

Marcos Filipe Maia Mendonça

Licenciado em Bioquímica



Estudo da foto-intercalação do 4',7-dihidroflavílio em polinucleótidos e da especificidade dessa interacção

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: António Jorge Parola, Professor Associado com Agregação
Faculdade de Ciências e Tecnologias- Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: João Carlos Lima, Professor Associado com Agregação
Faculdade de Ciências e Tecnologias- Universidade Nova de Lisboa

Arguente(s): José Ricardo Ramos Franco Tavares

Outubro de 2017

Estudo da foto-intercalação do 4',7-dihidroxi-flavílio em polinucleótidos e da especificidade dessa interacção

Copyright © Marcos Filipe Maia Mendonça, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

O trabalho realizado tem como objectivo o estudo da foto-intercalação de flavílios em polinucleótidos e avaliar como varia a interacção com polinucleótidos de diferentes composições e estruturas. O flavílio utilizado neste estudo foi o 4',7-dihidroxiavilíio e os polinucleótidos usados para avaliar a interacção foram ct-DNA, poli(A:U), e poli(G:C).

O estudo foi feito por espectroscopia de absorção UV-visível, fluorescência de estado estacionário e anisotropia de fluorescência. Os resultados demonstram que não há interacção dos nucleótidos com a forma chalcona, mas apenas após fotoconversão desta espécie em catião flavílio. Mesmo antes de irradiar a solução a presença de nucleótidos desvia o equilíbrio entre as formas em solução favorecendo a formação de catião, uma evidência para a estabilidade do aducto formado apenas com o catião. Além disto, o efeito de estabilização do catião pode ser visto por espectroscopia de emissão, onde uma redução da emissão da chalcona a cerca de 500 nm é acompanhada por um aumento da emissão de catião e base quinoideal (em equilíbrio com o catião no estado excitado).

As medições de anisotropia de fluorescência do catião flavílio e da base quinoideal na presença dos diferentes polinucleótidos apontam que todos eles causam uma redução de anisotropia de fluorescência do catião, compatível com uma variação do seu tempo de vida (aumento) após intercalação.

Os resultados do estudo indicam que o 4',7-dihidroxiavilíio realmente interage com os diversos polinucleótidos e, através de medições tanto de absorvância como de emissão, é possível verificar a presença dessas moléculas usando este flavílio como sonda, dadas as significativas variações espectrais causadas pela interacção entre ambos.

Palavras-chave: flavílios, fotointercalção, DNA, RNA, espectroscopia

Abstract

The work here described has as objective the study of the photointercalation of flavylum dyes in polynucleotides and evaluating how the interactions between those two change depending on the composition and structure of such polynucleotides. The flavylum used in this study was the 4',7-dihydroxyflavylium and the polynucleotides were ct-DNA, poly(A:U) and poly(G:C).

Studies were done using UV-visible absorption spectroscopy, steady-state fluorescence and anisotropy fluorescence. Results show that there is no interaction between the chalcone form and the polynucleotides, only after irradiation leading to the formation of the cation species. Even before irradiation, adding the nucleotides shifts the equilibrium between the different species favouring the formation of the cation, as evidence for the stability of the adduct formed only with the cation. Furthermore, the stability of the cation can be seen through emission spectroscopy, where a reduction of the emission of the chalcone around 500 nm is accompanied by an increase in emission of the cation and quinoidal base (in equilibrium with the cation after excitation).

The anisotropy fluorescence measurements of the flavylum cation and quinoidal base in the presence of the different polynucleotides indicate that they cause a reduction in fluorescence anisotropy of the cation, concordant with a shift (increase) in its lifetime after intercalation

The results of the study indicate that the 4',7-dihydroxyflavylium really does interact with the different polynucleotides and, through both absorbance and emission, it's possible to detect the presence of those molecules using this flavylum as a probe, given the significant spectral changes brought upon by the interaction between those molecules.

Keywords: flavylum, photointercalation, DNA, RNA, spectroscopy

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Ácidos nucleicos.....	2
1.1.1. Os componentes dos ácidos nucleicos.....	2
1.1.2. Estrutura dos ácidos nucleicos.....	4
1.2. Flavonóides.....	6
1.3. Flavílios.....	7
2. Materiais e métodos.....	11
2.1. Materiais.....	12
2.2. Técnicas utilizadas.....	13
2.2.1. Saltos de pH.....	13
2.2.2. Medições de espectros de absorção e de fluorescência.....	13
2.2.3. Medições de anisotropia.....	14
3. Resultados.....	15
3.1. Estudo do 4',7-dihidroxiavilíio.....	16
3.2. Estudo da interacção com ácidos nucleicos.....	18
3.2.1. Estudo do flavíio em água.....	18
3.2.2. Estudo do flavíio em água com ct-DNA.....	22
3.2.3. Medições com pApU.....	29
3.2.4. Medições com pGpC.....	38
4. Discussão dos resultados.....	45
5. Conclusão.....	51
6. Bibliografia.....	53
6.1 Referências.....	54

Índice de figuras

Figura 1.1 - Os 3 componentes dum nucleótido: fosfato, açúcar e base azotada	2
Figura 1.2 - Estrutura da ribose e da desoxirribose.	3
Figura 1.3 - Formação de ligações fosfodiéster entre vários nucleótidos (DNA).	4
Figura 1.4 - Emparelhamento complementar das bases azotadas.	5
Figura 1.5 - Estruturas das conformações A, B e Z do DNA.	6
Figura 1.6 - Estrutura do catião flavílio.	7
Figura 1.7 - Rede típica do equilíbrio químico entre as várias formas dum flavílio	7
Figura 2.1 - Cuvette tamanho “macro” e tamanho “semi-micro”	12
Figura 3.1 - Espectros de absorção de soluções do 4',7-diOH a vários pHs, imediatamente após a adição do flavílio.	16
Figura 3.2 - Espectros de absorção de soluções do 4',7-diOH a vários pHs, 2 horas após a adição do flavílio.	17
Figura 3.3 - Curva de variação de absorção do catião (460 nm) e da chalcona-trans (370 nm) com o pH.	17
Figura 3.4 - Espectros de absorção do 4',7-diOH numa solução tamponizada com cacodilato, pH 4,64, após vários tempos de irradiação a 365 nm.	18
Figura 3.5 - Espectros de absorção do 4',7-diOH durante o processo de recuperação até atingir o equilíbrio.	19
Figura 3.6 - Espectros de fluorescência da irradiação do 4',7-diOH, com excitação a 417 nm.	20
Figura 3.7 - Espectros de fluorescência da recuperação do 4',7-diOH.	21
Figura 3.8 - Variação de intensidade de fluorescência da solução do 4',7-diOH durante a irradiação a 503 e 563 nm.	21
Figura 3.9 - Espectros de absorção da titulação do 4',7-diOH com ct-DNA.	22
Figura 3.10 - Variação de intensidade de fluorescência do 4',7-diOH conforme é adicionado ct-DNA.	23
Figura 3.11 - Variação de intensidade de fluorescência de chalcona/catião (503 nm) e de catião/base quinoidal (562 nm) durante a titulação com ct-DNA.	23
Figura 3.12 - Espectros de absorção durante a irradiação da solução do 4',7-diOH contendo 3.2E-5M de ct-DNA.	24
Figura 3.13 - Espectros de absorção durante apenas a recuperação da solução do 4',7-diOH contendo 3.2E-5M de ct-DNA.	25
Figura 3.14 - Espectros de fluorescência da solução do 4',7-diOH contendo ct-DNA durante irradiação.	25
Figura 3.15 - Espectros de fluorescência da solução do 4',7-diOH contendo ct-DNA durante recuperação.	26
Figura 3.16 - Espectros de anisotropia do catião e base quinoidal do flavílio, e flavílio após adição de ct-DNA.	27
Figura 3.17 - Espectros normalizados do 4',7-diOH a pHs 2,27, 5,64 e em água com e sem ct-DNA a pH rondando 4,5.	28
Figura 3.18 - Espectros normalizados de soluções 1E-5M de 4'-7-dihidroxi-flavílio diluído em tampão acetato, HCl e NaOH todos a 0.1 M.	29
Figura 3.19 - Espectros de absorção durante a irradiação da solução do 4',7-diOH até atingir o estado fotoestacionário, antes da adição de pApU.	29
Figura 3.20 - Espectros de absorção da solução do 4',7-diOH durante o processo de recuperação.	30
Figura 3.21 - Espectros de fluorescência durante a irradiação do 4',7-diOH antes da adição do pApU.	31
Figura 3.22 - Espectros de fluorescência durante a recuperação do 4',7-diOH antes da adição do pApU.	31
Figura 3.23 - Espectros de absorção da titulação da solução de 4',7-diOH com pApU.	32

Figura 3.24 - Variação de absorvância a 375, 478 e 494 nm durante a titulação do 4',7-diOH com pApU.	33
Figura 3.25 - Espectros de fluorescência da titulação da solução de 4',7-diOH com pApU.	33
Figura 3.26 - Variação de intensidade de fluorescência da mistura do 4',7-diOH com pApU conforme se adiciona o nucleótido.	34
Figura 3.27 - Espectros de absorção durante a irradiação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 µL de pApU.	34
Figura 3.28 - Espectros de absorção durante a recuperação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 µL de pApU.	35
Figura 3.29 - Espectros de fluorescência durante a irradiação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 µL de pApU.	36
Figura 3.30 - Espectros de fluorescência durante a recuperação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 µL de pApU.	36
Figura 3.31 - Variação de intensidade de fluorescência durante a irradiação e recuperação da solução 4',7-diOH contendo 100 µL de pApU 3,2E-5 M.	37
Figura 3.32 - Espectros de anisotropia para soluções de flavílio em cacodilato a pHs 2,18 e 6,8 e soluções a 3 pHs diferentes contendo pApU.	37
Figura 3.33 - Espectros de absorção da solução 4',7-diOH durante a titulação de pGpC.	38
Figura 3.34 - Espectros de fluorescência da solução 4',7-diOH durante a titulação com pGpC.	39
Figura 3.35 - Variação de intensidade de fluorescência da solução conforme se adiciona pGpC.	40
Figura 3.36 - Espectros de absorção do processo de irradiação da solução de 4',7-diOH contendo pGpC.	40
Figura 3.37 - Espectros de absorção do processo de recuperação da solução de 4',7-diOH contendo pGpC.	41
Figura 3.38 - Espectros de emissão do processo de irradiação do 4',7-diOH contendo pGpC.	42
Figura 3.39 - Espectros de emissão do processo de recuperação da solução de 4',7-diOH contendo pGpC.	43
Figura 3.40 - Variação de intensidade de emissão da solução do 4',7-diOH contendo pGpC durante a irradiação e recuperação da mesma.	43
Figura 3.41 - Espectros de anisotropia para soluções de flavílio em cacodilato a pHs 2,18 e 6,8 e de uma solução contendo flavílio e pGpC.	44
Figura 4.1 - Espectros de absorção das várias soluções de flavílio em água sem mais nada e com os vários polinucleótidos adicionados, no equilíbrio.	46
Figura 4.2 - Espectros de absorção das várias soluções de flavílio em água sem mais nada e com os vários polinucleótidos adicionados, no estado fotoestacionário.	47
Figura 4.3 - Sobreposição dos espectros de absorvância das várias soluções no equilíbrio e no estado fotoestacionário (i), após adição dos polinucleótidos.	47
Figura 4.4 - Espectros de emissão de fluorescência das várias soluções de flavílio com e sem polinucleótidos, no equilíbrio.	48
Figura 4.5 - Espectros de emissão de fluorescência das várias soluções de flavílio com e sem polinucleótidos, no estado fotoestacionário.	49

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Lista de polinucleótidos usados, bem como fabricantes e referências do website dos respectivos.	12
Tabela 4.1 - Resultados resumidos das medições de absorção.	46
Tabela 4.2 - Resultados resumidos das medições de fluorescência.	48
Tabela 4.3 - Valores de anisotropia medidos para o catião flavílio em soluções contendo os diferentes nucleótidos	49

Abreviaturas

4',7-diOH	4',7-dihidroxiavilino
Ct-DNA	<i>calf-thymus deoxyribonucleic acid</i>
pApU	<i>polyadenylic-polyuridylic acid</i>
pGpC	<i>polydeoxyguanylic-polydeoxycytidylic acid</i>

1. Introdução

1.1. Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são as moléculas que contêm a informação genética necessária para o desenvolvimento, funcionamento e reprodução de todos os organismos vivos que se conhecem. Estas moléculas são polímeros de nucleótidos, sendo estes por sua vez compostos por uma de 5 diferentes bases azotadas (citosina, guanina, adenina, timina e uracilo), uma pentose (ribose ou desoxirribose) e um grupo fosfato.

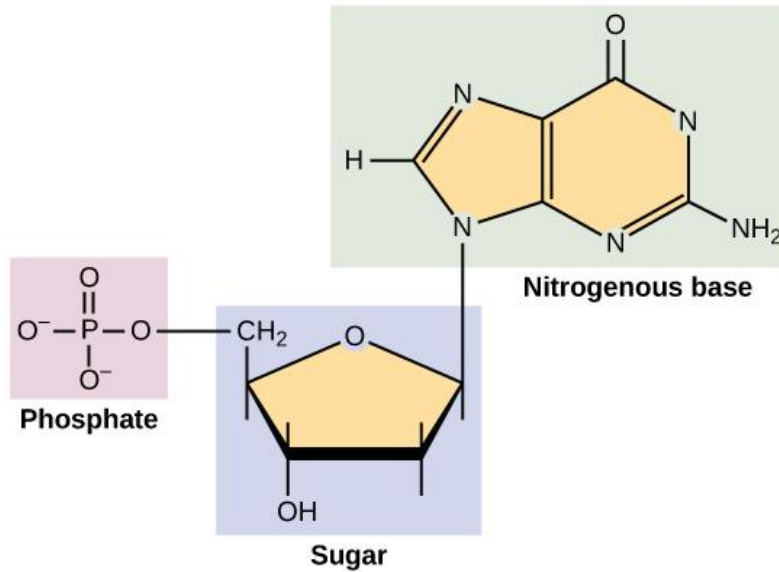
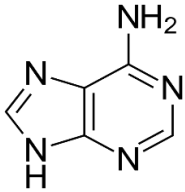
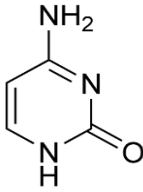
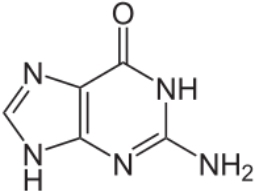
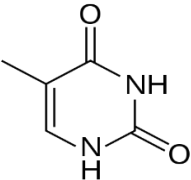
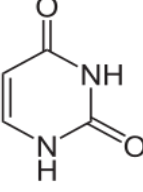


Figura 1.1 - Os 3 componentes dum nucleótido: fosfato, açúcar e base azotada ^[1]

1.1.1. Os componentes dos ácidos nucleicos

As 5 bases azotadas principais são divididas em purinas e pirimidinas. As purinas são as bases contendo anéis duplos (adenina e guanina) enquanto as pirimidinas têm apenas um anel (timina, citosina e uracilo). O emparelhamento destas bases nos ácidos nucleicos é feito entre adenina e timina (ou uracilo em RNAs) e citosina e guanina. O primeiro emparelhamento é estabilizado por 2 pontes de hidrogénio e o segundo por 3.

Tabela 1.1 - As 5 principais bases azotadas presentes em DNA e RNA

Purinas	Pirimidinas
 <p>Adenina</p>	 <p>Citosina</p>
 <p>Guanina</p>	 <p>Timina</p>
	 <p>Uracilo</p>

Os açúcares presentes nestes polímeros podem ser dois, a ribose e a deoxirribose, dos quais deriva o nome dessas macromoléculas. A distinção entre os dois é feita pela falta de um oxigénio na posição 2' da desoxirribose, sendo esta um derivado da ribose. Apesar de parecer pequena, esta diferença é bastante importante. O facto de a ribose ter um hidroxilo na posição 2' em vez de apenas um hidrogénio torna o RNA mais vulnerável a hidrólise catalisada por base.

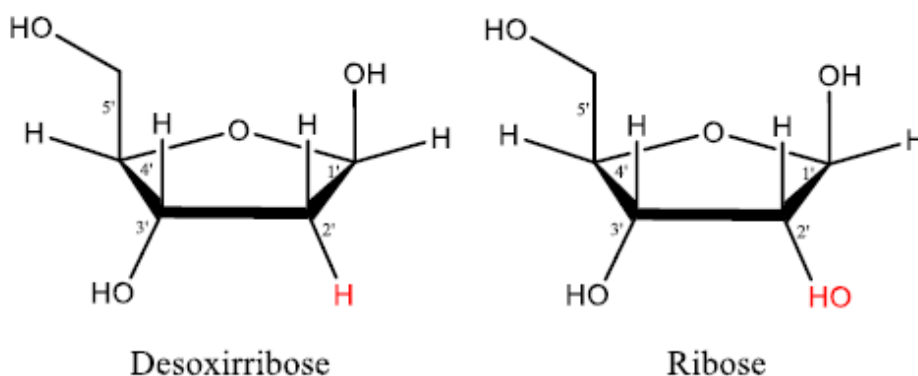


Figura 1.2 - Estrutura da ribose e da desoxirribose. [2]

A combinação duma base azotada (ou nucleobase) com um açúcar é chamada nucleósido, e a combinação deste elemento com um grupo fosfato é o nucleótido. O fosfato de um nucleótido liga-se ao açúcar do nucleótido seguinte por uma ligação covalente entre o oxigénio do fosfato e o grupo hidroxilo na posição 3' do açúcar. Esta ponte formada entre os grupos hidroxilo de dois açúcares pelo grupo fosfato é chamada ligação fosfodiéster. É de notar que os grupos

fosfato no *backbone* da molécula dos nucleótidos conferem-lhe uma carga negativa ao longo da estrutura.

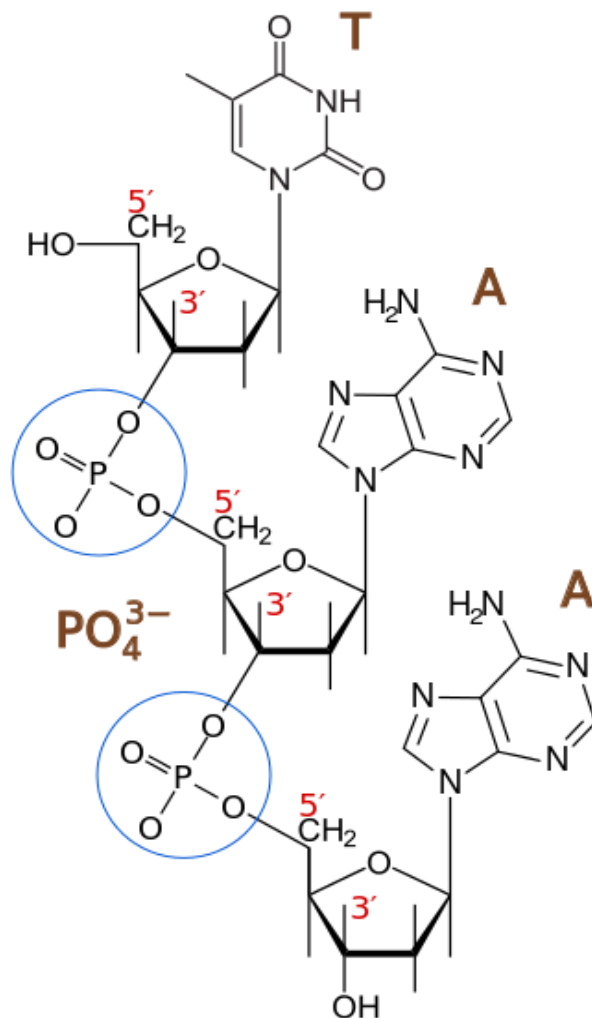


Figura 1.3 - Formação de ligações fosfodiéster entre vários nucleótidos (DNA).^[3]

1.1.2. Estrutura dos ácidos nucleicos

As várias pontes fosfodiéster formadas entre os nucleótidos dão origem aquilo que é o chamado *backbone* dos ácidos nucleicos, pois são aquilo que lhes confere a sua estrutura em cadeia característica. Sendo esta ligação formada por aquilo que é essencialmente uma reacção de condensação, é natural que ela possa ser quebrada por hidrólise. Lembrando que o RNA possui um hidroxilo na posição 2' da ribose, este tipo de nucleótido é mais vulnerável a hidrólise porque um ião hidroxilo vindo da água pode atacar aquele em 2', que por sua vez vai atacar o fósforo e ligar-se covalentemente a ele. Nesta situação, o fósforo tem 5 ligações, e vai querer quebrar uma, neste caso a ligação ao próximo nucleótido (pelo carbono 5'). Por esta razão as cadeias de RNA costumam ser mais curtas que as de DNA.

Uma molécula de DNA é composta de 2 cadeias complementares, unidas entre si pelas pontes de hidrogénio que se formam entre as bases azotadas em cada. A molécula de RNA é geralmente contrastada com o DNA como sendo de cadeia única por normalmente não

emparelhar com outras cadeias para formar a hélice dupla, mas tem a capacidade de se dobrar sobre si mesma devido à existência de zonas complementares internas na sequência, e geralmente é encontrada na natureza em estruturas originadas por esse processo.

Existe complementaridade entre as bases, e regra geral, elas ligam-se adenina com timina (ou uracilo em RNA) e guanina com citosina, devido ao número de pontes de hidrogénio que se podem formar entre elas.

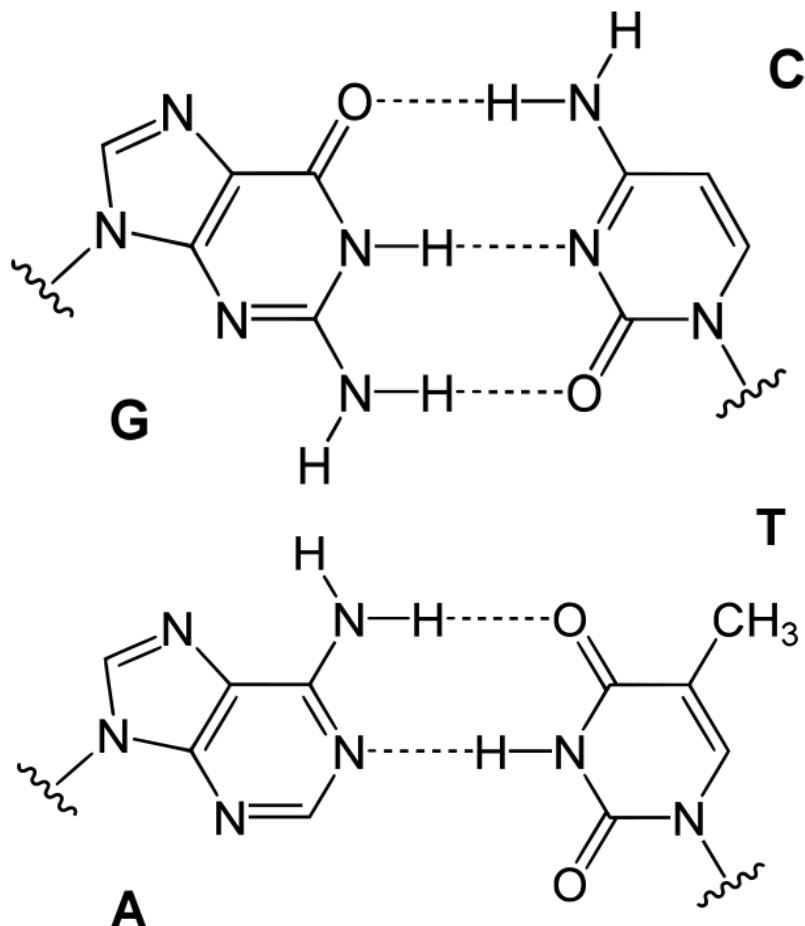


Figura 1.4 - Emparelhamento complementar das bases azotadas. [4][5]

Devido à diferença entre o número de pontes de hidrogénio entre os dois emparelhamentos, a quantidade de cada base presente numa molécula torna-se um factor que contribui para a estabilidade dela, sendo maior em moléculas com maior percentagem de guanina e citosina.

Se as duas cadeias na molécula de DNA estivessem “esticadas” linearmente, apresentariam grande tensão devido a efeitos estéricos causados pela proximidade das bases. Para os aliviar, as cadeias da molécula torcem-se numa forma helicoidal, que aumenta o espaçamento entre essas bases, dando origem à hélice dupla. Esta estrutura foi deduzida por James Watson e Francis Crick a partir de dados de difracção de raios-X obtidos por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins [6].

A estrutura em particular que Watson e Crick calcularam corresponde à conformação B. Essa é a forma mais comum *in vivo*. Além dela, existem ainda as conformações A^[7] e Z^[8]. As várias conformações diferem em múltiplas características, como o sentido da rotação da hélice, número de pares de bases por volta completa ou orientação das bases dentro da estrutura, e são estruturas alternativas que o DNA toma dependendo das condições do ambiente em que se encontra, como conteúdo de água ou concentração de iões.

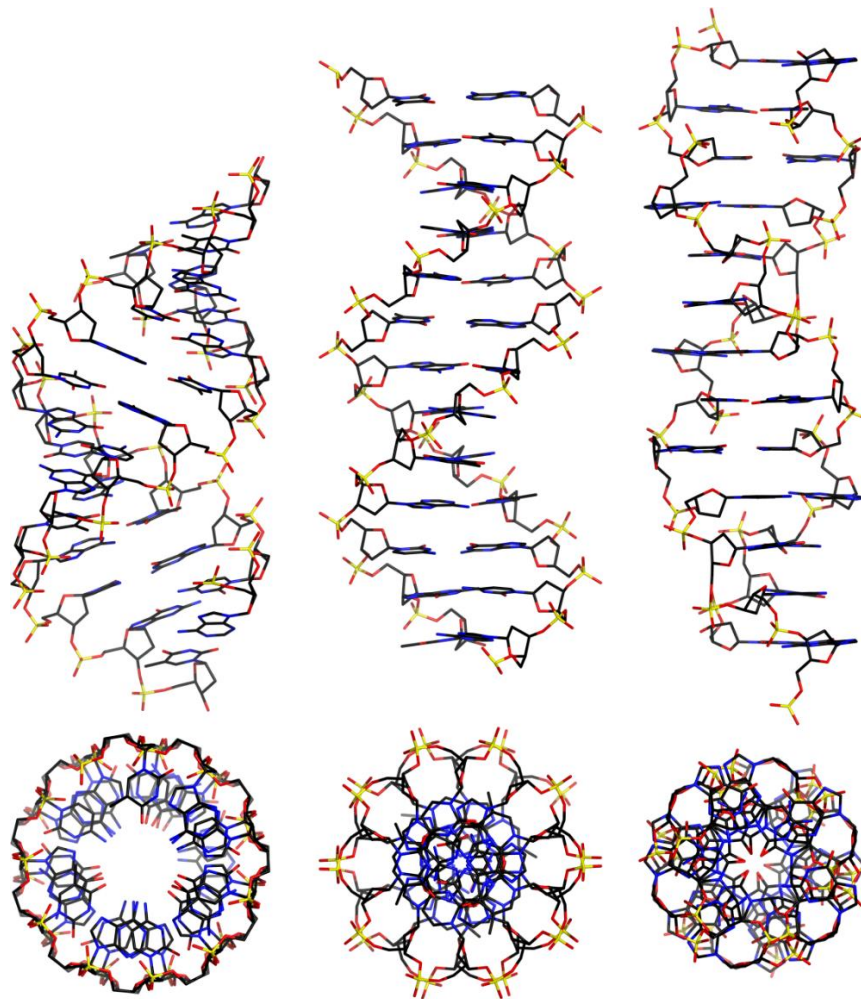


Figura 1.5 - Estruturas das conformações A, B e Z do DNA. [9]

Já foi feita investigação descrevendo o uso e criação de compostos para a detecção selectiva de polinucleótidos através de espectroscopia de entre os quais salienta-se o trabalho de Piantanida *et al*, onde foi demonstrado o reconhecimento selectivo de ácidos nucleicos por pequenos cromóforos [10] e por análogos sintéticos de nucleobases [11], bem como o uso de compostos cujas propriedades de fluorescência alteram-se quando tais compostos se ligam a ácidos nucleicos [12]. Existem ainda estudos demonstrando também o uso de moléculas sintéticas para detecção de estruturas secundárias em polinucleótidos por meios espectrofotométricos. [13]

Todos estes estudos abrem o precedente para o trabalho que aqui está descrito, onde se tenta determinar se ocorre a interacção entre polinucleótidos e um flavílio em particular, como as propriedades de absorvância e fluorescência do flavílio são influenciadas por essa interacção, e como essa interacção depende da constituição desses ácidos nucleicos.

1.2. Flavonóides

A classe do composto em estudo, dos flavílios, é uma série de substâncias que, por sua vez, é uma subclasse dos flavonóides, que são um conjunto de metabólitos importantes presentes em plantas e fungos. Estes compostos servem múltiplas funções, mas uma das mais notáveis é a de serem os pigmentos mais importantes nas plantas, visto que existe uma grande variedade

de cores nesta classe de substâncias. Cores como o amarelo, azul ou vermelho presentes em flores são devidas aos flavonoides.

A estrutura básica do flavonóide contém dois grupos fenil e um anel heterocíclico, estando este último anel unido a um dos grupos fenil, e o outro fenil substituído no anel heterocíclico. A composição do anel heterocíclico e a posição de substituição do fenil nele determinam a subclasse do flavonóide em questão. Desta estrutura básica derivam vários subgrupos de compostos, como por exemplo, as antocianidinas, grupo onde está incluído o composto em estudo neste trabalho. Na figura 1.6 pode-se ver o esqueleto “base” das antocianidinas:

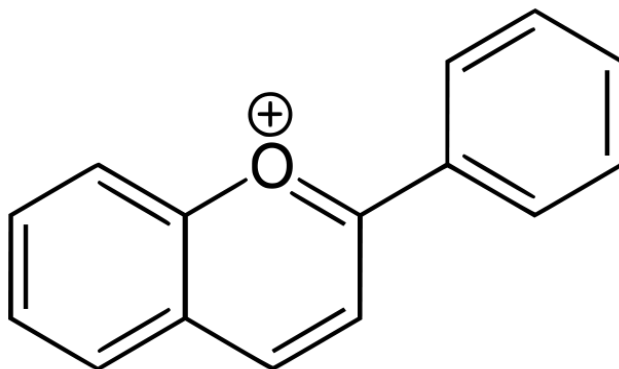


Figura 1.6 - Estrutura do catião flavílio. ^[14]Esta estrutura em particular, com as duas ligações duplas e o oxigénio carregado positivamente, é a base para as antocianidinas.

1.3. Flavílios

Os flavílios possuem uma rede característica de formas diferentes. A conversão entre estas formas pode ser influenciada por radiação electromagnética, bem como pH e temperatura. A rede geral que estes compostos possuem inclui duas formas chalcona, uma em conformação *cis*, e outra em *trans*, ambas com o anel heterocíclico aberto, uma forma hemiacetal, já com o anel fechado, a forma catiónica e a forma de base quinoidal. A conversão de chalcona-*trans* em chalcona-*cis* por absorção de luz é o que confere as propriedades fotocromáticas a estes compostos. Pode-se ver em baixo um exemplo desta rede:

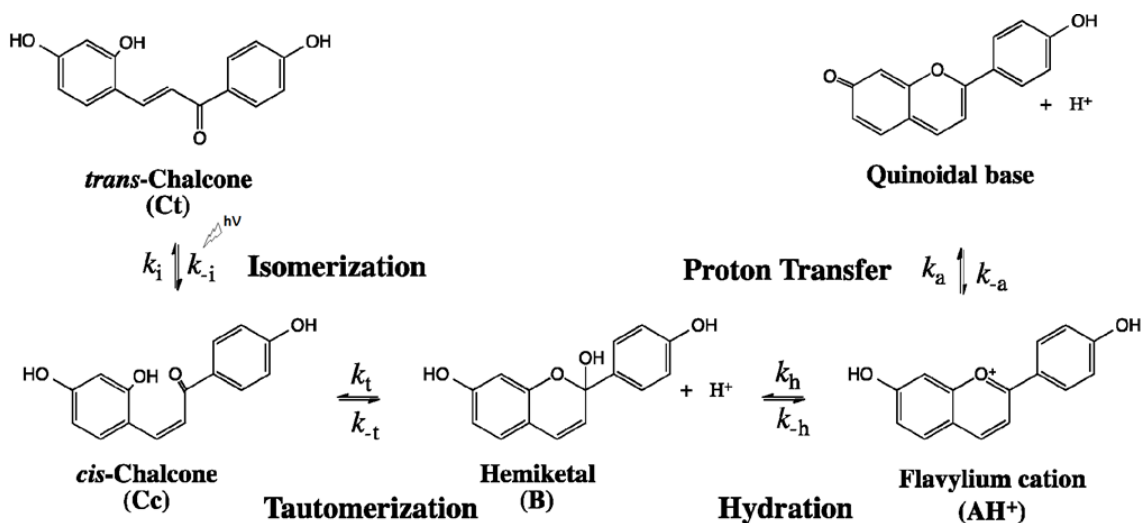


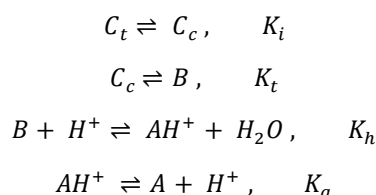
Figura 1.7 - Rede típica do equilíbrio químico entre as várias formas dum flavílio (ilustrado o equilíbrio do 4',7-dihidroxi flavílio) (adaptado ^[15])

Deste equilíbrio químico é possível observar 4 diferentes reacções que ocorrem: a isomerização da chalcona *trans* em *cis*, a tautomerização da chalcona-*cis* em hemiacetal, a passagem do hemiacetal para catião, com libertação de água, e finalmente, a conversão do catião em base quinoidal, com perda dum próton.

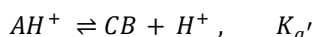
Pode-se ver pelo esquema reacional ilustrado na figura 1.7 que a formação das várias espécies do flavílio 4',7-diOH está dependente da isomerização da chalcona-*trans* em chalcona-*cis*, por absorção de fotões. Isto indica-nos que existe uma barreira energética considerável a ultrapassar se quisermos causar a formação do catião ou base quinoidal a partir da chalcona-*trans*. É de notar também que, como já mencionado, alterações de pH também podem causar a conversão da chalcona-*trans* nas outras formas do flavílio, sendo que em pHs bastante abaixo do pK_a a forma catiónica será a maioritária no equilíbrio.

A chalcona-*cis* e o hemiacetal convertem-se rapidamente nas restantes espécies e têm, portanto, um tempo de vida curto. Por esta razão, esta complexa rede de formas é tratada como um simples equilíbrio ácido-base, sendo o ácido a forma catiónica e a "base" a soma das concentrações das restantes espécies. Isto é devido ao facto de que os flavílios, se não estiverem expostos à luz, tendem para um estado de equilíbrio termodinâmico onde o catião e a sua base conjugada são as espécies que estão presentes em maior quantidade em solução, devido à sua maior estabilidade. Dependendo das características de cada composto em particular, a base conjugada pode ser a base quinoidal, o hemiacetal ou a chalcona-*trans* [16].

Deste modo, a rede de reacções pode ser reduzida deste esquema:



Para este mais simples:



É de notar que esta simplificação produz uma pseudo-constante de acidez que apenas permite determinar a concentração da forma catiónica e da soma das bases conjugadas numa solução em equilíbrio, e não é indicativa do verdadeiro pK_a do composto.

Este trabalho tem como objectivo estudar e caracterizar as interacções entre um flavílio, após a sua irradiação, e vários polinucleótidos, de modo a determinar a viabilidade dele na detecção da presença desse tipo de moléculas. Os estudos foram efectuados com o 4',7-dihidroxi-flavílio, a pH à volta de 4,5. A estrutura deste flavílio pode ser vista na figura 1.7.

A este pH não ocorre degradação dos nucleótidos e não existe base quinoidal (pK_a reportado do flavílio é de 4.0 ou 4.3, dependendo da fonte [16]), isto porque essa forma do flavílio é termodinamicamente menos estável do que a forma chalcona-*trans*. Sendo assim, é necessário um pH consideravelmente maior que o pK_a do composto para retardar a reconversão da base em chalcona.

O 4',7-diOH, quando conservado sem exposição à luz, tende para um equilíbrio onde as duas espécies predominantes são a chalcona-*trans* e o catião.

É esperado que haja alguma interacção entre a forma catiónica e os nucleótidos, dado que o composto, sendo catião, possui uma carga positiva que deverá ser atraída pelo *backbone* negativamente carregado dos nucleótidos.

Já foram feitos estudos entre a interacção entre catiões deste tipo de compostos e polinucleótidos que revelam que realmente existe interacção [2]. Estes estudos foram feitos em condições semelhantes às descritas no presente trabalho, mas os flavílios usados neles são flavílios em que a forma catiónica é aquela presente em maior quantidade à volta do pH 5, enquanto o composto aqui usado encontra-se maioritariamente na forma de chalcona-*trans* no mesmo pH, sendo necessário irradiá-lo para causar a formação da forma catiónica

Este trabalho difere então, na medida em que visa determinar se este flavílio pode ser usado como um intercalador activável por irradiação com luz visível, e estudar a sua selectividade para nucleótidos.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

O flavílio foi previamente sintetizado no laboratório do grupo de Fotoquímica e Química Supramolecular. É um pó branco, com a estrutura que pode ser vista na figura 1.7, e que está complexado com cloro. A massa molar do complexo é de 339,7 g/mol. Pôde ser usado para preparação de soluções apenas com diluição em 0.1 M de HCl aquoso de modo a criar uma solução a pH=1. A dissolução foi feita sem necessidade de outros cuidados como uso de tampão.

Os nucleótidos usados foram os listados na tabela 2.1:

Tabela 2.1 - Lista de polinucleótidos usados e seus fabricantes.

Nucleótido	Fabricante
ct-DNA	Sigma-Aldrich ^[17]
pApU	Invivogen ^[18]
pGpC	Sigma-Aldrich ^[19]

As seguintes cuvettes foram usadas ao longo das várias experiências para efectuar medições:



Figura 2.1 - Cuvette tamanho “macro” e tamanho “semi-micro”, com capacidade para 3 e 1,5 mL, respectivamente. ^[20]

Ambas têm um percurso óptico de 1cm e são de plástico. A sua composição não absorve em nenhum dos comprimentos de onda usados nas experiências, não alterando portanto os dados obtidos. ^[20]

2.2. Técnicas utilizadas

2.2.1. Saltos de pH

Inicialmente foram feitas várias experiências de salto de pH para determinar a influência desse parâmetro no espectro de absorção do 4',7-dihidroxi-flavílio. Estas experiências foram realizadas utilizando cuvettes macro contendo soluções com 1 mL de NaOH 0.1M, 1mL de tampão fosfato 0.1M e 1 mL de flavílio 10E-4M em HCl 0.1M (num volume total de 3 mL isto resulta numa concentração de 3,3 E-5M do flavílio), individualmente acertadas para um pH final diferente. Os pHs foram medidos ao fim de duas horas, depois de esperar que as soluções equilibrassem.

Foram medidos espectros de absorção das soluções ao longo do tempo para ver a progressão. Os dados obtidos permitiram determinar as zonas de maior absorção de cada espécie presente em solução e permitiram determinar o pK_a'

2.2.2. Medições de espectros de absorção e de fluorescência

Após os saltos de pH preparou-se uma solução de NaOH 0.1M, tampão fosfato 0.1M e 4',7-diOH a 10E-4 M diluído em HCl 0.1M, a um pH de 4.56 (medido no final), com partes iguais dos 3 componentes a perfazer um volume total de 1 mL, numa cuvette semi-micro. Esta solução foi irradiada até o flavílio atingir o estado fotoestacionário, ou seja, um estado onde não se consegue aumentar mais a quantidade de catião presente em solução por excitação da *chalcona-trans*.

A irradiação foi seguida pela medição de vários espectros de absorção e de fluorescência ao longo do processo.

Posteriormente, foi feita a titulação com ct-DNA numa solução idêntica, e irradiação da mesma. Na titulação, tanto com este como com os outros polinucleótidos usados ao longo do trabalho, são adicionados 100 μ L numa solução contendo 3,2 E-4 M do polinucleótido em questão. Obtém-se no fim, portanto, uma solução com aproximadamente 3,3E-5 M do flavílio e 3,2E-5 M do polinucleótido adicionado, num volume de 1,1 mL. Esta alteração de volume dentro da célula é pequena que chegue para se desprezar, bem como as variações de concentração daí provenientes. Note-se também que a concentração dos polinucleótidos referida tem como base a massa molar dum único nucleótido (\approx 323 g/mol) visto que as cadeias de polinucleótidos têm comprimentos variáveis e não se pode definir um único comprimento como sendo o correcto. Nesta medida, as soluções usadas no trabalho contém um rácio aproximado de 1 molécula de flavílio para cada 1 nucleótido.

Provou-se difícil conseguir manter o pH próximo do valor desejado de 4.5, e foram feitas repetições da experiência com tampões acetato e cacodilato. Este último acabou por ser escolhido como o melhor para medições subsequentes por ter permitido resultados mais consistentes. As soluções usadas nessas experiências são idênticas àquela previamente descrita, com substituição do tampão fosfato por cacodilato.

As irradiações foram feitas com uma lâmpada de xénon-mercúrio de 300 Watts utilizando um filtro de cut-off de 365 nm.

As medições de fluorescência usam um comprimento de onda de excitação de 417 nm, que é especificamente o ponto isobéptico da solução, onde a *chalcona-trans* e o catião absorvem igualmente. Este comprimento é escolhido para que as contribuições para o espectro vindas das duas espécies sejam apenas dependentes das capacidades como fluoróforos delas.

O seguimento das cinéticas e titulações foi feito com um Cary 5000 UV-Vis-NIR e um SPEX Fluorolog-3. Após irradiação/adicação de nucleótido, a célula contendo a solução a ser analisada é colocada no Cary para medição de absorvância e após essa medição, imediatamente posta no SPEX para medição de fluorescência. Este processo demora entre 3 a 4 minutos para ambas as medições.

As experiências acima descritas foram realizadas com soluções contendo o 4',7-diOH e os polinucleótidos listados na tabela 2.1.

2.2.3. Medições de anisotropia

Após medições de absorção e de fluorescência, foram feitas medições de anisotropia de soluções do flavílio a pHs ácido e básico, e com os 3 diferentes nucleótidos utilizados. As medições foram feitas também com cuvettes semi-micro, com um volume de solução do flavílio de 1 mL com pH acertados para próximo de 4,5 mais os 100 μ L de nucleótido. O instrumento usado foi o SPEX Fluorolog-3 disponível no laboratório do grupo de Fotoquímica e Química Supramolecular do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa.

Às soluções contendo apenas ácido ou base quinoidal, o flavílio foi adicionado depois dos outros componentes da mistura e a medição feita imediatamente após, de modo a tentar minimizar o aparecimento de outras formas, visto que a mistura começa a equilibrar imediatamente.

3. Resultados

3.1. Estudo do 4',7-dihidroxi-flavílio

Inicialmente, estudou-se o comportamento do flavílio a diferentes pHs para perceber como varia o seu espectro. Para tal, foram realizadas experiências de saltos de pH onde se prepararam soluções de NaOH contendo tampão fosfato, ambos a concentrações de 0.1 M e com o tampão a diferentes concentrações. O flavílio, diluído em HCl 0.1 M, foi adicionado depois dos restantes componentes das soluções, e a sua absorção medida imediatamente a seguir. Os espectros medidos no momento após esta adição estão ilustrados na figura 3.1:

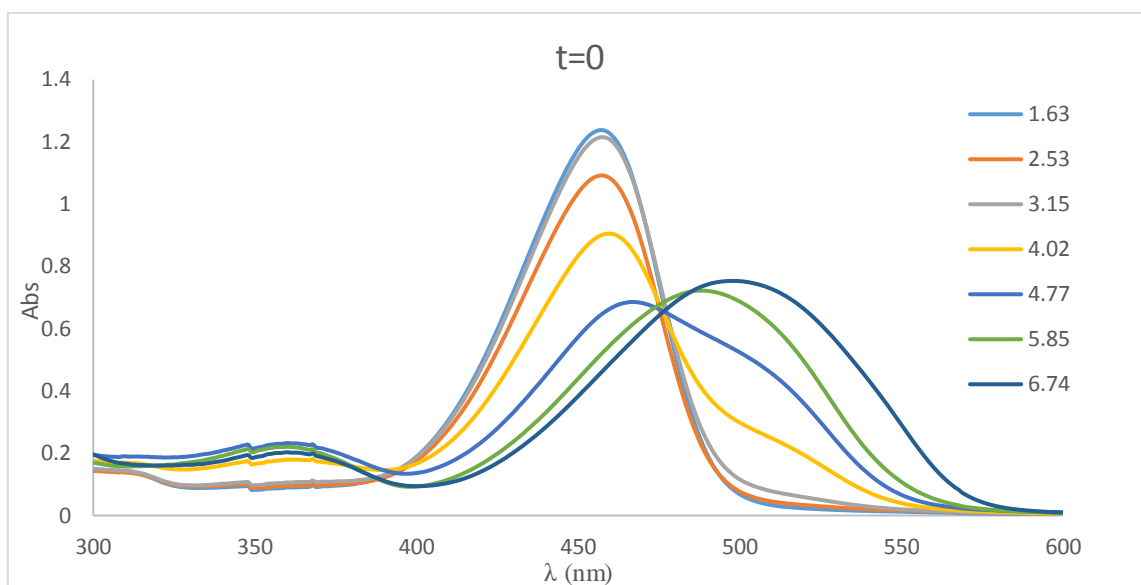


Figura 3.1 - Espectros de absorção de soluções do 4',7-diOH a vários pHs, imediatamente após a adição do flavílio.

É possível ver claramente a existência dum ponto isobéstico à volta dos 480 nm. Este ponto corresponde ao comprimento de onda onde o catião e a base quinoidal absorvem igualmente. Pode-se ver que o máximo de absorção do catião é à volta dos 460 nm, e o da base quinoidal à volta dos 500. A variação dependente de pH da quantidade de catião e base quinoidal que aqui se observa vai ao encontro do pK_a conhecido da literatura (4,0 - 4,3).

Em seguida, a figura 3.2 mostra os espectros das mesmas soluções depois de equilibrarem durante 2 horas.

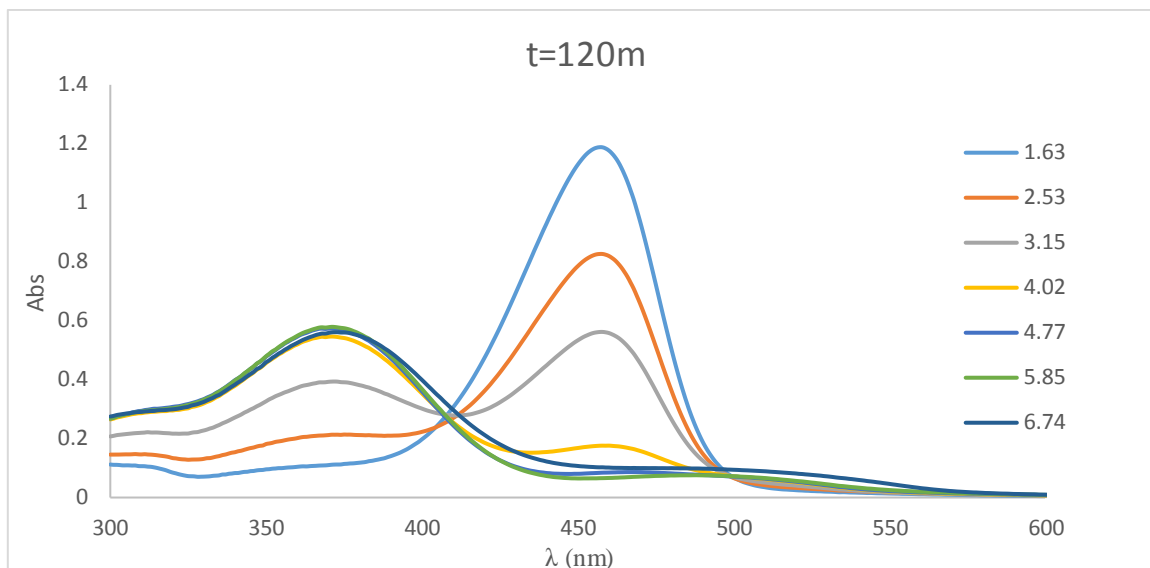


Figura 3.2 - Espectros de absorção de soluções do 4',7-diOH a vários pHs, 2 horas após a adição do flavílio.

Depois de equilibrar, os espectros ilustram agora um outro ponto isobéstico à volta dos 410 nm, este onde a chalcona-*trans* e o catião absorvem igualmente. Neste gráfico é também possível observar que mesmo a pHs bastante acima do pK_a a quantidade de base quinoidal presente depois de a solução equilibrar é muito pequena. Isto demonstra que essa forma do flavílio é termodinamicamente menos estável que a forma catião. Conforme o tempo passa essa base é convertida em catião, que retorna à forma chalcona-*trans*, em maior ou menor quantidade dependendo do pH, como se pode ver em cima.

Os dados de absorção destas experiências permitiram também determinar o pK_a aproximado do composto. Para tal, foram grafadas as absorvâncias para os máximos de absorção da chalcona-*trans* e do catião contra o pH, e foram feitos ajustes com valores de absorvância calculados, ilustrados na figura 3.3:

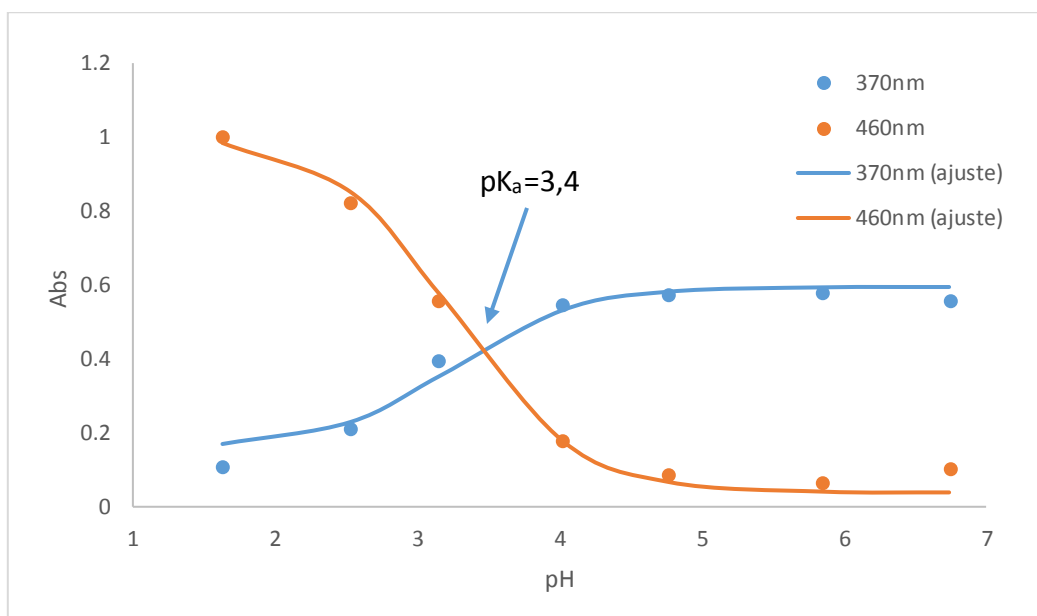


Figura 3.3 - Curva de variação de absorção do catião (460 nm) e da chalcona-*trans* (370 nm) com o pH.

Como o gráfico ilustra, o pK_a' parece ser à volta de 3,4. A literatura indica que o valor correcto é de 3,4 ou 3,05, dependendo da fonte ^[16], estando muito próximo daquele os dados parecem indicar. Este valor vai ao encontro dos espectros na figura 3.2.

3.2. Estudo da interacção com ácidos nucleicos

3.2.1. Estudo do flavílio em água

Foi estudada a interacção do 4',7-dihidroflavílio com vários ácidos nucleicos usando espectroscopia de UV-Vis e espectrofluorimetria.

Primeiro mediu-se o espectro da solução sem adição de nenhum nucleótido. Conforme se irradia a solução com luz visível é possível observar a fotoconversão da chalcona em catião. Em baixo pode-se ver a variação desse espectro ao longo do processo.

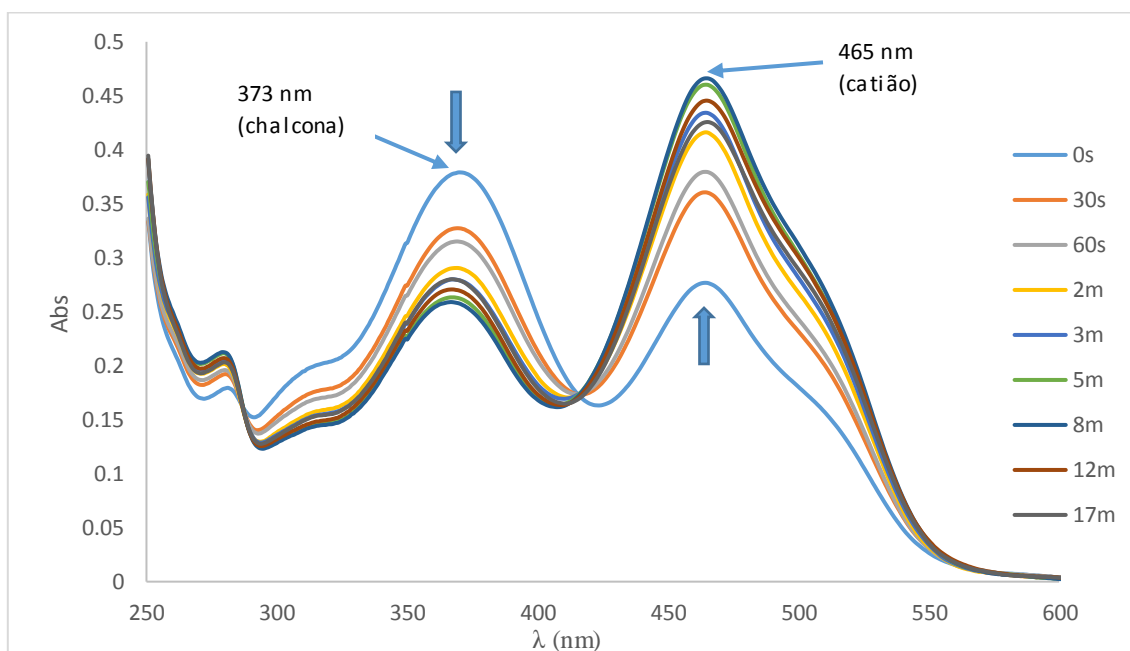


Figura 3.4 - Espectros de absorção do 4',7-diOH numa solução tamponizada com cacodilato, pH 4,64, após vários tempos de irradiação a 365 nm. A solução contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M. O pH da solução (medido no fim) é de 4,64. As medições aqui ilustradas são apenas aquelas feitas até se atingir o estado fotoestacionário do catião, e os tempos apresentados são o total de tempo de irradiação a que a amostra foi sujeita antes de cada medição. A solução foi irradiada com luz de comprimento de onda de 365 nm. O espectro inicial observado é semelhante em forma àqueles obtidos da experiência de salto de pH para os pHs 4,02 e 4,77, em equilíbrio, se bem que o valor de absorvância para a chalcona é um pouco menor e a do catião um pouco maior, possivelmente devido a exposição accidental a luz. O ponto isobéstico destas duas espécies é claramente visível aqui, à volta dos 417 nm.

A irradiação ocorreu durante um tempo total de 17 minutos, mas parece haver um retorno ao equilíbrio logo a partir dos 8 minutos, por razões desconhecidas.

Em seguida, na figura 3.5, pode-se ver os espectros medidos ao longo do processo de recuperação da solução, no escuro, até atingir o equilíbrio.

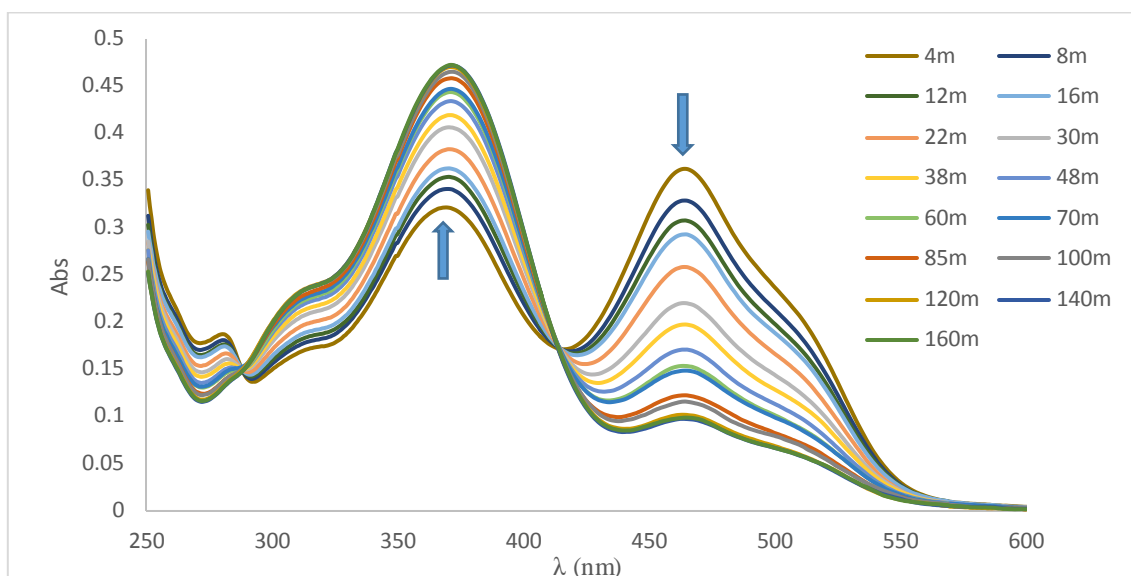


Figura 3.5 - Espectros de absorção do 4',7-diOH durante o processo de recuperação até atingir o equilíbrio. A solução é a mesma da figura 14, bem como as condições da experiência.

Depois de equilibrada a solução, a absorção da chalcona é maior que no princípio da irradiação e a do catião menor, o que indica que a solução deve ter sido exposta acidentalmente à luz antes de se iniciar as medições. De resto, a forma do espectro mantém-se igual ao longo da irradiação e da recuperação.

Em seguida, temos os espectros obtidos para as medições de emissão de fluorescência. O comprimento de onda de excitação aqui usado foi o do ponto isobéstico visível nos espectros de absorção, 417 nm. Este foi escolhido por ser aquele onde ambos a chalcona e o catião absorvem igualmente, e portanto, as contribuições deles para o espectro de emissão serão apenas dependentes do rendimento quântico.

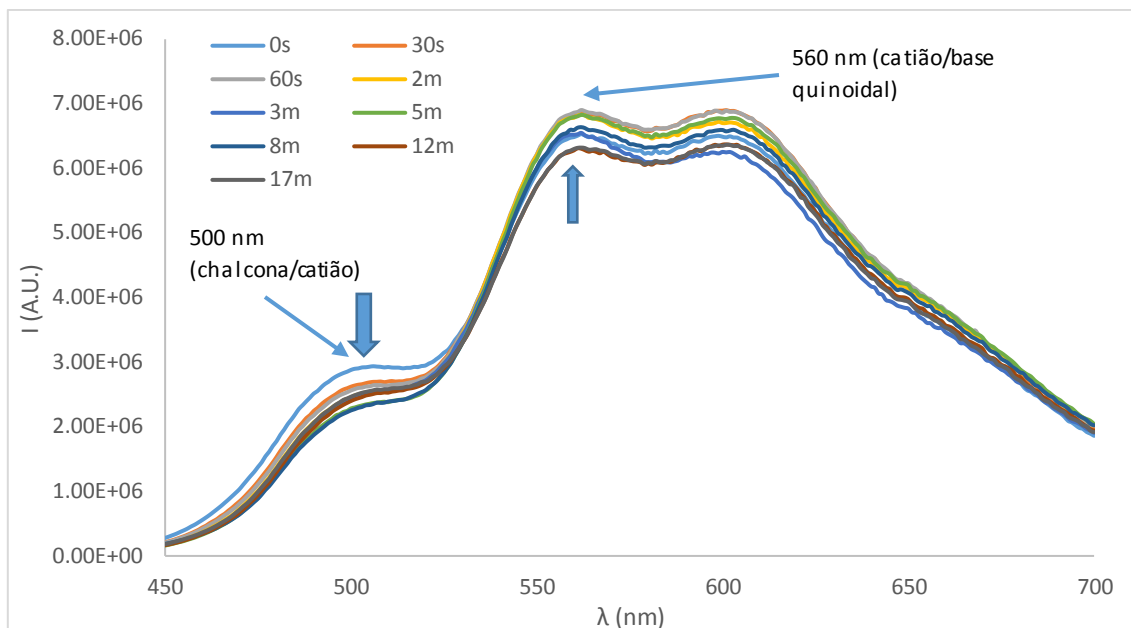


Figura 3.6 - Espectros de fluorescência da irradiação do 4',7-diOH, com excitação a 417 nm. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M. O pH da solução (medido no fim) é de 4,64. Estes espectros são apenas aqueles obtidos durante a irradiação da solução até se atingir o estado fotoestacionário. O comprimento de onda de excitação usado foi de 417 nm.

Estes espectros mostram uma diminuição da emissão à volta dos 500 nm e um aumento da emissão aos 560 nm, mas depois uma diminuição a partir dos 8 minutos. É importante mencionar que as bandas de emissão não correspondem apenas a uma espécie cada. A emissão da chalcona-trans e do catião sobrepõem-se na primeira banda, dos 500 nm, e a do catião e da base quinoidal sobrepõem-se na segunda, aos 560 nm. Isto implica que a variação aos 500 nm não será tão directa como se via para a chalcona nos espectros de absorção, e geralmente deverá ser menor visto que ao mesmo tempo que uma espécie contribui para aumento de emissão, a outra contribuirá para uma diminuição. Os espectros do processo de recuperação seguem-se ilustrados na figura 17:

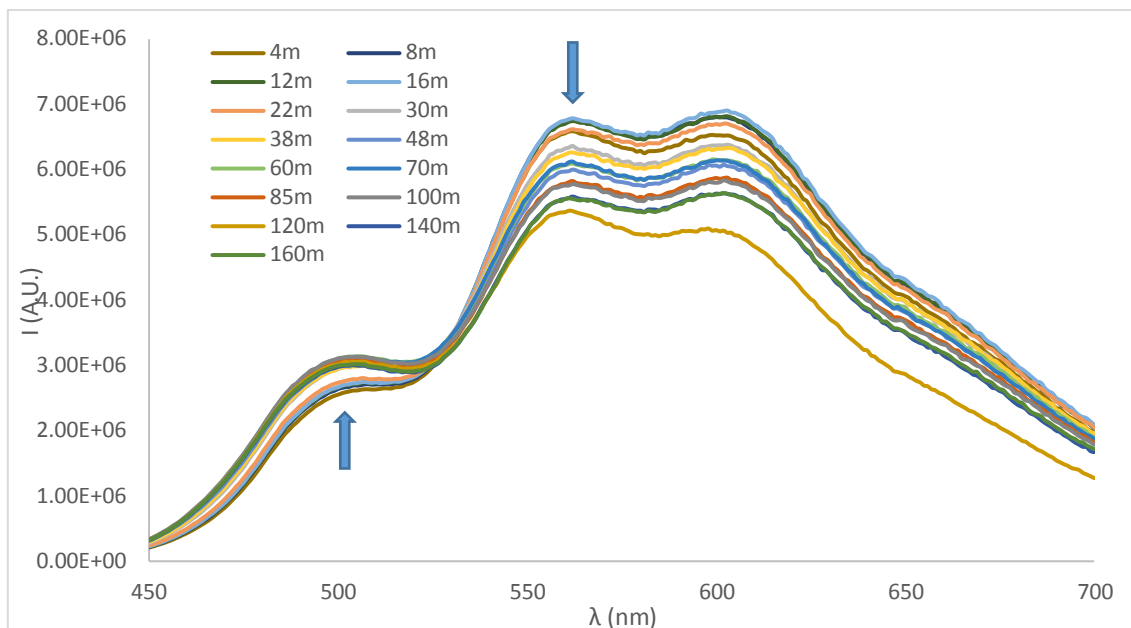


Figura 3.7 - Espectros de fluorescência da recuperação do 4',7-diOH. A solução usada contém 3,3E-5M do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M. O pH da solução (medido no fim) é de 4,64. Estes espectros são apenas os do processo de recuperação da solução do estado fotoestacionário de volta ao equilíbrio.

Durante a recuperação, nota-se um aumento de emissão perto dos 500 nm, correspondentes à chalcona. No entanto, perto dos 560 nm, correspondendo ao catião, verifica-se também aumento de emissão antes de começar a diminuir.

Na figura 3.8 pode-se observar a variação de intensidade de emissão aos 503 e 563 nm ao longo da experiência de irradiação e do processo de recuperação da solução, que ilustra mais claramente os detalhes explicados previamente.

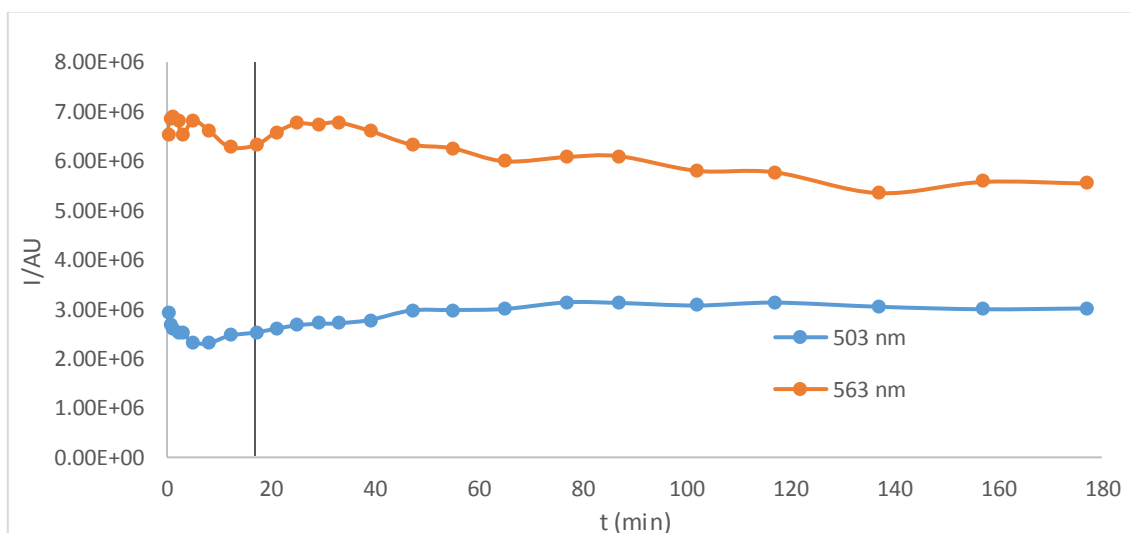


Figura 3.8 - Variação de intensidade de fluorescência da solução do 4',7-diOH durante a irradiação a 503 e 563 nm. Os comprimentos de onda ilustrados correspondem aos picos das bandas de emissão de chalcona/catião (503 nm) e de catião/base quinoidal (563 e 603 nm). A linha vertical indica o fim da irradiação e início de recuperação (depois de 17 minutos de irradiação).

3.2.2. Estudo do flavílio em água com ct-DNA

Após o estudo do flavílio foi feita a titulação de uma solução de composição idêntica à anterior com a adição de ct-DNA. A solução de ct-DNA titulado tinha concentração de $3,2 \times 10^{-4}$ M. Foram adicionados ligeiramente mais do que 100 μL dessa solução a um volume final de 1 mL para que a mistura final tivesse uma concentração de $3,2 \times 10^{-5}$ M de ct-DNA. A figura 3.9 ilustra a variação de absorvância da solução durante essa titulação:

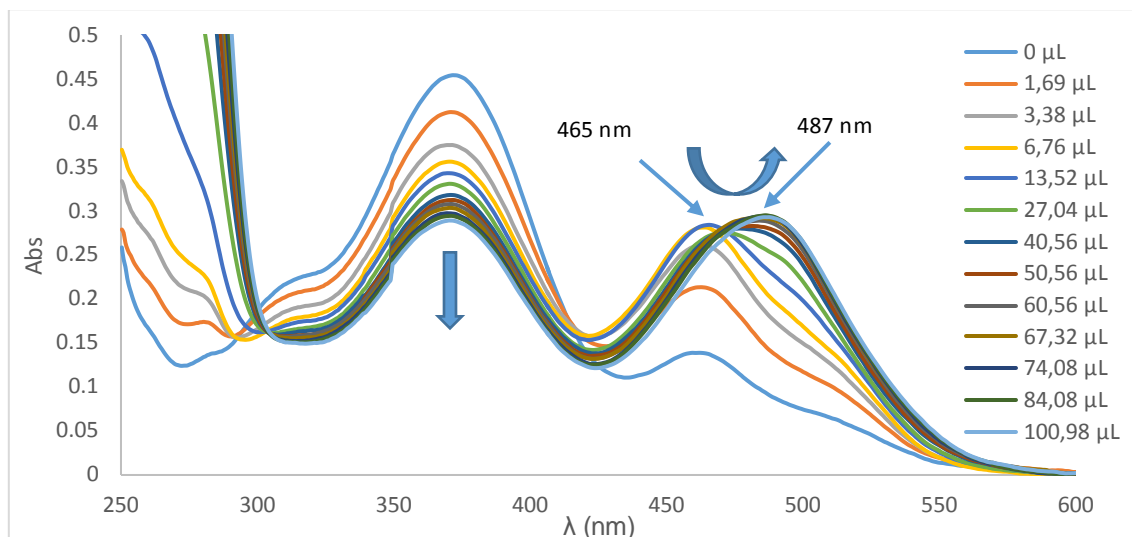


Figura 3.9 - Espectros de absorção da titulação do 4',7-diOH com ct-DNA. O pH da solução antes de iniciar a titulação é de 4,56, e de 5,14 depois de acabar. A solução usada contém $3,3 \times 10^{-5}$ M do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda 100 μL de ct-DNA $3,2 \times 10^{-5}$ M.

O gráfico mostra que a adição de ct-DNA cria um ambiente favorável à formação da forma catiónica do flavílio. Pode-se ver que a absorvância da chalcona diminui com um aumento simultâneo da absorção do catião. Isto verifica-se até à adição de um total de 13,52 μL de ct-DNA; a partir deste ponto, adições subseqüentes causam um desvio batocrômico do máximo de absorção da banda e alargamento da mesma.

A figura 3.10 ilustra as alterações do espectro de emissão ao longo da titulação:

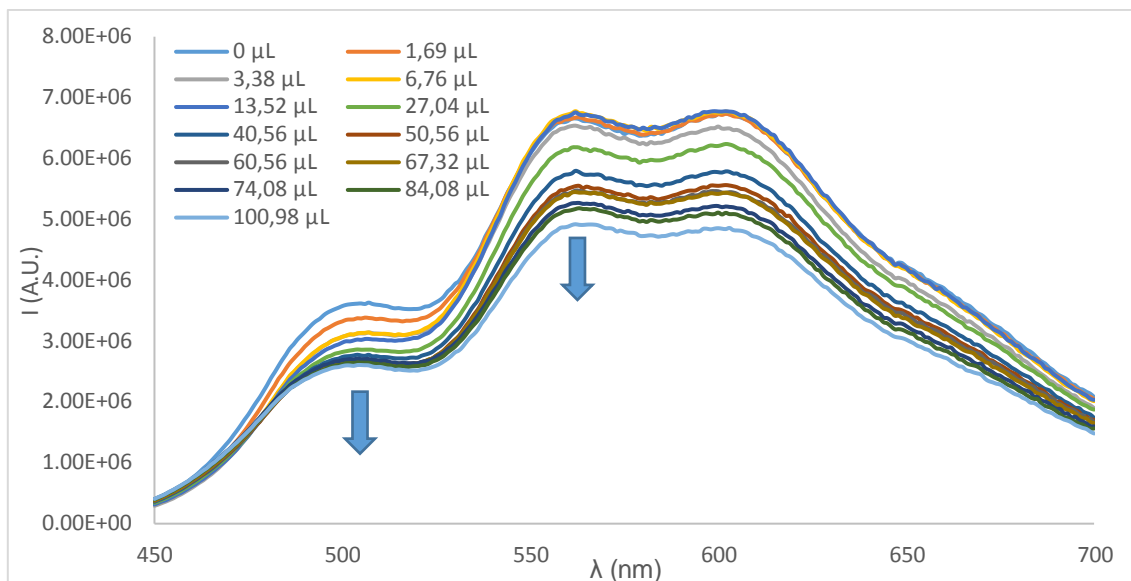


Figura 3.10 - Variação de intensidade de fluorescência do 4',7-diOH conforme é adicionado ct-DNA. O pH da solução antes de iniciar a titulação é de 4,56, e de 5,14 depois de acabar. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda 100 μL de ct-DNA $3,2E-5M$.

A adição de ct-DNA causa uma redução da intensidade de emissão da solução ao longo de todo o seu espectro, sendo este efeito mais pronunciado na zona do catião onde a chalcona não emite (perto dos 560 nm).

Na figura 3.11 pode-se ver este efeito mais claramente:

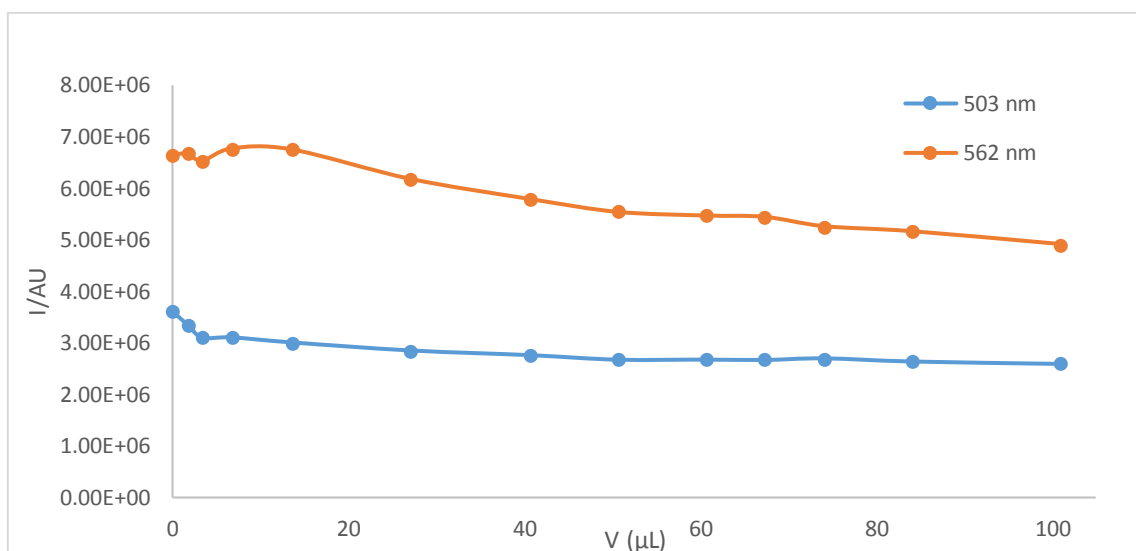


Figura 3.11 - Variação de intensidade de fluorescência de chalcona/catão (503 nm) e de catião/base quinoidal (562 nm) durante a titulação com ct-DNA. O pH da solução antes de iniciar a titulação é de 4,56, e de 5,14 depois de acabar. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda 100 μL de ct-DNA $3,2E-5M$. (diOH:ct-DNA \approx 1:1).

Tal como previamente dito, ocorre diminuição da intensidade de emissão de ambas as bandas de emissão, e nota-se mais essa diminuição para a banda de 562 nm, visto que à volta dos 500 nm ocorre uma diminuição porque a chalcona diminui mas o catião aumenta simultaneamente.

Após a titulação foi feita a irradiação da solução contendo o ct-DNA para estudar os seus espectros tanto de absorção como de emissão de maneira a analisar as diferenças causadas pela adição do polinucleótido.

A figura 3.12 mostra a avariação do espectro de absorção durante o processo de irradiação até ao estado fotoestacionário:

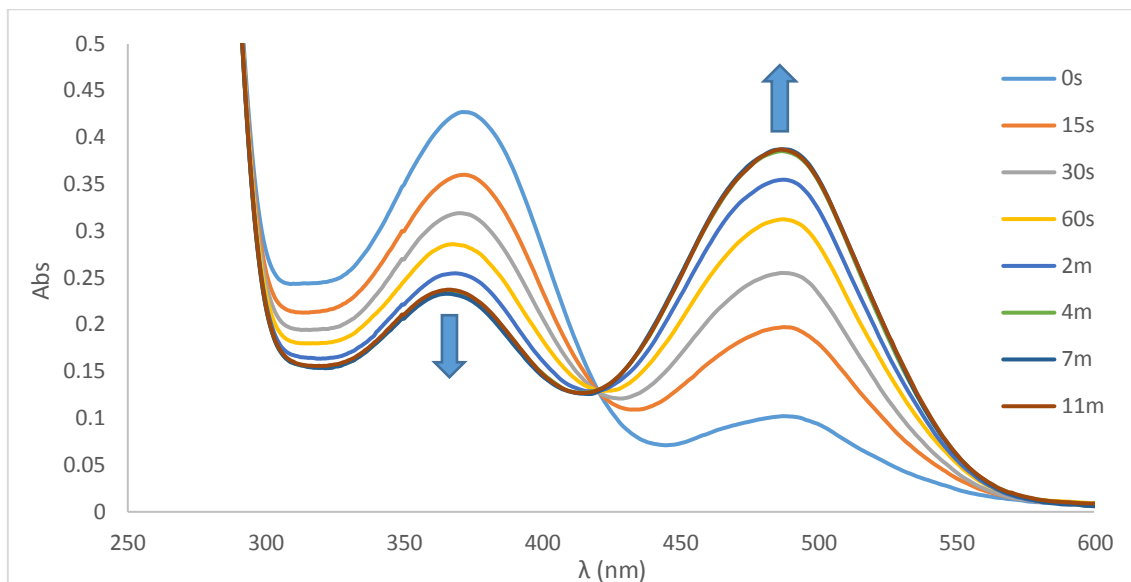


Figura 3.12 - Espectros de absorção durante a irradiação da solução do 4',7-diOH contendo $3,2E-5M$ de ct-DNA. A solução usada nestas medições é a aquela usada na titulação, tendo pH final de 5,14 e constituição igual, nomeadamente partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda 100 μL de ct-DNA $3,2E-5M$.

A solução contendo ct-DNA comporta-se de maneira semelhante àquela sem nucleótido, na medida em que a irradiação causa a fotoconversão da chalcona em catião, e apenas estas duas espécies estão presentes na solução, visto pelo ponto isobéstico. Tal como se pôde ver nos espectros obtidos durante a titulação, a banda de absorção do catião alargou, em comparação com o espectro pré-titulação, o máximo de absorção foi desviado para volta os 490 nm e o seu valor máximo no estado fotoestacionário também foi reduzido, passando de 0,46 para 0,35.

A figura 3.13 demonstra que o comportamento do flavílio também se mantém durante a recuperação. O catião vai-se convertendo de volta a chalcona-*trans*, demorando quase 2 horas e meia até atingir o equilíbrio.

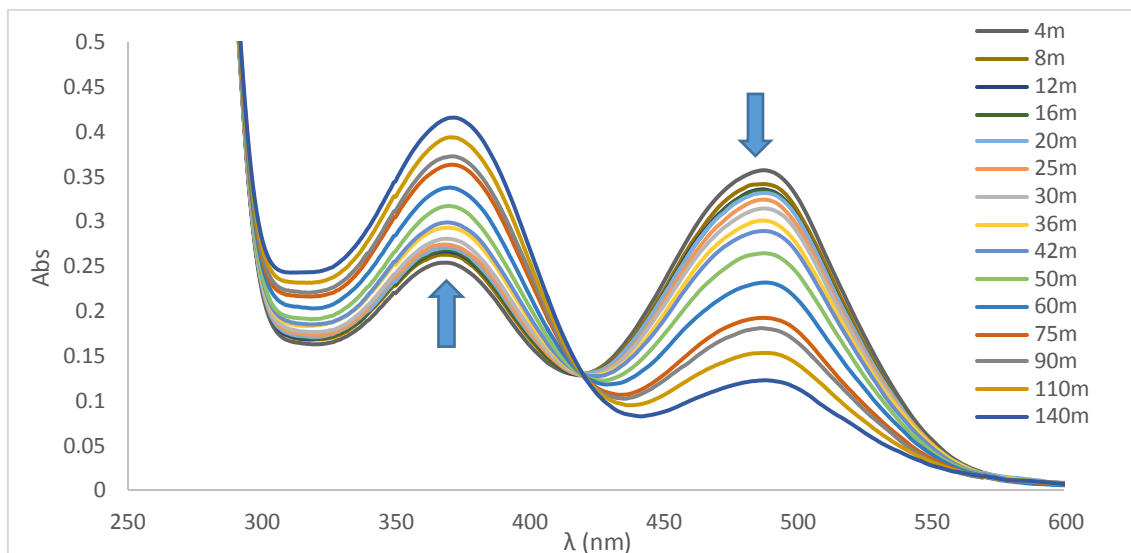


Figura 3.13 - Espectros de absorção durante apenas a recuperação da solução do 4',7-diOH contendo $3,2E-5M$ de ct-DNA. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda 100 μL de ct-DNA $3,2E-5M$. O pH, medido no fim da experiência, é de 5,14.

A figura 3.14 apresenta os espectros de emissão durante a irradiação até ao estado fotoestacionário do flavílio, após adição de ct-DNA.

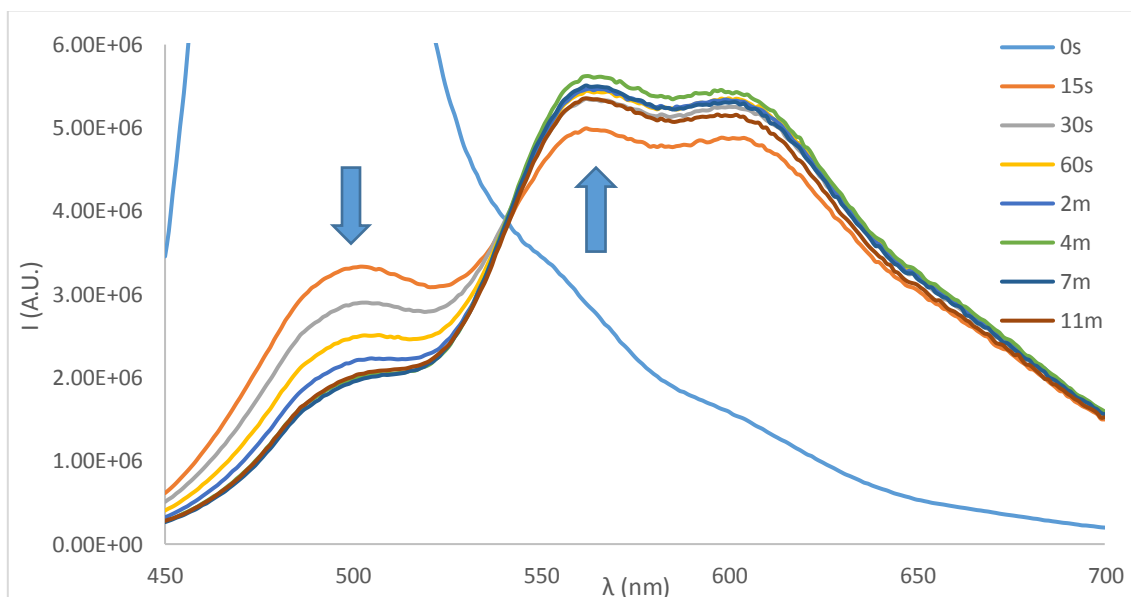


Figura 3.14 - Espectros de fluorescência da solução do 4',7-diOH contendo ct-DNA durante irradiação. Os máximos de emissão aqui visíveis da chalcona e do catião são, respectivamente, perto dos 490 e 560 nm. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda 100 μL de ct-DNA $3,2E-5M$ (diOH:ct-DNA $\approx 1:1$). O pH é de 5,14.

Vê-se uma alteração bastante abrupta imediatamente na primeira medição da irradiação, com a emissão da banda chalcona/catião a cair para quase um quinto e a do catião/base quinoidal a subir também consideravelmente, se bem que para apenas mais ou menos o dobro, o que deve ter sido causado por fenómenos de *quenching* causados pelo polinucleótido, visto que a

alteração abrupta ocorre imediatamente após a primeira adição de ct-DNA. As variações seguintes progredem mais devagar, com descida contante da emissão da chalcona conforme ela é convertida em catião, que emite cada vez mais, tal como se viu previamente à adição do polinucleótido.

O comportamento do flavílio misturado com ct-DNA durante a recuperação não varia muito daquilo observado nas medições anteriores, como se pode ver na figura 3.15:

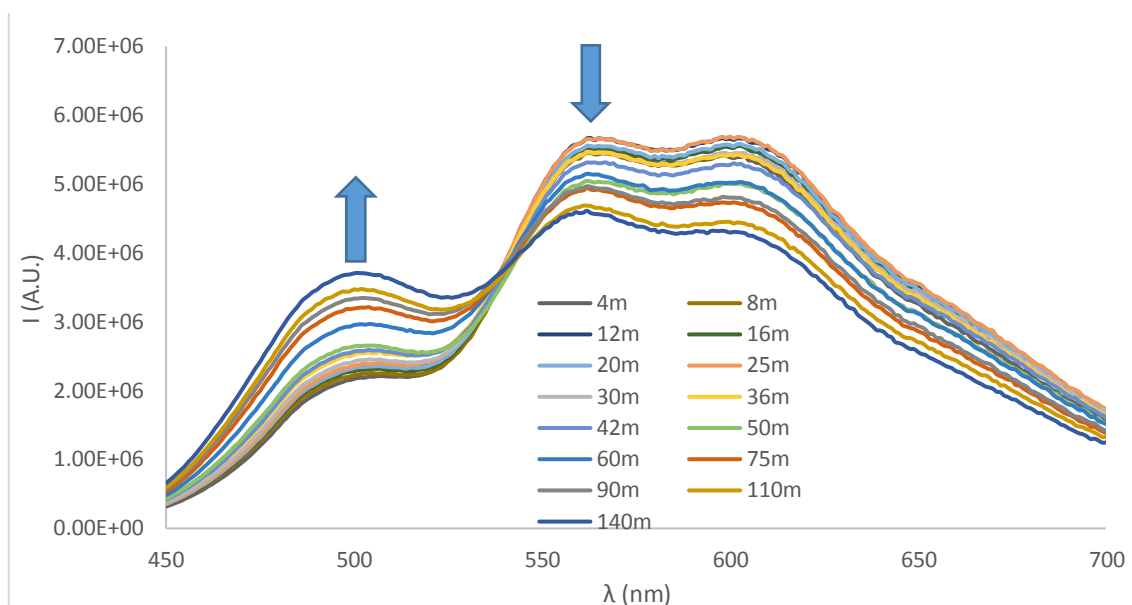


Figura 3.15 - Espectros de fluorescência da solução do 4',7-diOH contendo ct-DNA durante recuperação. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda $100 \mu L$ de ct-DNA $3,2E-5M$, a um pH de 5,14 (diOH:ct-DNA \approx 1:1).

Tal como acontecia com a solução sem ct-DNA adicionado, o flavílio em forma catiónica retorna à forma chalcona-*trans* quando deixado a equilibrar no escuro, com redução de emissão do catião e aumento da chalcona.

Os resultados, tanto de absorção como de emissão, mostram que o comportamento geral do flavílio não é alterado pela adição do ct-DNA. A irradiação leva à conversão da chalcona-*trans* em catião como normal, e ele regressa a chalcona numa escala de tempo semelhante. Verifica-se, no entanto, o desvio batocrómico e alargamento da banda de absorção do catião causado pela adição do ct-DNA, com redução do máximo de absorvância da mesma, bem como redução da intensidade de emissão de ambas as formas.

Após a irradiação do flavílio com ct-DNA foi medida a sua anisotropia de fluorescência no estado fotoestacionário, usando uma cuvette com uma solução igual àquela previamente usada, com $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, e ainda $100 \mu L$ de ct-DNA $3,2E-5M$. Foram também medidas as anisotropias para o flavílio sozinho em água, a pHs 2,18 e 6,8. Para tal foram feitos saltos de pH de modo a poder-se medir a fluorescência imediatamente antes que haja tempo para o flavílio começar a equilibrar.

Os resultados podem ser vistos em seguida, na figura 3.16:

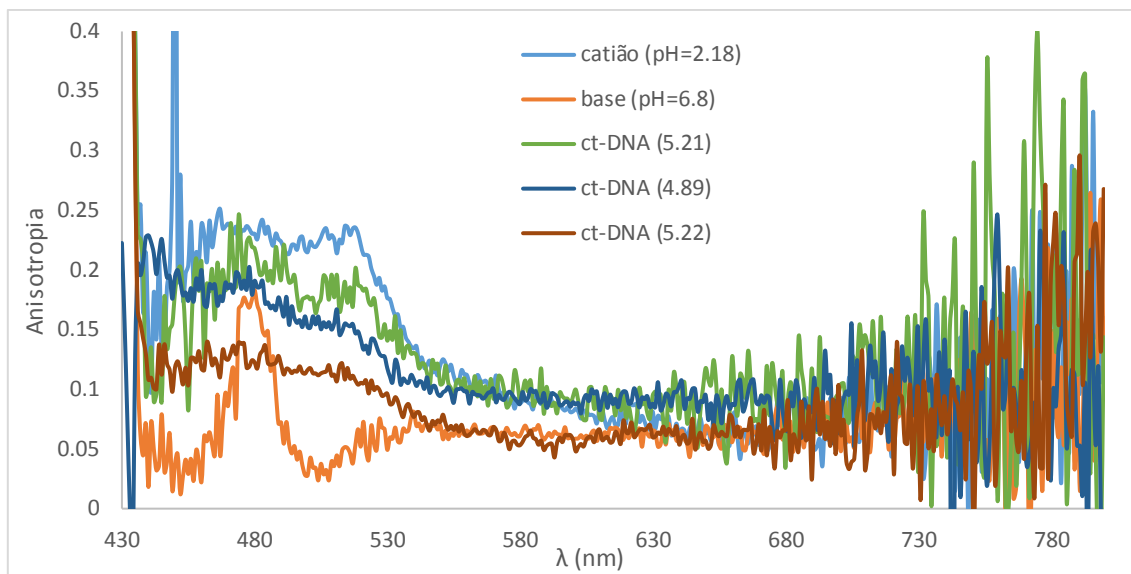


Figura 3.16 - Espectros de anisotropia do catião e base quinoidal do flavílio, e flavílio após adição de ct-DNA. As anisotropias ilustradas são de soluções contém o 4',7-diOH em cacodilato a pHs 2,18 e 6,8 (tirados imediatamente após um salto de pH) e soluções a 3 pHs diferentes contendo ct-DNA. Os pHs de cada solução de flavílio com ct-DNA podem ser vistos na figura.

As 3 medições indicam que a adição do ct-DNA à solução causa uma redução de anisotropia do catião.

Os espectros obtidos destas medições usando tampão cacodilato mostram resultados iguais aos obtidos com os tampões anteriores, fosfato e acetato. Mas, já destas primeiras medições tinha surgido a dúvida sobre se a banda alargada de absorção na zona do catião era mesmo devido a uma interação entre o ct-DNA e o catião ou se seria com a base quinoidal, visto que o seu máximo de absorção está sobreposto com parte da banda do catião.

Para tal, foram comparados os espectros normalizados do catião, da base quinoidal e do flavílio ao pH em estudo, com e sem ct-DNA. A normalização foi feita para o máximo de absorção na zona do catião/base quinoidal. Pode-se ver a comparação na figura 3.17:

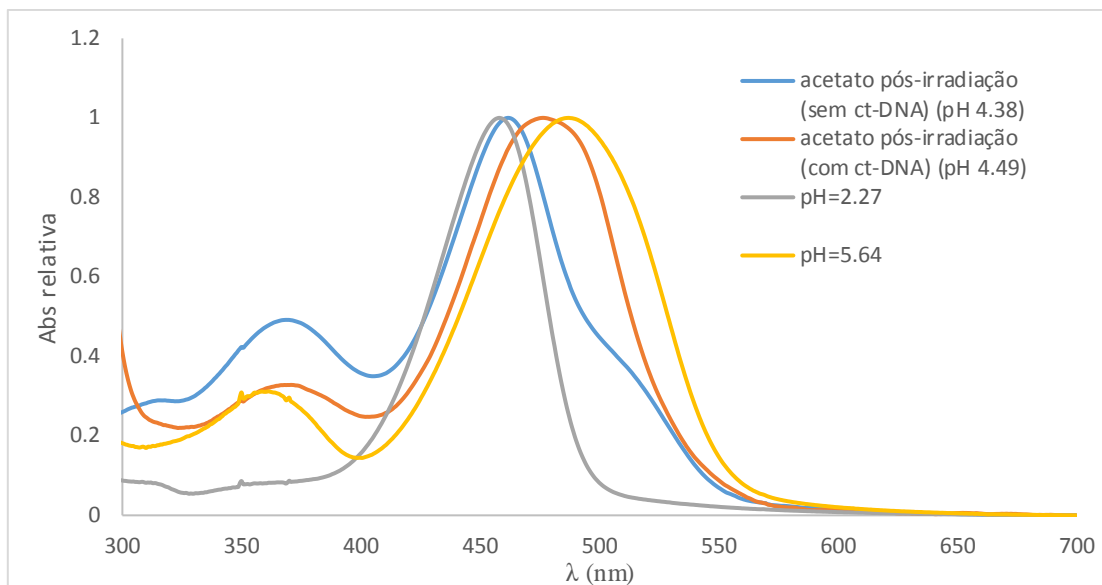


Figura 3.17 - Espectros normalizados do 4',7-diOH a pHs 2,27, 5,64 e em água com e sem ct-DNA a pH rondando 4,5. Os espectros estão normalizados cada um para o seu máximo de absorção da zona flavílio/base quinoidal. As soluções contém $1E-5M$ de 4'-7-dihidroxi-flavílio diluído em partes iguais de tampão acetato, HCl e NaOH todos a 0.1 M, num volume total de 1 mL. Os espectros do flavílio em água com tampão acetato, tanto com e sem ct-DNA, ilustram o estado fotoestacionário da solução. Os espectros a pH mais ácido e básico foram obtidos fazendo saltos de pH como os descritos previamente.

Tal como nos espectros mostrados previamente, antes da adição de ct-DNA, o catião é a espécie dominante após irradiação, e existe um “ombro” na sua banda de absorção, talvez devido à presença de uma pequena quantidade de base quinoidal. Lembrando que o pK_a do composto é de 4,0-4,3, ao pH ilustrado é possível que essa espécie se forme dada a presença de catião devido à irradiação.

Os espectros da solução do flavílio contendo ct-DNA e da solução a pH 5,64, que contém maioritariamente base quinoidal, têm uma forma semelhante. Isto deve-se ao facto da base quinoidal ter o seu máximo de absorção à volta dos 490 nm, bastante perto do valor máximo do catião quando este se encontra numa solução contendo ct-DNA, o que pode dar a ideia que está a haver formação da base. No entanto, é de lembrar que a base é formada a partir do catião e na experiência de titulação pôde-se ver claramente primeiro o aparecimento dessa espécie antes da banda de absorção começar a desviar para comprimentos de onda maiores, o que retira a dúvida.

O mesmo tipo de análise foi feito para a banda da chalcona para ter a certeza de que não ocorrem interacções entre ela e o ct-DNA.

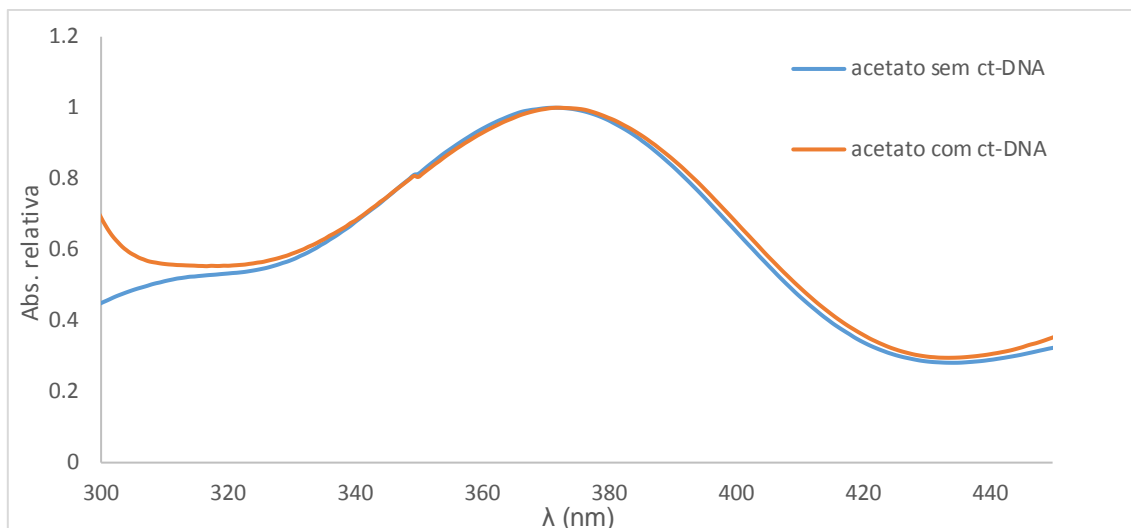


Figura 3.18 - Espectros normalizados de soluções $1E-5M$ de 4'-7-dihidroxi-flavílio diluído em tampão acetato, HCl e NaOH todos a 0,1 M. Os espectros foram normalizados para a zona de absorção da chalcona (300-400 nm). Estão presentes espectros de soluções a pH 4,29 sem e com $3.3E-5M$ de ct-DNA, estando estas em equilíbrio.

A zona do espectro correspondente à absorção da chalcona não sofre desvios de comprimento de onda e mantém uma forma semelhante, mesmo depois de se adicionar o ct-DNA. Sendo assim, podem-se excluir interações entre o DNA e a chalcona.

3.2.3. Medições com pApU

As experiências descritas previamente foram repetidas, desta vez com uso do polinucleótido pApU. Primeiramente foi feita uma medição do espectro de absorção do flavílio em água, que se pode ver na figura 3.19:

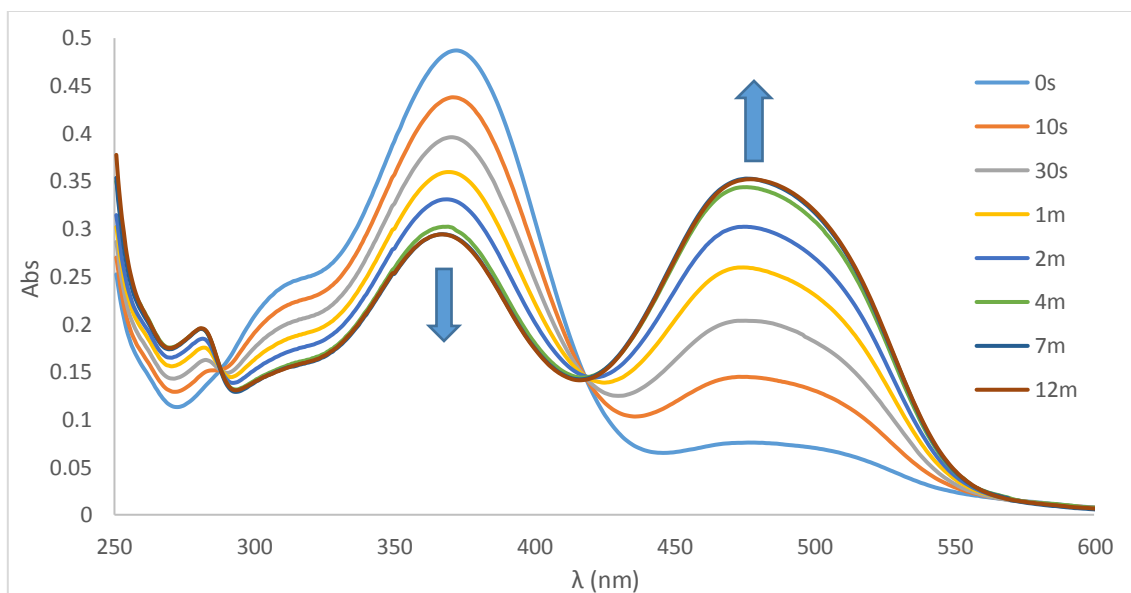


Figura 3.19 - Espectros de absorção durante a irradiação da solução do 4',7-diOH até atingir o estado fotoestacionário, antes da adição de pApU. O pH da solução medido no início da experiência é de 4,66. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL.

O espectro é semelhante àquele obtido anteriormente, mas a banda do catião alargou e o seu máximo de absorção foi desviado para os 475 nm. O ponto isobéstico ainda está presente e bem definido, portanto não devem estar presente mais espécies para além da chalcona-*trans* e catião apesar das mudanças observadas. Na figura 3.20 pode-se ver o processo de recuperação até ao equilíbrio:

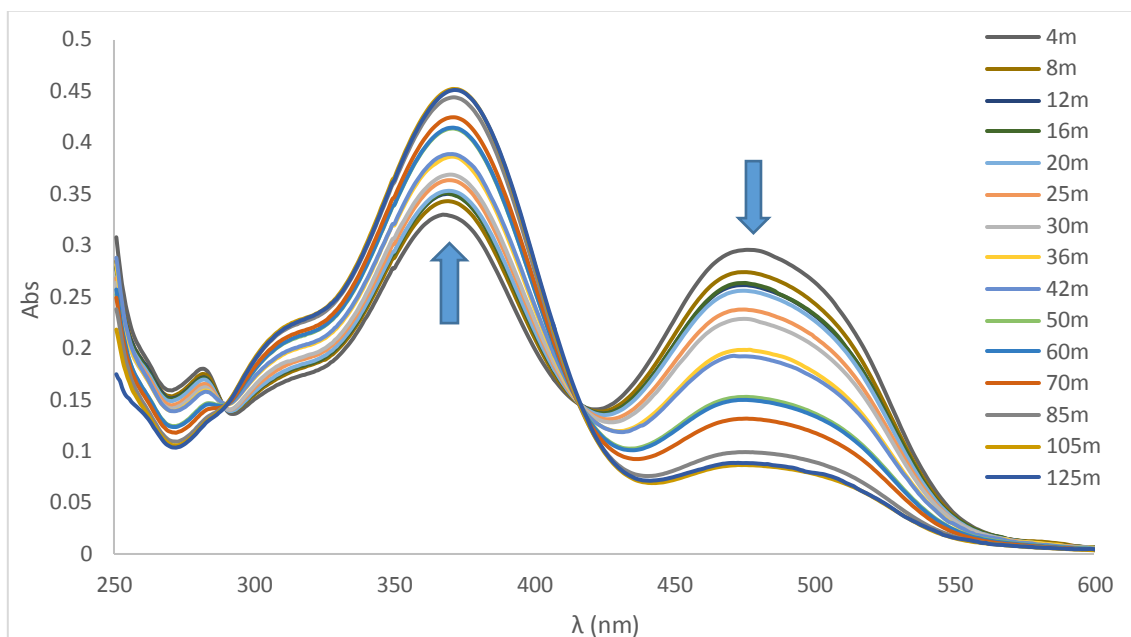


Figura 3.20 - Espectros de absorção da solução do 4',7-diOH durante o processo de recuperação. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL.

A recuperação da solução decorre como normal, tendo ela revertido para o equilíbrio após pouco mais de 2 horas. Os máximos de absorvância atingidos pela chalcona e pelo catião são semelhantes àqueles atingidos na experiência idêntica feita antes da titulação com ct-DNA.

Na figura 3.21 estão mostrados os dados de emissão de fluorescência da mesma solução durante a sua irradiação:

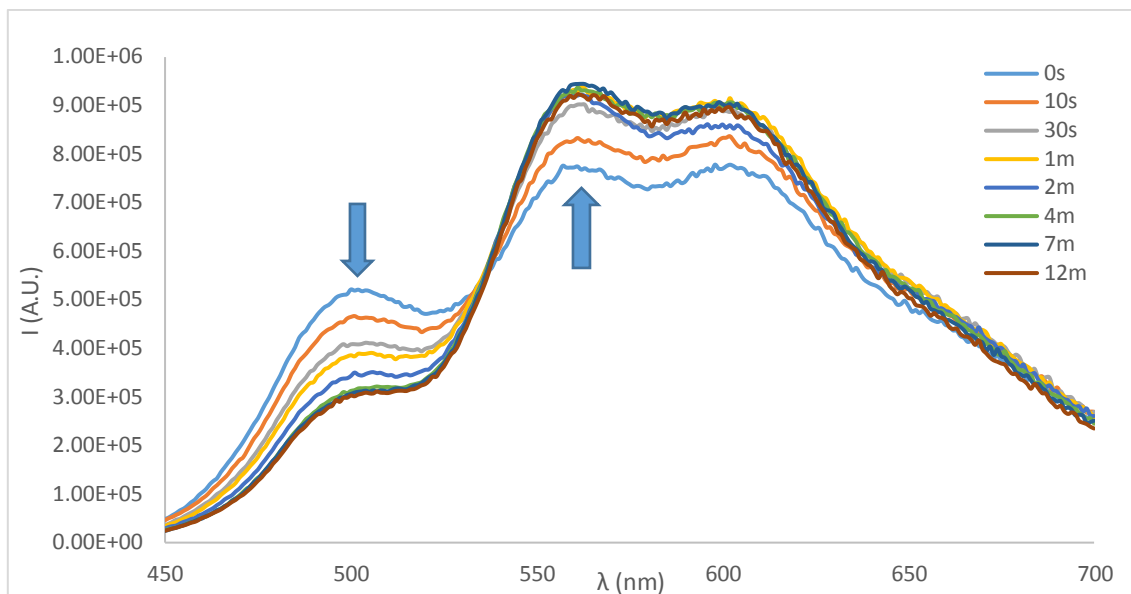


Figura 3.21 - Espectros de fluorescência durante a irradiação do 4',7-diOH antes da adição do pApU. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL.

Nota-se imediatamente que os valores medidos são quase uma ordem de grandeza menores que os da experiência prévia. Apesar disto, a forma e comportamento do espectro ao longo do processo de irradiação são os mesmos que já tinham sido vistos antes. A emissão chalcona/catião, aos 500 nm, vai diminuindo, e do catião/base quinoidal, aos 560 nm, aumenta em simultâneo.

Em seguida, na figura 3.22, podem-se ver os espectros durante a recuperação:

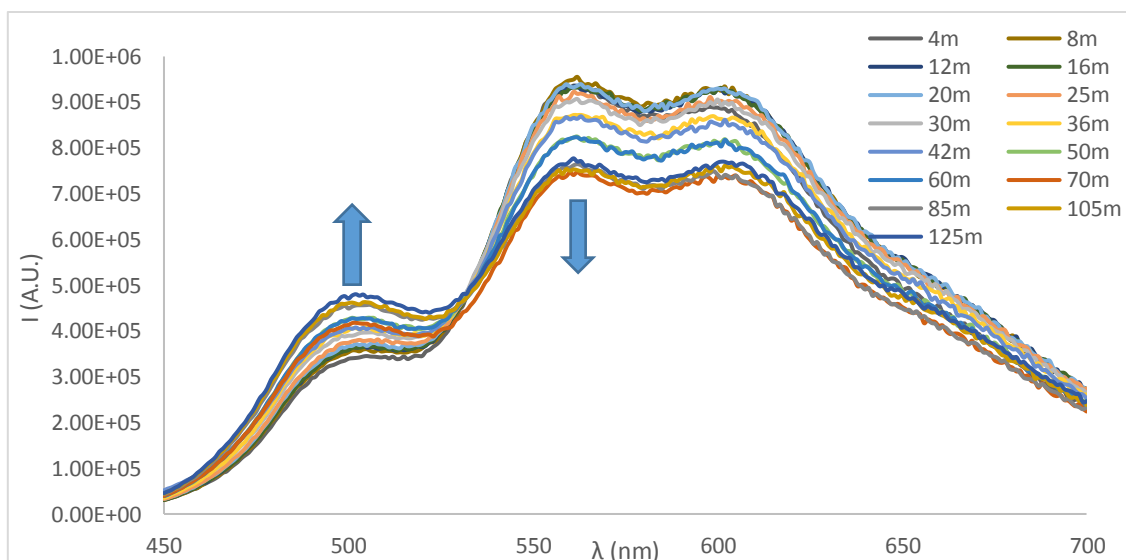


Figura 3.22 - Espectros de fluorescência durante a recuperação do 4',7-diOH antes da adição do pApU. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL.

A solução de 4',7-diOH preparada para as experiências com pApU comporta-se semelhantemente àquela previamente usada para o ct-DNA, sendo a diferença em intensidade de emissão a única diferença significativa encontrada.

Seguiu-se a titulação com pApU, cujos resultados podem ser vistos na figura 3.23:

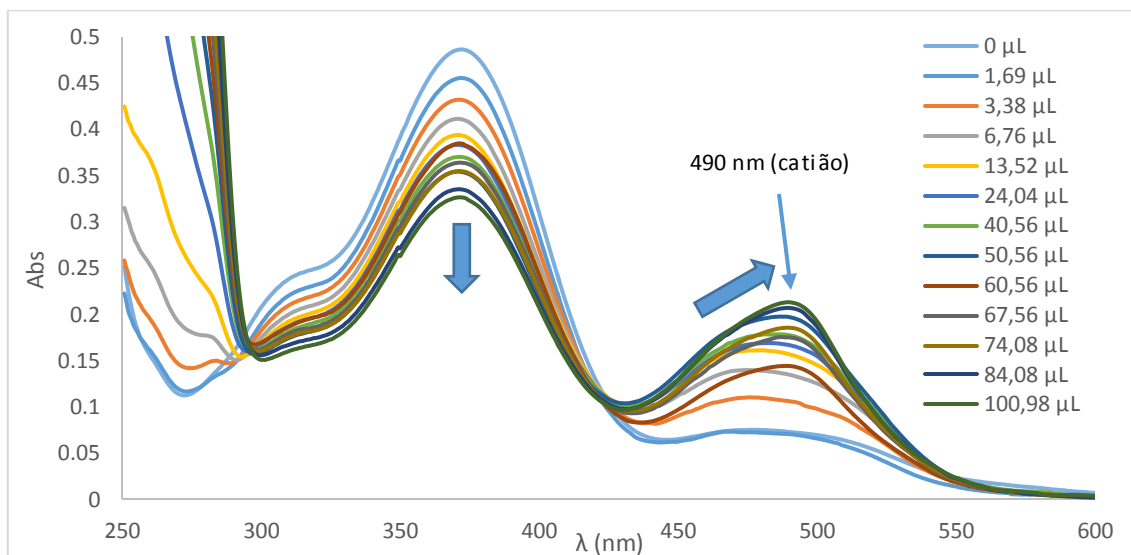


Figura 3.23 - Espectros de absorção da titulação da solução de 4',7-diOH com pApU. A solução usada, tal como nas experiências anteriores, contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL. A esta mistura foram titulados 100,98 μL de uma solução pApU $3.2E-4M$ em água. O pH desta solução, medido depois da titulação, é de 4,62.

Tal como na titulação com ct-DNA, a adição do polinucleótido estabiliza a formação da forma catiónica, visível pela diminuição de absorvância da chalcona, a 375 nm, e pelo aumento a 478 nm, correspondendo ao catião. Vê-se também o desvio do máximo de absorção do catião, passando dos 478 para os 494 nm.

Estas alterações são maiores nas primeiras adições, e depois seguem um ritmo constante, exceptuando-se a medição quando a solução contém um total de 60,56 μL . Esse espectro mostra um aumento de absorvância da chalcona e diminuição do flavílio, mas os seguintes espectros retornam à tendência.

Na figura 3.24 podem-se ver melhor estas variações:

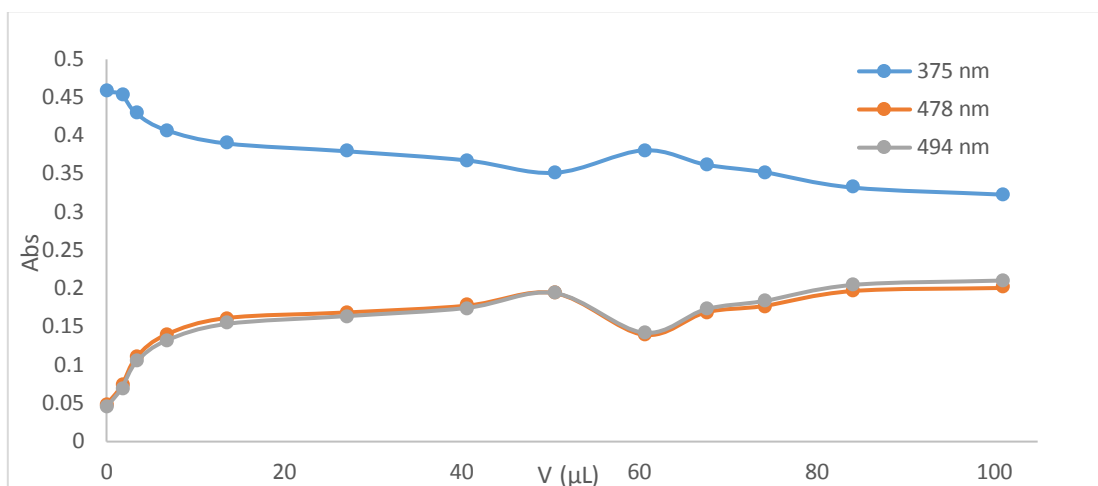


Figura 3.24 - Variação de absorvância a 375, 478 e 494 nm durante a titulação do 4',7-diOH com pApU. Os 3 comprimentos de onda ilustrados correspondem aos picos de absorção, respectivamente, da chalcona-trans, catião no início, e no final da titulação.

Na figura 3.25 podem-se ver os espectros de emissão durante a titulação:

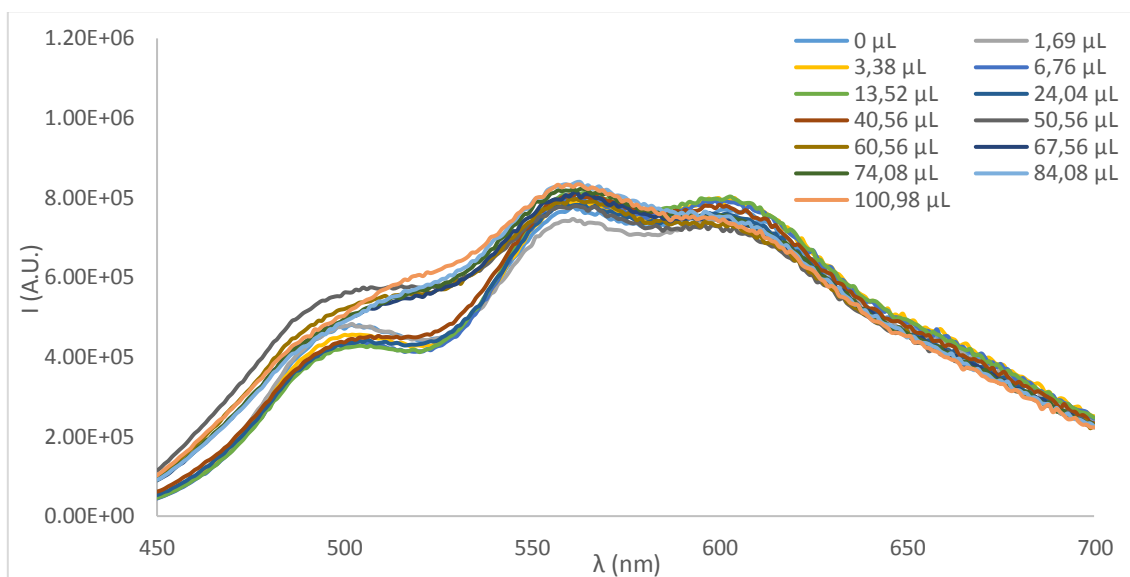


Figura 3.25 - Espectros de fluorescência da titulação da solução de 4',7-diOH com pApU. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL. A esta mistura foram titulados 100,98 µL de uma solução pApU $3,2E-4M$ em água. O pH desta solução, medido depois da titulação, é de 4,62.

Devido ao facto das variações de intensidade serem muito pequenas, é difícil distinguir o que se está a passar ao certo. A figura 3.26 demonstra as alterações mais claramente:

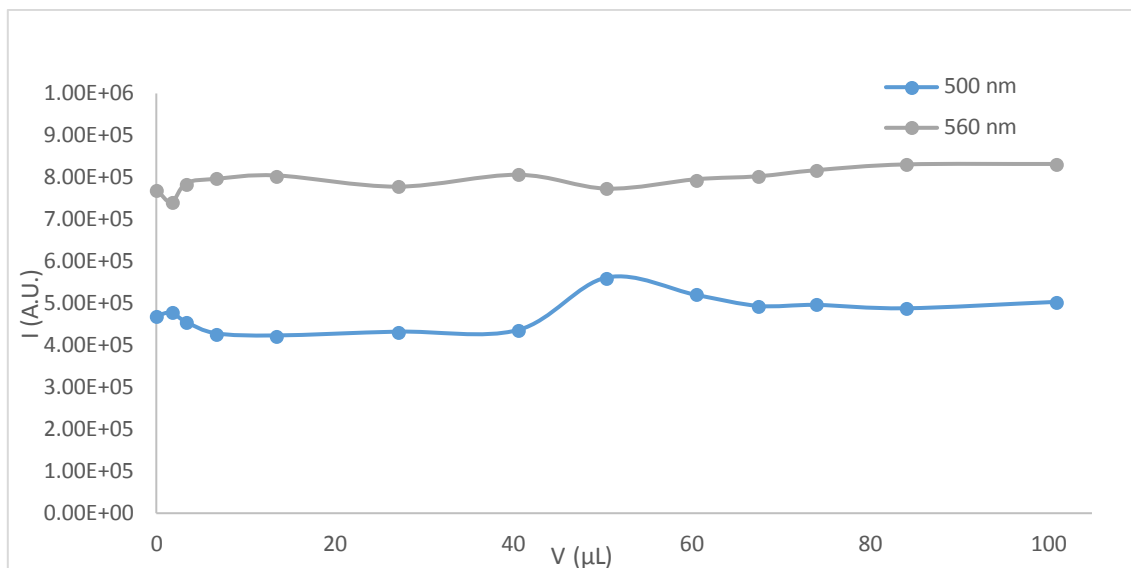


Figura 3.26 - Variação de intensidade de fluorescência da mistura do 4',7-diOH com pApU conforme se adiciona o nucleótido. A curva dos 500 nm corresponde à chalcona com alguma contribuição de catião, e a dos 560 ao catião e base quinoidal.

A primeira adição de pApU causa um ligeiro aumento da emissão da banda chalcona/catião e diminuição do catião/base quinoidal. A segunda e terceira causam o oposto e as seguintes quase não alteram a emissão de ambas as espécies. A adição que leva a um volume total de 50,56 μL da solução de pApU adicionados causa uma subida da emissão da chalcona e um ligeiro decréscimo para o catião. Depois desta, com as subseqüentes adições, vê-se diminuição e estabilização da emissão da chalcona e um aumento progressivo da emissão do catião. O resultado final da titulação é que tanto uma espécie como a outra veem um ligeiro aumento de intensidade de emissão comparativamente à inicial.

Em seguida, na figura 3.27, podem-se ver os espectros de absorção obtidos durante a irradiação da solução depois de adicionar pApU:

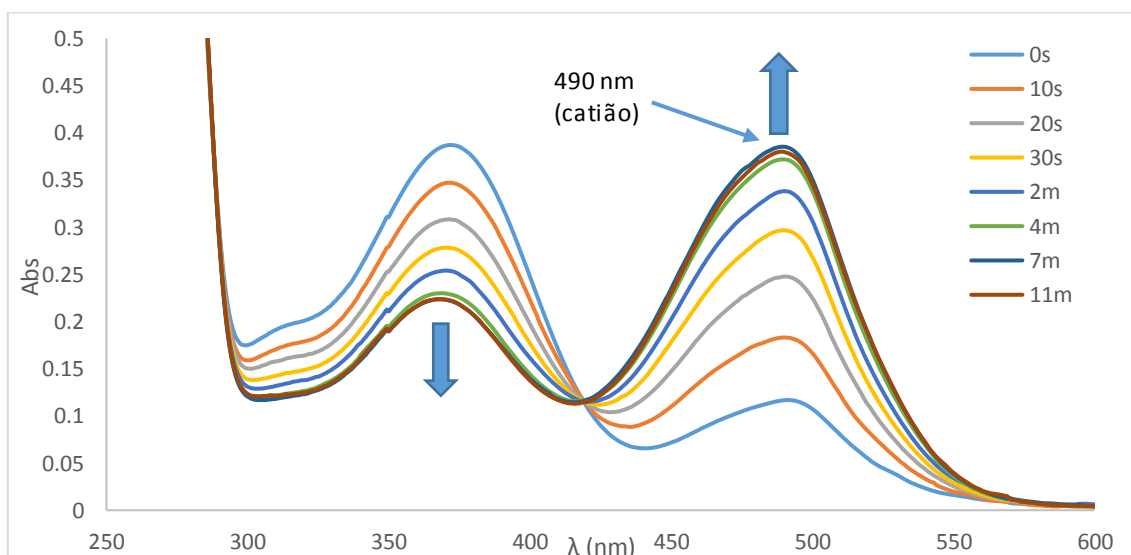


Figura 3.27 - Espectros de absorção durante a irradiação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 μL de pApU. A solução usada contém 3,3E-5M do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual fora adicionados 100 μL de pApU 3,2E-4 M dissolvido em água (diOH:pApU≈1:1).

Tal como com o ct-DNA, o comportamento do flavílio mantém-se constante. O máximo de absorção da chalcona, antes de iniciar a irradiação, quando a solução ainda se encontra equilibrada, é menor do que antes da adição de pApU, e a absorção do catião também é ligeiramente maior. Isto vem ao encontro daquilo observado na titulação com pApU, bem como na com ct-DNA, de que a adição do polinucleótido estabiliza o catião e favorece a sua formação. Pode-se também ver que o ponto isosbético da solução foi desviado para os 420 nm.

Em seguida, na figura 3.28, podem-se ver os espectros tirados durante o processo de recuperação até ao equilíbrio:

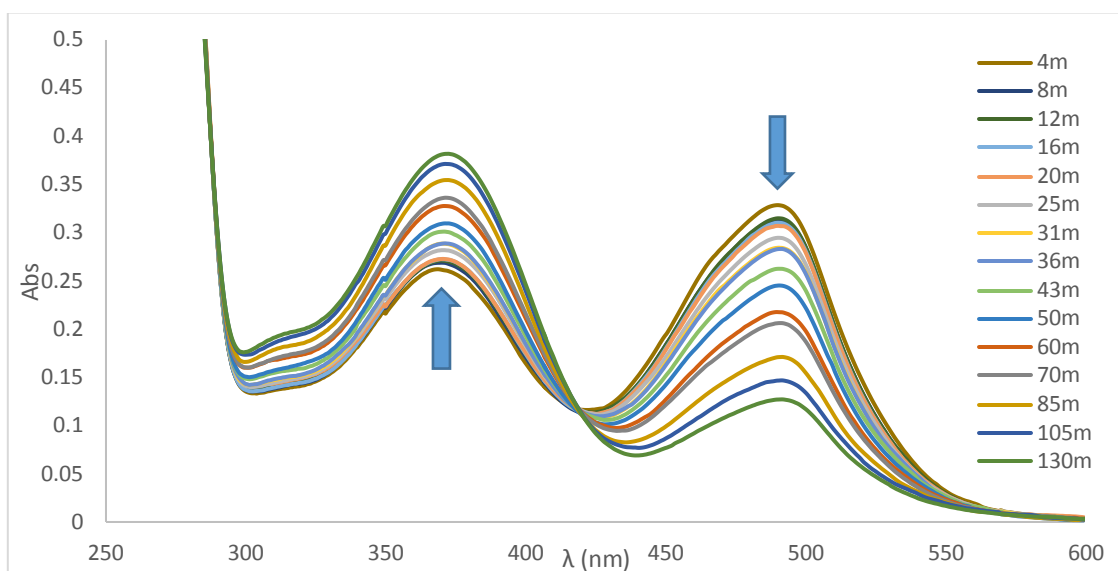


Figura 3.28 - Espectros de absorção durante a recuperação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 μ L de pApU. A solução usada contém $3,3E-5M$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μ L de pApU $3,2E-4 M$ dissolvido em água. O pH da solução medido no fim da experiência é de 4,62.

Os resultados mostram que, tal como foi visto nas experiências anteriores, a adição de pApU não influencia o tempo que a solução demora a equilibrar, sendo pouco mais que duas horas suficiente.

Os espectros de emissão medidos simultaneamente durante a irradiação podem ser visto na figura 3.29:

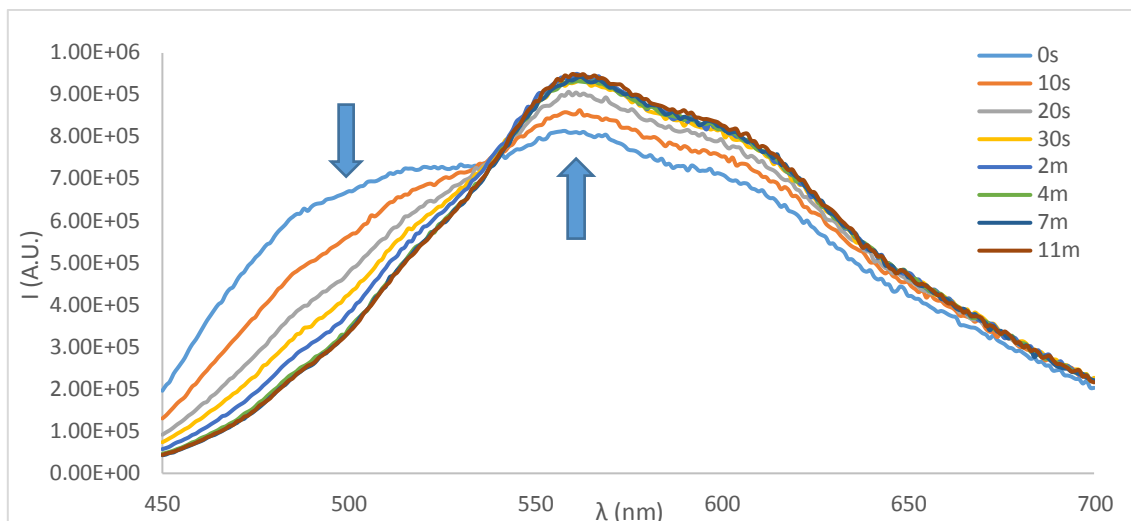


Figura 3.29 - Espectros de fluorescência durante a irradiação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 μL de pApU. A solução usada contém $3,3\text{E}-5\text{M}$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual fora adicionados 100 μL de pApU $3,2\text{E}-4$ M dissolvido em água (diOH:pApU \approx 1:1).. O pH da solução medido no fim da experiência é de 4,62.

Como se pode ver, as variações de intensidade de emissão ilustram novamente a progressão ao longo do processo, com diminuição aos 500 nm e aumento aos 560 nm, correspondendo, respectivamente, à chalcona-*trans* e catião, e ao catião e base quinoidal.

A emissão máxima atingida pela chalcona é maior do que aquela antes da adição de pApU, chegando perto das 700 000 unidades vs as 500 000 (fig. 30). A emissão máxima atingida pelo catião durante o estado fotoestacionário não mudou, mas aquela enquanto a solução está equilibrada subiu ligeiramente, de um mínimo de 750 000 unidades para 800 000.

Na figura 3.30 podem-se ver os espectros de emissão de fluorescência durante a recuperação:

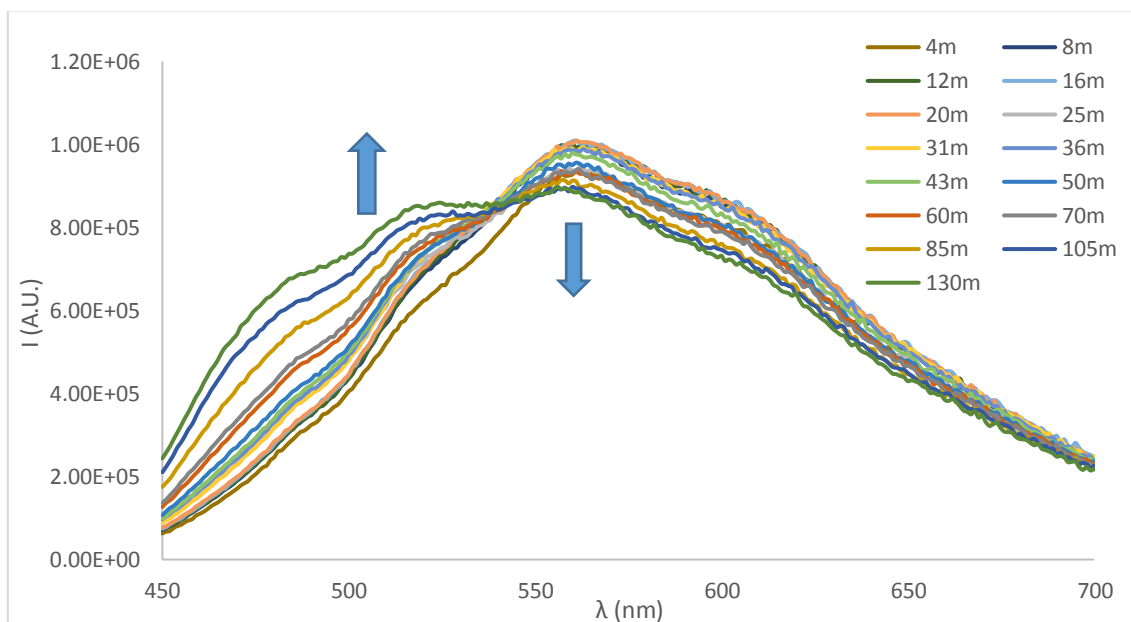


Figura 3.30 - Espectros de fluorescência durante a recuperação da solução do 4',7-diOH após adição de 100 μL de pApU. A solução usada contém $3,3\text{E}-5\text{M}$ do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μL de pApU $3,2\text{E}-4$ M dissolvido em água. O pH da solução medido no fim da experiência é de 4,62.

Mesmo depois de se terminar a irradiação da solução a intensidade de emissão ao longo de todo o espectro parece aumentar durante ainda meia hora. A partir deste ponto, as variações começam a assemelhar-se mais ao comportamento típico do flavílio, com descida da emissão do catião e aumento da chalcona. A figura 3.31 ilustra isto mais claramente:

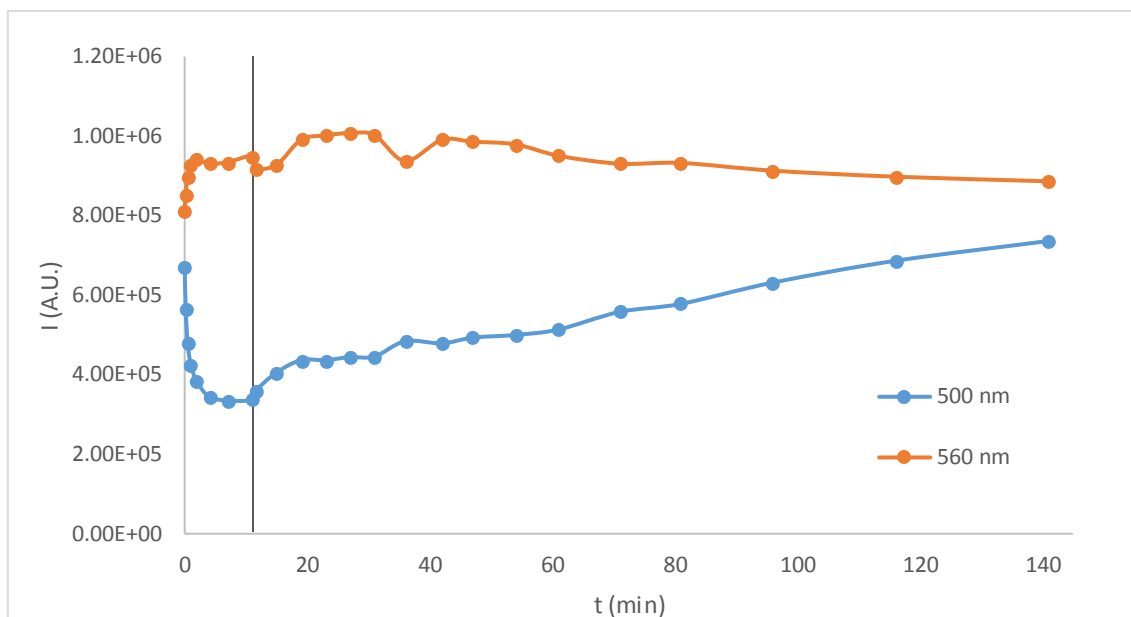


Figura 3.31 - Variação de intensidade de fluorescência durante a irradiação e recuperação da solução 4',7-diOH contendo 100 μ L de pApU $3,2E-5$ M. Os comprimentos de onda ilustrados correspondem aos picos de emissão conjunta da chalcona-trans e do catião, a 500 e a 560 nm, à emissão conjunta do catião e da base quinoidal. A linha vertical marca o fim da irradiação da amostra e início da recuperação (a 11 minutos).

Finalmente, foram feitas medições de anisotropia de fluorescência com o flavílio e pApU:

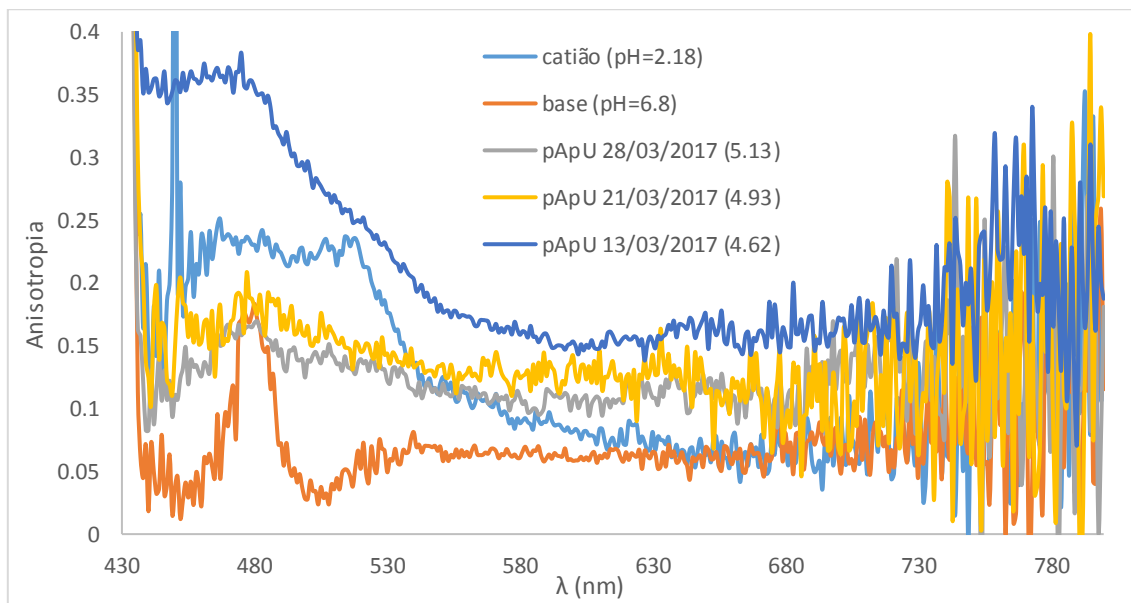


Figura 3.32 - Espectros de anisotropia para soluções de flavílio em cacodilato a pHs 2,18 e 6,8 e soluções a 3 pHs diferentes contendo pApU. A solução usada contém $3,3E-5$ M do flavílio diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μ L de pApU $3,2E-4$ M dissolvido em água

Duas das três medições de anisotropia com pApU revelam resultados semelhantes aqueles com cacodilato, com exceção de uma onde parece ter havido um aumento de anisotropia. Se se excluir a medição de flavílio com pApU cuja anisotropia aumentou, o efeito do pApU é o mesmo que o do ct-DNA.

Conclui-se que o 4',7-diOH, após adição de pApU, mostra comportamento semelhante àquele após adição de ct-DNA. Tal como com o ct-DNA, a adição do polinucleótido estabiliza o catião e favorece a sua formação. Causa também o alargamento da banda de absorção do mesmo, e desvia o máximo da banda para o vermelho, sendo o desvio ligeiramente maior (465 nm -> 490 nm contra 465 -> 487 para o ct-DNA)

Relativamente à emissão de fluorescência, é difícil comparar os dois polinucleótidos pois as medições de fluorescência com pApU produziram valores de emissão uma ordem de grandeza mais pequenos. No entanto, pode-se ver que o comportamento do flavílio em ambos os casos é parecido. Ambos experienciam uma redução/aumento de emissão para a chalcona/catião conforme a solução é irradiada, de acordo com a variação da concentração dessas espécies causada pela fotoconversão da primeira na segunda, e depois o oposto conforme a solução volta ao equilíbrio. Além disto a variação de intensidade de emissão do catião é menor do que a da chalcona para os dois nucleótidos.

3.2.4. Medições com pGpC

Após as experiências com pApU, repetiram-se as mesmas com outro polinucleótido, o pGpC. Na figura 3.33 pode-se ver as variações de absorção duma solução de flavílio conforme se vai adicionado pGpC:

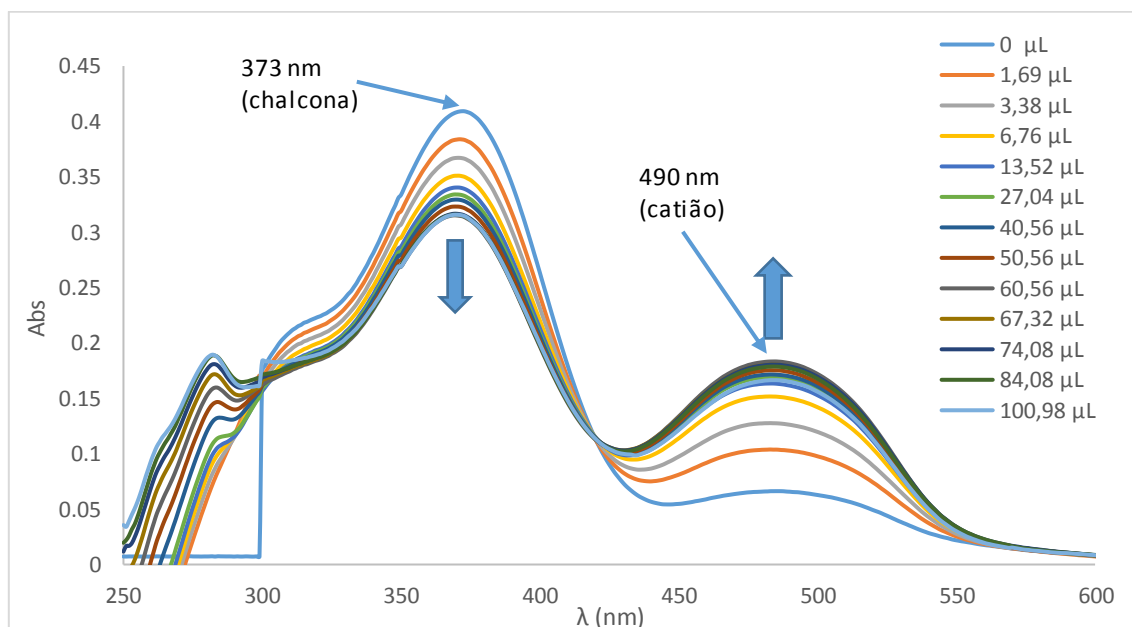


Figura 3.33 - Espectros de absorção da solução 4',7-diOH durante a titulação de pGpC. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4.63. A solução usada contém $3,3E-5M$ do 4',7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 µL de pGpC $3,2E-4$ M dissolvido em água (diOH:pGpC \approx 1:1).

Tal como com os restantes polinucleótidos, a adição de pGpC causa a conversão de alguma chalcona-*trans* em catião. A partir dos 60,56 μL adicionados deixam de haver alterações dos valores de absorvância nos máximos da chalcona e do catião (375 e 487 nm, respectivamente), mas depois da última adição, para totalizar os 100,98 μL , existe uma pequena diminuição de absorvância do catião.

Em seguida podem-se ver os espectros de emissão de fluorescência durante a titulação:

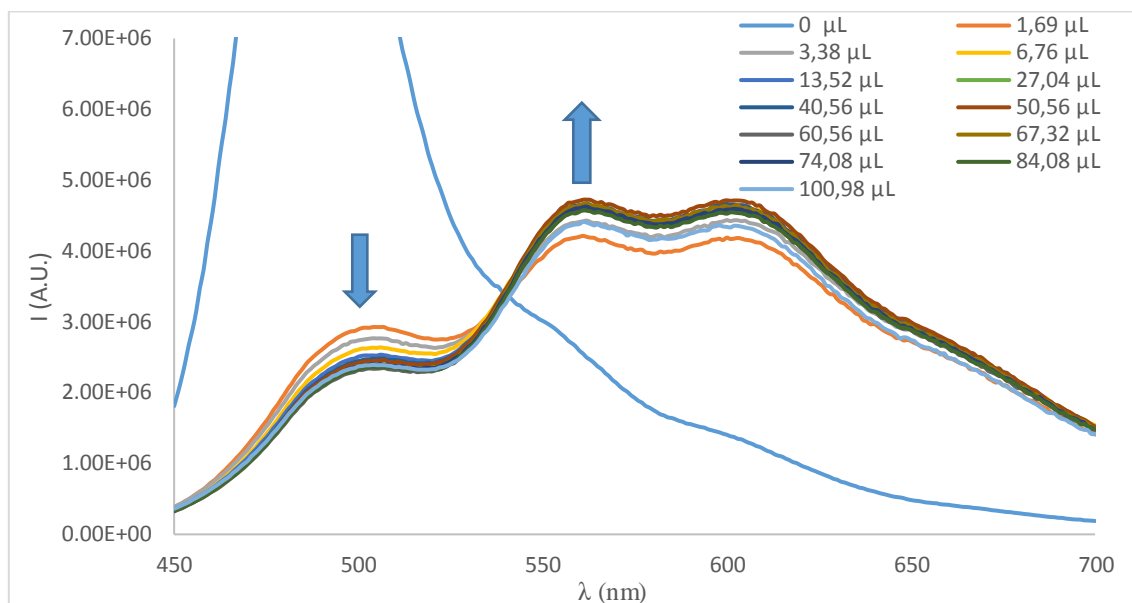


Figura 3.34 - Espectros de fluorescência da solução 4',7-diOH durante a titulação com pGpC. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4,63. A solução usada contém 3,3E-5M do 4',7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μL de pGpC 3,2E-4 M dissolvido em água (diOH:pGpC \approx 1:1).

Antes de qualquer adição de pGpC, a intensidade de emissão da banda chalcona/catião é muito maior que a de catião/base quinoidal, e logo após a primeira adição vê-se uma mudança drástica, caindo a emissão da primeira banda e aumentando a da segunda, tal como aconteceu com o ct-DNA. Assume-se que isto tenha sido causado também por fenómenos de *quenching*.

As subsequentes adições de pGpC aumentam a emissão do catião e diminuem a da chalcona até um volume total de 6,76 μL terem sido adicionados. A partir desse ponto, as variações para ambas as formas do flavílio são muito pequenas, pelo que no final da titulação houve uma diminuição bastante ligeira da intensidade de fluorescência delas. A figura 3.35 ilustra isto mais claramente:

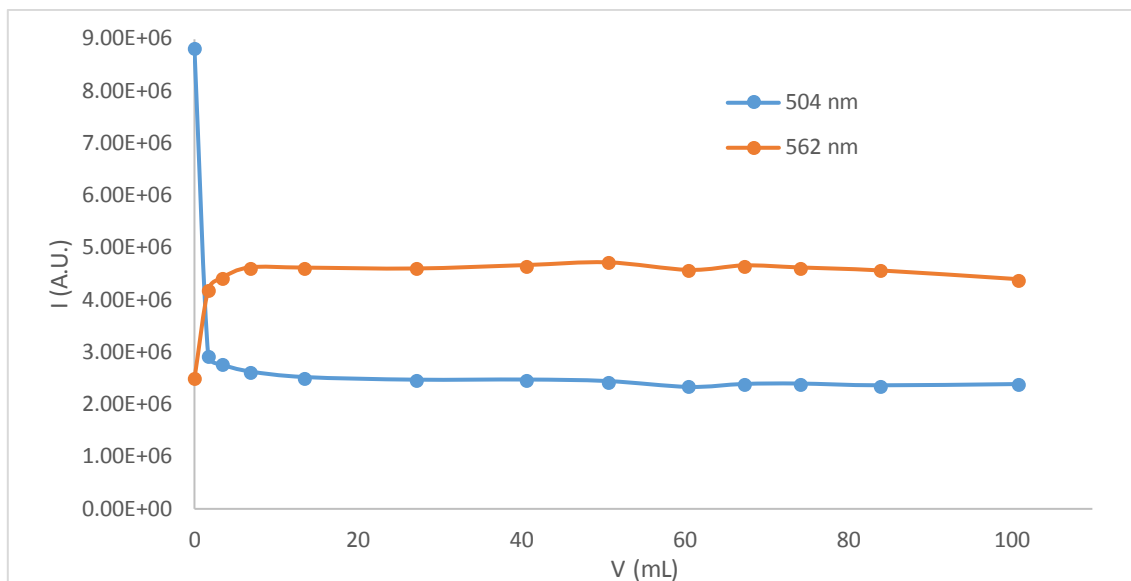


Figura 3.35 - Variação de intensidade de fluorescência da solução conforme se adiciona pGpC. Os 504 e 562 nm correspondem à chalcona e ao catião, respectivamente. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4.63. A solução usada contém $3,3E-5M$ do 4',7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados um total de 100 μL de pGpC $3,2E-4 M$ dissolvido em água.

Os espectros de absorção durante a irradiação do flavílio com pGpC podem ser vistos na figura 3.36:

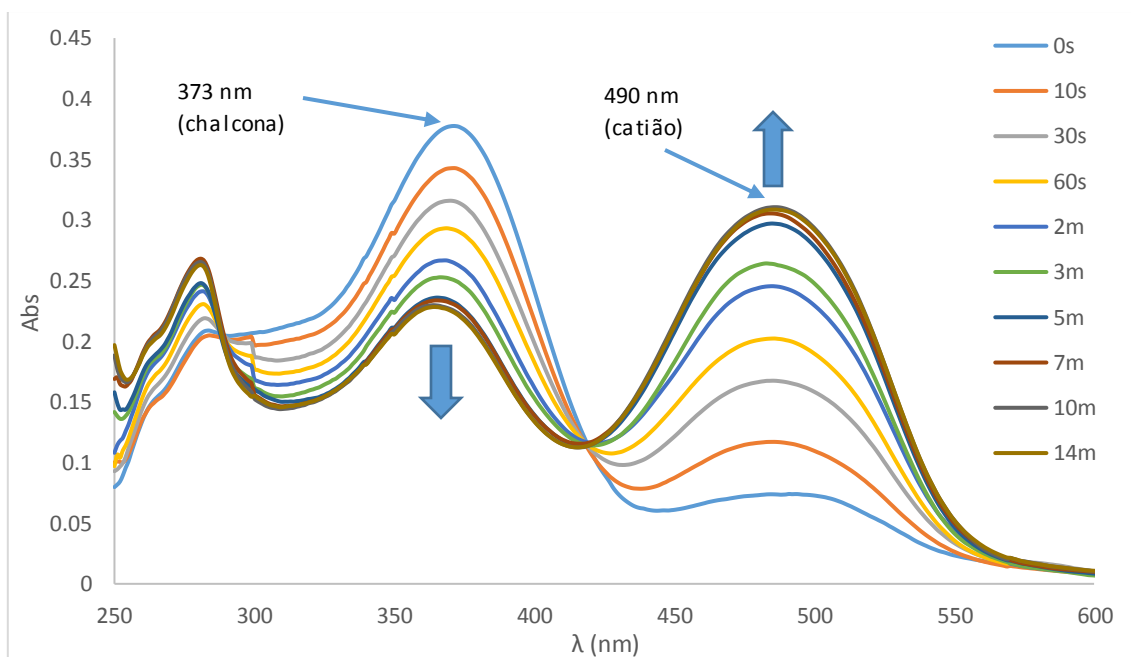


Figura 3.36 - Espectros de absorção do processo de irradiação da solução de 4',7-diOH contendo pGpC. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4.63. A solução usada contém $3,3E-5M$ do 4',7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μL de pGpC $3,2E-4 M$ dissolvido em água (diOH:pGpC \approx 1:1).

Vê-se o mesmo comportamento para este nucleótido como se via nos prévios: a fotoconversão de chalcona-*trans* em catião procede como normal, a banda de absorção do catião torna-se mais larga e o seu máximo desvia para o vermelho. No entanto, com pGpC o máximo de absorção que o catião atinge é consideravelmente menor do que com ct-DNA e pApU. Enquanto na presença desses dois polinucleótidos o máximo chega quase a 0,390, com pGpC a absorvância do catião no estado fotoestacionário da solução chega apenas a 0,308.

Seguidamente, na figura 3.37, podem-se ver os espectros do processo de recuperação:

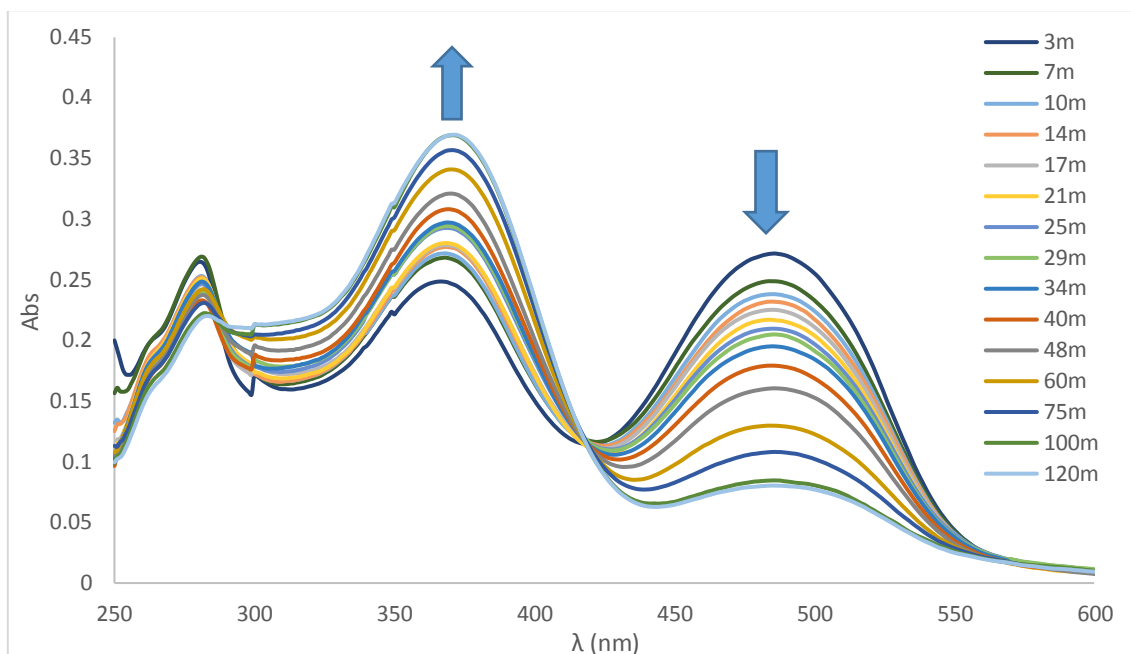


Figura 3.37 - Espectros de absorção do processo de recuperação da solução de 4',7-diOH contendo pGpC. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4,63. A solução usada contém $3,3E-5M$ do 4',7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μL de pGpC $3,2E-4 M$ dissolvido em água.

O retorno ao equilíbrio procede como com os outros polinucleótidos, demorando pouco mais de 2 horas.

Em seguida podem-se ver os espectros de emissão de fluorescência:

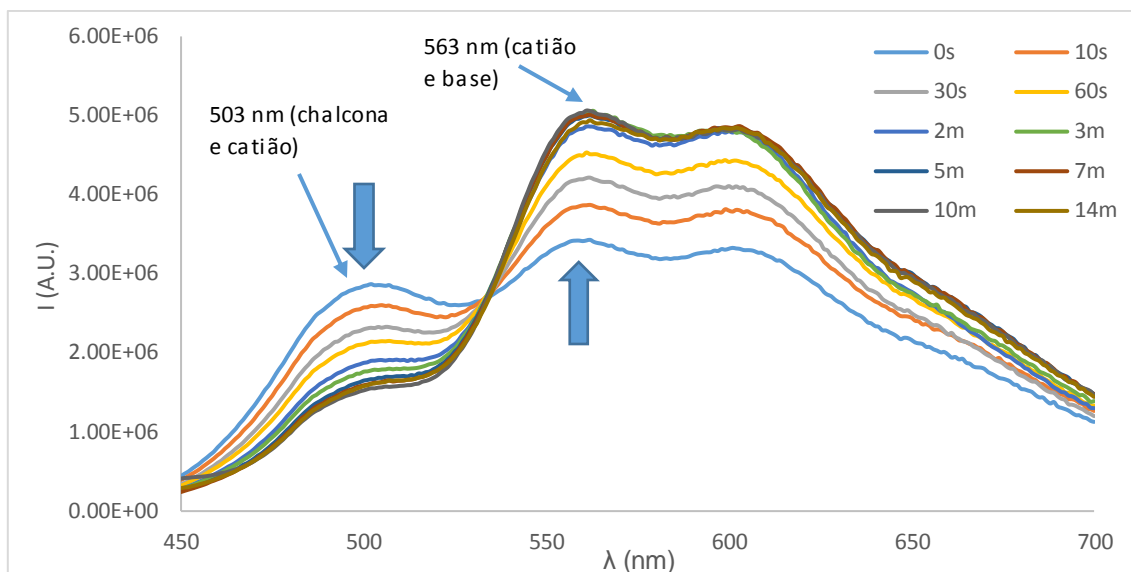


Figura 3.38 - Espectros de emissão do processo de irradiação do 4',7-diOH contendo pGpC. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4.63. A solução usada contém $3,3E-5M$ do 4',7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 μL de pGpC $3,2E-4 M$ dissolvido em água.

As variações espectrais prosseguem da mesma maneira que no caso da absorvância, havendo clara diminuição da emissão da chalcona com aumento simultâneo da emissão do catião. O máximo de emissão do catião é menor que aquele alcançado pelo flavílio sozinho em água e misturado com ct-DNA. Nesses, o catião atinge $7E6$ e $6,7E6$ unidades em água e após adição de ct-DNA, respectivamente. Aqui, após adição de pGpC, o máximos atingido é de pouco menos de $5E6$ unidades de intensidade de emissão. Os espectros obtidos durante a recuperação da solução até ao equilíbrio (figura 3.39) mostram que a emissão da chalcona e do catião voltam aos valores antes da irradiação como normal.

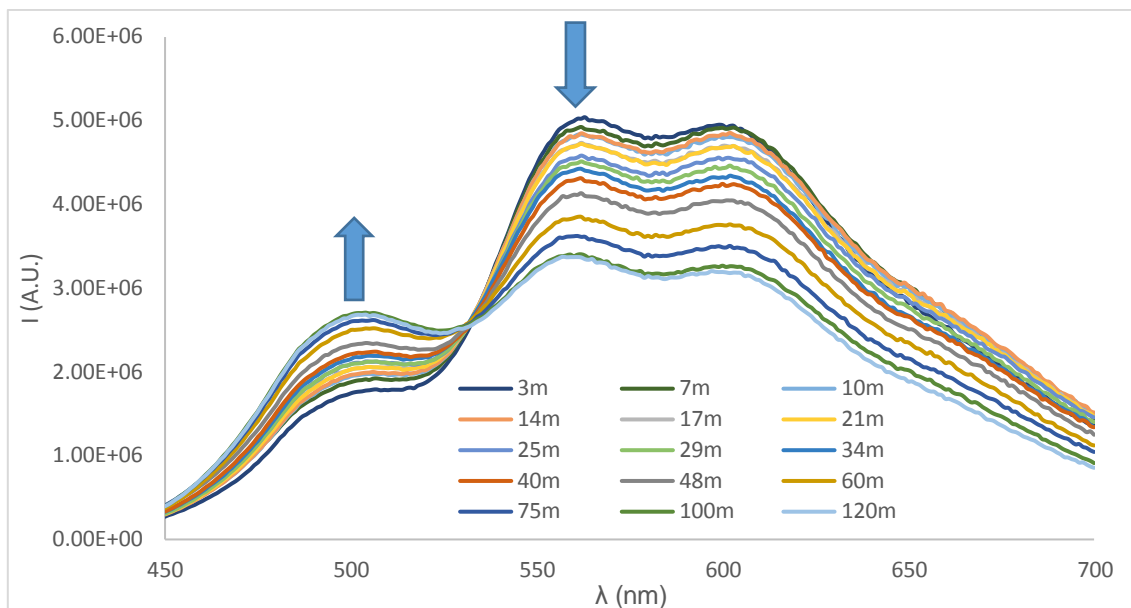


Figura 3.39 - Espectros de emissão do processo de recuperação da solução de 4',7-diOH contendo pGpC. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4.63. A solução usada contém 3,3E-5M do 4'.7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 µL de pGpC 3,2E-4 M dissolvido em água.

Os resultados acima descritos podem ser melhor vistos na figura 3.40:

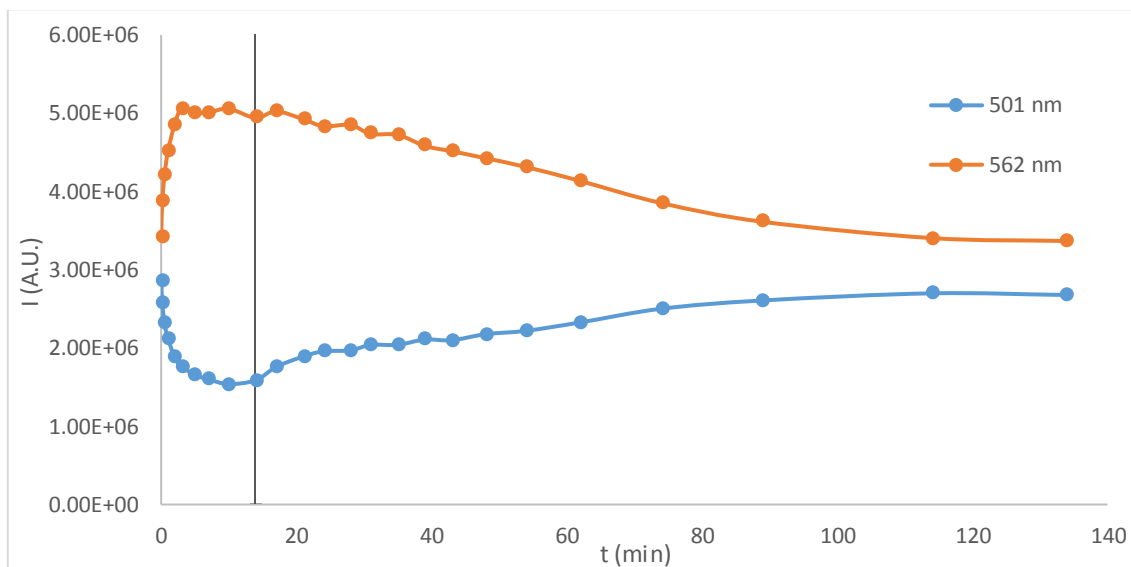


Figura 3.40 - Variação de intensidade de emissão da solução do 4',7-diOH contendo pGpC durante a irradiação e recuperação da mesma, aos comprimentos de onda 501 e 562 nm, que correspondem, respectivamente, à chalcona e ao catião. O pH da solução medido antes do início da experiência foi de 4.63. A solução usada contém 3,3E-5M do 4'.7-diOH diluído em partes iguais de NaOH 0,1M, HCl 0,1M e tampão cacodilato 0,1M num volume final de 1 mL, à qual foram adicionados 100 µL de pGpC 3,2E-4 M dissolvido em água. A linha vertical marca o fim da irradiação da solução.

Finalmente fez-se a medição da anisotropia de fluorescência numa solução contendo o 4',7-diOH e pGpC:

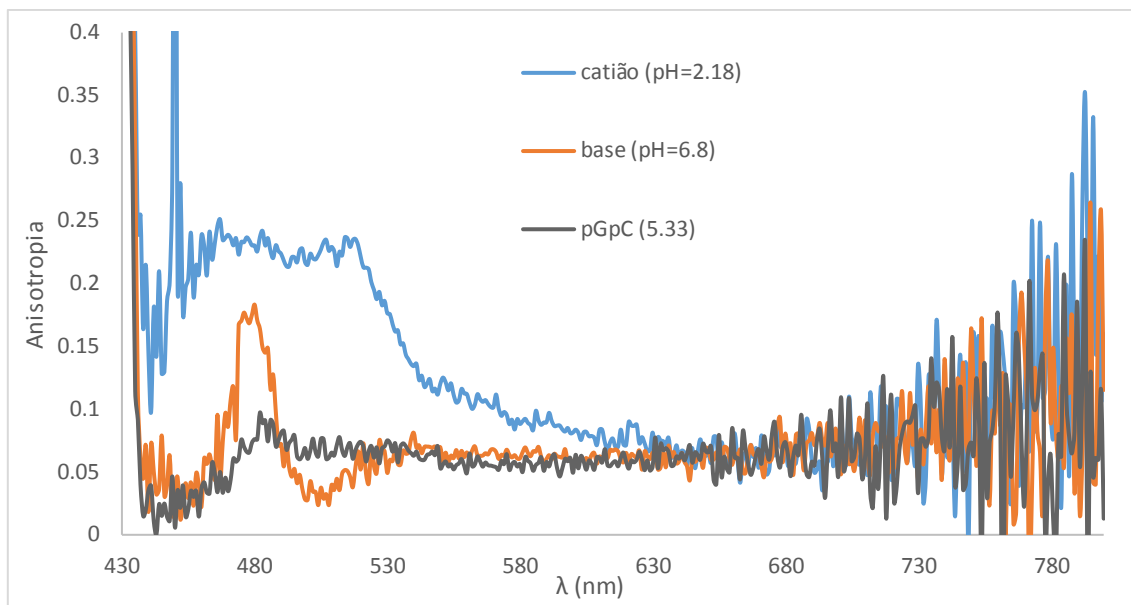


Figura 3.41 - Espectros de anisotropia para soluções de flavílio em cacodilato a pHs 2,18 e 6,8 e de uma solução contendo flavílio e pGpC.

A medição com pGpC mostra redução de anisotropia em comparação com apenas o catião em água, tal como nos nucleótidos anteriores, mas essa redução é claramente maior que com os nucleótidos anteriores.

As experiências em pGpC mostram resultados semelhantes aos anteriores no que toca ao desvio e alargamento da banda de absorção do catião. No entanto, a forma da banda do catião parece ser mais achatada que as obtidas com os outros nucleótidos.

As variações de intensidade de fluorescência conforme se adiciona pGpC são muito pequenas, exceptuando a primeira adição que causa uma queda extremamente abrupta na emissão da chalcona e um salto, embora mais ligeiro, na do catião. Isto implica que a presença deste polinucleótido em solução afecta apenas a emissão do catião quando ele se encontra no estado excitado.

4. Discussão dos resultados

Tabela 4.1 - Resultados resumidos das medições de absorção. Os valores listados indicam, da esquerda para a direita: pH da solução no início da experiência, antes da adição de qualquer nucleótido; pH da solução no fim da experiência, depois da titulação; comprimento de onda onde a absorção da banda do catião é máxima; desvio de comprimento de onda desse máximo em comparação com o flavílio em água sem nenhum nucleótido; valor de absorção no máximo da banda quando a solução se encontra equilibrada; valor de absorção nesse mesmo máximo quando a solução se encontra no estado fotoestacionário; diferença de absorvância entre estes dois últimos parâmetros.

Solução	pH _{inicial}	pH _{final}	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	λ_{shift} (nm)	Abs _{min}	Abs _{máx}	Δ Abs
H ₂ O	4,58	4,64	465	-	0,098	0,466	0,368
ct-DNA	4,56	5,18	487	+22	0,102	0,388	0,286
pApU	4,66	4,62	490	+25	0,117	0,385	0,268
pGpC	4,63	5,33	490	+25	0,073	0,309	0,236

Os resultados obtidos das medições de absorção mostram que a adição de qualquer um dos nucleótidos causa um desvio no máximo de absorção do catião, o que indica que estes compostos favorecem a sua formação. Também se vê que, comparado com o flavílio sozinho em água, a absorção ao longo de todo o espectro é reduzida ligeiramente nos casos do pApU e pGpC. Isto pode-se ver em baixo, na figura 4.1:

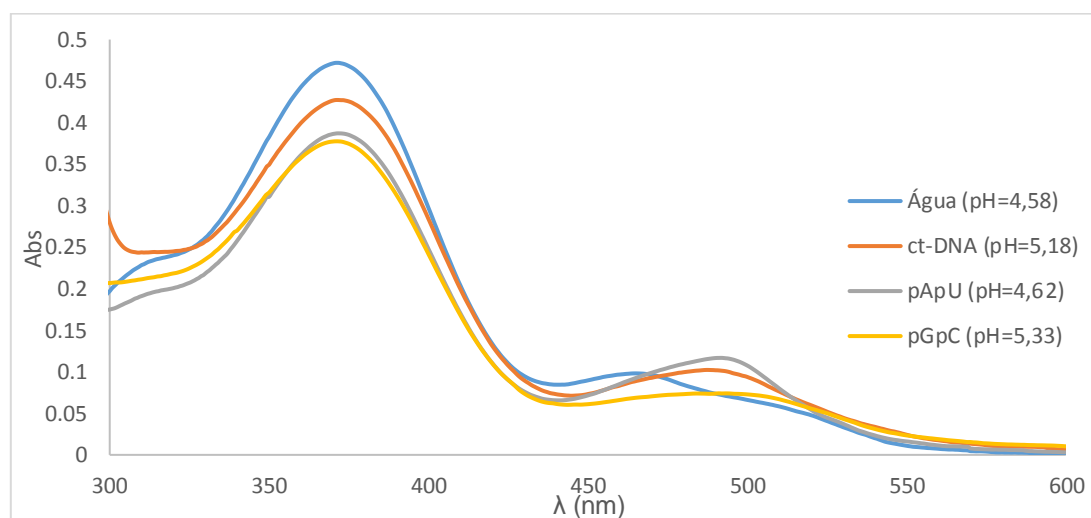


Figura 4.1 - Espectros de absorção das várias soluções de flavílio em água sem mais nada e com os vários polinucleótidos adicionados, no equilíbrio. Os espectros foram tirados depois da adição dos 100,98 μ L do polinucleótido respectivo.

Note-se que as diferenças de pH também podem contribuir para o desvio da banda e variações de absorvância, devido ao efeito no equilíbrio que o pH tem. Apesar disso, os desvios observados são bastante semelhantes.

A presença dos nucleótidos causa também uma redução no máximo de absorvância que a banda atinge no estado excitado. Veja-se a figura 4.2:

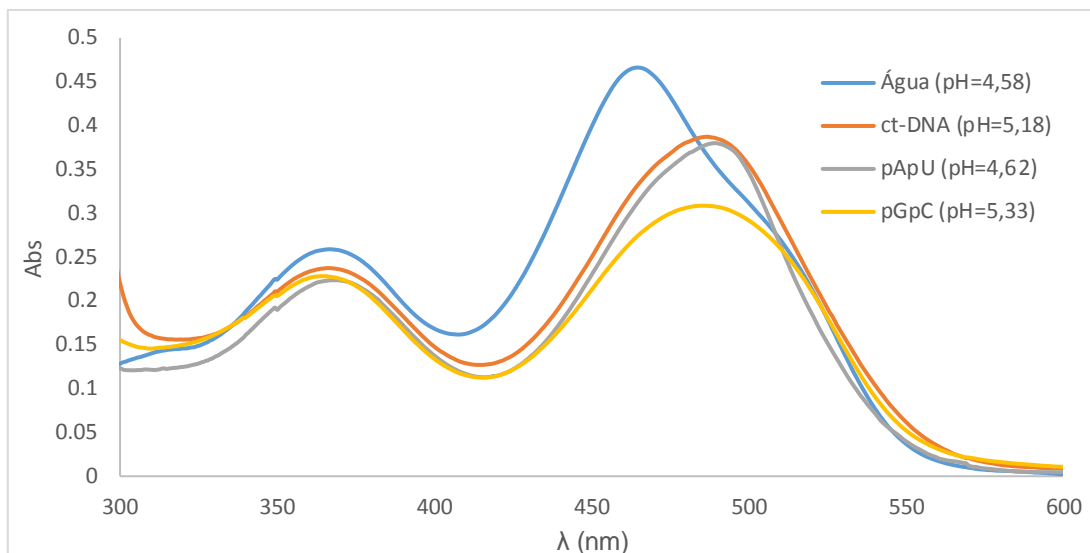


Figura 4.2 - Espectros de absorção das várias soluções de flavílio em água sem mais nada e com os vários polinucleótidos adicionados, no estado fotoestacionário. Os espectros foram tirados depois da adição dos 100,98 μL do polinucleótido respectivo.

Pode-se ver logo que o pGpC é o polinucleótido que mais reduz o máximo de absorção do catião, enquanto as bandas do ct-DNA e o pApU são semelhantes, mesmo tendo em conta as diferenças de pH. Repare-se também que as diferenças de absorvância ao longo do espectro entre as soluções contendo polinucleótidos e aquela apenas com o flavílio são maiores do que as dos espectros das soluções equilibradas. Ainda, todos os espectros com adição de nucleótidos evidenciam um desvio do ponto isobéstico, visível se sobrepusermos estes conjuntos de espectros em cima ilustrados. Pode-se ver isto na figura 4.3:

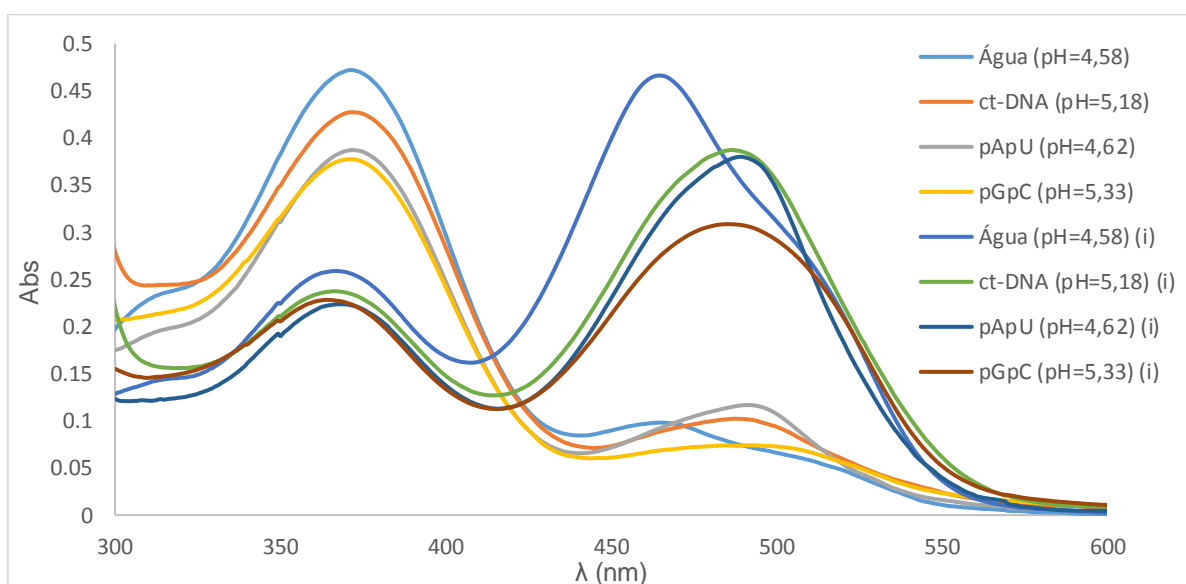


Figura 4.3 - Sobreposição dos espectros de absorvância das várias soluções no equilíbrio e no estado fotoestacionário (i), após adição dos polinucleótidos. .

Pode-se ver que o ponto onde os espectros das soluções equilibradas se cruzam com os espectros das soluções fotoestacionárias, para aquelas misturas contendo polinucleótidos, se desvia ligeiramente para o vermelho relativamente ao ponto isobéptico do flavílio em água.

Estas informações vão ao encontro dos trabalhos previamente feitos no Grupo de Fotoquímica e Química Supramolecular com outros flavílios, onde também se observaram desvios batocrómicos na banda de absorção do catião e redução do valor máximo de absorção alcançado.

Relativamente aos dados de emissão e fluorescência, os resultados obtidos podem ser vistos, em resumo, na tabela 4.2:

Tabela 4.2 - Resultados resumidos das medições de fluorescência. Os rácios entre as intensidades de catião e base conjugada (chalcona-trans) correspondem à solução em equilíbrio (inicial) e no estado fotoestacionário (final).

Solução	pH _{inicial}	pH _{final}	I _{AH⁺} /I _{CB} (inicial)	I _{AH⁺} /I _{CB} (final)
H ₂ O	4,58	4,64	2,23	2,93
ct-DNA	4,56	5,18	1,24	2,80
pA-pU	4,66	4,62	1,21	2,79
pG-pC	4,63	5,33	1,20	3,28

Em todos os casos observa-se um aumento do rácio entre a emissão do catião e da chalcona, devido à conversão causada pela irradiação. As figuras 4.4 e 4.5 ilustram isto claramente:

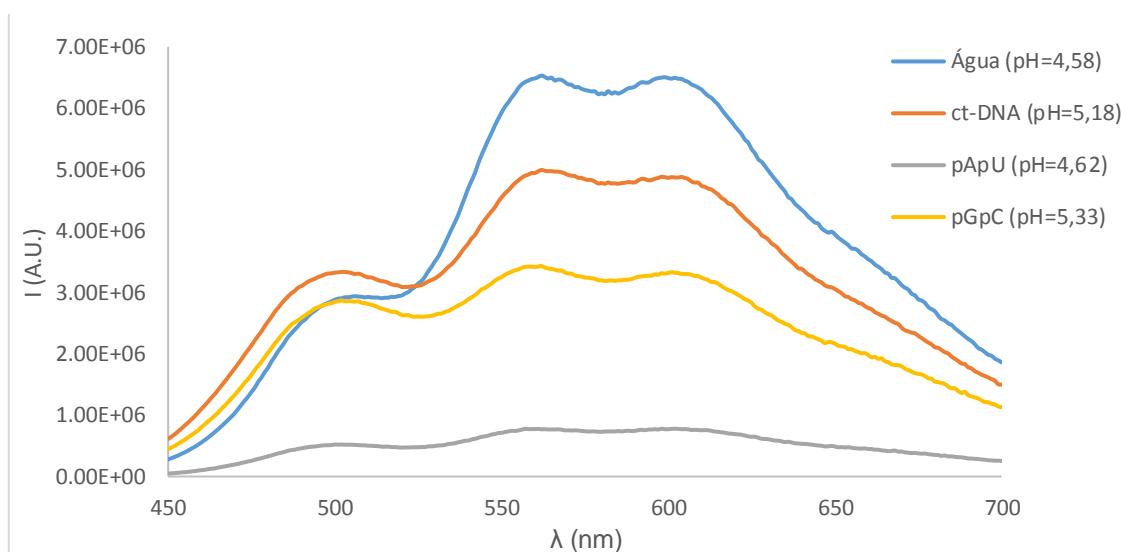


Figura 4.4 - Espectros de emissão de fluorescência das várias soluções de flavílio com e sem polinucleótidos, no equilíbrio. Estes espectros foram tirados depois da adição dos 100,98 μ L de cada polinucleótido.

Os resultados das medições de fluorescência indicam que a adição de polinucleótidos reduz a intensidade de emissão do 4',7-diOH na banda do catião/base quinoidal, independentemente do polinucleótido. Na banda da chalcona/catão também se observa um valor um pouco maior nos casos do ct-DNA e do pGpC, possivelmente devido à contribuição do catião para esta banda.

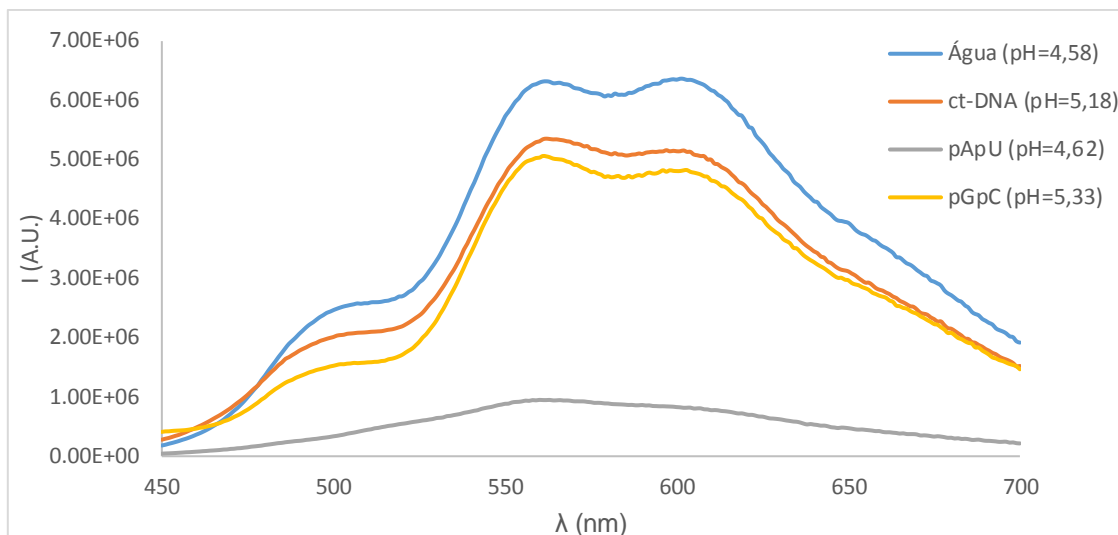


Figura 4.5 - Espectros de emissão de fluorescência das várias soluções de flavílio com e sem polinucleótidos, no estado fotoestacionário. Estes espectros foram tirados depois da adição dos 100,98 μL de cada polinucleótido.

Após a irradiação das soluções vê-se um grande aumento da emissão do catião acompanhado duma redução de emissão da chalcona, que demonstra a grande alteração do rácio das intensidades destas duas espécies.

No entanto, a irradiação das soluções leva a um aumento da emissão do catião de modo que o rácio de emissão das duas espécies no estado fotoestacionário não varia muito daquele do flavílio apenas em água.

Finalmente, temos na tabela 4.3 os resultados resumidos das medições de anisotropia de fluorescência:

Tabela 4.3 - Valores de anisotropia medidos para o catião flavílio em soluções contendo os diferentes nucleótidos

Experiência	Anisotropia do catião média
H ₂ O	0,25
Ct-DNA	0,173
pApU	0.226 (0,16*)
pGpC	0,10

*Média obtida excluindo o valor mais alto de 0,36, que se desviou muito dos restantes resultados obtidos

Todas as medições de anisotropia, exceptuando uma com pApU, mostram que a adição de nucleótidos causa uma redução desse parâmetro, em comparação com o catião sozinho em água.

Diminuições de anisotropia podem ser devidas a diminuição do tempo de correlação rotacional ou aumentos de tempo de vida da espécie (ou uma mistura dos dois fenómenos, dependendo da influência de cada um). Dado que se a fotointercalação do flavílio para dentro dos polinucleótidos levaria a um aumento do tempo de correlação rotacional, dos dados obtidos pode-se concluir que deverá ter havido um aumento do tempo de vida do catião no estado excitado.

5. Conclusão

Como foi demonstrado, no pH estudado, este flavílio encontra-se maioritariamente na forma chalcona-*trans*, e conseguiu-se provar que realmente não existe interacção dele com os polinucleótidos e pode ser facilmente feita a sua conversão na forma catiónica por irradiação com luz, devido à sua natureza fotocromica.

Pôde-se ver que realmente o catião é estabilizado pela presença dos polinucleótidos, dada o aumento de absorvância observado no máximo do catião conforme os nucleótidos são adicionados. Este aumento diz-nos que a presença dos polinucleótidos parece criar um ambiente mais favorável à formação do catião. Acompanhando esse aumento viu-se também desvio do máximo para o vermelho, demonstrando a interacção ocorrente entre o catião e os nucleótidos.

Do mesmo modo, pode-se também ver que não existe alteração da banda da chalcona aquando dessas titulações, confirmando que a interacção é específica com a forma catiónica.

O espectro de fluorescência do 4',7-diOH também é afectado pela adição dos polinucleótidos. Regra geral, a intensidade de fluorescência da forma catiónica diminui para todas as combinações de flavílio e polinucleótido estudadas.

Finalmente, a adição de polinucleótidos causa uma diminuição na anisotropia medida para a forma catiónica do flavílio. Isto pode ser causado por duas razões, o aumento do tempo de vida do catião no estado excitado, ou uma diminuição da liberdade de movimento do catião. Dado que se verificou que o catião interage com os ácidos nucleicos, é razoável concluir que a intercalação do flavílio nos polinucleótidos tenha causado uma redução na liberdade de movimento do catião.

Vistas as distintas alterações nos espectros tanto de absorção como de emissão de fluorescência, bem como de anisotropia, quando o flavílio interage com os polinucleótidos, ele pode ser considerado uma sonda para a detecção desses polímeros.

Como mesmo depois de intercalar nesses polinucleótidos o flavílio retorna de catião a chalcona quando não está exposto a luz, ele pode ser considerado um *switch* molecular reversível. Dada a facilidade com que esta intercalação reversível pode ser activada, levanta-se a possibilidade do uso desta molécula como modulador de actividade de polinucleótidos. O efeito desta interacção nos espectros do flavílio é consideravelmente diferente quando ele interage com pApU ou com pGpC. Isto mostra que este flavílio poderá ter capacidade para permitir distinguir zonas do DNA ou RNA mais ricas nestas bases em particular.

De futuro, será necessário determinar as constantes do processo cinético de intercalação do catião excitado para dentro dos polinucleótidos, bem como determinar como variam essas constantes com a composição de bases dos polinucleótidos. Será também importante estudar a capacidade de *uptake* que células vivas têm para este composto, bem como a toxicidade do flavílio, de modo a saber se é viável o seu uso *in vivo*.

6. Bibliografia

6.1 Referências

- [1] - Molnar, C., Gair, J., Chapter 2.3 – Biological Molecules ,“Concepts of Biology – 1st Canadian Edition, retirado de <https://opentextbc.ca/biology/chapter/2-3-biological-molecules/> a 24/09/2017
- [2] - M. Hugo, (2016), Estudo da interação de flavílios com ácidos nucleicos (Tese de Mestrado), retirado de <http://hdl.handle.net/10362/19702>
- [3] - Retirado de https://en.wikipedia.org/wiki/File:Phosphodiester_Bond_Diagram.svg, visitado a 20/09/2017
- [4] - Retirado de https://en.wikipedia.org/wiki/File:Base_pair_GC.svg, visitado a 19/09/2017
- [5] - Retirado de https://en.wikipedia.org/wiki/File:Base_pair_AT.svg, visitado a 19/09/2017
- [6] - Retirado <https://www.chemheritage.org/historical-profile/james-watson-francis-crick-maurice-wilkins-and-rosalind-franklin>, visitado a 01/08/2017
- [7] - Franklin, R.E., Goslin, R.G.,(1953), “The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content”, *Acta Crystallographica* 1953, **6**, 673
- [8] - Thamman, T.J., Lord, R.C., Wang, A.H., Rich, A. (1981), “The high salt form of Poly(dG-dC).poly(dG-dC) is left-handed Z-DNA: Raman spectra of crystals and solutions”, *Nucleic Acids Research* 1981, **9**, Vol. 20
- [9] - Retirado de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/00/Dnaconformations.png>, visitado a 03/08/2017
- [10] - Crnolatac, I., Rogan, I., Majić, B., Tomić, S., Deligeorgiev, T., Horvat, G., Makuc, D., Plavec, J., Pescitelli, G., Piantanida, I. (2016), “Small molecule probes finely differentiate between various ds- and ss-DNA and RNA by fluorescence, CD and NMR response”, *Analytica Chimica. Acta* 940 (2016) 128–135.
- [11] - Tumir, L-M, Piantanida I., Juranović, I, Meić, Z., Tomić, S, Žinić, M. (2005) “Recognition of homo-polynucleotides containing adenine by a phenanthridinium bis-uracil conjugate in aqueous media”, *Chem. Comm.*, 2005, 2561-2563
- [12] - Wu, J., Zou, Y., Li, C., Sicking, W., Piantanida, I., Yi, T., Schmuck, C. (2012) “A Molecular Peptide Beacon for the Ratiometric Sensing of Nucleic Acids”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134** (4), 1958-1961
- [13] - Gershberg, J., Radić Stojković, M., Škugor, M., Tomić, S., Rehm, T. H., Rehm, S., Saha-Möller, C., R., Piantanida, I., Würthner, F., *Chemical European Journal*, **21** (2015) 7886–7895.
- [14] - Retirado de https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/fff/Flavylium_cation.svg, visitado a 20/09/2017
- [15] - Gago, S., Basílio, N., Moro, A.J. e Pina, F. (2015) “Flavylium based dual photochromism: addressing *cis-trans* isomerization and ring opening-closure by different light inputs”, *Chem. Comm.*, 2015, **51**, 7349-7351
- [16] - P. Fernando, Melo, Maria J., Laia, César A. T., Parola, A. Jorge e Lima, J. Carlos (2012) Chemistry and applications of flavylium compounds: a handful of colours, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 869–908
- [17] - sigmaaldrich.com, Deoxyribonucleic acid from calf-thymus, disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d4522>, acessado a 29/11/2017

[18] - [invivogen.com](http://www.invivogen.com), Polyadenylic–polyuridylic acid, disponível em <http://www.invivogen.com/polyau>, acessado a 29/11/2017

[19] - [sigmaaldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com), Polydeoxyguanylic acid · Polydeoxycytidylic acid sodium salt, disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p3136>, acessado a 29/11/2017

[20] - Retirado de <https://www.brand.de/products/life-science-products/cuvettes-and-accessories/technical-data/>, visitado a 02/12/2017