA}$ um do outro após a intercalação (Daune, 1999c). Este alongamento da molécula de DNA é acompanhado por um desenrolamento local e uma mudança no grupo fosfato da base intercalada. O Eb tem um volume molecular maior que em relação a *acridine orange*,



devido ao anel aromático fenil perpendicular aos outros três anéis (Tsai *et al.*, 1977), ocasionando um desenrolamento maior ao DNA. O B-DNA contém dois tipos de sulcos, chamados sulco maior (12 Å de largura) e o sulco menor (6 Å de largura) (Stryer, 1996), ilustrados na figura 4.14. Eles surgem porque as ligações glicosídicas de um par de base não são diametralmente opostas umas às outras. O sulco maior é ligeiramente mais profundo do que o menor, 8,5 Å e 7,5 Å respectivamente. Cada sulco é circundado por átomos de hidrogênio, que podem protonar ou deprotonar o DNA. O diâmetro da hélice do B-DNA na forma intermediária é 23,7 Å. Com estes espaços dimensionais numericamente definidos na literatura, podemos perceber uma facilidade do Eb intercalar ao DNA.

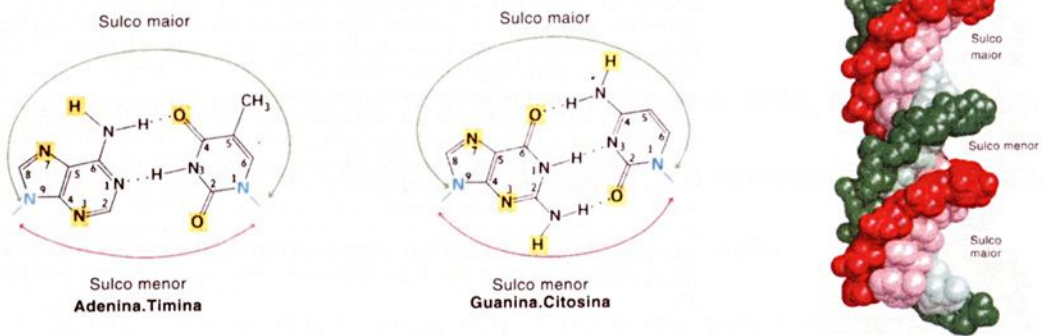


Figura 4.14: Sulcos do B-DNA, sulco maior e o sulco menor.

Muitos métodos podem ser usados para determinar C_f e r durante a titulação, assim a fração de etídio ligado α e a distribuição de equilíbrio de cada titulação é calculado por:

$$\alpha_i = \frac{C_b}{C} = \frac{1 - C_f}{C} = \frac{A'_{PAS} - A_{PAS_f}}{A_{PAS_b} - A_{PAS_f}} \quad (4.13)$$

onde A_{PASf} e A_{PASb} são as medidas da amplitude do sinal fotoacústico do etídio livre e intercalado ao DNA. O α tem uma variação de 0 a 1, enquanto A'_{PAS} tem uma variação entre A_{PASf} e A_{PASb} . Assim,

$$r_i = \alpha_i \frac{C}{C_{DNA}} \quad (4.14)$$

$$C_{fi} = (1 - \alpha_i)C \quad (4.15)$$

onde C_{DNA} é a concentração de DNA da titulação. Para um simples modelo de dois estados de ligação, podemos usar a equação de *Scatchard* para plotar r/C_f contra r :

$$\frac{r}{C_f} = k_i(n - r) \quad (4.16)$$

onde r é o número de moléculas de etídio ligadas por bases de DNA, C_f é a concentração de etídio livre, K_i é a constante de equilíbrio da ligação, e n representa o número de sítios ligados do DNA (normalmente pares de base) ocupados pelo etídio.

Contudo, como a relação linear (Eq. 4.16) é rara para um sistema com ácidos nucleicos, é mais usual a aplicação do modelo de sítios excluídos (*neighbor exclusion*) desenvolvido por McGhee e von Hippel (McGhee and von Hippel, 1974):

$$\frac{r}{C_f} = k(1 - nr) \left[\frac{(1 - nr)}{(1 - (n-1)r)} \right]^{n-1} \quad (4.17)$$

onde K_i é a constante de ligação para um sítio isolado, e n representa o número de bases excluídas da ligação. A forma mais estendida da equação 4.17 introduz um fator (ω_{MH}) de cooperatividade para calcular a interação entre moléculas de drogas ligadas, com ω_{MH} podendo ser, $\omega_{MH} > 1$ ou $\omega_{MH} < 1$ correspondendo uma ligação cooperativa e anti-cooperativa, respectivamente. A escolha do modelo apropriado depende do sistema DNA-

droga, normalmente tenta-se pelo gráfico de *Scatchard* e então usa-se o método iterativo de McGhee-von Hippel (K_i , n) ou sua forma estendida (K_i , n , ω_{MH}). Como o nosso sistema demonstrou uma não linearidade, devido a presença de dois pontos isobéstico, escolhemos McGhee-von Hippel. O resultado está plotado na figura 4.15. Pelo gráfico notamos a perpendicularidade do ajuste para baixos valores de r , indicando que o tipo de ligação é não cooperativa.

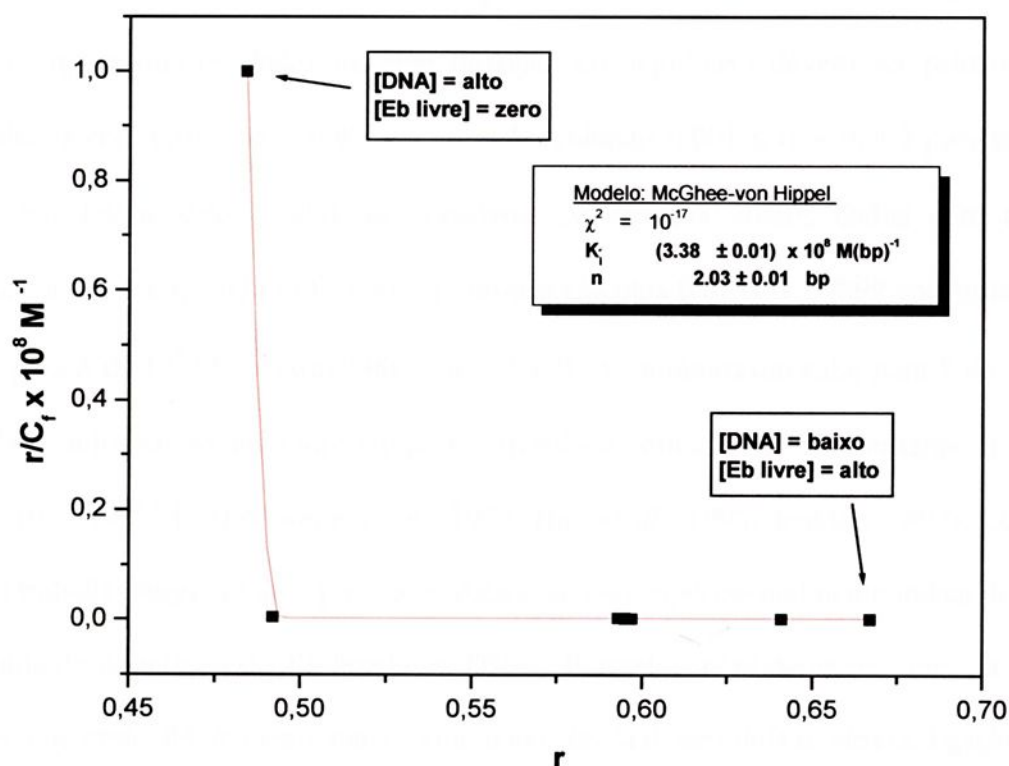


Figura 4.15: Análise dos dados de absorção por fotoacústica A_{PAS} em 480 nm da ligação do etídio com o ct-DNA. Dados são plotados com r/C_f contra r em cada ponto da titulação. O método não linear de McGhee-von Hippel exclui os sítios para $0.001 \leq \alpha \leq 0.999$.

A partir dos dados da figura 4.15, aplicando-se o modelo de McGhee-von Hippel conseguimos determinar o valor para k e n . O valor encontrado para $K = 3,38 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ e

$n = 2,03$ pb. Na literatura encontramos um valor para K de $9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Das *et al.*, 1999), no entanto, no trabalho realizado por Das não foi utilizado o ct-DNA, mas o sistema poli[d(G-C)], e este tipo de polímero pode ser menos reativo ao Eb do que o ct-DNA, já que este tem em sua estrutura composta tanto por pares de base G-C quanto A-T. Encontramos na literatura um outro valor para essa constante de ligação, $2,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Gaugain *et al.*, 1978), que aproxima-se mais do nosso sistema. No entanto permanece a questão a respeito da precisão desses valores pois, não é mencionado pelos autores a possibilidade do Eb ter dois modos de ligação ao DNA. O trabalho de Jenkins (Jenkins, 1997), sugere que os dados de uma titulação em equilíbrio devem ser primeiramente calculados com $0,01 \leq \alpha \leq 0,99$ e com muito cuidado $0,001 \leq \alpha \leq 0,999$ porque podem estar envolvidos erros muito significativos. Analisamos nossos dados com as duas variações de α , e quando utilizamos em nossos cálculos $0,01 \leq \alpha \leq 0,99$ encontramos um valor para K de 10^5 M^{-1} , e com $0,001 \leq \alpha \leq 0,999$ encontramos um valor para K de 10^9 M^{-1} . Também achamos na literatura citações e trabalhos com o valor da constante de ligação entre $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (Loontjens *et al.*, 1990; Haq *et al.*, 1995; Jenkins, 1997). Como em nosso trabalho surgiram dois pontos isobélicos, isto experimentalmente indica dois tipos distintos de população do Eb ligado ao DNA. Portanto, consideramos que os nossos dados registram de maneira mais clara a existência desses dois modos de ligação e que já se tinha indícios desde 1967 (Le Pecq and Paoletti, 1967), sem uma evidência experimental aceitável. Com o intuito de verificar a existência dos dois modos de ligação do Eb ao DNA, realizamos titulações com SDS, cujos resultados estão apresentados a seguir.

4.2.2 Titulação de SDS

Em solução aquosa o Eb exibe duas bandas de absorção, uma em 285 nm e outra em 480 nm, e uma banda de emissão de fluorescência em torno de 610 nm. O SDS é um surfatante aniônico. A concentração da força iônica em 150 mM de NaBr em uma solução contendo água, diminui a concentração micelar crítica (cmc) do SDS de ~ 8 mM em força iônica zero (Pal *et al.*, 1998) para ~ 1 mM (Hunter, 1992). Assim, a interação do SDS com o complexo DNA-Eb, é eletrostática e hidrofóbica, e em seguida, atingindo a cmc, teremos a micela interagindo com o Eb, e não o monômero de SDS, tendo assim o ambiente micelar hidrofóbico favorável ao Eb.

Estudo recente (Pal *et al.*, 1998), indica que quando adiciona-se SDS ao Eb, abaixo da cmc, a absorbância do Eb diminui e a intensidade de emissão de fluorescência também diminui na mesma proporção, mas o rendimento quântico do Eb, em relação a água permanece inalterado. A diminuição da intensidade da absorbância é esperada, porque a formação do complexo associado, envolvendo o cátion do etídio e o ânion do SDS, resulta na precipitação do complexo na solução. Acima da cmc do SDS, a absorbância do Eb aumenta gradativamente, indicando um aumento na solubilização do Eb na água, após a formação das micelas, deslocando as bandas para 292 nm e 512 nm. O aumento do tempo de vida do Eb livre de 1,7 ns para 5 ns na presença do SDS acima da cmc, indica que devido o Eb possuir carga positiva, o íon do Eb liga-se fortemente a micela aniônica do SDS, com o aumento da emissão de fluorescência quando está em um ambiente micelar. Estas informações indicam uma interação do Eb com o SDS, que nos levou a escolha do SDS na titulação do complexo DNA-Eb.



Após a ultima titulação de DNA cuja concentração é 11,06 mM de DNA, o sinal fotoacústico não apresentou mais nenhuma alteração, passamos a titular com SDS, com valores que variaram de 0 a 30,98 mM de SDS. O resultado dessa titulação está apresentado na figura 4.16. Nas curvas em vermelho, nota-se que com a titulação do SDS, temos um acréscimo na intensidade do sinal fotoacústico.

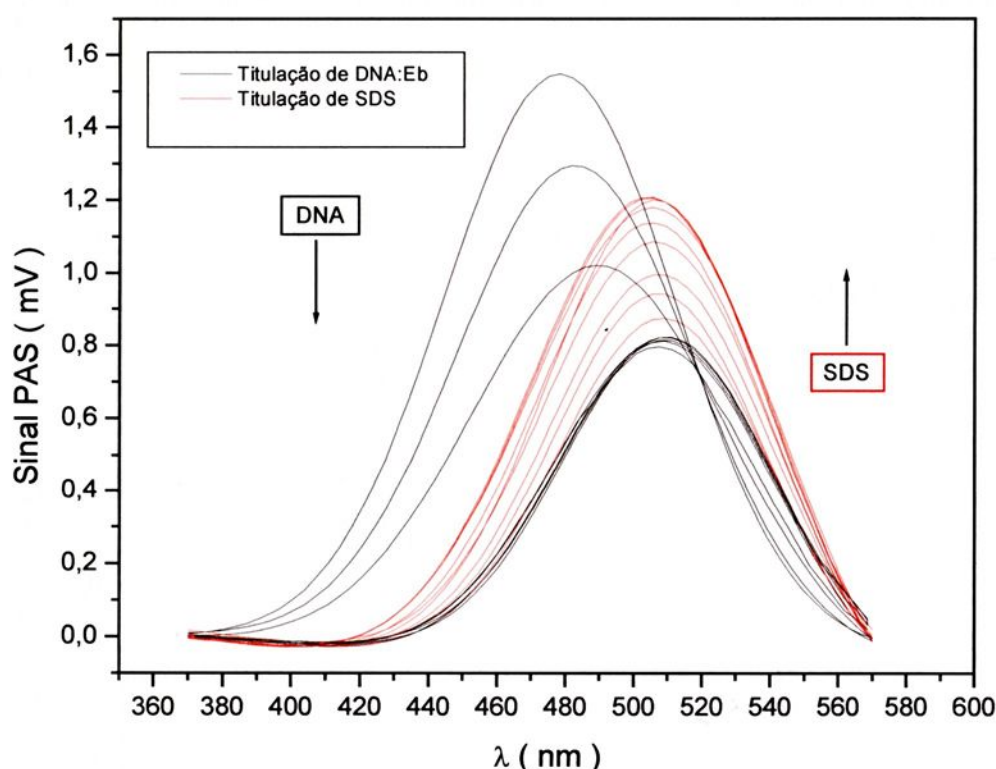


Figura 4.16: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico para a titulação de DNA ao Eb, e uma titulação de SDS ao complexo DNA-Eb em 150 mM de NaBr.

A figura 4.17, mostra em separado as intensidade das titulações de SDS, com uma pequena variação de 5 nm. A partir de 21,48 mM de SDS não temos mais mudança da intensidade do sinal fotoacústico, isto representa o total de Eb removido pelo SDS. Estes dados portanto, fornecem indícios de que o SDS está removendo algumas moléculas de

etídios do DNA. Assim temos uma dissociação do etídio ligado fracamente ao DNA, e a constante de dissociação pode ser calculada pela intensidade do sinal fotoacústico em um determinado comprimento de onda.

As medidas de PAS, com o SDS acima da cmc, não interferem no sinal. O espalhamento gerado acima da cmc, que é um grande problema em outras técnicas de espectroscopia, como na fluorescência, aqui não se faz presente, pois a detecção do sinal fotoacústico é proveniente do decaimento não radiativo, que é uma medida indireta do sistema.

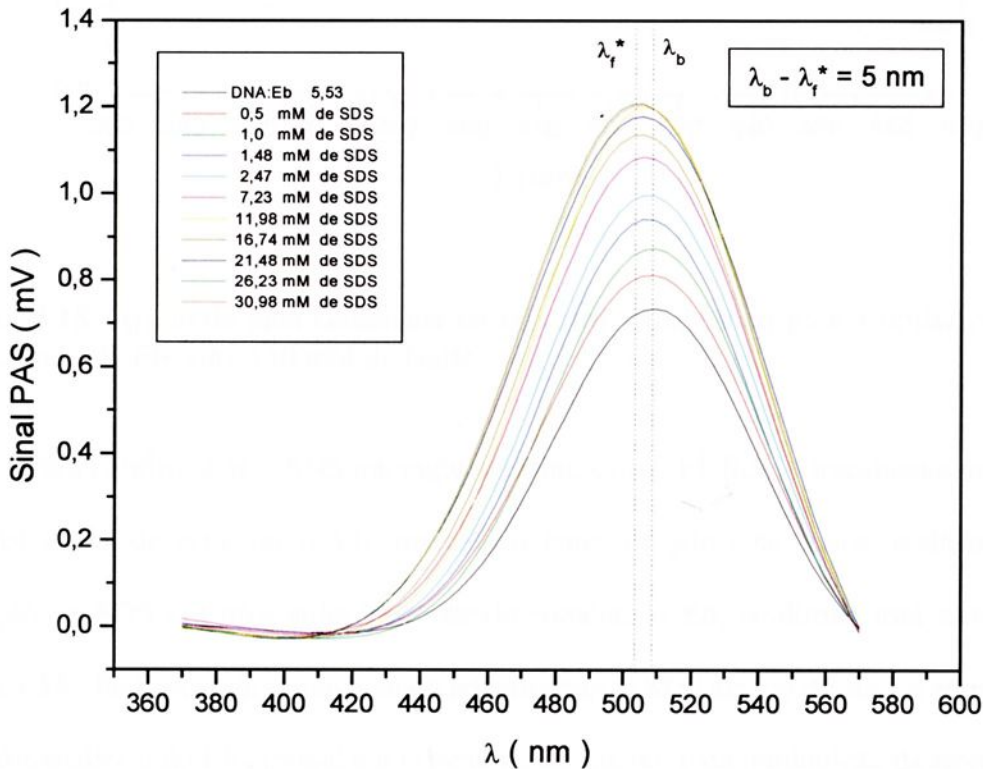


Figura 4.17: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico para a titulação de SDS ao complexo DNA-Eb, 11,06 mM de DNA e 2,0 mM de Eb, e 150 mM de NaBr.

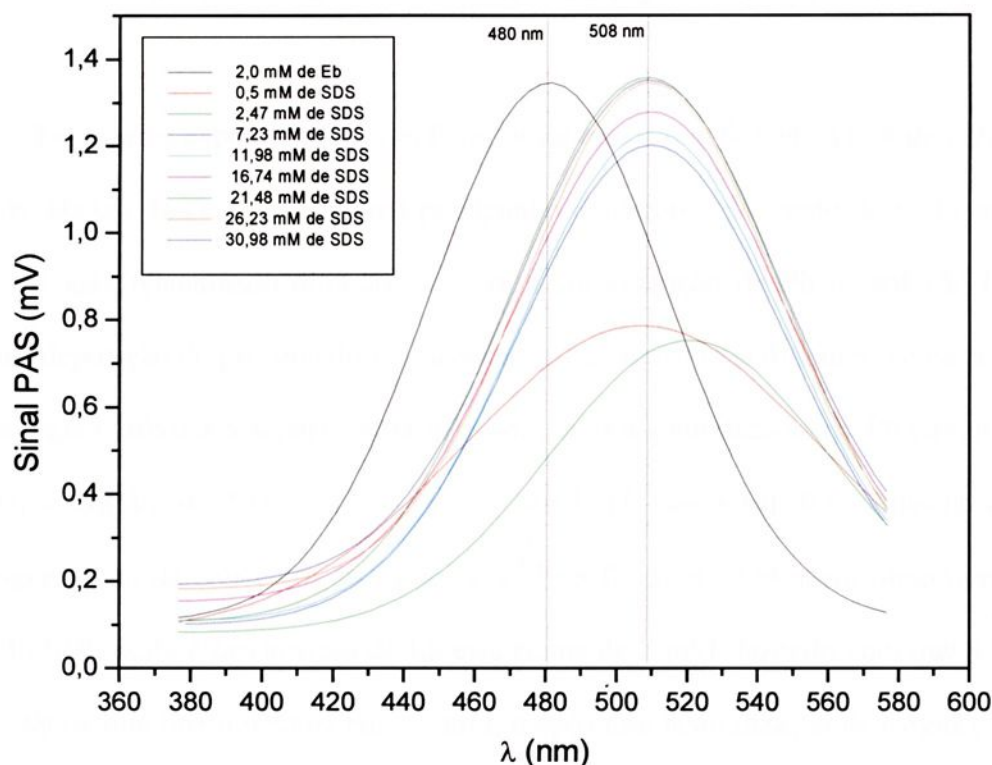


Figura 4.18: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico para a titulação de SDS em 2,0 mM de Eb com 150 mM de NaBr.

Para confirmar se o SDS interagiu somente com o Eb ligado fracamente no DNA, e não foi capaz de remover o Eb intercalado entre os pares de bases, realizamos uma titulação de SDS em uma solução contendo somente o Eb, conforme está mostrado na figura 4.18. Podemos notar que quando adicionamos o SDS abaixo da cmc, a amplitude do sinal fotoacústico do Eb diminui em relação ao Eb inicial. Esta diminuição da amplitude do sinal é esperada, já que a formação dos complexos envolvendo o cátion do Eb e o ânion do SDS na solução induz a precipitação destes. Para concentrações de SDS acima da cmc, a amplitude aumenta gradativamente, indicando um aumento na solubilização do Eb na solução. A amplitude do Eb alcança o seu valor máximo, correspondente ao valor máximo

do Eb livre, indicando que todo o Eb disponível na solução está interagindo com a micela de SDS. A amplitude também exibe um deslocamento para o vermelho de 480 nm para 508 nm.

Em nossos experimentos com PAS, observamos que durante a fase de precipitação, ou seja, abaixo da cmc, o complexo precipitado deposita-se no fundo do porta amostra. O sinal PA está relacionado diretamente com a concentração de Eb na solução (Eq. 4.6), assim a deposição do precipitado no fundo do porta amostra vai diminuir a concentração de Eb na região próxima a superfície da solução. Após a solubilização do Eb com o aumento da concentração de SDS na solução, a amplitude do sinal PA aumenta devido a homogeneização da concentração na solução. Pela figura 4.18 também observamos que a cmc do SDS nesta concentração de Eb está acima de 2 mM, fazendo com que a interação eletrostática seja predominante até ~ 2 mM, e após esta neutralização de cargas o efeito da cmc começa a se manifestar, visualizado pelo aumento da amplitude do sinal PA.

A figura 4.19 mostra a intensidade de fluorescência da titulação de SDS ao Eb, e a intensidade de fluorescência do Eb livre e intercalado no DNA. Na figura 4.19 (A) podemos notar que quando adicionamos SDS na solução abaixo da cmc o efeito observado na absorbância também acontece com o sinal de fluorescência, ou seja, diminuição da intensidade do sinal devido a fase de precipitação. Quando a concentração de SDS começa a atingir a cmc, a amplitude do sinal de fluorescência volta a crescer, ou seja, a fase de solubilização, com uma variação de 5 nm para o vermelho. Pela figura também podemos inferir que a cmc do SDS em 50 μ M de Eb em 150 mM de NaBr está entre 450 μ M e 650 μ M. A figura 4.19 (B) mostra a intensidade de fluorescência do Eb livre e intercalado ao DNA. Este experimento foi necessário para comparar as intensidades do sinal dos complexos SDS-Eb e DNA-Eb (figura 4.19 C).



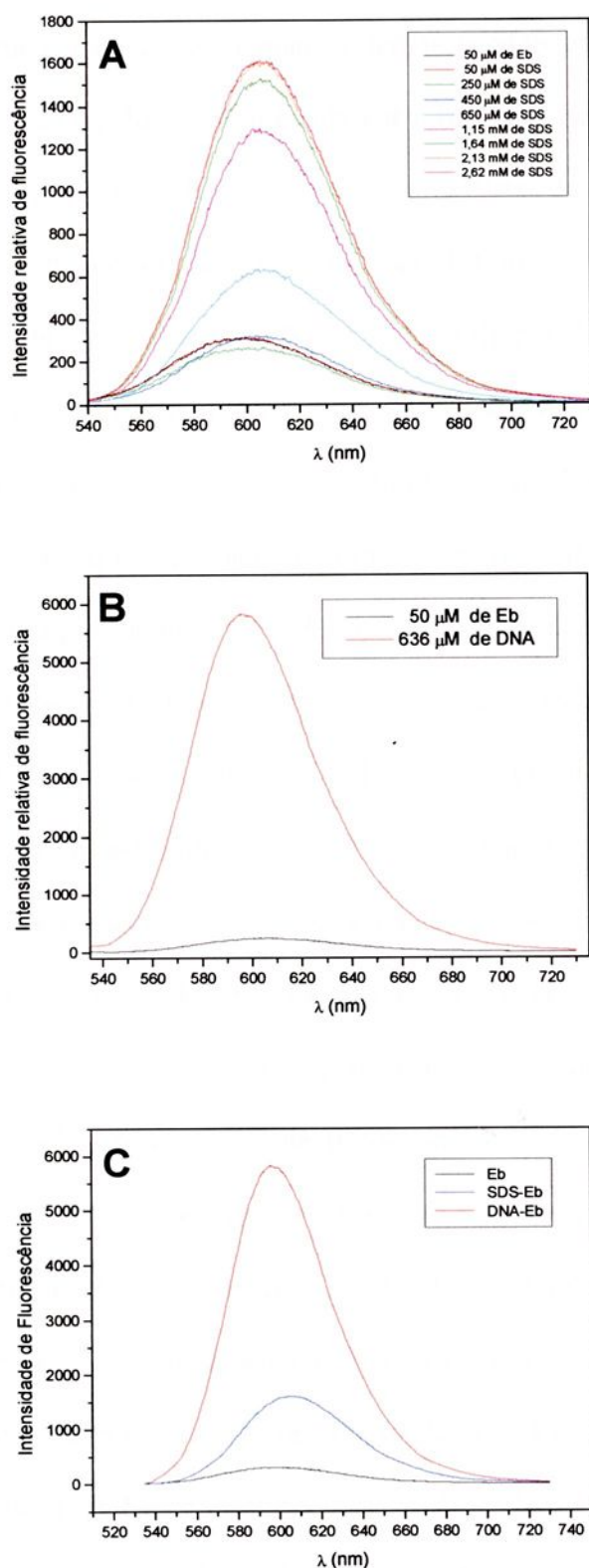


Figura 4.19: Intensidade de fluorescência de 50 μM de Eb com 150 mM de NaBr. (A) Titulação de SDS, e (B) intensidade do Eb livre e intercalado no DNA, e (C) comparação das intensidades de fluorescências do Eb, SDS-Eb e DNA-Eb.

Das intensidades de fluorescência da figura 4.19 (A e B), temos uma intensidade de fluorescência aumentada 5,2 vezes quando temos o SDS interagindo com o Eb, e passando para 19 vezes quando o Eb intercala entre os pares de bases do DNA. Estas diferenças mostram que apesar do Eb aumentar a intensidades de fluorescência e deslocar 28 nm em ambos, os ambientes do SDS e do DNA são distintos.

Os resultados obtidos com a titulação de SDS ao Eb por PAS e fluorescência estão de acordo com os dados obtidos por absorbância e fluorescência por Pal (Pal *et al.*, 1998). Uma questão pode ser levantada quanto a diminuição da amplitude do sinal na fase de precipitação nas técnicas aqui exploradas e comentadas, ou seja, a PA, absorbância e a fluorescência. A diminuição da amplitude do sinal pode estar relacionada simplesmente à diminuição da concentração da amostra dentro da área da solução na qual é feita a coleta dos dados em cada técnica. Após a interação do Eb com o SDS abaixo da cmc, temos uma neutralidade de cargas associada com a hidrofobicidade de ambas, que acaba provocando a precipitação, e consequentemente o complexo acaba depositando-se no fundo.

Analisando as figuras 4.18 e 4.19 quanto aos decaimentos não radiativos e radiativos, podemos relacionar através de cada técnica o comportamento da interação SDS-Eb. Primeiramente, analisando os dados de fluorescência (Fig. 4.19 A) quando temos a interação do Eb com o SDS, temos uma interação que é eletrostática e hidrofóbica a qual predomina até o momento de equilíbrio entre Eb e SDS, logo após começa o agrupamento de mais monômeros de SDS com a primeira interação de Eb e SDS. Assim, começa a mudar o ambiente do Eb com a formação de micelas de SDS. Então temos uma intensidade de fluorescência inicial que diminui devido a interação eletrostática e hidrofóbica, e que começa aumentar com o aumento de SDS na solução, devido a formação de um ambiente mais hidrofóbico para o Eb.



O aumento de 5,2 vezes da intensidade de fluorescência do Eb (Fig. 4.19 C) e do deslocamento de 28 nm (Fig. 4.18), indica que devido o Eb possuir carga positiva, o íon do Eb liga-se fortemente a micela aniônica do SDS. O ambiente micelar do SDS faz com que a intensidade de fluorescência do Eb aumente. Isto também ocorre quando titulamos Eb ao DNA, pois o ambiente hidrofóbico entre os pares de base também faz com que a intensidade do sinal de fluorescência aumente 19 vezes (Fig. 4.19 C). Em relação a amplitude do sinal do Eb em PAS diminuir com as duas primeiras adições de SDS também está relacionado a interação eletrostática e hidrofóbica, e em consequência sua precipitação. A partir do aumento da concentração de SDS na solução, começa a criar um ambiente mais hidrofóbico e a amplitude do sinal PAS começa a aumentar, devido a diminuição da concentração da população que estava precipitada, também confirmado por manter o deslocamento espectral em 508 nm. As espectroscopia de fluorescência e fotoacústica são complementares, portanto devido a titulação de SDS ao Eb enquanto o sinal de fluorescência aumenta (Fig. 4.19 A), o sinal de PAS deveria diminuir (Fig. 4.18), no entanto ocorre um aumento alcançando o valor do Eb livre. Este efeito representa apenas a homogeneização da solução. A interação de Eb com o SDS, e o Eb com o DNA são bem distintas. Quando o Eb intercala com o DNA, ele não interage eletrostaticamente com as bases do DNA, apenas pelo ambiente mais hidrofóbico proporcionado por elas que é mais favorável ao Eb. Enquanto que o Eb e o SDS tem primeiro uma interação eletrostática e hidrofóbica, e que depois com o aumento da concentração de SDS na solução proporciona um ambiente mais hidrofóbico, qual permite um aumento na fluorescência. O deslocamento do espectro de fotoacústica para o vermelho caracteriza uma nova ligação do Eb, ou seja, de mais baixa energia.

O Eb possui dois anéis, o anel principal chamado fenantridina e o anel secundário fenil que está perpendicular ao anel principal. Na interação do SDS ao Eb podemos associar que um dos dois anéis do Eb está inserido na micela de SDS, mas não podemos afirmar qual deles. Levando em conta a intensidade de fluorescência do complexo SDS-Eb ser ~ 4 vezes menor do que o complexo DNA-Eb podemos inferir que provavelmente o anel secundário fenil esteja inserido na micela de SDS.

Assim os decaimentos dos processos não radiativos da interação do Eb com o SDS não são alterados, mantendo o rendimento quântico $\phi_{PAS} \sim 0,10$, enquanto que na fluorescência a transferência do próton do grupo amina do Eb é inibido após a intercalação entre os pares de bases do DNA, fazendo com que a energia tenha um relaxamento mais intenso pelo processo radiativo.

De acordo com os pontos isosbéticos obtidos nas figuras 4.12 e 4.13, temos indício experimental de dois modos de ligação do Eb ao DNA. A literatura confirma o que foi obtido, sugerindo que o Eb têm duas possibilidade de ligar-se ao DNA. O modo clássico é a intercalação e no segundo o sítio de ligação será o grupo fosfato (Le Pecq and Paoletti, 1967; Douthart *et al.*, 1973; Yguerabide and Ceballos, 1995; Byrne and de Mello, 1998). Se de fato o SDS é capaz de remover o Eb do DNA, isto pode ser checado através do comportamento da intensidade do sinal fotoacústico. É bem conhecido na literatura as propriedades fluorescentes do Eb ao ligar-se ao DNA. O sinal de fluorescência torna-se mais intenso após essa interação, em contrapartida o sinal fotoacústico tende a diminuir como é demonstrado pela figura 4.13. A partir do momento em que o SDS é adicionado ao complexo DNA-Eb espera-se que ocorra o inverso do acima mencionado, ou seja, a intensidade do sinal fotoacústico aumenta com o aumento da concentração de SDS, como

mostra a figura 4.17. Isto representa que o Eb complexado ao DNA está sendo removido do DNA e reagindo ao SDS. Esta reação de dissociação pode ter sua constante determinada a partir da seguinte expressão:

$$\alpha_i = \frac{A_{PASf}^* - A_{PAS}^i}{A_{PASf}^* - A_{PASb}} \quad (4.18)$$

onde A_{PASf}^* e A_{PASb} são as medidas da amplitude do sinal fotoacústico do etídio removido e intercalado ao DNA. O α tem uma variação de 1 a 0, enquanto A_{PAS}^i tem uma variação entre A_{PASb} e A_{PASf}^* .

Uma das funções biológicas de muito biopolímeros é a de se ligar em pequenas moléculas, assim um entendimento dos mecanismos destas interações é muito importante na compreensão destes sistemas biológicos. Na maioria dos casos, estas interações envolvem a formação de algum tipo de ligação não covalente entre a pequena molécula ou íon, que são chamados de ligantes, e alguma região específica ou mesmo próximo a superfície da macromolécula, que são chamados de sítios de ligação. De modo geral, todas as medidas de processos de equilíbrio de ligações são indiretas, nas quais não podemos observar diretamente qual macromolécula tem ligantes ligados em seu sítio de ligação. Na maioria dos casos, tudo o que podemos medir é a fração de todos os ligantes que estão na solução e estão ligados ou o número de sítios de ligação que estão ocupados.

Para descrever o mais simples mecanismo de interação, onde temos uma molécula P que tem somente um único sítio de ligação para o ligante A (van Holde *et al.*, 1998), podemos usar a relação:



Com sua constante de ligação definida como:



$$K = \frac{[PA]}{[P][A]} \quad (4.19)$$

onde [] é a concentração molar, e [A] representa a concentração do ligante livre na solução. Também podemos pensar que a reação do processo de dissociação do ligante pode ser dada como:



e que também pode ser escrita em termos da constante de dissociação:

$$K_d = \frac{[P][A]}{[PA]} \quad (4.20)$$

assim,

$$K_d = 1/K \quad (4.21)$$

Assim podemos expressar o resultado em termos de um parâmetro experimental de acessibilidade $\bar{\nu}$, definido como sendo o número médio de moléculas ligadas por macromoléculas. Deste modo, desde que o número de moles da molécula ligada por unidade de volume é igual a [PA], e o número total de moles da macromolécula por unidade de volume é dado pela soma de ([P] + [PA]), temos que:

$$\bar{\nu} = \frac{[PA]}{[P] + [PA]} \quad (4.22)$$

Podemos reescrever a equação 4.22 usando a equação 4.19,

$$\bar{\nu} = \frac{K[P][A]}{[P] + K[P][A]} = \frac{K[A]}{1 + K[A]} \quad (4.23)$$

desde que para um único sítio, $\bar{\nu}$ é igual a fração de saturação θ , assim temos também para a equação 4.23 descrita para $\bar{\nu}$ contra [A] como uma função que caracteriza uma hipérbole retangular, como mostra a figura 4.23.

$$y = a \frac{bx}{1+bx} \quad \Leftrightarrow \quad \theta = \frac{K[A]}{1+K[A]} \quad (4.24)$$

assim podemos deduzir que: $\bar{\nu} \rightarrow 1$ (saturação) somente quando $[A] \rightarrow \infty$. Quando temos $\bar{\nu} = 0,5$, temos também $[A] = 1/K$. Agora também podemos rescrever a equação 4.23 em termos da constante de dissociação, e também teremos $[A] = K_d$ em $\bar{\nu} = 0,5$.

$$\bar{\nu} = \frac{[A]}{K_d + [A]} \quad (4.25)$$

Assim podemos concluir que quando temos uma fração de ligantes ligado, podemos relacionar ao número de moléculas dissociadas. Logo com os dados fotoacústicos temos que,

$$\alpha = \left(1 - \bar{\nu}\right) \quad (4.26)$$

que representa o número de moléculas dissociadas do complexo DNA-Eb.

A figura 4.20, mostra a dissociação do etídio ligado ao DNA com o aumento da concentração de SDS. Quando essa concentração alcança o valor de 2 mM de SDS temos 50 % do etídio ligado fracamente ao DNA removido.

Ajustando os dados em relação a uma hipérbole retangular, encontramos o valor da constante de dissociação K_d . O valor obtido para essa constante foi de $0,43 \pm 0,04$ mM de Eb.

Estudos realizados por Nordmeier (Nordmeier, 1992) com absorção e espalhamento de luz em relação ao modos de ligação do etídio ao ct-DNA evidenciaram dois modos de ligação, onde a intercalação é dominante no processo de ligação em uma condição de saturação de intercalante. O resultado encontrado por Nordmeier foi de que 76 - 80 % das

moléculas de etídeos estavam intercaladas ao DNA. Os nossos resultados indicam também uma forte intercalação do Eb ao DNA em torno de 78,5 %, já que o coeficiente de dissociação, obtido da figura 4.20, nos informa que $21,5 \pm 2$ % dos etídeos ligados externamente foram removidos pelo SDS.

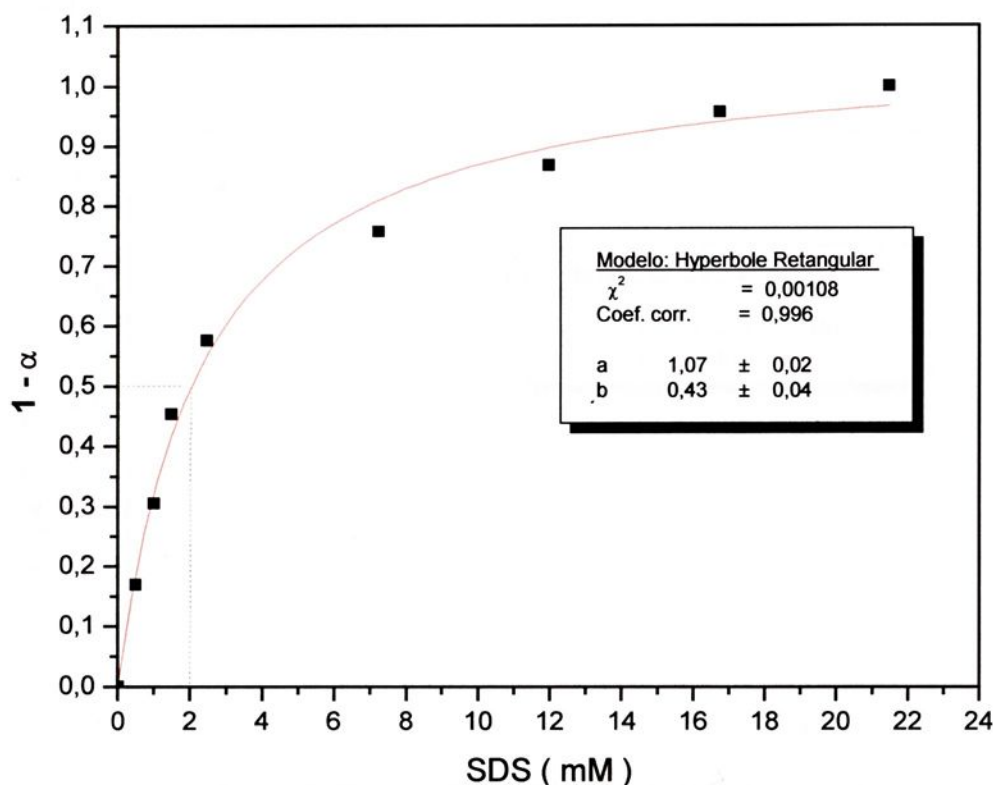


Figura 4.20: Número de moléculas de etídio dissociadas em função da concentração de SDS em 150 mM de NaBr.

As constantes de associação e dissociação quando aplicadas a uma mesma reação de equilíbrio reversível possuem valores recíprocos. Caso esta reação apresente dois modos de ligação, quando o ligante for dissociado, e o valor da sua constante diferenciar do inverso da constante de ligação, temos então mais um indício de dois sítios de ligação e que um deles é mais reativo que o outro. Quando utilizamos da análise de McGhee-von

Hippel, inicialmente foi considerado um único modo de ligação, ou seja, intercalação. Com os dados obtidos a partir da titulação com SDS, uma quantidade de Eb foi removido, restando uma concentração de Eb complexado ao DNA mais fortemente ligado. Essa concentração portanto representa os etídios que estão intercalados ao DNA e portanto deve ter sua concentração corrigida, e simulado por mais uma vez a equação 4.17 de McGhee-von Hippel.

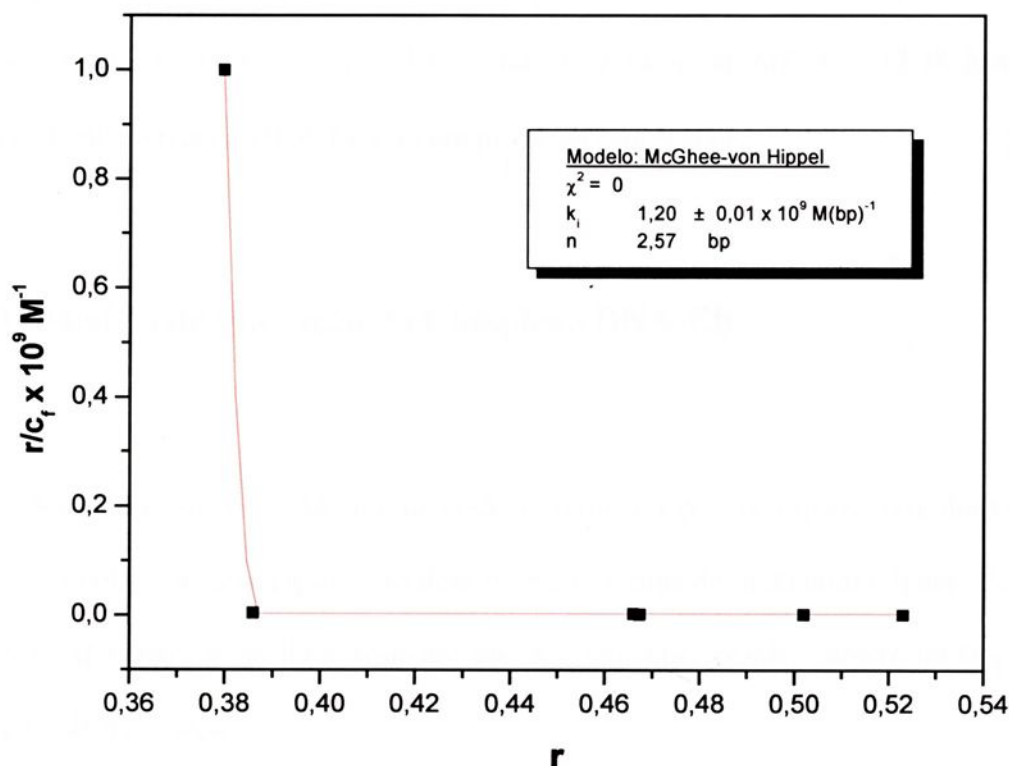


Figura 4.21: Análise dos dados de absorção por fotoacústica A_{PAS} em 480 nm da ligação do etídio com o ct-DNA, corrigidos pela constante de dissociação, pelo método não linear de McGhee-von Hippel que exclui os sítios para $0,001 \leq \alpha \leq 0,999$. Dados são plotados com r/C_f contra r em cada ponto da titulação.

Corrigindo-se a concentração do etídio mais fortemente ligado ao DNA e simulando novamente os dados através do modelo de McGhee-von Hippel, figura 4.21,

obtemos um novo valor para a constante de associação do complexo DNA-Eb, $1,20 \pm 0,01 \times 10^9 \text{ M(bp)}^{-1}$ e o número de pares de bases excluídos pela intercalação do Eb de 2,57.

Com este valor experimental da constante de equilíbrio K obtido com PAS, permite que realizamos um cálculo padrão da energia livre da reação, já que o processo ocorreu em temperatura e pressão constantes. Esta energia livre também chamada de energia livre de Gibbs, é uma combinação da entalpia e da entropia do sistema. A energia livre da reação do complexo DNA-Eb pode ser calculado da clássica relação $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ (Cantor and Schimmel, 1980; Haq *et al.*, 1995), dando o valor de $\Delta G^\circ = -12,38 \text{ kcal mol}^{-1}$, mostrando que a reação DNA-Eb tem um processo espontâneo.

4.2.3 Modelo de interação do Complexo DNA-Eb

Muito dos processos bioquímicos são controlados por interações entre duas ou mais macromoléculas. A associação entre duas moléculas, uma definida como ligante A, e outra molécula M capaz de se ligar somente em A, tem uma reação caracterizada por uma constante de associação K :



$$K = [MA]/[M][A] \quad (4.27)$$

ou uma constante de dissociação $K_d = K^{-1}$. Em uma macromolécula M, tem-se a possibilidade de oferecer um número n de sítios de ligações para o ligante A. O ligante pode ser bastante grande para cobrir vários sítios de ligação, excluindo potencialmente

sítios pela possibilidade de $2n - 1$, ou simplesmente pequeno e modificar a estrutura local de um polímero e excluir seus sítios vizinhos (McGhee and von Hippel, 1974).

Os dados obtidos a partir da análise de McGhee-von Hippel e da dissociação, caracterizam dois prováveis modos de ligação DNA-Eb. Da análise de McGhee-von Hippel obtém-se um valor alto para a ligação, indicando que este tipo de ligação deve ser a de intercalação. Quando o complexo DNA-Eb está na presença de SDS, ocorre a remoção de uma certa quantidade de Eb, a constante obtida tem um valor menor, e isto representa um fraco acoplamento, indicando a interação da molécula de Eb ao grupo fosfato, sendo portanto mais fáceis de serem removidas.

O modelo que propomos para a interação do SDS ao Eb está esquematizado na figura 4.22. A primeira interação é eletrostática e hidrofóbica, onde tem-se um reconhecimento de cargas positivas e negativas, e depois a formação de um precipitado entre o Eb e o SDS, neutralizando as cargas. O Eb e o SDS tornam-se mais hidrofóbicos, onde os dois tentam se proteger mutuamente num único ambiente, o que produz o precipitado. Com o aumento da concentração de SDS na solução, ocorre a solubilização do precipitado e forma-se uma micela de SDS com o Eb ligado fortemente a micela, com a inserção do anel secundário fenil na micela.

Com os dados obtidos pelo método não linear de McGhee-von Hippel, podemos deduzir que o etídio intercala entre dois pares de base, pressionando as bases adjacentes, fazendo com que as bases subsequentes, diminuam o espaçamento entre elas. Assim, é permitida a intercalação do etídio a cada 3 pares de bases, ou seja, deixando de intercalar 2 pares de base para que a próxima intercalação seja possível, conforme está ilustrado na figura 4.23.

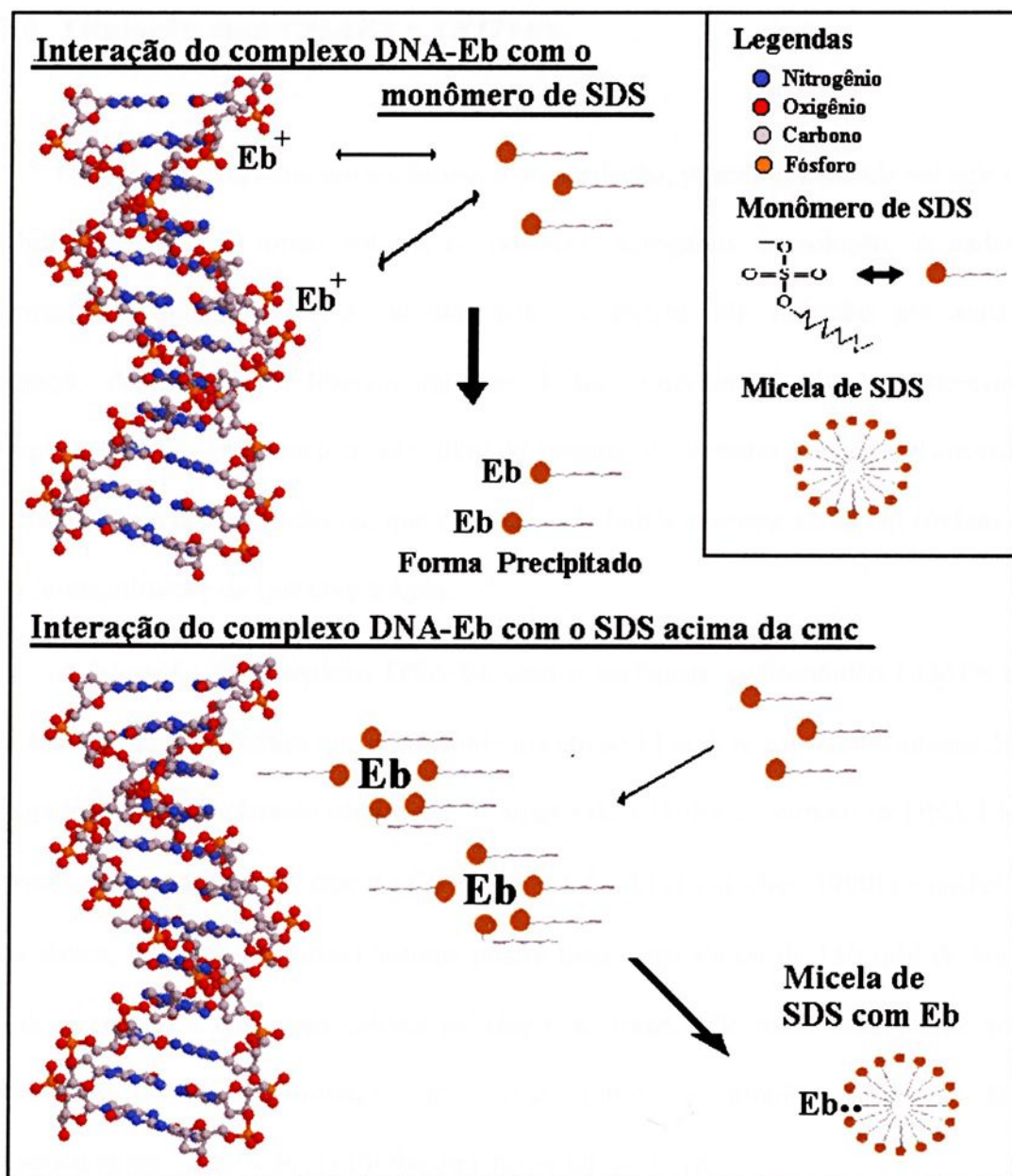


Figura 4.22: Modelo de interação do SDS com o etídio.

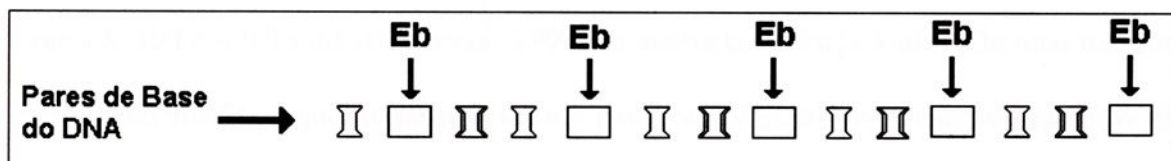


Figura 4.23: Modelo de intercalação do Etídio ao DNA.

4.2.4 Titulação com CHAPS e TRITON

Quando adicionamos um surfatante a uma solução, primeiramente ele vai agir como solubilizador, ou seja tornar solúvel os possíveis agregados da solução. A cadeia de hidrocarbono, quando dispersa em uma solução aquosa, são rodeadas por água. A agregação dessas cadeias liberam algumas destas moléculas de água, aumentando a entropia e diminuindo assim a energia livre do sistema. A estrutura das micelas em solução aquosa tem uma configuração tal, que as cadeias de hidrocarboneto estão em contato entre si preferencialmente do que com a água.

A interação do complexo DNA-Eb com o surfatante zwitteriônico CHAPS conta com a interação eletrostática que comparativamente ao SDS deve ser menos intensa devido a carga líquida do surfatante ser *neutra*. A adição do CHAPS ao complexo DNA-Eb está mostrado na figura 4.24. A cmc do CHAPS é ~ 6,5 mM (Deutscher, 1990) na ausência de força iônica, no entanto o nosso sistema possui uma força iônica de 150 mM de NaBr, e isto deve reduzir a cmc para valores próximos de 1mM. De modo semelhante ao que ocorre com o SDS a formação de micelas junto ao complexo DNA-Eb facilita energeticamente a liberação do Eb fracamente ligado ao DNA.

Na interação do complexo DNA-Eb com o surfatante neutro Triton X-100, figura 4.25, a interação hidrofóbica torna-se mais prevalecente que a eletrostática. A cmc do Triton X-100 é ~ 0,3 mM (Deutscher, 1990) na ausência de força iônica. De uma maneira geral, é um anfifílico que forma micelas e o ambiente hidrofóbico é mais favorável ao Eb que está ligado externamente no DNA.



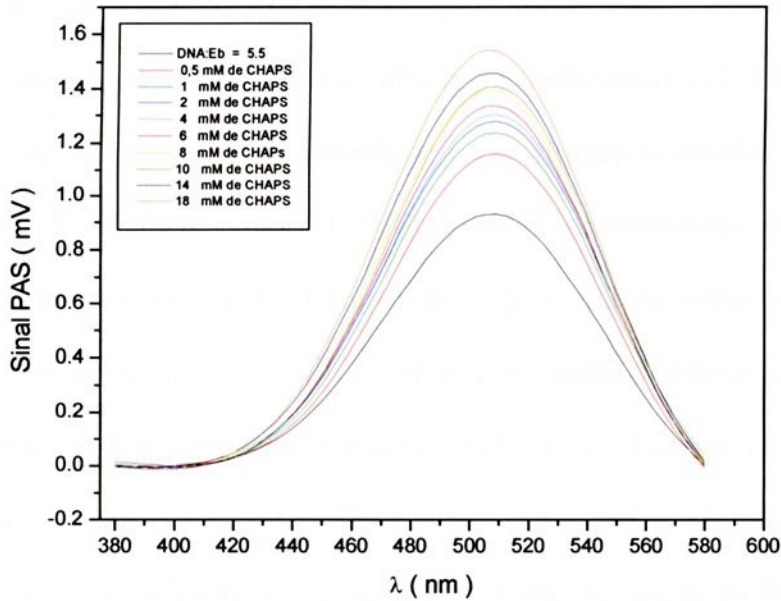


Figura 4.24: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico para a titulação de surfatante zwitteriônico CHAPS ao complexo DNA-Eb. 150 mM de NaBr, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0.

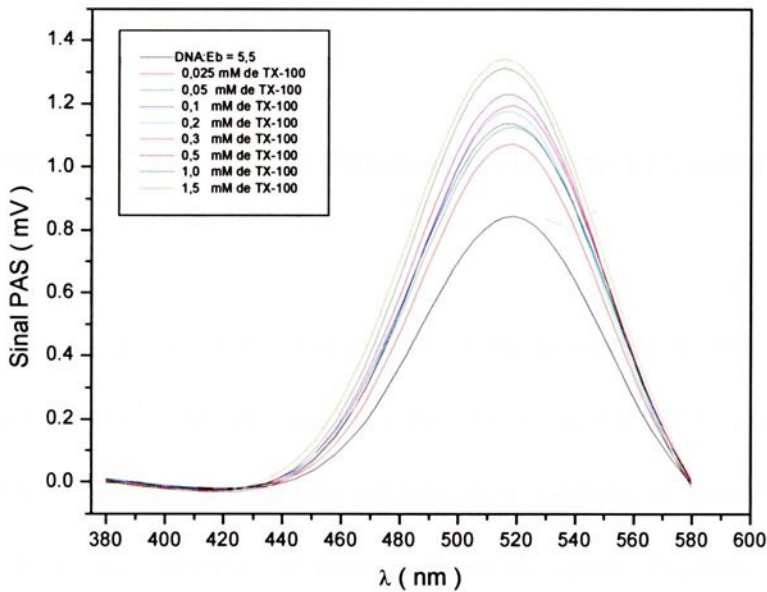


Figura 4.25: Ajuste de uma Gaussiana no espectro fotoacústico para a titulação de surfatante neutro Triton X-100 ao complexo DNA-Eb. 150 mM de NaBr, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,0.

Observando-se o comportamento das curvas de titulação dos surfatantes utilizados, observa-se que com o aumento da concentração dos surfatantes aumenta-se também a amplitude do sinal fotoacústico, numa evidência do deslocamento do Eb ligado ao DNA associando-se ao surfatante. Comparando-se estes últimos resultados da aplicação de CHAPS e Triton X-100 no complexo DNA-Eb ao obtido anteriormente com SDS, observa-se que a intensidade da amplitude alcança valores próximos do etídio na condição livre. Isto nos levou a concluir que o CHAPS e Triton X-100 estão dissociando o Eb do DNA e possivelmente também desnaturando o próprio DNA. Assim do ponto de vista energético, após a remoção completa do etídio do DNA, é mais favorável sua ligação nas micelas do surfatante. A proposta inicial era distinguir os dois modos de ligação do Eb ao DNA, assim foram escolhidos surfatantes, aniônico (SDS), zwitteriônico (CHAPS) e neutro (Triton X-100). Destes resultados obtidos observa-se que o SDS frente ao CHAPS e o Triton X-100, é mais efetivo no processo de dissociação fármaco-DNA.

4.2.5 Rendimento Quântico de Fluorescência por Fotoacústica

O rendimento quântico de fluorescência está associado a razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos pela amostra. Isto mostra que temos um balanço de energia nas propriedades fotofísicas da molécula em relação a condição na qual ela se encontra. A figura 4.7 mostra os decaimentos de uma molécula do estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 , com os possíveis caminhos nos quais a molécula pode relaxar a energia absorvida. Independente do caminho de relaxamento da molécula do seu estado excitado, que é uma propriedade intrínseca de cada molécula em relação a condição que se encontra,

temos uma compensação entre os decaimentos radiativos e não radiativos, ou seja, os decaimentos são complementares.

Quando uma amostra é excitada, o processo de decaimento por fluorescência gera pouco ou até nenhum sinal fotoacústico. Quando comparamos o sinal de uma amostra não fluorescente com uma fluorescente, teremos menos calor sendo gerado pela amostra fluorescente. Assim podemos relacionar a intensidade do sinal de uma amostra fluorescente com uma amostra menos fluorescente pela área da curva, logo:

$$\phi_{FI} + \phi_{NR} \approx 1 \quad (4.28)$$

onde ϕ_{FI} e ϕ_{NR} são a eficiências quântica de fluorescência e a eficiência da conversão de fótons absorvidos em calor, respectivamente. Podemos obter o rendimento quântico de fluorescência por fotoacústica, calculando os decaimentos não radiativos totais da molécula. Onde temos que,

$$\phi_{FI} \approx 1 - \phi_{NR} \quad (4.29)$$

Na figura 4.26, temos a eficiência quântica (ϕ_{PAS}) por fotoacústica do brometo de etídio livre e intercalado ao DNA em 150 mM de NaBr. A eficiência quântica foi calculada pela área da curva de cada espectro.

Com os dados do rendimento quântico de fluorescência por fotoacústica, figura 4.26, podemos calcular o rendimento quântico da molécula, usando a equação 4.29. Da figura 4.4 temos $\phi_{FI} = 0,90$ e da figura 4.26 o $\phi_{PAS} = 0,13$, substituindo o valor de ϕ_{PAS} na equação 4.29 podemos achar ϕ_{FI} por fotoacústica, assim temos que:

$$\phi_{FI} \approx 1,0 - 0,13$$

$$\phi_{FI} \approx 0,87$$

Dos dados obtidos dos rendimentos quânticos pelas duas técnicas, temos uma comparação mostrada na tabela 4.2.

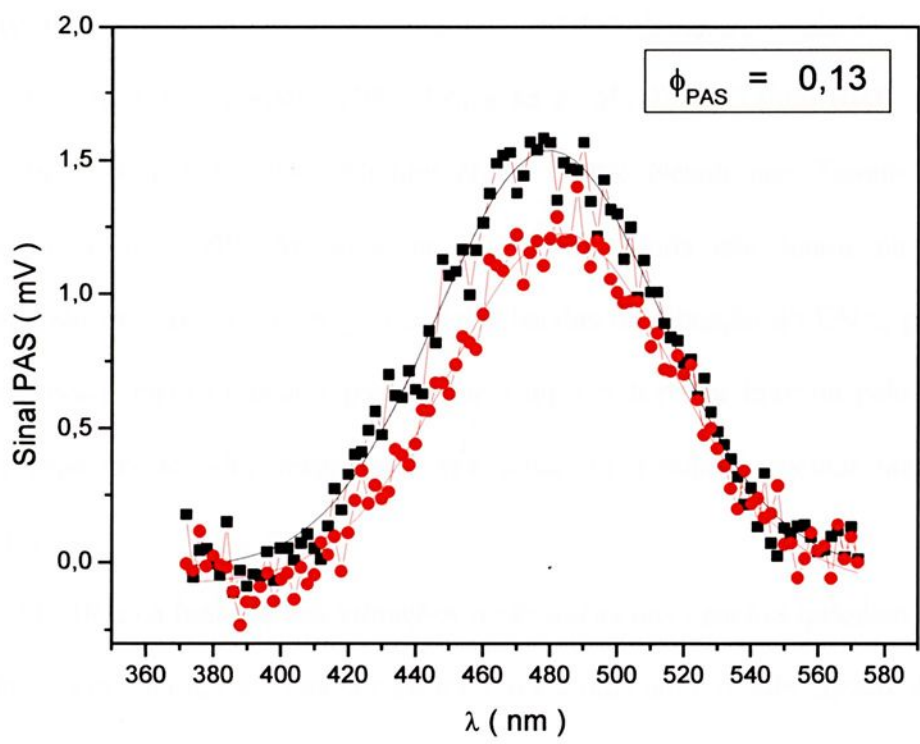


Figura 4.26: Intensidade do sinal fotoacústico e um ajuste por uma Gaussiana do brometo de etídio em função do comprimento de onda, livre (■ - ■ - ■ - ■ - ■ - ■) e intercalado ao DNA (● - ● - ● - ● - ● - ●). 2,0 mM Eb 0,86 mM de DNA e 150 mM de NaBr; a eficiência quântica $\phi_{PAS} = 0,13$.

Tabela 4.2: Comparações dos rendimento quânticos obtidos por fluorescência e fotoacústicos.

Por fluorescência	$\phi_{FI} \approx 0,90$	e	$\phi_{NR} \approx 0,10$
Por fotoacústica,	$\phi_{FI} \approx 0,87$	e	$\phi_{PAS} \approx 0,13$

4.3 MEDIDAS DE FTIR DO COMPLEXO DNA-Eb

A espectroscopia de FTIR já está bem estabelecida para a análise estrutural de biomoléculas. O uso desta espectroscopia com o DNA demonstra resultados relativamente congruentes (Alex and Dupuis, 1989; Fritzsche *et al.*, 1993; Tajmir-Riahi *et al.*, 1995; Liquier and Taillandier, 1996; Medina *et al.*, 1998; Neault and Tajmir-Riahi, 1999; Dovbeshko *et al.*, 2000; Arakawa, *et al.*, 2000). Ainda não temos na literatura o assinalamento padrão para as frequências das bandas de vibração do DNA, porque temos vários métodos sendo utilizados para tentar romper a barreira imposta pela absorção da água no espectro de infra vermelho e relacionar um resultado melhor numa condição fisiológica.

O FTIR está baseado nas vibrações moleculares das ligações químicas, onde temos várias formas de vibrações como por exemplo o estiramento e o dobramento. As vibrações de um conjunto de grupos atômicos apresentam grande interesse em bioquímica e biofísica, nos quais temos: $C=O$, $-COOH$, COO^- , $O-H$, $S-H$, $O-P-O$, $O-H$, $N-H$ e $C-H$. A banda de análise do DNA e do complexo DNA-Eb, influenciado pela força iônica foi dividido em 3 regiões considerada de interesse, as bandas na região entre $3800 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ (região de estiramento das vibrações $O-H$, $N-H$ e $C-H$), entre $1800 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ (região das vibrações das bases), e entre $1350 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ (região de vibração dos grupos fosfatos).

O método de tela onde o filme de DNA é formado, introduz uma nova metodologia na análise da interação da molécula de DNA, do complexo DNA-Eb e a influência da força iônica sobre este complexo. Na literatura especializada não se encontra referência a esta metodologia, sendo este trabalho pioneiro em sua aplicação. Algumas das bandas

assinaladas nesta nova metodologia são corroboradas por trabalhos anteriores. No entanto alguns deslocamentos são encontrados, isto deve-se principalmente ao efeito da superposição das bandas de vibração da água com as bandas de vibração da macromolécula.

A amostra forma um filme fino no cartão de transmitância mantendo a água estrutural e a camada de solvatação preservando o DNA na condição nativa após o processo de secagem com a sílica gel. A condição nativa do DNA foi checada monitorando-se a banda de absorção em 260 nm do DNA em solução e comparada com a banda de absorção do filme de DNA ressuspendido na mesma solução tampão, mostrado na figura 4.27. A condição de solvatação foi confirmada medindo-se a umidade relativa do ambiente onde os filmes foram feitos. Estimamos que a quantidade de água presente na amostra está em torno de 5 % de umidade relativa, na qual foi medida com um higrômetro. A contribuição da vibração da água estrutural é percebida nos filmes pela presença do alargamento da base da banda na região de $1720 - 1580 \text{ cm}^{-1}$.

O método aqui utilizado da tela de transmitância, tem uma vantagem em relação ao método que utiliza as pastilhas prensadas de KBr, porque não induz pressão a biomolécula. Apesar da frequência das bandas vibracionais diferir um pouco do método tradicional de transmitância com janelas de CaF_2 , temos uma banda característica da conformação da dupla hélice do B-DNA marcada na literatura em 1225 cm^{-1} , isto confirma a estabilidade e conformação do DNA.



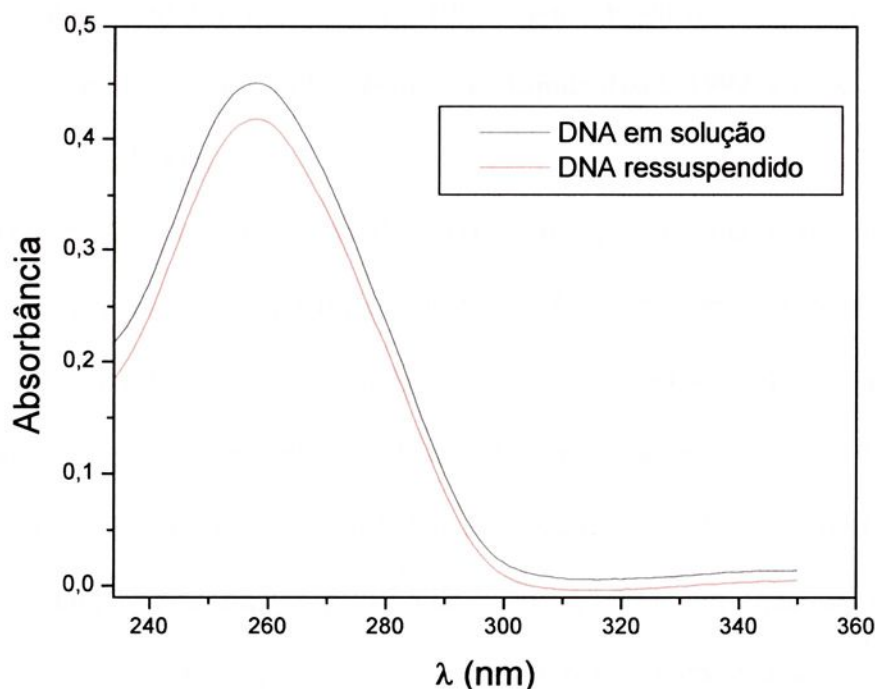


Figura 4.27: Espectro de absorção do DNA em solução e do filme de DNA ressuspendido, em 150 mM de NaBr.

As figuras 4.28, 4.29 e 4.30 mostram as modificações estruturais do complexo DNA-Eb obtidas com o filme de DNA, causadas pela titulação de NaBr em duas razões molares: DNA:Eb igual a 1 (Fig. 4.28) e DNA:Eb igual a 5 (Fig. 4.29 e 4.30), na qual correspondem a 400 μ M e 2mM de DNA, respectivamente. As figuras mostram o espectro de referência do DNA (a), do complexo DNA-Eb sem NaBr (b), e na presença de uma titulação de NaBr (c-f). A tabela 4.3 mostra as frequências das bandas de vibração correspondentes aos grupos de interesse.

Mudanças foram observadas no espectro de FTIR do filme de DNA-Eb com a titulação de NaBr em relação ao filme de DNA na região de 3800 – 2300 cm^{-1} que correspondem as vibrações de estiramento das ligações O–H, N–H e C–H. Assim

como as bandas de vibração das bases e dos grupos fosfatos na região de 1800 – 1000 cm^{-1} (Alex and Dupuis, 1989; Fritzsche *et al.*, 1993; Tajmir-Riahi *et al.*, 1995; Liquier and Taillandier, 1996; Medina *et al.*, 1998; Neault and Tajmir-Riahi, 1999; Dovbeshko *et al.*, 2000; Arakawa, *et al.*, 2000).

As mudanças ocorridas na região de 3800 – 2300 cm^{-1} na qual correspondem as vibrações de estiramento, como mostra as figuras 4.28 e 4.29, temos uma mudança da frequência de vibração de 34 cm^{-1} na banda de 3191 cm^{-1} , e 41 cm^{-1} na banda de 3187 cm^{-1} , que corresponde a razão molar de 1 e 5, respectivamente, nas quais temos sua designação como sendo o estiramento simétrico das ligações $N-H$. Nesta mesma região tivemos uma mudança de 12 cm^{-1} na posição da banda em 2997 cm^{-1} que está designada pela literatura como sendo a ligação $C-H$ dos anéis da base (Dovbeshko *et al.*, 2000). As mudanças em torno de 34 cm^{-1} e 41 cm^{-1} nas bandas de vibração em 3191 cm^{-1} e em 3187 cm^{-1} respectivamente, que é bastante significativa em FTIR, mostram uma mudança na estrutura do DNA. A partir destas análises, podemos concluir que a estrutura do DNA sofre mudança quando o complexo DNA-Eb é submetido a ação da força iônica. Para as bandas de vibração que aparecem em 3176 cm^{-1} e em 3177 cm^{-1} na primeira titulação de NaBr em ambas razões molares, não conseguimos relacioná-las a alguma vibração específica, mas supomos que pode estar relacionado a uma interação da nuvem eletrônica do Eb com a ligação NH da base. Esta ligação poderia estar causando uma nova frequência de vibração desta interação, devido principalmente a diminuição do volume interno entre os pares de bases pela presença do etídio intercalado devido a ação do NaBr nos grupos fosfatos. Mais precisamente poderia estar acontecendo uma repulsão de cargas devido ao próton do grupo amina do Eb, que pode ficar movimentando-se no Eb e criando um potencial repulsivo com as bases. Devido ao espaço entre os pares de bases, acaba-se criando uma força que

interage com a ligação NH da base, que também tem o mesmo potencial repulsivo do Eb. Assim esta repulsão de cargas entre o Eb e os pares de bases em 10 mM de NaBr corrobora os resultados obtidos para o tempo de vida do estado tripleto do Eb, no qual é relativamente longo em relação as outras concentrações de NaBr.

O espectro do filme de DNA mostra uma série de bandas de vibração entre 1800 – 1250 cm^{-1} que são designadas como sendo as vibrações das bases (Alex and Dupuis, 1989; Fritzsche *et al.*, 1993; Tajmir-Riahi *et al.*, 1995; Liquier and Taillandier, 1996; Medina *et al.*, 1998; Neault and Tajmir-Riahi, 1999; Dovbeshko *et al.*, 2000; Arakawa, *et al.*, 2000). Quando o Eb é adicionado ao DNA, não observamos mudanças nas bandas de vibração nas duas razões molares, e com o aumento de NaBr as bandas monitoradas sofreram um pequeno deslocamento em torno de 5 cm^{-1} , mas que está dentro da resolução de aquisição, no qual não podemos dizer que os anéis da base do DNA estão sofrendo alguma mudança. Temos mudanças mais evidentes nesta região quando a razão molar é 1 (Fig. 4.28) do que quando é 5 (Fig. 4.29 e 4.30). Este resultado pode ser uma consequência da competição entre o íon de Na^+ e o íon de Eb^+ no grupo fosfato devido a dificuldade do Eb^+ intercalar entre os pares de bases, já que o número de pares de bases disponíveis para o Eb é menor nesta razão molar.

Na região entre 1350 – 1000 cm^{-1} que representam as bandas de vibração dos grupos fosfatos com estiramento assimétrico em 1225 cm^{-1} e simétrico em 1060 e 1040 cm^{-1} , nos quais estão relacionados as mudanças espaciais das posições destes grupos fosfatos na dupla hélice do DNA. Nas figuras 4.29 e 4.30 a banda de vibração em 1225 cm^{-1} mantém sua posição na condição de DNA livre e quando intercalado com o Eb, mas quando sofre a ação de NaBr ocorre uma mudança de 15 cm^{-1} . Na figura 4.28 a banda de vibração em 1225 cm^{-1} não aparece nas condições iniciais, mas volta a aparecer quando

sofre a ação de NaBr e mantém os mesmos valores da figura 4.29. A banda de vibração em 1717 cm^{-1} e 1225 cm^{-1} são consideradas em FTIR um marcador da conformação B DNA. Estes resultados indicam que a interação do complexo DNA-Eb com o NaBr deve estar alterando o estado do grupo fosfato ao longo do DNA, a nova localização desta frequência de vibração em 1210 cm^{-1} pode estar refletindo a compactação do DNA devido ao aumento da força iônica.

Condensando os resultados de FTIR, temos duas regiões na qual apresentaram modificações. A primeira na banda em torno de 3187 cm^{-1} , correspondendo ao estiramento simétrico da ligação NH, indicando um forte acoplamento entre os anéis aromáticos do etídio e o N_6 da adenina, N_3 da timina, N_1 e N_2 da guanina e o N_4 da citosina. O segundo acontece na banda em 1225 cm^{-1} , mostrando a flutuação do estiramento assimétrico do grupo fosfato, responsável pelo esqueleto do DNA.

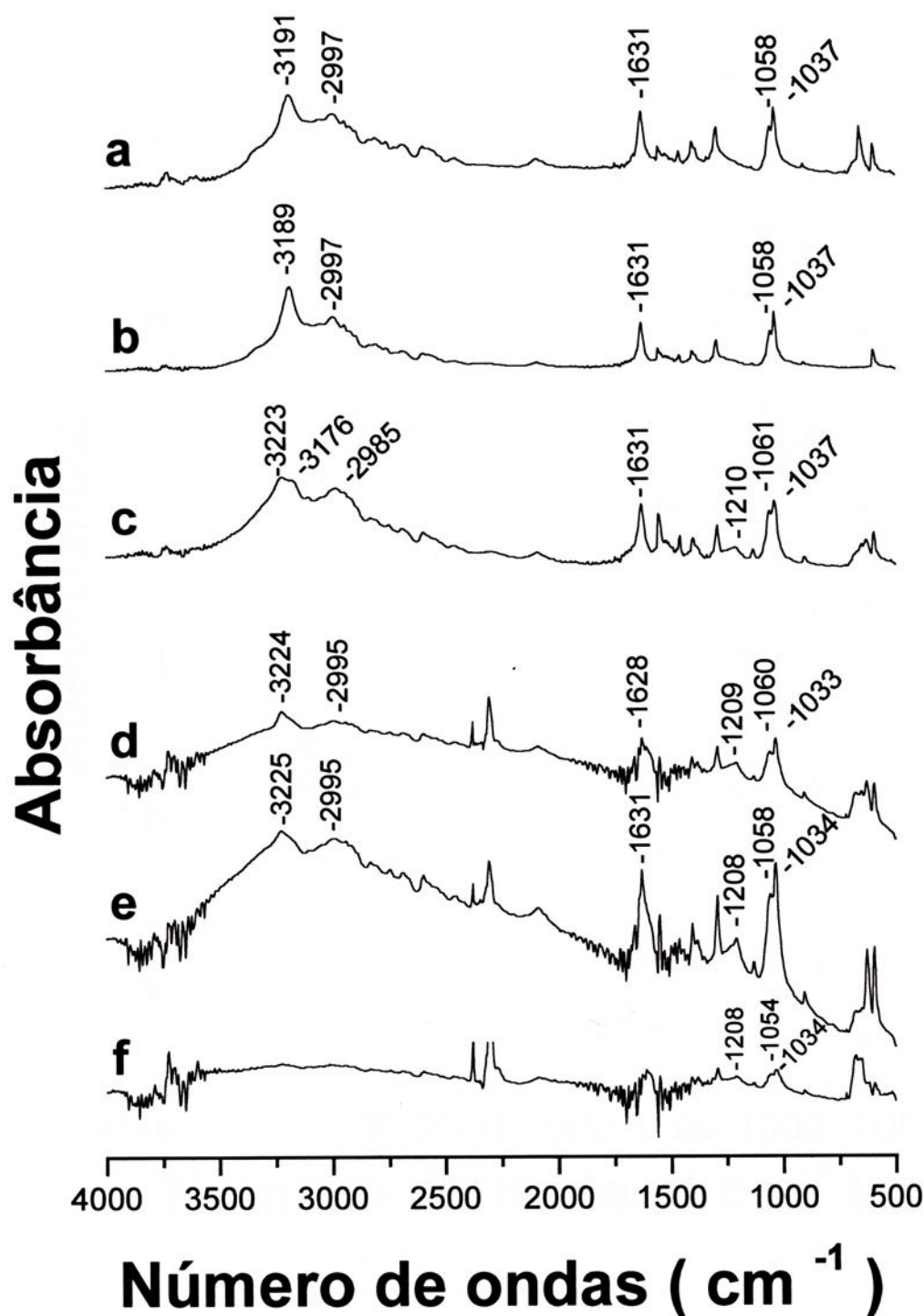


Figura 4.28: Espectros de FTIR do DNA e do complexo DNA-Eb com DNA:Eb igual a 1, na região de 4000 - 400 cm^{-1} . (a) DNA livre, (b) complexo DNA-Eb, (c) 10 mM, (d) 50 mM, (e) 100 mM, (f) 150 mM de NaBr.

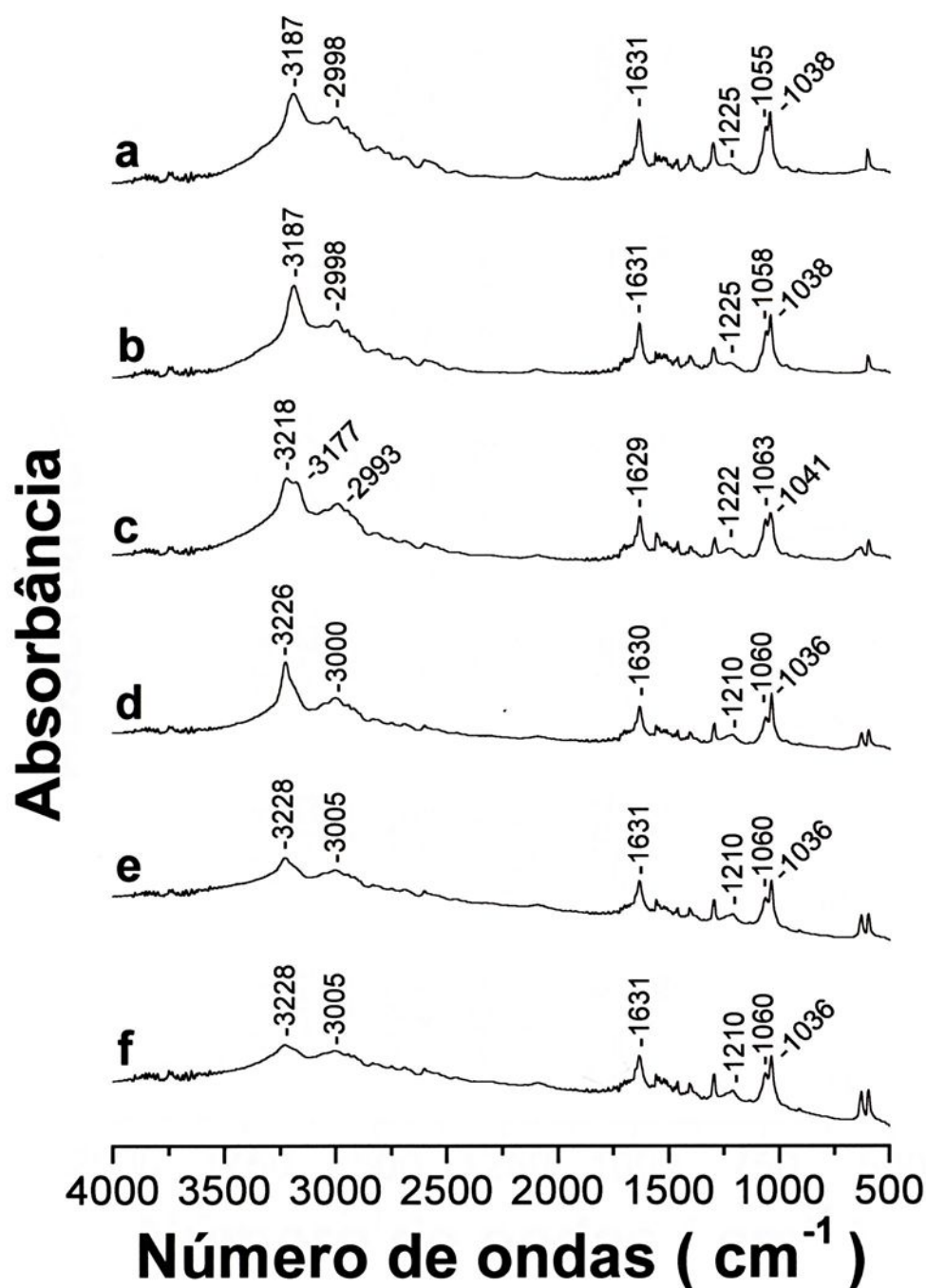


Figura 4.29: Espectros de FTIR do DNA e do complexo DNA-Eb com DNA:Eb igual a 5, na região de 4000 - 400 cm^{-1} . (a) DNA livre, (b) complexo DNA-Eb, (c) 10 mM, (d) 50 mM, (e) 100 mM, (f) 150 mM de NaBr.

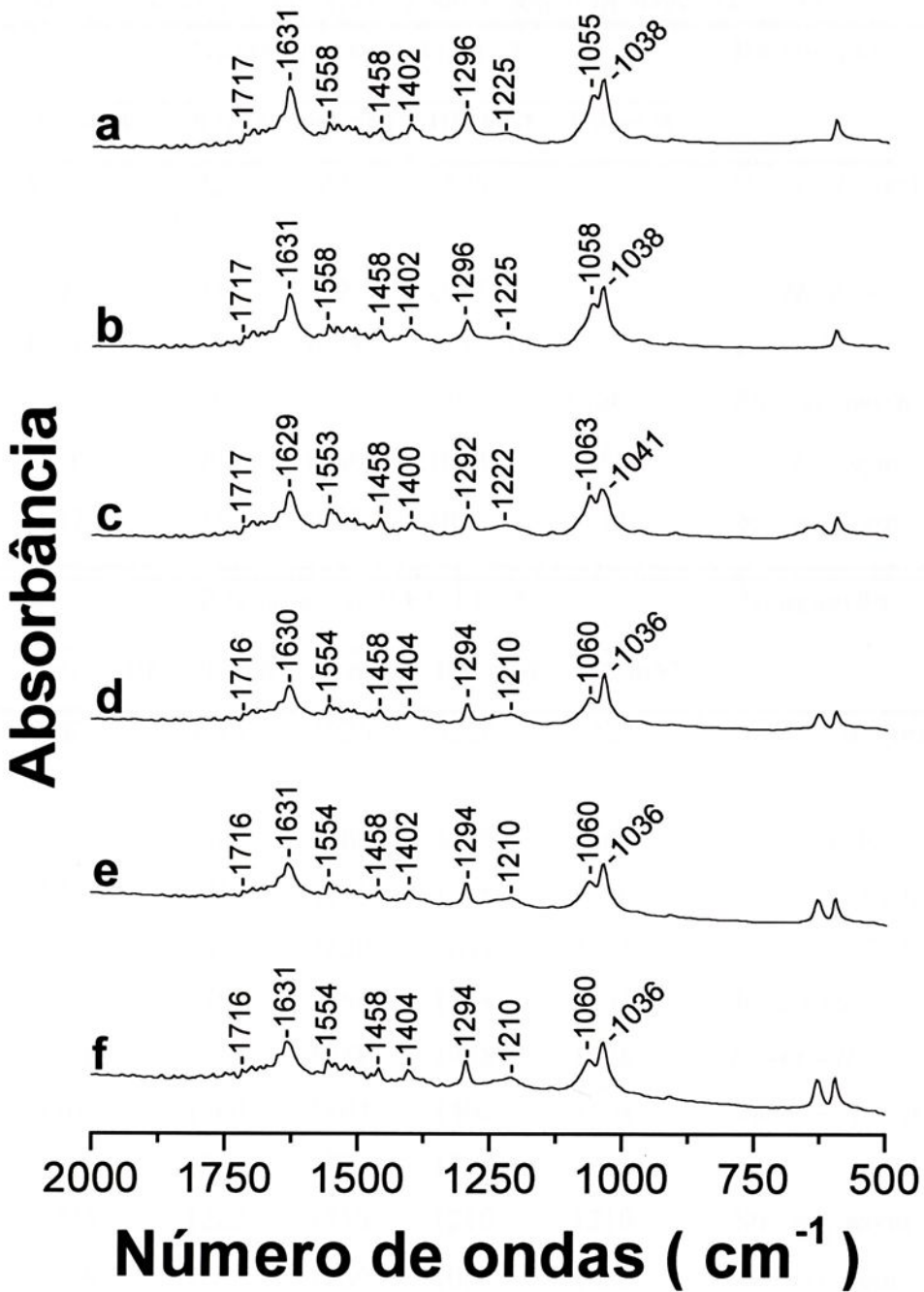


Figura 4.30: Espectros de FTIR do DNA e do complexo DNA-Eb com DNA:Eb igual a 5, na região de 2000 - 500 cm^{-1} . (a) DNA livre, (b) complexo DNA-Eb, (c) 10 mM, (d) 50 mM, (e) 100 mM, (f) 150 mM de NaBr

Tabela 4.3: Frequências das bandas de vibração (cm^{-1}) do DNA e da razão molar DNA:Eb com uma titulação de NaBr, com o *IR screen cell card*.*

DNA	Razão molar DNA:Eb 1					Designação
	zero NaBr	10 mM	50 mM	100 mM	150 mM	
3191	3189	3223	3224	3225	-	Str. <i>N-H</i> sym.
-	-	3176	-	-	-	
2997	2997	2985	2995	2995	-	<i>C-H</i> anéis
1631	1631	1631	1628	1631	-	<i>C=C</i> , T, A,
-	-	1210	1209	1208	1208	Str. PO_2^- asym.
1058	1058	1061	1060	1058	1054	Str. PO_2^- sym
1037	1037	1037	1033	1034	1034	Str. PO_2^- sym

DNA	Razão molar DNA:Eb 5					Designação
	zero NaBr	10 mM	50 mM	100 mM	150 mM	
3187	3187	3218	3226	3228	3228	Str. <i>N-H</i> sym.
-	-	3177	-	-	-	
2998	2998	2993	3000	3005	3005	<i>C-H</i> anéis
1717	1717	1717	1716	1716	1716	In-pv G, C, A, T
1631	1631	1629	1630	1631	1631	<i>C=C</i> , A, T, C, G.
1558	1558	1553	1554	15554	1554	Ring base
1458	1458	1458	1458	1458	1458	<i>C-O-H</i>
1402	1402	1400	1404	1402	1404	Str. <i>C-N</i> ; A, G, C
1296	1296	1292	1294	1294	1294	C
1225	1225	1222	1210	1210	1210	Str. PO_2^- asym.
1055	1058	1063	1060	1060	1060	Str. PO_2^- sym.
1038	1038	1041	1036	1036	1036	Str. PO_2^- sym.

* As designações das bandas estão associadas as designadas pela literatura (Alex and Dupuis, 1989; Fritzsche *et al.*, 1993; Tajmir-Riahi *et al.*, 1995; Liquier and Taillandier, 1996; Medina *et al.*, 1998; Neault and Tajmir-Riahi, 1999; Dovbeshko *et al.*, 2000; Arakawa, *et al.*, 2000).

Str., estiramento; In-pv, vibração no plano da base; T, timina; A, adenina; G, guanina; C, citosina; asym., assimétrico; sym., simétrico.

Conclusões

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi o uso da espectroscopia fotoacústica na área de biofísica molecular investigando as propriedades fotofísicas e físico-químicas de intercalantes em moléculas biológicas. Utilizamos a técnica de fotoacústica para avaliar o brometo de etídio livre e intercalado ao DNA, para melhor elucidar os mecanismos de interações deste complexo. Os resultados com a PAS foram muito promissores, e como não encontramos na literatura o uso da PAS no tratamento de interações fármaco-DNA, incorporamos outras técnicas espectroscópicas para corroborar a análise obtida com fotoacústica. Assim, os resultados obtidos com a fluorescência estática, fluorescência resolvida no tempo, FTIR e a espectroscopia fotoacústica permitiram uma análise mais detalhada do complexo DNA-Eb.

Os resultados proveniente da PAS foram interessantes. Através dela podemos obter o tempo de vida do estado tripleto do brometo de etídio livre e intercalado ao DNA, o rendimento quântico de PAS e de fluorescência, e também elucidar os dois modos de ligação do etídio ao DNA, que usualmente é determinado pela combinação de técnicas espectroscópicas e de hidrodinâmica.



O brometo de etídio tem uma característica singular, que é o aumento de intensidade do sinal de fluorescência a partir do momento que se intercala no DNA. As medidas de tempo de vida foram obtidas através da técnica de modulação em frequência. Para o etídio livre o tempo de vida obtido para o estado singleto foi de $1,65 \pm 0,04$ ns e este valor aumenta para cerca de 21 ns quando intercala com o DNA estes dados estão de acordo com o encontrado na literatura (Burns, 1969; Atherton and Beaumont, 1993; Pal *et al.*, 1998). A explicação para esse efeito reside na nova distribuição dos estados excitados, com os processos de distribuição de energia, e portanto o aumento no tempo de vida.

Como as técnicas empregadas medem decaimentos complementares; fotoacústica $\rightarrow$ decaimentos não radiativos, fluorescência $\rightarrow$ decaimentos radiativos, os resultados para a eficiência quântica de fluorescência do etídio obtido pelas duas técnicas foram de $\phi_{FL} = 0,90 \pm 0,02$ (fluorescência) e $\phi_{FL(PAS)} = 0,87 \pm 0,03$ (fotoacústica) na condição intercalada, e quando o etídio encontra-se ancorado ao grupo fosfato do DNA a sua eficiência passa a ser de $\phi_{FL(PAS)} = 0,04 \pm 0,01$. Este é o principal motivo porque a técnica de fluorescência não consegue distinguir o modo ancorado, pois sua contribuição é mascarada pela alta eficiência do modo intercalado.

A técnica PAS possui uma vantagem no estudo com amostras que não possuem decaimentos radiativos ou baixa eficiência quântica, ou seja, possibilita o estudo de outros fármacos e proteínas que não apresentam espectros de emissão, fazendo com que a PAS obtenha informações em condições menos favoráveis a espectroscopia de fluorescência.

A força iônica tem um papel muito importante na estabilidade, conformação e ligação de pequenas moléculas ao DNA. Na investigação aqui realizada, verificamos que os experimentos resolvidos no tempo em duas janelas temporais distintas, foram imprescindíveis na comparação do efeito da força iônica sobre a estrutura do DNA. Nas

duas janelas temporais utilizadas com resolução em nanosegundos e milisegundos, verificou-se que a segunda é mais suscetível aos efeitos de relaxamento do DNA induzidos pela força iônica. O relaxamento da molécula ocorre em face da blindagem dos grupos fosfato que reduz a intensidade da força eletrostática repulsiva entre eles, induzindo uma mudança no estado do DNA e percebida pelo intercalante. O tempo de vida do estado tripleto encontrado para o etídio livre foi em torno de $0,30 \pm 0,05$ ms e intercalado entre os pares de bases do DNA em 10 mM de NaBr foi em torno de 20 ms para uma razão molar DNA:Eb de 5, e com o aumento da concentração de NaBr este tempo decai para cerca de 2 ms.

A partir das informações do tempo de vida do estado tripleto do Eb no complexo DNA-Eb, passamos a utilizar a PAS na investigação da ligação do Eb ao DNA, para determinarmos as propriedades físico-químicas da interação. Com o avanço da investigação percebemos que foi possível estipularmos o valor da constante de ligação, como também surgiram evidências experimentais de dois modos de ligação do Eb ao DNA, já sob suspeitas desde 1967 (Le Pecq and Paoletti, 1967). A comprovação destes dois modos de ligação foi realizada com um experimento adicional a condição do complexo, já que este segundo modo de ligação poderia estar fracamente associado ao DNA, assim passamos a titular SDS ao complexo DNA-Eb. A carga do SDS sendo negativa competiria com a carga do polieletrólito, comprovado experimentalmente.

De acordo com o mencionado na literatura (Le Pecq and Paoletti, 1967; Douthart *et al.*, 1973; Yguerabide and Ceballos, 1995; Byrne and de Mello, 1998), a região do grupo fosfato é um forte candidato ao segundo modo de ligação, após a saturação do processo de intercalação. Três evidências sugerem este tipo de ligação, o surgimento de dois pontos isosbéticos, a determinação da constante de dissociação, cujo inverso do seu valor é

menor que da constante de associação, e um valor menor para a eficiência quântica em relação ao modo intercalado. Todos estes indícios sugerem os dois modos de ligação do Eb ao DNA e suas respectivas afinidades.

A utilização do modelo de McGhee-von Hippel geralmente é utilizado em processos onde há exclusão de sítios. O valor encontrado para a constante de associação foi de $3,38 \times 10^8 \text{ M(bp)}^{-1}$ e o número de sítios excluídos a partir da simulação com os dados experimentais foi de 2,03. A partir dos dados obtidos com a titulação com o SDS, a remoção do etídio possibilitou o ajuste dos dados em relação a uma hipérbole retangular. Com este ajuste encontramos o valor da constante de dissociação de $0,43 \pm 0,04 \text{ mM}$ de Eb. Os resultados encontrados indicam uma forte intercalação do Eb ao DNA em torno de 78,5 %, já que o coeficiente de dissociação nos informa que $21,5 \pm 2 \%$ dos etídios ligados externamente foram removidos pelo SDS. A partir da determinação da concentração de etídios intercalados o valor encontrado para a constante de associação do complexo DNA-Eb foi de $1,20 \times 10^9 \text{ M(bp)}^{-1}$ que está de acordo com a literatura (Loontjens *et al.*, 1990; Haq *et al.*, 1995; Jenkins, 1997), indicando uma alta afinidade do Eb intercalar-se entre os pares de bases do DNA. O novo valor encontrado para o número de pares de bases excluídos pela intercalação do Eb foi de 2,57 e salienta que apesar do Eb intercalar-se com muita facilidade entre um par de bases, ao mesmo tempo dificulta a intercalação de outro Eb nos pares de bases adjacentes porque o espaço físico entre as bases é afetado pelo espaço ocupado pelo EB. Os dados de associação e dissociação do complexo DNA-Eb possibilitaram inferir um modelo de interação deste complexo.

Dos resultados obtidos com o complexo DNA-Eb na presença dos surfatantes CHAPS e Triton X-100, demonstrou-se que a molécula de DNA foi desnaturada, liberando por completo o etídio para o meio.



O FTIR mostrou-se uma forte ferramenta na análise estrutural do DNA. Os dados mostraram frequências de vibrações características do DNA e do complexo DNA-Eb com uma nova metodologia de transmitância, o cartão com tela o qual proporciona a formação de um filme fino da amostra. Foi possível monitorar três regiões de vibrações nas quais consideramos de interesse, as bandas entre $3800 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ (região de estiramento $O-H$, $N-H$ e $C-H$), entre $1800 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ (região de vibração das bases), e entre $1350 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ (região de vibração dos grupos fosfatos). Os resultados com FTIR demonstraram duas bandas de vibração importantes, em 3187 cm^{-1} que corresponde ao estiramento simétrico do grupo NH das bases, e a banda em 1225 cm^{-1} que corresponde ao estiramento assimétrico do grupo fosfato. Os deslocamentos encontrados para estas bandas sugerem a proximidade entre o etídio e os pares de bases do DNA, e a compactação do estado da dupla hélice do DNA, ambas induzidas pela titulação de NaBr.

O FTIR demonstrou ser uma ferramenta muito precisa e segura em seus resultados, conferindo uma impressão digital molecular da amostra, e com uma infinidade de aplicações em macromoléculas biológicas. Podemos também salientar que a combinação das técnicas empregadas permitirão no futuro estudar as macromoléculas biológicas que ainda não dispõem de técnicas adequadas. Os sistemas pouco investigados, como por exemplo moléculas e proteínas que: não fluorescentes, são insolúveis em água, que não cristalizam, as que espalham luz, etc... que são de interesse da indústria farmacêutica, poderão ser investigadas pelas técnicas aqui utilizadas.



BIBLIOGRAFIA

- Abbruzzetti S, E. Crema, L. Masino, A. Vecli, C. Viappiani, J. R. Small, L. J. Libertini and E. W. Small (2000 a) Fast events in protein folding: structural volume changes accompanying the early events in the N $\rightarrow$ I transition of apomyoglobin induced by ultrafast pH jump. *Biophys J.* **78**, 405-415.
- Abbruzzetti S, C. Viappiani, J. R. Small, L. J. Libertini and E. W. Small (2000 b) Kinetics of local helix formation in poly-L-glutamic acid studied by time-resolved photoacoustics: neutralization reactions of carboxylates in aqueous solutions and their relevance to the problem of protein folding. *Biophys. J.* **79**, 2714-2721.
- Aamodt, L. C., J. C. Murphy and J. G. Parker (1977) Size considerations in the desing of cells for photoacoustic spectroscopy. *J. Applied Phys.* **48**(3), 927-933.
- Alex, S. and P. Dupuis (1989) FT-IR and Raman investigation of cadmium binding by DNA. *Inorg. Chi. Acta.* **157**, 271-281.
- Atherton, S. J. and P. C. Beaumont (1984). *Photobiochem. and Photobiophys.* **8**, 103-113.
- Atherton, S. J. and P. C. Beaumont (1993) The effect of mercuric ions on the excited states of DNA-intercalated ethidium bromide. *Photochemistry and Photobiology.* **57**, 460-64.
- Arakawa, H., R. Ahmad, M. Naoui and H A. Tajmir-Riahi (2000) A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions. *J. Biol. Chem.* **275**, 10150-10153.
- Beck, S. M. (1985) Cell coatings to minimize sample (NH₃ and N₂H₄) adsorption for low-level photoacoustic detection. *Applied Optics.* **24**(12), 1761-1763.
- Bell, A. G. (1880) *Am. J. Sci.* **20**, 305.
- Bresloff, J. L. and D. M. Crothers (1981) Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interactions. *Biochemistry*, **20**, 3547-3553.
- Burns, V. W. F. (1969) Fluorescence decay time characteristics of the complex between ethidium bromide and nucleic acis. *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 420-424.
- Byrne, C. D. and A. J. de Mello (1998) Photophysics of ethidium bromide complexed to ct-DNA: a maximum entropy study. *Biophys. Chem.* **70**, 173-184.
- Cahen, D. (1981) Photoacoustic cell for reflection and transition measurements *Rev. Sci. Instrum.* **52**(9), 1306-1310.
- Cantor, C. R. and P. R. Schimmel. (1980) Biophysical Chemistry part I, II and III. WH Freeman and Company. San Francisco.
- Chen, L. S., J. W. Longworth, G. R. Fleming (1987) Picosecond time resolved fluorescence of ribonuclease T₁ : a pH and substrate-analog binding study. *Biophys. J.* **51**:865-873.
- Crothers, D. M. (1968) Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers. *Biopolymers* **6**, 575-584.
- Cuniberti, C. and M. Guenza (1990) Environment-induced changes in DNA conformation as probe by ethidium bromide fluorescence. *Biophys. Chem.* **38**, 11-22.
- Das, S., G. S. Kumar and M. Maiti (1999) Conversions of the left-handed form and the protonated form of DNA back to the bound right-handed form by sanguinarine and ethidium: A comparative study. *Biophys. Chem.* **76**, 199-218.
- Daune M. (1999a) Molecular Biophysics: Structural in motion. Oxford University Press. Chapter 4. pg 81.
- Daune M. (1999b) Molecular Biophysics: Structural in motion. Oxford University Press. Chapter 17.
- Daune M. (1999c) Molecular Biophysics: Structural in motion. Oxford University Press.



Chapter 4. pg 66.

- Deutscher, M. P. Ed. (1990) Methods in Enzymology. In: Guide to Protein Purification. Vol 182, Cap. 18. Academic Press, Inc. San Diego.
- Douthart, R. J., J. P. Burnett, F. W. Beasley and B. H. Frank (1973) Binding of Ethidium Bromide to Double-Stranded Ribonucleic Acid. *Biochemistry*. **12**, (2): 214-220.
- Dovbeshko, G. I., N. Y. Gridina, E. B. Kruglova and O. P. Pashchuk (2000) FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*. **53**, 233-246.
- Eisinger, J., A. A. Lamola, (1971) The Excited States of Nucleic Acids. In *Excited States of Proteins and Nucleic Acids* (Eds. Steiner, R. F. and Weinryb, I.) Plenum Press, New York.
- Fritzsche, H., A. Akhebat, E. Taillandier, K. Rippe and T. M. Jovin (1993) Structure and drug interactions of parallel-stranded DNA studied by infrared spectroscopy and fluorescence. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5085-5091.
- Garty, H., R. Caplan and D. Cahen (1982) Photoacoustic photocalorimetry and spectroscopy of Halobacterium halobium purple membranes *Biophysical J.* **37**, 405-415.
- Gaugain, B., J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques and J. -B. Le pecq (1978) DNA Bifunctional intercalators. 2. Fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer. *Biochemistry*. **17**, 5078-88.
- Gratton, E. and M. Limkeman (1983) A continuously Variable Frequency Cross-Correlation Phase Fluorometer With Picosecond Resolution. *Biophys. J.* **44**:315-324.
- Geacintov, N. E., J. Waldmeyer, V. A. Kurmin and T. Kolubayev (1981) Dynamics of the binding of acridine dyes to DNA investigated by triplet excited state probe techniques. *J. Phys. Chem.* **85**, 3608-3613.
- Haq, I., P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry and J. B. Chaires (1995) Interaction of Δ - and Λ -[Ru(phen)₂DPPZ]²⁺ with DNA: A calorimetric and equilibrium binding study. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4788-4796.
- Heller, D. P. and C. L. Greenstock (1994) Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye. *Biophys Chem.* **50**, 305-12.
- Hunter, T. F., D. Rumbles and M. G. Stock (1974) Photophysical processes in the vapour-phase measured by the optic-acoustic effect. *M. Faraday. Trans. 2.* **70**, 1010-1021.
- Hunter, R. J. (1992) Foundations of Colloid Science. Vol. 1. p. 564-625. Clarendon Press. Oxford.
- Jablonski, A (1935) Über den mechanismus des photolumineszens von farbstoffphosphoren. *Z. Phys.* **94**, 38-46
- Jenkins, T. C. (1997) Optical absorbance and fluorescence techniques for measuring DNA-drug interactions. In *Drug-DNA interactions protocols* (Fox, K. R., eds), pp.195-218. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Kapuscinski, J., Z. J. Darzynkiewicz, (1987) *Biomol. Struct. Dyn.* **5**, 127-143.
- Kurian, E., F. G. Prendergast and J. R. Small (1997) Photoacoustic analysis of proteins: volumetric signal and fluorescence quantum yields. *Biophysical Journal*. **73**, 466-476.
- Lakowicz, J.R. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Lakowicz, J. R (1991) Topic in Fluorescence Spectroscopy. (Edited by) Vol. 1 Techniques. Plenum Press. New York.
- Lee, W. E., W. C. Galley (1988) Perturbations to the intersystem crossing of proflavin upon binding to DNA and poly d(A-IU) from triplet-delayed emission spectroscopy *Biophys. J.* **54**, 627-635.

- Le Pecq, J-B. and C. Paoletti (1967) A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acid: physical-chemical characterization. *J. Mol. Biol.* **27**, 87-106.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, M. M. Cox, (1995) *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, São Paulo.
- Lerman, L. S. (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.* **3**, 18-30.
- Li, H. J. and D. M. Crothers (1969) Relaxations studies of the proflavine-DNA complex: the kinetics of na intercalation reaction. *J. Mol. Biol.* **39**, 461-477.
- Liquier, J and E. Taillandier (1996) Infrared spectroscopy of nucleic acids. In *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. (Edited by H. H. Mantsch and D. Chapman), pp131-158. Wiley-Liss, Inc., New York, USA
- Lohman, T. M., P. L. DeHaseth, M. T. Record, (1978) *Biophys. Chem.* **8**, 281-294.
- Loontjens, F. G., P. Regenfuss, A. Zechel, L. Dumortier and R. M. Clegg (1990) Binding characteristics of hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): Multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry.* **29**, 9029-9039.
- McDonald, F. A. and G. C. Jr. Wetsel, (1978) Generalized theory of the photoacoustic effect. *Appl. Phys.* **49**, 2313-2322.
- McDonald, F. A. (1986) Photoacoustic, photothermal, and related techniques: a review *Can. J. Phys.* **64**, 1023-29.
- McGhee, J. D. and P. H. von Hippel (1974) Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* **86**, 469-489.
- Medina, M. A., F. J. Ramírez, J. Ruiz-Chica, T. Chavarria, J. T. López-Navarrete and F. Sánchez-Jiménez (1998) DNA-chlorpheniramine interaction studied by spectroscopic techniques. *Biochim. Biophys. Acta.* **1379**, 129-133.
- Meyer-Almes, F. J., D. Porschke, (1993) Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry.* **32**, 4246-4253.
- Misra, V. K., K. A. Sharp, R. A. Friedman and B. Honig (1994) Salt effects on ligand-DNA binding. *J. Mol. Biol.* **238**, 245-63.
- Moore, T. A., D. Benin and R. Tom (1982) Photoacoustic measurement of photophysical properties. Lowest triplet-state energy of a free base porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7356-7357.
- Müller, W. and D. M. Crothers, (1968) Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. *J. Mol. Biol.* **35**, 251-290.
- Murphy, J. C., J. W. M. Spicer, L. C. Aamodt and B. S. H. Royce (1990) Photoacoustic and Photothermal Phenomena II.. Vol 62, Springer-Verlag, Berlin.
- Narayanan, K., S. Chandani, T. Ramakrishna and M. C. Rao (1997) Depth profiling of mammalian cells by photoacoustic spectroscopy: localization of ligands *Biophysical Journal.* **72**, 2365-2368.
- Neault, J. F. and H. A. Tajmir-Riahi (1999) Structural analysis of DNA-chlorophyll complex by Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy. *Biophys. J.* **76**, 2177-2182.
- Nordmeier, E. (1992) Absorption spectroscopy and dynamic and static light-scattering studies of ethidium bromide binding to calf thymus DNA: Implications for outside binding and intercalation *J. Phys.Chem.* **96**, 6045-6055.
- Olmstead III, J. and D. R. Kearns (1977) Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry* **16**, 3647-3654.

- Ouzafe, M., P. Poulet, J. Chambron (1992) Photoacoustic detection of triplet state and singlet oxygen in highly absorbing samples. *Photochem. Photobiol.* **55**, 491-503.
- Pal, K. S., D. Mandal and K. Bhattacharyya (1998) Photophysical processes of ethidium bromide in micelles and reverse micelles. *J. Phys. Chem. B* **102**, 11017-11023.
- Perkampus, H. H (1992) UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. pg 103. Springer-Verlag, New York.
- Poston, P. E. and J. H. Harris (1987) Maximum likelihood quantitative estimates for peaks: Application to photoacoustic spectroscopy. *Anal. Chem.* **59**, 1620-1626.
- Rosencwaig, A. and A. Gersho, (1976) Theory of the photoacoustic effect with solids. *J. Appl. Phys.* **47**, 64-69.
- Rosencwaig, A. (1980) Photoacoustics and Photoacoustics Spectroscopy. John Wiley & Sons. New York.
- Sharp, K. A., R. A. Friedman, V. K. Misra, J. Hecht and B. Honig (1995) Salt effects on polyelectrolyte-ligand binding: comparison of Poisson-Boltzmann and limiting low/counterions binding models. *Biopolymers.* **36**, 245-62.
- Sharp, K. A. and B. Honig (1995) Salt effects on nucleic acids. *Current Opinion in Structural Biology.* **5**, 323-8.
- Spiro, T. G. (1987) *Biological applications of Raman spectroscopy* vol 1. John Wiley & Sons, New York.
- Stryer, L. (1996) Bioquímica. 4 ed. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro
- Tam, A. C. and Y. H. Wong (1980) *Appl. Phys. Lett.* **36**(6),472.
- Tajmir-Riahi, H. A., J. F. Neault and M. Naoui (1995) Does DNA acid fixation procedure left-handed Z structure? *FEBS Lett.* **370**, 105-108.
- Tsai, C.-C., S. C. Jain, H. M. Sobell (1977) Visualization of drug-nucleic acid at atomic resolution. I. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex ethidium: 5-iodouridylyl (3'-5') adenosine. *J. Mol. Biol.* **114**, 301-315.
- van Holde, K. E., W. C. Johnson and P. S. Ho (1998) Chemical equilibria involving macromolecules. In *Principles of physical biochemistry*, cap 15. Prentice Hall, New Jersey.
- Voet, D. and J. G. Voet (1995) *Biochemistry.* 2nd. Ed., John Wiley & Sons. Chapter 28. p.870.
- Wahl, Ph., J. Paoletti and J.-B Le Pecq (1970) Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex evidence for na internal motion in DNA. *PNAS.* **65**, 417-421.
- Weast, R. C. (1987) CRC Handbook of chemistry and physics. 68th edition. CRC Press, Inc., Florida, USA
- Wilson, W. D., I. G. Lopp, (1979) *Biopolymers.* **18**, 3025-3041.
- Wilson, W. D., C. R. Krishnamoorthy, Y. H. Wang, J. C. Smith, (1985) *Biopolymers.* **24**, 1941-1961.
- Yguerabide, J. and A. Ceballos (1995) Quantitative fluorescence method for continuous measurement of DNA hybridization kinetics using a fluorescent intercalator. *Anal. Biochem.* **228**, 208-220.

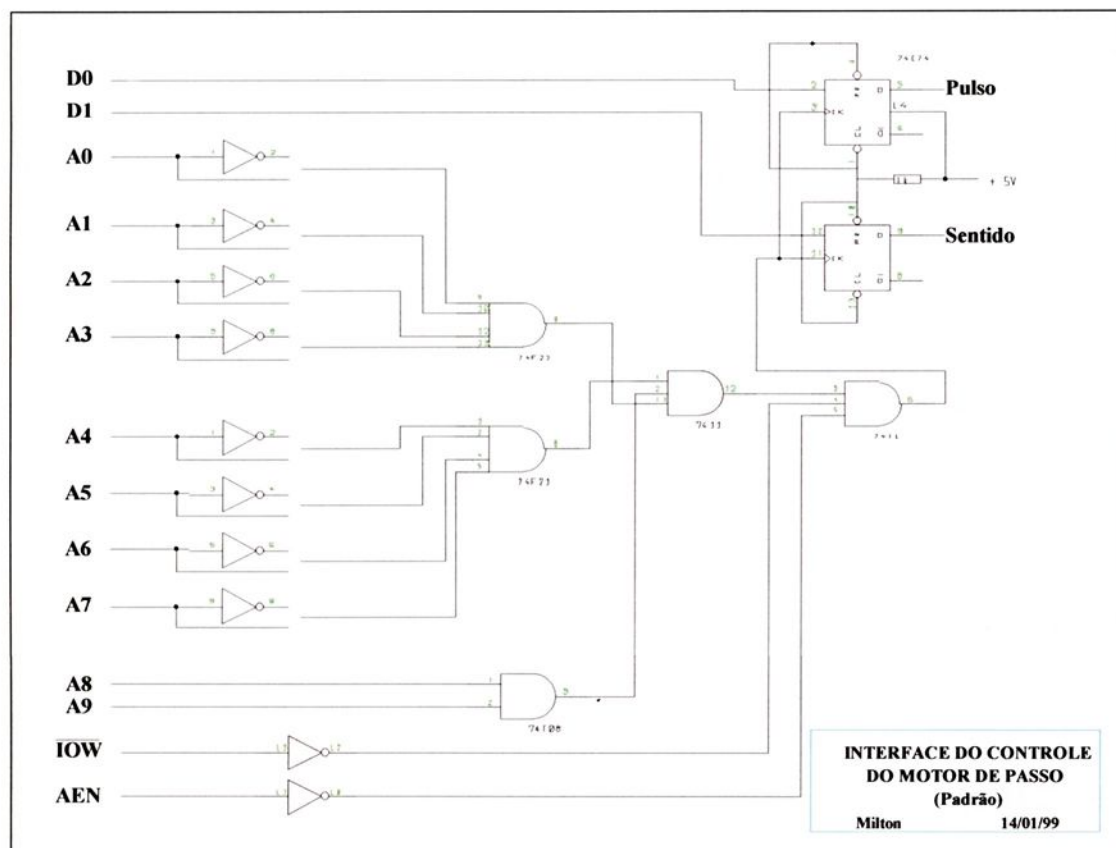


APÊNDICE A

MONTAGEM DA PARTE ELETRÔNICA DE CONTROLE E AQUISIÇÃO DE DADOS DO ESPECTRÔMETRO FOTOACÚSTICO

Os primeiros resultados obtidos foram com a elaboração dos circuitos eletrônicos, que inicialmente foram testados parte por parte no *pront-o-Labor PL 552*, para posterior elaboração do esquema elétrico dos circuitos com o programa *TANGO* ou do *WinBoard & WinDraft*, que é uma ferramenta gráfica para projetos de circuitos eletrônicos. Foram montados a interface de comunicação e o *drive* do motor de passo. A figura A.1 mostra o circuito elétrico (A) e a montagem final da interface (B), e a figura A.2 mostra o circuito elétrico (A) e o *drive* (B) do motor de passo (CROW, DC 5A, *Drive controller*) com o motor de passo. As duas montagens foram incorporadas ao sistema de aquisição de dados.

(A)



(B)

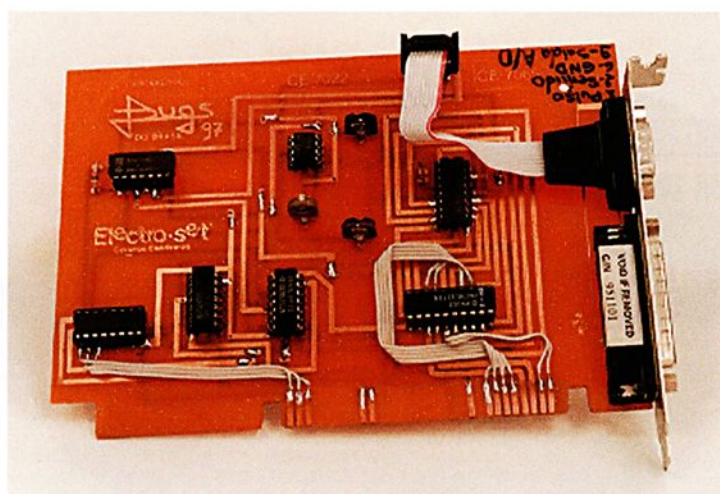
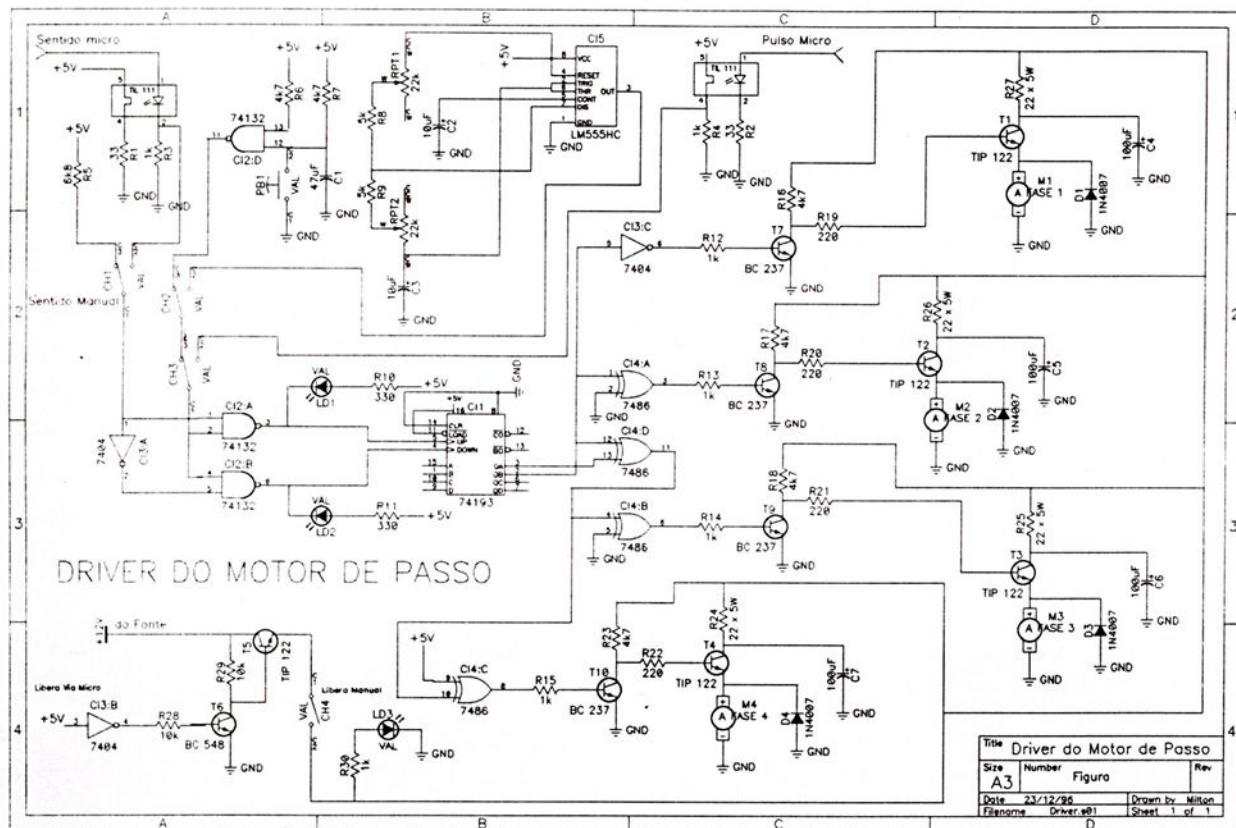


Figura A.1: Interface de controle do motor de passo. (A) Circuito elétrico; e (B) Fotografia ilustrativa da interface do motor de passo.

(A)



(B)



Figura A.2: O drive do motor de passo. (A) Circuito elétrico; e (B) Fotografia ilustrativa do drive do motor de passo e o motor de passo.

