



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS SOBRE A INTERAÇÃO DE  
RUTINAS,  $\beta$ -LAPACHONAS E CUMARINAS COM ALBUMINA  
SÉRICA BOVINA (ASB).**

**EDUARDO BENES DA SILVA**

Salvador

2014

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS SOBRE A INTERAÇÃO DE  
RUTINAS,  $\beta$ -LAPACHONAS E CUMARINAS COM ALBUMINA SÉRICA  
BOVINA (ASB).**

EDUARDO BENES DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina M. Quintella

Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. José Carlos Netto Ferreira

Salvador

2014

ii

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e ao nosso senhor Jesus Cristo, pois a fé deve estar presente nas horas escuras e tristes. Agradeço profundamente aos meus pais e aos meus irmãos, não há como não agradecê-los, juntam-se a esses, todos aqueles que torceram e rezaram por mim.

Esta tese é mais que um documento científico para mim. Ela é social, no sentido em que se revela como uma construção de futuro. Ela também é étnica, já que demonstra a possibilidade de mudança de uma trajetória histórica herdada. Representa também, uma libertação das determinações da pirâmide social brasileira. Política? Sim. Não poderia deixar de sê-la, devido à utilização que se faça desse conhecimento.

Agradeço a CAPES; como também a esta nova mãe em forma de cátedra que encontrei: a UFRRJ. O grupo de fotoquímica do IQ-UFRRJ (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). Pois, sem a chancela de seus tão nobres membros, este trabalho não iria em frente. Agradeço enormemente e de forma muito especial, ao Prof. Dr<sup>o</sup> Francisco de Assis Silva e família. Soma-se a esse agradecimento, outro não menos importante, o meu co-orientador Prof. Dr<sup>o</sup> José Carlos Netto Ferreira, e a orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina M. Quintella. Segue-se a este agradecimento, outro, na intenção do IQ-USP de Ribeirão Preto, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Okano pelas aulas e acolhimento, aos colegas do alojamento da pós-graduação da UFRRJ na magnífica pessoa do doutorando Eduardo Aragão Catunda. Ao grupo de pesquisa LABLASER (IQ-UFBA), em especial a Alexandre Kamei Guimarães e Ângelo e a Dr<sup>a</sup> Cristiane Carla pela soma de todas essas conquistas.

## RESUMO

Medidas relativas aos espectros de Absorção da Albumina Sérica Bovina com variação do comprimento de onda de varredura entre 300 a 500nm demonstraram um aumento nas intensidades da banda de absorção da ASB, após adição de aliquotas dos ligantes ( $\beta$ -lapachonas, cumarinas e Rutinas), sobretudo em 280nm, que é o comprimento de onda de absorção característico dos dois resíduos de triptofano presentes na ASB. Medidas de Dicroísmo Circular confirmam a presença das bandas de absorção características dos resíduos de triptofano, cujos máximos de absorção estão em 208 e 222nm nas diferentes temperaturas estudadas. As modificações obtidas nos espectros de Dicroísmo Circular da ASB a partir da adição de alíquotas das espécies ligantes deram origem ao efeito ocorrido na disposição planar original da  $\alpha$ -hélice presente na estrutura secundária da ASB. A emissão fluorescente de ASB nas temperaturas de 298K, 303K, 310K e para os sistemas ASB/ $\beta$ -lapachonas e ASB/rutinas e 288K, 293K, 298K para o sistema ASB/Cumarinas, mostrou um efeito supressivo sobre o espectro de emissão da ASB, sobretudo em 345 nm, emissão do resíduo de triptofano da ASB, após a adição dos ligantes. Os valores para os parâmetros termodinâmicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  para os sistema ASB/ $\beta$ -lapachonas, ASB/4-metil-7-hidroxicumarinas e ASB/Rutinas não sofreram grandes variações como uma função do ligante. A partir destes valores pode-se concluir que o tipo de interação predominante entre ASB/ligante foi hidrofóbica. A sobreposição entre os espectros de absorção do supressor e de emissão da ASB possibilitou determinar para cada par ASB/supressor a distância crítica de interação e o raio de Foster, os quais mostraram a probabilidade da existência do fenômeno de Transferência da Energia Ressonante de Fluorescência (FRET) em todos os casos. No sistema ASB/ $\beta$ -lapachona e ASB/3-Ácido sulfônico  $\beta$ -lapachona obtivemos respectivamente para um valor médio relativo as três temperaturas de trabalho, temos:  $R_0 = 2,69$  nm em relação a  $r = 3,02$  e  $R_0 = 2,32$ nm em relação a  $r = 3,32$ . Já para o par 7-hidroxicumarina e 4-metil-7-hidroxicumarina, temos:  $R_0 = 3,53$  e  $r = 3,83$ nm;  $R_0 = 3,70$  nm e  $r = 4,33$  nm. Por fim, no par ASB/Rutina e ASB/Rutina-metilada:  $R_0 = 3,43$ nm e  $r = 3,41$ nm;  $R_0 = 3,14$ nm e  $r = 4,03$ nm.

***PALAVRAS CHAVE : Cumarinas,  $\beta$ -lapachona, rutina, ASB, Fluorescência, Dicroísmo Circular***

## ABSTRACT

Measurements relating to the absorption spectra in the wavelength range of 300 to 500nm scan demonstrated an increase in intensity of the absorption band of ASB upon addition of aliquots of ligands ( $\beta$ -lapachonas, coumarins and Rutinas), mainly 280nm, is the wavelength of the absorption characteristic of the two tryptophan residues present in the ASB. Circular Dichroism measurements confirm the presence of characteristic absorption bands of tryptophan residues, which are maximum at around 208nm and 222nm at different temperatures. The changes in the spectra obtained Circular Dichroism of ASB from the addition of aliquots of ligand species gave rise to the effect occurred in planar array of original  $\alpha$ -helix present in the secondary structure of ASB. The fluorescent emission of ASB at temperatures of 298K, 303K, and 310K for the ASB / ASB and  $\beta$ -lapachonas / routines and 288K, 293K, 298K for the ASB / Coumarins system, systems showed a suppressive effect on the emission spectrum of ASB , especially at 345 nm, emission of the tryptophan residue of ASB, after the addition of binders. The values for the thermodynamic parameters  $\Delta G_0$ ,  $\Delta H_0$ ,  $\Delta S_0$  system for ASB /  $\beta$ -lapachonas, ASB / 4-methyl-7-hydroxycoumarins and ASB / Rutinas underwent no significant variations as a function of the ligand. From these values it can seconcluir that the predominant interaction between ASB / binder is hydrophobic. The overlap between the absorption spectra of the suppressor and issued by ASB allowed to determine for each pair ASB / suppressor critical distance the radius of interaction and Foster, that indicate the probability of the existence of the phenomenon Resonant Energy Transfer Fluorescence (FRET) in all cases. In ASB /  $\beta$ -lapachone and ASB / 3-sulfonic acid  $\beta$ -lapachone system obtained respectively for an average value for the three operating temperatures, we have  $R_0 = 2.69$  nm against air = 3.02 and  $R_0 = 2, 32$ nm relative air = 3.32. As for the pair 7-hydroxycoumarin and 4-methyl-7-hydroxycoumarin, we have:  $r = R_0 = 3.53$  3,83nm;  $R_0 = 3.70$  and  $r = 4.33$  nm nm. Finally, the pair ASB / rutin and ASB / Rutina-methylated:  $R_0 = r = 3,43$ nm 3,41nm;  $R_0 = 3,14$ nm and  $r = 4,03$ nm.

**KEYWORDS:** *Coumarins,  $\beta$ -lapachone, rutin, ASB, Fluorescence, Circular Dichroism*

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Esquema representativo de uma transição do tipo $\pi$ - $\pi^*$ .	2
Figura 2- Esquema representativo das energias eletrônicas e sua multiplicidade.	4
Figura 3- Diagrama demonstrando o Princípio de Franck-Condon.	8
Figura 4- Diagrama de Jablonski.	9
Figura 5- Esquema básico dos processos fotofísicos frente à absorção de luz.	9
Figura 6- Esquema representativo das transições eletrônicas moleculares.	11
Figura 7- Processos de transferência de energia.	14
Figura 8- Representação simplificada do processo tipo FRET. D=doador e A=receptor.	16
Figura 9- Representação da sequência estrutural e hierárquica de uma proteína.	19
Figura 10- Exemplo ilustrativo do aspecto em $\alpha$ -hélice numa proteína.	20
Figura 11- Exemplo ilustrativo de uma estrutura do tipo folha- $\beta$ .	21
Figura 12- Exemplo ilustrativo da estrutura terciária numa proteína.	22
Figura 13-Fórmula estrutural plana para o triptofano.	23
Figura 14-Figura representativa da estrutura tridimensional da ASB	24
Figura 15a e 15b- Fórmula estrutural da $\beta$ -lapachona e Ácido $\beta$ -Lapachona 3-Sulfônico.	26
Figura 16- Fórmula estrutural da cumarina e um dos seus derivados, o 3-ácido carboxilcumarina.	27
Figura 17- Fórmula estrutural plana: Cumarina(A), Psoraleno(B) e Aflatóxina(C).	28
Figura 18- Fórmula estrutural plana das espécies cumarínicas utilizadas.	29
Figura 19- Fórmula estrutural da Rutina e Rutina-metilada.	30

Figura 20- Foto do sistema acoplado utilizado nas medidas de Absorção no Uv-vis, Dicroísmo Circular e Emissão de Fluorescência.	37
Figura 21- Espectro de absorção (superior, $\lambda_{\text{max}} = 280\text{nm}$ e de fluorescência (inferior, $\lambda_{\text{max}} = 345\text{nm}$ ) para ASB em tampão fosfato livre da presença de ligantes.	39-40
Figura 22- Espectro de Absorção da ASB em presença de concentrações Variadas de rutina a T=296K.	41
Figura 23- Espectro de absorção no Uv-vis para rutina em solução Etanólica a T=296K.	41
Figura 24- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de rutina a T=296K.	44
Figura 25- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em presença de concentrações variadas de rutina a T= 303K.	44
Figura 26- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em concentrações variadas de rutina a T=310K.	44
Figura 27- Espectro de fluorescência para ASB com diferentes concentrações de rutina a T=296K.	49
Figura 28- Gráfico de $F_0/F$ para a ASB após adição de diferentes Concentrações de rutina a T=296K.	50
Figura 29- Espectro de fluorescência para a ASB após adição de diferentes concentrações de rutina a T=303K.	51
Figura 30- Gráfico de $F_0/F$ para a ASB após adição de diferentes Concentrações de rutina a T=303K.	52

Figura 31- Espectro de fluorescência para a ASB após adição de diferentes concentrações de rutina a T=310K.	52
Figura 32- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina a T= 310K.	53
Figura 33- Gráfico $F_0/F_0-F$ da [ASB] x 1/[rutina] a T=296K	56
Figura 34 – Gráfico de $F_0/F_0-F$ da [ASB] x 1/[rutina] em T=303K.	56
Figura 35- Gráfico de $F_0/F_0-F$ da [ASB] x 1/[rutina] em T=310K.	57
Figura 36- Gráfico de $\ln K_a \times 1/T$ para ASB nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	58
Figura 37- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ da ASB x $\log$ [rutina] a T=296K.	61
Figura 38- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ da ASB x $\log$ [rutina] a T=303K.	62
Figura 39- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ da ASB x $\log$ [rutina] a T= 310K.	63
Figuras 40.1, 40.2 e 40.3- Sobreposição dos Espectros de Fluorescência da ASB ( $1,00 \times 10^{-6}M$ ) e de Absorção da rutina ( $1,00 \times 10^{-6}M$ ) nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	66-69
Figura 41- Fórmula estrutural plana para a rutina metilada.	69
Figura 42- Espectro da absorção na região do Uv-vísivel para a rutina metilada.	70
Figura 43- Espectro de Absorção para ASB em presença de Concentrações variadas de rutina metilada a T=296K.	71
Figura 44- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de Concentrações variadas de rutina metilada a T=296K.	72
Figura 45- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de Concentrações variadas de rutina metilada a T=303K.	73

Figura 46-Espectro de Dicroism Circular para ASB em presença de Concentrações variadas de rutina metilada a T=310K.	73
Figura 47- Espectro de fluorescência para ASB em presença de Concentrações variadas de rutina metilada a T=296K.	76
Figura 48- Gráfico de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina metilada a T= 296K.	77
Figura 49- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina metilada a T=303K.	78
Figura 50- Gráfico de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina metilada a T=303K.	79
Figura 51- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina metilada a T=310K.	79
Figura 52- Gráfico de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina metilada a T=310K.	80
Figura 53- Gráfico de Fo/Fo-F da ASB x 1/[rutina metilada] a T=296K.	82
Figura 54- Gráfico de Fo/Fo-F da ASB x 1/[rutina metilada] a T=303K.	83
Figura 55- Gráfico de Fo/Fo-F da ASB x 1/[rutina metilada] a T=303K.	83
Figura 56- Gráfico de ln Ka x 1/T para ASB/ rutina metilada.	84
Figura 57- Gráfico de log (Fo-F)/F para ASB x log[rutina metilada] a T= 296K.	86
Figura 58- Gráfico de log(Fo-F)/F para ASB x log[rutina metilada] a T= 303K.	87

Figura 59- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log$ [rutina metilada] a T=310K.	87
Figuras 60.1, 60.2 e 60.3- Sobre posição dos espectros de emissão Fluorescente para ASB= $[1,0 \times 10^{-5}M]$ e de absorção para rutina metilada= $[1,0 \times 10^{-5}M]$ , nsa temperaturas de 296, 303 e 310K.	89-90
Figura 61-Espectro de absorção no UV-vis para $\beta$ -lapachona em etanol a T= 298K.	93
Figura 62- Espectro de absorção no Uv-vis para ASB em solução Tampão fosfato, em presença de concentrações variadas de $\beta$ -lapachona a T= 296K.	93
Figura 63- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de Concentrações variadas de $\beta$ -lapachona a T=296K.	94
Figura 64- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de Concentrações variadas de $\beta$ -lapachona a T=303K.	95
Figura 65- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de Concentrações variadas de $\beta$ -lapachona a T=310K.	95
Figura 66- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a T=296K.	98
Figura 67- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a T=296K.	99
Figura 68- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a T=303K.	99
Figura 69- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes Concentrações de $\beta$ -lapachona a T=303K.	100

Figura 70- Espectros de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a T=310K.	101
Figura 71- Gráfico de $F_0/F$ da ASB x $1/[\beta\text{-lapachona}]$ a T=296K.	104
Figura 72- Gráfico de $(F_0/F_0-F)$ para ASB x $1/[\beta\text{-lapachona}]$ a T= 296K.	104
Figura 73- Gráfico de $(F_0/F_0-F)$ para ASB x $1/[\beta\text{-lapachona}]$ a T=303K.	104
Figura 74- Gráfico de $(F_0/F_0-F)$ para ASB x $1/[\beta\text{-lapachona}]$ a T=310K.	105
Figura 75- Gráfico de $\ln K_a$ x $1/T$ para ASB/ $\beta$ -lapachona.	106
Figura 76- Gráfico de $\log (F_0-F)/F$ para ASB x $\log[\beta\text{-lapachona}]$ a T=296K.	108
Figura 77- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[\beta\text{-lapachona}]$ a T=303K.	108
Figura 78- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[\beta\text{-lapachona}]$ a T=310K.	109
Figura 79.1, 79.2 e 79.3- Sobreposição dos espectros de emissão Fluorescente para $[ASB]= 1,0 \times 10^{-5}M$ e de Absorção para $[\beta\text{-lapachona}]=1,0 \times 10^{-5}M$ nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	110-111
Figura 80- Espectro de absorção para ASB em presença de Concentrações variadas do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=296K.	114
Figura 81- Espectro de absorção para o Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico em etanol sendo T=296K.	114

Figura 82- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=296K.	115
Figura 83- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=303K.	116
Figura 84- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=310K.	116
Figura 85- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=296K.	119
Figura 86- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=296K.	120
Figura 87- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=303K.	120
Figura 88- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=303K.	121
Figura 89- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a T=310K.	122

Figura 90- Gráfico de $F_0/F$ da ASB após adição de diferentes concentrações do Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico a $T=310K$ .	123
Figura 91- Gráfico de $F_0/F_0-F$ da ASB x $1/[\text{Ácido } \beta\text{-lapachona 3-sulfônico}]$ a $T= 296K$ .	125
Figura 92- Gráfico de $F_0/F_0-F$ da ASB x $1/[\text{Ácido } \beta\text{-lapachona 3-sulfônico}]$ a $T=303K$ .	125
Figura 93- Gráfico de $F_0/F_0-F$ da ASB x $1/[\text{Ácido } \beta\text{-lapachona 3-sulfônico}]$ a $T=310K$ .	126
Figura 94- Gráfico de $\ln K_a \times 1/T$ para ASB/Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico.	127
Figura 95- Gráfico de $\log (F_0-F)/F$ da ASB x $\log[\text{Ácido } \beta\text{-lapachona 3-sulfônico}]$ a $T=296K$ .	128
Figura 96- Gráfico de $\log (F_0-F)/F$ da ASB x $\log[\text{Ácido } \beta\text{-lapachona 3-sulfônico}]$ a $T=303K$ .	129
Figura 97- Gráfico de $\log (F_0-F)/F$ da ASB x $\log[\text{Ácido } \beta\text{-lapachona 3-sulfônico}]$ a $T=310K$ .	129
Figura 98.1, 98.2 e 98.3- Sobreposição dos espectros de fluorescência para $[\text{ASB}] = [1,0 \times 10^{-5}]M$ e de absorção para o ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico= $[1,00 \times 10^{-5}]M$ ,	131-132
nas temperaturas de 296, 303 e 310K. a $T= 296, 303$ e $310K$ .	131-132
Figura 99-Espectro de absorção para ASB após adição de concentrações variadas de 7-hidroxycumarina a $T=293K$ .	135
Figura 100- Espectro de absorção na região do UV-vis para 7-hidroxycumarina em EtOH a $T=298K$ .	135
Figura 101- Espectro de Dicroísmo circular para ASB após	

Adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina a T=288K.	136
Figura 102- Espectro de Dicroísmo circular para ASB após adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina a T=293K.	137
Figura 103- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB após adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina a T=298K.	137
Figura 104- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina a T=288K.	139
Figura 105- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações 7-hidroxicumarina a T=288K.	140
Figura 106- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina a T=293K.	140
Figura 107- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina a T=293K.	141
Figura 108- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina a T=298K.	142

Figura 109- Gráfico de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina a $T=298K$ .	143
Figura 110- Espectro de emissão da fluorescência para 7-hidroxicumarina em etanol ( $\lambda_{exc}= 325nm$ ).	143
Figura 111- Gráfico de $F_0/F_0-F$ para ASB x $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ a $T=288K$ .	145
Figura 112- Gráfico de $F_0/F_0-F$ para ASB x $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ a $T=293K$ .	145
Figura 113- Gráfico de $F_0/F_0-F$ para ASB x $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ a $T=298K$ .	146
Figura 114- Gráfico de $\ln K_a \times 1/T$ para ASB/[7-hidroxicumarina]	147
Figura 115- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[7\text{-hidroxicumarina}]$ a $T=288K$ .	149
Figura 116- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[7\text{-hidroxicumarina}]$ a $T=293K$ .	149
Figura 117- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[7\text{-hidroxicumarina}]$ a $T=296K$ .	150
Figura 118.1, 118.2 e 118.3- Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência para $[ASB]= 1,0 \times 10^{-5}M$ e de absorção no Uv-vis para $[7\text{-hidroxicumarina}]= 1,0 \times 10^{-5}M$ nas temperaturas de 288, 293 e 296K.	151-152
Figura 119- Espectro de absorção para ASB após adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxicumarina a $T=298K$ .	155
Figura 120- Espectro de absorção da 4-metil-7-hidroxicumarina em etanol a $T=298K$ .	155

Figura 121- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB após adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=288K.	156
Figura 122- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB após adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=293K.	157
Figura 123- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB após adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=298K.	157
Figura 124- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7- hidroxicumarina a T=288K.	159
Figura 125- Gráfico de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=288K.	160
Figura 126- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=293K.	161
Figura 127- Gráfico de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=293K.	162
Figura 128- Espectro de fluorescência para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=293K.	162
Figura 129- Gráfico de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina a T=298K.	163
Figura 130- Espectro de emissão de fluorescência para 4-metil-7-hidroxicumarina em etanol ( $\lambda_{exc} = 325nm$ ).	164
Figura 131- Gráfico de Fo/Fo-F para ASB x 1/[4-metil-7-hidroxicumarina] a T=288K.	166
Figura 132- Gráfico de Fo/Fo-F para ASB x 1/[4-metil-7-hidroxicumarina] a T= 293K.	166

Figura 133- Gráfico de $F_0/F_0-F$ para ASB x $1/[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ a $T= 298\text{K}$ .	167
Figura 134- Gráfico de $\ln K_a \times 1/T$ para ASB /4-metil-7-hidroxicumarina	168
Figura 135- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ a $T=288\text{K}$ .	170
Figura 136- Gráfico de $\log( F_0-F)/F$ para ASB x $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ a $T=293\text{K}$ .	171
Figura 137- Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ a $T=298\text{K}$	171
Figura 138.1 , 138.2 e 138.3- Sobreposição dos espectros de Fluorescência para [ASB]= $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$ e de absorção para [4-metil-7-hidroxicumarina]= $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$ nas temperaturas de 288, 293 e 298K.	174
Figura 139 – Curva de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina em PBS ( $1,00 \mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).	176
Figura 140 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de rutina (0 – $24,8 \mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).	177
Figura 141 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6}$ $\text{mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de rutina metilada (0 – $24,8 \mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).	178

Figura 142 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), em PBS, na presença de concentrações variadas de  $\beta$ -lapachona (0 – 24,8  $\mu$ M). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação

( $\lambda = 280$  nm).

178

Figura 143 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), em PBS, na presença de concentrações variadas do ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico (0 – 24,8  $\mu$ M). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda$

= 280 nm).

179

Figura 144 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), em PBS, na presença de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina (0 – 24,8  $\mu$ M). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação

( $\lambda = 280$  nm).

179

Figura 145 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), em PBS, na presença de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxi-cumarina (0 – 24,8  $\mu$ M). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação

( $\lambda = 280$  nm).

180

LISTA DE TABELAS	pág
Tabela 1- Transições características para alguns cromóforos.	10
Tabela 2- Transições eletrônicas, comprimentos de onda e absortividade molar para grupos cromóforos característicos.	11-12
Tabela 3- Procedimento experimental utilizado na obtenção das amostras supressoras.	33-34
Tabela 4- Procedimento experimental para a obtenção da solução de ASB.	35-36
Tabela 5- Valores de $\alpha$ -hélice para ASB em presença de diferentes concentrações Rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	46
Tabela 6- Dados de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina a $T=296K$ .	50
Tabela 7- Dados de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina a $T=303K$ .	52
Tabela 8- Dados de $F_0/F$ para ASB em diferentes concentrações de rutina a $T=310K$ .	53
Tabela 9- Valores de $T(K)$ , $K_{sv}$ e $K_q$ para o sistema ASB/rutina nas Temperaturas de 296, 303 e 310K.	54
Tabela 10- Valores de $F_0/F_0-F$ para ASB x $1/[rutina]$ nas temperaturas de 293, 303 e 310K.	56
Tabela 11- Valores de $\ln K_a \times 1/T$ para o sistema ASB/rutina nas Temperaturas de 296, 303 e 310K.	58
Tabela 12- Valores de $T(K)$ , $\Delta G^0$ , $\Delta H^0$ e $\Delta S^0$ para o sistema ASB/rutina nas Temperaturas de 296, 303 e 310K.	60
Tabela 13- Valores de $\log(F_0-F/F)$ para ASB x $\log [rutina]$ nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	61
Tabela 14- Dados de $K_b$ e $n$ para o sistema ASB/rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	63

Tabela 15- Valores de “J”, “R <sup>6</sup> ”, “r <sup>6</sup> ” e “r” para o sistema ASB/rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	68
Tabela 16- Valores de $\alpha$ -hélice da ASB em presença de diferentes concentrações de rutina-metilada nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	74
Tabela 17- Dados de F <sub>0</sub> /F da ASB após adição de diferentes concentrações de rutina-metilada a T=296K.	76
Tabela 18- Valores de F <sub>0</sub> /F da ASB após adição de diferentes concentrações de rutina-metilada a T=303K.	78
Tabela 19- Valores de F <sub>0</sub> /F para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina-metilada a T=310K.	79
Tabela 20- Valores de T(K), K <sub>sv</sub> e K <sub>q</sub> para o sistema ASB/rutina-metilada em diferentes temperaturas.	80
Tabela 21- Valores para F <sub>0</sub> /F <sub>0</sub> -F da ASB x 1/[rutina-metilada] em diferentes temperaturas.	81
Tabela 22- Valores de T(K), K <sub>sv</sub> e k <sub>q</sub> para o sistema ASB/ Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico em diferentes temperaturas.	83
Tabela 23- Dados de T(K), $\Delta G^0$ , $\Delta H^0$ e $\Delta S^0$ para o sistema ASB/rutina-metilada	84
Tabela 24- Valores de Log (F <sub>0</sub> -F/F) da ASB x log[rutina-metilada] nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	85
Tabela 25- Dados de K <sub>b</sub> e n para o sistema ASB/rutina-metilada nas Temperaturas de 296, 303 e 310K.	87
Tabela 26- Valores de “J”, “R <sup>6</sup> ”, r <sup>6</sup> , R e r para o sistema ASB/rutina metilada nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	90
Tabela 27- Valores de $\alpha$ -hélice da ASB em presença de diferentes Concentrações de $\beta$ -lapachona nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	95
Tabela 28- Valores de F <sub>0</sub> /F para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a T=296K.	97

Tabela 29- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a $T= 303K$ .	99
Tabela 30- Dados de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de $\beta$ -lapachona a $T=310K$ .	100
Tabela 31- Valores de $T(K)$ , $K_{sv}$ e $K_q$ para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona em diferentes temperaturas.	101
Tabela 32- Valores de $F_0/F_0-F$ para ASB x $1/[\beta\text{-lapachona}]$ em diferentes temperaturas.	102
Tabela 33- Valores de $1/T \times \ln K_a$ para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona em diferentes temperaturas.	104
Tabela 34- Valores de $T(K)$ , $\Delta G^0$ , $\Delta H^0$ e $\Delta S^0$ para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona.	105
Tabela 35- Valores de $\log(F_0-F)/F$ para ASB x $\log[\beta\text{-lapachona}]$ nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	106
Tabela 36- Dados de $K_b$ e $n$ para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	108
Tabela 37- Valores de $J$ , $R_0^6$ , $r^6$ , $R$ e $r$ para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	111
Tabela 38- Valores de $\alpha$ -hélice da ASB em presença de diferentes concentrações do ácido $\beta$ -lapachônico-3-sulfônico nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	116
Tabela 39- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações do ácido $\beta$ -lapachônico-3-sulfônico a $T=296K$ .	118
Tabela 40- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes Concentrações do ácido $\beta$ -lapachônico-3-sulfônico a $T=303K$ .	120
Tabela 41- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações do ácido $\beta$ -lapachônico-3-sulfônico a $T=303K$ .	121

Tabela 42- Valores de T(K), K <sub>sv</sub> e K <sub>q</sub> para o sistema ASB/ ácido β-lapachônico-3-sulfônico em diferentes temperaturas.	122
Tabela 43- Dados de F <sub>0</sub> /F para ASB x [4-metil-7-hidroxicumarina] a T=302K	123
Tabela 44- Valores de F <sub>0</sub> /F para ASB x [4-metil-7-hidroxicumarina] a T=306K.	125
Tabela 45- Dados de F <sub>0</sub> /F para ASB x [4-metil-7-hidroxicumarina] Em T=310K	126
Tabela 46- Valores de T(K), K <sub>sv</sub> e k <sub>q</sub> para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina em diferentes temperaturas	127
Tabela 47- Dados de F <sub>0</sub> /F <sub>0-F</sub> x 1/[4-metil-7-hidroxicumarina] em diferentes temperaturas	129
Tabela 48- Valores de J, R <sub>0</sub> <sup>6</sup> , r <sup>6</sup> , R e r para o sistema ASB/ácido β-lapachona-3-sulfônico, nas temperaturas de 296, 303 e 310K.	132
Tabela 49- Valores de α-hélice para ASB em presença de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.	137
Tabela 50- Valores de Fo/F para a ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina em T=288K.	139
Tabela 51- Valores de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina em T=293K.	141
Tabela 52- Valores de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina em T=298K.	142
Tabela 53- Valores de T(K), K <sub>SV</sub> e k <sub>q</sub> para o sistema ASB/7-hidroxicumarina em diferentes temperaturas.	144
Tabela 54- Valores de Fo/F <sub>0-F</sub> da ASB x 1/[7-hidroxicumarina] em diferentes temperaturas.	146
Tabela 55 - Valores de 1/T x ln K <sub>a</sub> para o sistema ASB/7-hidroxicumarina.	147
Tabela 56- Valores de T(K), ΔG <sup>o</sup> , ΔS <sup>o</sup> e ΔH <sup>o</sup> do sistema ASB/7-hidroxicumarina.	147

Tabela 57 –Valores de $\log(F_0-F/F)$ para ASB x $\log[7\text{-hidroxycumarina}]$ nas temperaturas de 288, 293 e 296K.	148
Tabela 58- Dados de $K_b$ e $n$ para o sistema ASB/7-hidroxycumarina nas temperaturas de 288, 293 e 296K.	150
Tabela 59- Valores de $J$ , $R_0^6$ , $r^6$ , $R$ e $r$ para o sistema ASB/7-hidroxycumarina nas temperaturas de 288, 293 e 296K.	153
Tabela 60 - Valores de $\alpha$ -hélice para ASB em presença de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxycumarina, nas temperaturas de 288, 293 e 298K.	157
Tabela 61- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxycumarina em $T=288K$ .	159
Tabela 62- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxycumarina em $T=293K$ .	161
Tabela 63- Valores de $F_0/F$ para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxycumarina em $T=298K$ .	162
Tabela 64- Valores de $T(K)$ , $K_{SV}$ e $k_q$ para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxycumarina em diferentes temperaturas.	164
Tabela 65- Valores de $F_0/F_0-F$ da ASB x $1/[4\text{-metil-7-hidroxycumarina}]$ em diferentes temperaturas.	165
Tabela 66 - Valores de $1/T \times \ln K_a$ para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxycumarina em diferentes temperaturas.	167
Tabela 67- Valores de $T(K)$ , $\Delta G^\circ$ , $\Delta S^\circ$ e $\Delta H^\circ$ para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxycumarina.	168
Tabela 68 –Valores de $\log(F_0-F/F)$ da ASB x $\log[4\text{-metil-7-hidroxycumarina}]$ nas temperaturas de 288, 293 e 296K.	168
Tabela 69- Dados de $K_b$ e $n$ para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxycumarina nas temperaturas de 288, 293 e 296K.	171
Tabela 70- Valores de $J$ , $R_0^6$ , $r^6$ , $R$ e $r$ para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxycumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.	173

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

Uv-vis- Radiação do espectro eletromagnético na região do ultravioleta-visível.

ASB- Albumina Sérica Bovina

$\Delta E$ - Variação da energia entre dois estado eletrônicos.

$h$ - Constante de Planck

$\nu$ - Frequência da radiação eletromagnética

$E_1$ - Energia do estado eletrônico um.

$E_2$ - Energia do estado eletrônico dois.

$\lambda$ - Comprimento de onda .

$c$ - Velocidade da luz.

$N_A$ - Número de Avogadro

$\text{Kj.mol}^{-1}$ - Unidade de medida da energia molar de uma transição eletrônica.

nm- Unidade de medida correspondente a  $1,00 \times 10^{-9}\text{m}$ .

mol- Quantidade de substância.

$S$ - Momento angular total de spin

$M$ - Multiplicidade molecular.

$T$ - Estado triplete.

$S_0$ - Estado singlete fundamental

$S_2$ - Segundo estado singlete excitado.

$\sigma$ - Orbital sigma ligante.

$\sigma^*$ - Orbital sigma anti-ligante.

$\pi$ - Orbital pi ligante

$\pi^*$ - Orbital pi anti-ligante

$n$ - elétrons não ligantes

$\text{Hg}_{(g)}$ - Mercúrio

$\text{Xe}_{(g)}$ - Xenônio

E - Vetor campo elétrico

$\mu$ - Momento de dipolo molecular.

R- Momento dipolar da molécula.

$\Sigma$  - Somatório

$r_i$ - Operador momento dipolar para o elétron.

$n \rightarrow \sigma^*$  - Transição eletrônica do tipo elétrons não ligante para o orbital sigma anti-ligante.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$  - Transição eletrônica do tipo orbital sigma ligante para o orbital sigma anti-ligante.

$n \rightarrow \pi^*$  - Transição eletrônica do tipo elétrons não ligante para o orbital pi anti-ligante.

$P_0$  – Potência do feixe de radiação incidente

P- Potência do feixe de radiação após passar pela amostra.

T- Transmitância

b- Caminho ótico

A- Absorbância

$-\log^T$ - Logaritmo neperiano negativo da transmitância.

$\Delta A$ - Variação da absorção.

$A_e$ - Absorção no sentido esquerdo do DC

$A_d$ - Absorção no sentido direito do DC

DC- Absorção por dicroísmo Circular.

$\alpha$ -hélice- disposição conformacional encontrada entre aminoácidos presente na estrutura

Folha- $\beta$ - Disposição planar encontrada entre os aminoácidos presentes na estrutura secundária das proteínas.

FRET- Transferência de energia por ressonância fluorescente.

$\tau_0$ - Tempo de vida para o estado excitado do fluoróforo.

$R_0$ - Distância de Förster

[Q]- Concentração do supressor.

$F_0$  – Fluorescência inicial

F- Fluorescência final

$k_q$ - Constante de supressão bimolecular

$K_{sv}$ - Constante de Stern-Volmer

D- Coeficiente de difusão.

$\Delta x^2$ - Distância média entre as espécies no fenômeno de difusão.

r- Anisotropia

$r_0$ - Anisotropia média na ausência de difusão rotacional.

$T_1 \rightarrow S_0$ - Transição triplete excitado para o singlete fundamental.

$S_1 \rightarrow S_0$ - Transição singlete excitado para o singlete fundamental

$S_2 \rightarrow S_0$ - Transição do segundo nível de energia do singlete excitado para o singlete fundamental.

$M + h\nu \rightarrow M^*$  - Representação simplificada da excitação molecular.

$M^* \rightarrow M + h\nu$  - Representação simplificada da emissão radiativa.

$M^* + Q \rightarrow M + Q^*$ - Representação simplificada de um dos processos de supressão radiativa.

$\pi^2 \rightarrow \pi\pi^*$  - Transição eletrônica do tipo “pi” dois, para pi fundamental e pi excitado.

$n^2 \rightarrow n\pi^*$ - Transição eletrônica de elétrons do tipo n presentes em átomos de oxigênio.

HOMO- Orbital molecular de menor energia mais ocupado.

LUMO- Orbital molecular de maior energia pouco ocupado.

$\psi_a$  - Função de onda para o estado fundamental

$\psi_b$ - Função de onda do estado excitado.

> - Maior que

< - Menor que

$B_{a,b}$ - Absorção estimulada da radiação eletromagnética

$A_{a,b}$ - Emissão estimulada da radiação eletromagnética.

m- Massa do elétron

$\int E d\nu$  - Banda de absorção integrada.

$\epsilon$ - Coeficiente de absorção experimental

$\psi_1$ - Função de onda eletrônica

$\phi_1$ - Fator vibracional da função de onda.

$X_1$ - Fator vibracional da função de onda

$\sigma_1$ - Fator relativo ao spin eletrônico da função de onda.

$\theta$ - Tempo de correlação rotacional para o processo de difusão.

RET- Transferência de energia de ressonância.

$K_t$ - Razão da transferência de energia.

$r$ - Distância entre doador e receptor.

$\tau_D$ - Tempo de vida do doador na ausência de transferência de energia.

ASH- Albumina sérica bovina.

I e II- Sítios de ligação na macromolécula protéica.

IIA e IIIA- Subdomínios da Macromolécula protéica

$\Delta G^0$ - Variação da Energia livre de Gibbs de formação

$\Delta H^0$ - Variação da Entalpia de formação

$\Delta S^0$ - Variação da Entropia de formação.

$L_1$ - $L_9$ - Elipticidade presente na estrutura secundária da macromolécula protéica

Trp-134- Resíduo de triptofano presente no primeiro subdomínio.

Trp-212- Resíduo de triptofano presente no segundo subdomínio.

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ - Carbonato de sódio

$\text{H}_2\text{SO}_4$ - Sulfato de hidrogênio

$\text{Ac}_2\text{O}$  – Anidrido acético

$L_p$ - Lapachol

ADN- Ácido desoxidoribonucleico

pH- Fator hidrogeniônico.

$-\text{SO}_3\text{H}$ - Grupo sulfônico (Sulfu).

$\theta_{208}$ - Valores de ângulos em  $\lambda= 208\text{nm}$ .

$\theta_{222}$ - Valores de ângulos em  $\lambda=222\text{nm}$ .

M.R.E- Medida da elipticidade residual.

n- Sítio de ligação

J- Fator relativo a sobreposição dos espectros de emissão do doador e absorção do receptor contido na intergal de sobreposição.

Ka- Constante de ligação efetiva.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Pg.</b>
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xxiv
1.0-INTRODUÇÃO	1
1.1 Uma breve perspectiva teórica	1
1.2 Estudo de caso	17
1.3 Os elementos do sistema em estudo	19
1.3.1 Macromolécula protéica	19
1.3.2 Albumina sérica bovina(ASB)	22
1.4 Lapachonas, cumarinas e flavonóides as moléculas supressoras	25
1.4.1 Lapachonas quinonas especiais	25
1.4.2 Cumarinas	27
1.4.3 Flavonóides	30
2.0- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
2.1 A obtenção dos espectros de Absorção no UV-vis, Dicroísmo Circular e Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário.	36
3.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 ASB x rutina	40
3.1.1 Dados de Espectroscopia de Absorção no UV-visível	40
3.1.2 Dados de Dicroísmo Circular	43
3.1.3 Dados de Fluorescência	47
3.2 ASB x rutina-metilada	69
3.2.1 Dados de Absorção no UV-vis	69
3.2.2 Dados de Dicroísmo Circular	71
3.2.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário	75

3.3 ASB x $\beta$ -lapachona	91
3.3.1 Dados de Espectroscopia de Absorção no UV-visível	91
3.3.2 Dados de Dicroísmo Circular	93
3.3.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário	96
3.4 ASB x 3-Ácido $\beta$ -lapachona-sulfônico	112
3.4.1 Dados de Espectroscopia de Absorção no UV-visível	112
3.4.2 Dados de Dicroísmo Circular	114
3.4.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário	117
3.5 ASB x 7-hidroxicumarina	133
3.5.1 Dados de Espectroscopia de Absorção no UV-visível	133
3.5.2 Dados de Dicroísmo Circular	135
3.5.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário	138
3.6 ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina	154
3.6.1 Dados de Espectroscopia de Absorção no UV-visível	154
3.6.2 Dados de Dicroísmo Circular	155
3.6.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário	158
4-ESTUDOS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA COM RESOLUÇÃO TEMPORAL	176
5-CONCLUSÃO	181
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
ANEXOS	190-229

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 UMA BREVE PERSPECTIVA TEÓRICA

Elementos conceituais associados às transições eletrônicas ocorridas em moléculas orgânicas, entre as quais se encontram: Albumina Sérica Bovina (ASB, esta especificamente melhor conceituada como macromolécula), Cumarinas, Flavonóides e  $\beta$ -Lapachonas, por fazerem parte deste estudo, serão abordados neste tópico.

Nas transições eletrônicas, que são quantizadas, a energia do fóton absorvido pela espécie energeticamente excitada está associada à variação de energia entre os dois níveis eletrônicos envolvidos em uma transição [GILBERT 1991]. A primeira condição para que uma determinada transição eletrônica ocorra é que o valor da energia de transição eletrônica entre dois estados quaisquer esteja diretamente relacionado com a diferença entre os valores de energia correspondentes a estes estados. Essa condição está associada ao fato de que essas energias admitem apenas valores discretos (quantização da energia). Por conseguinte, ao considerarmos dois níveis energéticos “1” e “2” quaisquer de uma transição eletrônica, pode ser estabelecida uma relação como a que se segue abaixo (Equação 1).

$$\Delta E = h\nu \quad (\text{equação 1})$$

onde  $\Delta E = E_2 - E_1$ ;  $h$  = constante de Planck e  $\nu$  = frequência

A partir da relação entre a frequência e o comprimento de onda da radiação eletromagnética, pode-se reescrever a equação da energia a partir do comprimento de onda da radiação de excitação (equação 2).

$$E = hc/\lambda \quad (\text{equação 2})$$

onde  $c$  = velocidade da luz no vácuo e  $\lambda$  = comprimento de onda da radiação

Na situação em que se deseje expressar a energia para 1 mol de fótons teremos (equação 3):

$$\Delta E = N_A hc/\lambda \quad (\text{equação 3})$$

onde,  $N_A = 6,022141 \times 10^{23}$  (Constante de Avogadro).

Assim, para  $\lambda$  em nanômetros (nm), temos que  $\Delta E = 1,1962658 \times 10^5 / \lambda \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Um exemplo característico de transição eletrônica é o caso típico do 1,3-butadieno [GILBERT 1991] quando excitado a 254nm, no qual ocorre uma transição  $\pi$ - $\pi^*$  que envolve uma energia de 471kJ mol<sup>-1</sup> (Figura 1).

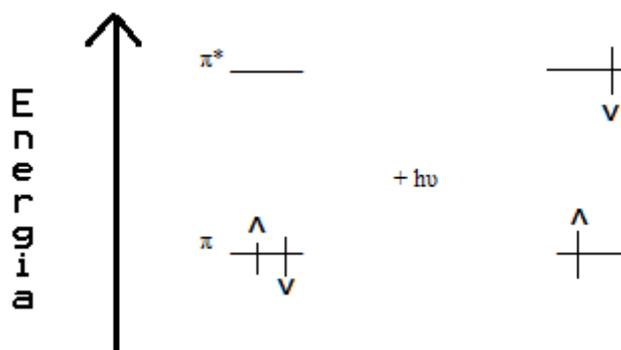


Figura 1- Esquema representativo de uma transição do tipo  $\pi$ - $\pi^*$ .

Radiações eletromagnéticas de curto comprimento de onda permitem excitar os elétrons de ligação na molécula, causando mudanças eletrônicas, daí as reações fotoquímicas ocorrerem por excitação na região do visível e do ultravioleta (UV) do espectro eletromagnético [GILBERT 1991].

As transições eletrônicas numa molécula orgânica estão associadas ao fato de que cada elétron na molécula, sendo portador de um momento angular de spin, quando na presença de um campo magnético poderá ter uma orientação favorável ou oposta às linhas do campo magnético a que está sujeito; isso permite ao elétron considerado ter

dois diferentes estados de energia, entendido comumente pela simbologia  $S=1/2$  e  $S=-1/2$ . A transição entre os dois níveis de energia correspondentes a esses estados envolve mudança no alinhamento do momento magnético do elétron, e este fenômeno está na base da ressonância do spin eletrônico.

O momento angular total de spin é representado pelo número quântico de spin “S” que é a resultante da contribuição individual de cada elétron. Daí, a multiplicidade de spin “M” ser o parâmetro que fornece o número de estados esperados na presença de um campo magnético aplicado, como demonstra a equação de multiplicidade (equação 4).

$$M= 2(\Sigma S) + 1 \quad \text{(equação 4)}$$

onde,  $\Sigma S$ = valor absoluto do somatório dos spins individuais.

A multiplicidade de uma molécula, na condição na qual todos os spins estão emparelhados e, portanto, o momento de spin total é igual a zero, será ( $M=1$ ); tal estado eletrônico é definido como estado singlete, que quando associado ao estado fundamental é representado por “ $S_0$ ”. Uma segunda situação possível,  $M=3$ , ocorre quando após a excitação eletrônica o momento angular total da molécula é igual a 1, resultando numa multiplicidade igual a 3, o qual é denominado estado triplete “T”. O estado triplete, por ter elétrons não emparelhados (de mesmo spin) ocupando orbitais diferentes (Princípio da exclusão de Pauli), se encontra num estado de energia inferior quando comparado ao estado singlete. (Figura 2).

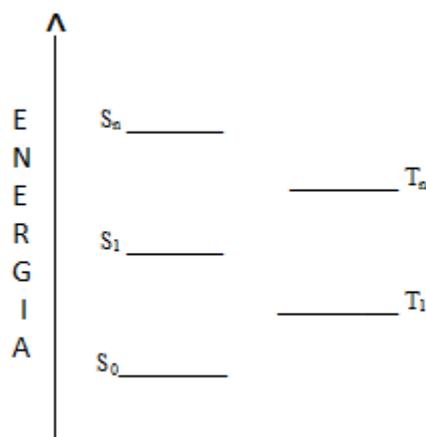


Figura 2- Esquema representativo das energias eletrônicas e sua multiplicidade.

O espectro de absorção reflete exatamente quais as possíveis transições envolvidas em uma molécula, com a banda de maior comprimento de onda (e, portanto, de menor energia) indicando a transição  $S_0-S_1$ ; a seguir  $S_0-S_2$  (menor comprimento de onda comparado à anterior),  $S_0-S_3$  e assim sucessivamente. A Regra de Kasha estabelece que o estado excitado singlete (ou tripleto) de uma determinada molécula é normalmente o estado reativo ou emissivo. O processo de conversão interna é, na maioria das vezes, mais rápido do que a emissão ou a reatividade do estado excitado, singlete ou tripleto e, portanto, processos emissivos ou reativos normalmente ocorrem a partir do primeiro estado eletronicamente excitado. Assim, os estados excitados superiores decaem a  $S_1$  (ou  $T_1$ ) que, então, é responsável pela reatividade ou propriedade emissiva. O caso do azuleno é um no qual a emissão de fluorescência vem do estado  $S_2$  que, por ter energia muito superior a  $S_1$ , tem constante de velocidade muito baixa para conversão interna  $S_2-S_1$  [GILBERT 1991], sendo considerado assim uma exceção à regra de Kasha. Outra consideração importante, tendo em vista o esquema simplificado, é a de que, muitas vezes, dependendo da molécula em estudo, o segundo estado excitado tripleto possui energia menor do que o primeiro estado excitado singlete.

Nos compostos orgânicos a transição eletrônica está associada à presença de orbitais dos mais diversos tipos:  $\sigma$ (sigma),  $\sigma^*$ (sigma antiligante),  $\pi$ (pi),  $\pi^*$ (pi antiligante) e n(não-ligante). No entanto, os orbitais  $\sigma$  e  $\pi$  por participarem das ligações que compõem uma molécula estão mais sujeitos as constantes vibracionais, no sentido de estarem sujeitas as variações nas energias de vibrações, o que não é característico do orbital “n” que pouco contribui para ligações nesses sistemas.

Essas transições eletrônicas podem ser estimuladas por diversas fontes de excitação e produzem estados eletronicamente excitados nas moléculas por meio de transições entre orbitais. A absorção de luz, que é o fenômeno precedente à transição entre estados energéticos na molécula, tem sua explicação associada ao modelo da mecânica quântica e da teoria de grupo. Uma das formas de interação da molécula com a radiação eletromagnética, e importante do ponto de vista fotoquímico, é a aproximação que pode ser estabelecida considerando a absorção da luz como a interação do vetor campo elétrico da radiação eletromagnética (E) e do momento dipolar da molécula ( $\mu$ ). O momento dipolar da molécula ( $\mu$ ) é determinado pela média da distância e direção entre os elétrons da molécula, por meio do vetor “r”. O operador relacionado para a absorção de luz é definido na equação abaixo ( Equação 5):

$$\mu = e \sum_i r_i \quad (\text{equação 5})$$

onde  $r_i$  é o operador para o momento dipolar para o elétron

Há duas condições para que uma absorção possa ocorrer: a primeira é a existência de um estado quântico de maior energia, e a segunda é a de que a integral do momento de transição se altere (mudança do momento de dipolo) durante a transição (Equação 6), e deve ser diferente de zero [ MARQUES 1984].

$$R_{a,b} = \langle \psi_a | R | \psi_b \rangle \quad (\text{equação 6})$$

onde  $R_{a,b}$  = mudança do momento de dipolo;  $\psi_a$  e  $\psi_b$  = Função de Onda para os estados eletrônicos “a” e “b”.

Observa-se que a absorção estimulada ( $B_{a,b}$ ), equação 7, e a emissão espontânea ( $A_{a,b}$ ) (equação 8) estão diretamente relacionadas às grandezas dos momentos de transição entre os dois estados, como demonstrado pelas equações relacionadas abaixo (Equações 7 e 8).

$$B_{a,b} = (8\pi^3 / 3h^2c) \times |R_{a,b}|^2 \quad (\text{equação 7})$$

$$A_{a,b} = (64\pi^4 / 3hc^3) \cdot \nu^3 \cdot |R_{a,b}|^2 \quad (\text{equação 8})$$

onde:  $h = 6,626069 \times 10^{-34}$  J.s ;  $c = 299792458$  m.s<sup>-1</sup>;  $\nu$  = frequência da radiação da emissão espontânea e  $R_{a,b}$  = mudança do momento de dipolo durante a transição entre os estados.

A intensidade da transição entre dois estados “a” e “b” quaisquer é denominada de força do oscilador (Equação 9), donde teríamos.

$$f_{a,b} = (8\pi^2 c m / 3he) \cdot |R_{a,b}|^2 \quad (\text{equação 9})$$

onde:  $f_{a,b}$  = força do oscilador,  $m$  = massa do elétron,  $e$  = carga do elétron,  $\nu$  = frequência de absorção,  $c$  = velocidade da luz no vácuo e  $h$  = constante de Planck.

Novamente aqui pode ser observada a dependência de uma grandeza relacionada com a transição eletrônica entre dois estados e a mudança do momento de dipolo. Isso nos leva a concluir que a intensidade da transição eletrônica entre dois estados está diretamente relacionada ao deslocamento de carga que ocorre na molécula no momento da transição.

A força do oscilador e o coeficiente de absorção experimental (coeficiente de extinção molar) estão relacionados por meio da seguinte equação (Equação 10).

$$f_{a,b} = 4,32 \times 10^{-9} \int \epsilon \nu d\nu \quad (\text{equação 10})$$

sendo  $\int \epsilon dv$ =banda de absorção integrada.

Em uma transição eletrônica apenas um elétron é excitado, e o valor dessa excitação possui uma energia que é a diferença de energia entre os orbitais nos estados fundamental e excitado. Outra consideração importante é a de que na função de onda total (equação 11), a parte eletrônica da molécula sofre influência do operador “R”, ou seja, da mudança do momento de dipolo durante a transição. Isto se deve a relação entre as partes que compõem a função de onda se dá de maneira independente.

$$\psi_1 \equiv \Phi_1 X_1 S_1 \quad (\text{equação 11})$$

Onde:  $\Phi_1$ = termo eletrônico,  $X_1$ = termo vibracional e  $S_1$ = termo referente ao spin.

A diferença do comportamento entre as funções de onda da parte nuclear e eletrônica é fator importante quando se considera a transição do dipolo elétrico [GILBERT 1991]. Com isto, pode-se dizer que numa transição eletrônica a promoção de um elétron para níveis mais energéticos ocorre de maneira mais rápida do que o movimento nuclear, tendo a configuração nos estados fundamental e excitado a mesma distribuição nuclear. Depreende-se disto que a configuração nuclear pós-transição pode sofrer alguma mudança, conforme estabelecido pelo principio de Franck-Condon (Figura 3) que norteia o entendimento das transições eletrônicas, isto porque é devido a diferença de massa entre o núcleo atômico e a do elétron, a movimentação de ambas componentes atômicas não se dá forma simultaneamente, isso determina uma resposta diferente das partículas componentes do átomo frente a uma condição de estimulação eletromagnética (ver Figura 3).

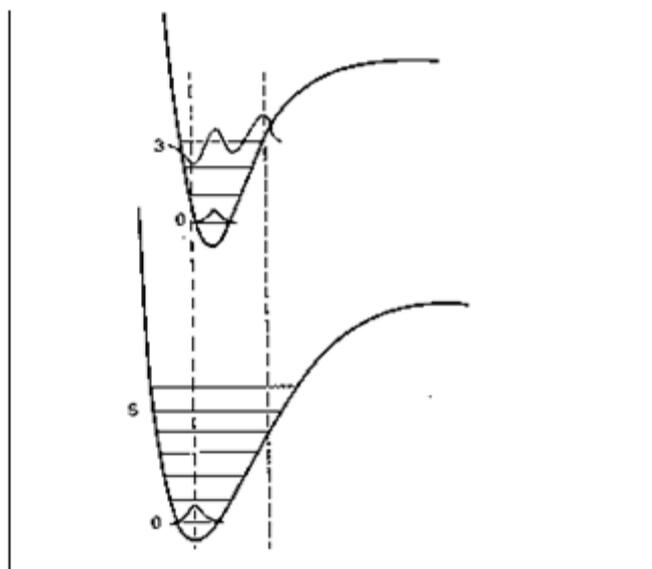


Figura 3- Diagrama demonstrando o princípio de Franck-Condon

A transição eletrônica devido à absorção da radiação é representada pela reta vertical tracejada localizada à esquerda. Contudo, os estados energéticos dos respectivos orbitais serão diferentes já que na condição estimulada (excitada) a posição relativa dos elétrons em relação ao núcleo causa uma modificação nas distâncias de ligação no orbital molecular resultante; aqui o núcleo não foi capaz de responder imediatamente ao estímulo da fonte de excitação. Sobre a simetria dos estados excitado e fundamental, tem-se que, quando estes estados não apresentam simetria diferente, este é um fator favorável à probabilidade de uma transição eletrônica.

Diferentes tipos de transições podem ocorrer entre os estados, as quais estão representadas de forma simplificada no diagrama de Jablonski mostrado na Figura 4. Nesse diagrama estão associados estados energéticos de diferentes multiplicidades e as possíveis transições que podem ocorrer entre eles. Essas transições podem se dar com emissão ou não de radiação eletromagnética. As transições radiativas, dentre as quais estão a fluorescência e a fosforescência, envolvem a emissão de um fóton durante o seu

processo de desativação, enquanto que as transições não-radiativas ocorrem por emissão de calor. É importante ressaltar que a transição radiativa denominada fosforescência ocorre entre estados energéticos de diferentes multiplicidades  $T_1 \rightarrow S_0$ , enquanto a emissão fluorescente ocorre entre estados de mesma multiplicidade  $S_1 \rightarrow S_0$ ,  $S_2 \rightarrow S_0$  ou  $T_n - T_1$ .

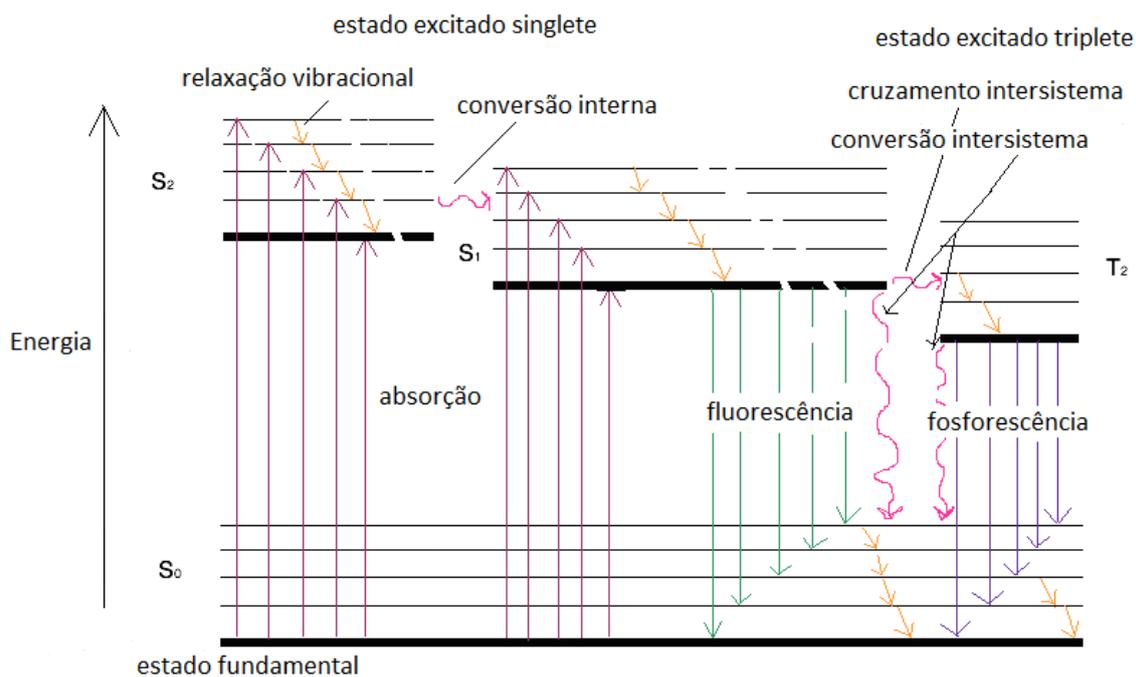


Figura 4 – Diagrama de Jablonski

Observando os processos básicos envolvidos em uma transição eletrônica entre estados excitados (Figura 4), a reatividade do estado excitado pode ser obtida por um estudo de supressão do processo de emissão radiativa. Aqui, a molécula excitada na ausência de uma segunda espécie que possa suprimi-la está livre para retornar ao estado fundamental emitindo uma radiação eletromagnética específica, isto é, fluorescência, fosforescência ou luminescência total a depender do ambiente químico no qual a espécie está envolvida e ao fato sua estrutura química favorecer o processo requerido (Figura 5).

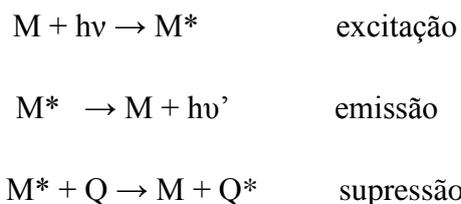


Figura 5- Esquema básico dos processos fotofísicos frente à absorção de luz.

Moléculas orgânicas podem apresentar diferentes transições eletrônicas, a depender do tipo de ligação apresentado. Por exemplo, transições do tipo  $\pi^2 \rightarrow \pi\pi^*$ , provenientes da presença de elétrons  $\pi$  no anel aromático, carbonila e na ligação dupla etilênica são possíveis. Além disso, a presença de elétrons “n” nos átomos de oxigênio em carbonilas fornece outro tipo de transição possível, ou seja,  $n^2 \rightarrow n\pi^*$ . No entanto, esta transição é menos provável, devido à diferença de simetria entre os estados, uma vez que a simetria entre estados é um fator muito importante na definição do tipo de transição mais provável. Assim, essas possíveis transições, e seus diferentes tipos, estão relacionados com os diferentes tipos de orbitais moleculares envolvidos [GILBERT 1991]. No estado fundamental os elétrons que estão no orbital “HOMO” (orbital molecular ocupado de maior energia), conhecidos como  $\sigma$ ,  $\pi$  e o orbital não ligante “n”, podem ser promovidos para o orbital molecular denominado de “LUMO” (orbital molecular não ocupado de menor energia), usualmente denominado de orbital antiligante, ou seja,  $\sigma^*$  e  $\pi^*$ . A Tabela 1 mostra as transições características para alguns cromóforos, grupos constituintes da molécula responsáveis pela absorção de luz (Tabela 1).

Tabela 1- Transições características para alguns cromóforos [GILBERT 1991].

Tipo de transição	Funções químicas características
$\pi \rightarrow \pi^*$	Alcenos, alcinos e compostos aromáticos.
$n \rightarrow \pi^*$	Carbonilas, tiocarbonilas, nitro, azo e grupos amino.
$n \rightarrow \sigma^*$	Aminas, álcoois e haloalcanos
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	Alcanos

Um diagrama de energia, de caráter ilustrativo, (Figura 6) revela as diferenças entre as diversas transições. Apesar de a energia ser um fator importante nesta transição, atente-se para o fato de que há dois outros fatores grande importância, a saber: o spin eletrônico e a simetria dos orbitais moleculares.

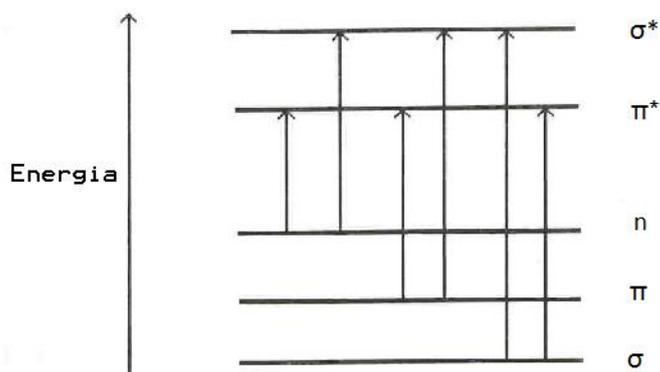


Figura 6- Esquema representativo das transições eletrônicas moleculares

A Tabela 2 representa uma racionalização simplificada da absorção de radiação eletromagnética para alguns grupos cromóforos, assim como valores estimados para a absorvidade molar referente às transições eletrônicas apresentadas por grupos químicos específicos.

Tabela 2 - Transições eletrônicas, comprimento de onda e absorvidade molar para grupos cromóforos característicos [ GILBERT 1991]

Grupo cromóforo	Transição	Valor aproximado para $\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
N=O	$n \rightarrow \pi^*$	660	200
C=S	$n \rightarrow \pi^*$	520	100
N=N	$n \rightarrow \pi^*$	350	100
C=C-C=O	$n \rightarrow \pi^*$	350	30
C=O	$n \rightarrow \pi^*$	280	20
NO <sub>2</sub>	$n \rightarrow \pi^*$	270	20
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	$\pi \rightarrow \pi^*$	260	200
-C≡N	$n \rightarrow \pi^*$	240	150
C=C-C=O	$\pi \rightarrow \pi^*$	220	$2,0 \times 10^5$
C=C-C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$	220	$2,0 \times 10^5$
S=O	$n \rightarrow \pi^*$	210	$1,5 \times 10^3$
C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	$1,0 \times 10^3$
C-C	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 180	$1,0 \times 10^3$
C-H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 180	$1,0 \times 10^3$

A contribuição da Química, em especial das técnicas espectroscópicas a ela aplicadas, podem fornecer informações e possíveis formas de abordagem sobre aspectos relevantes das macromoléculas, em especial as proteínas. Essas, por serem possuidoras de aspectos fundamentais associados ao seu comportamento, tais como: sítios de ligação, transporte e metabolismo no organismo humano e animal, possuem interesse fundamental no seu estudo nos dias de hoje.

Um dos aspectos essenciais a ser considerado, sobretudo pela sua importância fenomenológica nos processos bimoleculares, é o da transferência de energia. Um dos possíveis mecanismos para transferência de energia é o que ocorre por via colisional (equação 12).



Equação 12-Equação representativa do fenômeno de transferência de energia entre duas espécies moleculares.

Quando duas moléculas, M e Q no estado fundamental interagem quimicamente, suas interações são repulsivas devido a energia do estado fundamental ser dependente do inverso da distância colisional entre as espécies. por isso aumenta gradativamente. Se M ou Q se encontrarem no estado excitado, então a energia colisional do par  $M^*Q$  ou  $MQ^*$  será um pouco menor do que a do par separado  $M + Q^*$  ou  $M^* + Q$ . Considerando uma mesma geometria, as superfícies potenciais de  $M^*Q$  e  $MQ^*$  se interceptam e ocorre um processo de conversão interna (ou cruzamento entre sistemas se o tripleto for envolvido) para um estado de energia mais baixa. No ponto de interseção ocorre interação entre  $M^*$  e Q permitindo assim uma transferência de excitação eletrônica. Após o relaxamento para o mínimo do estado de energia mais baixa, a energia térmica pode popular o par da colisão para retornar à superfície superior ou separar o complexo em dois monômeros. Neste caso, as reações podem ocorrer por colisões onde as nuvens de elétrons dos reagentes sobrepõem-se significativamente no espaço, ocorrendo um processo de transferência de elétrons na região de entrosamento. Se os detalhes estereoeletrônicos forem ignorados, então a constante de velocidade para transferência de energia por troca de elétrons (aceptor no estado fundamental) deve cair exponencialmente como um aumento da separação entre  $D^*$  (doador excitado) e A. Isto é devido ao fato de que a densidade de elétrons usualmente decresce exponencialmente na medida em que a distância entre o elétron e o núcleo é aumentada. Um estudo da teoria da transferência de energia por troca de elétrons foi feito por D. L. Dexter, que propôs a seguinte equação para a constante de velocidade (equação 13):

$$k_{ET} = KJ e^{(-2R_{DA}/L)} \quad (\text{equação 13})$$

onde  $J$  é o espectro da integral de sobreposição;  $K$  a constante de interação do orbital específico;  $R_{DA}$  é a separação doador-aceptor e  $L$  o raio de Van der Waals.

A transferência de energia por troca de elétrons pode ocorrer em uma ou várias etapas, entretanto algumas condições devem ser seguidas:

- a) troca de elétrons concertada, isto é, os elétrons do doador e acceptor são trocados simultaneamente;
- b) transferência de carga por troca de elétrons, isto é, os elétrons do doador e acceptor são trocados em uma etapa via par de íon radicais;
- c) troca de elétrons por ligação química covalente, isto é, os elétrons do doador e acceptor são trocados como resultado de uma ligação química para formar um intermediário dirradical ou zwitteriônico(sem carga residual).

Muitos processos de transferência de energia ocorrem em solução fluida via um mecanismo de troca de elétrons, com a difusão molecular de  $D^*$  e  $A$  sendo a constante de velocidade limitante à transferência de energia. Este processo poderá afetar a constante de velocidade de transferência de energia ( $k_{ET}$ ), que pode ser explicado então pelas seguintes etapas (Figura 6):

1. O doador de energia  $D^*$  se difunde na solução até encontrar uma molécula acceptora  $A$ , sendo que ambos irão colidir em um complexo de encontro  $\overline{D^*A}$ , comumente denominado de um exciplexo (um complexo formado com pelo menos um componente no estado excitado).
2. Colisões entre  $D^*$  e  $A$  podem ocorrer, sendo que eventualmente uma das colisões leva à transferência de energia e geração de um novo complexo de encontro (exciplexo)  $\overline{DA^*}$ .
3. O complexo de encontro (exciplexo)  $\overline{DA^*}$  se separa em  $D + A^*$ .

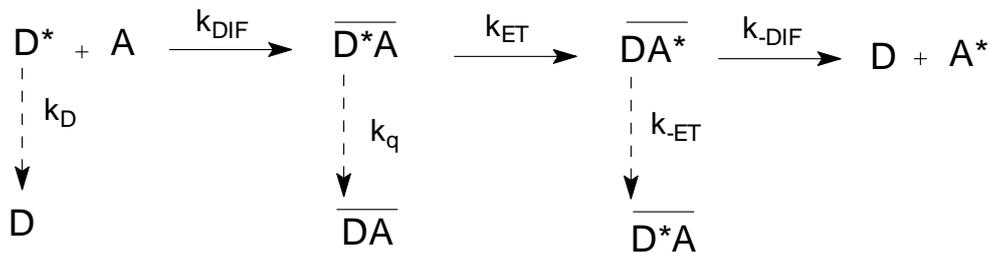


Figura 7- Processos de transferência de energia

Baseado na figura 7, as seguintes situações podem ser consideradas:

1. A velocidade de dissociação do exciplexo ou complexo de encontro é muito mais rápida em relação à transferência de energia. ( $k_{-DIF} \gg k_{ET}$ ).

$$k_{OB} = \frac{k_{DIF}}{k_{-DIF}} k_{ET} \quad \text{se } k_{-DIF} \gg k_{ET}$$

2. A velocidade de dissociação do exciplexo ou complexo de encontro é mais lenta comparada à transferência de energia ( $k_{ET} \gg k_{-DIF}$ ).

$$k_{OB} = k_{DIF} \quad \text{se } k_{ET} \gg k_{-DIF}$$

$k_{OBS}$  = constante de velocidade observada.

Conclui-se que a constante de velocidade observada não é diretamente a constante de velocidade de transferência de elétron ( $k_{ET}$ ) que é refletida em ambos os casos. No caso (1), a constante de velocidade é uma composição da (pseudo) constante de velocidade ( $k_{DIF} / k_{-DIF}$ ) para formar o exciplexo ou o complexo de encontro e a constante de velocidade da transferência de energia. Por outro lado, no caso (2), a

constante de velocidade observada é uma medida da constante de velocidade de difusão para D\* e A e a constante de transferência de energia  $k_{ET}$  não está relacionada.

Em muitos casos, a transferência de energia obedece à equação 14.

$$k_{ET}^{OB} = k_{DIF} [ k_{ET} / (k_{ET} + k_{-DIF}) ] = \alpha k_{DIF} \quad (\text{equação 14})$$

que deve conter a constante de velocidade do supressor, então  $\alpha = (k_{ET} + k_q) / (k_{ET} + k_q + k_{-DIF})$  e a expressão de Stern-Volmer para a supressão por transferência de energia pode ser descrita pelas equações 15 ou 16:

$$\Phi^0 / \Phi = 1 + k_{OBS ET} \tau_D [A] \quad (\text{equação 15})$$

$$\Phi^0 / \Phi = 1 + \alpha k_{ET} \tau_D [A] \quad (\text{equação 16})$$

Um processo importante de transferência de energia entre duas espécies moleculares que estabelecem entre si interações do tipo doador/ligante é o efeito FRET (transferência de energia por ressonância fluorescente), o qual está associado diretamente com as interações existentes entre os sistemas estudados nesse trabalho.

O mecanismo tipo FRET envolve um fluoróforo que no estado excitado é capaz de doar a sua energia de excitação a uma segunda espécie (ligante) . Entende-se que o efeito do tipo FRET é uma troca de energia que ocorre por oscilação entre os momentos de dipolo das espécies envolvidas no fenômeno, com esta ressonância ocorrendo em frequências semelhantes [Hussain 2009]. O esquema abaixo (Figura 7) demonstra de forma simplificada o processo FRET.

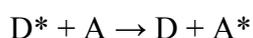
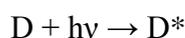


Figura 8- Esquema representativo simplificado do processo tipo FRET. D= doador e A=ligante.

Quatro condições são necessárias para que a transferência de energia pelo mecanismo tipo FRET possa ocorrer [Hussain 2009]:

1- O espectro de emissão fluorescente do cromóforo doador deve sobrepor o espectro de absorção do cromóforo aceptor. O grau de sobreposição está associado à integral de sobreposição espectral, ou fator J.

2- Os dois cromóforos devem estar o mais próximo possível um do outro (1 a 10 nm)

3- As orientações dos dipolos de transição das espécies doadora e aceptoras devem estar o mais paralelo possível um em relação ao outro.

4- O tempo de vida fluorescente da espécie doadora deve ser suficiente para que o processo FRET possa ocorrer.

## 1.2 Estudo de Caso

Macromoléculas do tipo Albumina Sérica Bovina (ASB) e Albumina Sérica Humana (ASH) possuem algumas características que norteiam o interesse pelo seu estudo, dentre as quais pode-se citar: são proteínas de massa molecular elevada, apresentam aspecto característico de uma macromolécula, possuem função fisiológica, além da regulação da pressão osmótica coloidal e o transporte de vários ligantes endógenos encontrados na circulação [Chen (2008); He e Carter (1992), Bhattacharya et al, (2000); Zsila *et al.*, (2003), He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2005), He et al. (2006).]. O emprego de técnicas espectroscópicas, dentre as quais: espectroscopia no UV [Barroni *et al.*, 2001], espectroscopia de Absorção tipo Dicroísmo Circular (D.C) [Wilting *et al.*,

1980], e espectroscopia de emissão de fluorescência [Xu *et al.* (1996), Yamasaki *et al.* (1999) e Wilting *et al.* (1980)], além da modelagem molecular (MM) [Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008) e Monti *et al.* (2009)], são métodos capazes de fornecer dados que possibilitam maior entendimento sobre as interações existentes em sistemas do tipo proteína/ligante (composto bioativo).

Estudos sobre interações do tipo ASH/flavonóides como quercetina [Sengupta e Sengupta (2002), Zsila *et al.* (2003) e Kanakis *et al.* (2006)] e ASH/rutina [Pastukhov *et al.* (2007)] estão presentes de forma bastante pronunciada na literatura, demonstrando deste modo a importância de um estudo que envolva substâncias do grupo químico dos flavonóides. O estudo de outro grupo de substâncias de interesse encontrada na literatura, as cumarinas, demonstram que, para o caso específico da molécula 8-acetil-7-hidroxycoumarina, a resposta da emissão do fluoróforo da ASH está associada a interações do tipo hidrofóbica nos domínios e subdomínios da macromolécula [Baoming 2009].

As interações ASB/ligante ou ASH/ligante promovem alterações na estrutura secundária da proteína (ASB ou ASH), as quais, além da supressão de fluorescência acima referida, provocam mudanças na conformação na estrutura de  $\alpha$ -hélice existente na macromolécula. Além disso, as interações do tipo hidrofóbicas estão predominantemente envolvidas no processo de interação, o que permite confirmar o tipo de interação fármaco em potencial/proteína pela localização do ligante [Tian 2005].

As albuminas séricas (ASs), por serem abundantes e presentes no plasma sanguíneo, estão no centro de interesse em diversos trabalhos de pesquisa, principalmente quando se considera a sua interação com diversos grupos ligantes a fim de uma melhor compreensão das funções existentes nos organismos. O fato de que as

ASs contribuem em 80% para a pressão osmótica sanguínea [He e Carter (1992), Sugio *et al.* (1999), Cui *et al.* (2008) e Yue *et al.* (2008)] é fator que, por si só, permite imenso interesse no estudo da interação entre albuminas e fármacos em potencial [Petitpas *et al.* (2001), He *et al.* (2005), Cui *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Stan *et al.* (2009)].

### 1.3. Os Elementos do Sistema em Estudo

#### 1.3.1 Macromolécula Protéica

Um conceito imediato sobre proteínas é o de macromoléculas de elevada massa molar, pertencendo por isso à categoria das macromoléculas, sendo que a sua constituição se dá por ligações peptídicas entre unidades denominadas aminoácidos [Filho 2007]. Neste conceito já está contida a idéia de estrutura primária, pois a mesma é o resultado da ligação peptídica estabelecida entre aminoácidos segundo uma seqüência linear. No entanto, no conjunto de sua arquitetura há também três estruturas que a complementam: estruturas secundária, terciária e quaternária (Figura 9). Um aspecto interessante de sua solubilidade é o de que, devido ao seu grande tamanho, quando em presença de solvente adequado obtem-se uma solução coloidal, distinguindo-se das soluções obtidas a partir de pequenas moléculas.

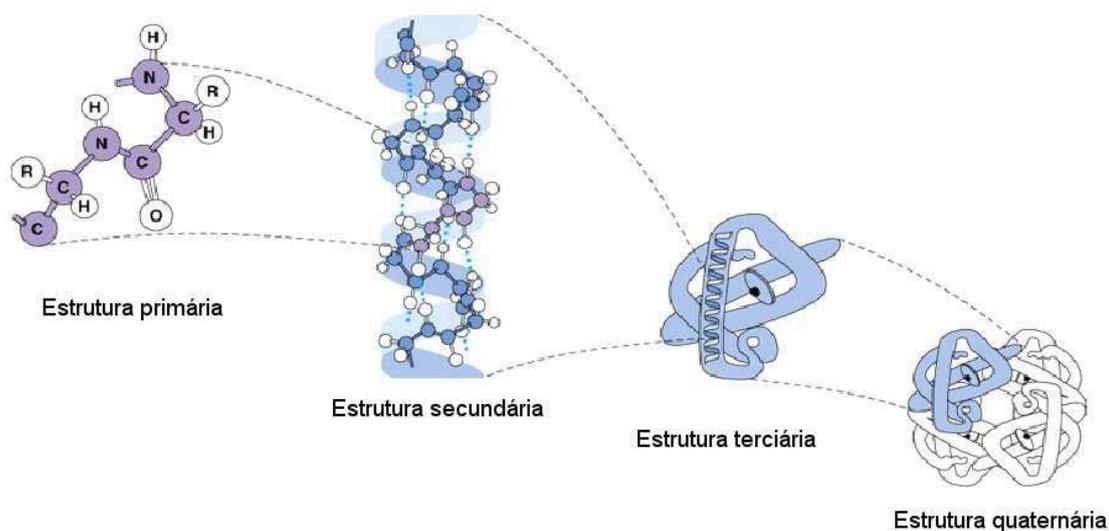


Figura 9- Representação da sequência estrutural e hierárquica de uma proteína. [Filho 2007]

Uma consideração cabe aqui, entendendo que a estrutura primária de uma proteína é linear em sua organização devido às ligações peptídicas. Por isso, essas interações não permitem a presença de ramificações nessa estrutura. A estrutura secundária de uma proteína está associada ao aumento da cadeia peptídica e às condições físico-químicas do meio, e tem como conceito, a disposição espacial regular e repetitiva da cadeia polipeptídica, geralmente mantida por ligações de hidrogênio [Filho 2007]. Será visto mais adiante que a estrutura secundária, por possuir o resíduo de triptofano, está diretamente associada ao comportamento supressivo da emissão fluorescente da ASB, já que uma modificação conformacional nesta estrutura responde pela redução do seu rendimento quântico de fluorescência. Um elemento chave no conhecimento da estrutura secundária é o conceito de  $\alpha$ -Hélice e folha- $\beta$  (figura 10).

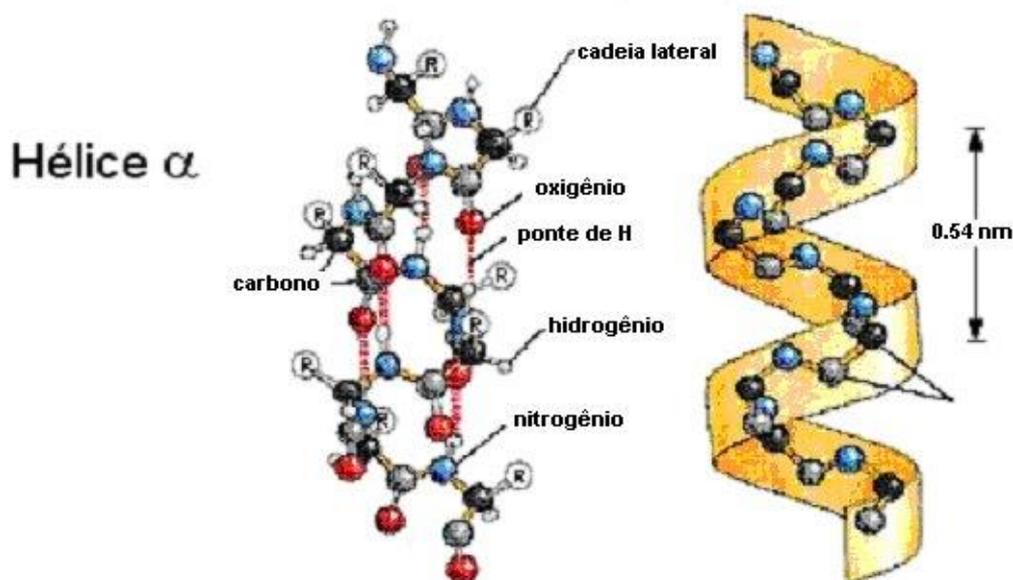


Figura 10- Exemplo ilustrativo do aspecto em  $\alpha$ -hélice numa proteína. [Filho 2007]

A  $\alpha$ -hélice na albumina sérica pode ser entendida como o resultado das interações entre os centros polares presentes nos aminoácidos, as quais determinam o enrolamento da estrutura primária sobre si mesma, formando uma hélice estabilizada por ligações de hidrogênio. As folhas- $\beta$  (Figura 11), por seu turno, são o resultado da união por meio de fitas paralelas das cadeias peptídicas estabilizadas por ligações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio.

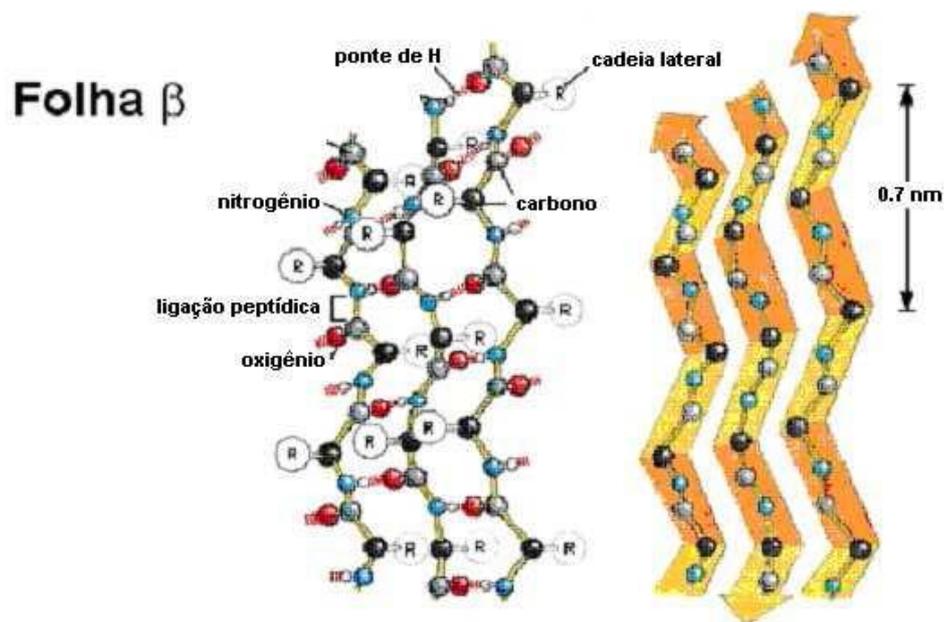


Figura 11- Exemplo ilustrativo de uma estrutura do tipo folha- $\beta$ . [Filho 2007]

A estrutura terciária (Figura 12) é o resultado de interações entre as hélices a partir de interações do tipo: atração ou repulsão eletrostática, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e de pontes dissulfeto estabelecidas por meio de resíduos de aminoácidos formadores das cadeias.

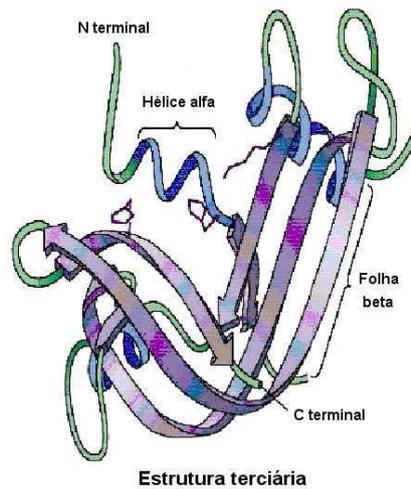


Figura 12- Exemplo ilustrativo da estrutura terciária numa proteína. [Filho 2007]

A estrutura quaternária está presente em proteínas que possuem duas cadeias polipeptídicas e não será dedicada muita discussão a esta estrutura, já que o objetivo deste sub-tópico é alcançar uma breve compreensão da estrutura secundária, principalmente da estrutura de  $\alpha$ -hélice, por estar contida em 67% da estrutura secundária da ASB [Peters 1985].

### 1.3.2 Albumina Sérica Bovina (ASB)

A interação de ASB com diferentes moléculas tem sido extensamente descrita na literatura, podendo-se citar berbamina [Cheng *et al.* (2009)], colchicina [Hu *et al.* (2005)], efonidipina [Wang *et al.* (2008)], fluorbiprofeno [Vayá *et al.* (2008)], gatifloxacino [Guo *et al.* (2004)], glicirrizinato de monoamônio [Hu *et al.* (2004)] e Rutina [Zhang *et al.* (2004); Liu (2010); Lu (2008); Pastukhov (2006)]. Porém, uma maior compreensão da sua natureza estrutural permitirá um maior entendimento da proposta deste trabalho tendo em vista a natureza intrínseca do seu cromóforo/fluoróforo triptofano, pois todas as respostas de natureza espectroscópicas obtidas estão relacionadas a esse aminoácido.

A albumina sérica bovina (ASB), por ter comportamento químico associado a seu efeito carreador frente a diversas substâncias, apresenta dois elementos essenciais na importância do seu estudo, ou seja, os efeitos farmacodinâmicos e farmacocinéticos.

Dos diversos fatores que orientaram a escolha da albumina sérica bovina para estudo neste trabalho, além do fato de ser um homólogo da ASH (Albumina Sérica Humana) [Frazier 2005], pode-se citar outros cinco fatores que determinaram a sua aplicação no presente estudo. O primeiro se refere ao grande número de publicações na literatura no campo bioquímico; segundo, a albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo servindo como depósito e transporte de proteína para numerosos componentes [Sugio *et al.* (1999) e Tang *et al.* (2006)]. Em complemento a essa gama de observações tem-se que a estrutura secundária da ASB contém dois resíduos de triptofano (Figura 13), e possui estrutura helicoidal em grande parte da cadeia [Peters 1985]. Outros fatores relevantes são o seu isolamento em grandes quantidades, alta estabilidade e solubilidade [Frazier 2005]. Por isso, torna-se relevante o estudo de tal proteína quando se considera a sua função bioquímica, sobretudo de transporte, frente a outros compostos como, por exemplo: ácidos graxos de cadeia longa ou mesmo da bilirrubina [Frazier 2005].

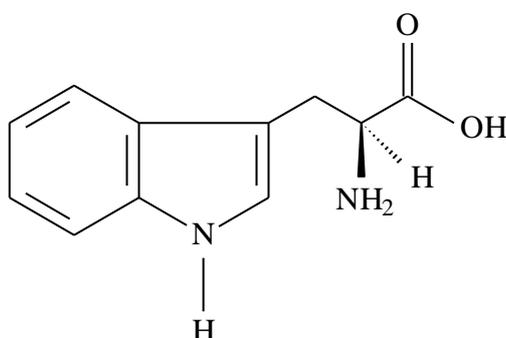


Figura 13- Fórmula estrutural para o Triptofano

A estrutura da albumina sérica bovina apresenta diversos domínios e subdomínios contendo resíduos de aminoácidos, principalmente, triptofano, tirosina e cistina, aos quais diversas substâncias podem se complexar. Além disso, apresenta diversos sítios de ligação que possuem alta afinidade para ácidos graxos (Figura 14) [Tian 2005].

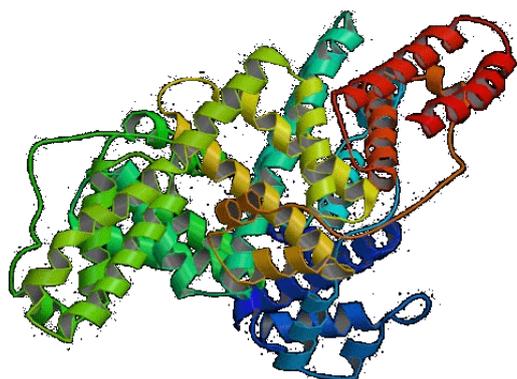


Figura 14- Figura representativa da estrutura tridimensional da ASB  
[<http://hi.baidu.com/robertoyuan/blog/calendar/200708>]

Aprofundando para uma melhor caracterização da estrutura da macromolécula de ASB, tem-se que na sua formação há três domínios homólogos I, II e III que são divididos por nove voltas L1-L9 por 17 pontes dissulfídicas. As curvaturas (no sentido de volta, *loops*) em cada domínio são feitos sobre a sequência de curvas do tipo larga-pequena-larga formando um triplete (em termos de arrumação estrutural). Cada domínio por sua vez é o produto de dois subdomínios (IA, IB, etc). Dados de cristalografia de Raios-X [Carter 1994] demonstraram que a estrutura da ASB possui em torno de 67% de estrutura do tipo  $\alpha$ -hélice com o polipeptídeo remanescentes ocorrendo ao redor e estendido em regiões flexíveis entre os subdomínios como na folha- $\beta$  ( $\beta$ -*sheets*). A ASB possui dois resíduos de triptofano apresentando fluorescência intrínseca [Peters 1985], sendo que um desses resíduos, denominado de Trp-134, se encontra no primeiro

subdomínio, enquanto que o outro triptofano, Trp-212, encontra-se no segundo subdomínio. É sabido também que, enquanto o resíduo Trp-212 se encontra dentro de uma região protéica, a fração Trp-134 está localizada na superfície da molécula [Peters 1985]. Face à localização dos resíduos de triptofano na estrutura secundária da ASB, conclui-se que a supressão da sua fluorescência intrínseca pode ser considerada uma técnica para medida da afinidade de ligação, com a interação ASB/sondas [Samanta 2009] evidenciando a importância do comportamento fluorescente da ASB na compreensão desse estudo.

## **1.4 Lapachonas, Cumarinas e Flavonóides: As moléculas supressoras**

### **1.4.1- Lapachonas: Quinonas especiais**

Dentre as diversas perguntas possíveis acerca do porque moléculas do grupo das Quinonas terem sido eleitas para atuar como supressoras no comportamento fluorescente da ASB, há alguns motivos que, do ponto de vista farmacológico, fotofísico e, sobretudo químico, revelam que o estudo destas moléculas é de extrema importância. Do ponto de vista farmacológico, diversas atividades podem ser consideradas, tais como: anti-malarial, anti-tumoral, anti-inflamatória. Moléculas do tipo hidroxinaftoquinona (lapachol) e derivados apresentam promissora atividade tripanossômica e leishimânica. Assim, esta variedade de possíveis aplicações resulta em um interesse especial pelas Lapachonas e seus derivados, e, em geral, por espécies moleculares contendo o grupo 1,2- ou 1,4-quinona, as quais são possuidoras de amplo interesse para estudos que envolvem interações do tipo fármaco/proteína [Ferreira 2003], ou seja, ligante ASB.

$\beta$ -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]-pirano-5,6-diona) é um produto natural normalmente obtido do tronco da *Tabebuia Avellanadae*, fartamente

encontrada no Brasil. Esta molécula apresenta uma pequena absorção no visível e uma absorção intensa na região UV do espectro eletromagnético. A absorção é deslocada para o vermelho com aumento da polaridade do solvente, sendo que em benzeno está em torno de 424nm e em DMSO em torno de 438nm [Netto-Ferreira 2008]. A adição de um grupo sulfônico na estrutura básica da  $\beta$ -lapachona (Figura 15.a), leva à obtenção do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico (Figura 15.b). Para ambas as espécies o composto de partida é o lapachol (4-hidroxi-3(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,2-diona, que pode ser adquirido comercialmente.

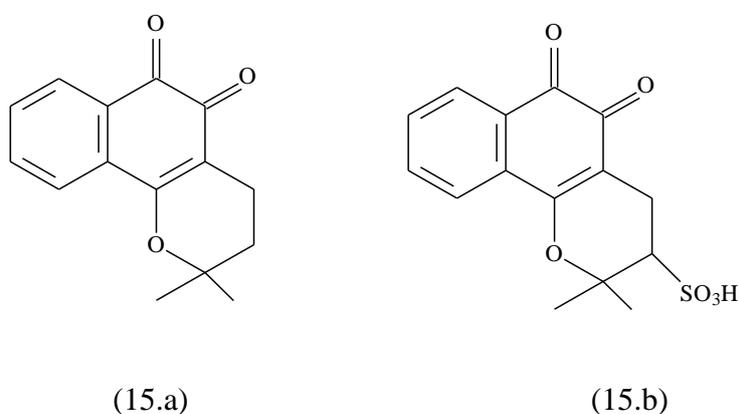


Figura 15.a e 15.b- Fórmula estrutural para  $\beta$ -lapachona e para o 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico.

O lapachol também pode ser facilmente extraído do tronco da *Tabebuia Avellanadae* por meio de uma solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, seguido por uma neutralização e recristalização por etanol. A partir desse composto, por adição de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, a uma temperatura de 0°C, e após filtração, obtem-se cristais de cor vermelha intensa [Subramanian 1998; Pinto 2000]. O 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, que é um derivado da  $\beta$ -lapachona, pode ser obtido por gotejamento de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em uma suspensão de lapachol em anidrido acético (Ac<sub>2</sub>O) entre 20-30°C. Após resfriamento e filtração, obtem-se cristais

alaranjados que são lavados com éter, secos e posteriormente recristalizados de etanol [Subramanian 1998; Pinto 2000]. Esta abordagem sintética demonstra que a possibilidade de utilização de uma molécula supressora de fácil obtenção e com origem na flora brasileira é um dos aspectos que tornam ainda mais relevante a sua eleição para traçarmos os caminhos sobre a sua ação supressora frente à ASB. Por isso, essa espécie molecular e seus derivados se constituem num elo para o fortalecimento de outras espécies nativas em estudos desta natureza.

### 1.4.2 Cumarinas

Após observarmos a importância da  $\beta$ -lapachona no sub-tópico anterior, passaremos agora a um segundo grupo de compostos também presentes na flora brasileira, que podem agir como anticoagulante e que são utilizados, por exemplo, em terapia fotodinâmica como agentes fotossensibilizadores da pele [Machado 1998]. Esses compostos são as cumarinas ou lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico (Figura 16)

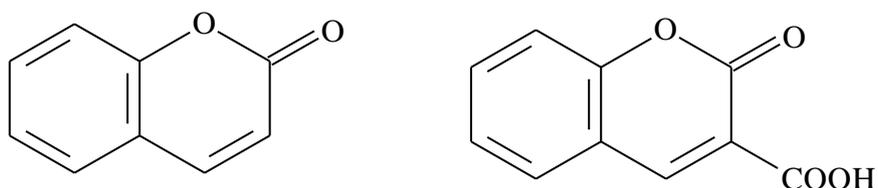


Figura 16- Fórmula estrutural da Cumarina e um dos seus derivados, o ácido 3-carboxicumarina.

Cumarinas são frequentemente obtidas de plantas, ocorrendo nas folhas, flores e frutos. Uma fonte de obtenção dessa espécie é o “cumaru”, espécie de feijão muito encontrado na Amazônia, do qual se extrai a cumarina em grande quantidade. Alguns compostos como os psoralenos e aflatoxinas (Figura 17) apresentam em sua estrutura um esqueleto básico das cumarinas. Os psoralenos são conhecidos como potentes sensibilizadores da pele, usado na cura de eritema e vitiligo através da terapia

fotodinâmica, enquanto as aflatoxinas são potentes hepatocarcinogênicos, sendo que a base de sua ação está relacionada à formação de ligações covalentes com o grupo guanina do ADN [Marques 1984]. .

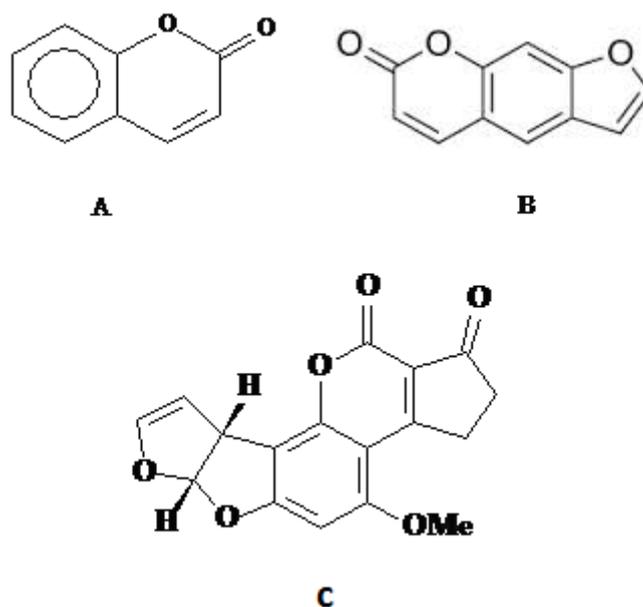


Figura 17- Fórmula estrutural plana: cumarina (a), psoraleno (b) e aflatoxina B<sub>1</sub> (c).

Do exposto acima, evidencia-se que a inclusão das cumarinas neste estudo fotofísico favorece um maior entendimento do comportamento de compostos tais como psoralenos e aflatoxinas devido à presença em suas estruturas de um resíduo coumarínico. Neste trabalho, iremos utilizar a 4-metil-7-hidroxycumarina e a 4-metil-7-hidroxycumarina a fim de verificarmos o comportamento supressivo quando da interação ASB/cumarinas como uma função dos diferentes grupos presente em sua estrutura básica modificada. As estruturas para as espécies estudadas estão apresentadas abaixo (Figura 18).

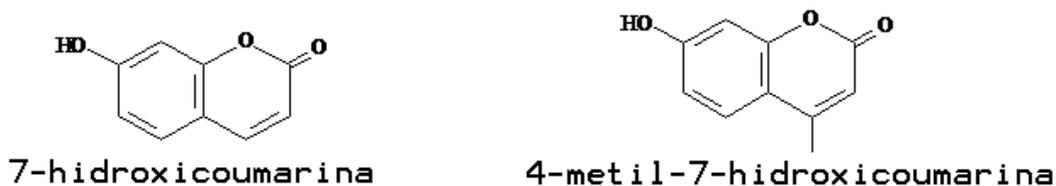


Figura 18- Fórmula estrutural plana para as espécies cumarínicas utilizadas

Ao observarmos as espécies selecionadas para estudo na figura anterior, nota-se a presença de um grupo metila adicionado na posição “4” da 7-hidroxicoumarina. No primeiro caso temos a 7-hidroxicoumarina, enquanto no segundo caso, temos a 4-metil-7-hidroxicoumarina, o que nos permitirá, por exemplo, estabelecer correlações entre a ação supressora das diversas cumarinas frente ao efeito da presença de um grupo metila na posição quatro do anel coumarínico.

Interações do tipo ASB/cumarinas formam sistemas importantes devido à sua alta sensibilidade ao fenômeno de supressão de fluorescência, tendo por isso, aplicações potenciais no estudo de sistemas bioquímicos, sobretudo em relação ao estudo da cinética de transporte de ácidos graxos através de membranas de transporte e capilares sanguíneos [Demant 2008]. Dados obtidos após estudos sobre interações do tipo ASB/cumarinas permitem obter informações sobre: auto-organização de amostras, polaridade e viscosidade de microambientes, onde essas interações estão estabelecidas. Essas interações estão associadas com o sítio de ligação da macromolécula e as cumarinas, determinando o tipo de interação daí resultante [Bhattacharya 2009]. Grupos amínicos livres presentes na estrutura da ASB se ligam fortemente com compostos cumarínicos, do tipo 4-ácido acético-7-hidroxicoumarina. Associado a esse comportamento, a afinidade de ligação destes grupos amínicos, aumenta com o aumento do aspecto hidrofóbico de uma espécie molecular [Demant 1996].

### 1.4.3 Flavonóides

Rutina (3-O-(6-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-5,7,3',4'-tetraidroflavona) é um flavonóide polifenólico amplamente presente em alimentos de origem vegetal como trigo mourisco, salsa e tomates [Guardian 2000; Erlund 2000]. Rutina é conhecida como um dos flavonóides mais comuns, ocorrendo naturalmente com uma variedade de atividades bioquímicas e farmacológicas. Relatos recentes indicam que a rutina é capaz de agir contra radicais livres [Duthie 1999], suprime a imunidade celular [Middleton 2000] e tem atividade anti-carcinogênica [Rotelli 2005]. Artigos mais recentes mostram que a rutina também tem atividade antimicrobiana [Pereira 2007].

A rutina e a rutina metilada utilizadas como espécies supressoras fluorescentes nesse estudo foram obtidas junto ao grupo de Fitoquímica da UFRRJ, e as respectivas estruturas moleculares estão apresentadas a seguir (Figura 19).

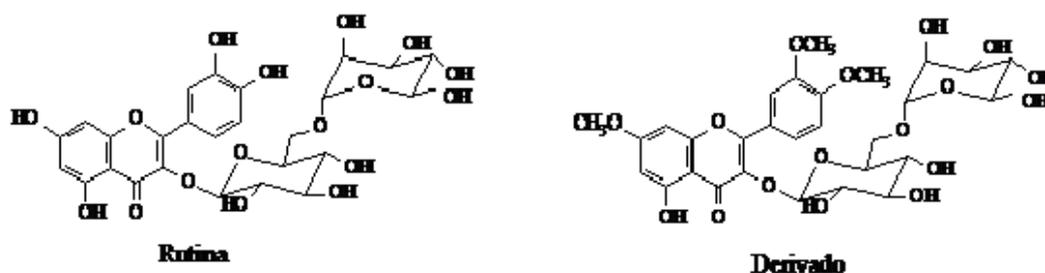


Figura 19- Fórmula estrutural para rutina e rutina metilada (derivado)

Novamente aqui, a metilação de um composto, reduzindo a quantidade de grupos polares, como é o caso dos compostos com hidroxilas fenólicas, permite-nos compreender o comportamento supressivo de compostos desta classe de substância frente à ASB.

Em relação à interação ASB/flavonóides, aspectos como: hidrofobicidade, impedimento estérico e arranjo espacial parecem ser fatores chaves no entendimento da afinidade de polifenóis em relação às proteínas plasmáticas ASH e ASB [Dinniz 2008]. Soma-se a isso o fato de a associação do tipo polifenóis/proteínas ser dependente das condições do meio ambiente, com estas interações podendo causar alterações nas propriedades das proteínas. Em condições não-oxidativas, polifenóis formam complexos não-covalentes reversíveis com proteínas por meio de ligações de hidrogênio ou por interações hidrofóbicas, sendo que um mecanismo em duas fases está envolvido nessa interação: a primeira é a formação de um complexo solúvel do tipo proteína-ligante, e a segunda é a agregação do complexo solúvel para formar compostos insolúveis. Em condições oxidantes, como no plasma sanguíneo, os polifenóis reagem com espécies reativas de oxigênio, intermediários ou produtos de reação da oxidação dos polifenóis, podendo formar ligações covalentes com aminoácidos e grupos tióis. Os polifenóis covalentemente ligados de forma irreversível à proteína são resistentes à ruptura por agentes desnaturantes. Um aspecto importante a considerar é o de que compostos com grupo carbonila (-CO-) na posição C<sub>4</sub> apresenta alta afinidade por ASH [Dinniz 2008]. Considerando a ASB como um homólogo da ASH, isto pode indicar um comportamento similar para o sistema ASB/rutina. Além disso, rutina, junto com a 2-vicenina, apresenta baixa hidrofobicidade e possui baixa porcentagem de ligação (<10% e 56% respectivamente), com esta última estando relacionada com o impedimento estérico devido à presença de cadeias glicosídicas substituintes nos carbonos R<sub>6</sub> e R<sub>3</sub> próximos à carbonila C<sub>4</sub> [Dinniz 2008].

O efeito supressivo da fluorescência devido às interações do tipo ASB/ligante, para o caso específico da interação flavonóide/ASB, dentre os quais se encontra a rutina, mostra que a constante de supressão de Stern-Volmer,  $K_{SV}$ , apresenta uma relação

inversamente proporcional com a temperatura indicando um possível mecanismo de supressão que tem origem na formação de um pré-complexo e não numa possível colisão dinâmica. Os valores para  $K_{SV}$  encontrados para diversos flavonóides, nas temperaturas de 298 e 310K, foram: caliosina  $K_{SV} = 4,88-5,51 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ ; rutina  $K_{SV} = 7,63-7,88 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$  e quercetina  $K_{SV} = 5,95-6,08 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$  [Liu 2010]. A constante de velocidade de supressão efetiva ( $k_q$ ), nestes três casos, se encontra numa faixa de  $2,18 \times 10^{12}$  a  $3,60 \times 10^{13} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ , assumindo um tempo de vida do estado excitado para ASB igual a  $\tau = 10^{-8}\text{s}$ , na ausência de supressores [Liu 2010]. Os valores para  $K_q$  são muito superiores à constante de velocidade de difusão para o solvente empregado (meio aquoso), que é de  $5,0 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ , o que implica em um processo de supressão estática [Liu 2010].

Os valores de entalpia, entropia e energia livre para os sistemas ASB/caliosina, ASB/rutina e ASB/quercetina foram de, respectivamente:  $\Delta H = -10,41$  e  $-10,41$ ;  $-20,48$  e  $-20,48$ ;  $-2,00$  e  $-2,00 \text{ KJ.mol}^{-1}$ ;  $\Delta S = 57,06$  e  $59,36$ ;  $26,78$  e  $27,85$ ;  $90,32$  e  $93,96 \text{ J.mol}^{-1}\text{.K}^{-1}$  e  $\Delta G = -27,42$  e  $-28,10$ ;  $-28,46$  e  $-28,48$ ;  $-28,91$  e  $-30,00 \text{ KJ.mol}^{-1}$ . Isto indica que o tipo de interação entre a ASB e esses flavonóides é predominantemente hidrofóbica, sendo que possíveis interações eletrostáticas não podem ser descartadas. Os números de sítios de ligação para esses sistemas foram de:  $n = 0,96$  e  $0,94$ ;  $0,95$  e  $1,00$ ;  $0,82$  e  $0,85$ , respectivamente, ou seja, há somente um sítio de ligação para a interação ASB/flavonóide. Os valores determinados para as distâncias entre o flavonóide e a ASB,  $r = 3,01\text{Å}$  (caliosina);  $5,72\text{Å}$  (rutina) e  $4,75\text{Å}$  (quercetina) demonstram grande possibilidade de ocorrência de um processo de transferência de energia por ressonância fluorescente nesses sistemas [Liu 2010].

## 2.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste tópico serão explicitados os procedimentos experimentais utilizados na preparação das soluções e os métodos de análise para obtenção dos dados, iniciando-se pelo preparo das soluções estoque das sondas empregadas como agentes supressores, ou seja:  $\beta$ -lapachonas, Cumarinas e Rutinas (ver quadros abaixo).

Tabela 3 - Procedimento experimental para obtenção das amostras supressoras.

<b>Etapa 1</b>
As Cumarinas (Sigma-Aldrich), $\beta$ -lapachona e o3-Ácido $\beta$ -lapachona-sulfônico foram obtidos junto ao Laboratório de Fotoquímica do DQ-ICE-UFRRJ, enquanto Rutina foi obtida junto ao grupo de Fitoquímica do DQ-ICE-UFRRJ (MERCK). A síntese da rutina metilada (Figura 16) foi realizada por tratamento de uma solução metanólica de rutina (200 mg) com solução etérea de diazometano [Markam 1976], seguida por evaporação do solvente, obtendo-se ao final 117 mg (58,5%). Os deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do derivado metilado estão de acordo com dados da literatura [Markam 1976].
<b>Etapa 2</b>
Oito balões volumétricos de 10 mL foram previamente lavados e secos, aos quais se adicionou 50% do seu volume total com etanol (grau HPLC), sendo todos eles devidamente fechados e reservados para posterior utilização.

### Etapa 3

A partir da concentração de trabalho desejada para os diversos supressores ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , [Ji 2009]) foram pesadas as massas respectivas dos compostos supressores por meio de uma balança analítica (Marte, modelo AY220), com precisão de décimo de miligrama. Os valores das massas calculadas (mc) e medidas (mm) dos supressores estão apresentados abaixo:

A) $\beta$ -lapachona	mc=2,42 mg	mm=2,60 mg
B) 3-Ácido $\beta$ -lapachona-sulfônico	mc=3,23 mg	mm=3,40 mg
C) 7-Hidroxycoumarina	mc=1,62 mg	mm=1,70 mg
D) 4-Metil-7-hidroxycoumarina	mc=1,76 mg	mm=1,50 mg
E) Rutina	mc=6,10 mg	mm=6,18 mg
F) Rutina metilada	mc=6,52 mg	mm=6,58 mg

### Etapa 4

Após pesagem das respectivas massas, as mesmas foram adicionadas aos balões volumétricos contendo etanol, sendo em seguida levemente agitados manualmente para homogeneização e dissolução total da amostra sólida no solvente. Após isso, completou-se o volume do balão para a sua capacidade total de 10 mL, seguida de uma repetição da etapa de agitação.

### Etapa 5

As amostras assim preparadas foram reservadas em local escuro sob a proteção de papel laminado a fim de evitar degradação fotoquímica por irradiação com luz ambiente.

Dando prosseguimento ao t3pico, procedimento experimental, iremos abordar a prepara33o da solu33o da macromol33cula ASB, sendo que para esta esp33cie empregou-se uma concentra33o de trabalho igual a  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  para medidas no UV-vis e fluorimetria, e de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  para medidas de Dicro33smo circular.

Tabela 4- Procedimento experimental para obten33o das solu33o33es da ASB.

<p style="text-align: center;"><b>Etapa 1</b></p> <p>Em um bal33o volum33trico de 1000 mL devidamente lavado e seco adicionou-se 50% do seu volume com 33gua Milli-Q, obtida no Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ. Esse bal33o volum33trico foi devidamente reservado para posterior utiliza33o.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Etapa 2</b></p> <p>Sobre o volume reservado (500 mL de 33gua Milli-Q) adicionou-se sob leve agita33o um <i>sach33</i> de uma solu33o salina de tamp33o fosfato, pH=7,4, (lote n33o 038K8214, adquirido da SIGMA-ALDRICH). Em seguida, completou-se com 33gua Milli-Q at33 atingir o volume de 1000 mL. Este procedimento gerou uma solu33o tamponada de concentra33o igual a <math>2,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}</math>.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Etapa 3</b></p> <p>Num segundo bal33o volum33trico de volume igual a 25mL, devidamente limpo, transferiu-se uma al33quota de 15 mL do solvente previamente preparado (Etapa 2) por meio de uma pipeta volum33trica de mesmo volume (15 mL). Este bal33o foi devidamente reservado para adicionarmos a massa de ASB.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Etapa 4</b></p> <p>Pesou-se uma massa de valor igual a 167 mg de ASB (adquirido da Sigma-</p>

Aldrich, massa molecular média em torno de 66.000 Da, o qual estava devidamente acondicionado num aparelho do tipo freezer), a qual foi adicionada, sob agitação muito leve, ao balão reservado de volume igual a 25 mL e contendo 15 mL da solução tampão de fosfato.

### **Etapa 5**

Ao balão volumétrico de 25 mL, já contendo a massa de ASB, adicionou-se solução tampão fosfato suficiente para atingir o volume total. Com isso obteve-se uma solução tampão fosfato de ASB a pH=7,4. Essa solução resultante apresentou concentração igual a  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ . Soluções preparadas desta forma foram utilizadas em todas as medidas espectroscópicas do tipo Dicroísmo circular, enquanto uma alíquota de 10 mL, adicionada a um balão de 100 mL, foi diluída em solução tampão e o volume completado para 100 mL, obtendo-se uma solução de concentração  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  utilizada para as técnicas: Absorção no UV-vis e Emissão fluorescente.

## **2.0. Sobre a Obtenção dos Espectros**

### **2.1 A Obtenção dos Espectros de Absorção no UV-Vis, Dicroísmo Circular e Emissão de Fluorescência.**

As medidas de Absorção, Dicroísmo Circular e Fluorescência foram realizadas em um Espectrofotômetro Acoplado, em módulo único, possuidor dos dispositivos óticos e eletrônicos referentes às três técnicas (“JASCO”; modelo-J-8159 (Figura 20). As condições experimentais utilizadas na obtenção das medidas foram: para Dados de Espectroscopia de Absorção no UV-visível, varredura de  $\lambda_1=200 \text{ nm}$  a  $\lambda_2=500 \text{ nm}$ ; para as medidas de Dicroísmo circular,  $\lambda=200$  a  $250 \text{ nm}$ , e para as de Fluorescência

varredura de  $\lambda = 280$  a 460 nm, com abertura de fenda igual 1,0 nm e comprimento de onda de excitação igual a 280 nm.



Figura 20- Foto do sistema acoplado utilizado para medidas de Absorção no UV-vis, Dicroísmo Circular e Emissão de Fluorescência.

As soluções das diversas espécies supressoras e da macromolécula foram adicionadas a uma cubeta de quartzo de base quadrada, de dimensões iguais a 1,00 cm x 1,00 cm x 3,00 cm (caminho óptico de 1 cm) e volume de 3,0 mL.

A sequência de obtenção dos espectros foi: primeiro a adição da solução da macromolécula à cubeta, da qual se obtinha o primeiro espectro, funcionando assim como um “branco” do ponto de vista analítico; sobre essa mesma solução já contida na cubeta foram adicionadas diferentes alíquotas, em microlitros, da solução do supressor, ou seja  $\beta$ -lapachonas, cumarinas ou flavonóides, numa sequência de razão constante, a saber: 0  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 25  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 35  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, a partir das quais foram obtidos os diversos espectros de Absorção, Dicroísmo Circular e Emissão de Fluorescência para cada sistema estudado. As medidas de Dicroísmo Circular foram realizadas em presença de nitrogênio a fim de se evitar a influência do oxigênio

atmosférico no sinal obtido, com o controle da pressão do fluxo gasoso se dando por um regulador acoplado ao cilindro do referido gás. Quando necessário, foram feitas medidas a diferentes temperaturas, tendo sido empregado para isso um banho termostático (Jasco modelo J-8159), responsável pelo controle de temperatura da amostra com uma precisão de  $\pm 0,5$  °C. Como líquido refrigerante foi utilizado água, sendo o mesmo impulsionado por uma bomba presente no sistema auxiliar de refrigeração. O controle de temperatura era feito pelo mesmo princípio físico associado a um *peltier* com a estabilização e o controle da temperatura sendo realizados por um circuito eletrônico, com a determinação da temperatura de trabalho sendo feita diretamente pelo PC que controlava o sistema.

Após a obtenção dos dados espectroscópicos correspondentes às três técnicas (absorção, dicroísmo circular e emissão de fluorescência), os mesmos foram tratados e processados por meio do programa Origin.6.0.

### **3.0 Resultados e Discussão**

Neste trabalho, os resultados e a sua discussão serão apresentados por grupo de compostos, visando com isso facilitar a análise comparativa entre elas e possibilitando uma correlação entre a estrutura molecular da espécie supressora e a sua interação com a ASB.

Inicialmente, duas espécies do grupo das Lapachonas,  $\beta$ -Lapachona e 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico (Figura 15) foram utilizadas no estudo da interação ligante-proteína para o estudo do comportamento da macromolécula de ASB frente a estas duas espécies. A presença de um grupo sulfônico ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) no 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, o torna mais ácido e mais suscetível a formar ligações hidrogênio, quando comparada com a  $\beta$ -lapachona não substituída.

Em seguida diferentes Cumarinas (Figura 18) foram utilizadas com o objetivo anteriormente citado de avaliar o efeito da introdução de um grupo metil na estrutura da cumarina. Finalmente, foi investigado o comportamento dos flavonóides a fim de se verificar o efeito da metilação de três grupos hidroxila fenólicos sobre o comportamento de emissão de fluorescência da ASB. Com isso, teve-se a possibilidade de um estudo mais amplo do comportamento da ASB frente a diferentes ligantes (fármacos) em potencial.

As condições experimentais utilizadas para o estudo da interação ASB/ $\beta$ -Lapachonas, ASB/Cumarinas e ASB/Rutinas (flavonóides), já descritas anteriormente em detalhes, podem ser sumarizados como a seguir: uma solução de ASB em tampão fosfato (PBS, pH=7,4), com concentração de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , foi adicionada a uma cubeta de 1cm de caminho ótico volume de 3,0 mL. Sobre esta solução tampão de ASB foram adicionadas diferentes alíquotas em microlitros de uma solução etanólica contendo  $\beta$ -Lapachonas, Cumarinas ou Rutinas com concentração da solução estoque de  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , constituindo assim um total de 6 sistemas estudados.

### 3.0 ASB

Abaixo estão apresentados os espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência para a albmina sérica bovina (ASB), na ausência de qualquer um dos ligantes utilizados neste estudo (Figura 21).

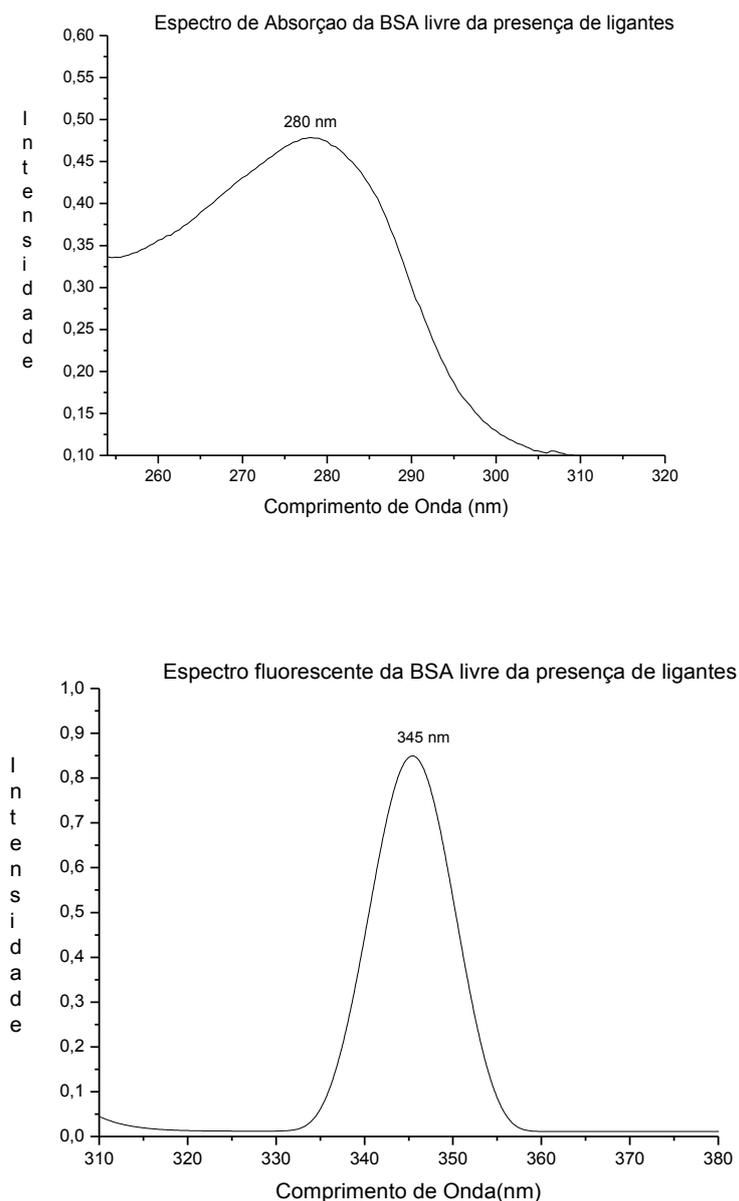


Figura 21- Espectros de Absorção (superior,  $\lambda_{\text{max}}= 280 \text{ nm}$ ) e de fluorescência (inferior,  $\lambda_{\text{max}}= 345 \text{ nm}$ ) para ASB em tampão fosfato (pH=7,4) e livre da presença de ligantes.

### 3.1. ASB x Rutina

#### 3.1.1- Dados de Absorção

O espectro de absorção para ASB apresenta absorção máxima a 280nm e, após adição de alíquotas (microlitros de solução) de uma solução estoque de rutina de concentração conhecida, observa-se tanto um deslocamento para comprimentos de onda menores (deslocamento do comprimento de onda máximo de 280nm para 275nm), além de um efeito hipercrômico (aumento da intensidade de absorção) (Figura 22).

O espectro de absorção da rutina em solução etanólica a 296K também é apresentado a fim de permitir comparações entre os comprimentos de absorção máxima das espécies em estudo (Figura 23). Percebe-se que os valores relativos à absorção máxima tanto da ASB em solução tampão, quanto da rutina em solução metanólica diferem por um valor de 20nm, possibilitando assim, devido a essa diferença nos valores de absorção máxima definir que à absorção em 280nm está estritamente relacionada com a macromolécula ASB (Figura 22).

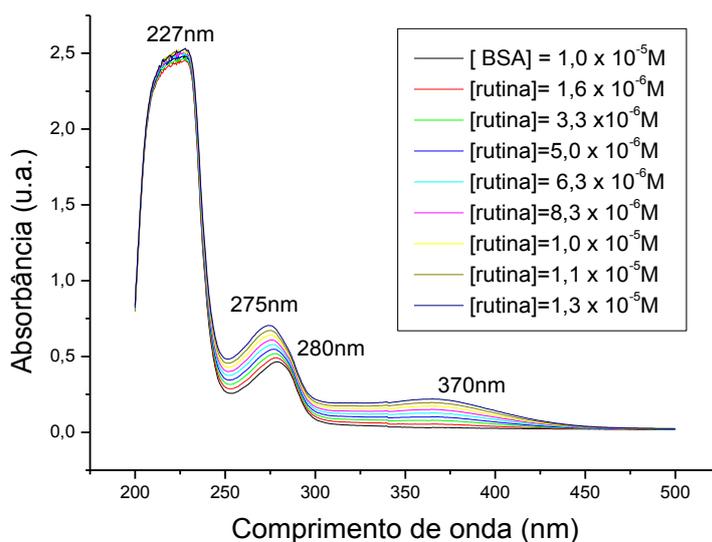


Figura 22- Espectro de Absorção da ASB em presença de concentrações variadas de rutina em T=296K

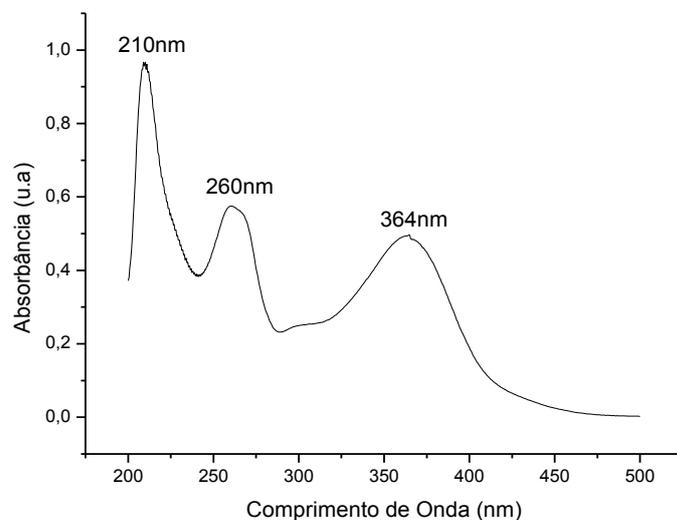


Figura 23- Espectro de absorção no UV-vis para rutina em solução etanólica em T= 296K

O comportamento observado no espectro de absorção para o sistema ASB/Rutina(Figura 22) indica que há três absorções distintas. A primeira em 227nm, a qual, por não demonstrar nitidamente o comportamento do efeito da presença da rutina sobre a absorção da ASB não será considerada na análise. Entretanto há em 280nm uma absorção bem definida e característica [Zeng 2008], e uma terceira absorção em 370nm, porém muito discreta, que se apresenta no espectro em função da adição de alíquotas de rutina e ausente para uma solução de ASB pura (1ª curva espectral, cor negra). Nota-se, contudo, dois aspectos significativos na absorção de comprimento de onda a 280nm. Primeiro, há um aumento da intensidade de absorção por parte do triptofano com o aumento da concentração de rutina, demonstrando haver um aumento da polarização, aumento do número de espécies com orientação do momento de dipolo favorável a transição por parte da espécie absorvedora a partir da

interação ASB/rutina. Outro comportamento apresentado no espectro de absorção da ASB/rutina é a presença do deslocamento para o azul no comprimento de onda de absorção da ASB de 280nm para 275nm, com o aumento da concentração de rutina no meio. Isto é indicativo de que a presença de rutina em diferentes concentrações produziu essa modificação espectral. Pode-se afirmar que o efeito hipercrômico devido ao aumento da intensidade da banda de absorção do triptofano em 280nm, seguido de um efeito de deslocamento ocorrido entre 280 e 275nm, está em relação direta com a presença de rutina no meio.

### **3.1.2- Dados de Dicroísmo Circular**

O dicroísmo circular é uma técnica sensível para monitorar mudanças conformacionais nas proteínas [Yue *et al.* (2008)] sendo geralmente usada na determinação da estrutura secundária de macromoléculas [Kelly *et al.* (2005) e Cheng *et al.* (2009)]. Medidas de dicroísmo circular para o sistema ASB/Rutina demonstraram uma mudança no valor do ângulo alfa ( $\alpha^\circ$ ), responsável por 67% da estrutura secundária da ASB [Peters 1985], indicando que uma mudança nos valores desses ângulos está diretamente associada a uma modificação planar na estrutura secundária da proteína. Os dados obtidos estão apresentados abaixo nas Figuras 24, 25 e 26, enquanto a Tabela 5 apresenta valores de  $\alpha$ -hélice, elipticidade residual significativa e ângulos observados.

Os espectros de Dicroísmo Circular para o sistema ASB/Rutina foram obtidos em três temperaturas diferentes e estão apresentados abaixo. Uma tabela demonstrativa, as quais apresentam os valores dos ângulos de  $\alpha$ -hélice determinados experimentalmente junto com a elipticidade residual. Observa-se que os comprimentos de onda de absorção máximo do espectro de D.C, característicos para os resíduos de triptofano presentes na estrutura da ASB, isto é, 208nm e 222nm (Figuras 24, 25, 26). [Peters 1985].

T= 296K

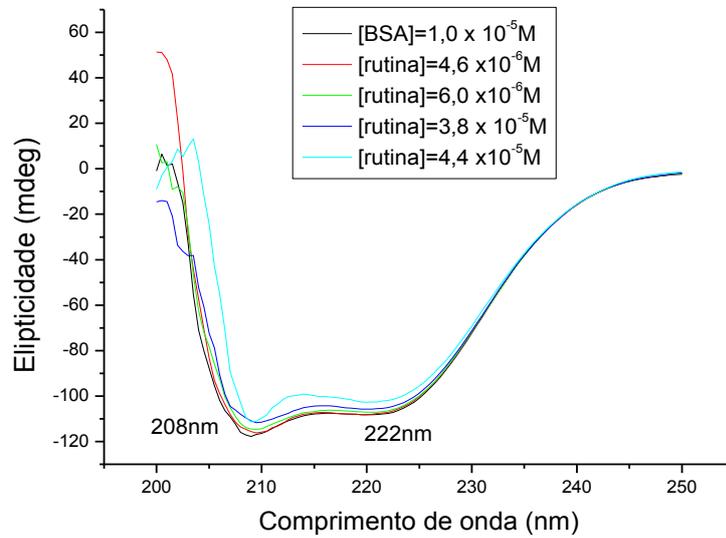


Figura 24-Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em presença de concentrações variadas de rutina em T=296K.

T=303K

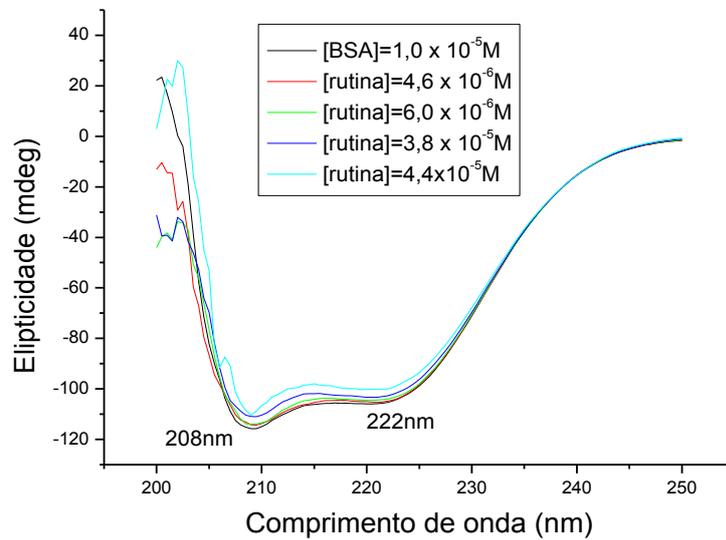


Figura 25-Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em presença de concentrações variadas de rutina em T=303K.

T=310K

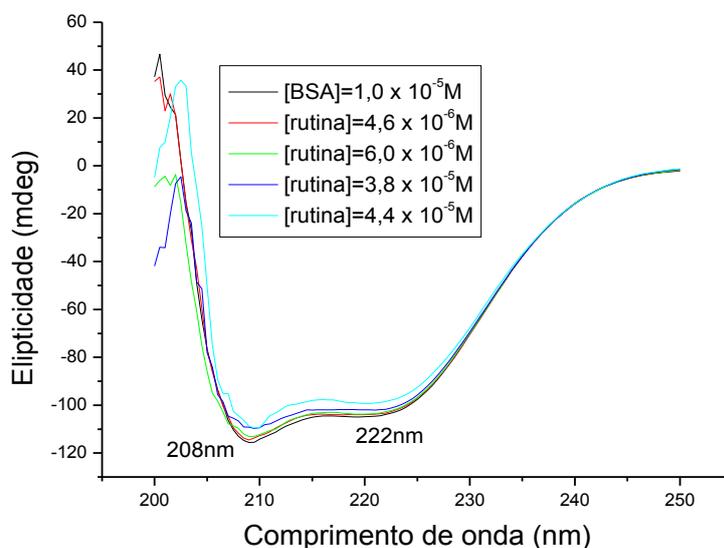


Figura 26-Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em concentrações variadas de rutina em T=310K

Valores de % de  $\alpha$ -hélice para a estrutura secundária de ASB na ausência e na presença de flavonóides foram determinadas usando as equações 17 e 18 [Chen *et al.* (1972), Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Yue *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)].

$$MRE = \frac{\theta}{(10.n.l.C_p)} \quad \text{(equação 17)}$$

De forma que o percentual de  $\alpha$ -hélice pode ser definido como:

$$\% \alpha - hélice = \left[ \frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \right] \times 100 \quad \text{(equação 18a)}$$

$$\% \alpha - hélice = \left[ \frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \right] \times 100 \quad \text{(equação 18b)}$$

A partir das equações 17 e 18 foram determinados os valores apresentados na Tabela 5.

Uma análise imediata dos espectros de absorção nos experimentos de dicroísmo circular para o sistema ASB/rutina revela que a adição de diferentes alíquotas de rutina à solução de ASB é acompanhada por uma redução significativa do ângulo de  $\alpha$ -hélice presente na estrutura secundária da macromolécula, como pode ser observado nas absorções máximas a 208 e 222 nm mostradas nos espectros das Figuras 24 a 26. [Peters 1985].

Tabela 5- Valores de  $\alpha$ -hélice para ASB em presença de diferentes concentrações de rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
54,90461	53,31519	53,90982	51,98846	53,18106	51,2040
53,4933	53,04078	52,69996	51,73307	52,4369	50,85695
52,59569	52,89726	52,49437	51,28452	51,19386	50,52975
50,18012	51,8652	50,62804	50,49516	49,40218	49,95021
47,7284	50,07837	48,74333	48,97866	47,48371	48,08212

A partir dos dados da tabela 5 observa-se uma redução do ângulo- $\alpha$  da estrutura secundária da ASB em função do aumento da concentração de rutina nas três diferentes temperaturas. Essas mudanças ocorridas nos valores do ângulo- $\alpha$  indicam alterações pronunciadas na conformação da estrutura secundária advindas de interações entre a ASB/rutina. Essa redução do ângulo- $\alpha$  é acompanhado por um efeito da redução sobre a

elipticidade residual da estrutura de  $\alpha$ -hélice da ASB, sobretudo, quando comparada à elipticidade original da ASB na ausência de rutina.

Outra consideração que pode ser feita a partir dos dados obtidos é a de que a variação de temperatura não influenciou os valores obtidos de  $\alpha$ -hélice, demonstrando que essa redução não está associada a um efeito térmico, dentro da faixa considerada, sobre a redução da elipticidade da estrutura de  $\alpha$ -hélice presente na estrutura secundária da ASB.

A mudança conformacional ocorrida na estrutura secundária da ASB, ou seja, a perda da elipticidade original da ASB devido à presença da rutina acarretou uma mudança conformacional da sua estrutura secundária, o que por consequência se reflete na disposição espacial dos resíduos de triptofano, os quais estão sujeitos a um aumento da energia relativa à transição eletrônica ocorrida no cromóforo entre 280 e 275nm.

### **3.1.3- Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário.**

Os espectros de fluorescência para ASB como uma função da adição de alíquotas de uma solução de rutina de concentração  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  a três diferentes temperaturas, ou seja, 296, 303 e 310K estão apresentados abaixo (Figuras 26, 28 e 30). A partir dos espectros apresentados nestas figuras para o sistema ASB/Rutina foram construídas as tabelas 6-8 e os gráficos apresentados nas Figuras 27, 29 e 31, com estes estudos de supressão levando à obtenção das respectivas constantes  $K_{SV}$  e  $K_q$ , conforme apresentado na Tabela 9.

A supressão da fluorescência se caracteriza por uma redução da intensidade de emissão de fluorescência de uma espécie molecular em estudo. Fenômenos de natureza molecular podem resultar neste efeito redutor, dentre os quais estão: reações no estado

excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão colisional [Lakowicz 2006] e Cheng *et al.* (2009)]. A distinção entre os tipos de supressão envolvida, ou seja, estática ou dinâmica, pode ser feita definida por meio da observação de alguns fatores cinéticos, após a ocorrência do efeito supressivo: dependência com a temperatura e a viscosidade do meio, além de mudanças consideráveis no tempo de vida do estado excitado singlete [Cheng *et al.*, 2009].

Na presente amostra, isto é ASB/rutina, o estudo de espectroscopia de emissão de fluorescência foi realizado em três temperaturas diferentes, tendo em vista que a temperatura é um fator capaz de influenciar o comportamento fluorescente da ASB. A banda de emissão fluorescente com máximo de emissão em 345nm se confirma como uma banda característica do fluoróforo responsável pela emissão fluorescente da ASB, isto é o resíduo triptofano. (Figura 21). Pode-se notar o efeito supressivo causado sobre esta banda de emissão radiativa como uma função do aumento da concentração do supressor, isto é, rutina, nas diferentes temperaturas trabalhadas (Figura 27, 29 e 31). Este comportamento observado por espectroscopia de fluorescência, assim como os dados de Dicroísmo Circular (Figura 24, 25 e 26), justificam a utilização do termo “complexo” para esse e os outros sistemas estudados neste trabalho, uma vez que demonstram a formação de uma nova espécie, ou seja, ASB/ligante (composto bioativo). O efeito supressivo advindo destas interações (ASB/rutina), no entanto, não afeta a energia da transição entre o estado excitado e fundamental no cromóforo, já que não houve mudança no comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência da ASB, de forma análoga ao observado no espectro de absorção no UV-Vis da ASB/rutina (Figura 22). No caso dos experimentos de emissão de fluorescência,

entretanto, há uma redução da intensidade de emissão fluorescente nas três temperaturas estudadas e uma correlação linear em cada uma delas (Figuras 27, 29 e 31).

As constantes de supressão associadas a processos de supressão fluorescente possuem comportamentos capazes de indicar o tipo de supressão, estática ou dinâmica. O parâmetro que delimita a condição da supressão dinâmica é a constante de velocidade de difusão, que é da ordem de  $k_q \cong 5 \times 10^9 \text{L.mol}^{-1}.\text{s}$ , em água [He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Uma primeira determinação sobre o sistema ASB/rutina visou estabelecer o tipo de processo envolvido da interação, ou seja, se dinâmico ou estático. Para isso, aplicando-se a equação de Stern-Volmer (Equação 19), foi observado o comportamento da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) nas temperaturas de 296, 303 e 310K. As Figuras 27 a 31 apresentam os espectros de emissão de fluorescência de ASB como uma função da adição de concentrações variadas de rutina, a 296, 303 e 310K, respectivamente. A partir destes espectros, foram construídas as Tabelas 6-9 e os respectivos gráficos de Stern-Volmer (Figuras 28-32).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0}$$

Equação 19-Equação para determinação da constante de Stern-Volmer

Os gráficos de supressão estão apresentados abaixo:

T=296K

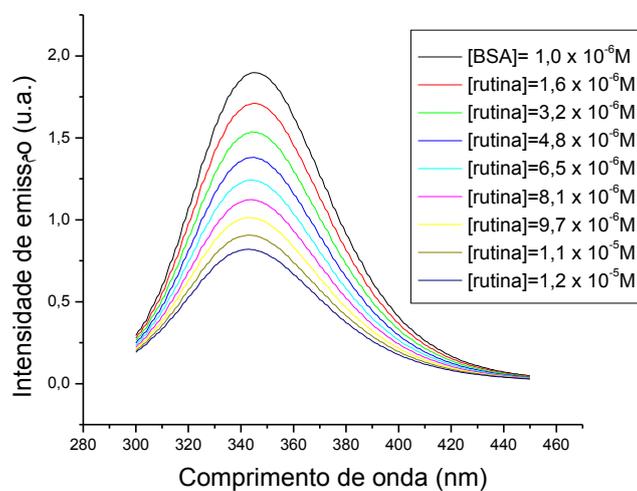


Figura 27- Espectro de Fluorescência para a ASB com diferentes concentrações de rutin em T=296K

Tabela 6 - Dados de  $F_0/F$  para a ASB após adição de diferentes concentrações de rutin em T=296K

[rutina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6}M$	1,0
$3,2 \times 10^{-6}M$	1,2
$4,8 \times 10^{-6}M$	1,3
$6,5 \times 10^{-6}M$	1,4
$8,1 \times 10^{-6}M$	1,5
$9,7 \times 10^{-6}M$	1,7
$1,1 \times 10^{-5}M$	1,8
$1,2 \times 10^{-5}M$	2,0

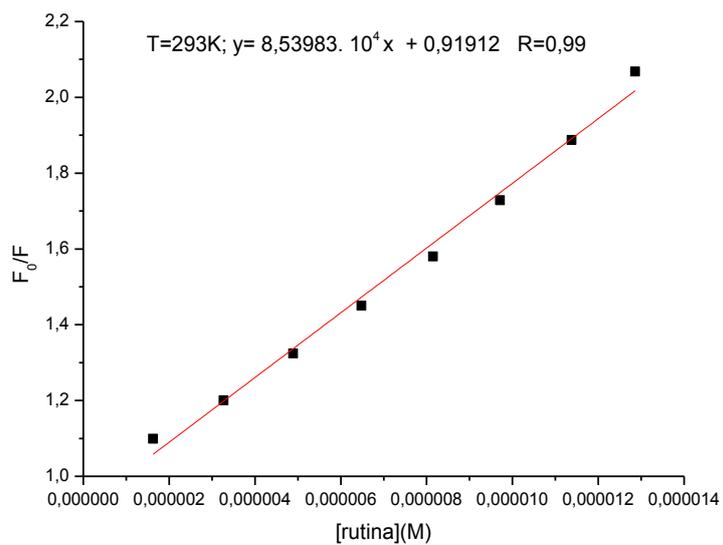


Figura 28- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina em T=296K

T=303K

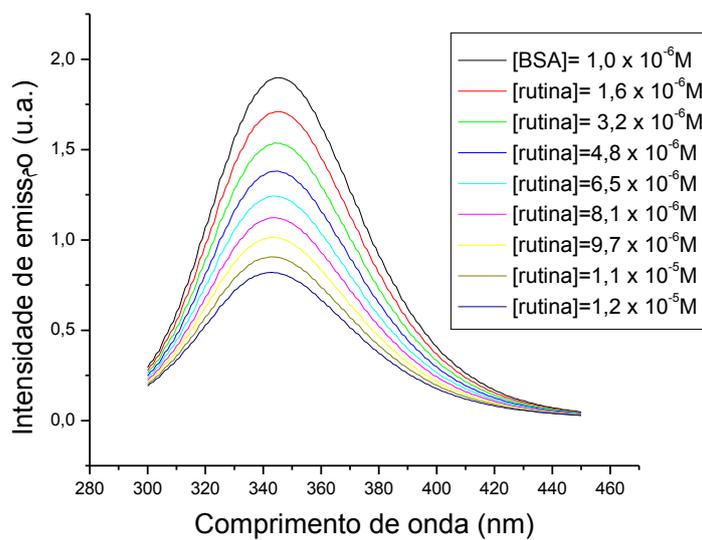


Figura 29- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina em T=303K

Tabela 7- Dados de  $F_0/F$  para a ASB após adição de diferentes concentrações de rutina, em  $T=303K$

[rutina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6}M$	1,1
$3,2 \times 10^{-6}M$	1,2
$4,8 \times 10^{-6}M$	1,3
$6,5 \times 10^{-6}M$	1,4
$8,1 \times 10^{-6}M$	1,6
$9,7 \times 10^{-6}M$	1,7
$1,1 \times 10^{-5}M$	1,9
$1,2 \times 10^{-5}M$	2,1

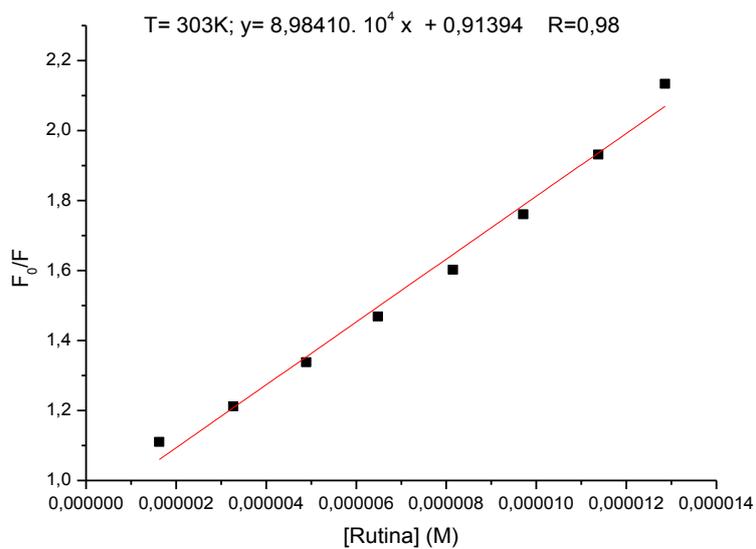


Figura 30- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina em  $T=303K$

T=310K

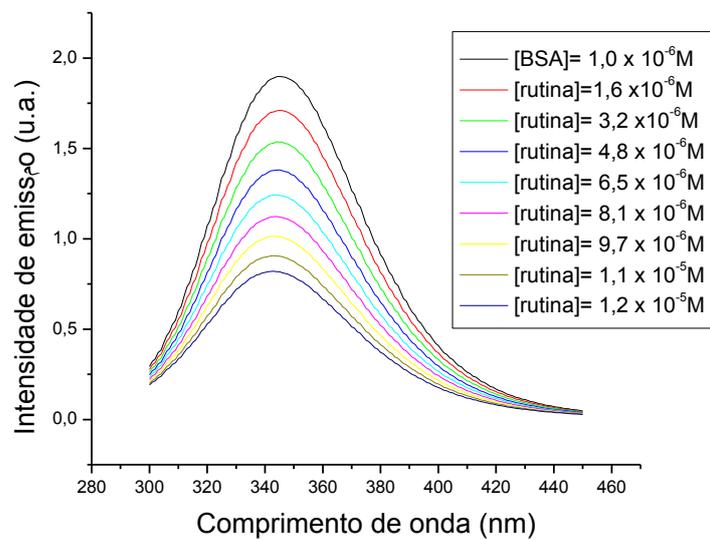


Figura 31- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina em T=310K.

Tabela 8- Dados de  $F_0/F$  para ASB com diferentes concentrações de rutina em T=310K

[Rutina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6}M$	1,1
$3,2 \times 10^{-6}M$	1,2
$4,8 \times 10^{-6}M$	1,3
$6,5 \times 10^{-6}M$	1,5
$8,1 \times 10^{-6}M$	1,6
$9,7 \times 10^{-6}M$	1,8
$1,1 \times 10^{-5}M$	2,0
$1,2 \times 10^{-5}M$	2,2

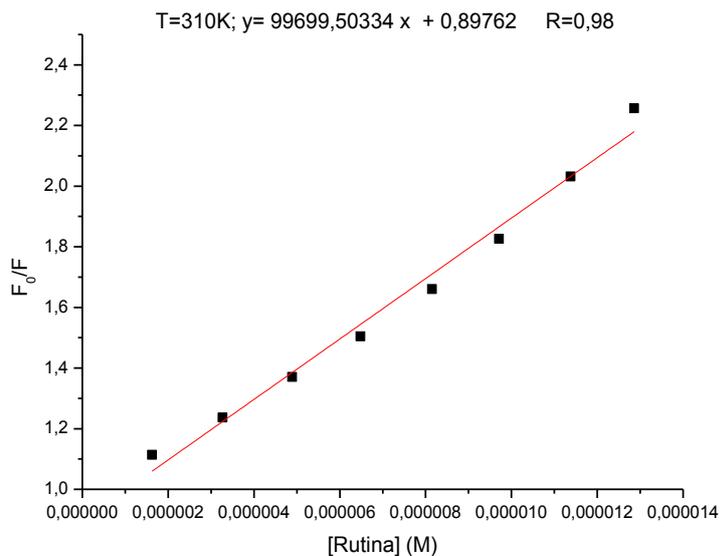


Figura 32- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina em T=310K

Tabela 9- Valores de T(K),  $K_{SV}$  e  $k_q$  para o sistema ASB/rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Temperatura (K)	Constante de Stern- Volmer ( $K_{sv}$ )  L.mol <sup>-1</sup>	Constante de velocidade de supressão de fluorescência para ASB ( $k_q$ ).  L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
296	$8,4 \times 10^4$	$8,4 \times 10^{12}$
303	$9,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^{12}$
310	$10 \times 10^4$	$10 \times 10^{12}$

Considerando que os valores para a constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ) nas temperaturas estudadas ( $k_q \cong 10^{12}$  e  $10^{13}$  L/mol.s) (Tabela 9) são superiores àquele para a constante de velocidade de difusão em meio aquoso ( $k_q \cong 5 \times 10^9$  L/mol.s) em três ordens de grandeza, conclui-se que o processo de supressão da rutina em relação a emissão fluorescente da ASB é estático. Adiciona-se a esse comportamento, o fato relevante de que a variação de temperatura dentro da faixa de trabalhada não influenciou significativamente as constantes de velocidade de supressão da fluorescência.

A constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ) foi obtida por meio de gráficos de Stern-Volmer modificados (equação 20), a partir dos dados da supressão de fluorescência da amostra ASB/rutina. A tabela 10 mostra os valores obtidos para  $F_0/F_0-F$  da ASB na presença de diferentes concentrações de rutina, nas temperaturas de 296, 303 e 310 K, a partir dos quais foram construídos os gráficos de Stern-Volmer modificados ( $F_0/F_0-F$  versus  $1/[rutina]$ ) mostrados nas Figuras 33-35, a fim de avaliarmos o grau de interação da ASB/rutina.

A fim de ampliar as considerações sobre o comportamento da interação ASB/rutina, e empregando-se os dados obtidos a partir das Figuras 33-35, uma terceira constante em função das temperaturas trabalhadas foi determinada, ou seja, a constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), as quais foram obtidas por meio dos gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 20) [He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Lakowicz (2006), Tang *et al.* (2006), Xie *et al.* (2006)]. Neste caso, constantes de supressão efetivas, com ordem de grandeza  $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$  L/mol, estão associadas a fortes interações entre

fármacos e a albumina [He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a} \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f} \quad (\text{Equação 20})$$

Equação 20-Equação para determinação da constante de supressão efetiva.

Tabela 10- Valores de  $F_0/F_0-F$  para ASB x  $1/[Rutina]$  nas temperaturas de: 293, 303 e 310K.

1/[Rutina]	$F_0/F_0-F$		
	296K	303K	310K
$7,6 \times 10^{-4} M^{-1}$	1,9	1,9	1,8
$8,8 \times 10^{-4} M^{-1}$	2,1	2,0	1,9
$1,3 \times 10^{-5} M^{-1}$	2,3	2,2	2,2
$1,2 \times 10^{-5} M^{-1}$	2,6	2,6	2,4
$1,5 \times 10^{-5} M^{-1}$	3,2	3,1	3,0
$2,0 \times 10^{-5} M^{-1}$	4,0	3,9	3,7
$3,0 \times 10^{-5} M^{-1}$	5,7	5,5	5,2
$6,1 \times 10^{-5} M^{-1}$	10,8	10,2	9,6

T=296K

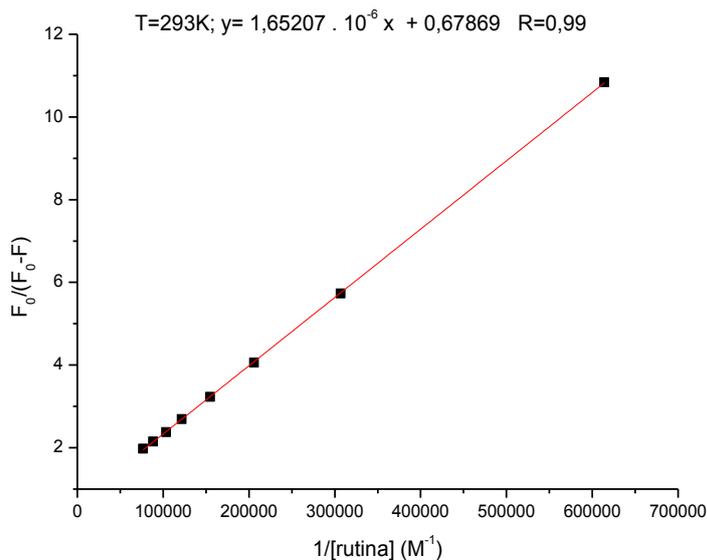


Figura 33- Gráfico de  $F_0/F_0-F$  da [ASB] x  $1/[Rutina]$  a T=296K

T=303K

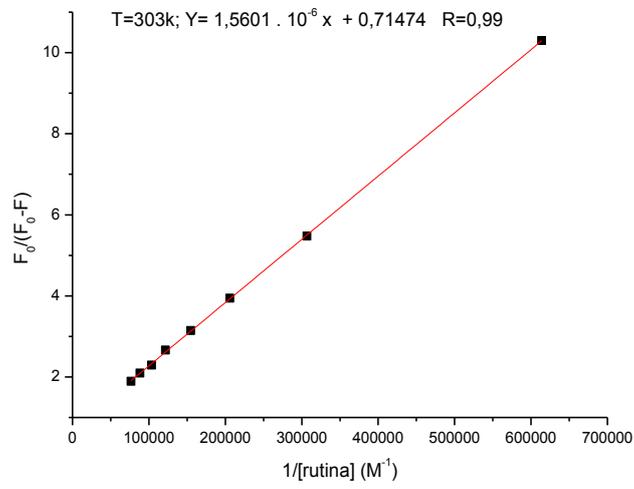


Figura 34- Gráfico de F<sub>0</sub>/F<sub>0</sub>-F da [ASB] x 1/[ Rutina] a T=303 K

T=310K

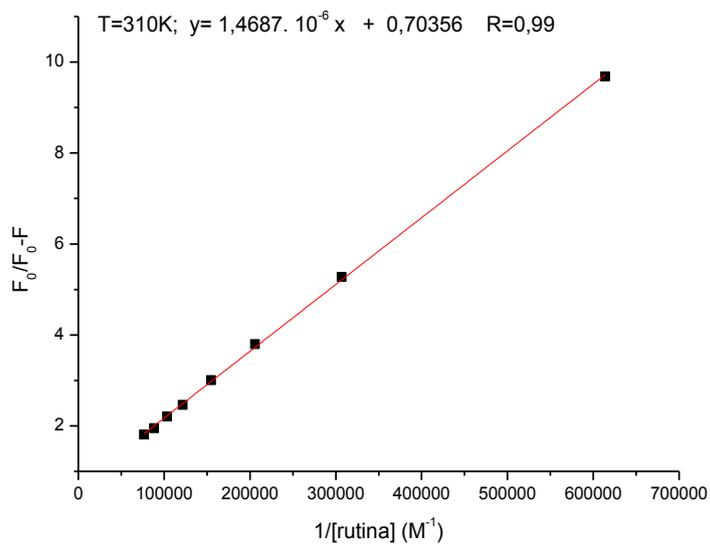


Figura 35- Gráfico de F<sub>0</sub>/F<sub>0</sub>-F da [ASB] x 1/[ Rutina] a T=310K

Empregando-se os valores de  $K_a$  obtidos dos gráficos de Stern-Volmer modificados, nas diferentes temperaturas, foi construído o gráfico da Figura 31, baseado nos dados mostrados na Tabela 11.

Tabela 11- Valores de  $\ln K_a \times 1/T$  para o sistema ASB/Rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T(K)	$K_a$	$1/T$ ( $K^{-1}$ )	$\ln K_a$
296	$3,63 \times 10^4$	$3,37 \times 10^{-3}$	10,5
303	$4,01 \times 10^4$	$3,30 \times 10^{-3}$	10,6
310	$4,43 \times 10^4$	$3,22 \times 10^{-3}$	10,7

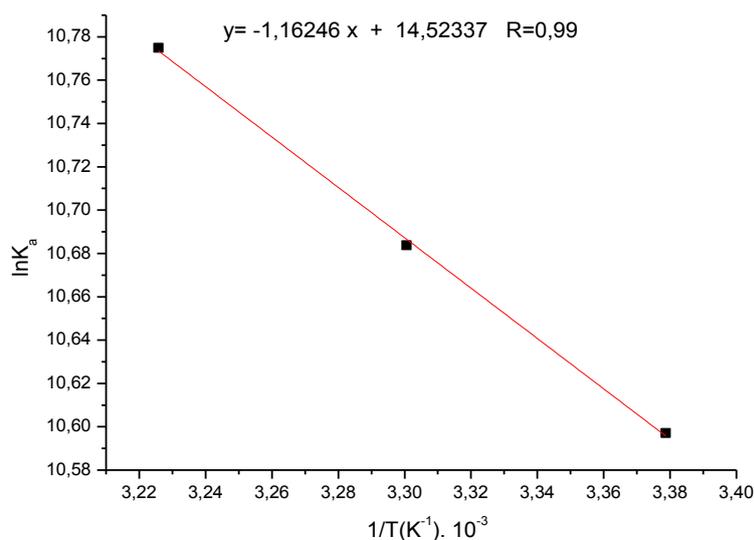


Figura 36- Gráfico de  $\ln K_a \times 1/T$  para ASB/Rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Utilizando a equação de Vant'Hoff (equação 21) foram obtidos os dados de  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema ASB/rutina (Tabela 12), sendo que a partir desses dados ficou estabelecido o tipo de interação predominante presente no sistema ASB/rutina.

Ao observarmos os valores obtidos na Tabela 12 temos que a ordem de grandeza da constante de Stern-Volmer modificada nas temperaturas estudadas variou de  $10^3$  a  $10^4$  L.mol<sup>-1</sup>. Isto indica que a interação entre ASB/rutina não é uma interação forte, ao ponto da temperatura causar modificações no seu valor. Para uma interação forte, como observado entre fármacos e albumina, a constante de Stern-Volmer modificada apresenta um valor de  $K_a$  compreendido entre  $10^4$  a  $10^5$  L.mol<sup>-1</sup>, [He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Por meio dos valores de  $K_a$  encontrados empregando-se o Stern-Volmer modificado para a supressão de ASB por rutina, foram construídos gráficos de van't Hoff (equação 21) [Gao *et al.* (2004); He *et al.* (2005); Kandagal *et al.* (2006); Tang *et al.* (2006); Xie *et al.* (2006); Cui *et al.* (2007); Li *et al.* (2007); Cui *et al.* (2008); Li *et al.* (2008); Yue *et al.* (2008); Wang *et al.* (2008); Zhang *et al.* (2008); Cheng *et al.* (2009); Qing *et al.* (2009) e Li *et al.* (2009)], que permitiram a determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de supressão da ASB por rutina. Assim, foram obtidos os valores de variação de entalpia ( $\Delta H^0$ ) e de entropia ( $\Delta S^0$ ) e, a partir deles, foi calculada a variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) empregando-se a Equação 22.

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad \text{Equação 21}$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{Equação 22}$$

Equação 21 e 22-Equações utilizadas na determinação das constantes termodinâmicas

Tabela 12- Valores de T(K),  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema ASB/rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

pH	T(K)	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$
7,4	296	-26,9KJ	0,1KJ	9,7KJ
7,4	303	-27,7KJ		
7,4	310	-26,0KJ		

Sendo assim, os valores de  $\Delta G^0 < 0$  são indicativos da presença de uma interação espontânea entre ASB/rutina. Além disso, os valores positivos de  $\Delta H^0 > 0$  e  $\Delta S^0 > 0$  indicam interações predominantemente hidrofóbicas.

A constante de supressão efetiva e o número de sítios de ligação para o sistema ASB/rutina foram determinadas a partir dos valores de  $\log[F_0-F/F] \times \log [rutina]$  listados na tabela 13. Estes valores foram empregados na construção dos gráficos das Figuras 37, 38 e 39.

Numa supressão do tipo estática os sítios de ligação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula [Cheng *et al.* (2009)]. Valores para a constante de ligação ( $K_b$ ) e para o número de sítios de ligação (n) foram obtidos a partir da construção de gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  (Equação 23), [Gao *et al.* (2004); Kandagal *et al.* (2006); Xie *et al.* (2006); Li *et al.* (2007); Shi *et al.* (2007); Qi *et al.* (2008); Wang *et al.* (2008); Zhang *et al.* (2008); Li *et al.* (2009); Cheng *et al.* (2009); Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)].

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q]$$

(Equação 23)

Equação 23- Equação utilizada para determinação da constante de ligação ( $K_b$ ) e sítio de ligação ( $n$ ).

Tabela 13- Valores de  $\log(F_0 - F/F)$  para ASB x  $\log[\text{rutina}]$  nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Log[ rutina]	Log( $F_0 - F/F$ )		
	296K	303K	310K
-5,78	-0,99	-0,95	-0,93
-5,48	-0,68	-0,64	-0,62
-5,31	-0,48	-0,47	-0,44
-5,18	-0,34	-0,33	-0,29
-5,08	-0,23	-0,21	-0,17
-5,01	-0,14	-0,11	-0,08
-4,94	-0,05	-0,02	0,01
-4,89	0,02	0,05	0,10

Os valores da constante de ligação ( $K_b$ ) e de números de sítios de ligação ( $n$ ) foram obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0 - F)/F$  da ASB x  $\log[\text{Rutina}]$  (Tabela 13 e gráficos 37, 38 e 39).

T=296K

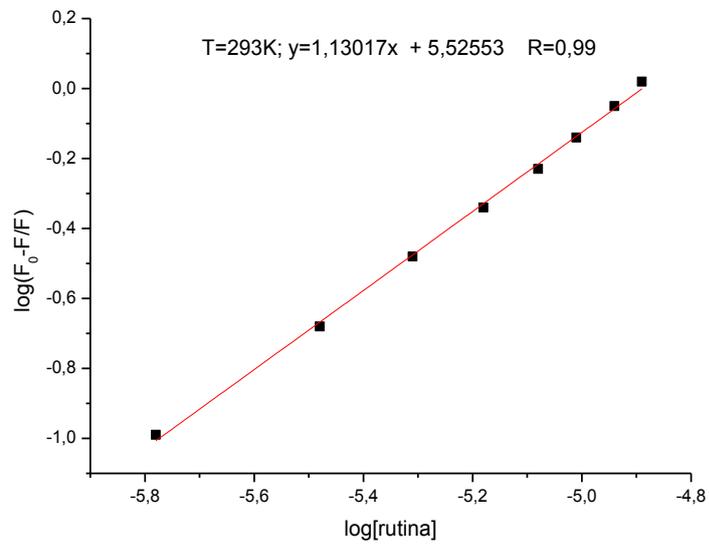


Figura 37- Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  da ASB x  $\log[rutina]$  a  $T=296K$ .

T=303K

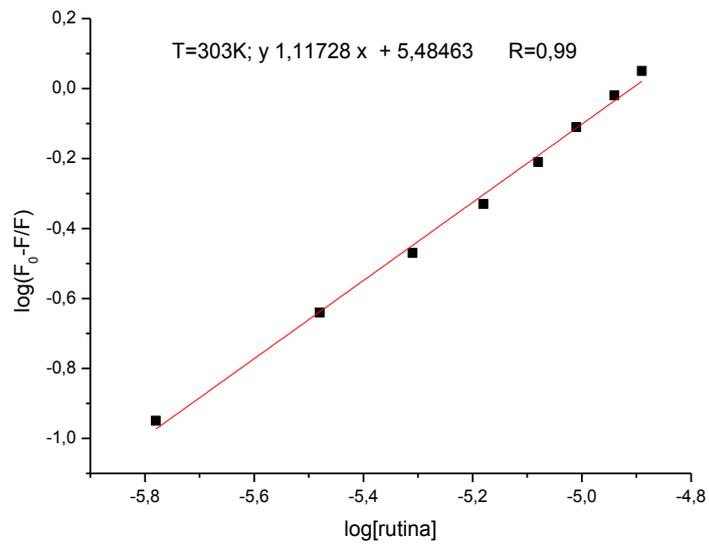


Figura 38- Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  da ASB x  $\log[rutina]$  a  $T=303K$

T=310K

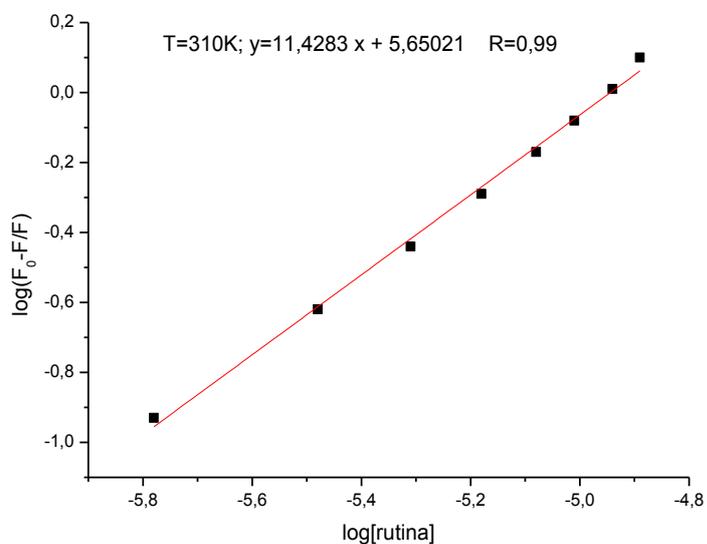


Figura 39- Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  da ASB x  $\log[Rutina]$  a T=310K

A partir das curvas obtidas nas Figuras 37-39, foram determinados os valores de “ $K_b$ ” e “ $n$ ” nas diferentes temperaturas de 296, 303 e 310K (Tabela 14).

Tabela 14- Dados de  $K_b$  e  $n$  para o sistema ASB/rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Temperatura (K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ ) ( $L \cdot mol^{-1}$ )	Sítio de ligação ( $n$ )
296	$3,3 \times 10^5$	1,1
303	$3,7 \times 10^5$	1,1
310	$4,7 \times 10^5$	1,1

A partir dos valores determinados para  $K_b$  e  $n$ , nota-se que não há contribuição da temperatura sobre o comportamento da constante de ligação efetiva (esse comportamento já se apresentava quando consideramos a constante de supressão,  $k_q$ ) tendo em vista que a magnitude dos valores encontrados está na ordem de  $10^5$  nas diferentes temperaturas utilizadas, o que demonstra a ausência de variação. Quanto ao número de sítios de ligação, os valores obtidos demonstram haver um ponto de interação ( $n=1$ ) existente entre a ASB e a rutina. Um aspecto interessante a ser considerado é que mesmo a ASB tendo dois resíduos de triptofano [Peters 1985] na sua estrutura secundária, há a confirmação de um único sítio de interação a partir dos dados obtidos para o sistema em estudo, estando este sítio localizado numa porção hidrofóbica da macromolécula.

Os espectros de emissão da fluorescência da ASB e de absorção radiativa da rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K (Figuras 40.1, 40.2 e 40.3) são apresentados abaixo. A partir dessa sobreposição, alguns parâmetros foram utilizados na determinação do raio de Förster para o sistema ASB/Rutina.

A possibilidade da ocorrência do fenômeno de transferência de energia envolvido na interação entre ASB e rutina foi verificada a partir da sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência da supressão de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) e o espectro de absorção UV/visível da rutina a  $T=298$ K. Os valores da integral de sobreposição ( $J$ ) do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASB) com o espectro de absorção do acceptor (flavonóide) foram calculados de acordo com a Equação 24 [Horrocks Jr. *et al.* (1981); Sytnik e Litvinyuk (1996); Gao *et al.* (2004); He *et al.* (2005); Lakowicz (2006); Xie *et al.* (2005); Mahesha *et al.* (2006); Kandagal *et al.* (2006); Li *et al.* (2007); Shi *et al.* (2007); Banerjee *et al.* (2008); Cui *et al.* (2008); Wang *et al.* (2008); Yue *et al.* (2008); Zhang *et al.* (2008); Cheng *et al.* (2009); Qing *et al.* (2009) e Stan *et*

al. (2009)]. As figuras 40.1, 40.1 e 40.3 mostram a sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência do doador (ASB) e de absorção do acceptor (rutina) para uma concentração de ASB de  $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  e de rutina de  $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$  ( $C_{\text{ASB}}/C_{\text{rutina}}=1:1$ ) a partir da qual foi determinada a integral de sobreposição empregando-se a equação 24.

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad \text{Equação 24}$$

Equação 24- Equação utilizada para determinação da integral de sobreposição(J).

A Equação 25 [Karreman *et al.* (1967); Horrocks Jr. *et al.* (1981); Sytnik e Litvinyuk (1996); He *et al.* (2005); Gao *et al.* (2004); Xie *et al.* (2005); Kandagal *et al.* (2006); Lakowicz (2006); Mahesha *et al.* (2006); Li *et al.* (2007); Shi *et al.* (2007); Banerjee *et al.* (2008); Cui *et al.* (2008); Wang *et al.* (2008); Yue *et al.* (2008); Zhang *et al.* (2008); Cheng *et al.* (2009); Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)] foi utilizada para calcular os valores de distância crítica entre o doador (ASB) e o acceptor (rutina), quando sua eficiência de transferência é 50% ( $R_0$ ). Para esses cálculos, o fator de orientação espacial do dipolo ou fator de orientação entre a emissão do dipolo do doador (ASB) e a absorção do dipolo do acceptor rutina ( $K^2$ ) é o parâmetro menos correto. Teoricamente, o parâmetro  $K^2$  pode ser na faixa de 0 a 4, mas os valores extremos requerem orientações muito rígidas. Se ambos, doador e acceptor, são rapidamente ligados e são livres para assumir qualquer orientação, como no presente caso da interação albumina/rutina, então  $K^2$  é igual a 2/3 [Liu *et al.* (2003), Kandagal *et al.* (2006), Shi *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Qing *et al.* (2009)].

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} k^2 N^{-4} \Phi J \quad \text{Equação 25}$$

Assim, os valores utilizados para a ASB foram:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$ , de onde foi obtido um valor de  $R_0 = 1,65$  nm.

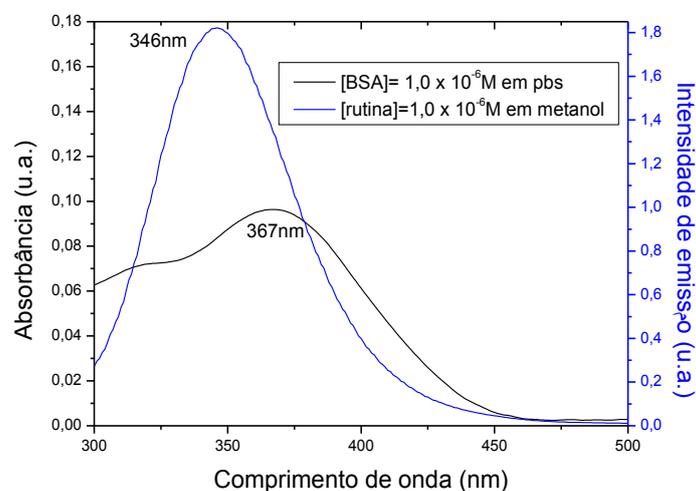
Para determinar os valores de eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador (ASB) e acceptor (Rutina) (E) foram usadas as Equação 26 e 27 [Sklar *et al.* (1977); Horrocks Jr. *et al.* (1981); Gao *et al.* (2004); He *et al.* (2005); Xie *et al.* (2005); Kandagal *et al.* (2006); Lakowicz (2006); Mahesha *et al.* (2006); Li *et al.* (2007); Shi *et al.* (2007); Banerjee *et al.* (2008); Cui *et al.* (2008); Yue *et al.* (2008); Wang *et al.* (2008); Zhang *et al.* (2008); Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)].

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Equação 26}$$

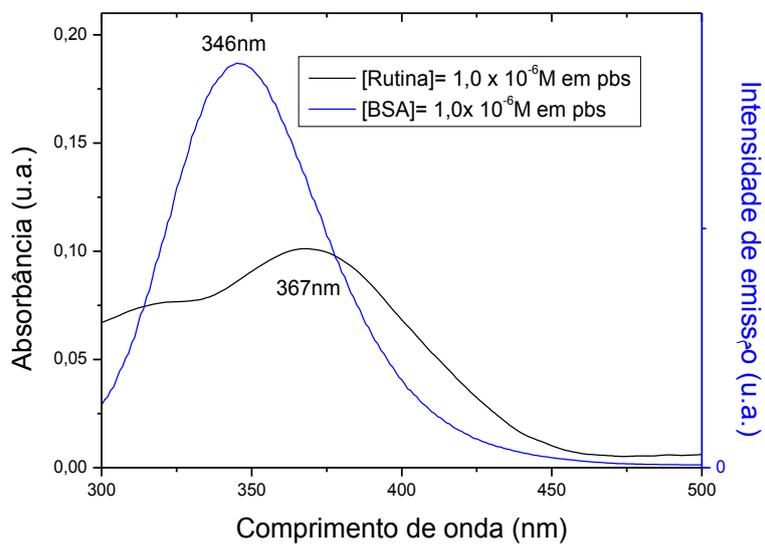
$$r^6 = \frac{R_0^6 \cdot (1 - E)}{E} \quad \text{Equação 27}$$

Equação 26 e 27- Equação utilizada para determinação dos valores da eficiência da transferência de energia entre doador e receptor.

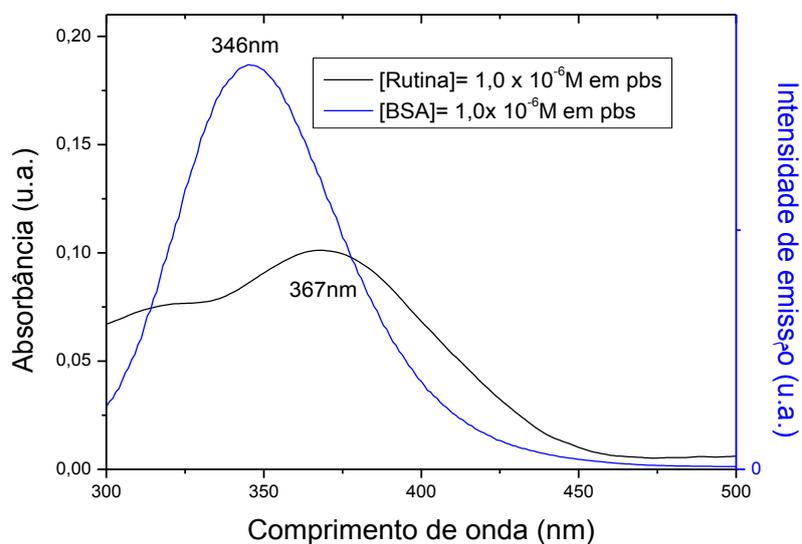
T=296K



T=303K



T=310



Figuras 40.1, 40.2 e 40.3- Sobreposição dos Espectros de Fluorescência da ASB ( $1,00 \times 10^{-6}M$ ) e de Absorção para rutina ( $1,00 \times 10^{-6}M$ ) nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

A partir da sobreposição dos espectros e ao aplicarmos a equação da integral de sobreposição (equação 24) foram determinados o fator “J”, e empregando as equações 25-27 pode-se calcular “ $R_0^6$ ”, “ $r^6$ ”, “R” e “r”. Esses dados foram obtidos considerando:  $\lambda$  em cm e os seguintes valores para ASB:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$  (Tabela 15) [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)].

Tabela 15- Valores de “J”, “ $R_0^6$ ”, “ $r^6$ ”, “R” e “r” para o sistema ASB/rutina nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T(K)	J	$R_0^6$	E	$r^6$	Ro(cm)	r(cm)
296	$1,27 \cdot 10^{-14}$	$1,49 \cdot 10^{-39}$	0,473785	$1,65 \cdot 10^{-39}$	$3,37 \cdot 10^{-7}$	$3,43 \cdot 10^{-7}$
303	$1,34 \cdot 10^{-14}$	$1,58 \cdot 10^{-39}$	0,488541	$1,65 \cdot 10^{-39}$	$3,41 \cdot 10^{-7}$	$3,43 \cdot 10^{-7}$
310	$1,25 \cdot 10^{-14}$	$1,58 \cdot 10^{-39}$	0,511162	$1,51 \cdot 10^{-39}$	$3,51 \cdot 10^{-7}$	$3,38 \cdot 10^{-7}$

A partir dos resultados obtidos na tabela 15, duas importantes considerações sobre a existência ou não de transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET) podem ser feitas. A primeira é a de que, dentro da variação de temperatura empregada neste trabalho, na temperatura de 296K não houve contribuição da temperatura sobre um possível processo FRET. A segunda consideração que pode ser feita a partir da tabela 15 é que a distância efetiva “r” entre ASB e rutina apresenta mesmo valor que o raio de Förster “R”, indicando que a distância entre as espécies nas temperaturas de 303 e 310K se encontra no valor limite da possibilidade de contribuição do mecanismo FRET.

Dados da literatura para a complexação entre rutina e albumina sérica bovina [Liu 2008 *et al*; Liu 2010 *et al* ] demonstram haver similaridade entre os resultados deste trabalho e os dos citados anteriormente. Por exemplo, os valores das grandezas termodinâmicas:  $\Delta G < 0$  havendo espontaneidade da interação, enquanto as interações foram predominantemente hidrofóbicas,  $\Delta S > 0$  e  $\Delta H > 0$ . Outros dois resultados similares entre os trabalhos foi a presença de apenas um ponto de interação no par ASB/rutina e a probabilidade de existência de efeito FRET em duas das temperaturas estudadas no sistema ASB/rutina.

## 3.2 ASB/Rutina Metilada.

### 3.2.1- Dados de Absorção

O Espectro de absorção da ASB em presença de diferentes concentrações da rutina metilada está apresentado abaixo (Figura 41). Neste ítem em particular será avaliado o efeito sobre as transições eletrônicas no estado fundamental da macromolécula pela adição de alíquotas do flavonóide metilado.

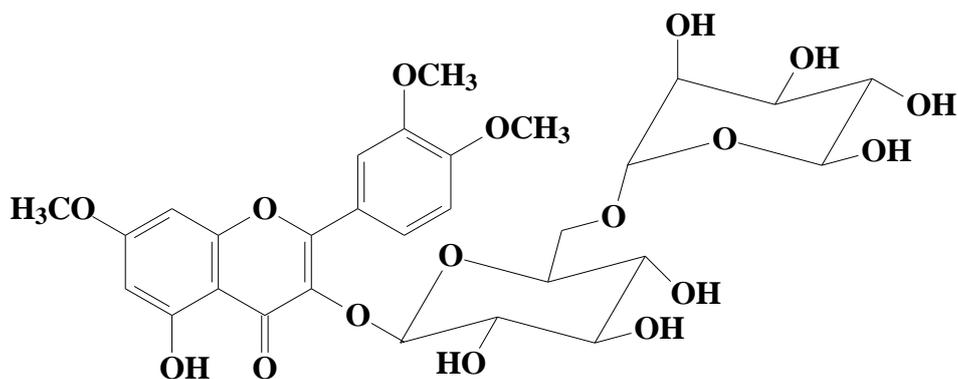


Figura 41- Fórmula estrutural plana para a rutina metilada

Espera-se com isso verificar se a alteração ocorrida na estrutura molecular da rutina por adição de grupos metila ( $-\text{CH}_3$ ) em posições anteriormente ocupadas por grupos hidroxílicos ( $-\text{OH}$ ) fenólicos seja capaz, ou não, de acarretar modificações sobre as

interações existentes no par ASB/rutina, como já demonstradas acima. O espectro de absorção na região do UV-visível para a rutina metilada está apresentado na Figura 42.

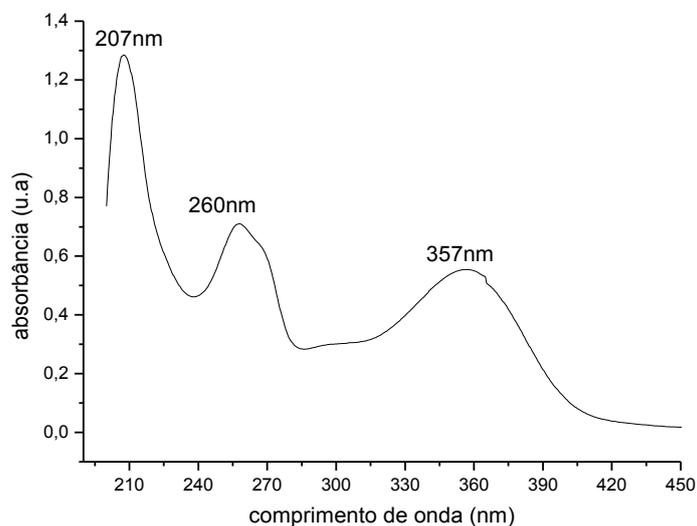


Figura 42- Espectro de absorção na região do UV-visível para a rutina metilada.

O espectro de absorção na região do UV-visível para a rutina metilada em presença de ASB está apresentado na Figura 42, podendo-se observar novamente, como no sistema ASB/rutina, três máximos de absorção nos comprimentos de onda a 228, 280 e 350nm. A banda de absorção a 270nm é consequência de um efeito de redução do comprimento de onda ocorrido na transição a 280nm, a qual será discutida mais adiante. Novamente não será considerada na análise a absorção em 228nm pela falta de uma correlação clara com a adição das alíquotas da solução da rutina metilada no sistema. A absorção com comprimento de onda máximo igual a 350nm está associada à presença da rutina metilada no meio, tendo em vista que essa banda não aparece no espectro da ASB na ausência do flavonóide (Figura 21). O comprimento de onda de absorção a 280nm é característico do resíduo de triptofano, observando-se efeitos hipsocrômico (deslocamento do máximo de absorção de 280 para 270nm) e hipercrômico após a

adição de diferentes concentrações da rutina metilada. Este dado parece indicar uma possível modificação do orbital molecular do triptofano contido no ASB por interação com a rutina metilada presente no meio. Sendo assim, verificam-se nesse caso os mesmos efeitos descritos anteriormente para o sistema ASB/rutina, ou seja, um efeito hiper-crômico conjugado a um efeito hipso-crômico para a absorção a 280nm do triptofano da ASB.

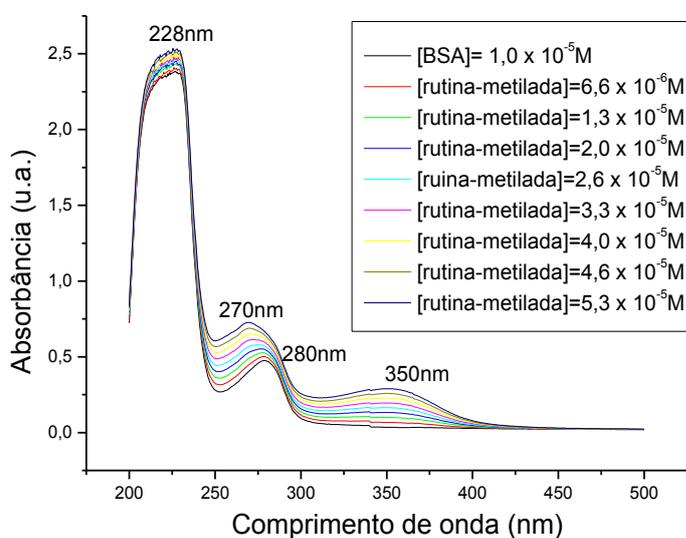


Figura 43- Espectro de Absorção para ASB em presença de concentrações variadas de rutina metilada, a T=296K

### 3.2.2- Dados de Dicroísmo Circular

O espectro de Dicroísmo Circular para o sistema ASB/rutina metilada é mostrado abaixo (Figuras 44, 45 e 46). Ao se observar a variação ocorrida em torno de 208 e 222nm no espectro de Dicroísmo Circular do sistema ASB/Rutina metilada, a diferentes temperaturas (296, 303 e 310K), nota-se uma acentuação na modificação ocorrida na conformação planar da estrutura secundária da macromolécula como mostrado na Tabela 16.

Estimativas acerca do percentual (%) de  $\alpha$ -hélice para a estrutura secundária de ASB na ausência e na presença de flavonóides foram feitas usando as Equações 12 e 13 [Chen *et al.* (1972); Khan *et al.* (2002); Gao *et al.* (2004); He *et al.* (2005); He *et al.* (2006); Kandagal *et al.* (2006); Yue *et al.* (2008); Cheng *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)], (Tabela 16).

T=296K

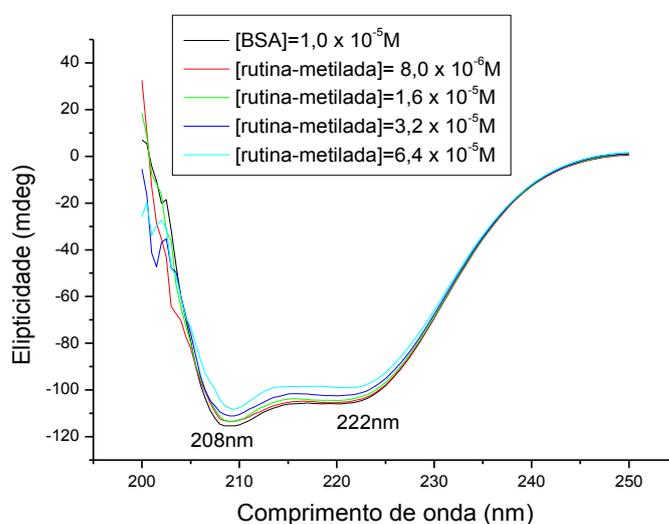


Figura 44- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de rutina metilada em T=296K.

T=303K

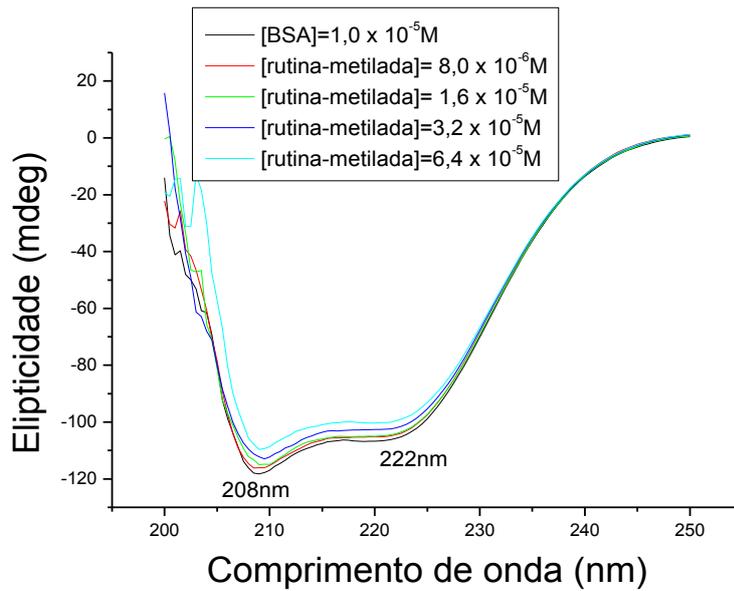


Figura 45- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de rutina metilada em T=303K.

T=310K

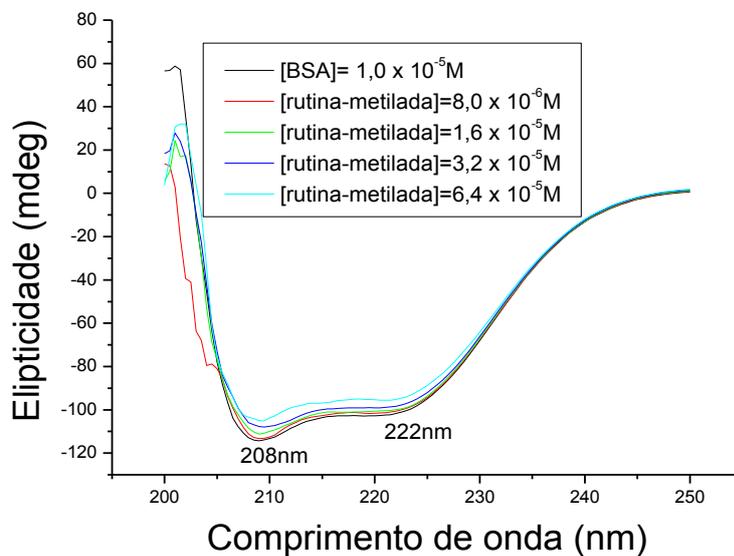


Figura 46-Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de rutina metilada em T=310K.

Esse comportamento é muito similar ao da rutina, demonstrando que também neste caso as interações existentes no sistema ASB/rutina metilada causaram uma redução nas medidas de ângulos associadas à elipticidade residual da estrutura secundária da ASB,

ou seja, modificações na conformação planar de sua estrutura secundária quando da adição da rutina metilada à solução contendo ASB. A tabela abaixo (Tabela 16) apresenta os dados obtidos nessa análise.

Tabela 16- Valores de  $\alpha$ -hélice da ASB em presença de diferentes concentrações de rutina metilada nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
54,13497	51,91567	54,42469	52,24286	53,07679	50,54336
53,42398	51,44784	54,12075	51,49660	52,06067	49,89521
52,18865	50,93861	52,69878	51,29983	50,54213	48,97208
51,01315	49,98934	51,07831	50,17250	48,9750	48,07152
48,51878	48,80614	48,74633	48,74633	47,53762	46,28469

A tabela 16 mostra uma redução do ângulo  $\alpha$  da estrutura em  $\alpha$ -hélice presente na ASB em função do aumento da concentração de rutina metilada nas três diferentes temperaturas. Essas mudanças ocorridas nos valores do ângulo  $\alpha$  indicam alterações pronunciadas na conformação da estrutura secundária advindas de interações entre a ASB e rutina. Essa redução do ângulo- $\alpha$  é acompanhado por um efeito da redução sobre a elipticidade residual da estrutura de  $\alpha$ -hélice da ASB, sobretudo quando comparada à elipticidade original da ASB livre da ação da rutina metilada.

Outra consideração que pode ser feita a partir dos dados obtidos é a de que a variação de temperatura não influenciou os valores obtidos de  $\alpha$ -hélice, demonstrando que essa redução não está associada a um efeito térmico, dentro da faixa considerada,

sobre a redução da elipticidade da estrutura de  $\alpha$ -hélice presente na estrutura secundária da ASB.

Pode-se admitir que a redução do ângulo de  $\alpha$ -hélice da ASB se relaciona com o aumento da energia de transição ocorrido no espectro de absorção (Figura 43). Isso porque a mudança conformacional ocorrida na estrutura secundária da ASB, ou seja, a perda da elipticidade original da ASB devido à presença da rutina metilada, pode, por consequência, se refletir na disposição espacial dos resíduos de triptofano, os quais estão sujeitos a um aumento da energia relativa à transição eletrônica ocorrida no cromóforo de 280 a 270nm.

### **3.2.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário**

Os espectros de Fluorescência para ASB/Rutina metilada são apresentados abaixo (Figura 47, 49 e 51). Ao observarmos o espectro de fluorescência da ASB em presença da rutina metilada, a diferentes temperaturas (296, 303 e 310K) verifica-se um efeito de supressão da intensidade de fluorescência intrínseca da ASB, a partir da adição de alíquotas de uma solução da rutina metilada à solução de ASB em tampão fosfato. Isto demonstra a existência de um mecanismo de desativação dessa emissão advindo da interação com a rutina metilada.

As tabelas 17, 18 e 19 apresentadas abaixo apresentam os valores de  $F_0/F$  da ASB x [rutina-metilada] nas três temperaturas de trabalho, sendo que esses valores deram origem aos gráficos 48, 50 e 52, os quais se referem à supressão de fluorescência da ASB em presença de alíquotas de rutina metilada, para a obtenção dos valores de supressão da fluorescência da ASB segundo a equação de Stern-Volmer (equação 19).

T=296K.

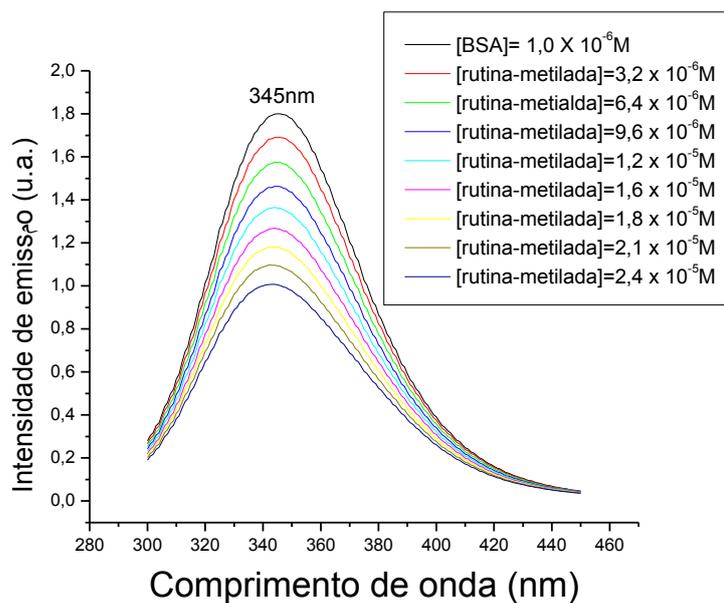


Figura 47- Espectro de Fluorescência para a ASB em presença de concentrações variadas de rutina metilada, em T=296K.

Tabela 17- Dados de  $F_0/F$  da ASB após adição de diferentes concentrações de rutina-metilada em T=296K.

[Rutina metilada]	$F_0/F$
$3,2 \times 10^{-6} \text{M}$	1,0
$6,4 \times 10^{-6} \text{M}$	1,1
$9,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,2
$1,2 \times 10^{-5} \text{M}$	1,2
$1,6 \times 10^{-5} \text{M}$	1,3
$1,8 \times 10^{-5} \text{M}$	1,4
$2,1 \times 10^{-5} \text{M}$	1,5
$2,4 \times 10^{-5} \text{M}$	1,6

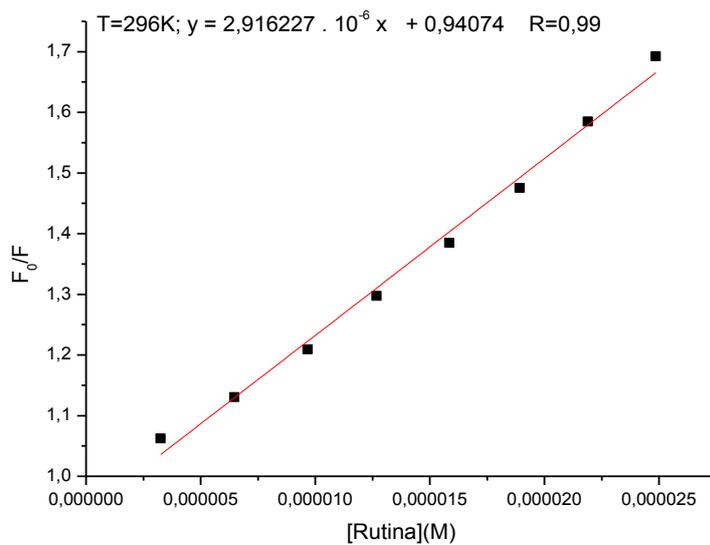


Figura 48- Gráfico de Fo/F para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina metilada, a T=296K

T=303K

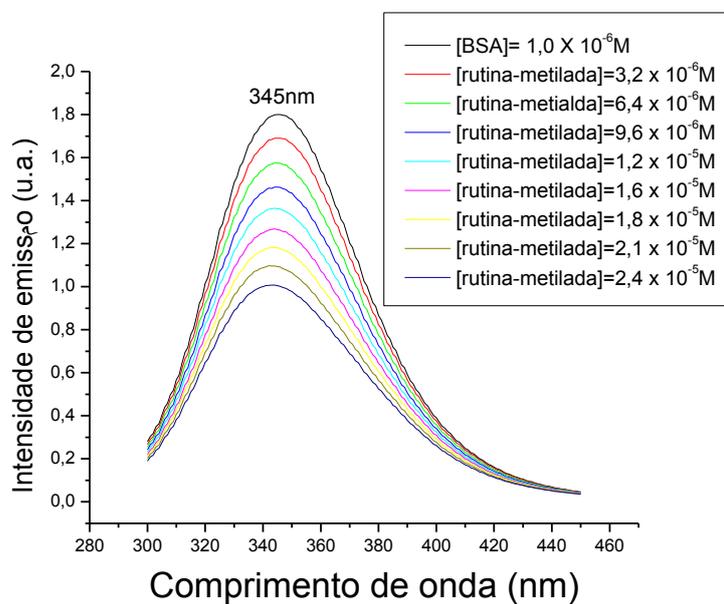


Figura 49- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina metilada, a T=303K

Tabela 18- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina-metilada em  $T=303K$ .

[Rutina metilada]	$F_0/F$
$3,2 \times 10^{-6}M$	1,0
$6,4 \times 10^{-6}M$	1,1
$9,6 \times 10^{-6}M$	1,2
$1,2 \times 10^{-5}M$	1,3
$1,5 \times 10^{-5}M$	1,4
$1,8 \times 10^{-5}M$	1,5
$2,1 \times 10^{-5}M$	1,6
$2,4 \times 10^{-5}M$	1,7

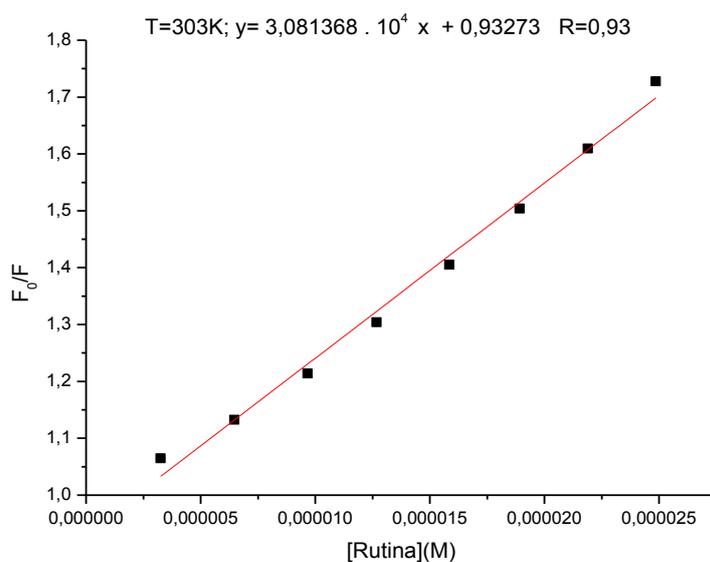


Figura 50- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina metilada,  $T=303K$

T=310K

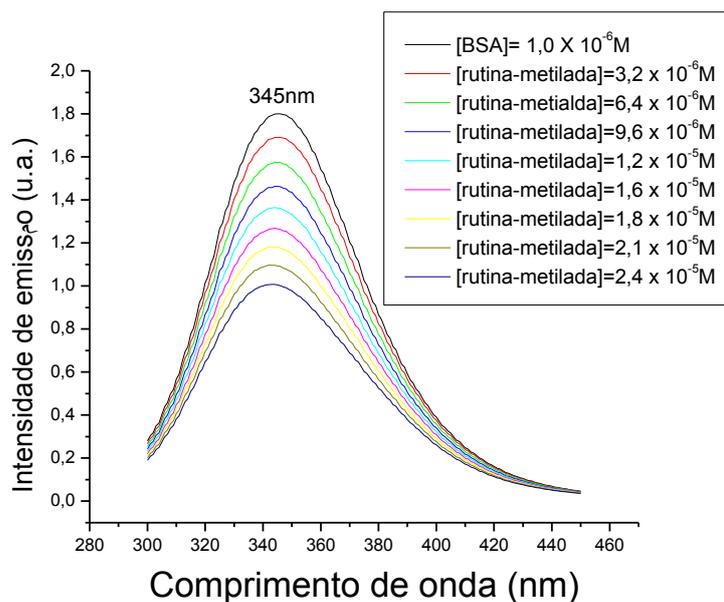


Figura 51- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina metilada, a T=310K

Tabela 19- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de rutina- metilada em T=310K

[rutina metilada]	$F_0/F$
$3,2 \times 10^{-6} \text{M}$	1,0
$6,4 \times 10^{-6} \text{M}$	1,1
$9,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,2
$1,2 \times 10^{-5} \text{M}$	1,3
$1,5 \times 10^{-5} \text{M}$	1,4
$1,8 \times 10^{-5} \text{M}$	1,5
$2,1 \times 10^{-5} \text{M}$	1,6
$2,4 \times 10^{-5} \text{M}$	1,7

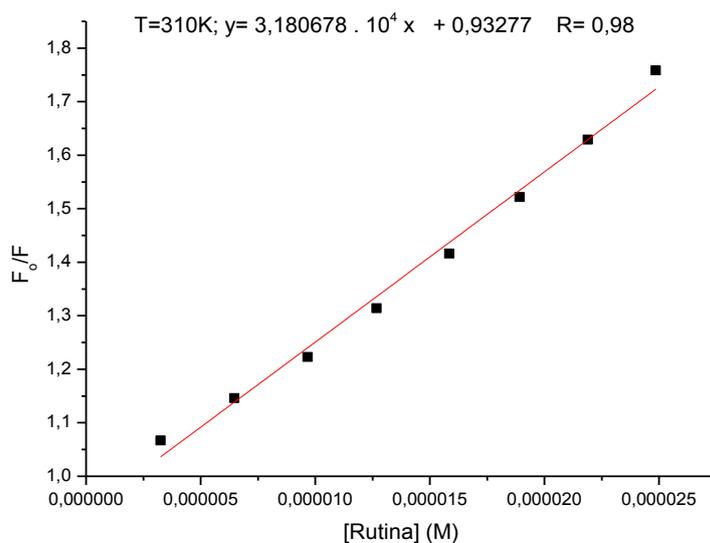


Figura 52- Gráfico de Fo/F para a ASB após a adição de diferentes concentrações de rutina metilada, a T=310K

A partir das curvas obtidas, foram determinados os valores das constantes  $K_{sv}$  e  $k_q$  que foram determinadas empregando-se a equação 19, os quais estão apresentados na tabela 20, a seguir.

Tabela 20- Valores de T(K),  $K_{sv}$  e  $k_q$  para o sistema ASB/rutina- metilada em diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	Constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) $L.mol^{-1}$	Constante de velocidade de supressão da fluorescência para ASB ( $k_q$ ) $L.mol^{-1}.s^{-1}$
296	$2,9 \times 10^4$	$2,9 \times 10^{12}$
303	$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^{12}$
310	$3,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{12}$

A ordem de grandeza da constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ) pela rutina metilada, nas temperaturas estudadas, quando comparada à constante de velocidade de difusão em meio aquoso ( $k_{dif} \cong 5 \times 10^9$  L/mol.s), nos leva à conclusão de que o processo de supressão ASB/rutina metilada é estático, uma vez que a constante de velocidade de supressão da fluorescência ( $k_q$ ) é superior em 3 ordens de grandeza à constante de velocidade de difusão. Além disto,  $k_q$  é independente da variação de temperatura utilizada, confirmando um processo de supressão estático.

A constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), foi obtida por meio dos gráficos de Stern-Volmer modificados, onde se empregou a equação 20. A tabela abaixo (Tabela 21) mostra os dados para  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[rutina\ metilada]$  nas temperaturas de 296, 303 e 310K obtidas dos experimentos de supressão do sistema ASB/rutina-metilada e, com base nos valores apresentados nesta tabela, foram construídos os gráficos mostrados nas Figuras 53, 54 e 55.

Tabela 21- Valores para  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[rutina-metilada]$  em diferentes temperaturas.

1/[ASB+rutina metilada]	$F_0/F_0-F$		
	296	303	310
$3,9 \times 10^{-4} M^{-1}$	2,3	2,3	2,3
$4,5 \times 10^{-4} M^{-1}$	2,6	2,6	2,6
$5,2 \times 10^{-4} M^{-1}$	3,0	3,0	2,9
$6,2 \times 10^{-4} M^{-1}$	3,6	3,5	3,3
$7,8 \times 10^{-4} M^{-1}$	4,3	4,2	4,1
$1,0 \times 10^{-5} M^{-1}$	5,6	5,6	5,3
$1,5 \times 10^{-5} M^{-1}$	8,3	8,2	7,9
$3,0 \times 10^{-5} M^{-1}$	16,6	15,9	15,4

T=296K

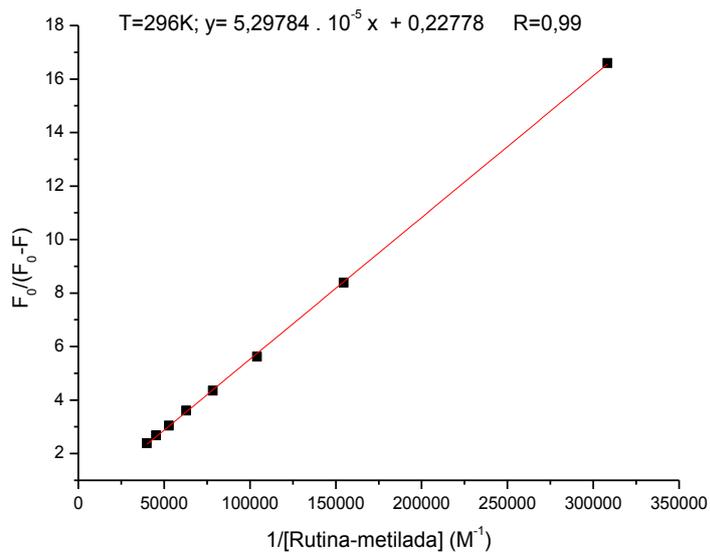


Figura 53-Gráfico de  $F_o/F_o-F$  da ASB x  $1/[rutina\ metilada]$ , a  $T=296K$ .

T=303K

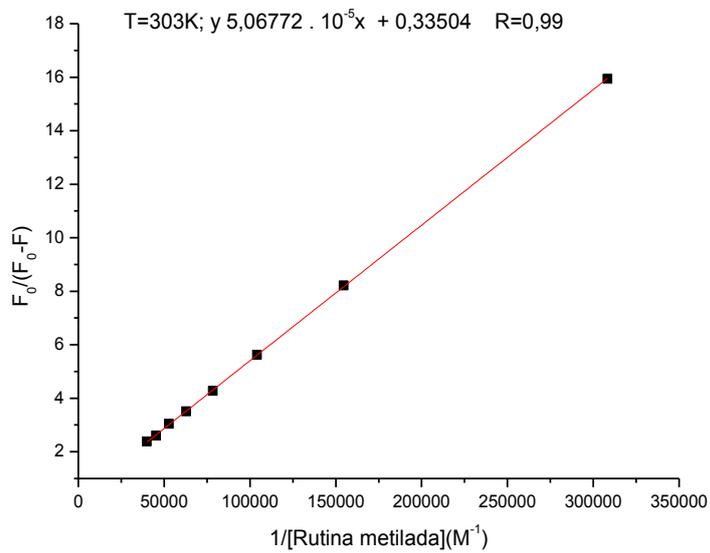


Figura 54-Gráfico de  $F_o/F_o-F$  da ASB x  $1/[rutina\ metilada]$ , a  $T=303K$

T=310K

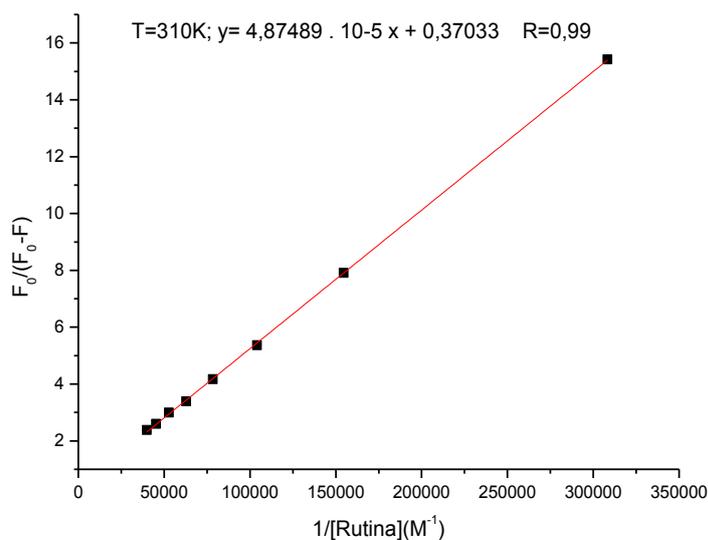


Figura 55-Gráfico de  $F_o/F_o-F$  da ASB x  $1/[rutina\ metilada]$ , a  $T=310K$ .

Utilizando-se a equação de Van't Hoff (equação 21) e baseado nos valores de  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados, foi construída a tabela 22. Empregando-se os valores nela contidos, foi traçado o gráfico mostrado na Figura 56, a partir do qual foram obtidos os dados de  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema em estudo (Tabela 23). Conhecidos estes valores e empregando-se a equação 22 o valor de  $\Delta G^0$  pôde ser calculado (Tabela 23).

Tabela 22- Valores de  $1/T \times \ln K_a$  para o sistema ASB/rutina-metilada.

T(K)	$K_a$	$1/T (K^{-1})$	$\ln K_a$
296	$4,49 \times 10^{-3}$	$3,37 \times 10^{-3}$	8,41
303	$5,43 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-3}$	8,60
310	$6,53 \times 10^{-3}$	$3,22 \times 10^{-3}$	8,79

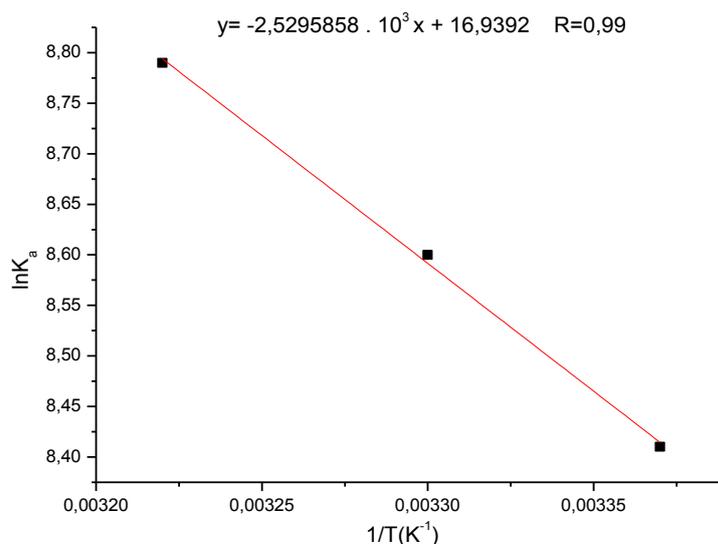


Figura 56- Gráfico de  $\ln K_a \times 1/T$  para ASB/rutina metilada

Tabela 23- Valores de T(K),  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  e  $\Delta H^\circ$  para o sistema ASB/Rutina- metilada.

pH	T(K)	$\Delta G^\circ$	$\Delta S^\circ$	$\Delta H^\circ$
7,4	296	-20,6 KJ	0,14KJ	20,8KJ
7,4	303	-21,6Kj		
7,4	310	-22,6Kj		

Com isso, foi possível estabelecer o tipo de interação predominante que está presente na formação do par ASB/rutina metilada. O valor para a constante universal dos gases utilizada foi:  $R = 8,31 \text{ J.mol/K}$ . Os valores de  $\Delta G^\circ < 0$  indicam uma espontaneidade na interação entre ASB e a Rutina metilada, com os valores de  $\Delta H^\circ > 0$  e  $\Delta S^\circ > 0$  indicando interações predominantemente hidrofóbicas.

A constante de supressão efetiva e o número de sítios de ligação ao sistema foram determinados a partir dos valores de  $\log[F_0 - F/F] \times \log[\text{rutina metilada}]$  (equação 23) e vão mostrados na tabela 24, a partir da qual foram traçados os gráficos respectivos de

log (F<sub>0</sub>-F/F) x log [rutina metilada] nas temperaturas de 296, 303 e 310K (Figuras 57-59), os quais permitiram a determinação dos valores de “K<sub>b</sub>” e “n” para o sistema ASB/rutina metilada a diferentes temperaturas (Tabela 25).

Tabela 24–Valores de log(F<sub>0</sub>-F/F) da ASB x log[rutina metilada] nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Log[Rutina Metilada]	Log(F <sub>0</sub> -F/F)		
	296K	303K	310K
-5,4	-1,1	-1,1	-1,1
-5,1	-0,8	-0,8	-0,8
-5,0	-0,6	-0,6	-0,6
-4,8	-0,5	-0,5	-0,5
-4,8	-0,4	-0,4	-0,3
-4,7	-0,3	-0,3	-0,2
-4,6	-0,2	-0,2	-0,2
-4,6	-0,1	-0,1	-0,1

T=296K

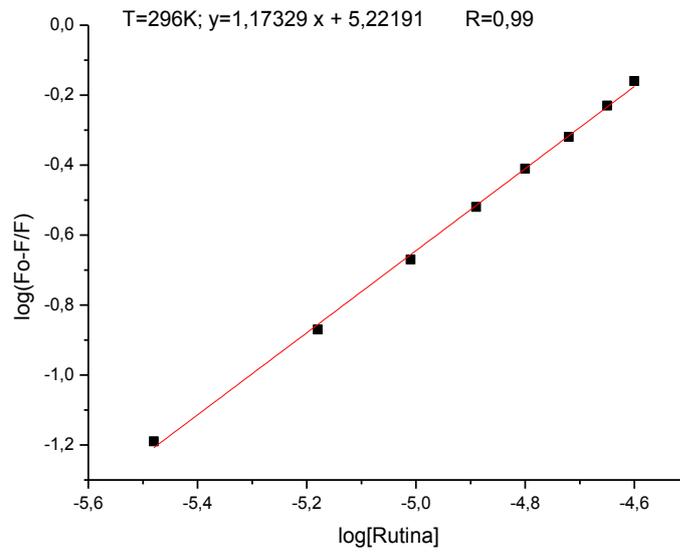


Figura 57- Gráfico de  $\log(F_o - F)/F$  para ASB x  $\log[\text{rutina metilada}]$ , a  $T=296\text{K}$

T=303K

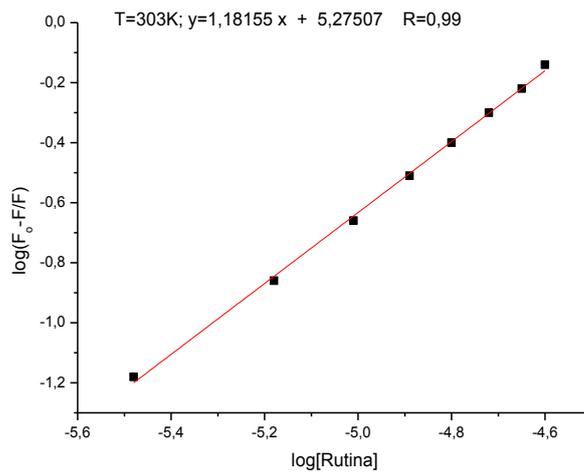


Figura 58- Gráfico de  $\log(F_o - F)/F$  para ASB x  $\log[\text{rutina metilada}]$ , a  $T=303\text{K}$

T=310 K

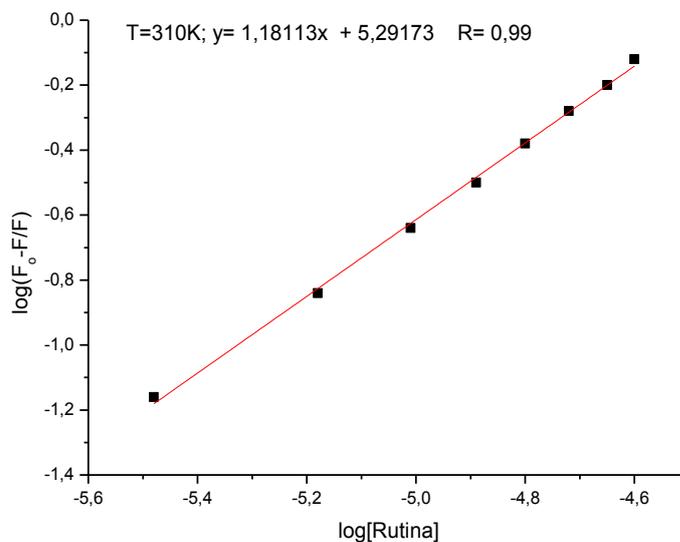


Figura 59- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log$ [rutina metilada], T=310K.

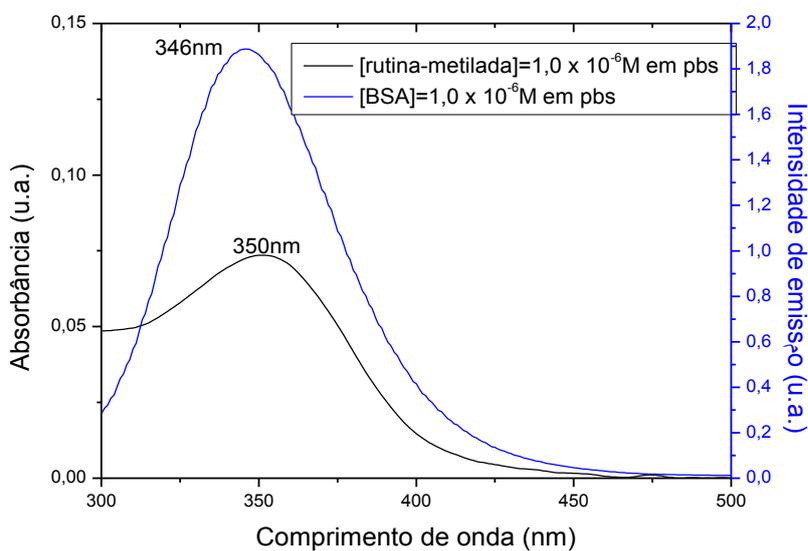
Tabela 25- Dados de  $K_b$  e  $n$  para o sistema ASB/rutina metilada nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Temperatura (K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ ) ( $L \cdot mol^{-1}$ )	Sítio de ligação ( $n$ )
296	$1,6 \times 10^5$	1,1
303	$1,7 \times 10^5$	1,1
310	$1,8 \times 10^5$	1,1

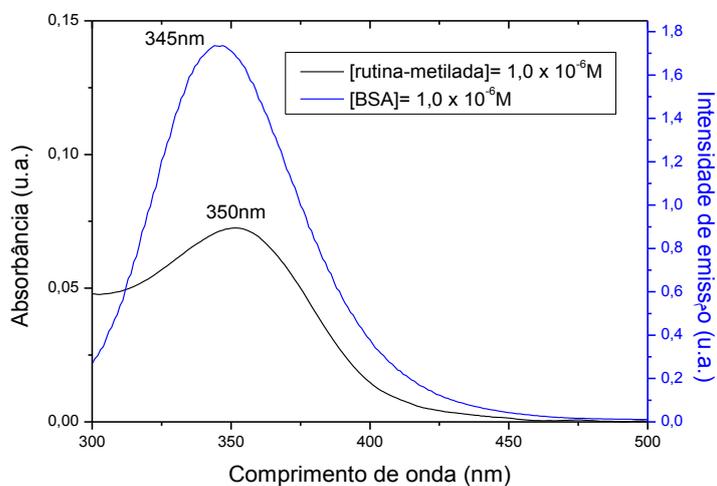
Os valores determinados para  $K_b$  e  $n$  mostram claramente que não há contribuição da temperatura sobre o comportamento da constante de velocidade de ligação efetiva, tendo em vista que a grandeza dos valores encontrados está na ordem de  $10^5$  nas diferentes temperaturas de 296, 303 e 310K. Quanto ao número de sítios de ligação, os valores obtidos demonstram haver um único sítio de interação ( $n=1$ ) no par ASB/rutina metilada, de maneira similar ao sistema ASB/rutina.

Os espectros de emissão de Fluorescência da ASB e de absorção para a rutina metilada estão apresentados nas Figuras 60.1, 60.2 e 60.3. A partir da sobreposição entre estes espectros e utilizando os mesmos parâmetros na ntegral de sobreposição(J) utilizados para a determinação do raio de Förster no sistema ASB/rutina foi determinada a influência ou não de um processo de transferência de energia tipo Förster (FRET) no sistema ASB/rutina metilada.

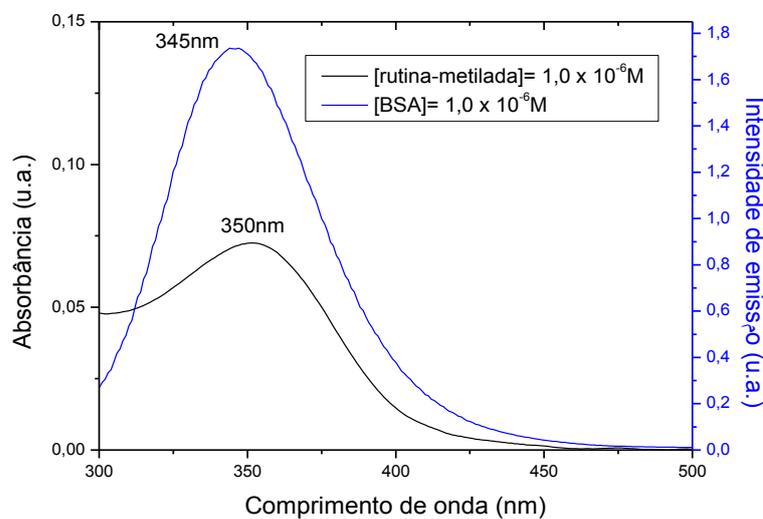
T=296K



T=303K



T=310K



Figuras 60.1, 60.2 e 60.3 - Sobreposição dos espectros de emissão de Fluorescência para ASB [ $1,00 \times 10^{-5}M$ ] e de Absorção para rutina metilada [ $1,00 \times 10^{-5}M$ ], nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

A partir da sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência para ASB e de absorção para rutina metilada. Empregando-se a equação da integral de sobreposição (equação 24) foi determinado o fator “J”, e utilizando-se as equações 25-27 foram calculados “ $R_o^6$ ”, “ $r^6$ ”, “R” e “r”, mostrados na Tabela 26, com esses dados sendo obtidos observando-se a relação de:  $\lambda$  em cm; e as seguintes constantes para a ASB:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$ . [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)].

Tabela 26- Valores de J,  $R_0^6$ ,  $r^6$ , R e r para o sistema ASB/rutina- metilada nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T(K)	J	$R_0^6$	E	$r^6$	$R_0(\text{cm})$	r(cm)
296	$8,39 \cdot 10^{-15}$	$9,87 \cdot 10^{-40}$	0,17831	$4,55 \cdot 10^{-39}$	$3,15 \cdot 10^{-7}$	$4,07 \cdot 10^{-7}$
303	$8,26 \cdot 10^{-15}$	$9,71 \cdot 10^{-40}$	0,17962	$4,44 \cdot 10^{-39}$	$3,14 \cdot 10^{-7}$	$4,05 \cdot 10^{-7}$
310	$8,18 \cdot 10^{-15}$	$9,62 \cdot 10^{-40}$	0,19523	$3,97 \cdot 10^{-39}$	$3,14 \cdot 10^{-7}$	$3,97 \cdot 10^{-7}$

A partir dos dados mostrados na tabela 26, duas importantes considerações devem ser feitas sobre a existência ou não de um mecanismo tipo “FRET” no processo de supressão de ASB pela rutina metilada. A primeira consideração é a de que dentro da variação de temperatura de trabalho, não houve contribuição da temperatura sobre um possível processo de transferência de energia por ressonância fluorescente. Por outro lado, os dados da tabela 26 indicam que a distância efetiva entre ASB e rutina metilada “r” foi igual a 4,0 nm nas três temperaturas, enquanto em relação ao raio de Förster “R” encontrou-se um valor de 3,12nm. Sendo assim, os valores superiores de “r” em relação a “R” indicam que a não existência de um efeito de “FRET” no fenômeno de supressão fluorescente no sistema ASB/rutina metilada tem pouca probabilidade de ocorrência.

Em conclusão, as determinações feitas a partir dos espectros de fluorescência do sistema ASB/rutina e ASB/rutina metilada, mostraram os seguintes resultados nas três temperaturas: em ambos os sistemas a supressão foi de natureza estática. ASB/rutina:  $k_q=8,4 \times 10^{12}$ ;  $9,0 \times 10^{12}$ ;  $1,0 \times 10^{12} \text{ L.mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; ASB/rutina metilada:  $k_q =2,9 \times 10^{12}$ ,  $3,0$

$\times 10^{12}$ ,  $3,1 \times 10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . As interações foram predominantemente hidrofóbicas: ASB/rutina:  $\Delta G^{\circ} = -26,09$ ;  $-27,7$  e  $-26,0 \text{ KJ}$ ;  $\Delta S^{\circ} = 0,1 \text{ KJ}$ ;  $\Delta H^{\circ} = 9,7 \text{ KJ}$  e ASB/rutina metilada:  $\Delta G^{\circ} = -20,6$ ;  $-21,6$  e  $-22,6 \text{ KJ}$ ;  $\Delta S^{\circ} = 0,14 \text{ KJ}$ ;  $\Delta H^{\circ} = 20,8 \text{ KJ}$ , apresentando somente um sítio de ligação, ou seja para ASB/rutina:  $n=1$  e para ASB/rutina metilada:  $n=1$ . Há probabilidade de ocorrência de efeito FRET nas temperaturas de 303 e 310K no sistema ASB/rutina, porém, na temperatura de 296K não há indicação de que para o sistema ASB/rutina metilada a transferência de energia por ressonância fluorescente deva ocorrer. Os resultados obtidos foram: sistema ASB/rutina-  $R_0 = 3,37 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,43 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=296\text{K}$ ;  $R_0 = 3,41 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,43 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=303\text{K}$ ;  $R_0 = 3,51 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,38 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=310\text{K}$ . Sistema ASB/rutina metilada:  $R_0 = 3,15 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 4,07 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=296\text{K}$ ;  $R_0 = 3,14 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 4,05 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=303\text{K}$ ;  $R_0 = 3,14 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,97 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=310\text{K}$ .

### **3.3 ASB x $\beta$ -lapachona**

#### **3.3.1 Dados de Absorção**

$\beta$ -Lapachona, em solução etanólica, apresenta absorções máximas no seu espectro de absorção na região do UV-vis, com bandas a 213(intensa), 257(intensa), 340(fraca) e 440 nm (fraca), como mostrado na Figura 61.

Por outro lado, como já mostrado anteriormente, o espectro de absorção para ASB em solução tampão de fosfato ( $\text{pH}=7,4$ ) demonstra a presença de três bandas de absorção com comprimentos de onda máximos a 230, 250 e 280nm, sendo que a banda de interesse para o nosso estudo corresponde à de absorção máxima em 280nm, referente ao resíduo do aminoácido triptofano. A adição de alíquotas da solução estoque de  $\beta$ -lapachona de concentração igual a  $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$  resultou em um aumento na absorbância deste cromóforo da ASB (efeito hipercrômico) devido à presença de interações do tipo ASB/ $\beta$ -lapachona na amostra. Nesse caso, na medida em que houve

um aumento da concentração da  $\beta$ -lapachona no meio, foi observado um aumento da probabilidade de transição para o resíduo de triptofano da ASB (Figura 62).

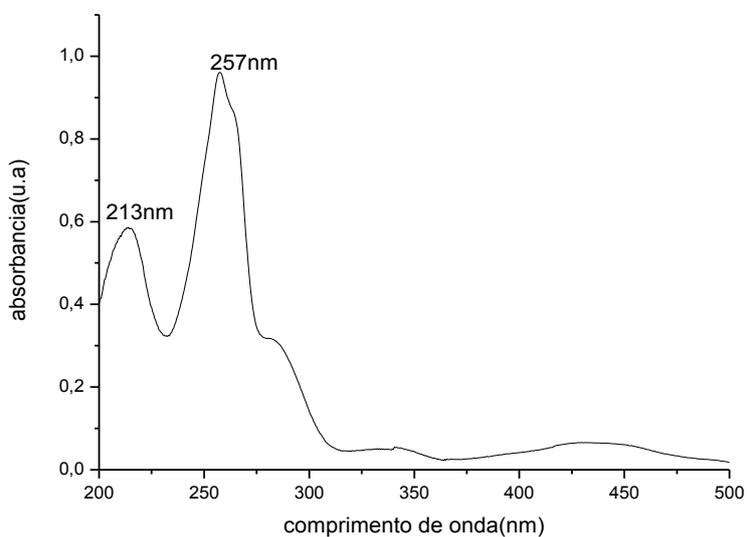


Figura 61- Espectro de absorção no UV-Vis para  $\beta$ -lapachona, em etanol, a  $T=298\text{K}$

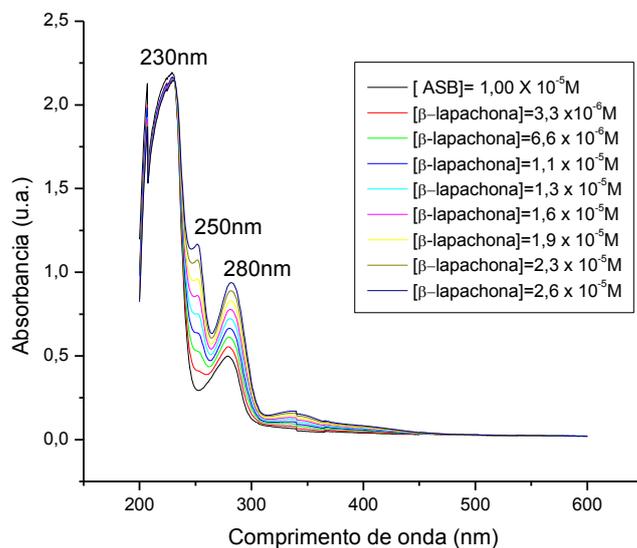


Figura 62- Espectro de Absorção no UV-Vis para ASB, em solução de tampão fosfato, em presença de concentrações variáveis de  $\beta$ -lapachona, a  $T=296\text{K}$

Observa-se que no sistema ASB/ $\beta$ -lapachona, diferentemente dos sistemas ASB/rutina e ASB/rutina metilada, não se observa um efeito de redução do comprimento de máxima absorção, para a transição a 280nm, demonstrando que a energia da transição eletrônica do resíduo triptofano não foi alterada pelas interações ASB/ $\beta$ -lapachona. Deve-se ressaltar que no espectro de absorção ASB/ $\beta$ -lapachona há a presença de bandas de absorção com máximos em 250nm e 340 nm resultantes da adição da  $\beta$ -lapachona no meio.

### 3.3.2 Dados de Dicroísmo circular

Os espectros de Dicroísmo Circular para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona, nas temperaturas de 296, 303 e 310K, estão mostrados nas Figuras 63-65. Ao observarmos a variação ocorrida em torno de 208 e 222nm no espectro de Dicroísmo Circular para este sistema, vê-se que as modificações na conformação planar da estrutura secundária da ASB por adição de alíquotas de  $\beta$ -lapachona foram acentuadas (Tabela 27).

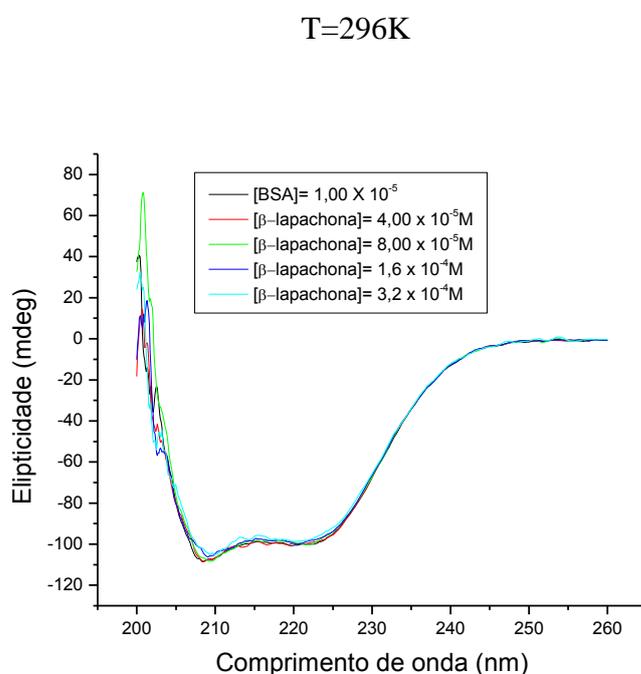


Figura 63- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de  $\beta$ -lapachona, a T=296K.

T=303K

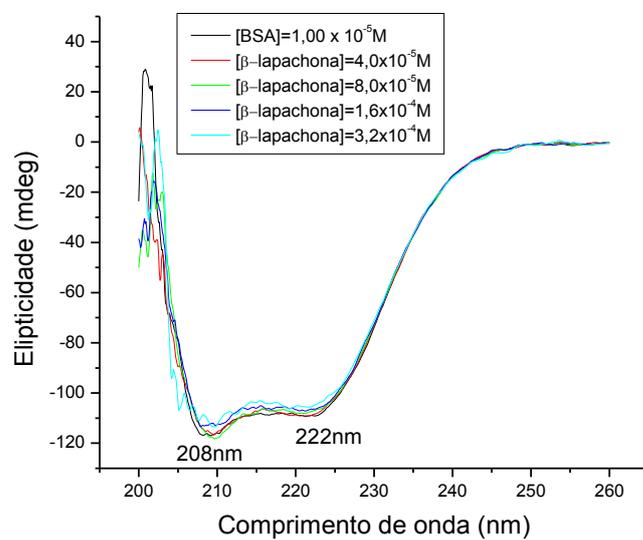


Figura 64- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de β-lapachona, a T=303K.

T=310K

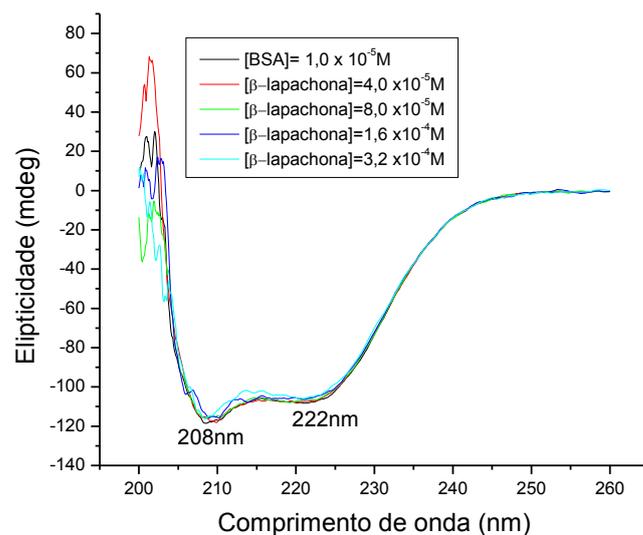


Figura 65- Espectro de Dicroísmo Circular para ASB em presença de concentrações variadas de β-lapachona, a T=310K.

Tabela 27- Valores de  $\alpha$ -hélice da ASB em presença de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
56,27977	54,37844	55,29565	54,05521	55,23877	53,36225
55,57294	54,34668	53,67164	54,00814	54,55978	53,0430
54,50942	54,04897	53,43287	53,18590	54,45906	52,72884
53,66690	53,29761	53,33156	52,61769	52,32255	52,13909
53,48975	52,59898	51,22349	52,08068	48,37125	51,77447

A partir da tabela 27, observa-se uma redução do ângulo- $\alpha$  da estrutura em  $\alpha$ -hélice presente na ASB em função do aumento da concentração de  $\beta$ -lapachona nas três diferentes temperaturas. Essas mudanças ocorridas nos valores do ângulo- $\alpha$  indicam alterações na conformação da estrutura secundária advindas de interações entre a ASB e  $\beta$ -lapachona. Essa redução do ângulo- $\alpha$  é acompanhado por uma redução da elipticidade residual da estrutura em  $\alpha$ -hélice da ASB.

Outra consideração que pode ser feita a partir destes dados é a de que a variação de temperatura não influenciou pronunciadamente os valores de  $\alpha$ -hélice, demonstrando que o efeito da temperatura não é um fator determinante nessa variação. No entanto, com o aumento da concentração de  $\beta$ -lapachona é acompanhado por uma significativa redução da elipticidade da estrutura em  $\alpha$ -hélice da ASB. Logo, o fator determinante na variação da  $\alpha$ -hélice da ASB é o aumento da concentração do ligante  $\beta$ -lapachona e não a temperatura, sobretudo a 208nm. Neste caso, considerando a variação da concentração

de  $\beta$ -lapachona (de 0 a  $3,2 \times 10^{-4}$  M), observou-se uma mudança sucessiva no valor de  $\alpha$ -hélice da ordem de  $3^\circ$  (296K),  $4^\circ$  (303K) e  $7^\circ$  (310K) (Tabela 27).

### **3.3.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário**

Os espectros de fluorescência para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona como uma função da adição de alíquotas de  $\beta$ -lapachona de concentração  $1,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, nas três diferentes temperaturas: 296, 303 e 310K, estão apresentados nas Figuras 66, 68 e 70. A partir dos espectros apresentados nesta figuras foram construídas as tabelas 28, 29 e 30 e os gráficos relativos às intensidades de emissão e a sua correlação com o comportamento fluorescente da macromolécula em função da presença do supressor ( $\beta$ -lapachona) (Figuras 67, 69 e 71). A partir destas figuras foram obtidos os valores das constantes  $K_{SV}$  e  $k_q$  nas diferentes temperaturas (Tabela 31).

Uma primeira determinação sobre o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona visou determinar o tipo de processo envolvido da interação, ou seja, se ele é dinâmico ou estático. Para isso, aplicando-se a equação de Stern-Volmer (Equação 19), foi observado o comportamento da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T=296K

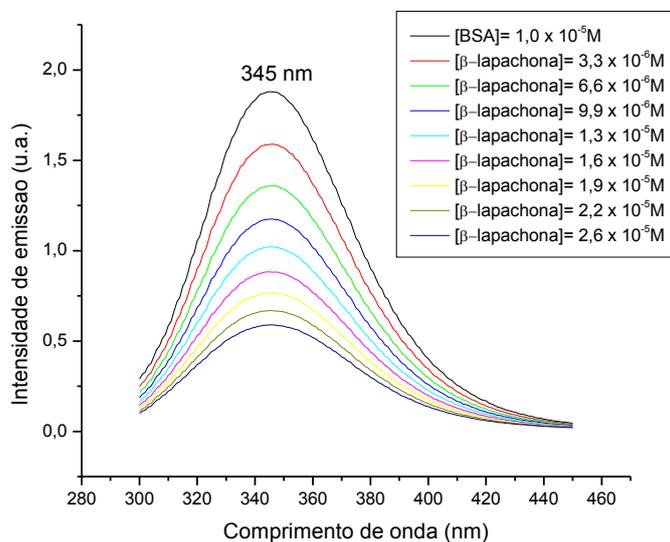


Figura 66- Espectros de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona, a T=296K.

Tabela 28- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona em T=296K

$[\beta\text{-lapachona}]$	$F_0/F$
$3,3 \times 10^{-6}\text{M}$	1,09
$6,6 \times 10^{-6}\text{M}$	1,20
$9,9 \times 10^{-6}\text{M}$	1,32
$1,3 \times 10^{-5}\text{M}$	1,45
$1,6 \times 10^{-5}\text{M}$	1,59
$1,9 \times 10^{-5}\text{M}$	1,76
$2,3 \times 10^{-5}\text{M}$	1,91
$2,6 \times 10^{-5}\text{M}$	2,10

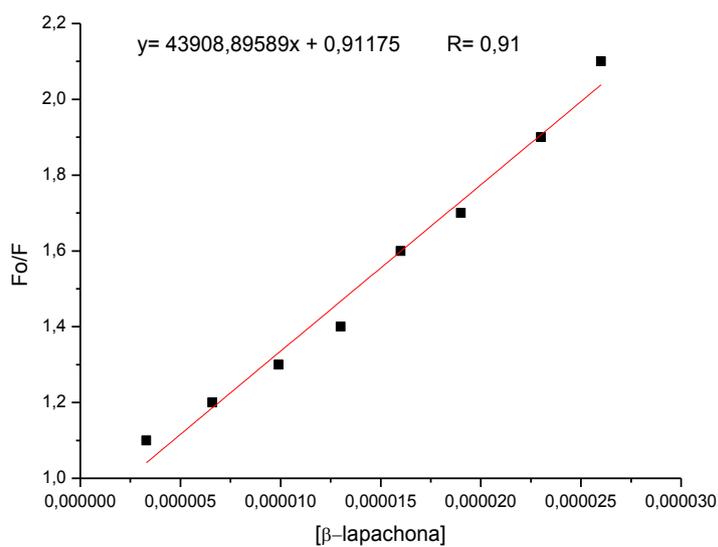


Figura 67- Gráfico de  $F_o/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona, a  $T=296\text{K}$

$T=303\text{K}$

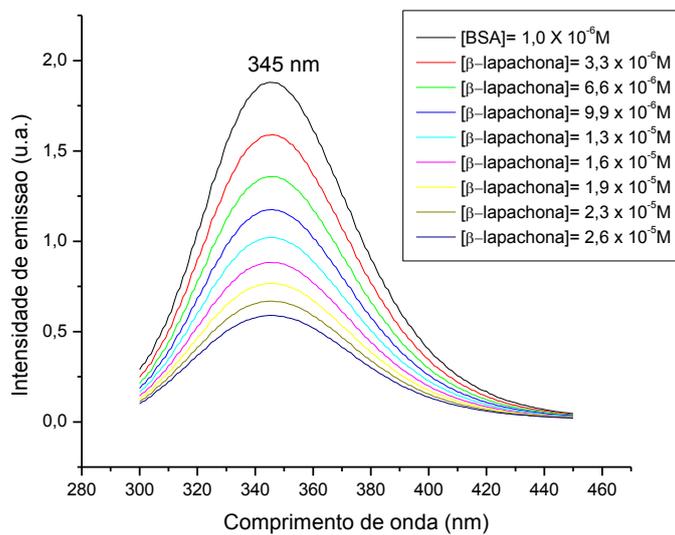


Figura 68 - Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona, a  $T=303\text{K}$

Tabela 29- Valores de  $F_0/F$  para a ASB após adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona em  $T=303K$ .

$[\beta\text{-lapachona}]$	$F_0/F$
$3,3 \times 10^{-6}M$	1,10
$6,6 \times 10^{-6}M$	1,20
$9,9 \times 10^{-6}M$	1,33
$1,3 \times 10^{-5}M$	1,46
$1,6 \times 10^{-5}M$	1,59
$1,9 \times 10^{-5}M$	1,75
$2,3 \times 10^{-5}M$	1,91
$2,6 \times 10^{-5}M$	2,07

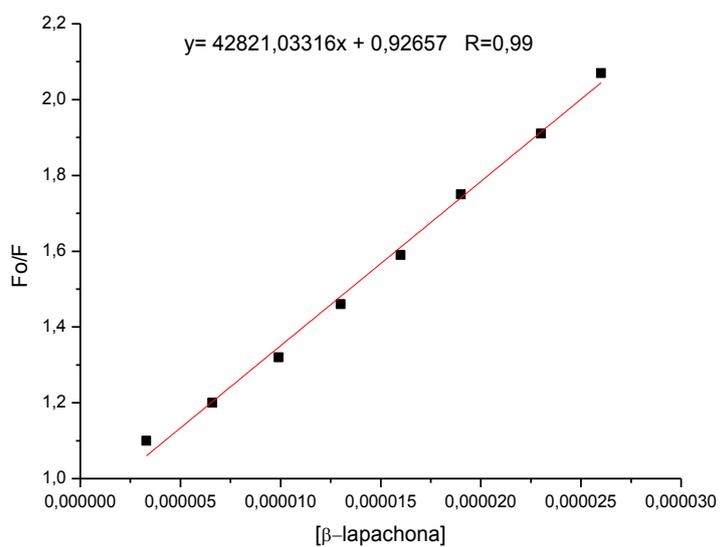


Figura 69- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona, a  $T=303K$

T=310K

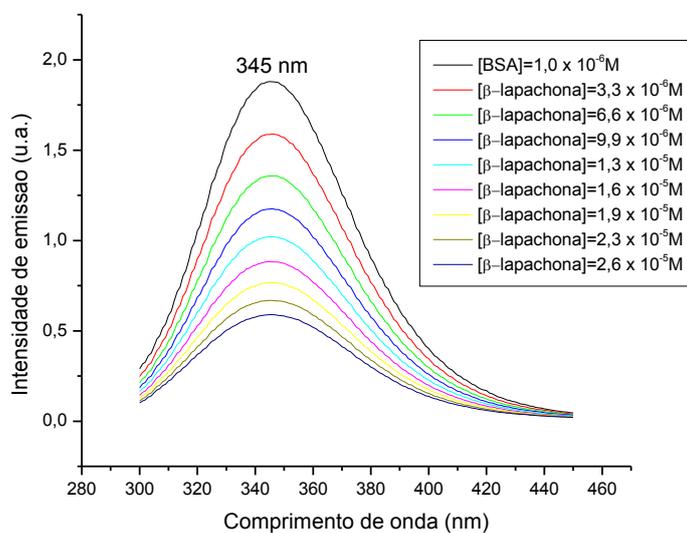


Figura 70- Espectros de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona, a T=310K.

Tabela 30- Dados de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de  $\beta$ -lapachona em T=310K.

$[\beta\text{-lapachona}]$	$F_0/F$
$3,3 \times 10^{-6}\text{M}$	1,11
$6,6 \times 10^{-6}\text{M}$	1,22
$9,9 \times 10^{-6}\text{M}$	1,36
$1,3 \times 10^{-5}\text{M}$	1,50
$1,6 \times 10^{-5}\text{M}$	1,64
$1,9 \times 10^{-5}\text{M}$	1,80
$2,3 \times 10^{-5}\text{M}$	1,98
$2,6 \times 10^{-5}\text{M}$	2,15

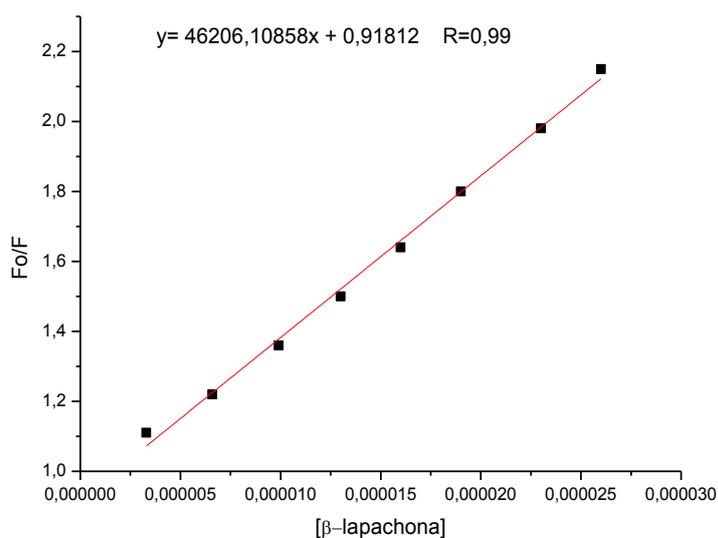


Figura 71- Gráfico de Fo/F para a ASB após a adição de diferentes concentrações de β-lapachona, a T=310K

A partir dos gráficos mostrados nas Figuras 67, 69 e 71, e empregando-se a equação 19, foram determinados os valores das constantes  $K_{sv}$  e  $k_q$  que vão mostradas na tabela 31.

Tabela 31- Valores de T(K),  $K_{sv}$  e  $k_q$  para o sistema ASB/β-lapachona em diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	Constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) $L.mol^{-1}$	Constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ). $L.mol^{-1}.s^{-1}$
296	$4,4 \times 10^4$	$4,4 \times 10^{12}$
303	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{12}$
310	$4,6 \times 10^4$	$4,6 \times 10^{12}$

A ordem de grandeza da constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ) nas temperaturas estudadas, quando comparada à constante de velocidade de difusão em meio aquoso ( $k_{dif} \cong 5 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ), nos leva a concluir que o processo de supressão ASB/ $\beta$ -lapachona é estático, uma vez que a constante de velocidade de supressão da fluorescência ( $k_q$ ) é  $10^3$  superior a  $k_{dif}$ . Além disto, pode-se afirmar, a partir dos dados da tabela 31, que  $k_q$  é independente da variação de temperatura utilizada.

A constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), nas temperaturas de 296, 303 e 310K, foi obtida por meio dos gráficos de Stern-Volmer modificados, empregando-se a equação 20. A tabela 32 apresenta os dados obtidos para  $F_0/F_0-F$  no sistema ASB x  $1/[\beta$ -lapachona] nas temperaturas de 296, 303 e 310K e, com base nestes valores, foram construídos os gráficos mostrados nas Figuras 72, 73 e 74.

Tabela 32- Valores de  $F_0/F_0-F$  para ASB x  $1/[\beta$ -lapachona] em diferentes temperaturas.

1/[ASB+ $\beta$ -lapachona]	$F_0/F_0-F$		
	296	303	310
$3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	1,8	1,8	1,8
$4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	2,1	2,1	2,0
$5,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	2,3	2,3	2,2
$6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	2,6	2,6	2,5
$7,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	3,2	3,2	3,0
$1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	4,0	3,9	3,8
$1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	5,7	5,6	5,3
$3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	11,0	10,6	9,8

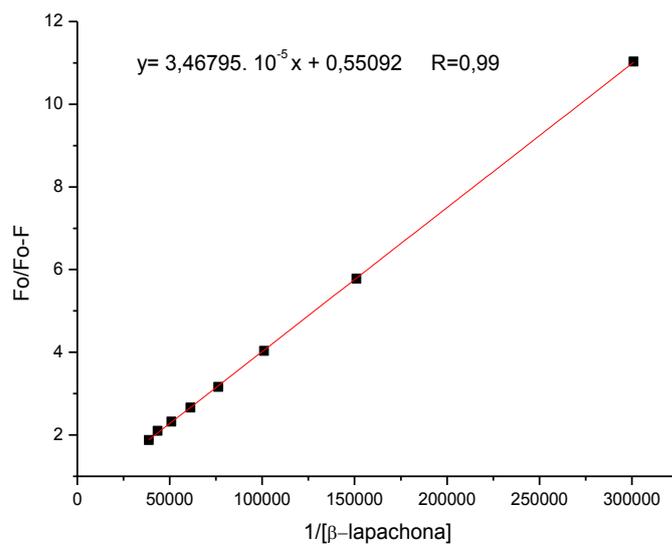


Figura 72- Gráfico de  $Fo/Fo-F$  para ASB x  $1/[\beta\text{-lapachona}]$ , a  $T=296K$ .

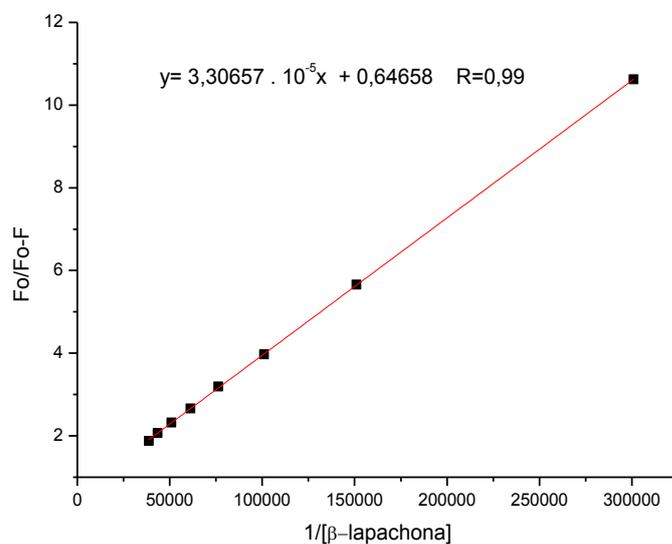


Figura 73- Gráfico de  $Fo/Fo-F$  para ASB x  $1/[\beta\text{-lapachona}]$ , a  $T=303K$ .

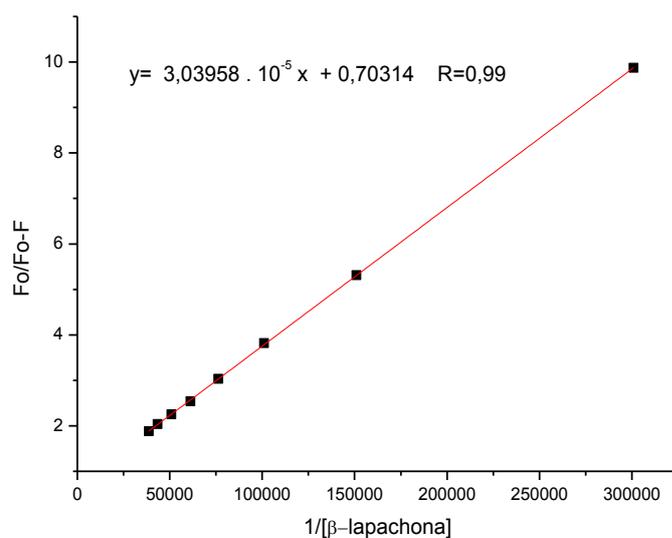


Figura 74- Gráfico de  $F_o/F_o-F$  para ASB x  $1/[\beta\text{-lapachona}]$ ,  $T=310\text{K}$ .

Com base nos valores de  $K_a$  obtidos dos gráficos de Stern-Volmer modificados apresentados nas Figuras 72 a 74, pode-se construir a tabela 33. Em função dos valores mostrados nesta tabela foi obtido o gráfico mostrado na Figura 75.

Tabela 33- Valores de  $1/T \times \ln K_a$  para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona em diferentes temperaturas.

T(K)	$K_a$	$1/T$	$\ln K_a$
296	$1,58 \times 10^4$	$3,37 \times 10^{-3}$	9,67
303	$1,95 \times 10^4$	$3,30 \times 10^{-3}$	9,88
310	$2,29 \times 10^4$	$3,22 \times 10^{-3}$	10,04

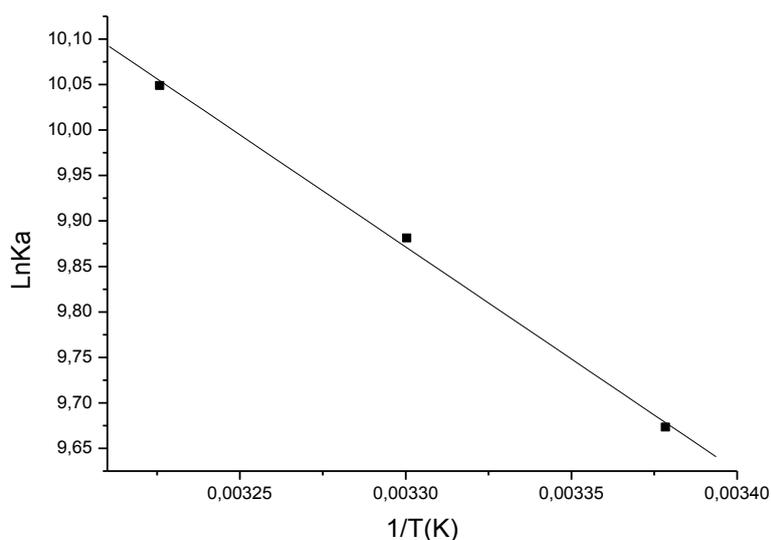


Figura 75- Gráfico de  $\ln K_a \times 1/T$  para ASB/ $\beta$ -lapachona.

Utilizando a equação de Vant'Hoff (equação 21), a partir da Figura 75 foram obtidos os valores de  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  (Tabela 34), assim como o de  $\Delta G^0$  (equação 22), os quais podem indicar o tipo de interação predominante que está presente na formação do par ASB/ $\beta$ -lapachona. Neste caso, o valor utilizado para a constante universal dos gases foi de  $R = 8,31 \text{ J.mol/K}$ .

Tabela 34- Valores de  $T(K)$ ,  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona.

pH	T(K)	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$
7,4	296	-23,8Kj	0,15Kj	20,5Kj
7,4	303	-24,8Kj		
7,4	310	-25,9Kj		

Os valores de  $\Delta G^0 < 0$  indicam uma espontaneidade para a interação entre ASB e  $\beta$ -lapachona, com os valores de  $\Delta H^0 > 0$  e  $\Delta S^0 > 0$  indicando interações predominantemente hidrofóbicas.

A seguir, está apresentada a tabela 35 com os valores de  $\log[\beta\text{-lapachona}] \times \log(F_0-F/F)$  nas três temperaturas estudadas, os quais permitiram obter os gráficos mostrados nas Figuras 76-78. Para isso, foi utilizada a equação 23, que permite a obtenção do número de sítios de ligação entre a macromolécula e o ligante, além da constante de ligação efetiva.

Tabela 35 –Valores de  $\log(F_0-F/F)$  para ASB x  $\log[\beta\text{-lapachona}]$  nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Log[ $\beta\text{-lapachona}$ ]	Log( $F_0-F/F$ )		
	296K	303K	310K
-5,47	-1,00	-0,97	-0,95
-5,17	-0,68	-0,66	-0,63
-5,00	-0,48	-0,46	-0,44
-4,88	-0,33	-0,33	-0,30
-4,78	-0,22	-0,21	-0,18
-4,70	-0,11	-0,11	-0,09
-4,63	-0,04	-0,04	-0,01
-4,58	0,04	0,03	0,06

T=296K

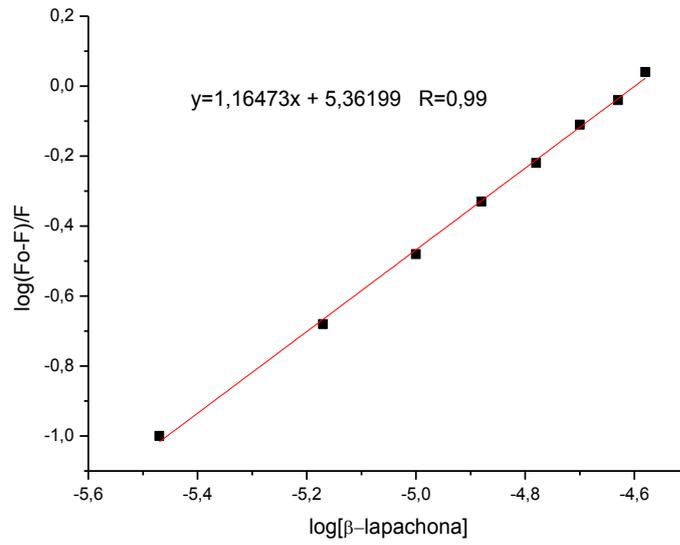


Figura 76 - Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[\beta\text{-lapachona}]$ , a  $T=296\text{K}$

T=303K

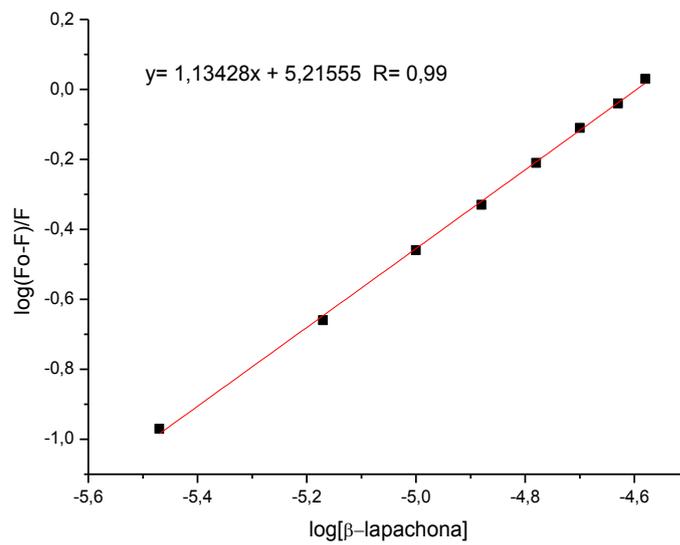


Figura 77- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[\beta\text{-lapachona}]$ , a  $T=303\text{K}$

T=310K

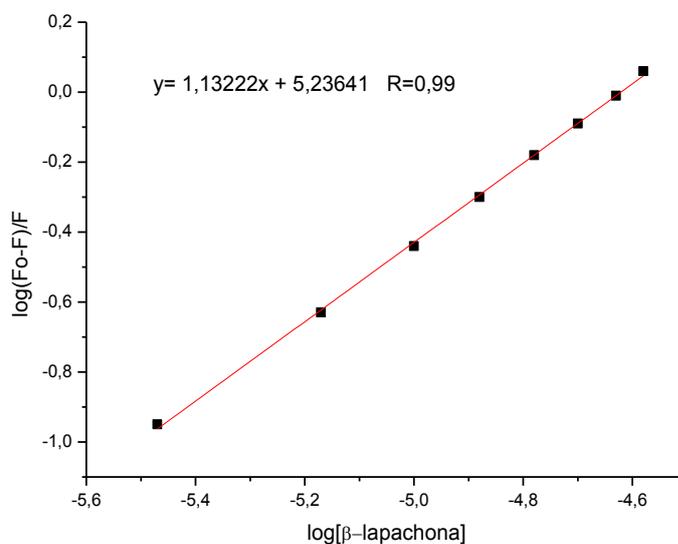


Figura 78- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[\beta\text{-lapachona}]$ , a T=310K

A partir das Figuras 76 a 78 foram determinados os valores de “ $K_b$ ” e “ $n$ ” nas temperaturas de 296, 303 e 310K, os quais vão mostrados na Tabela 36.

Tabela 36- Dados de  $K_b$  e  $n$  para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

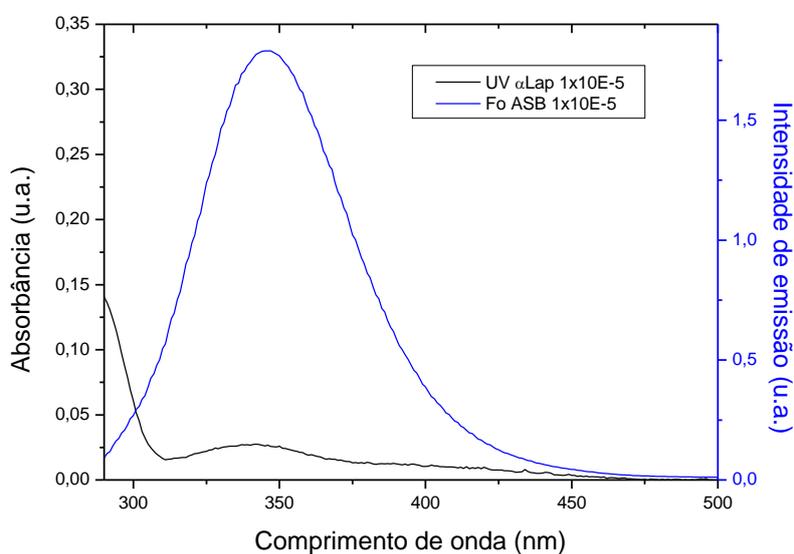
Temperatura (K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ )	Sítio de ligação ( $n$ )
296	$2,3 \times 10^5$	1,1
303	$1,6 \times 10^5$	1,1
310	$1,7 \times 10^5$	1,1

Os valores determinados para  $K_b$  e  $n$  mostra que não há contribuição da temperatura sobre o comportamento da constante de velocidade de ligação efetiva, tendo em vista que a magnitude dos valores encontrados está na ordem de  $10^5$  nas diferentes temperaturas utilizadas, demonstrando a não variação da mesma. Este

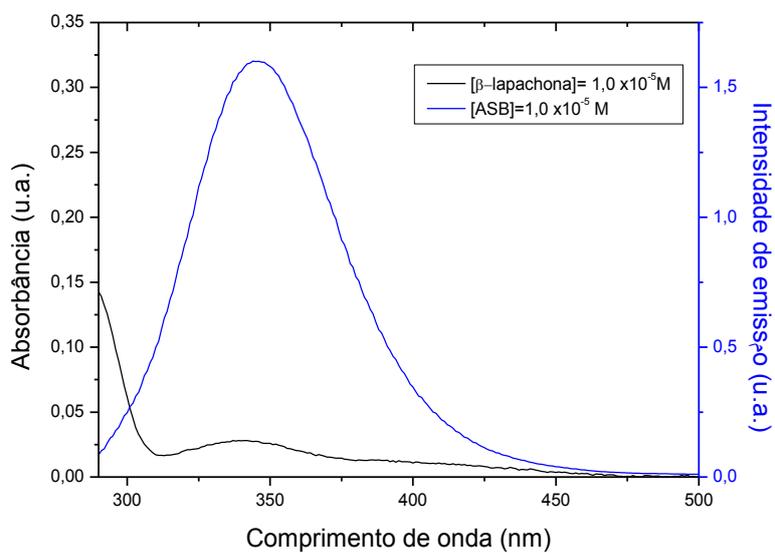
comportamento já tinha sido observado quando da determinação da constante de velocidade de supressão  $k_q$ . Quanto ao número de sítios de ligação, os valores obtidos demonstram haver um único sítio de interação ( $n=1$ ) entre a ASB e a  $\beta$ -lapachona. Um aspecto interessante a ser considerado é que, mesmo a ASB tendo dois resíduos de triptofano [Peters 1985] na sua estrutura secundária, há a indicação de um único ponto de interação a partir dos dados obtidos para o sistema em estudo.

A sobreposição dos espectros de emissão da fluorescência para ASB e de absorção eletrônica para  $\beta$ -lapachona, nas temperaturas de 296, 303 e 310K, vão apresentados abaixo (Figura 79.1, 79.2 e 79.3), a partir das quais alguns parâmetros puderam ser obtidos, os quais foram utilizados para a determinação do raio de Förster para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona.

T=296K



T=303K



T=310K

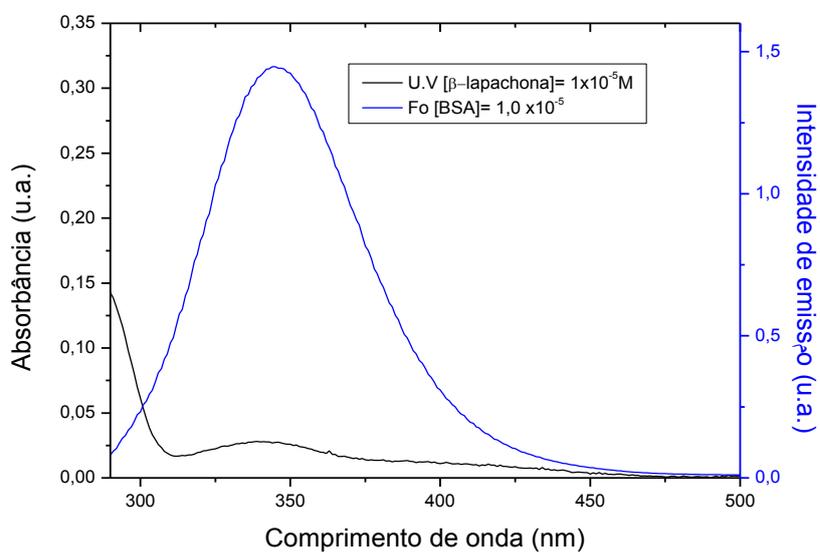


Figura 79.1, 79.2 e 79.3- Sobreposição entre os espectros emissão de Fluorescência para  $[\text{ASB}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  e de Absorção para  $[\beta\text{-lapachona}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$  nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

A partir da sobreposição dos espectros, e ao aplicarmos a equação da integral de sobreposição (equação 24), foi determinado o fator “J”, enquanto que na obtenção de “ $R_0^6$ ”, “ $r^6$ ”, “R” e “r” empregou-se as equações 25-27 ( $\lambda$  em cm, e os seguintes parâmetros para a ASB:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$ ) [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)], os quais vão mostrados na Tabela 37.

Tabela 37- Valores de J,  $R_0^6$ ,  $r^6$ , R e r para o sistema ASB/ $\beta$ -lapachona nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T	J	$R_0^6$	E	$R^6$	$R_0(\text{cm})$	$r(\text{cm})$
296K	$3,06 \cdot 10^{-15}$	$3,06 \cdot 10^{-40}$	0,26147	$1,02 \cdot 10^{-39}$	$2,66 \cdot 10^{-7}$	$3,17 \cdot 10^{-7}$
303K	$3,15 \cdot 10^{-15}$	$3,71 \cdot 10^{-40}$	0,251485	$1,10 \cdot 10^{-39}$	$2,68 \cdot 10^{-7}$	$3,21 \cdot 10^{-7}$
310K	$3,16 \cdot 10^{-15}$	$3,72 \cdot 10^{-40}$	0,249948	$1,12 \cdot 10^{-39}$	$2,68 \cdot 10^{-7}$	$3,22 \cdot 10^{-7}$

A primeira consideração é a de que dentro da variação de temperatura empregada, ou seja, 296, 303 e 310K, não houve contribuição da temperatura sobre um possível processo de “FRET”. A segunda consideração que podemos ter a partir da tabela 37 é de que a distância efetiva entre ASB e  $\beta$ -lapachona “ $r_0$ ” foi igual a 3,2 nm nas três temperaturas, enquanto em relação ao raio de Foster “ $R_0$ ” teve valor de 2,6nm. Sendo assim, os valores superiores de “r” em relação a “R”, indicam que a existência de efeito de “FRET” no fenômeno de supressão fluorescente no sistema ASB/ $\beta$ -lapachona tem pouca probabilidade de ocorrência.

### 3.4 ASB x 3-Ácido $\beta$ -lapachona-sulfônico

#### 3.4.1 Dados de Absorção

Similarmente ao sistema ASB/ $\beta$ -lapachona, o espectro de absorção para ASB em solução tampão de fosfato, após sucessivas adições de alíquotas do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico demonstra a presença de três bandas de absorção com comprimentos de onda máximos de 230, 250 e 280nm. Observa-se, em todo o espectro, um aumento da absorbância em função do aumento da concentração do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico (Figura 80). As bandas de absorção a 230 e 280nm são relativas à ASB, sobre as quais se observa claramente um efeito hipercrômico após a adição de alíquotas do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico. Este efeito pode estar associado a um aumento das interações do tipo ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico, as quais devem favorecer a probabilidade da transição do cromóforo, sobretudo a 280nm. A nova absorção, observada a 250nm, ausente no espectro da ASB livre, se apresenta na medida em que são adicionadas alíquotas de 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, e deve ser devida ao 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, que apresenta absorções na região do UV-visível com máximos a 213, 257, 290, 340 e 440 nm, com diferentes intensidades (Figura 81)

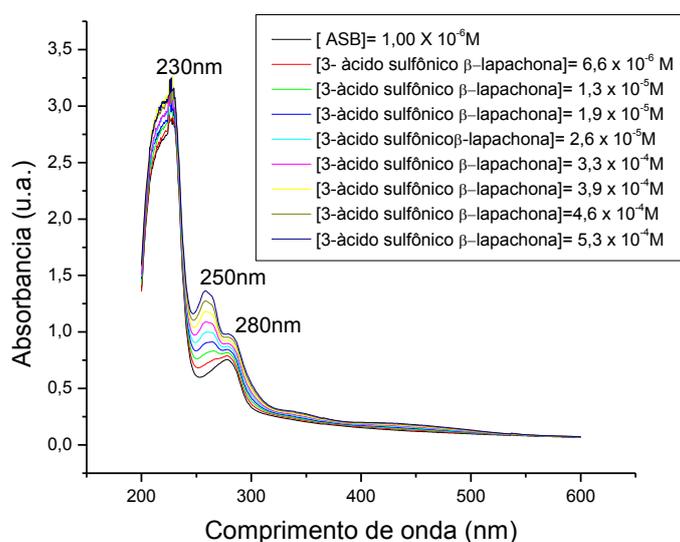


Figura 80- Espectro de Absorção para ASB em presença de concentrações variadas do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a T=296K

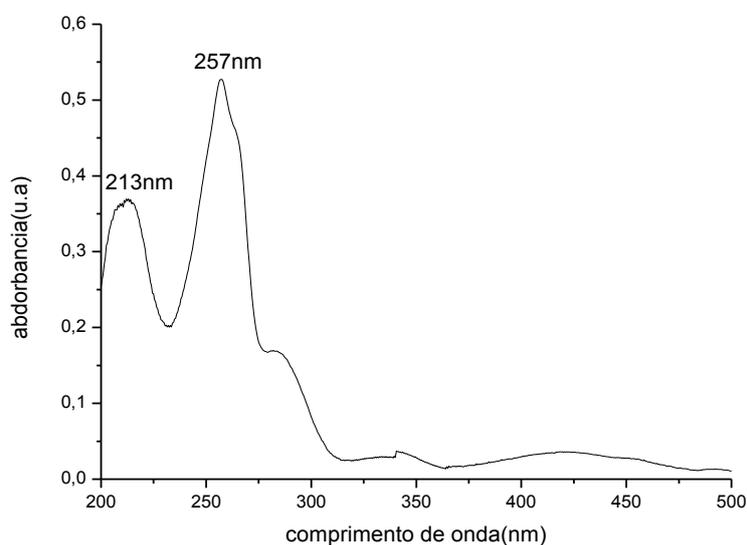


Figura 81- Espectro de absorção para o ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico, em EtOH, a T=298K

É interessante se notar que para o efeito observado sobre o espectro de absorção de ASB foram empregadas alíquotas de maior concentração para o 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, quando comparadas àquelas para  $\beta$ -lapachona, o que nos leva a concluir que as interações entre ASB e 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico devem ser menos efetivas, no sentido da redução da probabilidade de transição do cromóforo a 280nm, esta diferença de comportamento pode estar associada à acidez do grupo  $-\text{SO}_3\text{H}$  no 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico.

### 3.4.2 Dados de Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular para o sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico vão mostrados nas Figuras 82, 83 e 84. A variação ocorrida nos espectros em torno de 208 e 222nm indica a existência de modificação na conformação planar da estrutura secundária da ASB, conforme mostrado na Tabela 38.

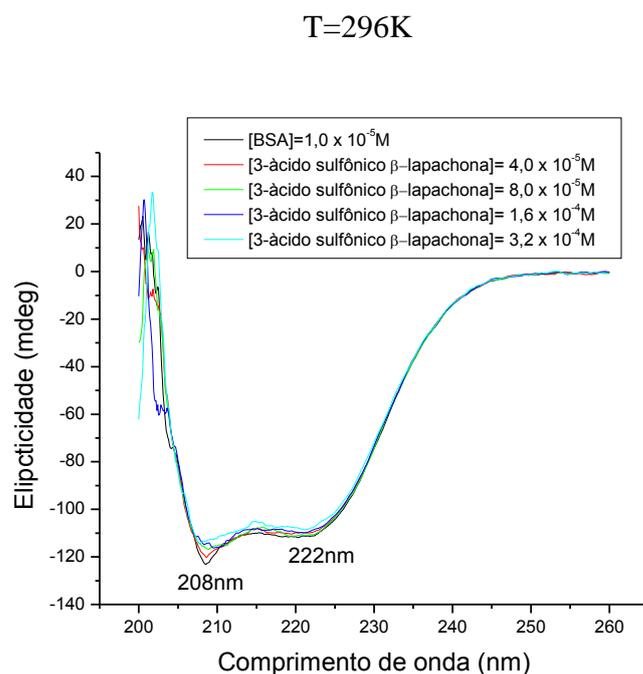


Figura 82- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em presença de concentrações variadas de 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a T=296K

T=303K

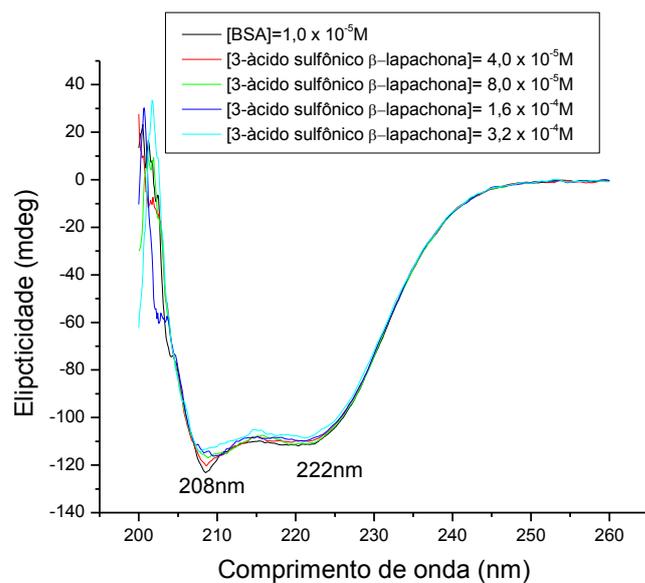


Figura 83- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em presença de concentrações variadas de 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a T=303K

T=310K

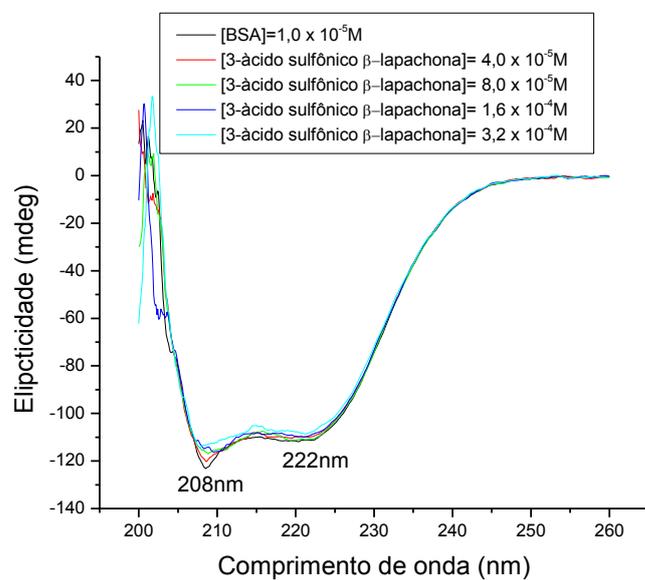


Figura 84- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB em presença de concentrações variadas de 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a T=310K

Tabela 38- Valores de  $\alpha$ -hélice da ASB em presença de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
57,63301	55,32714	55,41059	54,72208	54,88328	53,29988
56,32836	55,00958	55,20500	54,05294	54,29494	53,00103
54,40396	54,50773	54,44780	53,55390	52,92689	52,69085
53,81680	54,06258	52,26152	53,13429	52,90793	52,59671
53,50930	53,40535	50,75187	52,03475	51,66963	51,79998

A tabela 38 mostra a existência de uma redução do ângulo- $\alpha$  da estrutura em  $\alpha$ -hélice presente na ASB em função do aumento da concentração do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico nas três diferentes temperaturas (Equação 13). Essas mudanças ocorridas nos valores do ângulo- $\alpha$  indicam alterações na conformação da estrutura secundária advindas de interações entre a ASB e o 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico. Essa redução do ângulo- $\alpha$  é acompanhado por um efeito redutor da elipticidade residual da estrutura em  $\alpha$ -hélice da ASB.

Outra consideração que pode ser feita a partir dos dados obtidos é a de que a variação de temperatura não influenciou pronunciadamente os valores de  $\alpha$ -hélice, demonstrando que a variação da temperatura não é um fator determinante sobre esses valores. No entanto, para cada temperatura, o aumento da concentração de 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico é acompanhado por uma redução significativa da elipticidade da estrutura em  $\alpha$ -hélice da ASB, sobretudo em 208nm. O fator determinante na variação da  $\alpha$ -hélice da ASB é devido ao aumento de concentração do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-

sulfônico e não do fator temperatura. Neste caso, considerando a variação da concentração de 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico (de 0 a  $3,2 \times 10^{-4}$  M) observou-se uma mudança sucessiva no valor de  $\alpha$ -hélice da ordem de 4° (296K), 5° (303K) e 3° (310K) (Tabela 38).

O fator temperatura, da mesma forma que nos sistemas ASB/rutina e ASB/rutina metilada, não é o principal fator responsável pelas modificações ocorridas na estrutura secundária da ASB a partir da adição de alíquotas  $\beta$ -lapachona e 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico. As modificações ocorridas em relação à estrutura em  $\alpha$ -hélice estão associadas ao aumento da concentração do ligante, considerando a faixa de concentração entre 33 a 44  $\mu$ M nas três temperaturas estudadas. Outra conclusão é a de que as modificações ocorridas nos comprimentos de onda de absorção máxima relativa à transição do cromóforo, isto é 208 e 222nm, responderam com uma menor variação do valor de  $\alpha$ -hélice em relação ao ocorrido nos sistemas ASB/rutina e ASB/rutina metilada. Percebe-se também que a transição ocorrida em 208nm não foi fortemente influenciada com a adição das  $\beta$ -lapachonas, quando comparados com ligantes rutínicos, o que de certo modo é indicativo de que as interações ASB/ $\beta$ -lapachonas são menores que às dos sistemas ASB/rutinas do ponto de vista da disposição planar da estrutura em  $\alpha$ -hélice da ASB em relação ao cromóforo triptofano, ao qual estão associadas essas bandas com máximo da absorção de 208 e 228nm no espectro de Dicroísmo circular.

### 3.4.3. Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário

Os espectros de fluorescência e sua análise para o sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico estão apresentados nas Figuras 85, 87 e 89, a três diferentes temperaturas: 296, 303 e 310K, respectivamente. A partir dos dados obtidos a partir dos espectros apresentados nestas figuras foram construídas as tabelas 39, 40 e 41 e, a partir da equação de Stern-Volmer (Equação 19), os respectivos gráficos de Stern-Volmer (Figuras 86, 88 e 90).

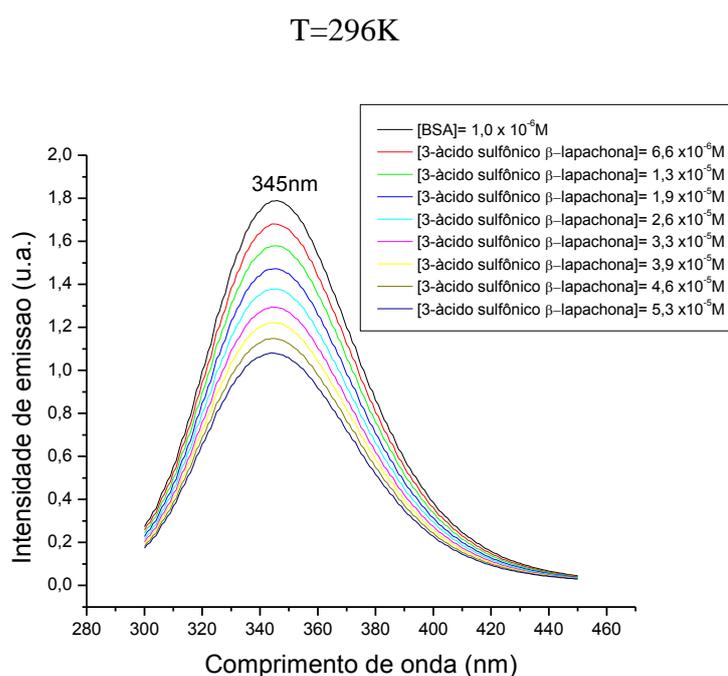


Figura 85- Espectro de Fluorescência para ASB após a adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a T=296K

Tabela 39- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico em T=296K

[ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico]	F <sub>0</sub> /F
6,6x 10 <sup>-6</sup> M	1,06
1,3 x 10 <sup>-5</sup> M	1,13
1,9 x 10 <sup>-5</sup> M	1,20
2,6 x 10 <sup>-5</sup> M	1,28
3,3 x 10 <sup>-5</sup> M	1,37
3,9 x 10 <sup>-5</sup> M	1,45
4,6 x 10 <sup>-5</sup> M	1,54
5,3 x 10 <sup>-5</sup> M	1,63

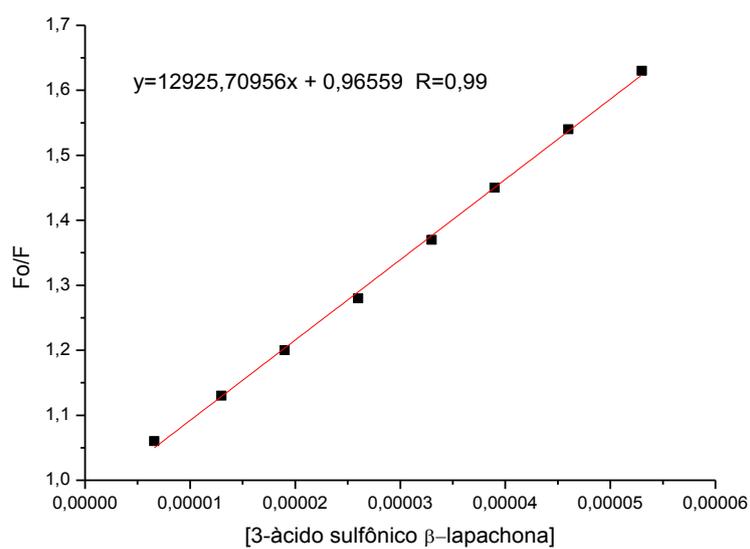


Figura 86 - Gráfico de F<sub>0</sub>/F para a ASB após a adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a T=296K

T=303K

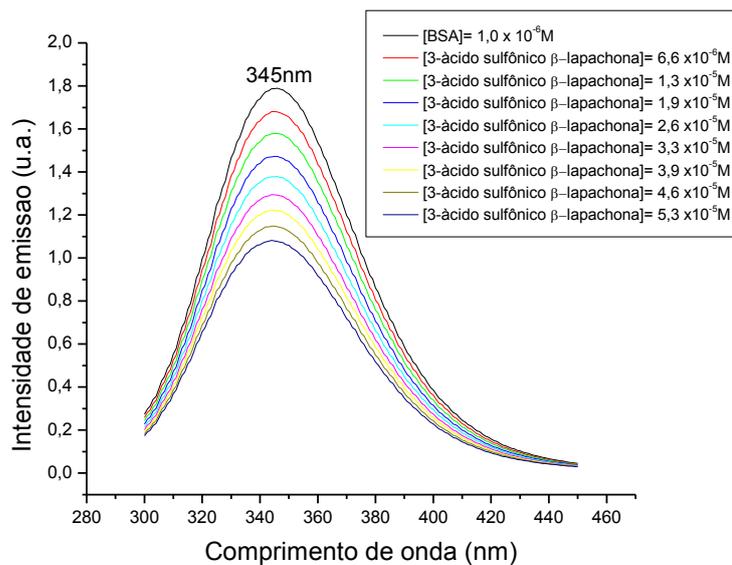


Figura 87 - Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações do 3-Ácido β-lapachona-sulfônico, a T=303K

Tabela 40- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações do 3-Ácido β-lapachona-sulfônico em T=303K.

[ácido β-lapachona-3-sulfônico]	$F_0/F$
$6,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,06
$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$	1,13
$1,9 \times 10^{-5} \text{M}$	1,22
$2,6 \times 10^{-5} \text{M}$	1,30
$3,3 \times 10^{-5} \text{M}$	1,38
$3,9 \times 10^{-5} \text{M}$	1,47
$4,6 \times 10^{-5} \text{M}$	1,57
$5,3 \times 10^{-5} \text{M}$	1,67

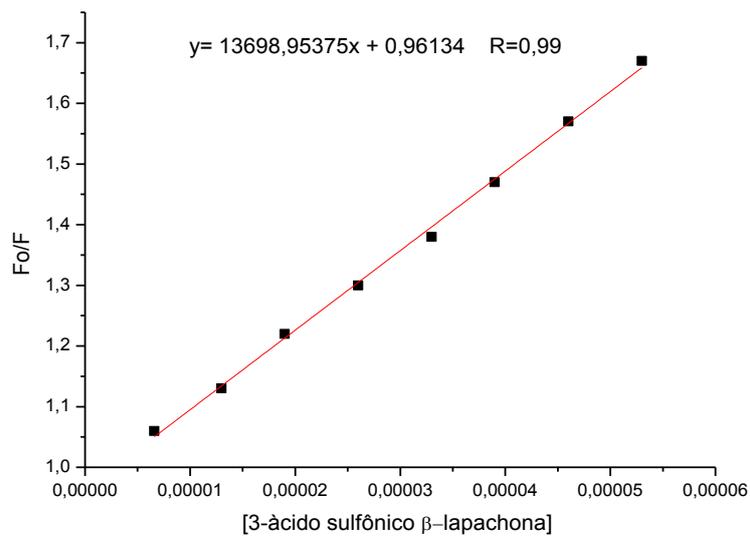


Figura 88- Gráfico de  $F_o/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a  $T=303K$

$T=310K$

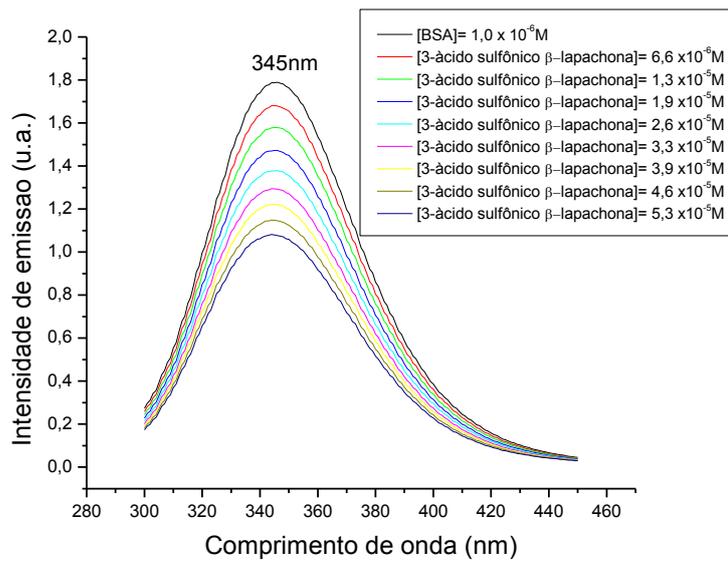


Figura 89- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a  $T=310K$ .

Tabela 41- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico em  $T=303K$

[ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico]	$F_0/F$
$6,6 \times 10^{-6}M$	1,07
$1,3 \times 10^{-5}M$	1,15
$1,9 \times 10^{-5}M$	1,23
$2,6 \times 10^{-5}M$	1,33
$3,3 \times 10^{-4}M$	1,42
$3,9 \times 10^{-4}M$	1,52
$4,6 \times 10^{-4}M$	1,63
$5,3 \times 10^{-4}M$	1,74

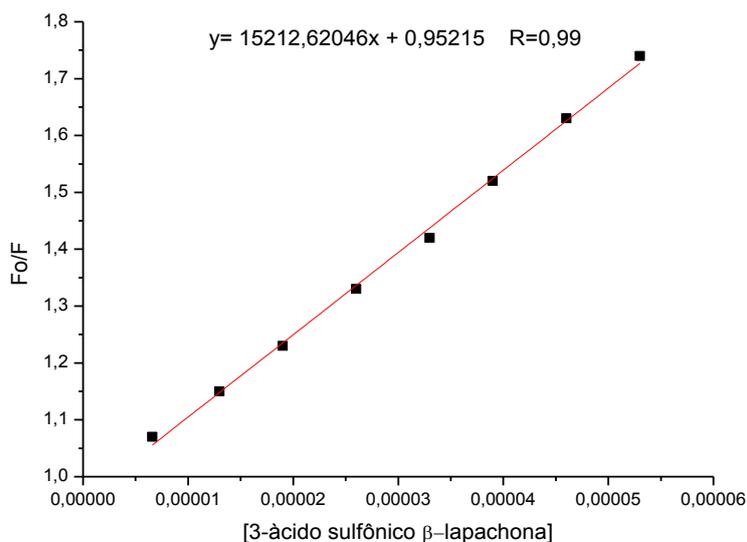


Figura 90 – Gráfico de  $F_0/F$  da ASB após a adição de diferentes concentrações do 3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, a  $T=310K$

A partir dos gráficos mostrados nas Figuras 86, 88 e 90 foram determinados os valores para a constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e para a constante de velocidade de supressão de fluorescência ( $k_q$ ), nas diferentes temperaturas empregadas, as quais vão mostradas na tabela 42.

Tabela 42- Valores de T(K),  $K_{SV}$  e  $k_q$  para o sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico em diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	Constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) L.mol <sup>-1</sup>	Constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ) L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
296	1,29 x 10 <sup>4</sup>	1,29 x 10 <sup>12</sup>
303	1,36 x 10 <sup>4</sup>	1,37 x 10 <sup>12</sup>
310	1,52 x 10 <sup>4</sup>	1,52 x 10 <sup>12</sup>

Considerando que o valor da constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q \cong 10^{12}$  L/mol.s) nas temperaturas estudadas é cerca de 3 ordens de grandeza superior à constante de velocidade de difusão em meio aquoso ( $k_{dif} \cong 5 \times 10^9$  L/mol.s), conclui-se que o processo de supressão ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico é estático. Além disto, os resultados mostrados na tabela 42 mostram claramente que a variação de temperatura não influenciou o valor de  $K_{SV}$  e, portanto, de  $k_q$ .

A constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), foi obtida por meio dos gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 20). A tabela 43 apresenta os dados obtidos para  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$  nas temperaturas de 296, 303 e 310K e, com base nestes valores, foram construídos os gráficos mostrados nas Figuras 91, 92 e 93.

Tabela 43- Valores de  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$  em diferentes temperaturas.

$1/[\text{ASB}+3\text{-Ácido } \beta\text{-lapachona-sulfônico}]$	$F_0/F_0-F$		
	296	303	310
	2,52	2,51	2,29
$1,91 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	2,82	2,82	2,60
$2,23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	3,17	3,17	2,95
$2,59 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	3,70	3,70	3,34
$3,08 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	4,53	4,31	3,95
$3,83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	5,84	5,49	5,19
$5,08 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	8,17	7,87	7,43
$7,60 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	15,94	15,03	13,88

T=296K

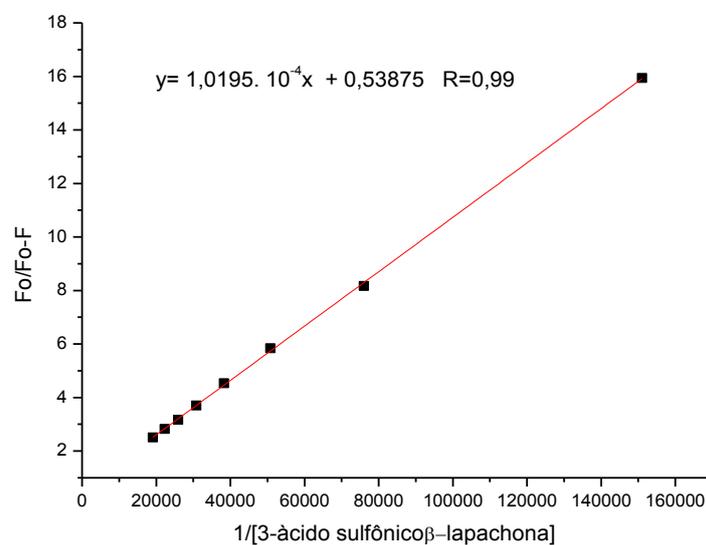


Figura 91- Gráfico de  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$ , a T=296K.

T=303K

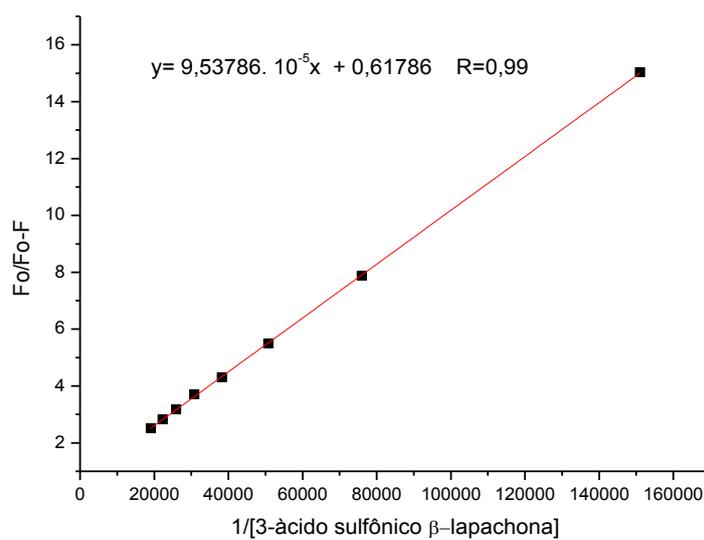


Figura 92- Gráfico de  $F_o/F_o-F$  da ASB x  $1/[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$ , a  $T=303\text{K}$ .

$T=310\text{K}$

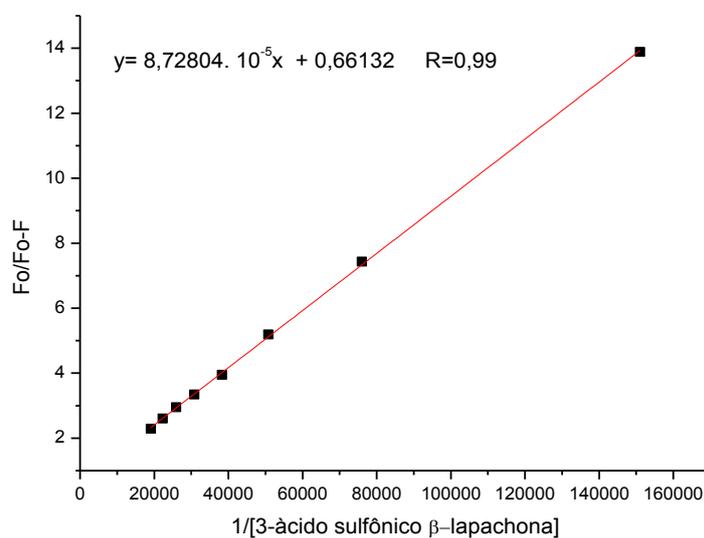


Figura 93- Gráfico de  $F_o/F_o-F$  da ASB x  $1/[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$ , a  $310\text{K}$ .

Empregando-se os valores de  $K_a$  obtidos dos gráficos de Stern-Volmer modificado apresentados nas Figuras 91-93, e utilizando a equação de Vant'Hoff (equação 21) foi

construída a tabela 44 a partir da qual obteve-se o gráfico apresentado na Figura 94, o qual permitiu a obtenção dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$ , assim como  $\Delta G^0$  (a partir da equação 22) para o sistema em estudo (Tabela 45). Com isso pode-se estabelecer o tipo de interação predominante que está presente na formação do par ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico.

Tabela 44- Valores de  $1/T \times \ln K_a$  do sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico.

T(K)	$K_a$	1/T	$\ln K_a$
310	$7,55 \times 10^3$	$3,22 \times 10^{-3}$	8,93
303	$6,43 \times 10^3$	$3,30 \times 10^{-3}$	8,77
296	$5,27 \times 10^3$	$3,37 \times 10^{-3}$	8,57

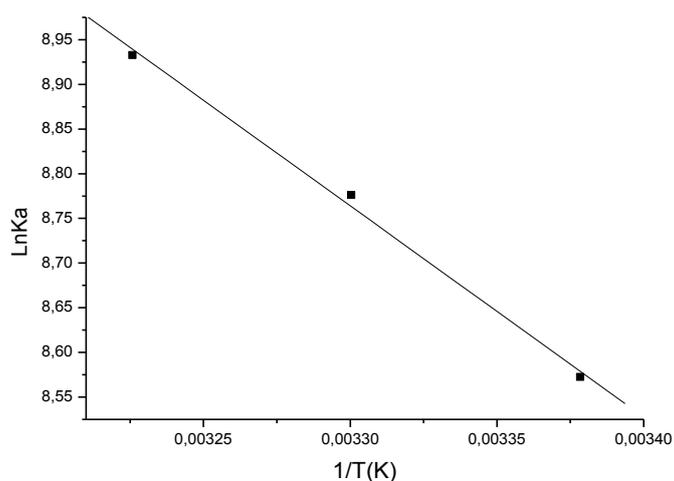


Figura 94- Gráfico de  $\ln K_a \times 1/T$  para ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico.

Tabela 45- Valores de T(K),  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico.

pH	T(K)	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$
7,4	296	-21,11KJ	0,13KJ	19,65Kj
7,4	303	-22,07KJ		
7,4	310	-23,04KJ		

Os valores de  $\Delta G^0 < 0$  indicam uma espontaneidade na interação entre ASB e3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, enquanto que valores de  $\Delta H^0 > 0$  e  $\Delta S^0 > 0$  indicam interações predominantemente hidrofóbicas. Neste caso, a constante universal dos gases utilizada foi  $R = 8,31 \text{ J.mol/K}$ .

A constante de supressão efetiva e o sítio de ligação do3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico à ASB (Equação 23) nas temperaturas de 296, 303 e 310K, foram determinados a partir dos gráficos de  $\log[F_0 - F/F] \times \log [\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$  (Tabela 46 e Figuras 95-97).

Tabela 46 –Valores de  $\log(F_0-F/F)$  da ASB x  $\log[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$  nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Log[ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico]	Log( $F_0-F/F$ )		
	296K	303K	310K
-5,47	-1,17	-1,14	-1,11
-5,17	-0,85	-0,83	-0,80
-5,00	-0,68	-0,65	-0,61
-4,88	-0,53	-0,51	-0,47
-4,78	-0,43	-0,40	-0,37
-4,70	-0,33	-0,31	-0,27
-4,63	-0,26	-0,23	-0,20
-4,58	-0,20	-0,17	-0,11

T=296K

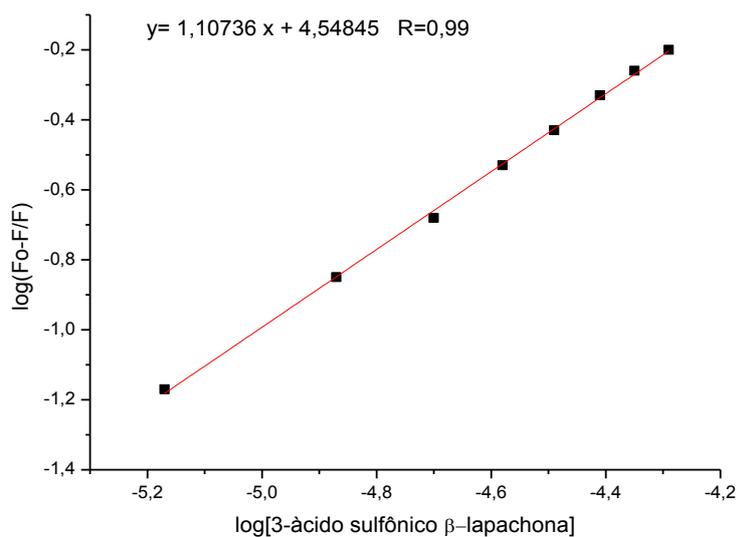


Figura 95- Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  da ASB x  $\log[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$ , a T=296K

T=303K

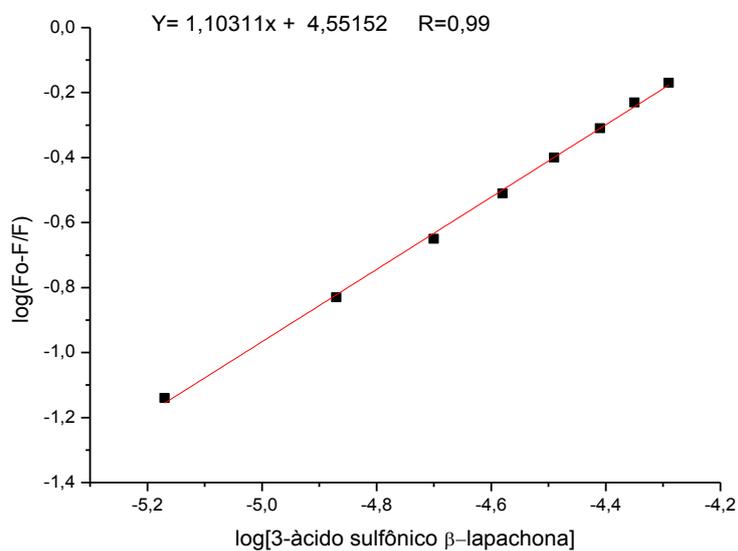


Figura 96- Gráfico de  $\log(Fo-F)/F$  da ASB x  $\log[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$ , a T=303K

T=310K

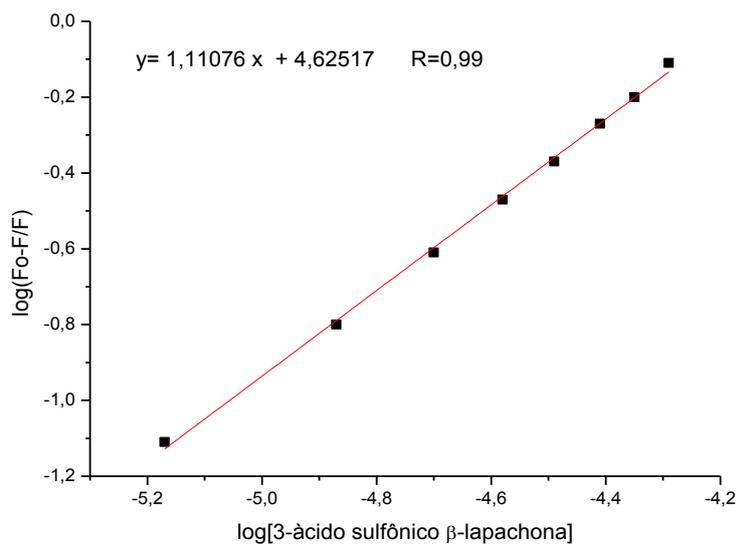


Figura 97- Gráfico de  $\log(Fo-F)/F$  da ASB x  $\log[\text{ácido } \beta\text{-lapachona-3-sulfônico}]$ , a T=310K

A partir dos valores obtidos destes gráficos, foram determinados os valores de “ $K_b$ ” e “ $n$ ” nas temperaturas de 296, 303 e 310K (Tabela 47).

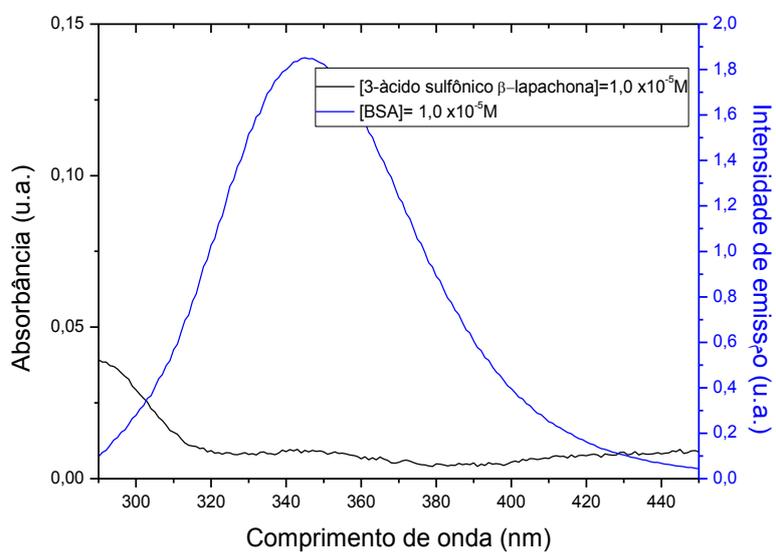
Tabela 47 - Dados de  $K_b$  e  $n$  do sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

Temperatura (K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ ) (L.mol <sup>-1</sup> )	Sítio de ligação (n)
296	$3,53 \times 10^4$	1,1
303	$3,56 \times 10^4$	1,1
310	$4,21 \times 10^4$	1,1

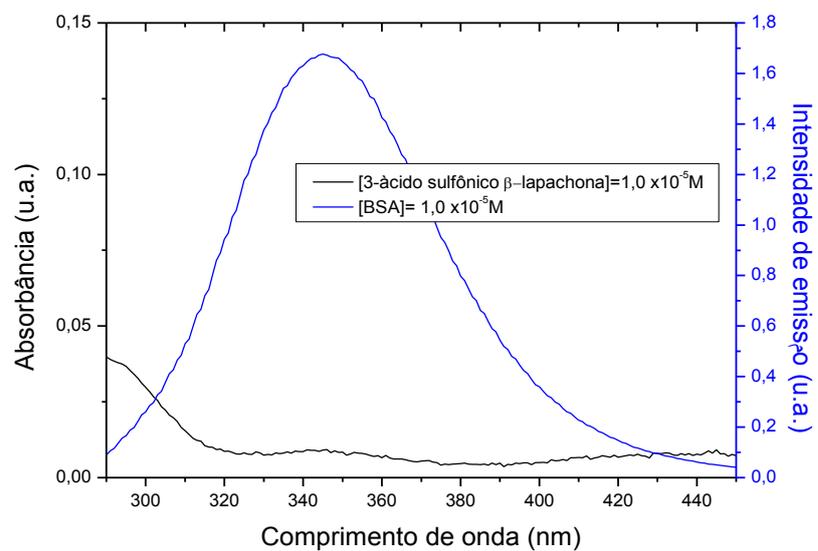
Os valores determinados para  $K_b$  e  $n$  permitem concluir que não há contribuição da temperatura sobre o comportamento da constante de velocidade de ligação efetiva, de maneira similar ao observado para a constante de velocidade de supressão de fluorescência ( $k_q$ ). Quanto ao número de sítios de ligação, os valores obtidos demonstram haver um único sítio interação ( $n=1$ ) entre a ASB e o3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico.

A sobreposição entre os espectros de emissão da fluorescência para ASB e de absorção eletrônica para o3-Ácido  $\beta$ -lapachona-sulfônico, nas temperaturas de 296, 303 e 310K (Figuras 98.1, 98.2 e 98.3), permitiu a obtenção de diversos parâmetros que foram utilizados na determinação do raio de Förster para o sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico.

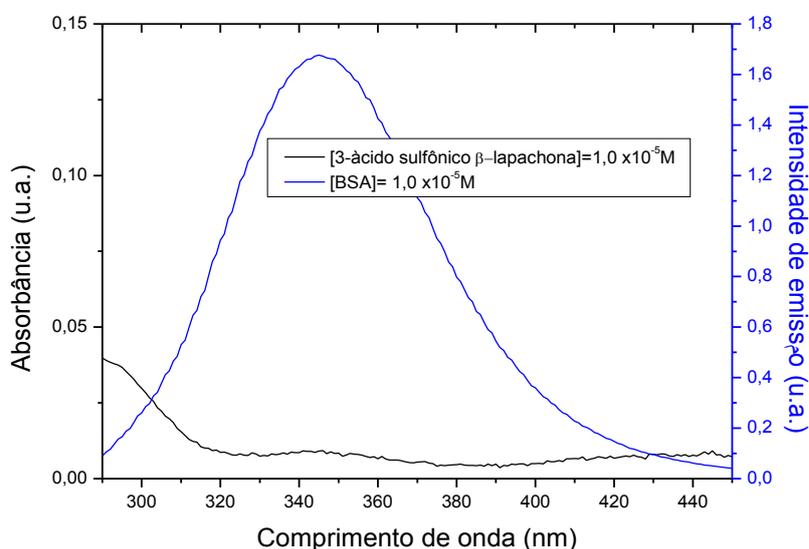
T=296K



T=303K



T=310K



Figuras 98.1, 98.2 e 98.3- Sobreposição dos espectros de Fluorescência para ASB=[1,00 x10<sup>-5</sup>M] e de absorção para o3-Ácido β-lapachona-sulfônico=[1,00 x10<sup>-5</sup>M], nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

A partir da sobreposição dos espectros mostrada nas Figuras 98.1, 98.2 e 98.3 e aplicando-se a equação da integral de sobreposição (Equação 24) foi determinado o parâmetro “J”, ao passo que para o cálculo de “R<sub>0</sub><sup>6</sup>”, “r<sup>6</sup>”, “R” e “r” empregou-se as equações 25-27 ( $\lambda$  em cm e os seguintes fatores para ASB:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$ ) [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)]. Estes parâmetros vão mostrados na Tabela 48.

Tabela 48- Valores de J,  $R_0^6$ ,  $r^6$ , R e r para o sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico, nas temperaturas de 296, 303 e 310K.

T	J	$R_0^6$	E	$R^6$	$R_0(\text{cm})$	r(cm)
296K	$1,26 \times 10^{-15}$	$1,48 \times 10^{-40}$	0,109425	$1,12 \times 10^{-39}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$3,26 \times 10^{-7}$
303K	$1,21 \times 10^{-15}$	$1,43 \times 10^{-40}$	0,102862	$1,24 \times 10^{-39}$	$2,28 \times 10^{-7}$	$3,23 \times 10^{-7}$
310K	$1,18 \times 10^{-15}$	$1,39 \times 10^{-40}$	0,093781	$1,35 \times 10^{-39}$	$2,27 \times 10^{-7}$	$3,32 \times 10^{-7}$

A partir dos dados da tabela 48 pode-se chegar a duas conclusões importantes sobre o mecanismo de transferência de energia entre o resíduo de triptofano da ASB e o ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico. A primeira delas é de que a distância efetiva (r) entre ASB e a lapachona foi igual a 3,2nm nas três temperaturas, enquanto que o valor para o raio de Förster ( $R_0$ ) foi de 2,2nm, demonstrando que  $r > R_0$ . Sendo assim, os valores superiores de “r” em relação a “ $R_0$ ” indicam que um mecanismo de transferência de energia por ressonância (FRET), ou mecanismo de Förster neste processo de supressão da fluorescência no sistema ASB/Ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico tem pouca probabilidade de ocorrer devido a distância de interação entre as espécies ser superior ao valor do raio de foster. A segunda conclusão é que, dentro da variação de temperatura de trabalho e observando os valores de “r” e “ $R_0$ ”, não houve contribuição da temperatura sobre um possível processo de “FRET”.

Em relação às determinações feitas a partir dos espectros de fluorescência do sistema ASB/ $\beta$ -lapachona e ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico, temos que nas três temperaturas a supressão foi de natureza estática( ASB/ $\beta$ -lapachona:  $k_q=4,4 \times 10^{12}$ ;  $4,3 \times$

$10^{12}$ ;  $4,6 \times 10^{12} \text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ; ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico:  $k_q = 1,29 \times 10^{12}$ ,  $1,37 \times 10^{12}$ ,  $1,52 \times 10^{12} \text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) sendo que as interações com a ASB foram predominantemente hidrofóbicas ASB/ $\beta$ -lapachona ( $\Delta G^\circ = -23,8$ ;  $-24,8$  e  $-25,8 \text{ KJ}$ ;  $\Delta S^\circ = 0,15 \text{ KJ}$ ;  $\Delta H^\circ = 20,5 \text{ KJ}$  e ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico :  $\Delta G^\circ = -21,11$ ;  $-22,07$  e  $-23,04 \text{ KJ}$ ;  $\Delta S^\circ = 0,13 \text{ KJ}$ ;  $\Delta H^\circ = 19,65 \text{ KJ}$ ). Ambos os sistemas apresentam apenas um sítio de ligação (ASB/ $\beta$ -lapachona :  $n=1$ ; ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico:  $n=1$ ). Não houve probabilidade de ocorrência de efeito FRET nas três temperaturas estudadas em nenhum dos sistemas  $\beta$ -lapachônicos. Os dados foram: sistema ASB/ $\beta$ -lapachona -  $R_0 = 2,66 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,17 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=296 \text{ K}$ ;  $R_0 = 2,68 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,21 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=303 \text{ K}$ ;  $R_0 = 2,68 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,22 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=310 \text{ K}$ . No sistema ASB/ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico:  $R_0 = 2,29 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,26 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=296 \text{ K}$ ;  $R_0 = 2,28 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,23 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=303 \text{ K}$ ;  $R_0 = 2,27 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r = 3,32 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=310 \text{ K}$

### 3.5 ASB x 7-Hidrocurmarina

#### 3.5.1 Dados de Absorção

O espectro de absorção para ASB, em solução tampão de fosfato ( $\text{pH}=7,4$ ) mostra a presença de duas bandas de absorção com comprimentos de onda máximos a 230 e 280 nm, sendo que a banda de interesse para o nosso estudo é aquela a 280 nm, correspondente à presença de um resíduo de triptofano na estrutura da ASB (Figura 99). A partir da adição de alíquotas de uma solução estoque de 4-metil-7-hidroxicumarina, em etanol, de concentração igual a  $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ , uma nova absorção a 327 nm se apresenta no espectro de maneira bastante evidente, a qual está associada à presença de 4-metil-7-hidroxicumarina livre no sistema, conforme pode ser comprovado pela inspeção do espectro de absorção na região do UV-vis para 4-metil-7-hidroxicumarina mostrado na Figura 100. O aumento da absorção para a banda com máximo a 280 nm,

concomitantemente ao acréscimo de 4-metil-7-hidroxicumarina, é indicativo de que esta transição foi favorecida e está relacionada com a presença de interações do tipo ASB/4-metil-7-hidroxicumarina, de maneira similar ao que ocorreu no sistema ASB/ $\beta$ -lapachona.

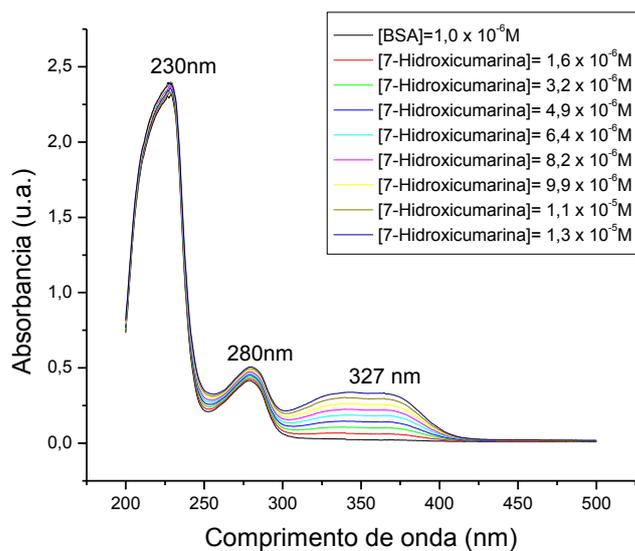


Figura 99- Espectro de Absorção para ASB após a adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina, a  $T=296\text{K}$

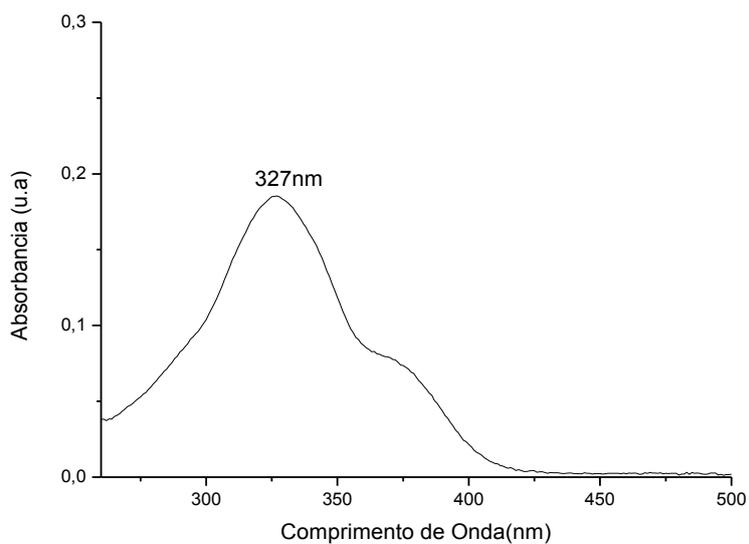


Figura 100- Espectro de absorção na região do UV-vis para 7-hidroxicumarina, em EtOH, a  $T=298\text{K}$

### 3.5.2 Dados de Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular para o sistema ASB/7-hidroxicumarina foram obtidos nas temperaturas de 288, 293 e 298K e estão mostrados nas figuras 101-103. As temperaturas empregadas neste caso foram inferiores àquelas para flavonoides e  $\beta$ -lapachonas, uma vez que a maiores temperaturas observou-se uma variação muito acentuada da elipticidade da ASB, indicando inclusive a possibilidade da sua desnaturação.

Ao observarmos a variação ocorrida nas bandas de absorção em torno de 208 e 222nm no espectro de Dicroísmo Circular (Tabela 49), nota-se que, quando da adição de alíquotas da solução de 7-hidroxicumarina, houve uma redução dos valores de elipticidade (Equações 17 e 18) na estrutura secundária da ASB nos dois comprimentos de onda de absorção característicos da estrutura secundária do triptofano, sobretudo a 208nm. Este comportamento foi observado nas três diferentes temperaturas empregadas. Estes resultados indicam que houve modificação na disposição planar da estrutura em  $\alpha$ -hélice presente na estrutura secundária da ASB, demonstrando que o efeito da interação tipo ASB/7-hidroxicumarina se dá de maneira bastante pronunciada sobre a disposição planar desta estrutura secundária.

T=288K

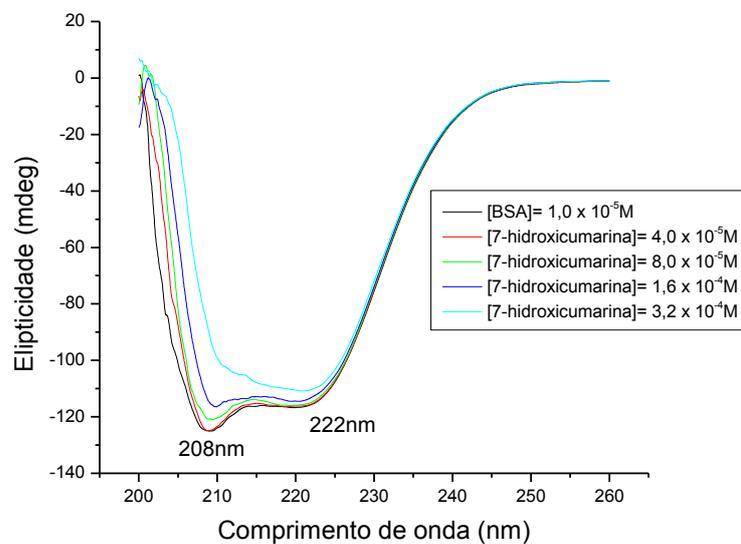


Figura 101- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB após a adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina, a T=288K

T=293

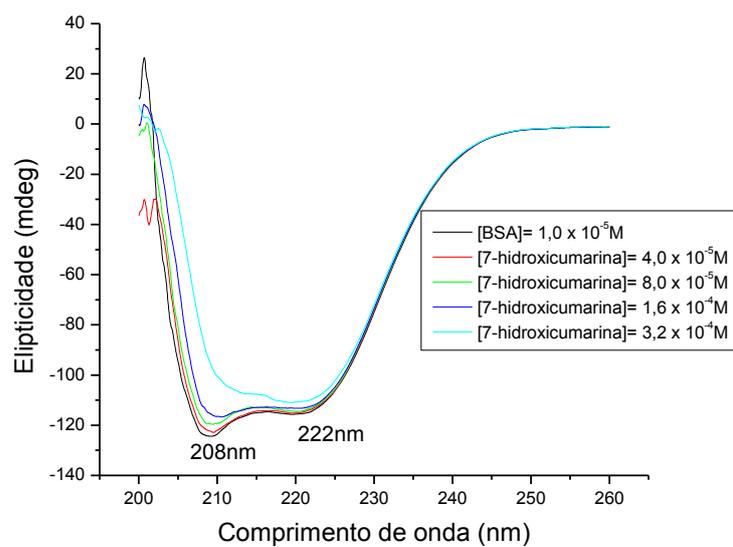


Figura 102- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB após a adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina, a T=293K

T=298K

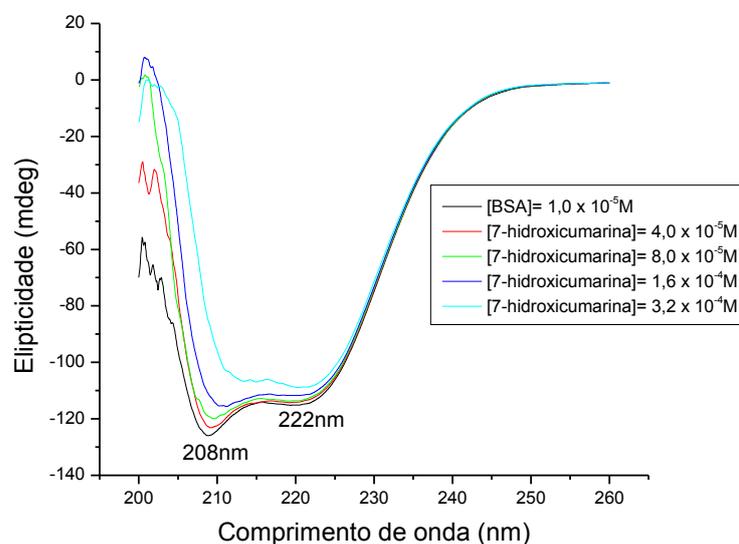


Figura 103- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB após a adição de concentrações variadas de 7-hidroxicumarina, a T=298K

Tabela 49- Valores de  $\alpha$ -hélice para ASB em presença de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

T=288K		T=293K		T=298K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
61,24541	60,38198	58,83458	58,20330	59,79974	58,51349
60,37267	59,79166	58,82747	57,79558	59,99526	58,49194
61,02619	59,64706	56,47352	57,10433	58,61121	58,07175
54,25702	59,22799	52,11103	56,54747	45,2364	57,07314
28,76170	57,35838	34,00581	54,87122	21,67911	55,09918

### 3.5.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário

Os espectros de fluorescência para o sistema ASB/7-hidroxicumarina estão apresentados nas Figuras 104, 106 e 108 nas três diferentes temperaturas: 288, 293 e 298K. A banda de emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASB, a 350nm, apresenta um deslocamento para o azul com a adição de alíquotas da solução de 7-hidroxicumarina, em etanol ( $\lambda_{\text{max}}=345\text{nm}$ ). Observa-se também o aparecimento de uma banda de emissão de fluorescência com máximo a 450nm correspondente à emissão da 7-hidroxicumarina (Figura 110). A partir dos espectros apresentados foram construídas as tabelas 50, 51 e 52 e os correspondentes gráficos de Stern-Volmer empregando-se a Equação 19 (Figuras 105, 107 e 109), relativos às intensidades de emissão fluorescente e suas correlações com o comportamento da macromolécula em função da presença do supressor (7-hidroxicumarina). Estes gráficos de Stern-Volmer permitiram a determinação da constante de Stern-Volmer ( $K_{\text{SV}}$ ) e da constante de velocidade de supressão da fluorescência ( $k_q$ ) da ASB pela cumarina (Tabela 53).

T=288K

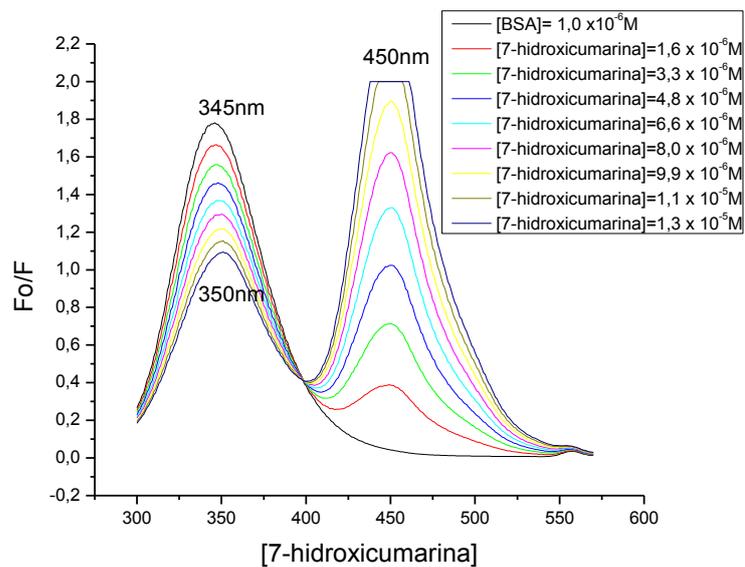


Figura 104- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina, a T=288K

Tabela 50- Valores de Fo/F para a ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina em T=288K.

[7-hidroxicumarina]	F <sub>0</sub> /F
1,6x 10 <sup>-6</sup> M	1,09
3,3 x 10 <sup>-6</sup> M	1,18
4,8 x 10 <sup>-6</sup> M	1,28
6,6 x 10 <sup>-6</sup> M	1,38
8,0 x 10 <sup>-6</sup> M	1,49
9,9 x 10 <sup>-6</sup> M	1,59
1,1 x 10 <sup>-5</sup> M	1,71
1,3 x 10 <sup>-5</sup> M	1,82

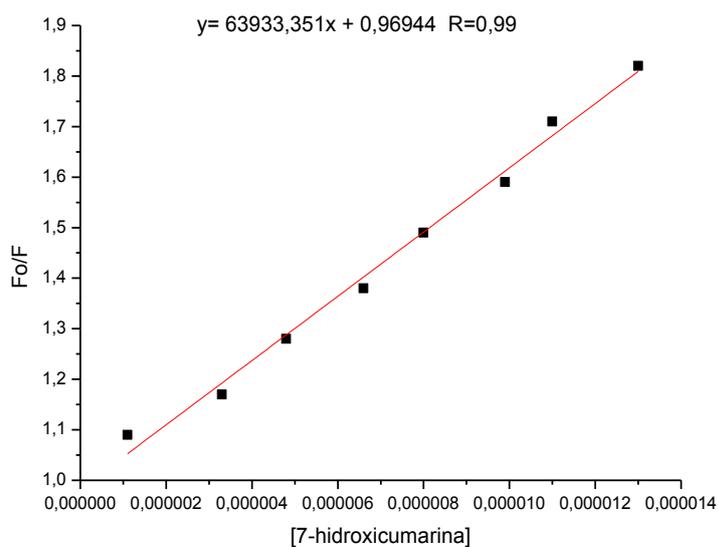


Figura 105- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina, a  $T=288K$

$T=293K$

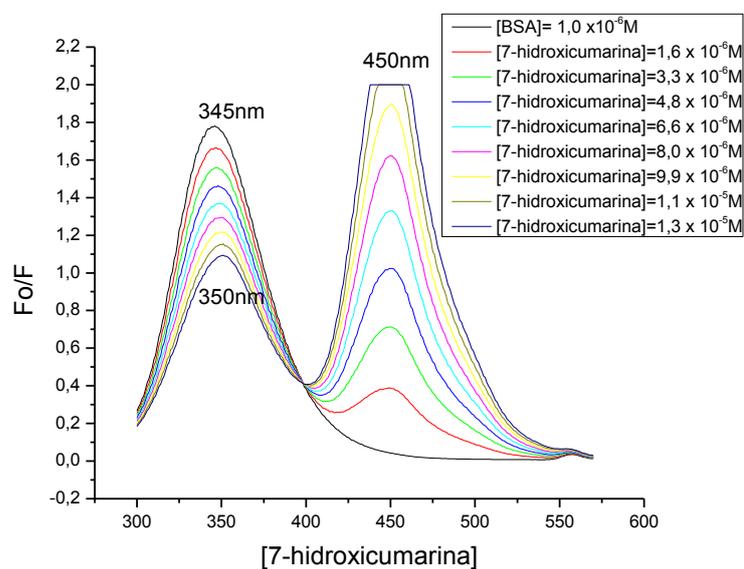


Figura 106- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina, a  $T=293K$ .

Tabela 51- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina em  $T=293K$ .

[7-hidroxicumarina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6}M$	1,09
$3,3 \times 10^{-6}M$	1,17
$4,8 \times 10^{-6}M$	1,26
$6,6 \times 10^{-6}M$	1,36
$8,0 \times 10^{-6}M$	1,45
$9,9 \times 10^{-6}M$	1,56
$1,1 \times 10^{-5}M$	1,67
$1,3 \times 10^{-5}M$	1,78

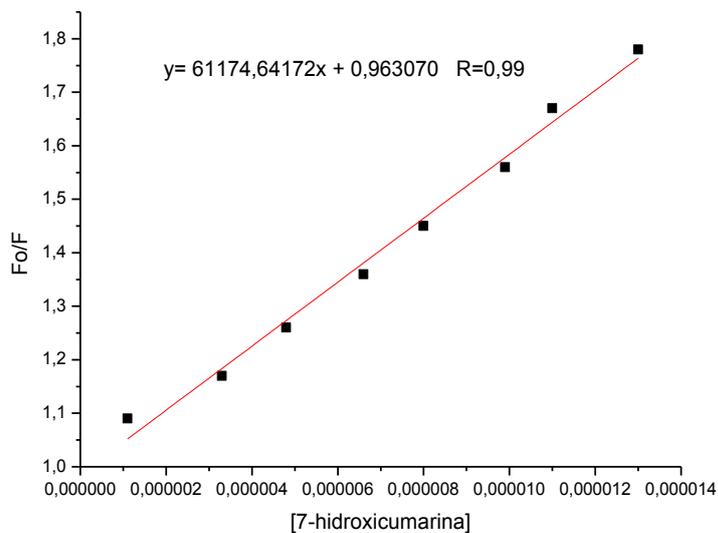


Figura 107- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina, a  $T=293K$

T=298K

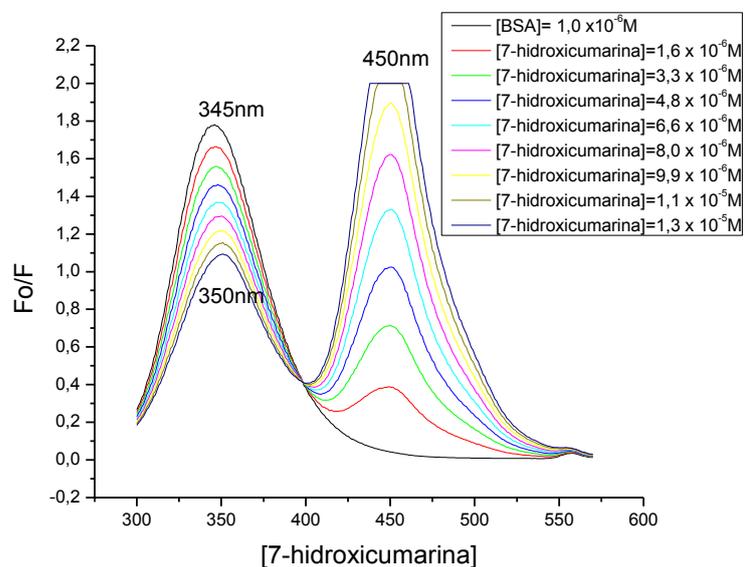


Figura 108- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina, a T=298K

Tabela 52- Valores de Fo/F para ASB após adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina em T=298K.

[7-hidroxicumarina]	F <sub>0</sub> /F
1,6x 10 <sup>-6</sup> M	1,08
3,3 x 10 <sup>-6</sup> M	1,16
4,8 x 10 <sup>-6</sup> M	1,25
6,6 x 10 <sup>-6</sup> M	1,34
8,0 x 10 <sup>-6</sup> M	1,44
9,9 x 10 <sup>-6</sup> M	1,54
1,1 x 10 <sup>-5</sup> M	1,64
1,3 x 10 <sup>-5</sup> M	1,75

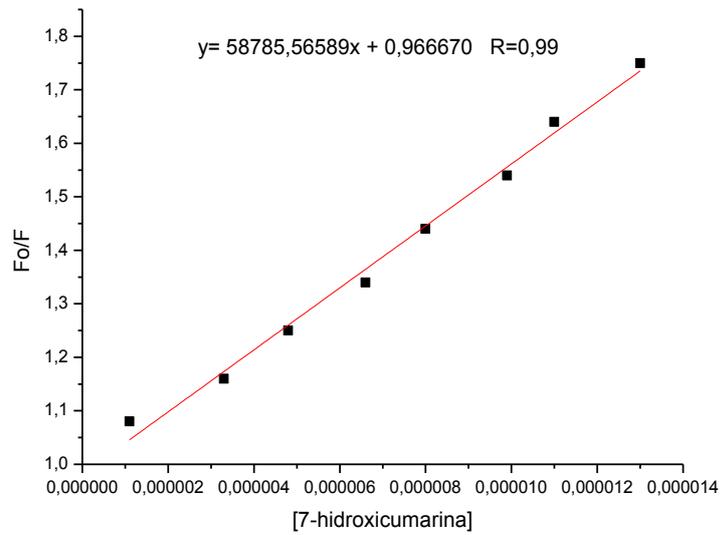


Figura 109- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 7-hidroxicumarina, a  $T=298K$ .

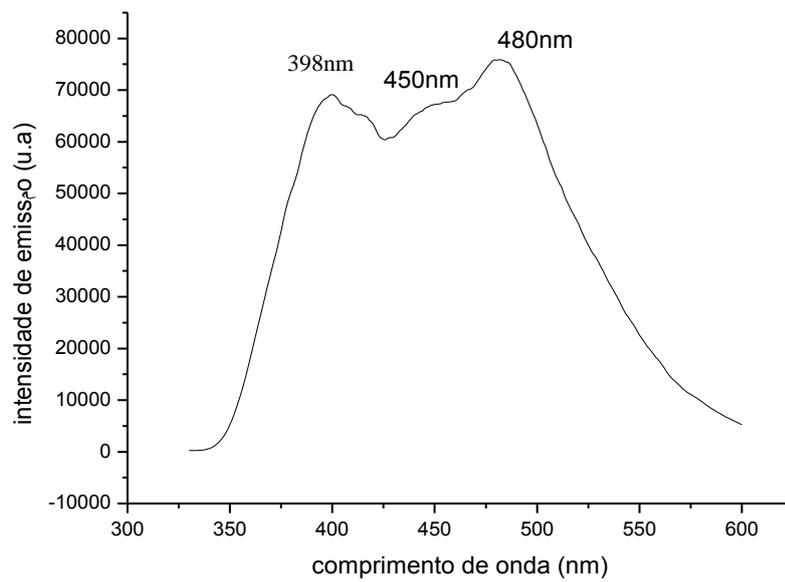


Figura 110- Espectro de emissão de fluorescência para 7-Hidroxicoumarina, em etanol

( $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$ ).

Tabela 53- Valores de T(K),  $K_{SV}$  e  $k_q$  para o sistema ASB/7-hidroxicumarina em diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	Constante de Stern- Volmer ( $K_{SV}$ )  L.mol <sup>-1</sup>	Constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ).  L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
288	$6,39 \times 10^4$	$6,29 \times 10^{12}$
293	$6,11 \times 10^4$	$1,37 \times 10^{12}$
298	$5,87 \times 10^4$	$5,87 \times 10^{12}$

Considerando a ordem de grandeza da constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ) nas temperaturas estudadas quando comparada com a constante de velocidade de difusão em meio aquoso ( $k_{dif} \cong 5 \times 10^9$  L/mol.s), podemos concluir que o processo de supressão ASB/7-hidroxicumarina é do tipo estático, uma vez que o valor da constante de velocidade de supressão da fluorescência ( $k_q$ ) é 3 ordens de grandeza superior em relação ao  $k_{dif}$ . Outro dado importante é o de que, a variação de temperatura não exerceu nenhuma influência significativa sobre o valor de  $K_q$ .

A constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis (Equação 20), ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), foi obtida por meio dos gráficos de Stern-Volmer modificados mostrados nas Figuras 111-113, com a tabela 54 apresentando os dados obtidos de  $F_0/F_0 - F$  para ASB  $\times 1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ , nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

T=288K

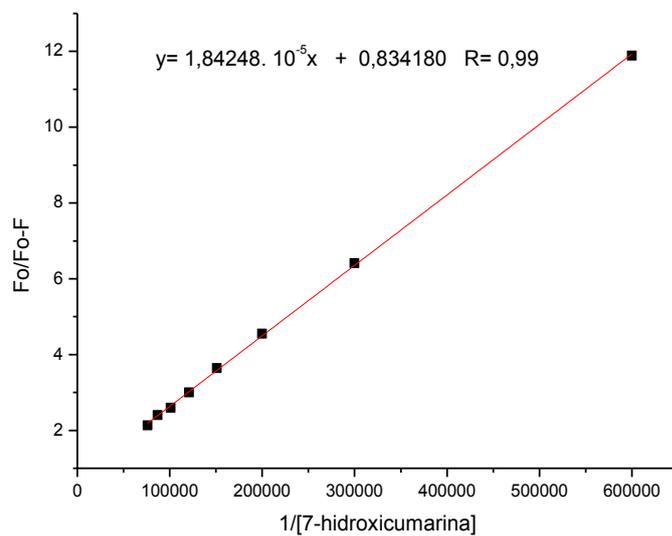


Figura 111- Gráfico de  $F_o/F_o-F$  para ASB x  $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ , a  $T=288\text{K}$ .

T=293K

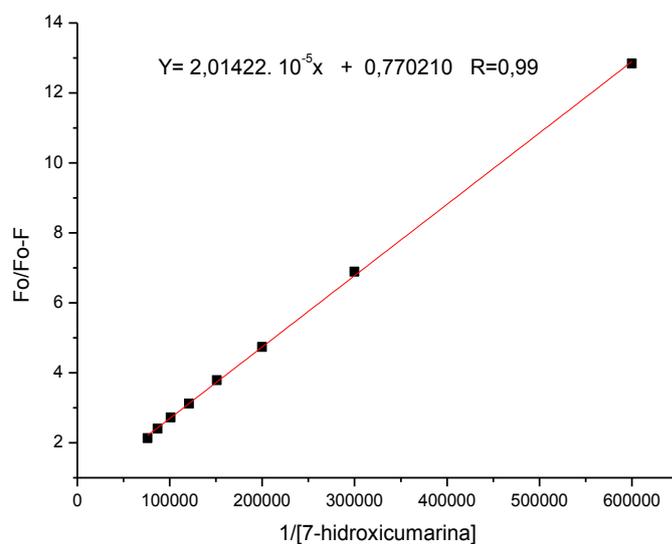


Figura 112- Gráfico de  $F_o/F_o-F$  para ASB x  $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ , a  $T=293\text{K}$ .

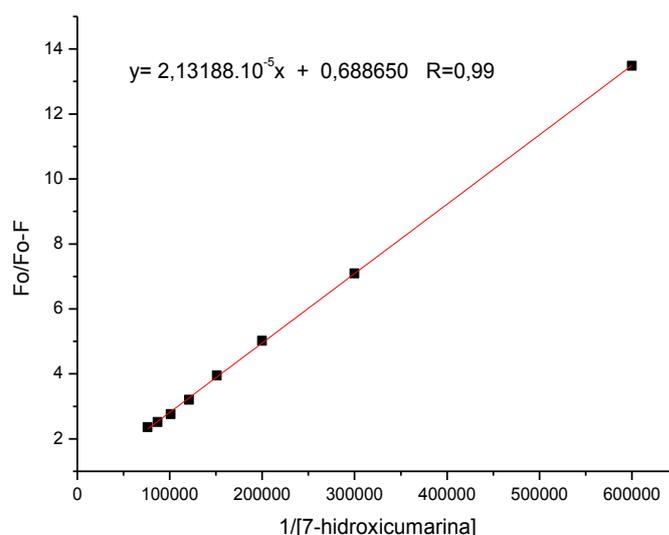


Figura 113- Gráfico de  $F_0/F_0-F$  para ASB x  $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$ , a  $T=298\text{K}$ .

Tabela 54- Valores de  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[7\text{-hidroxicumarina}]$  em diferentes temperaturas.

$1/[ASB+ 7\text{-hidroxicumarina}]$	$F_0/F_0-F$		
	288	293	298
$7,61 \times 10^4$	2,13	2,13	2,36
$8,69 \times 10^4$	2,40	2,40	2,52
$1,01 \times 10^5$	2,60	2,72	2,76
$1,21 \times 10^5$	3,00	3,12	3,20
$1,51 \times 10^5$	3,64	3,79	3,95
$2,00 \times 10^5$	4,55	4,74	5,02
$3,00 \times 10^5$	6,41	6,89	7,09
$6,00 \times 10^5$	11,89	12,84	13,48

Baseado nos valores para  $K_a$  obtidos dos gráficos de Stern-Volmer modificado (Tabela 55) e utilizando a equação de Vant'Hoff (Equação 21) pode-se construir o gráfico apresentado na Figura 114, o qual permitiu a obtenção dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema ASB/7-hidroxicumarina (Tabela 56) ( $R= 8,31 \text{ J.mol/K}$ ), com o valor de  $\Delta G^0$  sendo calculado a partir da Equação 22. Com estes parâmetros pode-se

estabelecer o tipo de interação predominante que está presente na formação do par ASB/7-hidroxicumarina.

Tabela 55 - Valores de  $1/T \times \ln K_a$  para o sistema ASB/7-hidroxicumarina.

T(K)	$K_a$	$1/T$	$\ln K_a$
288	$4,52 \times 10^4$	$3,35 \times 10^{-3}$	10,72
293	$3,81 \times 10^4$	$3,41 \times 10^{-3}$	10,55
298	$3,22 \times 10^4$	$3,47 \times 10^{-3}$	10,38

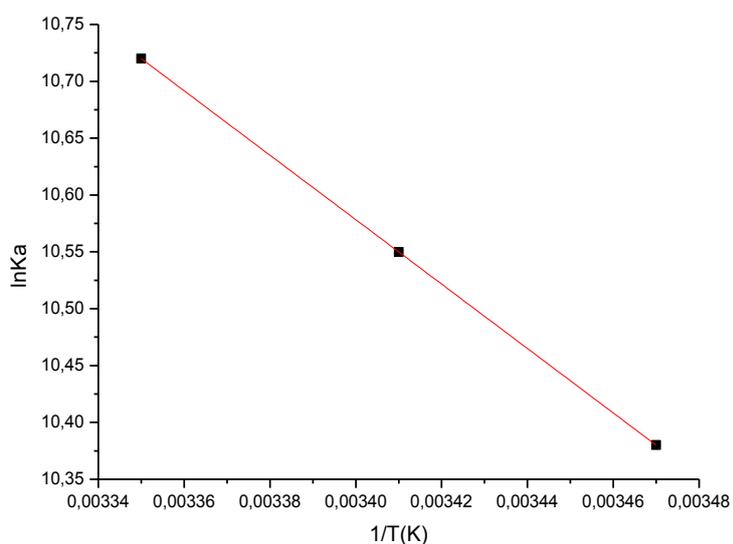


Figura 114- Gráfico de  $\ln K_a \times 1/T$  para ASB/7-hidroxicumarina.

Tabela 56- Valores de T(K),  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  do sistema ASB/7-hidroxicumarina.

pH	T(K)	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$
7,4	288	-25,67Kj	0,00Kj	-24,08Kj
7,4	293	-25,69Kj		
7,4	296	-25,72Kj		

Os valores de  $\Delta G^0 < 0$  indicam uma espontaneidade na interação entre ASB e 7-hidroxicumarina, enquanto que valores de  $\Delta H^0 < 0$  e  $\Delta S^0 = 0$  indicam a existência de forças de interação do tipo Van der Waals e formação de ligação de hidrogênio.

A constante de supressão efetiva e o número de sítios de ligação ao sistema foram determinados a partir dos valores de  $\log[F_0-F/F]$  x  $\log [7\text{-hidroxicumarina}]$  e empregando-se a (Equação 23) (Tabela 57), a partir dos quais foram construídos os gráficos mostrados nas Figuras 115-117. Estes gráficos permitiram a obtenção dos valores para “ $K_b$ ” e “ $n$ ” nas temperaturas de 288, 293 e 296K (Tabela 58).

Tabela 57 –Valores de  $\log(F_0-F/F)$  para ASB x  $\log[7\text{-hidroxicumarina}]$  nas temperaturas de 288, 293 e 296K.

Log[7-hidroxicumarina]	Log(F <sub>0</sub> -F/F)		
	288K	293K	296K
-5,77	-1,03	-1,07	-1,09
-5,47	-0,73	-0,76	-0,78
-5,30	-0,55	-0,58	-0,59
-5,17	-0,41	-0,44	-0,46
-5,08	-0,31	-0,33	-0,35
-5,00	-0,22	-0,24	-0,25
-4,93	-0,14	-0,17	-0,18
-4,88	-0,08	-0,10	-0,11

T=288K

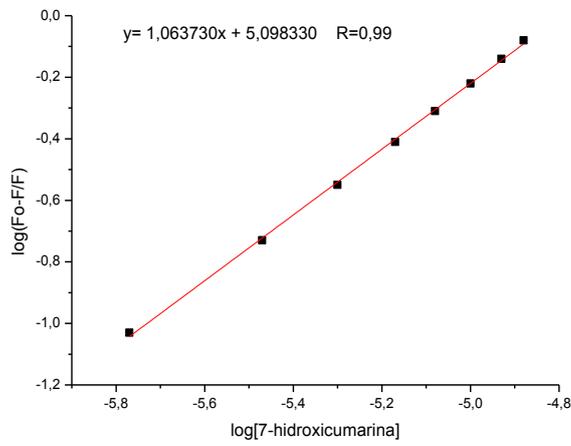


Figura 115- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[7\text{-hidroxicumarina}]$ , a  $T=288\text{K}$

T= 293K

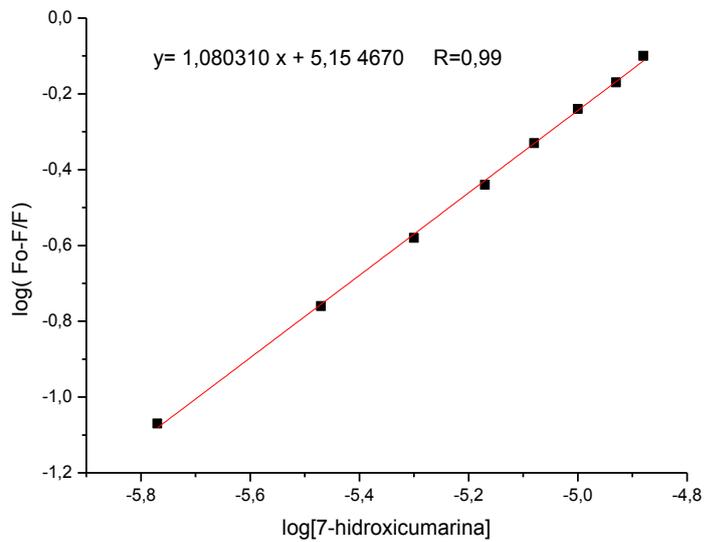


Figura 116- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[7\text{-hidroxicumarina}]$ , a  $T=293\text{K}$

T=298K

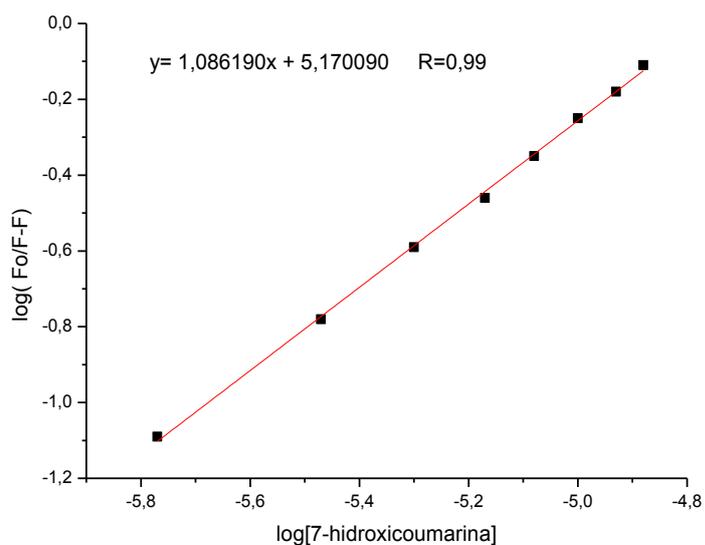


Figura 117- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[7\text{-hidroxicoumarina}]$ , a  $T=298\text{K}$ .

Tabela 58- Dados de  $K_b$  e  $n$  para o sistema ASB/7-hidroxicoumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

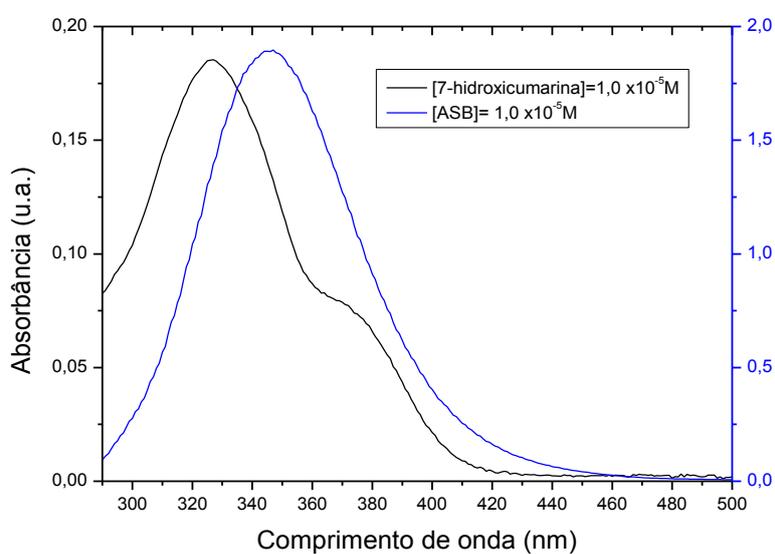
Temperatura (K)	Constante de ligação efetiva $L.mol^{-1}(K_b)$	Sítio de ligação (n)
288	$1,23 \times 10^5$	1,06
293	$1,42 \times 10^5$	1,08
298	$1,47 \times 10^5$	1,08

A partir dos valores determinados para  $K_b$  e  $n$  pode-se notar que não há contribuição da temperatura sobre o valor da constante de ligação efetiva, tendo em vista que a magnitude dos valores encontrados está na ordem de  $10^5$  nas diferentes temperaturas utilizadas. Quanto ao número de sítios de ligação, os valores obtidos

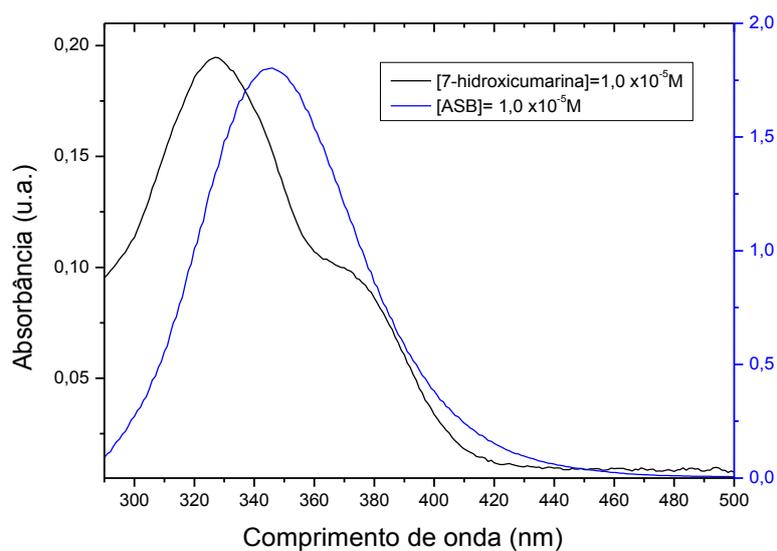
demonstram haver um único sítio de interação ( $n=1$ ) entre a ASB e a 7-hidroxicumarina.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência para ASB e de absorção eletrônica para 7-hidroxicumarina, nas temperaturas de 288, 293 e 296K, vão apresentados nas Figuras 118.1, 118.2 e 118.3.

T=288K



T=293K



T=298K

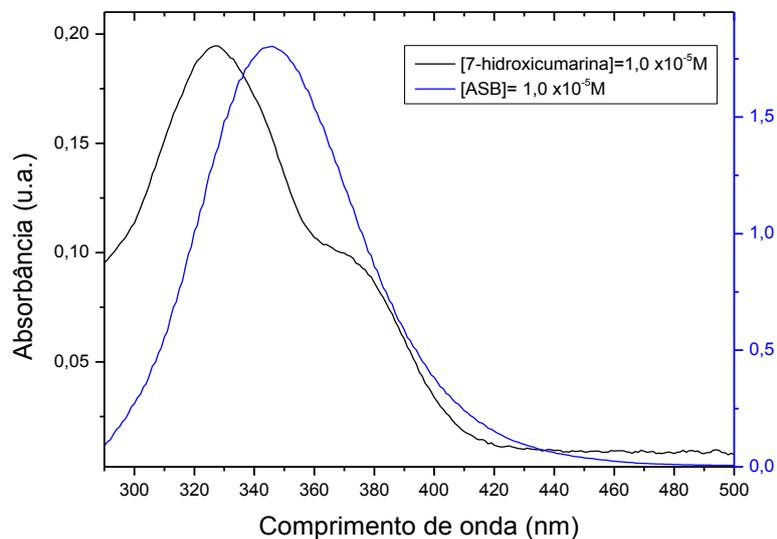


Figura 118.1, 118.2 e 118.3 - Sobreposição dos espectros de emissão de Fluorescência para ASB ( $[1,00 \times 10^{-5} \text{M}]$ ) e de Absorção no UV-vis para 7-hidroxicumarina ( $[1,00 \times 10^{-5} \text{M}]$ ) nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

A partir da sobreposição dos espectros mostrada nas Figuras 118.1-118.3, e ao aplicarmos a equação da integral de sobreposição (Equação 24), pôde-se determinar o parâmetro “J”, enquanto que os valores de “ $R_0^6$ ”, “ $r^6$ ”, “R” e “r” ( $\lambda$  em cm e empregando-se os seguintes valores para a ASB:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$ ) [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)] foram calculados a partir das Equações 25-27. Todos estes valores vão apresentados na Tabela 59.

Tabela 59- Valores de J,  $R_0^6$ ,  $r^6$ , R e r para o sistema ASB/7-hidroxycumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

T	J	$R_0^6$	E	$r^6$	$R_0$ (cm <sup>-1</sup> )	r (cm <sup>-1</sup> )
288K	$1,56 \times 10^{-14}$	$1,84 \times 10^{-39}$	0,32	$3,78 \times 10^{-39}$	$3,50 \times 10^{-7}$	$3,50 \times 10^{-7}$
293K	$1,63 \times 10^{-14}$	$1,92 \times 10^{-39}$	0,32	$3,92 \times 10^{-39}$	$3,52 \times 10^{-7}$	$3,97 \times 10^{-7}$
298K	$1,81 \times 10^{-14}$	$2,14 \times 10^{-39}$	0,33	$4,28 \times 10^{-39}$	$3,58 \times 10^{-7}$	$4,02 \times 10^{-7}$

A partir dos resultados mostrados na tabela 59, uma importante consideração deve ser feita sobre o tipo de mecanismo operante no processo de transferência de energia entre o resíduo do triptofano da ASB e a 7-hidroxycumarina. Considerando a variação dos valores obtidos dentro do erro experimental nas três temperaturas estudadas. Percebe-se a existência de valores muito próximos de  $R_0$  e r, este fato, indica a probabilidade de existência do efeito FRET no sistema.

### 3.6 ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

#### 3.6.1 Dados de Absorção

O espectro de absorção para ASB, em solução tampão fosfato (pH=7,4), mostra a presença de duas bandas de absorção com comprimentos de onda máximos a 230 e 280 nm, sendo que a banda de interesse para o nosso estudo é aquela a 280 nm, correspondente à presença de um resíduo de triptofano na estrutura da ASB (Figura 119). A partir da adição de alíquotas de uma solução estoque de 4-metil-7-hidroxicumarina, em etanol, de concentração igual a  $1,00 \times 10^{-3}M$ , uma nova banda de absorção em 324nm pode ser observada. Esta banda está relacionada à presença de 4-metil-7-hidroxicumarina livre (Figura 120) no sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina. O aumento da absorção para a banda com máximo a 280nm, concomitantemente ao acréscimo de 4-metil-7-hidroxicumarina, é indicativo de que esta transição está relacionada com a presença de interações entre ASB e a 4-metil-7-hidroxicumarina.

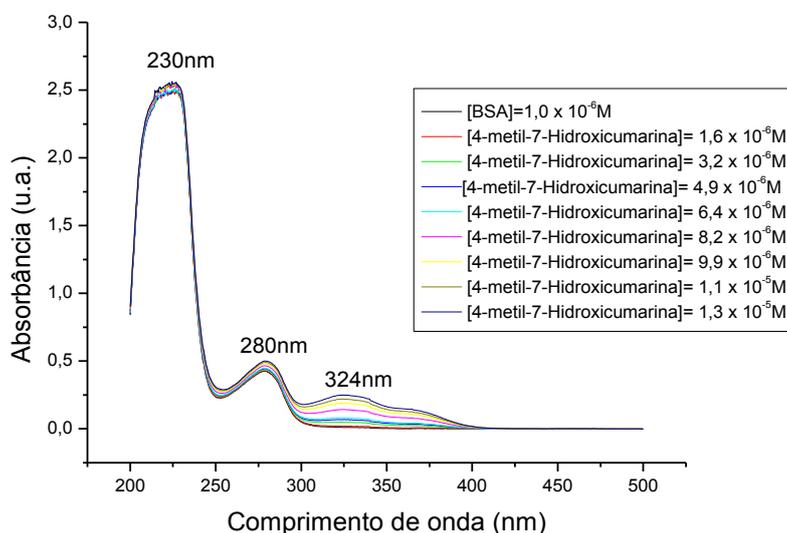


Figura 119 - Espectro de Absorção para ASB após a adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=298K

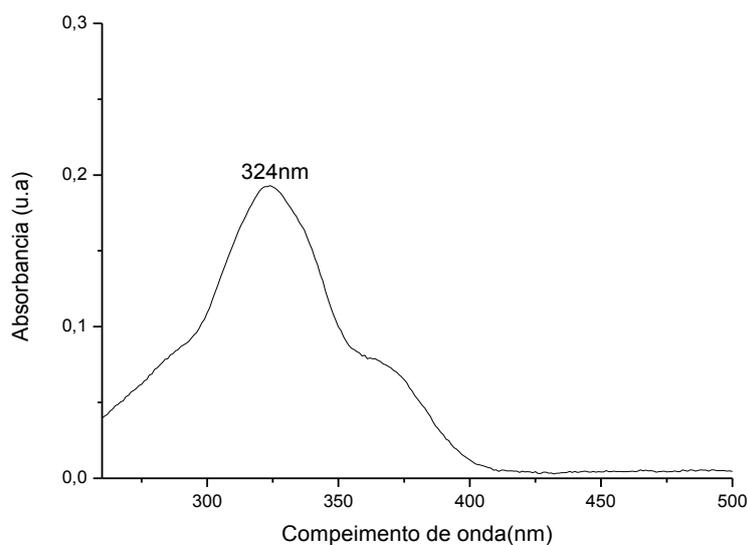


Figura 120- Espectro de absorção da 4-metil-7-hidroxicumarina em etanol, a T=293K.

### 3.6.2 Dados de Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular do sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina, nas temperaturas de 288, 293 e 298K estão mostrados nas Figuras 121-123. Ao observarmos a variação ocorrida em torno de 208 e 222nm nos espectros de Dicroísmo Circular (Tabela 60), nota-se que, após a adição de alíquotas de solução etanólica de 4-metil-7-hidroxicumarina, há uma redução dos valores de elipticidade (Equações 16-18) na estrutura secundária da ASB nos dois comprimentos de onda de absorção característicos da estrutura secundária da ASB, isto é 208 e 222nm, sobretudo a 208nm. Isto indica uma forte modificação na disposição planar da estrutura em  $\alpha$ -hélice presente na estrutura secundária da ASB a partir da adição de alíquotas de uma solução de 4-metil-7-hidroxicumarina.

T=288K

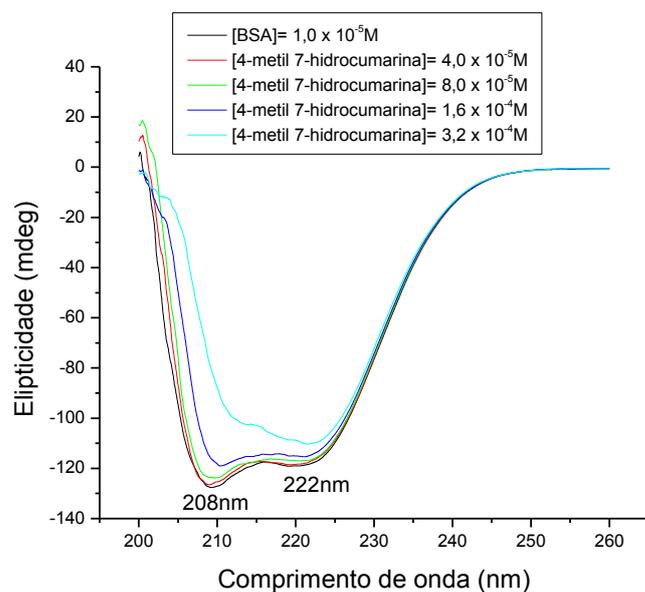


Figura 121- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB após a adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxycumarina, a T=288K

T=293K

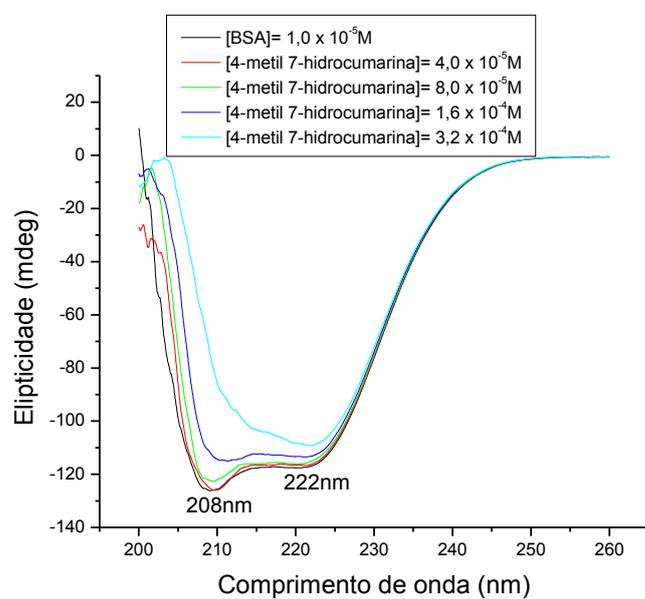


Figura 122- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB após a adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxycumarina, a T=293K

T=298K

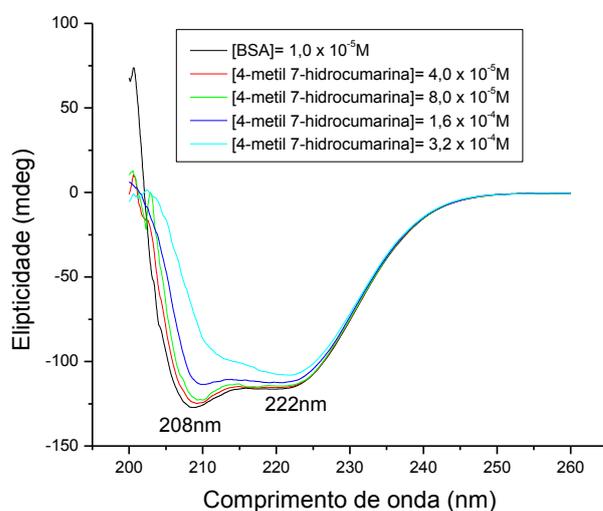


Figura 123- Espectro de Dicroísmo Circular para a ASB após a adição de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=298K.

Tabela 60 - Valores de  $\alpha$ -hélice para ASB em presença de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

T=288K		T=293K		T=298K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
61,84972	58,86788	60,43962	58,84488	61,09725	57,36102
61,31055	58,61270	59,90044	58,58435	58,05189	57,16102
59,08875	57,03059	58,34220	57,59765	55,75896	57,00792
53,86300	55,15927	51,07831	56,35009	49,24751	55,52785
34,84417	54,38240	30,25237	54,09320	23,21362	54,09320

Comparativamente aos outros sistemas estudados, rutinas e  $\beta$ -lapachonas, não foi observada influência da temperatura na estrutura secundária da ASB a partir da adição de alíquotas de 4-metil-7-hidroxicumarina e 4-metil-7-hidroxicumarina. Entretanto considerando as modificações do ângulo  $\alpha$ -hélice da estrutura secundária planar da ASB, foi nos sistemas cumarínicos que obtivemos a maior variação dos seus valores. Esse valores obtiveram variações da ordem de  $33^\circ$ ,  $12^\circ$  e  $28^\circ$  se observarmos a faixa de concentração  $3,3$  a  $4,4 \times 10^{-5}M$  no sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina. Comportamento similar está também presente no sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina nas mesmas faixas de concentração nas três temperaturas, sobretudo na absorção a 208nm.

### **3.6.3 Dados de Espectroscopia de Emissão de Fluorescência no Estado Estacionário**

Os espectros de fluorescência para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina estão apresentados nas Figuras 124, 126 e 128 nas três diferentes temperaturas: 288, 293 e 298K. A banda de emissão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASB, a 350nm, apresenta um deslocamento para o azul ( $\lambda_{\max}=345\text{nm}$ ) após a adição de alíquotas da solução de 4-metil-7-hidroxicumarina, em etanol. Por outro lado, pode-se observar nestas figuras o aparecimento de uma nova banda de emissão de fluorescência com máximo a 450nm e que corresponde à emissão da 4-metil-7-hidroxicumarina (Figura 130). A partir dos espectros apresentados foram construídas as tabelas 61-63 e os correspondentes gráficos de Stern-Volmer (Equação 19) (Figuras 125, 127 e 129), relativos às intensidades de emissão fluorescente e suas correlações com o comportamento da macromolécula em função da presença do supressor (4-metil-7-hidroxicumarina). Estes gráficos de Stern-Volmer permitiram a determinação da

constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e da constante de velocidade de supressão da fluorescência ( $k_q$ ) da ASB pela cumarina (Tabela 64).

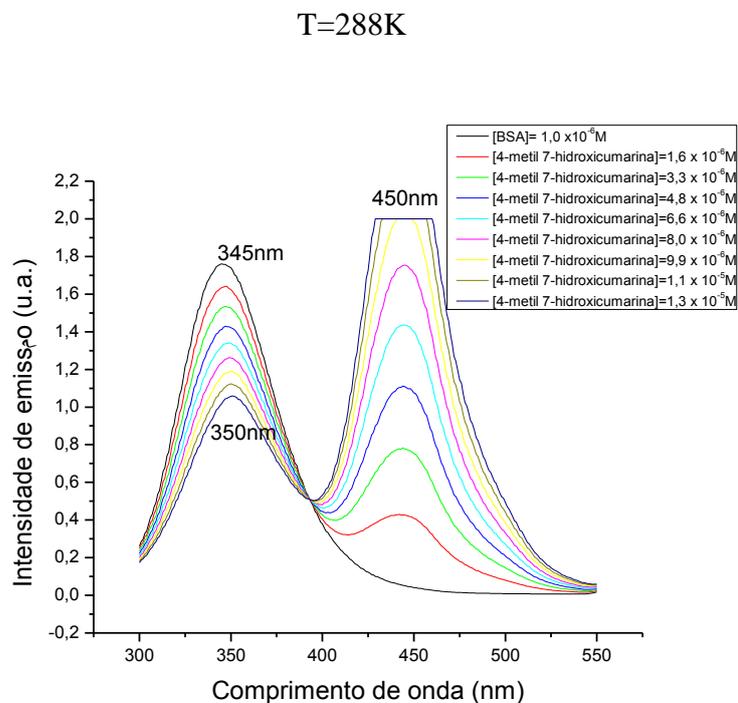


Figura 124- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=288K

Tabela 61- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina em T=288K.

[4-metil-7-hidroxicumarina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,08
$3,3 \times 10^{-6} \text{M}$	1,18
$4,8 \times 10^{-6} \text{M}$	1,27
$6,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,37
$8,0 \times 10^{-6} \text{M}$	1,48
$9,9 \times 10^{-6} \text{M}$	1,59
$1,1 \times 10^{-5} \text{M}$	1,70
$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$	1,82

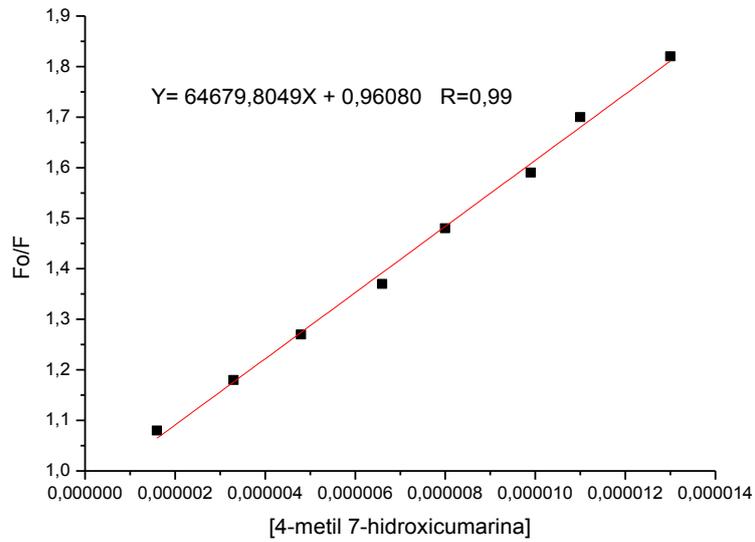


Figura 125- Gráfico de Fo/F para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=288K

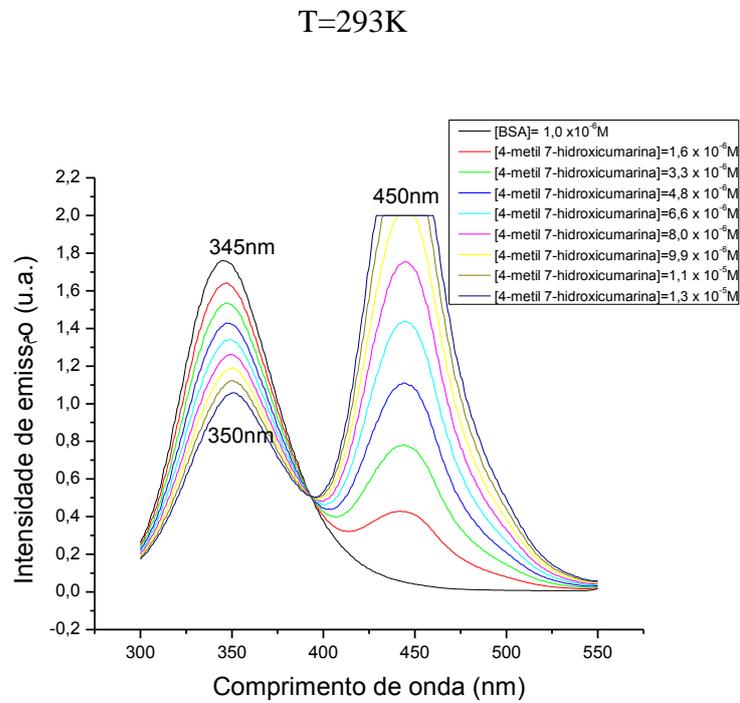


Figura 126- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=293K

Tabela 62- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina em  $T=293K$ .

[4-metil-7-hidroxicumarina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6}M$	1,08
$3,3 \times 10^{-6}M$	1,17
$4,8 \times 10^{-6}M$	1,26
$6,6 \times 10^{-6}M$	1,36
$8,0 \times 10^{-6}M$	1,46
$9,9 \times 10^{-6}M$	1,57
$1,1 \times 10^{-5}M$	1,67
$1,3 \times 10^{-5}M$	1,79

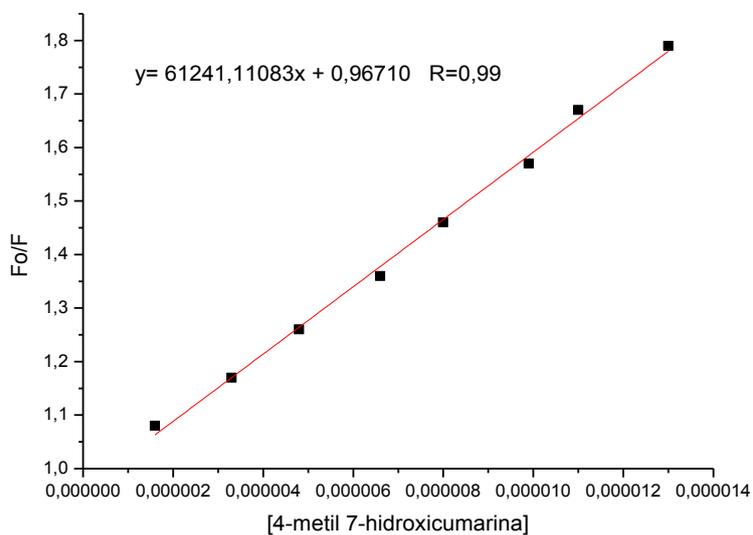


Figura 127- Gráfico de  $F_0/F$  para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, a  $T=293K$

T=298K

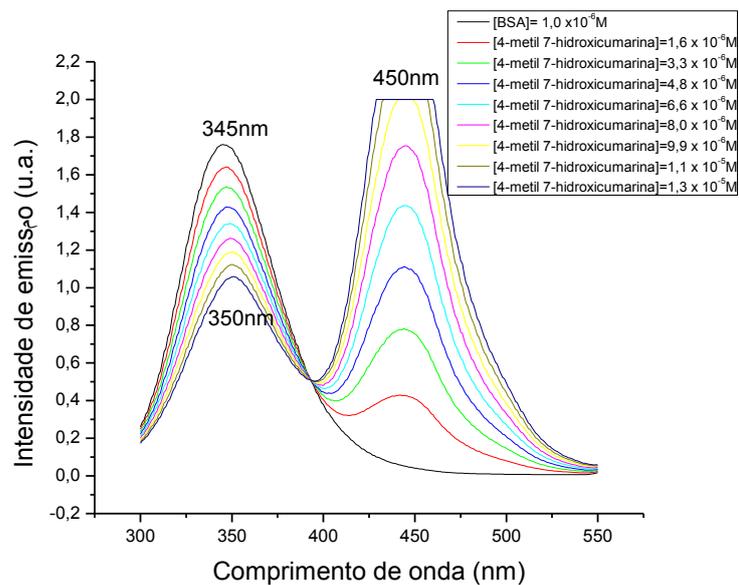


Figura 128- Espectro de Fluorescência para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=298K

Tabela 63- Valores de  $F_0/F$  para ASB após adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina em T=298K.

[4-metil-7-hidroxicumarina]	$F_0/F$
$1,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,08
$3,3 \times 10^{-6} \text{M}$	1,17
$4,8 \times 10^{-6} \text{M}$	1,25
$6,6 \times 10^{-6} \text{M}$	1,35
$8,0 \times 10^{-6} \text{M}$	1,44
$9,9 \times 10^{-6} \text{M}$	1,55
$1,1 \times 10^{-5} \text{M}$	1,65
$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$	1,77

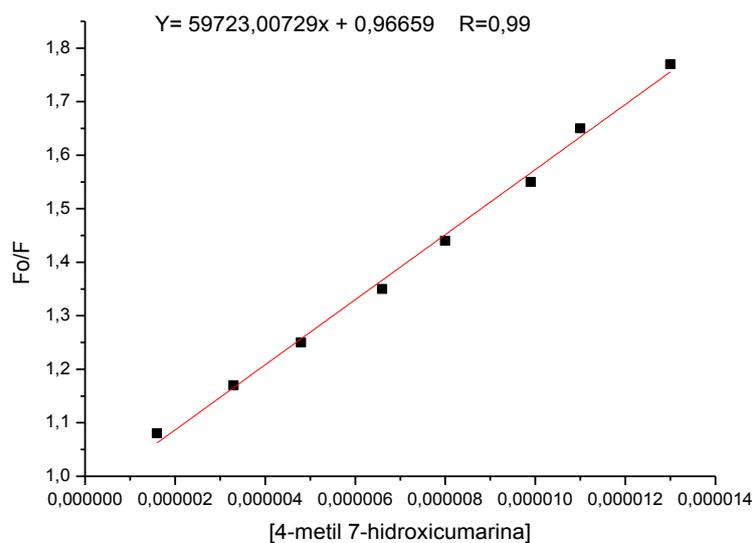


Figura 129- Gráfico de Fo/F para a ASB após a adição de diferentes concentrações de 4-metil-7-hidroxicumarina, a T=298K.

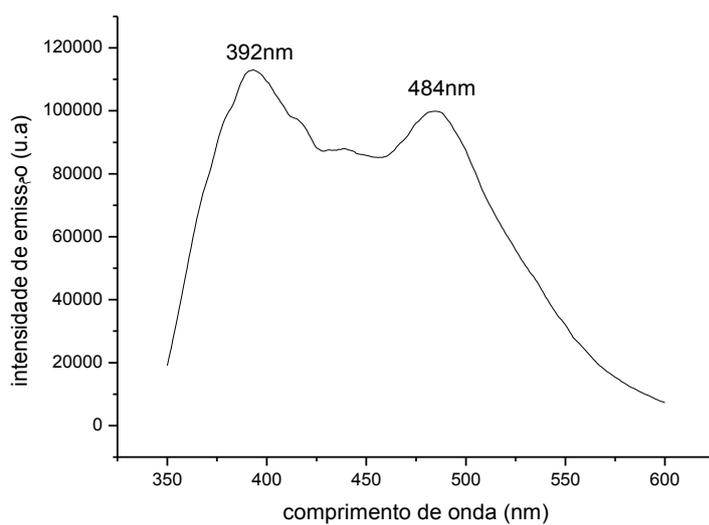


Figura 130- Espectro de emissão de fluorescência para 4-metil-7-hidroxicumarina, em etanol ( $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$ )

Tabela 64- Valores de T(K),  $K_{SV}$  e  $k_q$  para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina em diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	Constante de Stern- Volmer ( $K_{SV}$ )  L.mol <sup>-1</sup>	Constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ).  L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
288	$6,47 \times 10^4$	$6,47 \times 10^{12}$
293	$6,12 \times 10^4$	$6,12 \times 10^{12}$
298	$5,97 \times 10^4$	$5,97 \times 10^{12}$

A constante de velocidade de supressão da fluorescência da ASB ( $k_q$ ) nas temperaturas estudadas é 3 ordens de grandeza superior à constante de velocidade de difusão em meio aquoso ( $k_{dif} \cong 5 \times 10^9$  L/mol.s), donde se conclui que o processo de supressão ASB/4-metil-7-hidroxicumarina é do tipo estático e não dinâmico, com a variação de temperatura não influenciando o valor de  $k_q$ .

A constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), foi obtida por meio dos gráficos de Stern-Volmer modificados empregando-se a equação 20. A tabela 65 apresenta os dados de  $F_0/F_0-F$  para ASB x  $1/[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$  nas temperaturas de 288, 293 e 298K, a partir dos quais foram construídos os gráficos constantes das Figuras 131-133 que permitiram a obtenção dos valores de  $K_a$ .

Tabela 65- Valores de  $F_0/F_0-F$  da ASB x  $1/[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$  em diferentes temperaturas.

$1/[ASB + 4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$	$F_0/F_0-F$		
	288	293	298
	2,22	2,22	2,32
$7,61 \times 10^4$	2,39	2,39	2,49
$8,69 \times 10^4$	2,62	2,69	2,79
$1,01 \times 10^5$	3,06	3,09	3,26
$1,21 \times 10^5$	3,67	3,76	3,93
$1,51 \times 10^5$	4,60	4,74	4,84
$2,00 \times 10^5$	6,59	6,75	6,92
$3,00 \times 10^5$	12,50	12,83	13,07

T=288

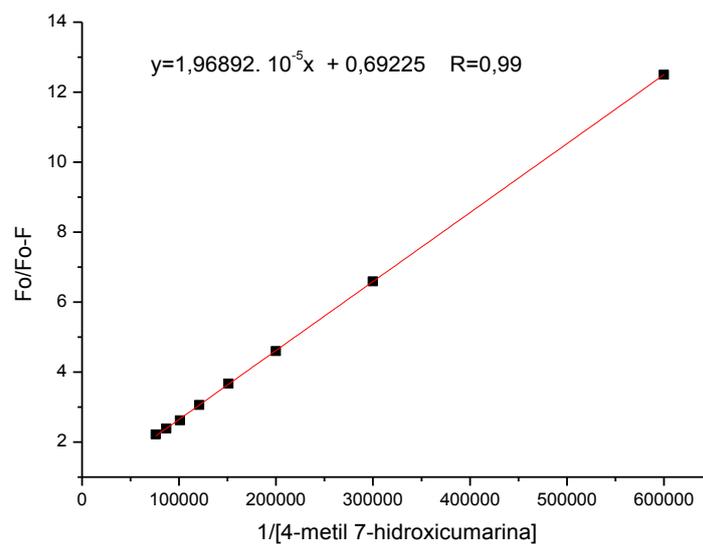


Figura 131- Gráfico de  $F_0/F_0-F$  para ASB x  $1/[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ , a  $T=288\text{K}$ .

T=293K

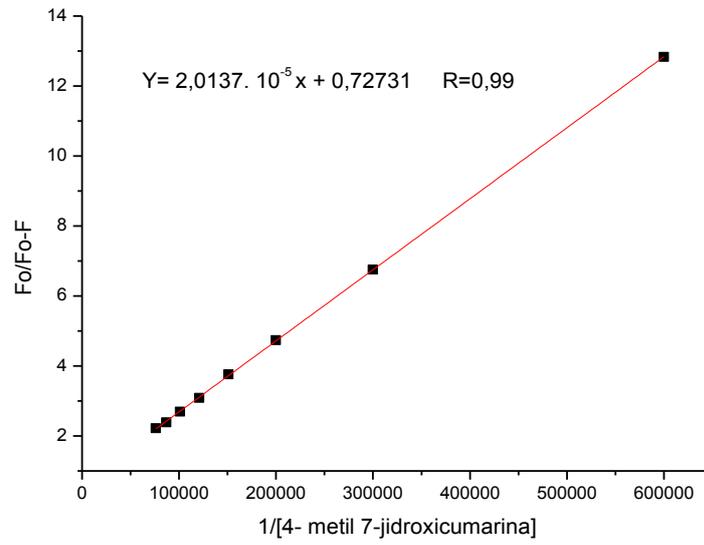


Figura 132- Gráfico de Fo/Fo-F para ASB x 1/[4-metil-7-hidroxicumarina], a T=293K

T=298K

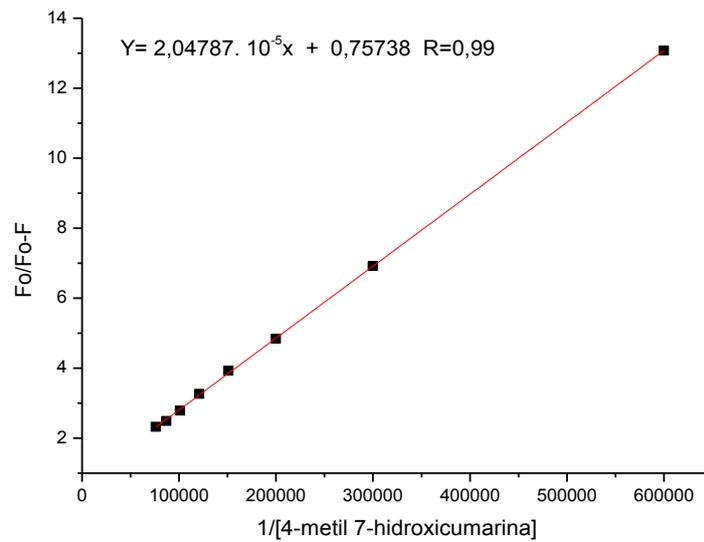


Figura 133- Gráfico de Fo/Fo-F para ASB x 1/[4-metil-7-hidroxicumarina], a T=298K

Baseado nos valores de  $K_a$  obtidos a partir do Stern-Volmer modificado, e empregando-se a equação de Vant'Hoff ( Equação 21), foi construído, a partir da tabela 66, o gráfico constante da Figura 134, que permitiu a obtenção dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  (constante universal dos gases  $R= 8,31 \text{ J.mol/K}$ ) para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina, com o valor de  $\Delta G^0$  sendo calculado a partir da equação 22. Estes valores estão apresentados na Tabela 67.

Tabela 66 - Valores de  $1/T \times \ln K_a$  para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina em diferentes temperaturas.

$1/T$	$\ln K_a$
$3,35 \times 10^{-3}$	10,51
$3,41 \times 10^{-3}$	10,49
$3,47 \times 10^{-3}$	10,46

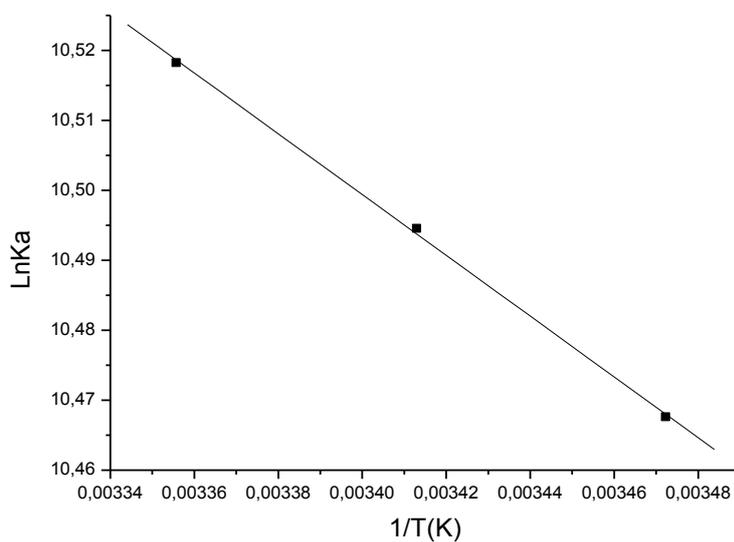


Figura 134- Gráfico de  $\ln K_a \times 1/T$  para ASB/4-metil-7-hidroxicumarina.

Tabela 67- Valores de T(K),  $\Delta G^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta H^0$  para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina.

pH	T(K)	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$
7,4	288	-25,06Kj	0,09Kj	3,61Kj
7,4	293	-25,56Kj		
7,4	298	-26,06Kj		

Os valores de  $\Delta G^0 < 0$  mostrados na tabela 67 indicam uma espontaneidade na interação entre ASB e 4-metil-7-hidroxicumarina, ao passo que os valores de  $\Delta H^0 > 0$  e  $\Delta S^0 > 0$  indicam interações hidrofóbicas.

A constante de supressão efetiva e o número de sítios de ligação ao sistema (Equação 23) foram determinados a partir dos valores de  $\log[F_0-F/F]$  x  $\log [4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$  e mostrados na tabela 68. Estes valores foram empregados para a construção dos gráficos apresentados nas figuras 135-137.

Tabela 68 –Valores de  $\log(F_0-F/F)$  da ASB x  $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$  nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

Log[ 4-metil-7-hidroxicumarina]	Log( $F_0-F/F$ )		
	288K	293K	296K
-5,77	-1,06	-1,07	-1,08
-5,47	-0,74	-0,75	-0,76
-5,30	-0,55	-0,57	-0,58
-5,17	-0,42	-0,43	-0,45
-5,08	-0,32	-0,33	-0,34
-5,00	-0,22	-0,24	-0,25
-4,93	-0,15	-0,16	-0,18

-4,88	-0,07	-0,09	-0,11
-------	-------	-------	-------

T=288K

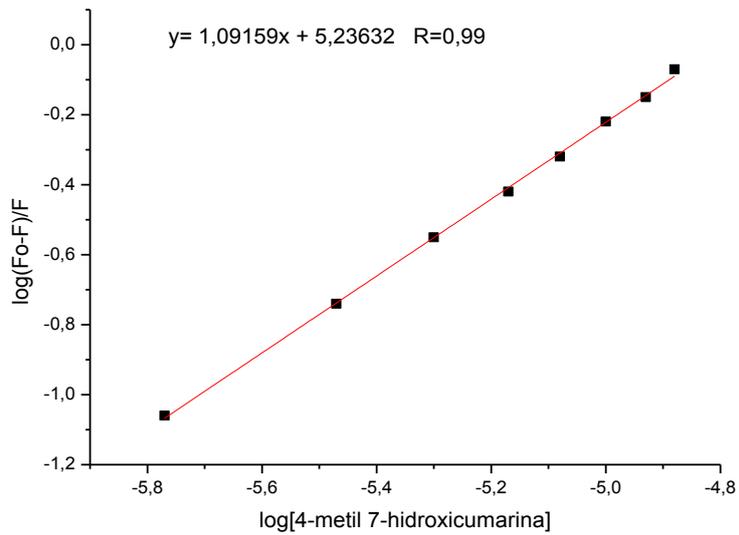


Figura 135- Gráfico de  $\log(F_o-F)/F$  para ASB x  $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ , a  $T=288\text{K}$

T=293K

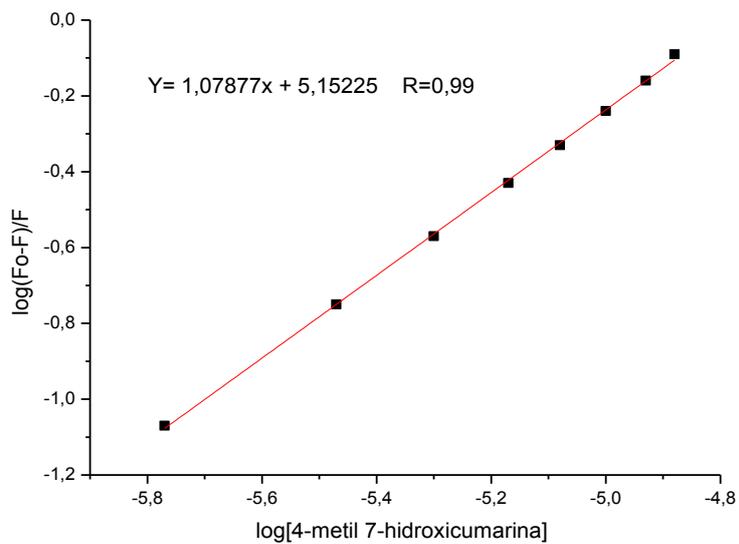


Figura 136- Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  para ASB x  $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ , a  $T=293\text{K}$

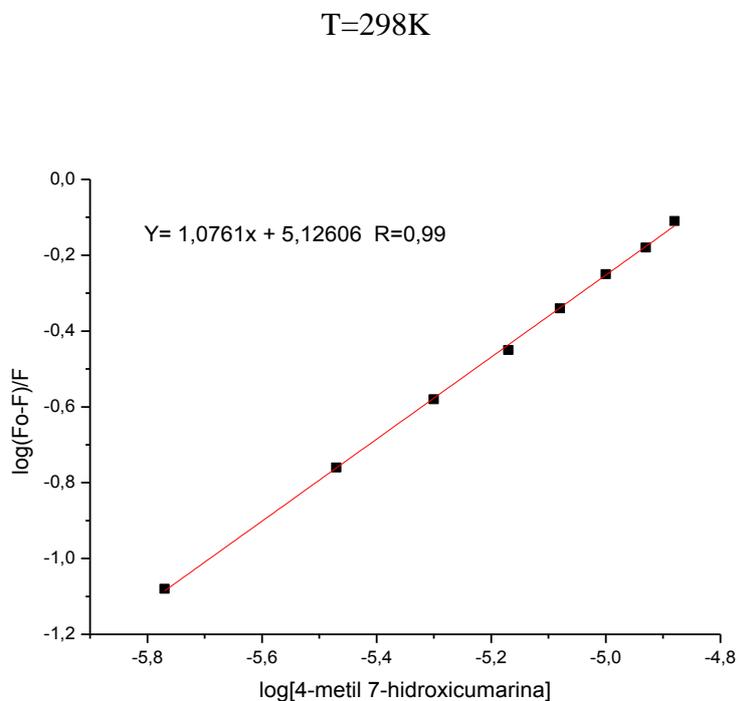


Figura 137- Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  para ASB x  $\log[4\text{-metil-7-hidroxicumarina}]$ , a  $T=298\text{K}$

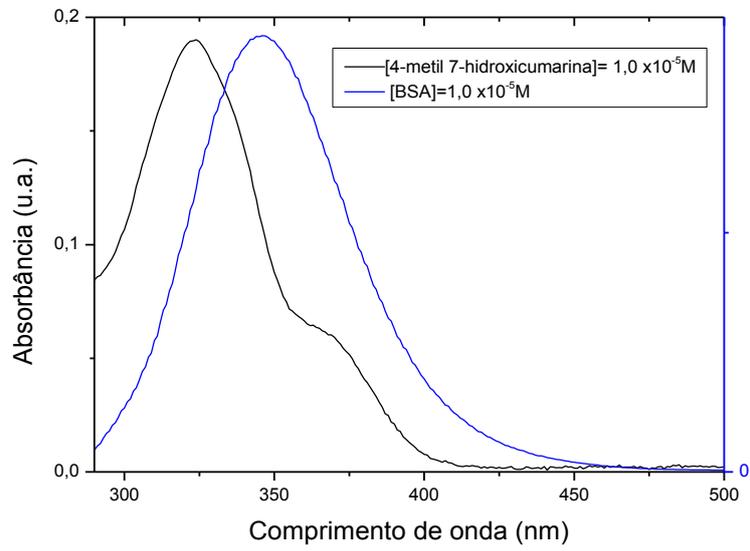
A partir destas figuras foram determinados os valores de “ $K_b$ ” e “ $n$ ” nas temperaturas de 288, 293 e 298K (Tabela 69). Dos dados constantes desta tabela pode-se notar que não há contribuição da temperatura sobre o comportamento da constante de velocidade de ligação efetiva, tendo em vista a constância dos valores encontrados, na ordem de  $10^5$ , para as diferentes temperaturas utilizadas. Quanto ao número de sítios de ligação, os valores obtidos demonstram haver somente um sítio de interação ( $n=1$ ) entre a ASB e a 4-metil-7-hidroxicumarina.

Tabela 69- Dados de  $K_b$  e  $n$  para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

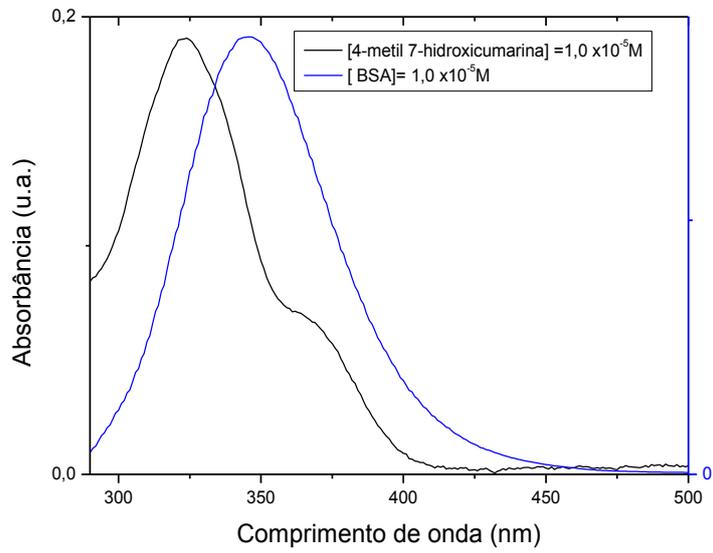
Temperatura (K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ )	Sítio de ligação ( $n$ )
288	$1,72 \times 10^5$	1,09
293	$1,41 \times 10^5$	1,07
298	$1,33 \times 10^5$	1,07

A sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência para ASB e de absorção eletrônica para 4-metil-7-hidroxicumarina permite a obtenção de diversos parâmetros, tais como “J”, “ $R_0^6$ ”, “ $r^6$ ”, “R” e “r” (Equações 24-27) que permitem auxiliar na identificação do possível mecanismo envolvido no processo de transferência de energia entre o resíduo do triptofano da ASB e a 4-metil-7-hidroxicumarina. Esta sobreposição dos espectros, nas temperaturas de 288, 293 e 298K, vai apresentada nas Figuras 138.1, 138.2 e 138.3 e os valores para os parâmetros listados acima (empregando-se  $\lambda$  em cm e os seguintes valores para a ASB:  $K^2 = 2/3$ ,  $N=1,336$  e  $\phi=0,15$  [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)]), estão mostrados na tabela 70.

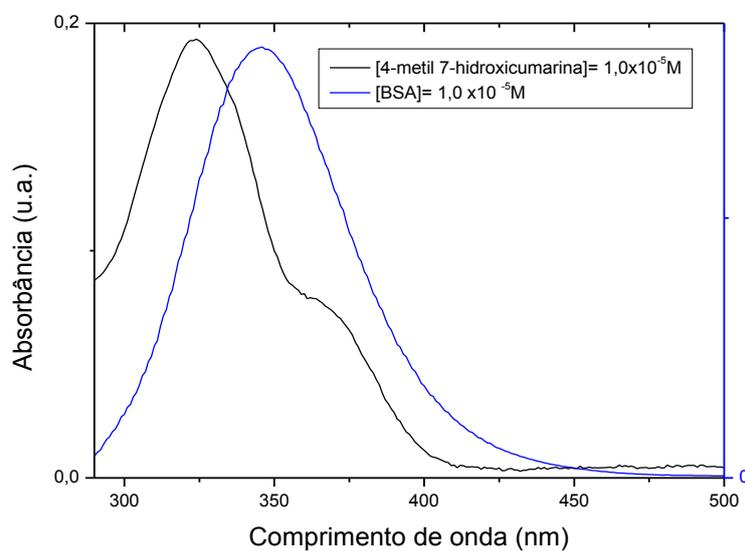
T=288K



T=293K



T=298K



Figuras 138.1, 138.2 e 138.3 - Sobreposição dos espectros de Fluorescência para ASB ( $[1,00 \times 10^{-6} \text{M}]$ ) e de absorção para 4-metil-7-hidroxicumarina ( $[1,00 \times 10^{-6} \text{M}]$ ) nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

Tabela 70- Valores de  $J$ ,  $R_0^6$ ,  $r^6$ ,  $R$  e  $r$  para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina nas temperaturas de 288, 293 e 298K.

T	J	$R_0^6$	E	$R^6$	$R_0(\text{cm}^{-1})$	$r(\text{cm}^{-1})$
288K	$1,31 \times 10^{-14}$	$1,55 \times 10^{-39}$	0,20	$5,99 \times 10^{-39}$	$3,40 \times 10^{-7}$	$4,26 \times 10^{-7}$
293K	$1,37 \times 10^{-14}$	$1,62 \times 10^{-39}$	0,20	$6,36 \times 10^{-39}$	$4,26 \times 10^{-7}$	$4,30 \times 10^{-7}$
298K	$1,47 \times 10^{-14}$	$1,71 \times 10^{-39}$	0,18	$7,52 \times 10^{-39}$	$3,45 \times 10^{-7}$	$4,43 \times 10^{-7}$

Os resultados mostrados na tabela 70 permitem que possamos obter algumas conclusões sobre o tipo de mecanismo operante no processo de transferência de energia entre o resíduo do triptofano da ASB e a 4-metil-7-hidroxicumarina. A distância efetiva entre ASB e a cumarina tem um valor médio de “ $r$ ” igual 4,3 nm enquanto que o raio de Förster “ $R_0$ ” apresentou um valor médio de 3,7nm nas três temperaturas. Como  $r > R_0$ , não há probabilidade da existência de um mecanismo de transferência de energia por ressonância fluorescente (mecanismo de Förster ou “FRET”) no fenômeno da supressão fluorescente no sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina, nota-se também que não há nenhuma contribuição das temperaturas sobre o processo FRET neste sistema.

Observando os dois sistemas cumarínicos ASB/4-metil-7-hidroxicumarina e ASB/4-metil-7-hidroxicumarina pode-se não houve mudança significativa sobre o espectro de absorção dos dois sistemas quando se considera a metilação da 4-metil-7-hidroxicumarina. Isto indica que a metilação é um fator que não altera a absorção da ASB quando a mesma está associada a 4-metil-7-hidroxicumarina ou 4-metil-7-hidroxicumarina. As bandas de absorção presentes em ambos os espectros são características e similares nos dois sistemas, a não ser por uma maior definição da banda em 325nm que se apresenta no sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina. Por outro lado, no espectro da ASB/4-metil-7-hidroxicumarina há um maior espalhamento da banda entre 300 e 400nm, o que se pode considerar como uma menor definição da banda característica das coumarinas livres em ambos os sistemas. Com relação às modificações ocorridas na estrutura secundária da ASB, observa-se que, apesar das interações do tipo ASB/4-metil-7-hidroxicumarina e 4-metil-7-hidroxicumarina se darem de forma bastante pronunciada sobre a estrutura secundária da ASB (Tabela 49 e 60), o efeito da metilação sobre a modificação estrutural na macromolécula não foi

representativo quando se compara a alteração relativa do ângulo de  $\alpha$ -hélice entre os sistemas ASB/4-metil-7-hidroxicumarina e ASB/4-metil-7-hidroxicumarina.

Em relação às determinações feitas a partir dos espectros de fluorescência do sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina e ASB/4-metil-7-hidroxicumarina, tem-se, nas três temperaturas empregadas, os seguintes resultados: em ambos os sistemas a supressão foi de natureza estática. ASB/4-metil-7-hidroxicumarina :  $k_q=6,29 \times 10^{12}$ ;  $1,37 \times 10^{12}$ ;  $5,87 \times 10^{12} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ; ASB/4-metil-7-hidroxicumarina:  $k_q=6,47 \times 10^{12}$ ,  $6,12 \times 10^{12}$ ,  $5,97 \times 10^{12} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . As interações foram predominantemente hidrofóbicas ASB/4-metil-7-hidroxicumarina:  $\Delta G^\circ= -25,67$ ;  $-25,69$ , e  $-25,72 \text{ KJ}$ ;  $\Delta S^\circ= 0,00\text{KJ}$ ;  $\Delta H^\circ=24,08\text{KJ}$  e ASB/4-metil-7-hidroxicumarina:  $\Delta G^\circ= -25,06$ ;  $-25,56$  e  $-26,06 \text{ KJ}$ ;  $\Delta S^\circ= 0,09\text{KJ}$ ;  $\Delta H^\circ=3,61\text{KJ}$ . Ambos os sistemas apresentam um sítio de ligação, ASB/4-metil-7-hidroxicumarina:  $n=1$ . Sobre o efeito FRET não há probabilidade de ocorrência desse efeito nas três temperaturas estudadas em nenhum dos sistemas cumarínicos. Ressalte-se, no entanto, que para o sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina em  $T=288\text{K}$  houve uma probabilidade mínima de transferência de energia por ser o raio de Förster igual ao raio mínimo encontrado entre as duas espécies (composto bioativo).

Os resultados obtidos estão sumarizados a seguir: sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina,  $R_o=3,50 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r= 3,50 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=296\text{K}$ ;  $R_o= 3,52 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r= 3,97 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=303\text{K}$ ;  $R_o= 3,58 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r=4,02 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=310\text{K}$ . sistema ASB/4-metil-7-hidroxicumarina:  $R_o=3,40 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r= 4,26 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=296\text{K}$ ;  $R_o= 4,26 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r= 4,30 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=303\text{K}$ ;  $R_o= 3,45 \times 10^{-7} \text{ cm}$  e  $r=4,43 \times 10^{-7} \text{ cm}$  em  $T=310\text{K}$ .

#### 4.0 Estudos de Emissão de Fluorescência com Resolução Temporal.

Como dito anteriormente, o processo de supressão da fluorescência de albumina sérica bovina pode se dar via um mecanismo estático no qual há uma pré-associação ASB-supressor. No estado fundamental, ou dinâmico, a ASB e o supressor interagem durante o decaimento da fluorescência da albumina [Lakowicz 2006]. No caso da supressão dinâmica, a constante de velocidade de supressão da fluorescência da albumina será dependente da concentração do supressor; observando-se então, um aumento desta constante de velocidade com o aumento da concentração do supressor. Entretanto, isto não ocorre no caso de uma supressão estática, na qual não se observa nenhuma variação do tempo de vida de emissão de fluorescência do fluoróforo (albumina) em função da concentração do supressor.

O decaimento da fluorescência da albumina pode ser facilmente observado após excitação a 280 nm de uma solução 1,00  $\mu\text{M}$  em PBS, conforme mostrado na Figura 139. Observa-se nos espectros a seguir que o decaimento mais curto correspondente ao perfil de decaimento do laser empregado no processo de excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

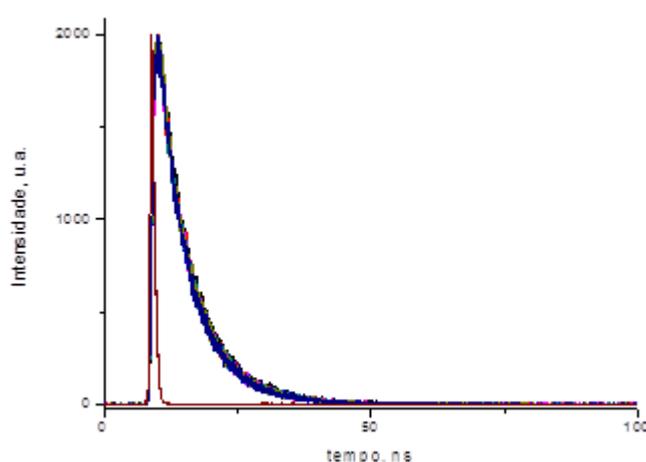


Figura 139 – Curva de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina em PBS (1,00  $\mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

Para que se tivesse uma confirmação adicional de que a supressão da albumina sérica bovina pelos compostos estudados neste trabalho (rutina, rutina metilada,  $\beta$ -lapachona, ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico, 7-hidroxycumarina e 4-metil-7-hidroxycumarina) corresponde a um processo estático, foram realizados experimentos empregando-se a espectroscopia de emissão de fluorescência com resolução temporal. Assim, alíquotas de concentração conhecida de cada um dos supressores foram adicionadas a uma solução de ASB (concentração:  $1,00 \mu\text{M}$ ). A partir disso foi determinado o tempo de vida de decaimento da fluorescência da albumina após cada adição do supressor; em todos os casos, não se observou mudança no tempo de vida de fluorescência para a albumina em qualquer concentração dos supressores. As Figuras 140-145 demonstram as conclusões. Sendo assim, estes resultados confirmam o caráter estático da supressão da albumina por: rutina, rutina metilada,  $\beta$ -lapachona, ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico, cumarina e 4-metil-7-hidroxycumarina.

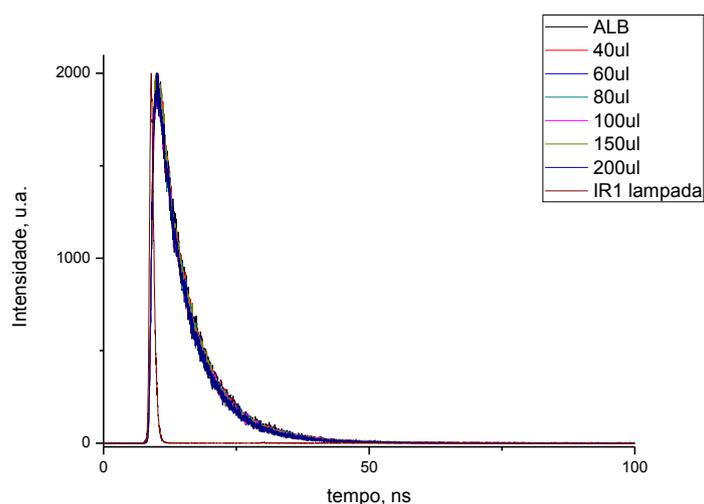


Figura 140 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de rutina (0 –  $24,8 \mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação.

$$(\lambda = 280 \text{ nm}).$$

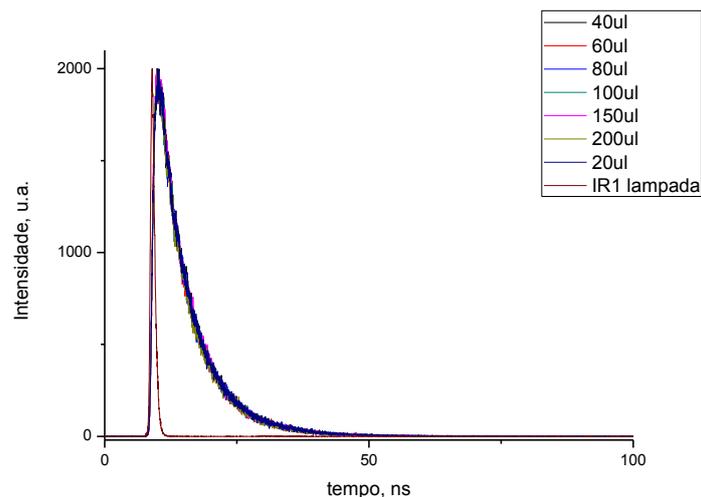


Figura 141 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de rutina metilada (0 – 24,8  $\mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

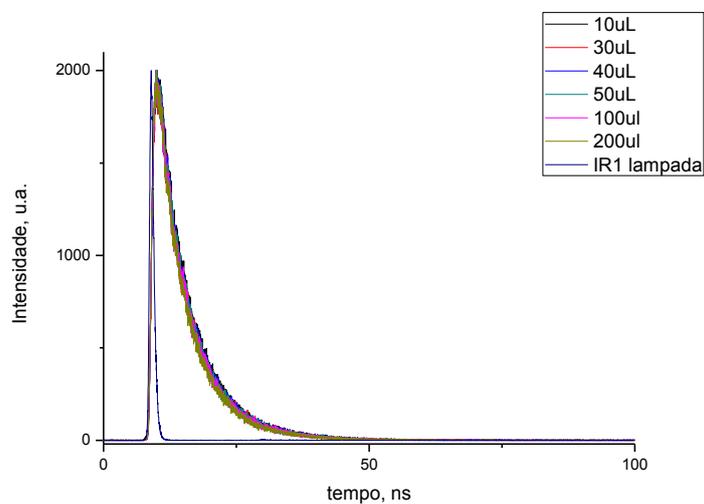


Figura 142 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de  $\beta$ -lapachona (0 – 24,8  $\mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

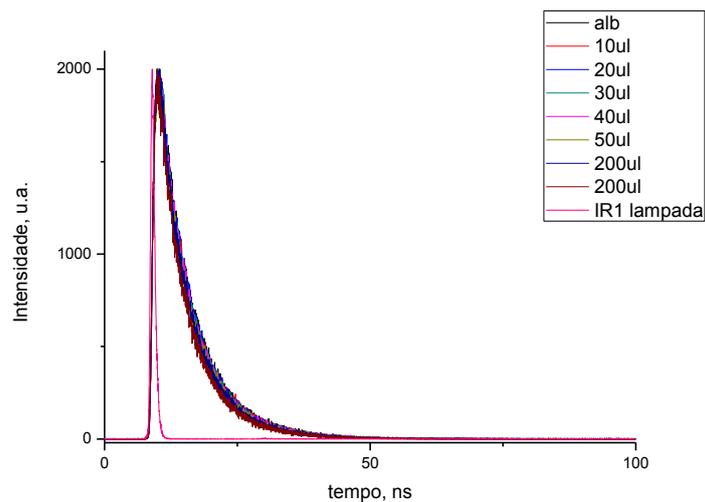


Figura 143 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas do ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico (0 – 24,8  $\mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

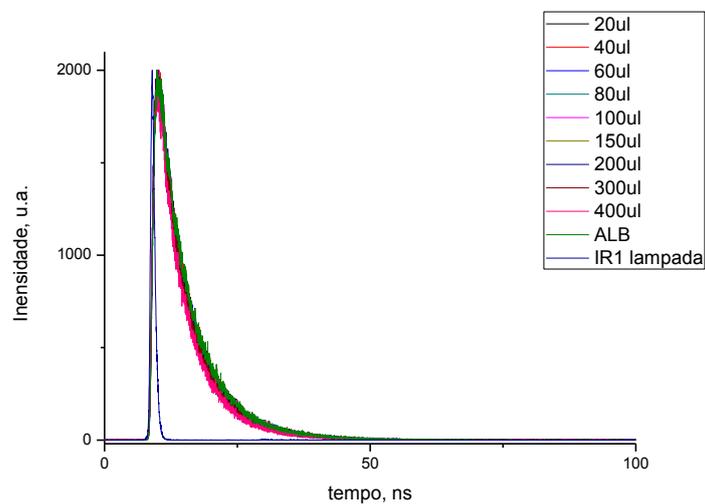


Figura 144 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de 7-hidroxycumarina (0 – 24,8  $\mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

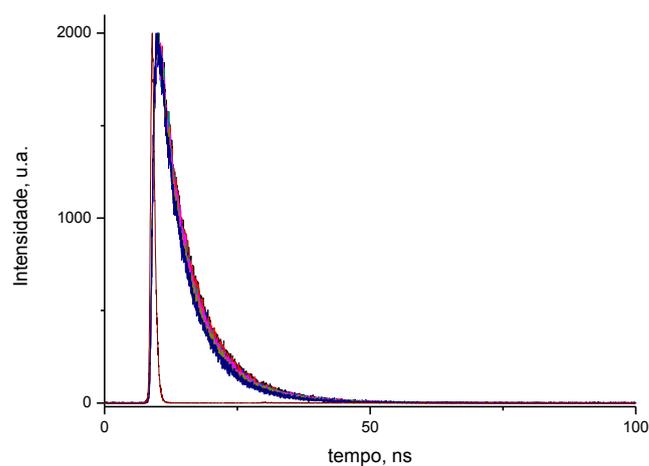


Figura 145 – Curvas de decaimento para a fluorescência de albumina sérica bovina ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), em PBS, na presença de concentrações variadas de 4-metil-7-hidroxi-cumarina (0 –  $24,8 \mu\text{M}$ ). O decaimento mais curto corresponde ao perfil do laser empregado na excitação ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).

## 5.0 Conclusões

1. Os espectros de absorção para ASB/ rutina , ASB/ rutina-metilada, ASB/ $\beta$ -lapachona, ASB/3-ácido sulfônico  $\beta$ -lapachona, ASB/-hidroxycumarina e ASB/4-metil-7-hidroxycumarina apresentam efeito hipercrômico. Ao observarmos os espectros de absorção do sistema ASB/rutina há um deslocamento do comprimento de onda máximo de absorção devido ao incremento de alíquotas de rutina.

2. Resultados de dicroísmo circular mostraram que todos os sistemas estudados apresentaram modificações importantes na estrutura secundária da ASB, conforme observação dos valores dos ângulos de  $\alpha$ -hélice da albumina como uma função da variação de concentração dos ligantes.

3. Empregando-se a espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário, observou-se que as interações existentes nos sistemas ASB-supressor, em todos os sistemas, foram estáticos, isto é devido aos valores das constantes de velocidade de supressão da fluorescência da albumina pelos supressores ( $k_q \approx 10^{12}$ - $10^{13}$  Lmol<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) ser bem superior à constante de velocidade de difusão no meio ( $k_{diff}^{PBS} \approx 10^9$  Lmol<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>).

4. O tipo de interação albumina/supressor foi predominantemente hidrofóbica, como demonstrado pelos valores das grandezas termodinâmicas ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ ), interação esta que ocorreu em um único um sítio ativo.

5. Empregando espectroscopia de emissão de fluorescência com resolução temporal, ficou inequivocamente demonstrado que o processo de supressão da fluorescência intrínseca da albumina pelos diferentes supressores empregados neste trabalho foi estático.

6- Em termos de grupos químicos as cumarinas estabeleceram as interações mais pronunciadas em relação às outras classes de compostos que fizeram parte deste estudo. Os valores das constantes cinéticas, associadas com os espectros de supressão demonstram essa conclusão.

7- Ao observarmos as cumarinas em relação às rutinas e  $\beta$ -lapachonas verifica-se que as interações do sistema cumarina/ASB foram mais pronunciadas.

## 6.0 Referências bibliográficas

- [BAHATTACHARYA 2000]- Bhattacharya, A. A; Curry, S.; Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 38731.
- [BARRONI 2001]- Baroni, S.; Mattu, M.; Vannini, A.; Cipollone, R.; Aime, S.; Ascenzi, P.; Fasano, M. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 6214.
- [BOAMING 2009]- Ji, B.; Li, Doajim.; Sun, H. *Spectrochim. Acta Part A.* **2009**, 73, 35.
- [BAHATTACHARYA 2009]- Bahattacharya, B.; Nakka,S.; Guruprasad, L.; Samanta, A. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 2143–2150,113.
- [BANERJEE 2008]- Banerjee, A.; Basu, K.; Sengupta, P. K. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2008**, 90, 33.
- [CARVALHO 2006]- Carvalho, M.G.; Rocha Junior, J.G.; Cavatti, L.C.; Suzart, L.R.; Cornelius, M.T.F.; Silva, V.G.; Cardoso, M.A.R *Rev. Univ. Rural, Série Ciências Exatas e da Terra* . **2006**, 1-2: 46-60.
- [CHEN I 2008]-Chen,X.; Qin,J.; Zhang,Y.; Yue,Y. *J. Mol. Struct.* **2008**, 88, 25.
- [CUI 2007]- Cui, F.; Wang, J.; Cui, Y.; Li, J.; Yao, X.; Lu, Y.; Fan, J. *J. Luminesc.* **2007**, 127, 409.
- [CUI 2008]- Cui, F.; Zhang, Q.; Yan, Y.; Yao, X.; Qu, G.; Lu, Y. *Carbohydr. Pol.* **2008**, 73, 464.
- [CUI 2008]- Cui, F. L.; Qin, L. X., Gui-Sheng Zhang, G. S.; Yao, X. J.; Du, J. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008, 42, 221.
- [CHENG et al 2009]- Cheng, X. X.; Lui, Y.; Zhou, B.; Xiao, X-H.; Liu, Y. *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, 72, 922
- [CARTER 1994]- Carter, D.C. ; Ho, J.X. *Adv Protein Chem.* **1994**, 45, 153.
- [CHENG 1972]- Chen, Y. H.; Yang, J. T.; Martinez, H. *Biochem.* **1972**, 11, 4120.
- [DEMANT 1996]- Demant, E.J.F.; *Biochim. Biophys. Acta.***1996**, 43-45, 1304.

- [DINNIZ 2008]-Dinniz, A.; Gilabert, L.E.; Lopes, N.P.; Villanueva-Camãnas, R.M.; Sagrado, S.; Medina-Hernández, M.J. *Anal Bioanal Chem.* **2008**, 391, 625.
- [DUTHIE 1999]- Duthie, S.J.; Dobson, V.L. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur. J. Nutr.* **1999**, 28–34,38
- [EFTINK 1981]- M.R. Eftink, C.A. Ghiron, *Anal. Biochem.* **1981**, 114, 199
- [ERLUND 2000]- Erlund I.; Kosonen T.; Alfthan G.; Mäenpää J.; Perttunen K.; J.; Parantainen J.; Aro A. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2000**, 56, 545.
- [EPPS 1998]- Epps, D. E.; Raub, T. J.; Caiolfa, V.; Chiari, A.; Zamai, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 51, 41
- [FILHO 2007]- Filho, S.L.A. *Caracterização e Estudos Cinéticos de Albumina Tratadas com espécies Reativas Derivadas de Óxidos de Nitrogênio: Espectroscopia de Absorção e Fluorescente*. Dissertação de Mestrado. **2007**
- [FRAZIER 2005]- Frazier, A.; Green, R.J.; Papadopoulou,A. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 158.
- [FERREIRA 2009]- Ferreira, E. S; *Interação Albumina do soro bovino com substratos sintéticos*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. **2009**.
- [GILBERT 1991]- Gilbert, A.; Bagott.J. *Essentials of Molecular Photochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. **1991**.
- [GUO 2004]- Guo, M.; Zou, J. W.; Yi, P. G.; Shang, Z. C.; Hu, G. X.; Yu, Q. S. *Anal. Sci.* **2004**, 20, 46.
- [GUO 2009]- X.-J. Guo, X.-D. Sun, S.-K. Xu, *J. Mol. Struct.* **2009**, 931, 55.
- [GUARDIAN 2001]- Guardian, T.; Rotelli, A.E.; Juarez, A.O.; Pelzer, L.E. *Farmaco* **2001**, 56, 683.
- [GAO 2004]- Gao, H.; Lei, L.; Liu, J.; Kong, Q.; Chen, X.; Hu, Z. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2004**, 167, 21.
- [HE 1992]- He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, 358, 209.

- [HE 2005]- He, W.; Li, Y.; Tian, J.; Liu, H.; Hu, Z.; Chen, X. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2005**, *174*, 53.
- [HE 2005]- He, W.; Li, Y.; Xue, C.; Hu, Z.; Chen, X.; Sheng, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1837.
- [HE 2006]- He, W. Y.; Li, Y.; Si, H. Z.; Dong, Y. M.; Sheng, F. L.; Yao, X. J.; Hu, Z. D. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2006**, *182*, 158.
- [HU 2004]- Hu, Y. J.; Liu, Y.; Shen, X. S., Fang, X. Y.; Qu, S. S. *J. J. Mol. Struc.* **2005**, *738*, 143.
- [HU 2005]- Hu, Y. J.; Liu, Y.; Shen, X. S., Fang, X. Y.; Qu, S. S. *J. J. Mol. Struc.* **2005**, *738*, 143.
- [HU 2005]- Hu, Y. J.; Liu, Y.; Zhang, L. X., Zhao, R. M.; Qu, S. S. *J. Mol. Struc.* **2005**, *750*, 174.
- [HUSSAIN 2009]- Hussain, S.A. *General Physics*, **2009**, 0908, 1815.
- [HORROCKS Jr 1981]- Horrocks Jr., W. D. W.; Collier, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2856.
- [JI 2009]- Ji, B.; Sun, H.; Li, D. *Spectrochimica Acta Part A*. 2009, 35-40,73.
- [KANAKIS 2006]- Kanakis, C. D.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Diamantoglou, S.; Riahi, H. A. T. *J. Mol. Struc.* **2006**, *798*, 69.
- [KELLY 2005]- Kelly, S. M.; Tess, T. J.; Price, N. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119.
- [KHAN 2002]- Khan, M. A.; Muzzamil, S.; Musarrat, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, *30*, 243.
- [KANDAGAL 2006]- Kandagal, P. B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Shaikh, S. M. T.; Jadegoud, Y.; Ijare, O. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 393.
- [KANDAGAL 2006]- Kandagal, P. B.; Seetharamappa, J.; Ashoka, S.; Shaikh, S. M. T.; Manjunatha, D. H. *J. Int. J. Biol. Macromol.* **2006**, *39*, 234.

- [KAREMAN 1967]- Karreman, G.; Steele, R. H.; Györgyi, A. S. *Biochem.* **1967**, *11*, 140.
- [LAKOWICZ 2006]- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, **2006**, 278
- [LIU 2008]- Liu, X; Xi, P.; Chen, F.; Xu, Z.; Zeng, Z. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2008**, *92*, 98.
- [LU 2008]- Lu, K.; Ba, C.; Chen, C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**, *47*, 888.
- [LIU 2010]- Liu, E.; Qi, L.; Li, P. *Molecules* **2010**, *15*, 9092.
- [LI 2007]- Li, D.; Zhu, J.; Jin, J.; Yao, X. *J. Mol. Struct.* **2007**, *846*, 34.
- [LI 2007]- Li, Y.; Yao, X.; Jin, J.; Chen, X.; Hu, Z. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1774*, 51.
- [LI 2009]- Li, D.; Ji, B.; Sun, H. *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, *73*, 35.
- [LI 2008]- Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z. *J. Mol. Struct.* **2008**, *885*, 64.
- [LIU 2003]- Liu, J.; Tian, J. N.; Zhang, J.; Hu, Z.; Chen, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 864.
- [MARQUES 1984]- Marques, A. S.; Estudos Espectroscópicos das Propriedades Luminescentes das Cumarinas à 77K. Tese de Doutorado. **1984**.
- [MONTI 2009]- Monti, S.; Manet, I.; Manoli, F.; Ottani, S.; Marconi, G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 805.
- [MACHADO 1998]- Machado, E.H; Química Nova. **2000**, *2*, 23.
- [MIDDLETON 2000]- Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673.
- [MAHESHA 2006]- Mahesha, H. G.; Singh, S. A.; Srinivasan, N.; Rao, A. G. A. *FEBS J.* **2006**, *273*, 451.

- [NAVEENRAJ 2013]- Naveenraj, S.; Anandan, S. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2013**, *14*, 53.
- [NETTO-FERREIRA 2008]- Netto Ferreira, J.C.; Bernardes, B.; Ferreira, A.B.B.; Miranda, M.A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 467.
- [PATUSKHOV 2007]- Pastukhov, A. V.; Levchenko, L. A.; Sadkov, A. P. *J. Mol. Struct.* **2007**, *842*, 60.
- [PETITPAS 2001]- Petitpas, I.; Bhattacharya, A.; Twine, S.; East, M.; Curry, S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22804.
- [PETERS 1986]- Peters, T. *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, **1996**.
- [PATUSKHOV 2006]- Pastukhov, A.V.; Levchenko, L.A.; Sadkov, A.P. *J. Mol. Struct.* **2007**, *60-66*, 842.
- [RIBEIRO 1990]- Ribeiro, F. W.; Pinto, M. C. F. R.; Pinto, A. V.; Oliveira, C. G. T.; Ferreira, V. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **1990**, *55-57*,1.
- [PEREIRA 2007]- Pereira, A.P.; Ferreira, I. C.; Marcelino, F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento A.; Pereira, J.A. *Molecules* **2007**, *12*, 1153.
- [QING 2009]- Qing, W. Y.; Ping, T. B.; Mei, Z. H.; Hua, Z. Q.; Cheng, Z. G. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2009**, *94*, 183.
- [QI 2008]- Qi, Z. D.; Zhou, B.; Xiao, Q.; Shi, C.; Liu, Y.; Dai, J. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2008**, *193*, 81.
- [ROTELLI 2005]- Qi, Z. D.; Zhou, B.; Xiao, Q.; Shi, C.; Liu, Y.; Dai, J. *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, *193*, 81.
- [SENGUPTA 2002]- Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *299*, 400.
- [SHI 2007]- Shi, X. Y.; Cao, H.; Ren, F. L.; Xu, M. *Chem. Biodiver.* **2007**, *4*, 2780.
- [SIVAKUMAR 2011]- R. Sivakumar, S. Naveenraj, S. Anandan, *J. Lumin.* **2011**, *131*, 2195

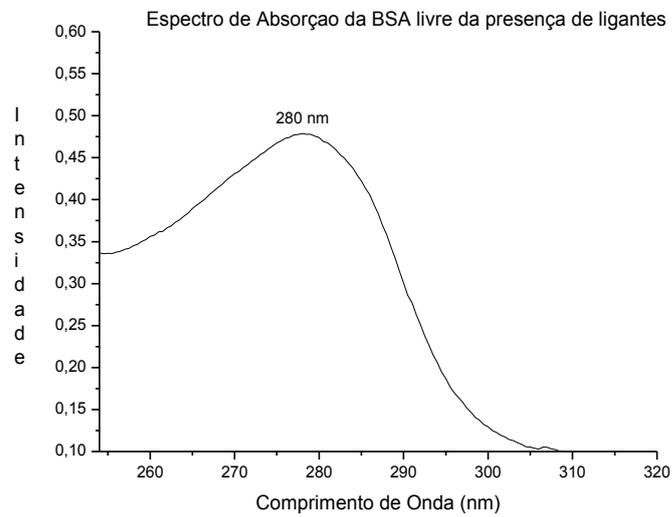
- [STAN 2009]- Stan, D.; Matei, I.; Mihailescu, C; Savin, M.; Matache, M; Hillebrand, M.; Baci, I. *Mol.* **2009**, *14*, 1614.
- [SUBRAMANIAN 1998]- Subramanian, S.; Ferreira, M. M. C.; Trsic, M. *Struct. Chem.* **1998**, *9*, 47.
- [SUGIO 1999]-Sugio,S.; Kasshima,A.; Mochizuki,S.; Noda,M.; Kobayashi,K. *Protein Eng.***1999**, *12*, 439.
- [SYNTNIK e LITVINYK 1996]- Sytnik, A.; Litvinyuk, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12959.
- [SKLAR 1977]- Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. *Biochem.* **1977**,*16*, 5100.
- [TANG 2005]- Tang, J.; Qi, S.; Chen, X. *J. Mol. Struct.* **2005**, *779*, 87.
- [TANG 2005]- Tang, K.; Qin, Y. M.; Lin, A. H.; Hu, X.; Zou, G. L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 404.
- [TANG 2006]- Tang, J.; Luan, F.; Chen, X. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3210.
- [TIAN 2005]- Tian, J.; Liu, J.; Hu, Z.; Chen, X. *Amer. J. Immunology* **2005**, *1*, 21.

## **ANEXOS**

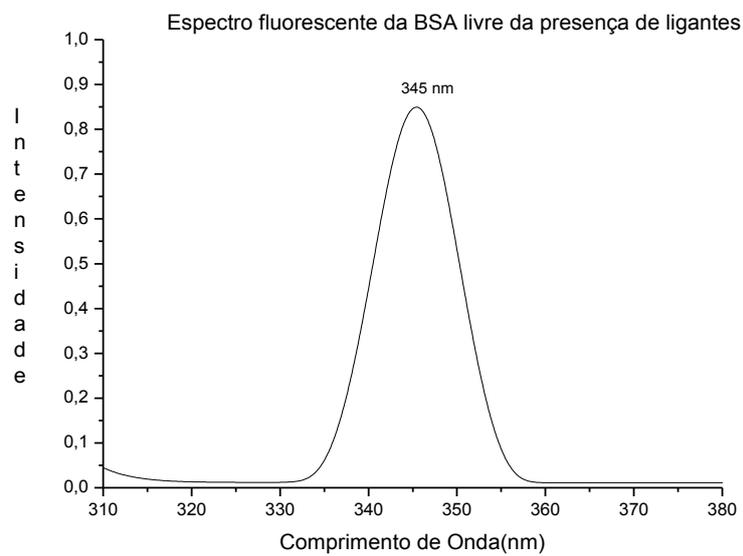
# Espectros de absorção no Uv-vis e de emissão fluorescente: ASB

T=298K

$\lambda_{\text{máx}}$  absorção=280nm



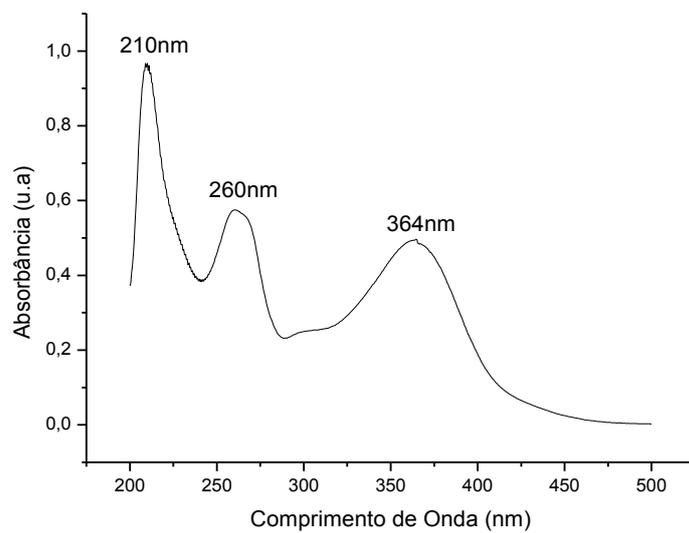
$\lambda_{\text{max}}$  emissão= 345nm



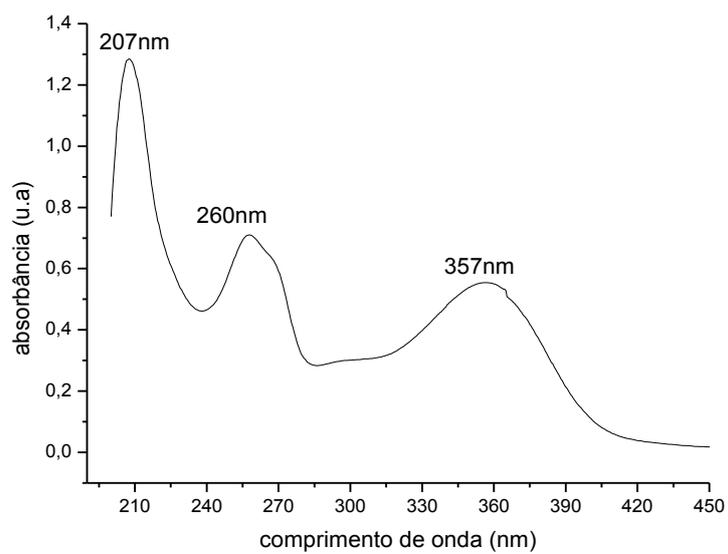
## Espectros de absorção no Uv-vis: rutina e rutina-trimetilada

T=298K

rutina



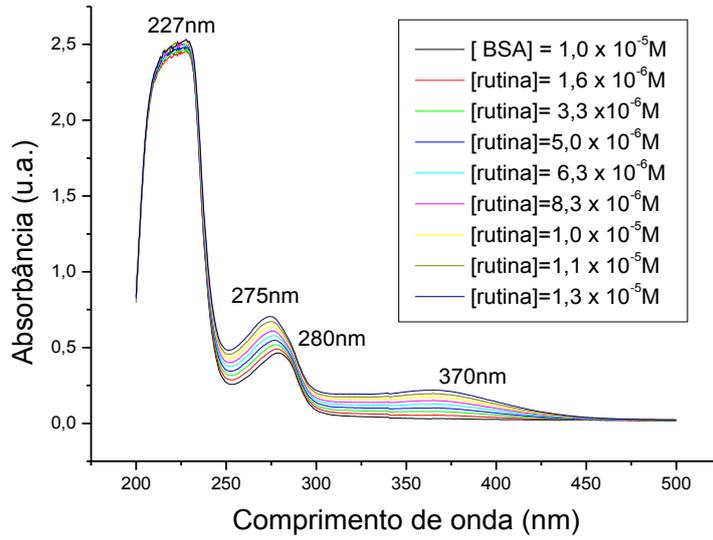
Rutina-metilada



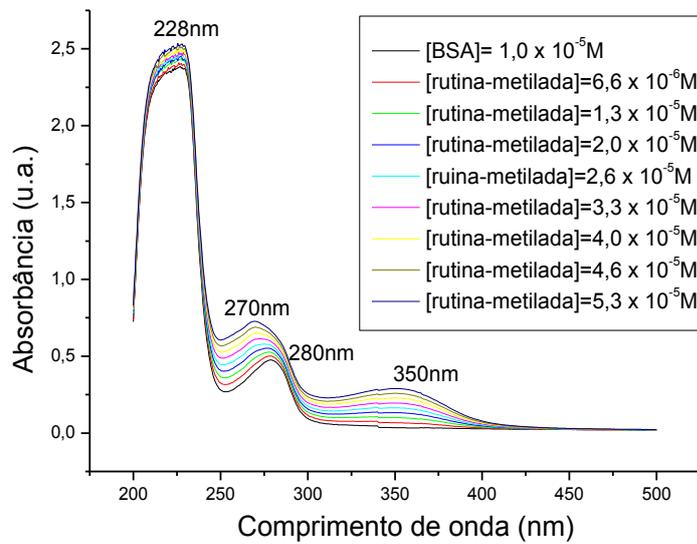
Espectros de absorção: ASBx rutina e ASB x rutina-metilada.

T=298

ASB x rutina



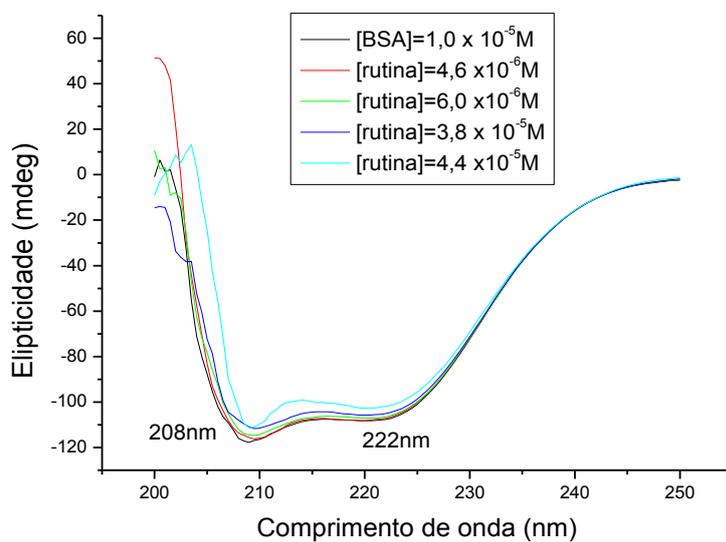
ASB x rutina-metilada



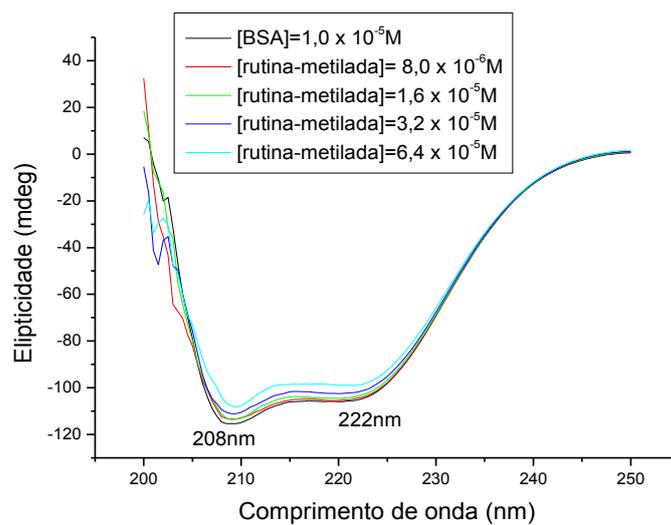
Espectros de absorção por Dicroísmo Circular: ASB x rutina e ASB x rutina-metilada.

T=296K

ASB x rutina

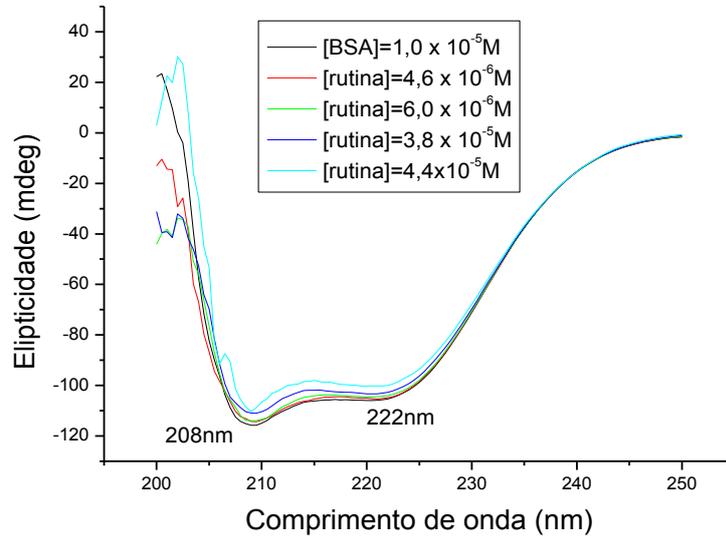


ASB x rutina-metilada

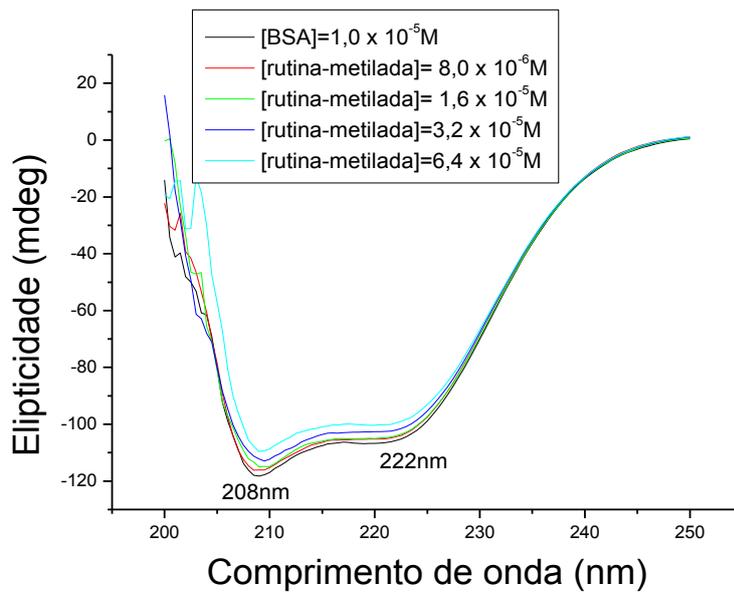


T=303

ASB x rutina

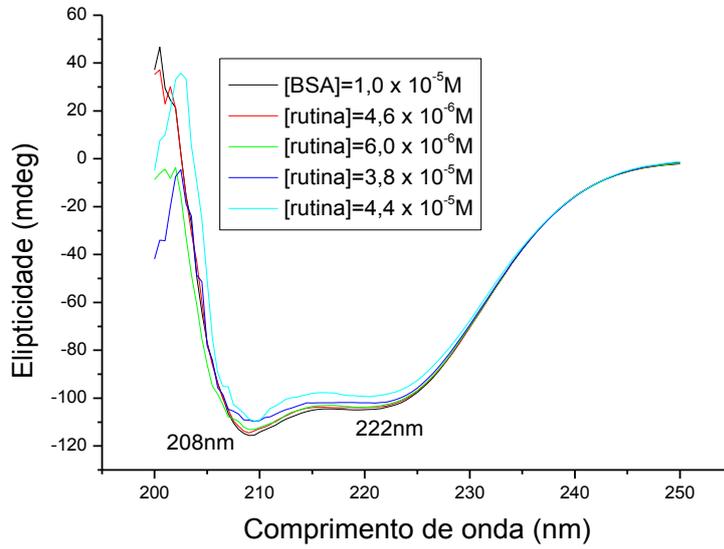


ASB x rutina-metilada



T=310K

ASB x rutina



ASB x rutina-metilada

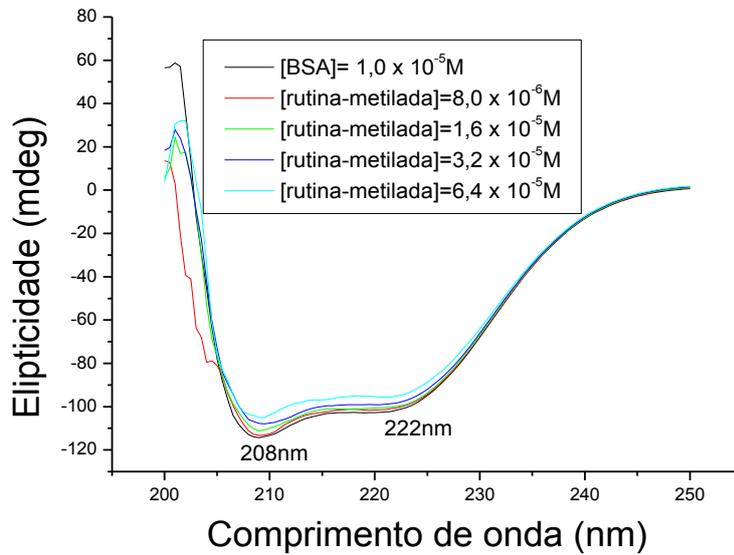


Tabela de valores para ângulo de  $\alpha$ -hélice.

ASB x rotina

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
54,90461	53,31519	53,90982	51,98846	53,18106	51,2040
53,4933	53,04078	52,69996	51,73307	52,4369	50,85695
52,59569	52,89726	52,49437	51,28452	51,19386	50,52975
50,18012	51,8652	50,62804	50,49516	49,40218	49,95021
47,7284	50,07837	48,74333	48,97866	47,48371	48,08212

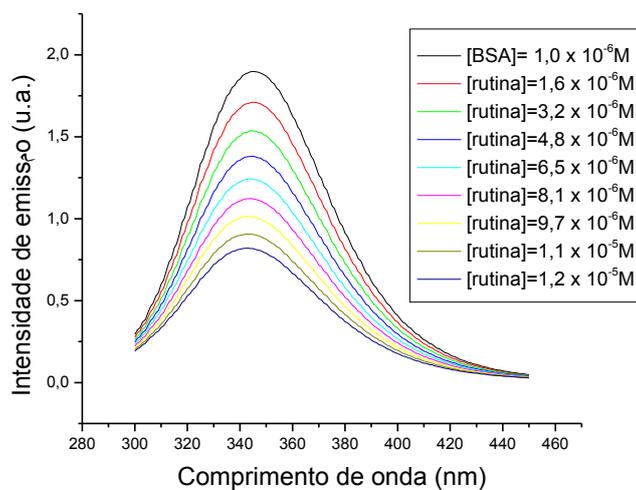
ASB x rotina-metilada

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
54,13497	51,91567	54,42469	52,24286	53,07679	50,54336
53,42398	51,44784	54,12075	51,49660	52,06067	49,89521
52,18865	50,93861	52,69878	51,29983	50,54213	48,97208
51,01315	49,98934	51,07831	50,17250	48,9750	48,07152
48,51878	48,80614	48,74633	48,74633	47,53762	46,28469

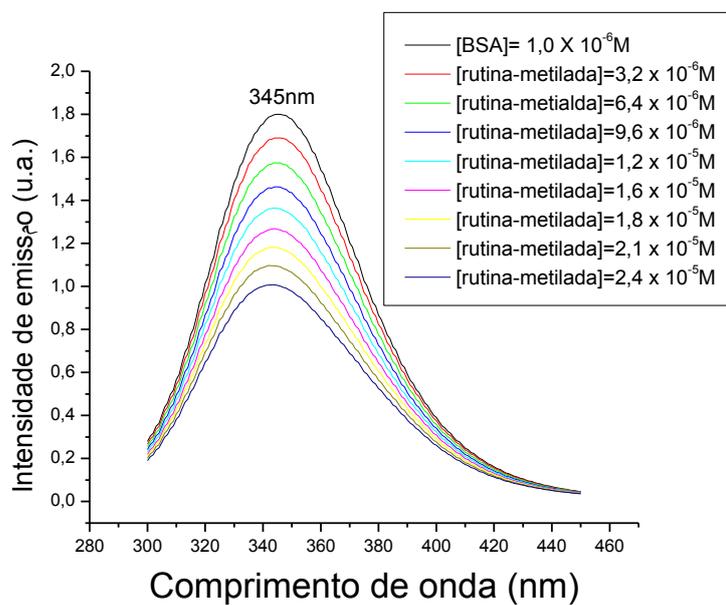
## Espectros de fluorescência: ASB x rutina e ASB x rutina-metilada

T=296K

### ASB x rutina

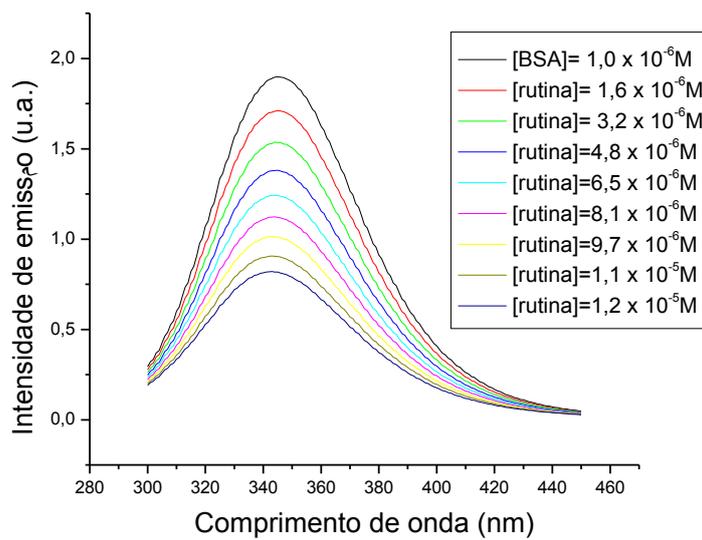


### ASB x rutina-metilada

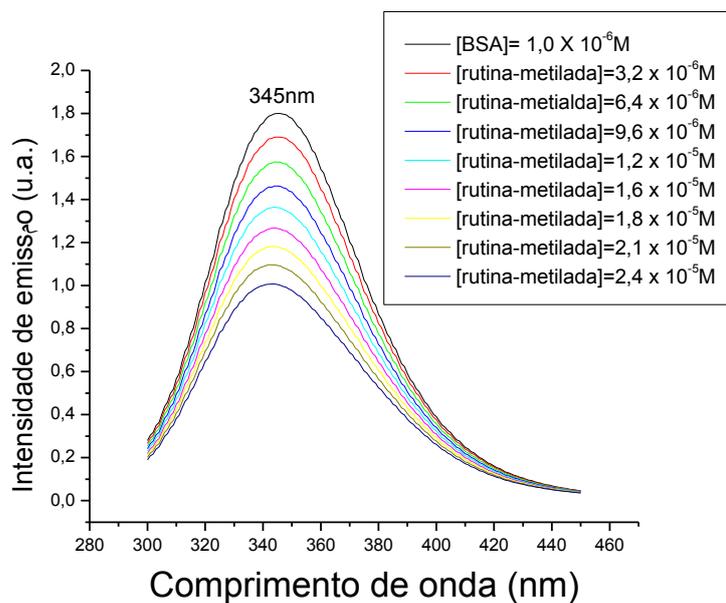


T=303K

### ASB x rutina

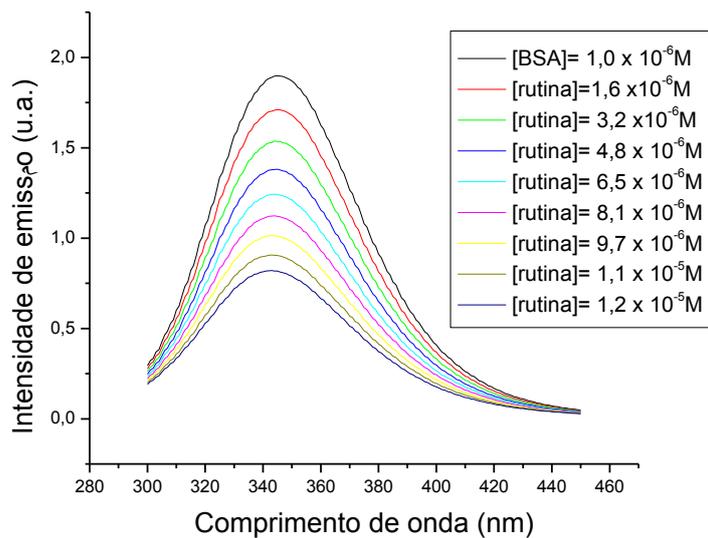


### ASB x rutina-metilada

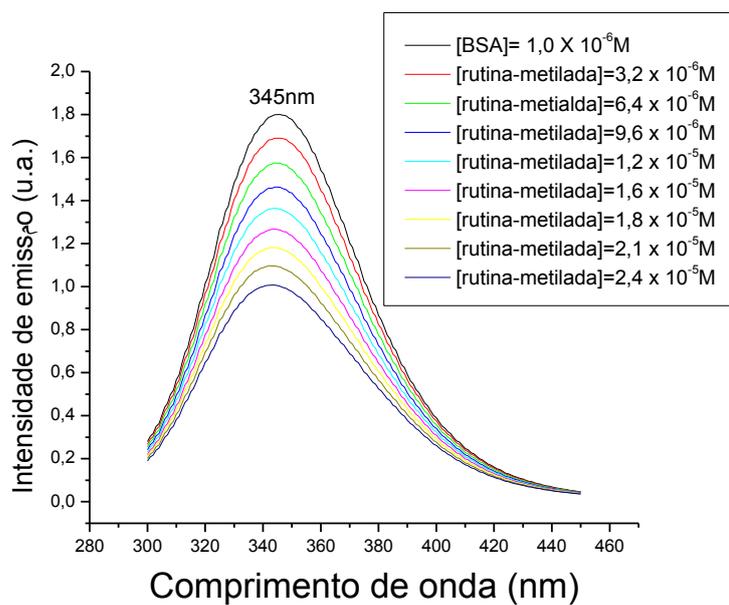


T=310K

ASB x rutina



ASB x rutina-metilada

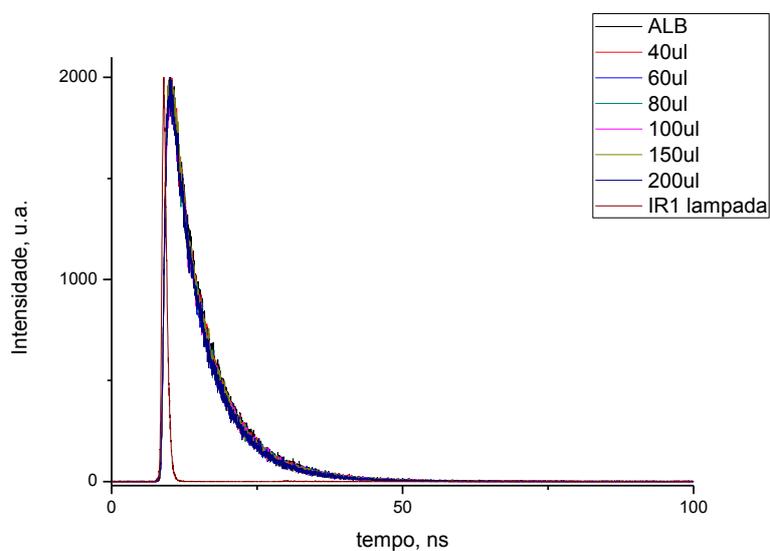


Dados obtidos a partir dos espectros de supressão fluorescente:

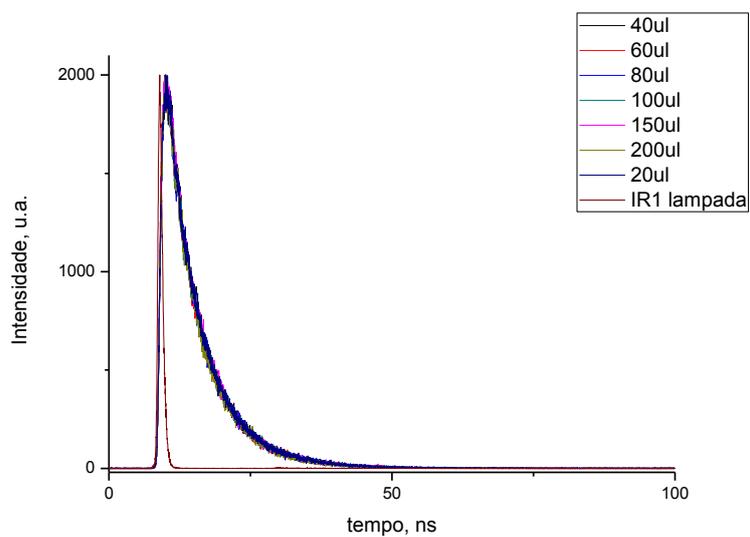
I

Temperatura (K)	Constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) $L.mol^{-1}$	Constante de velocidade de supressão de fluorescência para ASB ( $k_q$ ) $L.mol^{-1}.s^{-1}$	Sistema
296	$8,4 \times 10^4$	$8,4 \times 10^{12}$	ASB/rutina
296	$2,9 \times 10^4$	$2,9 \times 10^{12}$	ASB/rutina-trimetilada
303	$9,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^{12}$	ASB/rutina
303	$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^{12}$	ASB/rutina-trimetilada
310	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{13}$	ASB/rutina
310	$3,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{12}$	ASB/rutina-trimetilada

Espectro do decaimento fluorescente temporal da ASB x rutina



## Espectro do decaimento fluorescente temporal da ASB xrutina-metilada



## II

T(K)	Temperatura $1/T(K^{-1})$	Constante de Supressão efetiva ( $K_a$ )	$\ln K_a$	Sistema
296	$3,37 \times 10^{-3}$	$3,63 \times 10^4$	10,5	ASB/rutina
296	$3,37 \times 10^{-3}$	$4,49 \times 10^{-3}$	8,41	ASB/rutina-trimetilada
303	$3,30 \times 10^{-3}$	$4,01 \times 10^4$	10,6	ASB/rutina
303	$3,30 \times 10^{-3}$	$5,43 \times 10^{-3}$	8,60	ASB/rutina-trimetilada
310	$3,22 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^4$	10,7	ASB/rutina
310	$3,22 \times 10^{-3}$	$6,53 \times 10^{-3}$	8,79	ASB/rutina-trimetilada

### III

T(K)	Ph	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$	Sistema
296	7,4	-26,9KJ/mol	0,1KJ/mol	9,7KJ/mol	ASB/rutina
296	7,4	-20,6 KJ/mol	0,1KJ/mol	20,8KJ/mol	ASB/rutina-trimetilada
303	7,4	-27,7KJ/mol	0,1KJ/mol	9,7KJ/mol	ASB/rutina
303	7,4	-21,6KJ/mol	0,1KJ/mol	20,8KJ/mol	ASB/rutina-trimetilada
310	7,4	-26,0KJ/mol	0,1KJ/mol	9,7KJ/mol	ASB/rutina
310	7,4	-22,6KJ/mol	0,1KJ/mol	20,8KJ/mol	ASB/rutina-trimetilada

### IV

T(K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ ) ( $L.mol^{-1}$ )	Sítio de ligação (n)	Sistema
296	$3,3 \times 10^5$	1,1	ASB/rutina
296	$1,6 \times 10^5$	1,1	ASB/rutina-trimetilada
303	$3,7 \times 10^5$	1,1	ASB/rutina
303	$1,7 \times 10^5$	1,1	ASB/rutina-trimetilada
310	$4,7 \times 10^5$	1,1	ASB/rutina
310	$1,8 \times 10^5$	1,1	ASB/rutina-trimetilada

ASB x rutina

T	J	$R_0^6$	E	$r^6$	Ro(cm)	r(cm)
296K	$1,27 \cdot 10^{-14}$	$1,49 \cdot 10^{-39}$	0,473785	$1,65 \cdot 10^{-39}$	$3,37 \cdot 10^{-7}$	$3,43 \cdot 10^{-7}$
303K	$1,34 \cdot 10^{-14}$	$1,58 \cdot 10^{-39}$	0,488541	$1,65 \cdot 10^{-39}$	$3,41 \cdot 10^{-7}$	$3,43 \cdot 10^{-7}$
310K	$1,25 \cdot 10^{-14}$	$1,58 \cdot 10^{-39}$	0,511162	$1,51 \cdot 10^{-39}$	$3,51 \cdot 10^{-7}$	$3,38 \cdot 10^{-7}$

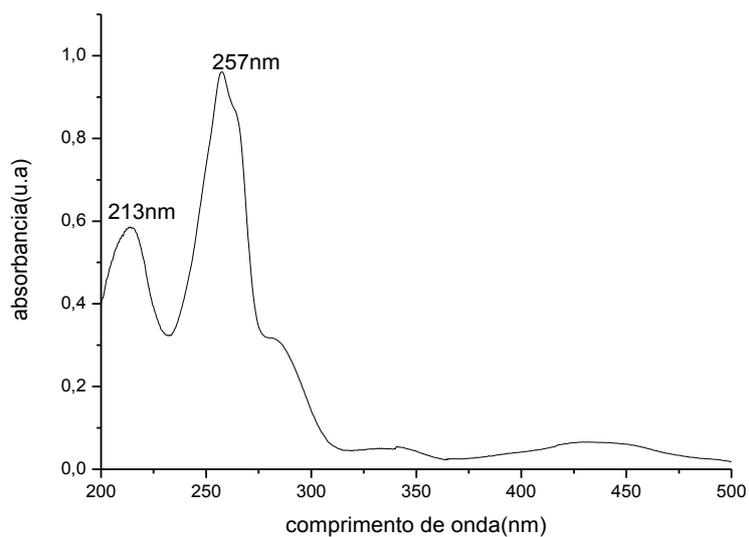
ASB x rutina-metilada

T	J	$R_0^6$	E	$r^6$	Ro(cm)	r(cm)
296K	$8,39 \cdot 10^{-15}$	$9,87 \cdot 10^{-40}$	0,17831	$4,55 \cdot 10^{-39}$	$3,15 \cdot 10^{-7}$	$4,07 \cdot 10^{-7}$
303K	$8,26 \cdot 10^{-15}$	$9,71 \cdot 10^{-40}$	0,17962	$4,44 \cdot 10^{-39}$	$3,14 \cdot 10^{-7}$	$4,05 \cdot 10^{-7}$
310K	$8,18 \cdot 10^{-15}$	$9,62 \cdot 10^{-40}$	0,19523	$3,97 \cdot 10^{-39}$	$3,14 \cdot 10^{-7}$	$3,97 \cdot 10^{-7}$

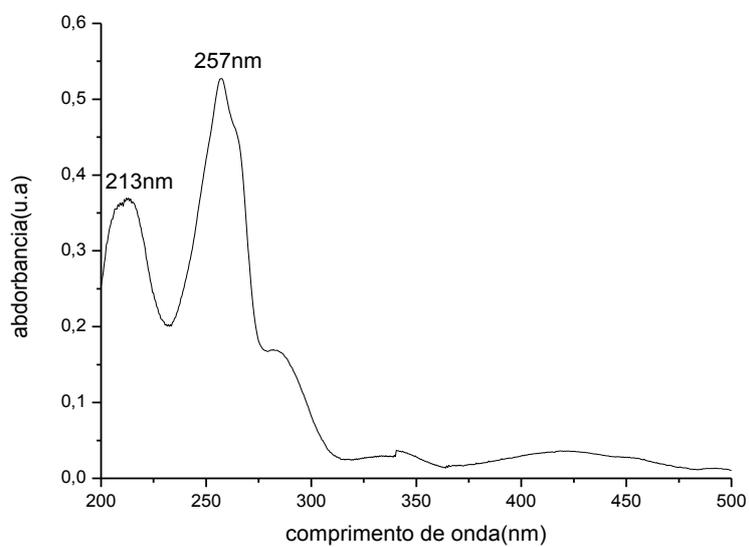
Espectros de absorção:  $\beta$ -lapachona e Ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico

T=298K

$\beta$ -lapachona



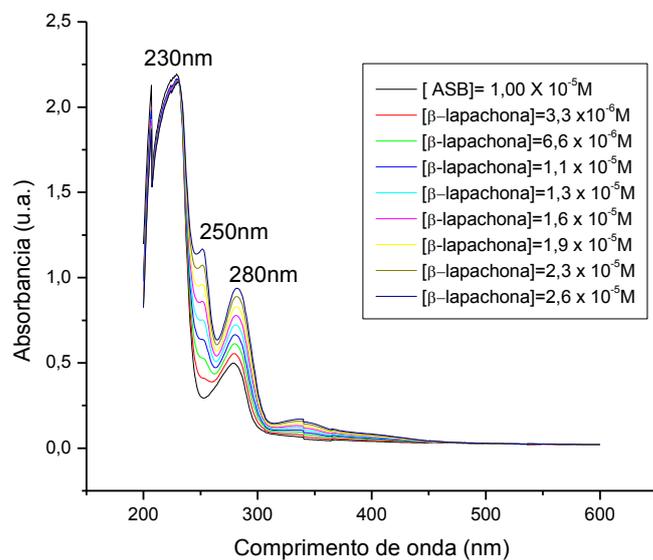
Ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico



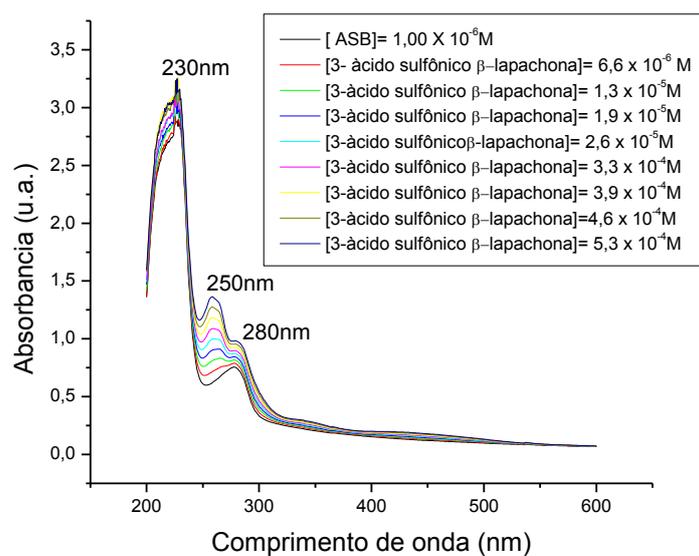
# Espectros de absorção: ASB x $\beta$ -lapachona e ASB x Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico

T=298K

## ASB x $\beta$ -lapachona



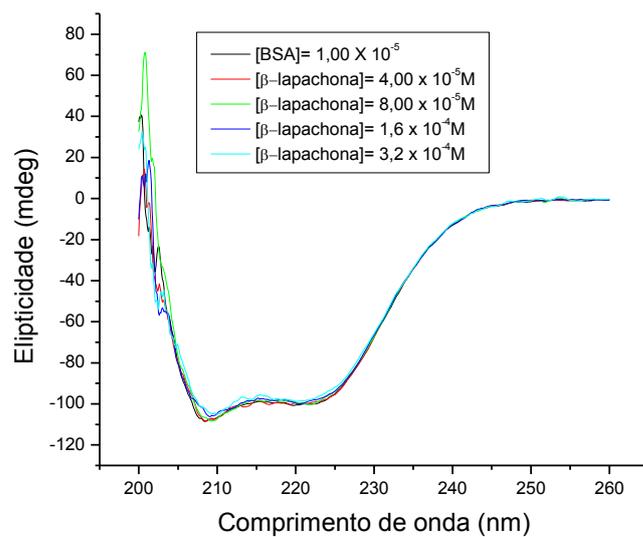
## ASB x Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico



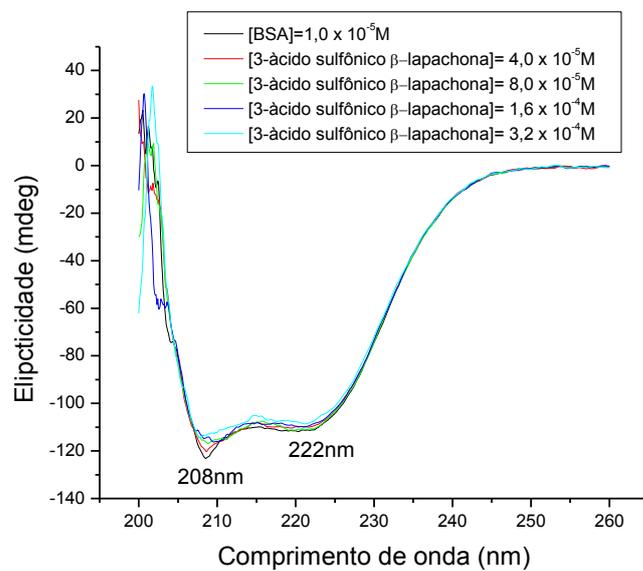
Espectros de absorção por Dicroísmo Circular: ASB x  $\beta$ -lapachona e ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico

T=296K

ASB x  $\beta$ -lapachona

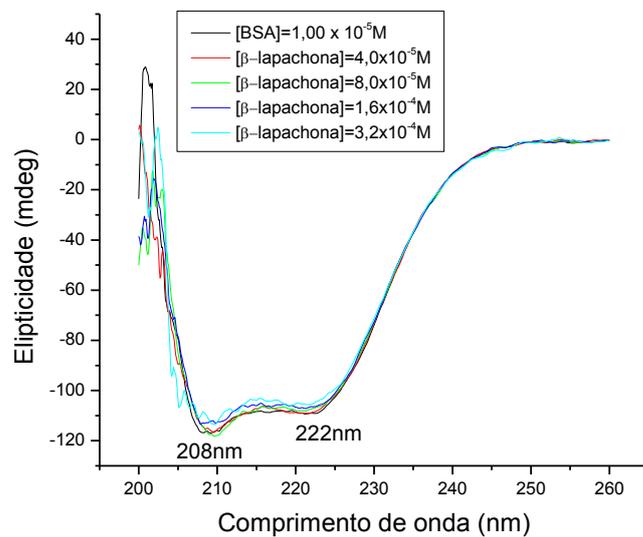


ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico

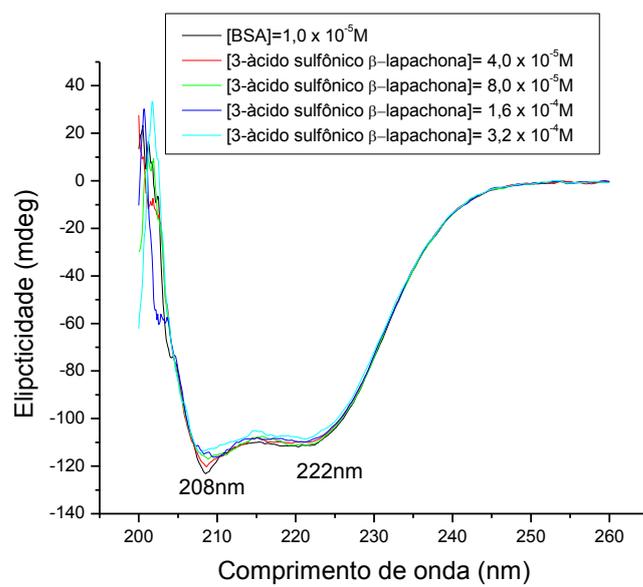


T=303K

### ASB x $\beta$ -lapachona

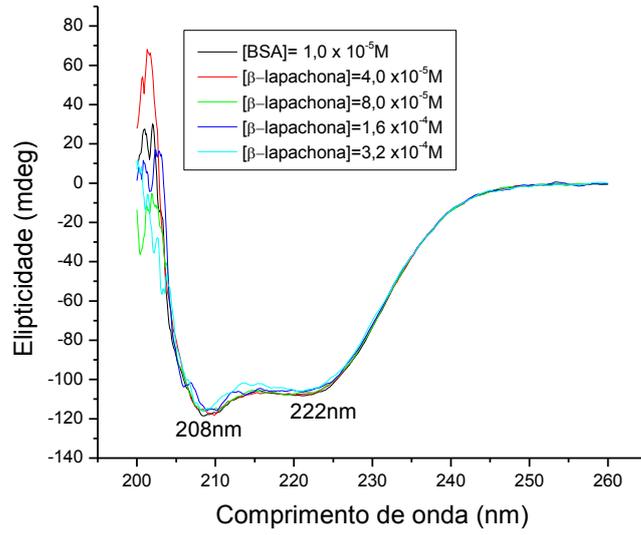


### ASB x Ácido $\beta$ -lapachona 3-sulfônico



T=310K

ASB x  $\beta$ -lapachona



ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico

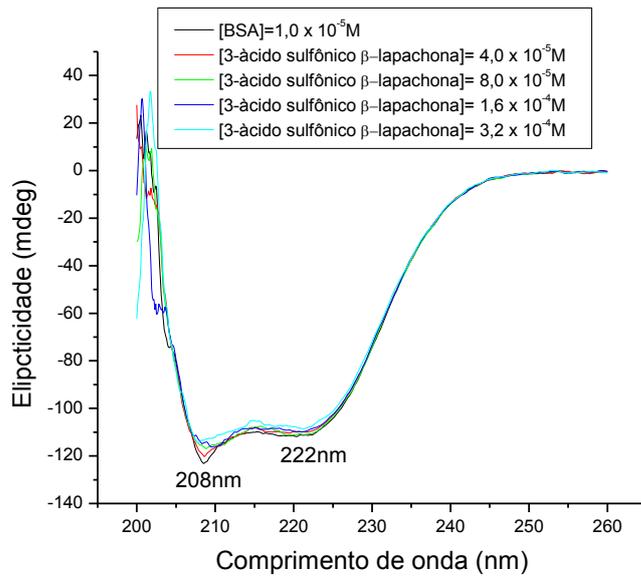


Tabela de valores de ângulo de  $\alpha$ -hélice: ASB x  $\beta$ -lapachona

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
56,27977	54,37844	55,29565	54,05521	55,23877	53,36225
55,57294	54,34668	53,67164	54,00814	54,55978	53,0430
54,50942	54,04897	53,43287	53,18590	54,45906	52,72884
53,66690	53,29761	53,33156	52,61769	52,32255	52,13909
53,48975	52,59898	51,22349	52,08068	48,37125	51,77447

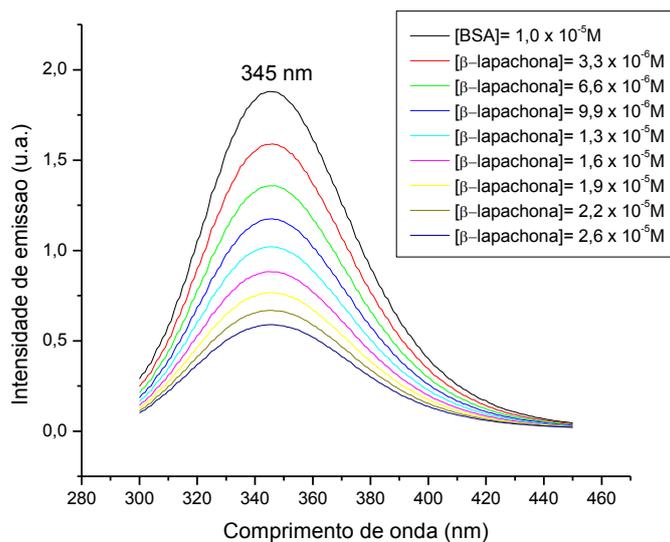
Valores de ângulo de  $\alpha$ -hélice: ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona 3-sulfônico

T=296K		T=303K		T=310K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
57,63301	55,32714	55,41059	54,72208	54,88328	53,29988
56,32836	55,00958	55,20500	54,05294	54,29494	53,00103
54,40396	54,50773	54,44780	53,55390	52,92689	52,69085
53,81680	54,06258	52,26152	53,13429	52,90793	52,59671
53,50930	53,40535	50,75187	52,03475	51,66963	51,79998

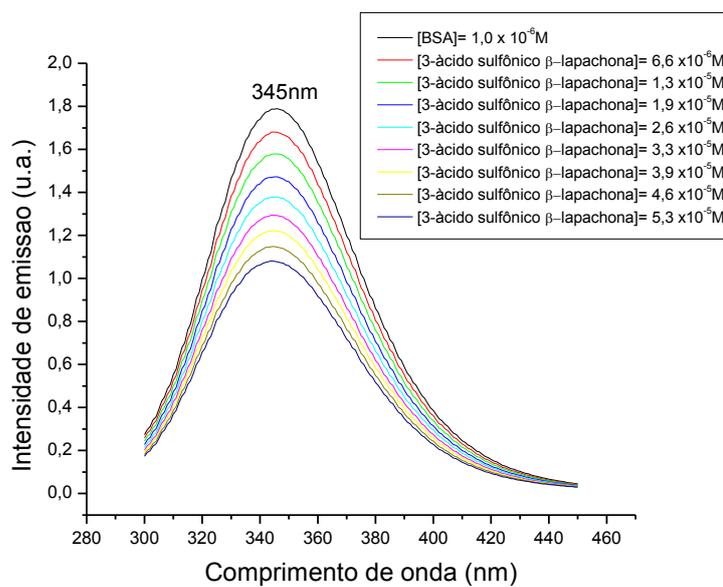
Espectros de fluorescência: ASB x  $\beta$ -lapachona e ASB e ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

T=296K

ASB x  $\beta$ -lapachona

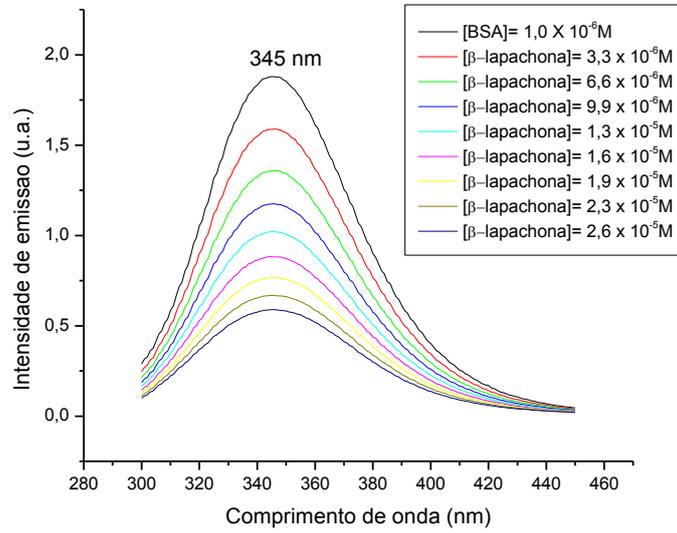


ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

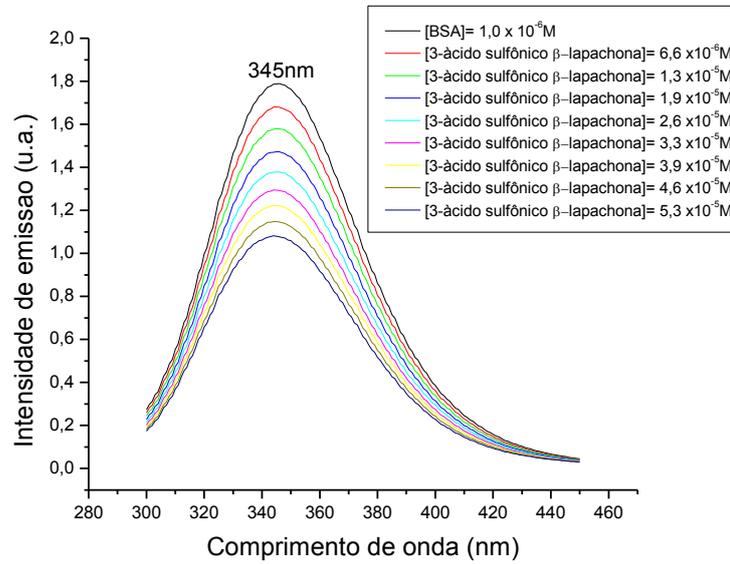


T=303K

ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona

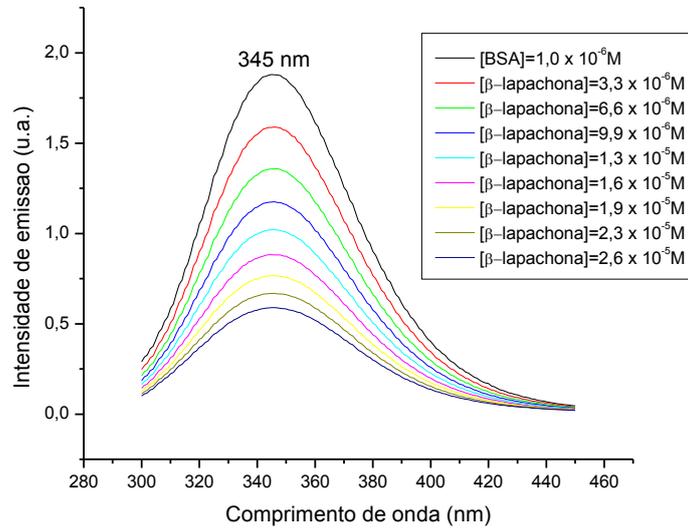


ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

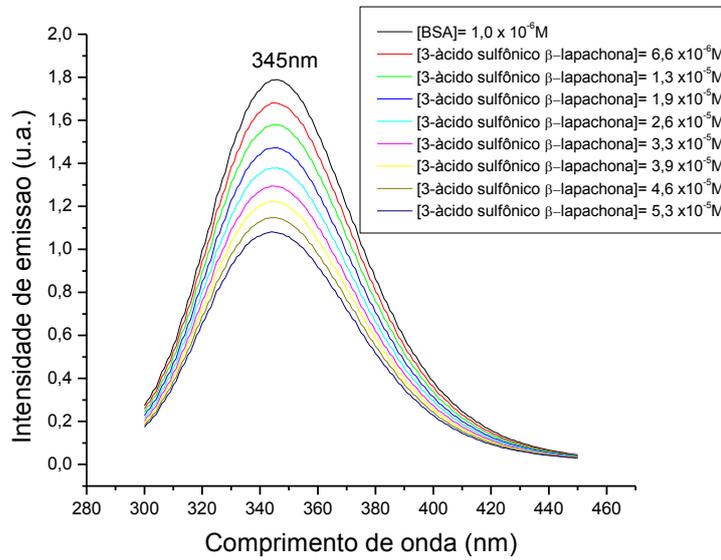


T=310K

### ASB x Ácido $\beta$ -lapachona



### ASB x Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

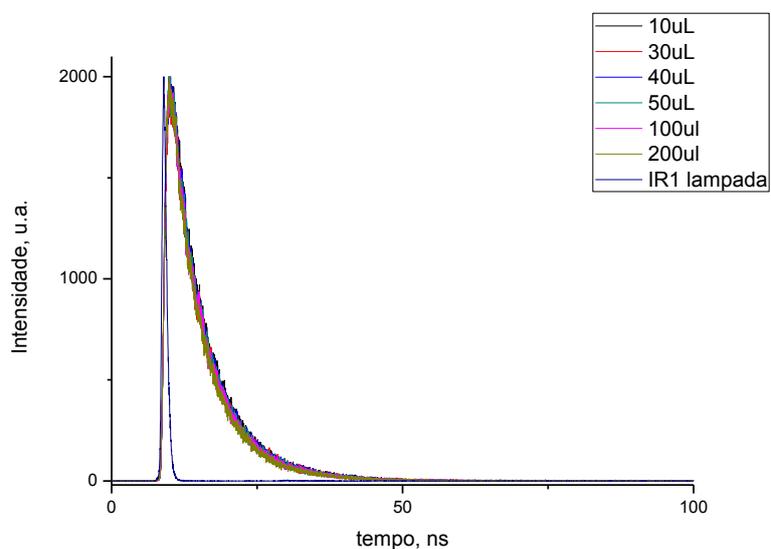


Dados obtidos a partir dos espectros de supressão fluorescente:

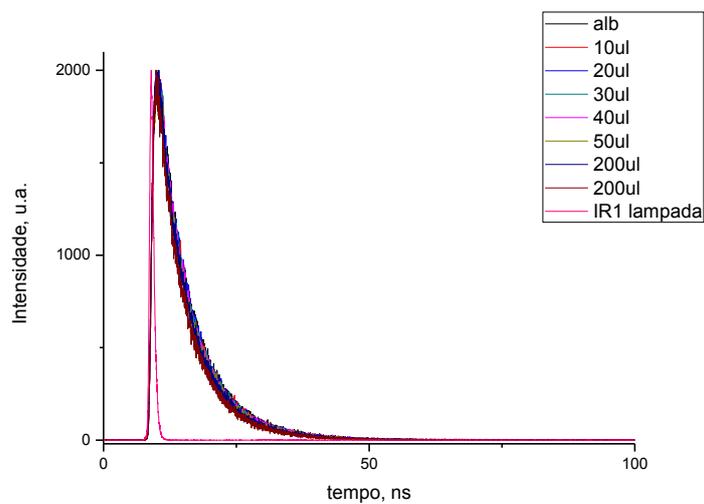
I

Temperatura (K)	Constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) L.mol <sup>-1</sup>	Constante de velocidade de supressão de fluorescência para ASB ( $k_q$ ) L.mol <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	Sistema
296	$4,4 \times 10^4$	$4,4 \times 10^{12}$	ASB/ $\beta$ -lapachona
296	$1,29 \times 10^4$	$1,29 \times 10^{12}$	ASB/ Ácido $\beta$ -lapachona-sulfônico
303	$4,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{12}$	ASB/ $\beta$ -lapachona
303	$1,36 \times 10^4$	$1,37 \times 10^{12}$	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-sulfônico
310	$4,6 \times 10^4$	$4,6 \times 10^{12}$	ASB/ $\beta$ -lapachona
310	$1,52 \times 10^4$	$1,52 \times 10^{12}$	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

Espectro do decaimento fluorescente temporal da ASB x  $\beta$ -lapachona



Espectro do decaimento fluorescente temporal da ASB x Ácido- $\beta$ -lapachona-3-sulfônico



II

T(K)	Temperatura $1/T(K^{-1})$	Constante de Supressão efetiva ( $K_a$ )	$\ln K_a$	Sistema
296	$3,37 \times 10^{-3}$	$1,58 \times 10^4$	9,67	ASB/ $\beta$ -lapachona
296	$3,37 \times 10^{-3}$	$5,27 \times 10^3$	8,57	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico
303	$3,30 \times 10^{-3}$	$1,95 \times 10^4$	9,88	ASB/ $\beta$ -lapachona
303	$3,30 \times 10^{-3}$	$6,43 \times 10^3$	8,77	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico
310	$3,22 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^4$	10,04	ASB/ $\beta$ -lapachona
310	$3,22 \times 10^{-3}$	$7,55 \times 10^3$	8,93	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

### III

T(K)	pH	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$	Sistema
296	7,4	-23,8KJ/mol	0,1KJ/mol	20,5KJ/mol	ASB/ $\beta$ -lapachona
296	7,4	-21,1KJ/mol	0,1KJ/mol	19,5KJ/mol	ASB/ Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico
303	7,4	-24,8KJ/mol	0,1KJ/mol	20,5KJ/mol	ASB/ $\beta$ -lapachona
303	7,4	-22,0KJ/mol	0,1KJ/mol	19,6KJ/mol	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico
310	7,4	-25,9KJ/mol	0,1KJ/mol	20,5KJ/mol	ASB/ $\beta$ -lapachona
310	7,4	-23,0KJ/mol	0,1KJ/mol	19,6KJ/mol	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

### IV

T(K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ ) ( $L.mol^{-1}$ )	Sítio de ligação (n)	Sistema
296	$2,3 \times 10^5$	1,1	ASB/ $\beta$ -lapachona
296	$3,5 \times 10^4$	1,1	ASB/ Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico
303	$1,6 \times 10^5$	1,1	ASB/ $\beta$ -lapachona
303	$3,6 \times 10^4$	1,1	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico
310	$1,7 \times 10^5$	1,1	ASB/ $\beta$ -lapachona
310	$4,2 \times 10^4$	1,1	ASB/Ácido $\beta$ -lapachona-3-sulfônico

V

ASB x  $\beta$ -lapachona

T	J	$R_0^6$	E	$R^6$	$R_0(\text{cm})$	$r(\text{cm})$
296K	$3,06 \cdot 10^{-15}$	$3,06 \cdot 10^{-40}$	0,26147	$1,02 \cdot 10^{-39}$	$2,66 \cdot 10^{-7}$	$3,17 \cdot 10^{-7}$
303K	$3,15 \cdot 10^{-15}$	$3,71 \cdot 10^{-40}$	0,251485	$1,10 \cdot 10^{-39}$	$2,68 \cdot 10^{-7}$	$3,21 \cdot 10^{-7}$
310K	$3,16 \cdot 10^{-15}$	$3,72 \cdot 10^{-40}$	0,249948	$1,12 \cdot 10^{-39}$	$2,68 \cdot 10^{-7}$	$3,22 \cdot 10^{-7}$

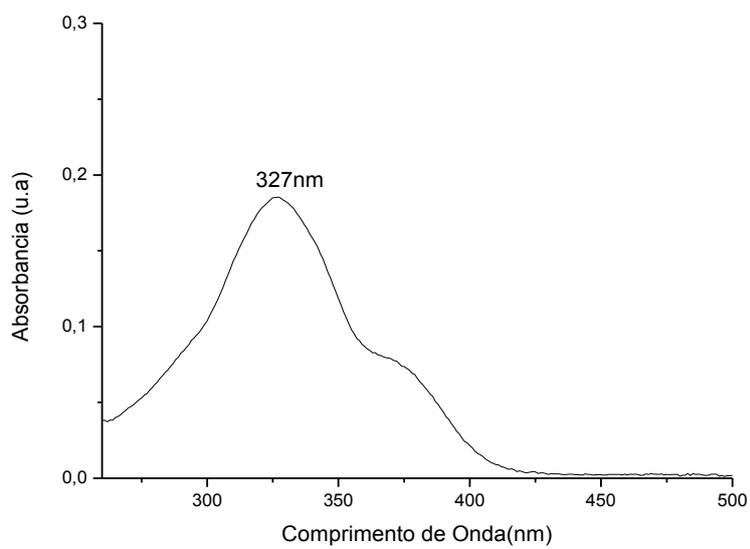
ASB x Ácido  $\beta$ -lapachona-3- sulfônico

T	J	$R_0^6$	E	$R^6$	$R_0(\text{cm})$	$r(\text{cm})$
296K	$1,26 \times 10^{-15}$	$1,48 \times 10^{-40}$	0,109425	$1,12 \times 10^{-39}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$3,26 \times 10^{-7}$
303K	$1,21 \times 10^{-15}$	$1,43 \times 10^{-40}$	0,102862	$1,24 \times 10^{-39}$	$2,28 \times 10^{-7}$	$3,23 \times 10^{-7}$
310K	$1,18 \times 10^{-15}$	$1,39 \times 10^{-40}$	0,093781	$1,35 \times 10^{-39}$	$2,27 \times 10^{-7}$	$3,32 \times 10^{-7}$

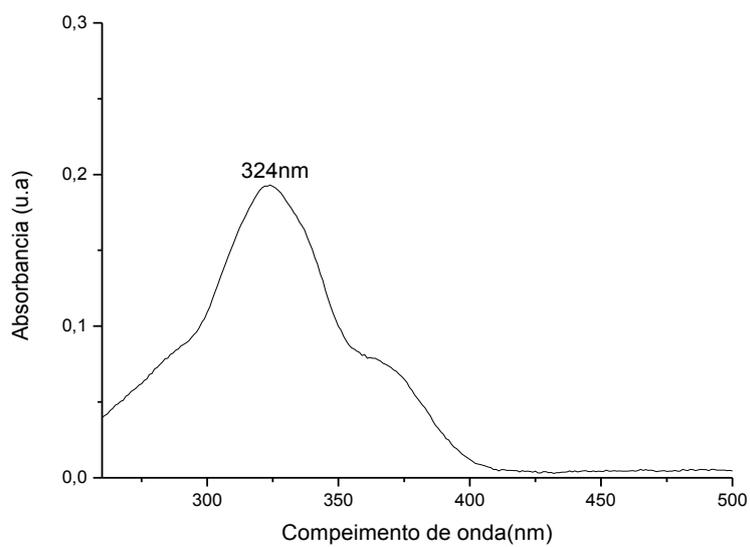
Espectros de absorção no Uv-vis: 7-hidroxicumarina e 4-metil-7-hidroxicumarina

T=298K

7-hidroxicumarina

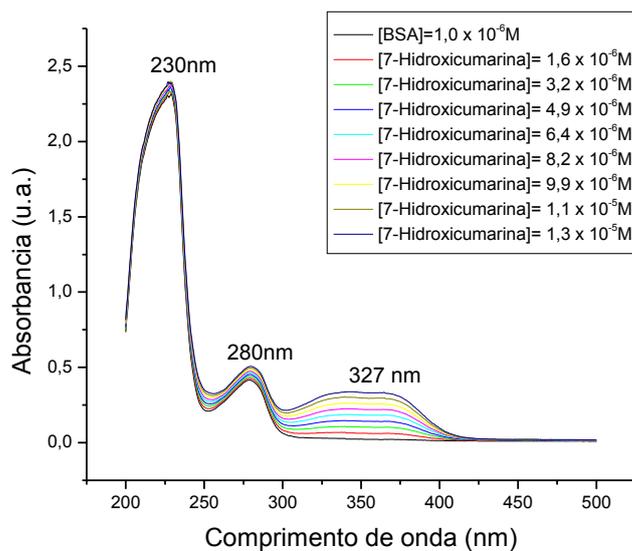


4-metil-7-hidroxicumarina

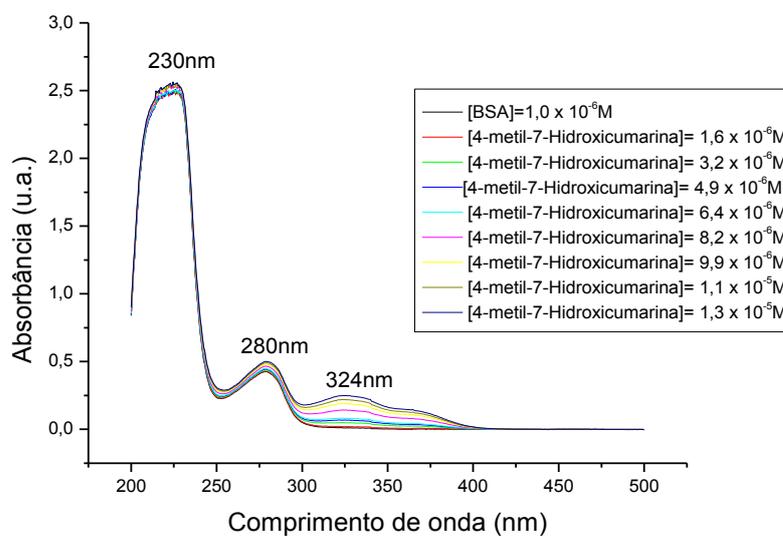


Espectros de absorção no Uv-vis: ASB x 7-hidroxicumarina e ASB x Ácido 4-metil-7-hidroxicumarina

7-hidroxicumarina



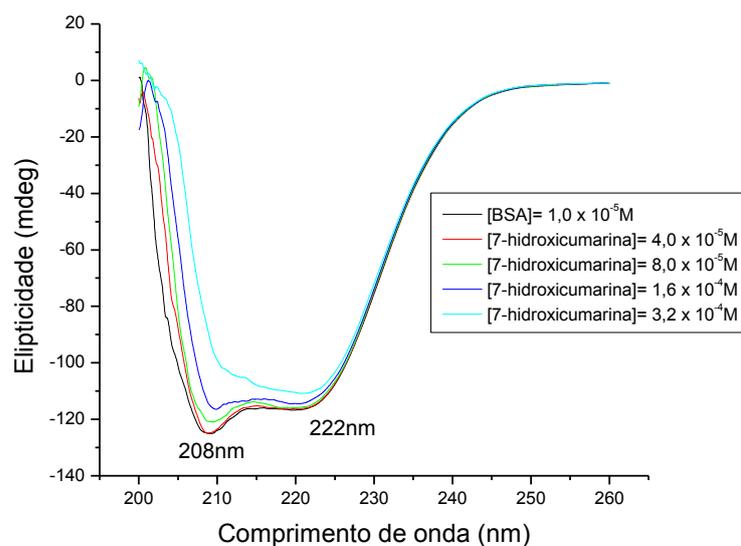
4-metil-7-hidroxicumarina



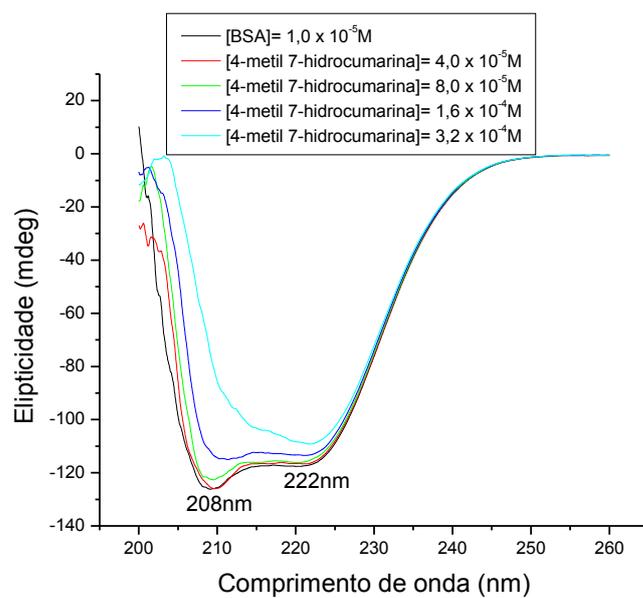
Espectros de absorção por Dicroísmo Circular: ASB x 7-hidroxicumarina e ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina.

T=288K

ASB x 7-hidroxicumarina

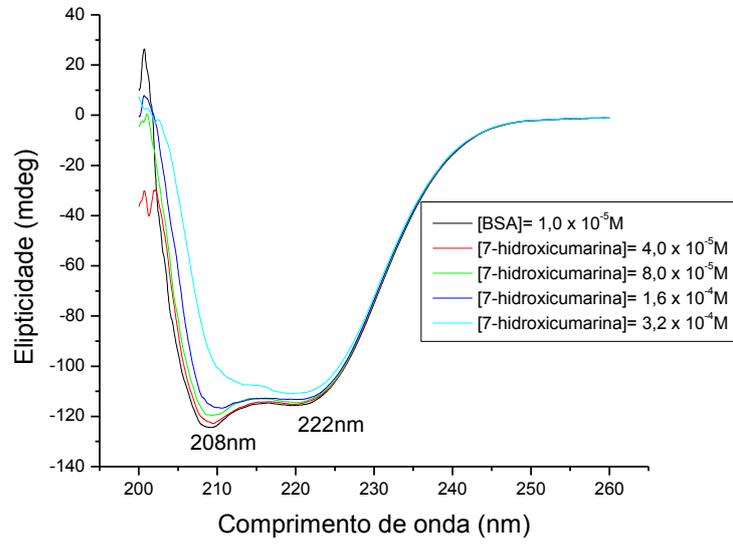


ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

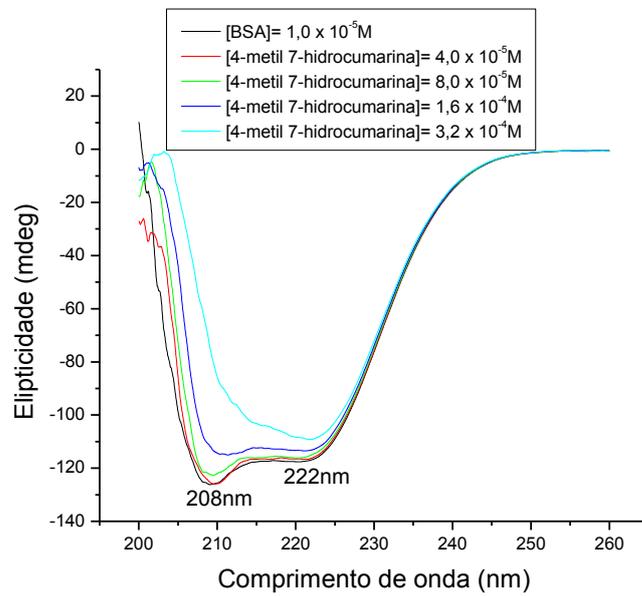


T=293K

ASB x 7-hidroxicumarina

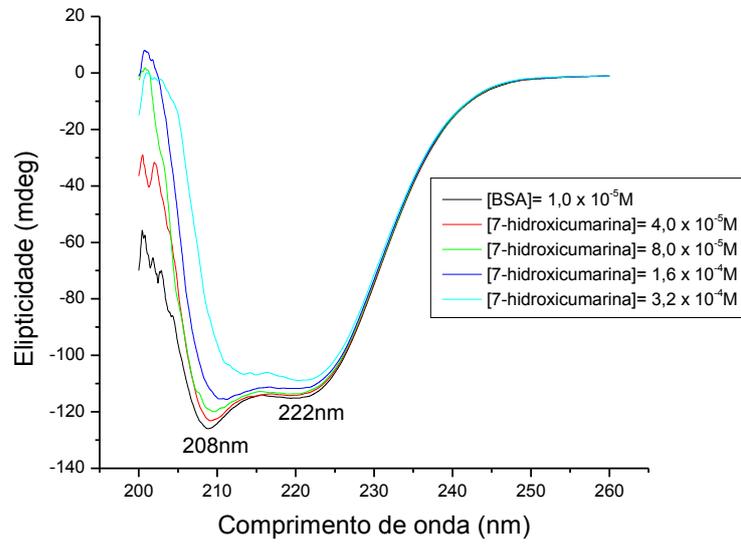


ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

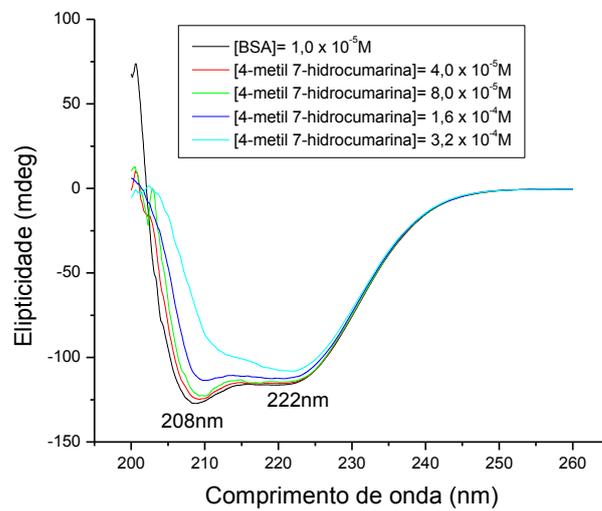


T=298K

ASB x 7-hidroxicumarina



ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina



Valores de ângulo de  $\alpha$ -hélice: ASB x 7-hidroxycumarina.

T=288K		T=293K		T=298K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
61,24541	60,38198	58,83458	58,20330	59,79974	58,51349
60,37267	59,79166	58,82747	57,79558	59,99526	58,49194
61,02619	59,64706	56,47352	57,10433	58,61121	58,07175
54,25702	59,22799	52,11103	56,54747	45,2364	57,07314
28,76170	57,35838	34,00581	54,87122	21,67911	55,09918

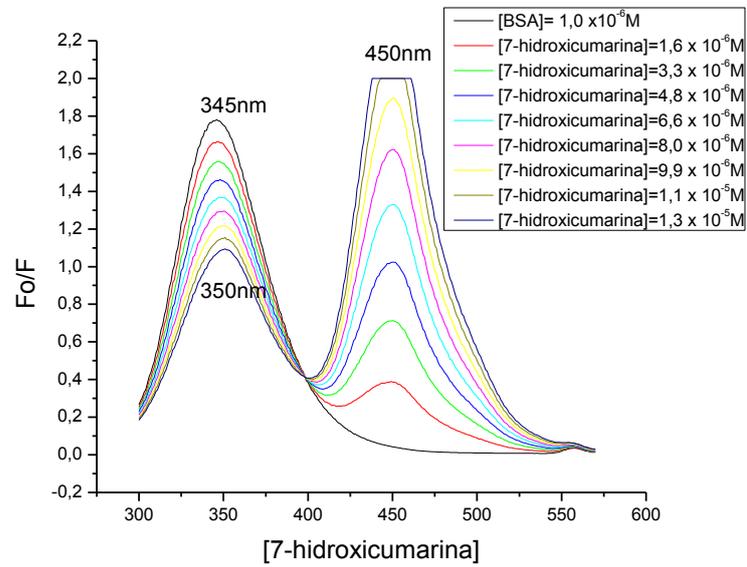
Valores de ângulo de  $\alpha$ -hélice: ASB x 4-metil-7-hidroxycumarina

T=288K		T=293K		T=298K	
% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice		% $\alpha$ -hélice	
208nm	222nm	208nm	222nm	208nm	222nm
61,84972	58,86788	60,43962	58,84488	61,09725	57,36102
61,31055	58,61270	59,90044	58,58435	58,05189	57,16102
59,08875	57,03059	58,34220	57,59765	55,75896	57,00792
53,86300	55,15927	51,07831	56,35009	49,24751	55,52785
34,84417	54,38240	30,25237	54,09320	23,21362	54,09320

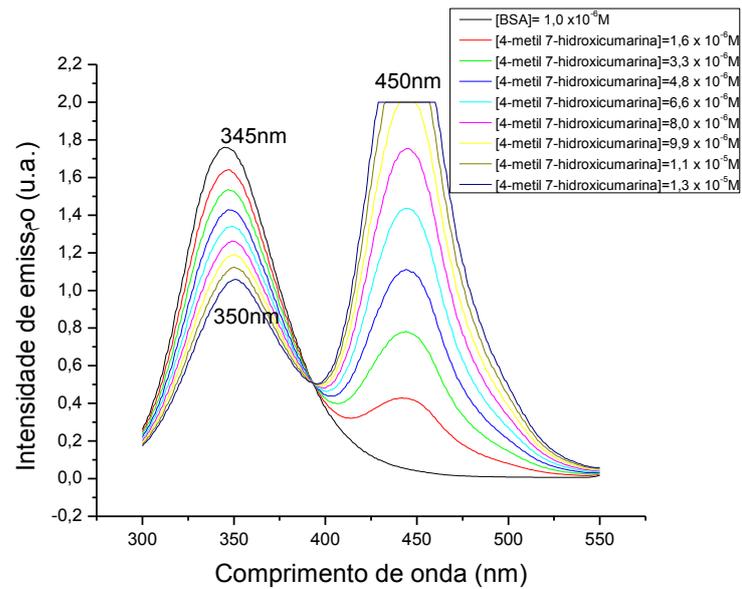
Espectros de fluorescência: ASB x 7-hidroxicumarina e ASB e ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

T=288K

ASB x 7-hidroxicumarina

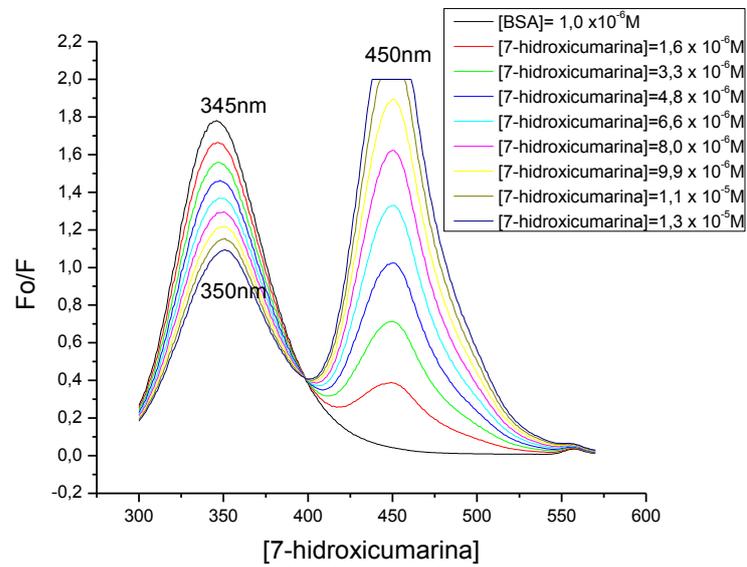


ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

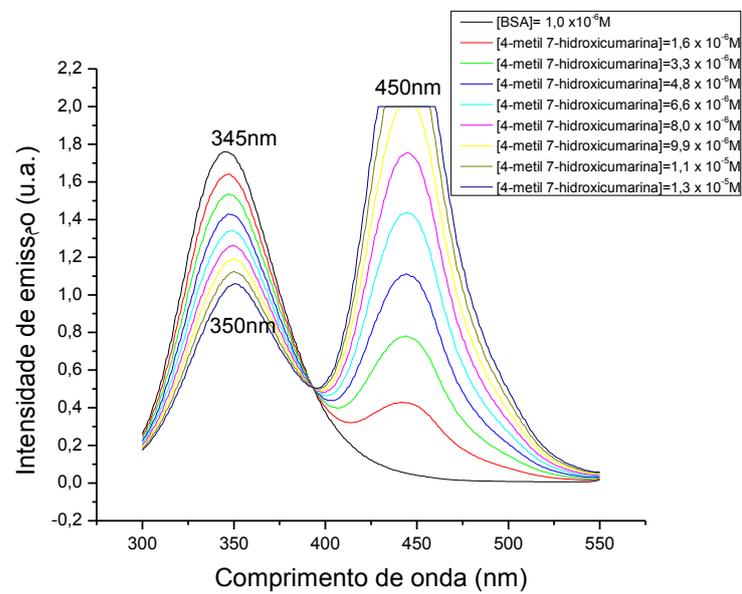


T=293K

ASB x 7-hidroxicumarina

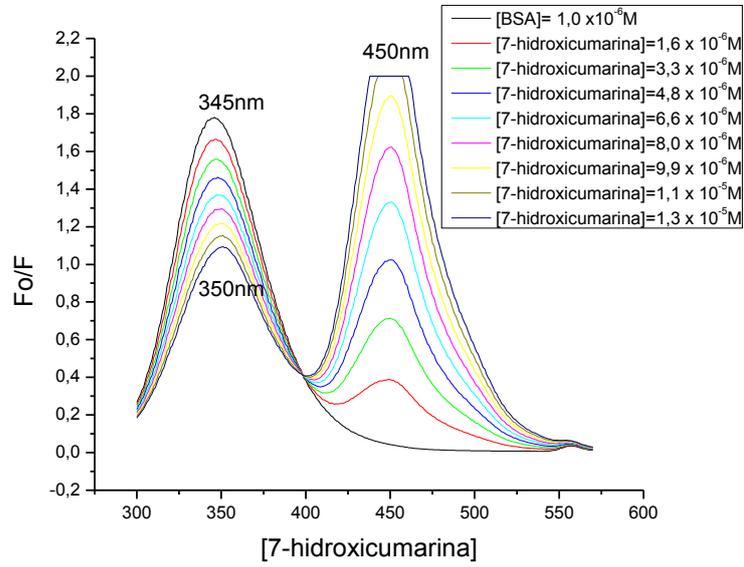


ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

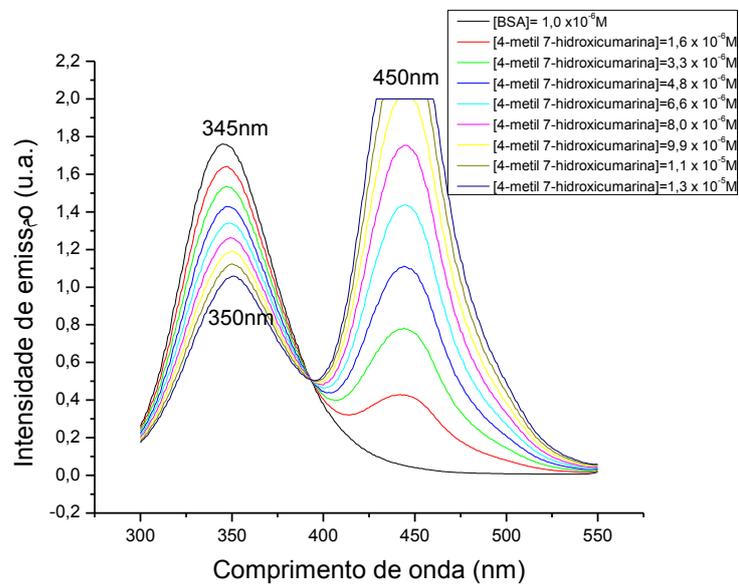


T=298K

### ASB x 7-hidroxicumarina



### ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina

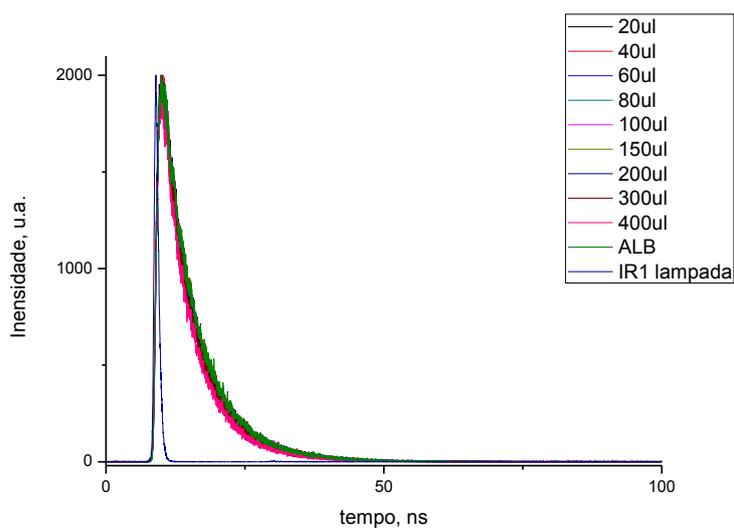


Dados obtidos a partir dos espectros de supressão fluorescente:

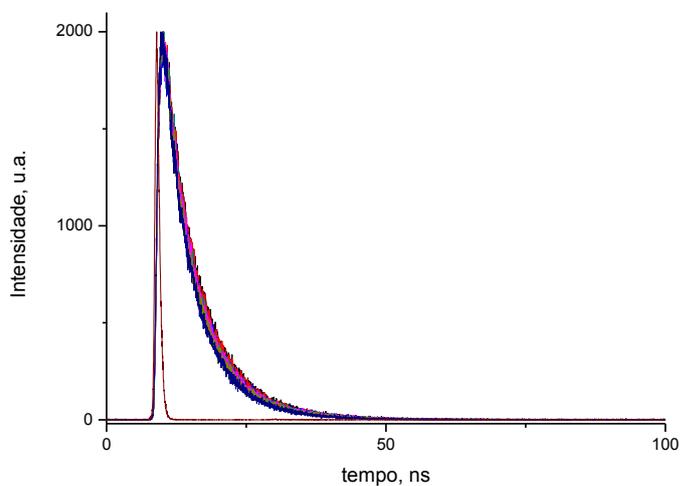
I

T(K)	Constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) $L.mol^{-1}$	Constante de velocidade de supressão de fluorescência para ASB ( $k_q$ ). $L.mol^{-1}.s^{-1}$	Sistema
288	$6,39 \times 10^4$	$6,29 \times 10^{12}$	ASB/7-hidroxicumarina
288	$6,47 \times 10^4$	$6,47 \times 10^{12}$	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
293	$6,11 \times 10^4$	$1,37 \times 10^{12}$	ASB/ 7-hidroxicumarina
293	$6,12 \times 10^4$	$6,12 \times 10^{12}$	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
298	$5,87 \times 10^4$	$5,87 \times 10^{12}$	ASB/ 7-hidroxicumarina
298	$5,97 \times 10^4$	$5,97 \times 10^{12}$	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina

Espectro de decaimento fluorescente temporal de ASB x 7-hidroxicumarina



Espectro de decaimento fluorescente temporal de ASB x 4-metil-7-hidroxicumarina



**II**

T(K)	Temperatura $1/T(K^{-1})$	Constante de Supressão efetiva ( $K_a$ )	$\ln K_a$	Sistema
288	$3,35 \times 10^{-3}$	$4,52 \times 10^4$	10,72	ASB/7-hidroxicumarina
288	$3,35 \times 10^{-3}$	$3,66 \times 10^4$	10,51	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
293	$3,41 \times 10^{-3}$	$3,81 \times 10^4$	10,55	ASB/ 7-hidroxicumarina
293	$3,41 \times 10^{-3}$	$3,59 \times 10^4$	10,49	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
298	$3,47 \times 10^{-3}$	$3,22 \times 10^4$	10,38	ASB/ 7-hidroxicumarina
298	$3,47 \times 10^{-3}$	$3,48 \times 10^4$	10,46	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina

### III

T(K)	pH	$\Delta G^0$	$\Delta S^0$	$\Delta H^0$	Sistema
288	7,4	-25,7KJ/mol	0,0KJ/mol	-24,1KJ/mol	ASB/7-hidroxicumarina
288	7,4	-25,1KJ/mol	0,1KJ/mol	3,6KJ/mol	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
293	7,4	-25,7KJ/mol	0,0KJ/mol	-24,1KJ/mol	ASB/ 7-hidroxicumarina
293	7,4	-25,1KJ/mol	0,1KJ/mol	3,6KJ/mol	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
296	7,4	-25,7KJ/mol	0,0KJ/mol	-24,1KJ/mol	ASB/ 7-hidroxicumarina
296	7,4	-26,1KJ/mol	0,1KJ/mol	3,6KJ/mol	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina

### IV

T(K)	Constante de ligação efetiva ( $K_b$ ) ( $L.mol^{-1}$ )	Sítio de ligação (n)	Sistema
288	$1,2 \times 10^5$	1,1	ASB/7-hidroxicumarina
288	$1,7 \times 10^5$	1,1	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
293	$1,4 \times 10^5$	1,1	ASB/ 7-hidroxicumarina
293	$1,4 \times 10^5$	1,1	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina
310	$1,5 \times 10^5$	1,1	ASB/ 7-hidroxicumarina
310	$1,3 \times 10^5$	1,1	ASB/4-metil-7-hidroxicumarina

V

ASB x 7-hidroxicumarina

T	J	$R_o^6$	E	$r^6$	$Ro (cm^{-1})$	$r (cm^{-1})$
288K	$1,56 \times 10^{-14}$	$1,84 \times 10^{-39}$	0,32	$3,78 \times 10^{-39}$	$3,50 \times 10^{-7}$	$3,50 \times 10^{-7}$
293K	$1,63 \times 10^{-14}$	$1,92 \times 10^{-39}$	0,32	$3,92 \times 10^{-39}$	$3,52 \times 10^{-7}$	$3,97 \times 10^{-7}$
298K	$1,81 \times 10^{-14}$	$2,14 \times 10^{-39}$	0,33	$4,28 \times 10^{-39}$	$3,58 \times 10^{-7}$	$4,02 \times 10^{-7}$

ASB x 4-metil-7hidroxicumarina

T	J	$R_o^6$	E	$R^6$	$Ro (cm^{-1})$	$r (cm^{-1})$
288K	$1,31 \times 10^{-14}$	$1,55 \times 10^{-39}$	0,20	$5,99 \times 10^{-39}$	$3,40 \times 10^{-7}$	$4,26 \times 10^{-7}$
293K	$1,37 \times 10^{-14}$	$1,62 \times 10^{-39}$	0,20	$6,36 \times 10^{-39}$	$4,26 \times 10^{-7}$	$4,30 \times 10^{-7}$
298K	$1,47 \times 10^{-14}$	$1,71 \times 10^{-39}$	0,18	$7,52 \times 10^{-39}$	$3,45 \times 10^{-7}$	$4,43 \times 10^{-7}$