UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"SELETIVIDADE IÔNICA NA LIGAÇÃO
DO ÍON CÁLCIO A ÁCIDOS NUCLEÍCOS:
O EFEITO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA
E DE COSOLVENTES"

Marcelo Andrés Fossey

Tese apresentada ao Instituto
de Física e Química de São
Carlos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
(Física Aplicada).

Orientador: Professor Doutor João Ruggiero Neto

Departamento de Física e Ciências dos Materiais

São Carlos

1992

URP / IFQSC / 3B!

8-2-000051

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO - IFQSC
FÍSICA

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física e Química de São Carlos

Fone (0162) 72-6222
Fax (0162) 72-2218

Av. Dr. Carlos Botelho, 1465
Caixa Postal 369
CEP 13560.970 - São Carlos - SP
Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE Marcelo Andres Fossey APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 30/09/1992

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. João Ruggiero Neto

Profa. Dra. Rosemary Sanches

Prof. Dr. Antonio Aprigio da Silva Curvelo

Profa. Dra. Adelaide Foljoni Alário

Prof. Dr. Paulo Bisch

**A minha filha
Marcela**

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao Professor João Ruggiero Neto, pela competência e compreensão mostradas na orientação, elementos sem os quais este trabalho não teria sido possível.

À Professora Cristina Carneiro Rodrigues pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Ao Professor Marcio F. Colombo pelas valiosas discussões e sugestões que em muito contribuíram no enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de Departamento de Física do IBILCE-UNESP: Jorge, Johnny, João, Marcio, José Roberto, Eloi, Elso, Arni, Ramon, Augusto e Marinônio pela sua amizade e incentivo.

À Ilva Cecilio Bernardes pela dedicação mostrada ao datilografar os originais e a "Dona Tita" pela montagem dos exemplares deste trabalho.

À CAPES, CNPq, FAPESP e à Reitoria da UNESP pela ajuda material que tornou possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Objetivando compreender os fatores moleculares determinantes da interação de ácidos nucléicos com espécies iônicas em solução, a ligação do cátion bivalente Ca^{2+} a esta macromolécula foi estudada sob diferentes condições físico-químicas. Os ácidos nucléicos poliriboadenílicos natural, e sintéticos poli(dA-dT) e poli(dG-dC) e ácido polideoxiriboadenílico sintético poli(rI).poli(rC), investigados, foram escolhidos por apresentar significantes diferenças entre si quanto à sequência de bases e quanto à estrutura secundária, fatores que sabidamente modulam as interações de ligantes com ácidos nucléicos, desde íons até proteínas.

Os parâmetros termodinâmicos que descrevem os dados obtidos com estes polímeros, na presença de Na^+ , K^+ e Li^+ como eletrólito suporte foram obtidos através de métodos de múltiplo equilíbrio e analisados através de modelos polieletrólíticos: condensação de contraíons e modelo celular. Estes resultados mostraram que a interação do Ca^{2+} aos ácidos nucléicos dependem fortemente da espécie iônica do sal suporte, da estrutura primária e secundária da macromolécula. Estes resultados evidenciam que a hidratação da macromolécula e dos íons desempenha papel fundamental na seletividade observada.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the fundamental factors that govern the interaction of nucleic acids with ions in solution. The bonding of divalent cations (Ca^{2+}) to these macromolecules was examined under different physical and chemical conditions. The natural nucleic acids, and synthetic poly deoxyribonucleotides (poli(dA-dT), poli(dG-dC)), and synthetic poly ribonucleic acid poli(rI).poli(rC) were utilized to determine the influence of the sequence and secondary structure, factors which modulate the interactions of ligands from ions to proteins with nucleic acids.

The thermodynamic parameters obtained from the interaction of these polymers in the presence of monovalent ions such as Na^+ , K^+ and Li^+ which behave as electrolytic supports were obtained by the method of multiple equilibrium and were analysed by poly electrolytical models: condensation of counter and cellular models. These results indicate that the interaction of Ca^{2+} with nucleic acids strongly depends on the ionic species of the supporting salt and the primary and secondary structures of the macromolecule. An additional factor of importance is the macromolecule and ionic hydrations.

INDICE

CAPITULO	TITULO	PAGINA
CAPITULO I	INTRODUÇÃO	01
CAPITULO II	MATERIAIS E MÉTODOS	09
	2.1. Introdução	10
	2.2. Materiais	10
	2.3. Método de Preparação das Amostras	11
	2.4. Métodos de Medidas	12
	2.5. Método de Caracterização do Indicador Metalocrômico Tetrametilmurexida (TMM).	13
	2.5.1. Método da Diferença entre as Absorções	16
	2.5.2. Método da Razão	19
	2.6. Método de Determinação das Constantes Aparentes de Ligação do Cálcio aos Polímeros: $K_2(0)$	22
	2.7. Métodos Computacionais Usados no Processamento dos Dados Experimentais e na Implementação dos Modelos Teóricos	23
CAPITULO III	MODELOS TEÓRICOS	25
	3.1. Introdução	26
	3.2. Modelo de Condensação de Contraíons	26
	3.3. Modelo Celular	31
	3.3.1. Equação de Poisson-Boltzmann (EPB)	33
CAPITULO IV	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
	4.1. Introdução	46
	4.2. Estudo da Seletividade Iônica de Ácido Nucléico Natural em Diferentes Concentrações de Eletrólito Suporte NaCl (Força Iônica)	47
	4.3. Estudo da Seletividade Iônica do DNA com a Espécie do Eletrólito Suporte	58
	4.4. Estudo da Dependência da Ligação Ca-NaDNA com a Temperatura	66
	4.5. Influência da Estrutura Secundária na Seletividade Iônica	70

	4.5.1. Composição de Bases	74
	4.5.2. Tipo de Conformação: A e B	75
	4.6. Influência do Cosolvente na Seletividade Iônica	78
	4.7. Análise dos Resultados Experimentais Segundo o Modelo de Condensação de Contraíons e o Modelo Celular	84
CAPÍTULO V	CONCLUSÕES	98
APÊNDICE 1		101
	1. Determinação da Constante Aparente de Ligação do Cálcio ao TMM (K_{TMM})	102
	1.1. Força Iônica e Espécie Iônica	102
	1.2. Temperatura	105
	1.3. Cosolvente	108
BIBLIOGRAFIA		115

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Nesta introdução faremos um apanhado histórico das principais pesquisas que contribuíram para que se conhecesse a correlação entre conformação e função dos ácidos nucléicos. O grande número de dúvidas que existem na atualidade sobre os mecanismos físico-químicos que regulam as propriedades destas moléculas foi a principal motivação deste trabalho.

As pesquisas fundamentais que resultaram na descoberta dos ácidos nucléicos foram realizadas por FRIEDERICH MIESCHER (Davidson, 1957), considerado como o fundador da bioquímica do núcleo celular. Em 1868 MIESCHER isolou o núcleo de células retiradas do pus, e observou que o material nuclear continha um raro composto de fósforo, e em 1872 mostrou que "cabeças" de esperma de salmon continham um composto ácido, identificado como ácido nucléico. Em pesquisas posteriores observou que a presença destes ácidos dá-se em diferentes tipos de células e tecidos, concluindo que os ácidos nucléicos são constituintes naturais de células e tecidos.

ALTMANN, em 1889 (Davidson, 1957), descreve um método para a obtenção de ácidos nucléicos de tecido animal e levedo sem proteína, pois os ácidos nucléicos eram anteriormente obtidos associados com proteínas. A partir do trabalho de ALTMANN, várias técnicas de obtenção e purificação de ácidos nucléicos são desenvolvidas, assim como melhores fontes fornecedoras de ácidos nucléicos são identificadas, entre as quais se destaca o timo de bezerro.

A identificação do ácido nucléico como o material genético foi evidenciada convincentemente a partir dos

experimentos sobre transformação bacteriana realizados em 1944 por AVERY e Col. (Avery, 1944). Estes demonstraram que o ácido nucléico isolado de uma espécie de pneumococo podia entrar em uma outra linhagem não capsulada e podia converter essa segunda numa linhagem produtora de cápsula.

Quando foi compreendido, no início dos anos 50, que as proteínas e não o material genético, eram produtos dos genes iniciou-se a procura pelo elo entre as linguagens dos dois polímeros: as linguagens dos ácidos nucléicos e as das proteínas.

A identificação do ácido desoxiribonucleico (DNA) com o material genético e o estabelecimento de sua estrutura em hélice dupla podem ser considerados os pontos iniciais no crescimento na nova disciplina da Biologia Molecular.

WATSON e CRICK (Watson, 1953, 1968; Crick, 1954) conseguiram juntar as peças do enorme quebra-cabeças de dados obtidos por vários pesquisadores, ao propor não somente uma estrutura para os ácidos nucléicos, como também indicaram como o DNA poderia duplicar-se para permitir a continuidade hereditária durante a divisão celular. Adaptando dimensões e formas de nucleotídeos a partir da estrutura da citosina obtida por FURBERG (Furberg, 1951), WATSON e CRICK propuseram um modelo no qual os pares de base adenina e timina (A-T) e citosina e guanina (C-G) são ligados por pontes de hidrogênio, o que justificava as observações feitas por CHARGAFF (Zamenhof, 1952) e GULLAND (Gulland, 1947), empilhando-se numa estrutura de dupla-hélice com 10 pares de bases por volta, na qual a distância de empacotamento é de 3.4 Å, conforme dados obtidos por ASTBURY (Astbury, 1947) e WILKINGS (Wilkins, 1953). Esta conformação é conhecida como conformação B (Saenger, 1988).

Com o desenvolvimento de novas técnicas experimentais, equipamentos e métodos utilizados na determinação de estruturas de ácidos nucleicos, verificou-se que os ácidos nucleicos podem assumir diferentes conformações, sendo estas agrupadas em 3 famílias principais: A, B e Z (Saenger, 1988).

Os ácidos ribonucleicos (RNA) são encontrados somente em duas conformações correlatas, A e A', constituindo a família A de estruturas de dupla hélice. Em força iônica baixa, na faixa de valores fisiológicos, a conformação A apresenta 11 pares de bases por volta completa de hélice. Entretanto, se a concentração de sal do meio onde se encontra o polímero foi aumentada acima de 20%, a conformação A transforma-se na conformação A', com 12 pares de bases (Arnott, 1964). Dados referentes a detalhes geométricos da estrutura de dupla hélice A-RNA e A'-RNA foram obtidos de polímeros sintéticos, tais como poli(rI).poli(rC) e poli(rA).poli(rU) (Chambelin, 1965; Arnott, 1972).

Enquanto o RNA, tanto o natural quanto o sintético, sob uma grande variedade de condições experimentais, apresenta-se só sob duas formas A e A', o DNA pode adotar vários tipos diferentes de conformações dependendo das condições experimentais, como espécie de contraíon, concentração e espécie do eletrólito suporte, hidratação e composição e de bases.

As conformações apresentadas pelo DNA são classificadas nas seguintes famílias: A, sendo o A-DNA único representante, com características conformacionais muito semelhantes ao A-RNA; B, com os tipos B, C, D, E e T-DNA. Além destas conformações de dupla hélice à direita, uma variedade com dupla hélice à esquerda tem sido identificada (Z-DNA).

Várias evidências mostram uma estreita interligação entre a forma e a função dos ácidos nucléicos. Há também evidências de que o ambiente iônico em que se encontram os ácidos nucléicos é determinante na manutenção da forma e, conseqüentemente, tem algum papel na determinação da função dos ácidos nucléicos.

Para estabelecer a natureza das forças envolvidas na manutenção da estrutura e estabilidade dos ácidos nucléicos, foram realizados vários estudos físico-químicos das transições conformacionais.

As transições ordem-desordem dos ácidos nucléicos são caracterizadas por uma grande entalpia positiva e variação de entropia. Entretanto, a interpretação destas mudanças termodinâmicas não é fácil. Forças hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, interação de empilhamento de bases (base-stacking), interações eletrostáticas e entropias conformacionais são as contribuições principais dos fenômenos observados. No entanto, sua importância relativa é de difícil acesso.

O alto grau de complexidade do sistema, entretanto, dificulta o conhecimento de qual destas interações determina a manutenção de uma dada conformação destes polímeros. Resultados experimentais têm mostrado que o ambiente iônico no qual o polímero se encontra é muito importante na manutenção da sua conformação e configuração (Anderson, 1982). O ambiente iônico tem se mostrado modulador de vários fenômenos biológicos nos quais ocorre interação de ligante com ácidos nucléicos. Um exemplo importante destes fenômenos é a interação de proteínas com ácidos nucléicos, que ocorre tanto na replicação, quanto na regulação da expressão gênica (Record, 1985). Estes fenômenos biológicos,

embora de extrema importância, não são bem compreendido físico-quimicamente.

Apesar da ligação de íons aos ácidos nucleicos ser pouco compreendida, seu papel como intermediário na ligação de proteínas com ácidos nucleicos, tem sido reconhecido por vários autores (Sissoëff, 1976; Pezzano, 1980). Recentemente, estes estudos têm demonstrado que as camadas de hidratação dos ácidos nucleicos desempenham um importante papel na ligação de ligantes e na seletividade observada (Texter, 1978; Saenger, 1987; Westhof, 1988).

Vários modelos e teorias foram propostos para descrever esta complexa interação entre íons e ácidos nucleicos. Os modelos de ordem-desordem, usados com sucesso na análise da estabilidade termodinâmica de polipeptídeos (Poland, 1970), não são perfeitamente adequados ao estudo da estabilidade de ácidos nucleicos, pois não levam em conta a interação eletrostática de longo alcance, e esses polímeros apresentam um forte caráter polieletrólítico.

Assim, a interação de íons com polieletrólitos lineares tem sido estudada principalmente através de três modelos: o modelo de condensação de contra-íons proposto inicialmente por OOSAWA (Oosawa, 1971) e desenvolvido posteriormente por MANNING (Manning, 1974, 1978); o modelo celular, que envolve a solução da equação de Poisson-Boltzmann (Katchalsky, 1971; Klein, 1981; Granot, 1983; Le Bret, 1984); e o cálculo da distribuição de contra-íons ao redor do polieletrólito através de simulação de Monte Carlo (Devarajan, 1988; Jayaram, 1990; Schaefer, 1990; Anderson, 1990).

As características conformacionais, relativamente

bem estabelecidas, permitem estudar as influências dos detalhes estruturais na seletividade iônica mostradas pelos biopolímeros em geral, e ante a rigidez apresentada por estes biopolímeros, o que possibilita a utilização dos modelos teóricos de condensação de contra-íons e o modelo celular, compreender, com bases físico-químicas, a especificidade da interação destes biopolímeros com ligantes.

Nossa hipótese de trabalho é que a seletividade iônica é determinada pela estrutura secundária e pela estrutura das camadas de água da macromolécula.

Para provar nossa hipótese, empregando técnicas relativamente simples (espectroscopia óptica), estudaremos a interação do cálcio com ácidos nucleicos. Utilizaremos ácidos nucleicos naturais e sintéticos que apresentem sequência de base bem definida, que forneça variedade estrutural, conformacional e diferentes hidratações e sequência de pares de base.

Com o objetivo de estudar como as contribuições eletrostáticas e entrópicas induzem a seletividade iônica, e qual é a parcela da energia conformacional nesta contribuição energética, estudaremos a seletividade iônica em diversas condições físico-químicas: forças iônicas, temperaturas, diferentes sais suportes e cosolventes.

Mostraremos que íons metálicos podem ser utilizados como sondas simplificadas, quando comparadas com drogas e proteínas, para o estudo da interação de íons com ácidos nucleicos.

O trabalho é eminentemente experimental, mas os dados experimentais serão analisados em consonância com dados obtidos de modelos teóricos.

É também objetivo deste trabalho o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de rotinas computacionais rápidas e eficientes que permitam a simulação de experimentos de interação de ácidos nucléicos com pequenos ligantes, em sistemas computacionais de pequeno porte.

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.

INTRODUÇÃO

Neste Capítulo serão descritos: os materiais, os equipamentos e a metodologia utilizados na preparação das amostras; as técnicas empregadas na obtenção dos dados experimentais; e os métodos computacionais utilizados no processamentos dos dados experimentais e no desenvolvimento e implementação dos modelos teóricos.

2.2.

MATERIAIS

Ácidos nucleicos (AN) de Timo de Bezerro (ct-DNA), Polideoxiribonucleotídeos (poli(dA-dT) e poli(dG-dC)) e Poliribonucleotídeos (poli(rI).poli(rC)) sintéticos foram adquiridos da PHARMACIA FINE CHEMICALS.

O indicador metalocrômico TETRAMETILMUREXIDA (TMM), de alto grau de purificação, foi gentilmente cedido pelo Prof. Rudolf Kohn, da Universidade Bratislava, Checoslováquia.

As soluções aquosas de NaCl, KCl e LiCl, foram feitas a partir de sais de grau analítico (Merck) e suas concentrações determinadas através da medida da densidade da solução saturada destes sais, a 20°C.

A concentração da solução aquosa de CaCl_2 (Merck) utilizada nas titulações, foi determinada por Espectroscopia de Massa, utilizando-se um Perkin Elmer Spectrometer do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e bidestilada em destilador de Quartzo (Tecnal),

apresentando condutividade elétrica de $\cong 2.0\mu\Omega^{-1}$.

A condutividade elétrica das amostras e da água foram medidas com condutivímetro (Digimed).

Todos os volumes de soluções usadas foram medidos com micro-seringas de precisão Hamilton.

Os espectros ópticos e as concentrações de polímero e corante foram determinados com espectrofotômetro UV-Visível, Specord M-40, Karl Zeiss - Jena, munido com porta cela termostatizável com controlador de temperatura, e acoplado a banho térmico (Fanen D-114). A variação de temperatura foi de $\cong 0.1^{\circ}\text{C}$.

2.3.

METODO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O ct-DNA de alto peso molecular foi dissolvido com agitação suave durante aproximadamente um dia a 4°C , em solução de 100mM de NaCl, pois nestas condições o ácido nucléico é muito estável, não apresentando denaturação apreciável. Posteriormente foi sonificado, aplicando-se ultrassom em intervalos de 5 minutos, intercalados com intervalos de borbulhamento de N_2 , diminuindo-se desta forma a formação de radicais livres. Durante o processo de sonicação, o recipiente contendo o polímero foi mantido em banho a 0°C .

O ct-DNA sonificado foi centrifugado em centrífuga refrigerada durante aproximadamente 1 hora a 15000 rpm e a 4°C , retirando-se desta forma possíveis agregados formados durante o processo de sonicação. O supernadante foi dializado contra solução 100mM de KDTA (ácido etilendinitrilotetracético sal disódico) para retirar íons bi e trivalentes da solução e, a seguir, para retirar

o excesso de sal suporte e EDTA, foi exaustivamente dializado contra água pura até a condutividade da mesma ser próxima à da água pura.

Os polinucleotídeos sintéticos foram dissolvidos de forma análoga à utilizada na preparação do ct-DNA, não sendo entretanto sonicados nem centrifugados. O excesso de NaCl foi retirado através de diálise contra água pura.

As diferentes formas salinas de ct-DNA e os polinucleotídeos sintéticos utilizados foram obtidos por cromatografia de troca iônica, utilizando resina Sephadex C-25, previamente condicionada com XCl, onde X é Na^+ , K^+ e Li^+ . Posteriormente, todas as soluções salinas e soluções de polímero foram filtradas em filtros Milipore $.25\mu\text{m}$, e armazenadas em recipientes de poliuretano a -20°C .

2.4. METODOS DE MEDIDAS

Os dados referentes à interação do Ca^{++} com os ácidos nucleicos foram obtidos realizando-se titulações utilizando o indicador metalocrômico TetraMetilMurexida (TMM) (descrito nos próximos dois itens), que complexa com este íon. Estas medidas foram realizadas a diferentes temperaturas e diferentes forças iônicas (I).

A força iônica I de cada solução foi ajustada a seu valor desejado pela adição de quantidades necessárias de XCl. Em todos os casos analisados a concentração de sal suporte XCl (C_s) é muito maior que a concentração de grupos carregados dos polímero (C_p) e a concentração do íon bivalente titulante (C_2) ($C_s \geq 50C_p$).

e $C_s \geq 25C_2$). Assim, a força iônica $I = \frac{1}{2}(2C_s + 6C_2 + C_p)$ será aproximadamente igual à concentração de sal suporte (C_s), pois as concentrações de íons monovalentes liberados pelo polímero e a concentração de íon bivalente utilizada durante a titulação são desprezíveis em comparação com a concentração de sal suporte.

2.5. MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DO INDICADOR METALOCRÔMICO TETRAMETILMUREXIDA (TMM)

A caracterização do indicador metalocrômico Tetrametilmurexida (TMM) nas diversas condições físico-químicas nas quais observaremos a interação de cálcio com ácidos nucleicos é imprescindível, no sentido de obter os valores da constante de ligação do cálcio ao TMM. Como será mostrado abaixo, o método utilizado consiste em determinar a concentração de cálcio complexada ao corante, medindo-se a variação da absorção óptica em comprimento de onda previamente determinado, e posteriormente calcular a fração de cálcio ligada ao polímero.

O indicador metalocrômico TMM (figura 1) é conhecido por ligar-se reversivelmente em solução aquosa com o Ca^{++} , na relação estequiométrica 1:1. Apresenta como vantagem em relação a outros indicadores a grande sensibilidade na detecção de íons bivalentes ($\cong 1\mu M$), e grande estabilidade na constante de ligação ao Ca^{++} numa grande faixa de variação de pH (aproximadamente entre 4 e 10) (Ohnishi, 1978).

Figura 1: Estrutura do indicador metalocrômico Tetrametilmurexida (TMM), utilizado neste trabalho.

O espectro da absorção óptica do TMM livre em solução aquosa mostrou um máximo de absorção em 530nm e, quando complexado com cálcio, um máximo de absorção em 490nm. Estes comprimentos de onda foram determinados através da primeira derivada do espectro de absorção.

Desta forma, as absorções nestes comprimentos de onda serão dadas por:

$$A_{490} = \epsilon_{490}^f C_{TMM}^f + \epsilon_{490}^b C_{TMM}^b \quad (1)$$

$$A_{530} = \epsilon_{530}^f C_{TMM}^f + \epsilon_{530}^b C_{TMM}^b \quad (2)$$

onde ϵ_{λ}^f e ϵ_{λ}^b são os coeficientes de extinção molar do corante livre e ligado, respectivamente, no comprimento de onda λ , e C_{TMM}^f e C_{TMM}^b são as concentrações de corante livre e complexada com o

ion bivalente, respectivamente.

Os valores de ϵ_{λ}^f e ϵ_{λ}^b usados (Ruggiero, 1987) foram:

$$\begin{aligned}\epsilon_{490}^f &= 8400 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} & \epsilon_{490}^b &= 20000 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \epsilon_{530}^f &= 13800 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} & \epsilon_{530}^b &= 8420 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\end{aligned}\quad (3)$$

Na ligação de cálcio com o indicador metalocrômico, não foram observados efeitos cinéticos. Desta forma, esta reação pode ser descrita pela equação de equilíbrio abaixo:

onde a constante aparente de ligação de Ca^{++} ao corante, será dada por:

$$K_{\text{TMM}} = \frac{[\text{TMMCa}^+]}{[\text{TMM}^-][\text{Ca}^{++}]} \quad (5)$$

onde $[\text{TMMCa}^+]$ é a concentração de TMM complexado com o cálcio (C_{TMM}^b); $[\text{TMM}^-]$ é a concentração de TMM livre (C_{TMM}^f) e $[\text{Ca}^{++}]$ é a concentração de cálcio livre (C_2^f). Estas concentrações podem ser escritas em função da fração F de cálcio complexada ao TMM, da concentração total de TMM (C_{TMM}) e da concentração total de cálcio na solução (C_2). Assim, temos:

$$\begin{aligned}[\text{TMMCa}^+] &= F C_{\text{TMM}} \\ [\text{TMM}^-] &= (1-F) C_{\text{TMM}} \\ [\text{Ca}^{++}] &= C_2 - F C_{\text{TMM}}\end{aligned}\quad (6)$$

Logo, pode-se reescrever a constante de ligação K_{TMM} como:

$$K_{TMM} = \frac{F}{(1-F)[C_2 - F C_{TMM}]} \quad (7)$$

A partir dos valores da absorção óptica pode-se determinar o valor de F e conhecendo-se a concentração total de cálcio na solução (C_2) e a concentração de TMM (C_{TMM}), determinar a valor de K_{TMM} .

Na determinação da fração de cálcio complexada ao corante, foram utilizados dois métodos: um clássico, ao qual nos referiremos como sendo o método da diferença de absorção e outro mais recente, o método da razão entre as absorções.

2.5.1. MÉTODO DA DIFERENÇA ENTRE ABSORÇÕES

O procedimento experimental utilizado neste método consiste em adicionar alíquotas de solução de $CaCl_2$ de concentrações bem determinada, e obter o espectro de absorção óptica após cada adição.

O comprimento de onda é escolhido de forma a se obter grande variação na absorção óptica após cada adição de cálcio, além de ser necessário conhecer o coeficiente de extinção molar (ϵ_λ) no comprimento de onda λ selecionado. Estas características são observadas em dois comprimentos de ondas diferentes: 490 e 530nm. Na figura 2 são mostrados os espectros de absorção óptica referente a uma titulação.

Figura 2: Espectro de absorção óptica referente à titulação CaCl_2 . Condições experimentais referentes ao espectro mostrado nesta figura: $C_{\text{TMM}} = 6.23 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $T = 290 \text{ K}$, $I = 10 \text{ mM NaCl}$.

Escolhendo qualquer um dos comprimentos de onda onde se verifica grande variação da absorção óptica (490 ou 530 nm) e utilizando a equação (1) ou (2), pode-se obter uma relação entre as medidas de absorção óptica antes do início da titulação (A_o), durante a titulação (A) e a absorção correspondente ao sistema com o corante totalmente complexado com o cálcio (A_s). As absorções são dadas por:

$$\begin{aligned} A_o &= \epsilon_{\lambda}^f C_{TMM} \\ A &= \epsilon_{\lambda}^f C_{TMM}^f + \epsilon_{\lambda}^b C_{TMM}^b \\ A_s &= \epsilon_{\lambda}^b C_{TMM} \end{aligned} \quad (8)$$

Substituindo as relações dadas pela equação (6) em (8), temos que a fração (F) de TMM complexada é dada por:

$$F = \frac{A - A_o}{A_s - A_o} \quad (9)$$

Para uma concentração de cálcio muito maior que a concentração de corante e para uma ligação fraca, temos que $(C_2 - F C_{TMM}) \cong C_2$. Logo, pode-se reescrever a equação (7) como:

$$\ln (K_{TMM}) = \ln \left(\frac{F}{1-F} \right) + \ln [1/C_2] \quad (10)$$

e, através do gráfico $\ln \left(\frac{F}{1-F} \right) \times \ln [1/C_2]$, obtém-se o valor de K_{TMM} , que corresponde à extrapolação para $C_2 \rightarrow 1$.

Embora bastante utilizado (Ohnishi, 1978; Lindstron, 1960), este método apresenta uma fonte de erro que é a

extrapolação envolvida. As titulações envolvem concentração máxima de CaCl_2 , que é da ordem de 1.0mM, portanto a extrapolação envolvida é grande.

Este método é bastante simples, mas apresenta uma limitação, inerente ao corante. Foi observada pequena variação nos valores da absorção óptica nos dois comprimentos de onda no decorrer do experimento, sendo esta variação maior à medida em que se aumenta a temperatura, e acentuando-se na presença de cálcio.

Verificou-se que, quando a medida é feita ininterruptamente por períodos inferiores a uma hora, a diminuição da absorção é muito pequena. Entretanto, em titulações mais demoradas, como quando se realizam as titulações com os polímeros, ou quando se estuda a dependência de K_{TMM} com a temperatura, as variações na absorção são suficientes para criar um artefato que representa uma quantidade de aproximadamente 100 μM de cálcio, levando a subestimar a fração de cálcio complexada e, conseqüentemente, a subestimar o valor de K_{TMM} .

2.5.2. MÉTODO DA RAZÃO $\Leftarrow$

Embora as absorções nos dois comprimentos de onda varie com o tempo e com o aumento da temperatura, a razão entre elas se mantém constante (figura 3), fazendo com que esta fonte de erro (conforme discutido no item anterior) seja minimizada quando se usa a razão entre as absorções para determinar a constante de ligação.

O procedimento experimental utilizado é semelhante ao descrito no item anterior, com a diferença que a absorção é

medida em dois comprimentos de onda onde se observa grande variação de absorção após cada adição de titulante, que, como já foi discutido, para o TMM correspondem a 490 e 530 nm.

A razão R entre as absorções em 490 e 530nm, utilizando as equações (1) e (2), pode ser escrita como:

$$R = \frac{A_{490}}{A_{530}} = \frac{\epsilon_{490}^f [\text{TMM}^-] + \epsilon_{490}^b [\text{TMMCa}^+]}{\epsilon_{530}^f [\text{TMM}^-] + \epsilon_{530}^b [\text{TMMCa}^+]} \quad (11)$$

Substituindo (6) em (11) obtém-se uma expressão para a fração F de indicador complexado, em função da razão (R) entre as absorções em 490 e 530nm e dos coeficientes de extinção molar nestes comprimentos de onda para o indicador totalmente livre e complexado:

$$F = \frac{R \epsilon_{530}^f - \epsilon_{490}^f}{(\epsilon_{490}^b - \epsilon_{490}^f) - R(\epsilon_{530}^b - \epsilon_{530}^f)} \quad (12)$$

ϵ_{490}^f 12200
 ϵ_{530}^f 8400
 ϵ_{490}^b 20000
 ϵ_{530}^b 8420

Desta forma, conhecendo-se a concentração total do cálcio, e com os valores de F obtidos a partir das equações acima, é possível obter os valores de K_{TMM} (equação 7) para cada concentração de cálcio total na solução. Os valores típicos obtidos apresentam uma flutuação de $\pm 5\%$ e fornecem o valor da constante intrínseca de ligação do cálcio ao indicador.

Através deste método, os valores da absorção foram medidos em 400, 490, 510 (isosbético), 530 e 700nm, sendo que as medidas em 400 e 700nm servem para monitorar a linha de base.

Figura 3: Variação da Absorção óptica do TMM em função do tempo, em dois comprimentos de onda diferentes: 490 e 530 nm; e a razão entre as Absorções nestes dois comprimentos de onda. Condições experimentais:
 $C_{TMM} = 66.7\mu M$, $T = 298K$, $I = 10mM NaCl$.

A ligação do cálcio aos polímeros e sua competição com diferentes íons monovalentes, foi estudada utilizando técnicas espectrofotométricas muito sensíveis. Esse método desenvolvido pelos Profs. Ruggiero, Quadrifoglio e Manzini (Ruggiero, 1987) na Universidade de Trieste, Itália, permite medir, utilizando o indicador metalocrômico TMM, pequenas quantidades de cálcio numa solução que contém o polímero. Isto torna possível obter boas isotermas de ligação por meio de uma técnica relativamente simples.

Em um experimento típico de titulação, o corante TMM é dissolvido em uma solução de polímero a uma determinada condição de força iônica e temperatura. Aliquotas de CaCl_2 de concentração conhecida são adicionadas à solução e, a partir da razão R entre as absorções em 490 e 530nm, medidas após cada adição de cálcio, e da constante de ligação do cálcio ao TMM, previamente determinada, pode-se calcular os valores da concentração de cálcio livre na solução (C_2^f), através da relação:

$$C_2^f = \frac{R \epsilon_{530}^f - \epsilon_{490}^f}{(\epsilon_{490}^b - R \epsilon_{530}^b) K_{\text{TMM}}} \quad (13)$$

e a concentração de cálcio ligada ao polímero (C_2^b), com a relação:

$$C_2^b = C_2 - C_2^f - F C_{\text{TMM}} \quad (14)$$

onde F é a fração de cálcio complexada ao corante, obtida através

da equação (9) ou (12), dependendo do método de medida utilizado, e FC_{TMM} é a concentração de cálcio complexado ao TMM.

Com estes dados é possível calcular a fração de sítios de "ligação" do polímero ocupados pelo íon bivalente: $\theta_2 = C_2^b/C_p$, onde C_p é o valor da concentração de monômeros ou grupos fosfato do polímero. Estes dados são diagramados na forma de gráficos de Scatchard (Scatchard, 1949) (θ_2/C_2^f vs θ_2) e a extrapolação de θ_2/C_2^f para valores de θ_2 tendendo a zero, fornece o valor da constante aparente de ligação do cálcio ao polímero ($K_2(0)$), ou em gráficos de $1/\theta_2 \times 1/C_1^2$, onde a interseção com o eixo das ordenadas fornece o valor do número de fosfatos "ocupados" (n) pelo íon bivalente e a declividade desta curva, fornece o valor de $1/K_2(0)$.

2.7. MÉTODOS COMPUTACIONAIS USADOS NO PROCESSAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS E IMPLEMENTAÇÃO DOS MODELOS TEÓRICOS

As expressões matemáticas que descrevem a dependência da constante de ligação aparente do Ca^{++} ao corante (K_{TMM}) com a força iônica, e a dependência de K_{TMM} com a temperatura, ambas na presença ou não de cosolvente para os diferentes íons monovalentes, foram obtidas utilizando o algoritmo de Marquardt de ajuste de mínimos quadrados não lineares, implementadas num PC-286 compatível IBM.

Os programas utilizados foram os propostos no livro *Numerical Recipes* (Press, 1987), adaptados para o estudo em questão.

A solução do modelo de condensação de contrações a duas variáveis (Friedman, 1984; Manning, 1978) envolve a solução de um sistema de equações acopladas, que só pode ser resolvido numericamente por método iterativo.

Para a solução deste modelo foi implementado o Método de Newton-Raphson, proposto no livro *Numerical Recipes*, com algumas modificações necessárias para esta aplicação específica. O programa modificado, foi testado, com o intuito de avaliar o erro cometido, resolvendo um sistema de equações que apresentassem solução conhecida. O erro cometido foi menor que 0,5%, o que foi considerado muito satisfatório para o estudo em questão.

O modelo celular (Katchalsky, 1971; Granot, 1983; Bleam, 1980; Anderson, 1978, 1982) envolve a solução da equação de Poisson-Boltzmann (EPB), uma equação diferencial não linear de 2^a ordem. Esta equação pode ser desenvolvida num sistema de equações diferenciais de 1^a ordem, e transformado num problema de valor inicial. Para a solução deste modelo foi utilizado o método de Runge-Kutta de 4^o - 5^o ordem (Watts, 1982).

Os programas desenvolvidos foram implementados em estação de trabalho SUN, modelo SPARC 330, com 4M flop, de forma que o tempo de CPU utilizado nas simulações de um experimento de competição contendo 60 iterações foi da ordem de 5 minutos.

CAPÍTULO III

MODELOS TEÓRICOS

Neste capítulo serão apresentados os dois modelos utilizados na análise dos resultados experimentais: o modelo de condensação de contraíons ou modelo de Manning de duas variáveis (Manning, 1969), o modelo celular (Poisson-Boltzmann) (Katchalsky, 1971) e as modificações por nós introduzidas na solução da Equação de Poisson-Boltzmann.

A teoria de condensação de contraíons proposta inicialmente por Oosawa (Oosawa, 1971) e posteriormente desenvolvida por Manning (Manning, 1969) para estudar o efeito do políon numa solução iônica, está baseada nas seguintes simplificações:

1) O políon é considerado uma linha infinita com densidade linear de carga λ ($\lambda = q/b$, sendo q a carga de cada grupo ionizado do políon e b a distância média entre as cargas).

2) A interação entre dois ou mais políons são desprezadas.

3) Assume-se a constante dielétrica (ϵ) como sendo a do solvente puro.

4) Os íons na solução são considerados pontuais e parte dos íons se condensam num volume V_b nas vizinhanças do políon até o parâmetro de carga ξ atingir o valor $1/Z$ (onde Z é a valência dos íons condensados), e são ditos territorialmente ligados, tendo liberdade de deslocamento no volume V_b .

5) Os íons fora do condensado são tratados pela teoria de Debye-Huckel.

A idéia fundamental é que os contraíons serão atraídos na direção do políon enquanto a energia eletrostática for maior do que a energia cinética. Nesse sentido foi introduzido um parâmetro adimensional ξ , denominado parâmetro de carga, dado por:

$$\xi = \frac{q^2}{\epsilon k T b} \quad (1)$$

onde q é a carga do grupo ionizado do políon, ϵ é a constante dielétrica do solvente, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Se, numa solução contendo contraíons monovalentes, $\xi < 1$ não haverá condensação, pois a energia cinética é superior à eletrostática. Ao contrário, se $\xi > 1$ os contraíons se condensarão em torno do políon, blindando suas cargas. A condensação de contraíons prossegue até que a densidade efetiva de cargas:

$$\xi_{ef} = \frac{q^2 (1 - \theta_1)^2}{\epsilon k T b} = \frac{q_{ef}^2}{\epsilon k T b} \quad (2)$$

torne-se igual à unidade. Nessa expressão θ_1 representa a fração de contraíons ligados ao políon ($\theta_1 = C_1^b / C_p$), sendo C_1^b a concentração de contraíons ligados ao polímero e C_p a concentração molar de grupos carregados do políon.

Para uma solução contendo contraíons de valências diversas a teoria prevê que os contraíons se condensam enquanto

$\xi_{ef} > 1/Z_i$, sendo Z_i a valência do íon considerado.

A teoria de duas variáveis é a extensão deste modelo para uma solução contendo mistura de íons mono e bivalentes. A energia livre total é dada pela soma de duas contribuições: a eletrostática, de longo alcance, e a entrópica, relacionada à troca de contraíons em V_b e na solução.

Definindo a energia livre de Gibbs reduzida por grupo carregado do políon como:

$$g = \frac{G}{n_p R T} \quad (3)$$

onde n_p é o número de moles de grupos carregados do políon (grupos fosfato no caso de ácidos nucleicos) e R é a constante universal dos gases, pode-se escrever a energia livre total do sistema como:

$$g = g_{el} + g_{mix} \quad (4)$$

onde g_{el} é a energia livre associada à repulsão eletrostática entre os grupos carregados do políon não compensados pelos íons condensados, e g_{mix} é a energia livre associada ao movimento dos íons livres, dos íons "ligados" e moléculas do solvente, ou seja:

$$g_{mix} = g_{mix}(\text{ligados}) + g_{mix}(\text{livres}) + g_{mix}(\text{solvente})$$

Para um solução polieletrólítica contendo dois tipos de cátions mono e bivalentes, pode-se escrever as contribuições à energia livre como:

$$g_{el} = -(1 - \theta_1 - 2\theta_2)^2 \xi \ln(1 - e^{-Kb}) \quad (5)$$

$$\begin{aligned} g_{mix} = & \theta_1 \ln(\theta_1/V_b) + \theta_2 \ln(\theta_2/V_b) \\ & + \theta_1 \ln(10^{-3}C_1^f) + (C_2^f/C_p) \ln(10^{-3}C_2^f) \\ & + \theta_2 \end{aligned} \quad (6)$$

onde $\theta_2 = C_2^b/C_p$ representa a fração de íons bivalentes "ligados" por grupo fosfato, C_2^b é a concentração molar de íons bivalentes "ligados" e C_2^f a concentração molar de íons livres.

O parâmetro K (em cm^{-1}) é o inverso do comprimento de Debye, e é dado por:

$$K^2 = \frac{4 \pi q^2 N^a}{10^3 \epsilon kT} \sum_i Z_i^2 C_i \quad (7)$$

onde a soma se estende sobre todas as espécies iônicas, e N^a é o número de Avogadro.

V_b , o volume de condensação em cm^3 por mol de grupo fosfato, é dado, na aproximação em que $C_1 \gg C_p$ e $C_1 \gg C_2$, por:

$$V_b = 10^3 e (1 - \xi^{-1}) (Kb)^2 / C_1 \quad (8)$$

Minimizando a energia livre total em relação a θ_1 e θ_2 , satisfazendo a condição que a quantidade total de íons bivalentes na solução é fixa, ou seja $dC_2/d\theta_2 = -C_p$, obtém-se:

$$\ln [10^3 e \theta_1 / C_1^f V_b] = -2 \xi [1 - \theta_1 - 2\theta_2] \ln (1 - \exp(-Kb)) \quad (9)$$

$$\ln(\theta_2/C_2^f) = 2 \ln(\theta_1/C_1^f) - \ln(V_b/10^3 e) \quad (10)$$

A solução das equações (9) e (10) é obtida iterativamente (por exemplo utilizando o método de Newton-Raphson): para um par de valores de C_1^f e C_2^f , atribuindo um valor para θ_2 na equação (9) encontramos θ_1 , com esse valor substituído na equação (10) encontramos um novo θ_2 e assim sucessivamente, até que se observe convergência.

No limite de θ_2 tendendo a zero, temos que:

$$\lim_{\theta_2 \rightarrow 0} (\theta_2/C_2^f) = K_2(0) \quad (11)$$

onde $K_2(0)$ representa a constante aparente de ligação entre o íon bivalente e o poliíon, e é proporcional ao trabalho por grupo fosfato realizado para deslocar um íon bivalente da solução (livre) para o volume de condensação V_b (ligado).

A dependência de $\ln[K_2(0)]$ com a força iônica I , para o caso em que a concentração de sal suporte C_s é muito maior que as concentrações de íons bivalentes C_2 e de grupos fosfato C_p , e portanto $C_s \cong C_1$, logo $I \cong C_1$, pode obter-se a partir da equação (10), sendo dada por:

$$\frac{d[\ln(K_2(0))]}{d[\ln(C_1)]} = -2 \quad (12)$$

Esta relação mostra que o trabalho para trazer um íon bivalente da solução (livre) aumenta com o crescimento da

força iônica, pois $K_2(0)$ diminui com o crescimento de C_1 .

3.3

MODELO CELULAR

O modelo celular pressupõe que, em soluções polieletrólíticas diluídas, a macromolécula carregada (macroion) assume simetria cilíndrica devido à repulsão eletrostática entre seus grupos ionizados, e é o centro de sua atmosfera iônica, formada por pequenos íons móveis na solução, não havendo interação entre as atmosferas de outros políons. Pressupõe também que, devido à repulsão eletrostática entre os políons as macromoléculas estão distribuídas uniformemente na solução.

Isto torna interessante dividir a solução em células, no centro das quais estão os políons, cada qual rodeado por uma atmosfera de pequenos íons. As células podem ser assumidas como sendo cilindros de altura b e diâmetro $2R_c$, onde b é igual à distância entre as projeções dos grupos carregados sobre o eixo do polímero, e $2R_c$ é igual à distância média entre os eixos dos polímeros (figura 1).

O parâmetro b é obtido a partir da estrutura do polímero determinada por métodos cristalográficos; o raio da célula, R_c , é determinado a partir da concentração de monômeros na solução, pois, numa solução contendo N_p grupos carregados por unidade de volume, temos:

$$N_p (\pi R_c^2 b) = 1 \quad (13)$$

logo, o raio da cela é:

$$R_c = 1/(N_p \pi b)^{1/2} \quad (14)$$

A análise convencial do modelo celular para soluções polieletrólíticas pressupõe também que os íons móveis são puntiformes e que a constante dielétrica é constante em toda a célula e igual à constante dielétrica do solvente.

Figura 1: Desenho esquemático para ilustrar o modelo celular para polieletrólitos lineares (Katchalsky, 1971)

A equação de Poisson que relaciona o potencial eletrostático $\Psi(r)$ do políon em qualquer ponto da célula com a densidade volumétrica de carga produzida pelos íons móveis da solução, escrita em coordenadas cilíndricas (Katchalsky, 1971; Anderson, 1982), é :

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left[r \frac{d\Psi(r)}{dr} \right] = - \frac{4\pi}{\epsilon} \rho(r) \quad (15)$$

onde a densidade volumétrica de cargas $\rho(r)$ é dada por:

$$\rho(r) = \sum n_i(r) z_i q \quad (16)$$

onde $n_i(r)$ é igual ao número de íons por cm^3 da espécie i em r , e z_i a valência da espécie iônica i e q a carga do próton. A relação entre $n_i(r)$ e a concentração molar local da espécie i ($C_i(r)$) é dada por:

$$n_i(r) = 10^{-3} N^a C_i(r) \quad (17)$$

onde N^a é o número de Avogadro e $n_i(r)$ e $C_i(r)$ são expressos em números de íons por cm^3 e em moles por litro, respectivamente.

A suposição fundamental do modelo convencional de PB (Poisson-Boltzmann) é que as concentrações locais de íons $n_i(r)$ estão relacionadas com as respectivas concentrações de referência n_i^0 pelo fator de Boltzmann, envolvendo o potencial eletrostático $\Psi(r)$:

$$n_i(r) = n_i^0 \exp \left[- Z_i \frac{q\Psi(r)}{kT} \right] \quad \text{potencial reduzido?} \quad (18)$$

A concentração de referência n_i^0 representa a concentração de íons na borda da célula ($r = R_c$). Neste ponto adota-se, por questões de simetria, o valor do potencial eletrostático como sendo nulo: $\Psi(R_c) = 0$.

Substituindo as concentrações locais de íons $n_i(r)$ pelas respectivas relações de Boltzmann temos:

$$\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{d\Psi}{dr} \right) = - \frac{4\pi q}{\epsilon} \sum_{i=1}^m Z_i n_i^0 e^{-\frac{Z_i q\Psi}{kT}} \quad (19)$$

Definindo o potencial reduzido $y = \frac{q\Psi}{kT}$ e o parâmetro de Debye para força iônica unitária $K_1^2 = \frac{4\pi q^2}{\epsilon kT}$ e um parâmetro adimensional $x = K_1 r$, pode-se reescrever a EPB como:

$$\frac{1}{x} \frac{d}{dx} \left(x \frac{dy}{dx} \right) = - \sum_{i=1}^m Z_i n_i^0 e^{-Z_i y} \quad (20)$$

As duas condições de contornos necessárias para a solução desta equação são:

a) A lei de Gauss aplicada na interface políon-solução ($x_p = K_1 R_p$, onde R_p é o raio do polímero):

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=x_p} = - \frac{Z\xi}{x_p} \quad (21)$$

onde $\xi = q^2/\epsilon kTb$ é conhecido como parâmetro de carga.

b) A condição de eletroneutralidade da célula, que implica que:

$$\left. \frac{dy}{dx} \right|_{x=x_c} = 0 \quad (22)$$

onde $x_c = K_1 R_c$.

Este sistema só apresenta solução analítica para o caso de simples diluição de sal-de-polímero, onde só se tem uma única espécie de íon móvel: o contra-íon. Entretanto, no caso de um sistema onde há excesso de sal suporte e/ou uma mistura de íons de diferentes valências, a KPB não apresenta solução analítica, mas tem várias soluções numéricas. *porque?*

Quando se pode escolher um método definido de integração, dá-se preferência ao método que reduz o problema de valores de contorno para um problema equivalente de valores iniciais (Bailey, 1968). Os métodos que fazem isso são razoavelmente seguros e já estão bem desenvolvidos. Assim, foi aplicado o método de Runge-Kutta de 4ª ordem (Gear, 1971). Primeiramente a equação (20) será colocada em sua forma mais explícita e específica para tratar o tipo de sistema estudado neste trabalho, que contém uma mistura de sal-de-polímero com o contra-íon monovalente, mais excesso de sal suporte com cátion igual ao contra-íon e um sal de cátion bivalente com o mesmo co-íon, podendo ser representado por:

logo, para este sistema a equação (20) fica:

$$\frac{d^2 y}{dx^2} = - \frac{1}{x} \frac{dy}{dx} - (n_1^0 e^{-y} + 2n_2^0 e^{-2y} - n_3^0 e^y) \quad (23)$$

onde n_1^0 , n_2^0 e n_3^0 representam as concentrações de referência (em

número de íons por cm^3) de íons monovalentes positivos, bivalentes positivos e monovalentes negativos (coíons) respectivamente, que são parâmetros a serem determinados.

A equação (23) é uma equação diferencial de 2ª ordem, e pode ser facilmente transformada num sistema de equações diferenciais de 1ª ordem. Fazendo:

$$\begin{aligned} y_1 &= y \\ y_2 &= \frac{dy_1}{dx} \\ y_3 &= n_1^0 e^{-y_1} \\ y_4 &= n_2^0 e^{-2y_1} \\ y_5 &= n_3^0 e^{y_1} \end{aligned} \quad (24)$$

obtemos o seguinte *sistema* conjunto de equações diferenciais de primeira ordem:

$$\begin{aligned} \frac{dy_1}{dx} &= y_2 \\ \frac{dy_2}{dx} &= -\frac{1}{x} y_2 - (y_3 + 2y_4 - y_5) \end{aligned} \quad (25)$$

com as seguintes condições de contorno:

$$y_2 = \frac{2\xi}{x_p} \quad \text{em } x = x_p \quad (26a)$$

$$y_1 = y_2 = 0 \quad \text{em } x = x_c \quad (26b)$$

O método de Runge-Kutta implica no conhecimento do valor da função e de sua derivada em um dado ponto. No entanto, apesar da equação (26b) fornecer o valor da função (potencial) e

de sua derivada (o campo elétrico) num mesmo ponto (a borda da célula), não é apropriado iniciar a solução a partir deste ponto em direção à borda do polímero.

Nas condições de força iônica e concentração de grupos fosfatos utilizadas nas simulações realizadas neste trabalho (da ordem de 10mM e 0.5mM respectivamente), observamos que a distâncias maiores que aproximadamente cinco vezes o inverso do parâmetro de Debye ($r \simeq 5/K$), tanto o potencial quanto o campo são praticamente nulos.

Estando a borda de célula R_c geralmente a uma distância duas a tres vezes maior que este ponto ($r \simeq 5/K$), implica então que deve ser realizada a integração da equação (23) num espaço relativamente grande onde a função e a derivada são praticamente nulos, resultando numa grande acumulação de erros originários do próprio método numérico utilizado.

Por isso é utilizada a equação (26a) e estima-se o valor inicial do potencial $\Psi(R_p)$, e como já é conhecido o valor do campo neste mesmo ponto, é possível aplicar o método de Runge-Kutta, como descrito adiante.

Portanto, conhecidos $y_1(x)$ e $y_2(x)$ no ponto $x = x_p$, pode-se aplicar o Método de Runge-Kutta de 4^a ordem. Este método numérico aplicado para resolver o sistema de equações (24) e (25), com valores iniciais dados por $y_1(x_p)$ e $y_2(x_p)$, consiste em obter os valores de y_1 e y_2 para um ponto $x_p + h$, uma vez conhecidos os valores em x_p , onde h é o passo de integração.

De posse dos valores de $y_1(x_p+h)$ e $y_2(x_p+h)$, pode-se calcular, reaplicando o método, os valores de $y_1(x)$ e $y_2(x)$ para $x = x_p + 2h$, e assim sucessivamente.

Desta forma, é escolhido um valor para o potencial $y_1(x = x_p)$ e integra-se a equação (23) pelo método de Runge Kutta. Se o valor $y_1(x_p)$ escolhido não for o correto, o campo elétrico e o potencial em $x = x_c$ (na borda da célula) não serão nulos.

A solução numérica deste sistema de equações requer a especificação de todos os n_i^0 , e do ponto R_b onde o campo elétrico e o potencial são praticamente nulos. Classicamente, R_b é calculado como sendo 5 vezes o inverso do parâmetro de Debye, pois R_b não coincide com R_c no caso em que há sal suporte na solução. O parâmetro de Debye é calculado em função da força iônica I da solução, onde I é definido como:

$$I = \frac{1}{2} \sum |z_i|^2 C_i \quad (27)$$

Na resolução numérica da EPB para um dado conjunto de valores de ζ , R_p , R_b e n_i^0 , utiliza-se o método de Runge-Kutta de 4ª ordem, iniciando-se a solução da EPB atribuindo um valor inicial ao potencial reduzido na borda do polímero ($y_1(x_p)$). Se após a evolução da solução conforme descrito anteriormente, até o ponto $x = x_b$, o potencial e o campo elétrico não se anularem simultaneamente neste ponto, inicia-se novamente a solução, variando sistematicamente $y_1(x_p)$. O procedimento é repetido até que o campo e o potencial elétrico se anulem em $x = x_b$, ou estejam dentro do intervalo de tolerância desejado (da ordem de 10^{-4}).

Com os valores de $y_1(x)$ obtidos, é possível calcular o número total de íons (N_i) de cada espécie iônica na célula, pois:

$$N_i = \int_{V_c} n_i(r) dv = \int_{V_c} n_i^o e^{-z_i y_1(x)} dv \quad (28)$$

onde $V_c = \pi b R_c^2$ e $dv = 2\pi b r dr$.

N_i pode ser escrito em função das concentrações molares de referência C_i^o , pois sendo a relação entre C_i^o e n_i^o em $r = R_c$ dada pela equação (17), temos que:

$$N_i = \int_{V_c} \frac{N^a}{10^3} C_i^o e^{-z_i y_1(x)} dv \quad (29)$$

e, analogamente, podemos obter o valor da concentração de íons na célula, pois

$$C_i = \frac{1}{V_c} \int_{V_c} C_i(x) dv \quad (30)$$

onde C_i é a concentração molar na célula e $C_i(x)$ é a concentração molar local de cada espécie i , dada por:

$$C_i(x) = C_i^o e^{-z_i y_1(x)} \quad (31)$$

Obtidos os valores de $y_1(x)$ e, conseqüentemente, de N_i , parte do problema fica resolvido. Porém a solução obtida deve ser tal que se verifique a eletroneutralidade da célula, descrita pela seguinte relação:

$$\sum Z_i N_i = N_p \quad (32)$$

O único parâmetro que pode ser variado na KPB e que em princípio é desconhecido, é n_i^0 . Caso a relação dada pela equação (32) não se verifique, inicia-se a solução da KPB (equação 23) para um novo conjunto de valores de n_i^0 . Depois de encontrar o valor do potencial na superfície, $y_1(x_p)$ e obter a solução da KPB, procede-se a integral (equação 28). Se o valor da equação (32) for diferente de N_p por uma quantidade maior que um certo valor pré-determinado, criteriosamente muda-se os n_i^0 , e retorna-se ao estágio inicial da resolução.

Desta forma, para uma determinada estrutura do polímero que determina os valores de R_p e b , e para um conjunto de concentrações de sal de polímero (C_p) e de íons suporte na solução, é possível, por meio de métodos iterativos, obter as concentrações de íons livres na solução.

Analisando o método de resolução da KPB utilizado por diversos autores, verificamos que, conhecidas as concentrações de polímero (e seus parâmetros estruturais característicos b e R_p) e as concentrações médias de sais suportes na solução, é necessário estimar os valores das concentrações livres (ou de referência) dos íons na solução, pois são estas concentrações livres, n_i^0 (ou C_i^0), que determinam o valor de $y_1(x)$.

Uma vez determinado o valor de $y_1(x)$, é necessário, ainda, verificar se as concentrações médias obtidas para o conjunto de C_i^0 correspondem aos valores conhecidos. Caso isso não ocorra deve-se iniciar uma nova solução para valores de C_i^0 modificados criteriosamente. Este procedimento é muito difícil de ser implementado para o caso de soluções nas quais tem-se misturas de sais com diferentes valências.

No caso de soluções formadas por sal de polímero

mais um excesso de sal suporte com cátion igual ao contra-íon, a aproximação utilizada consiste em supor $C_s = C_1$, onde C_s é a concentração de cátions monovalentes provenientes do sal suporte; ou seja, supor que a concentração de íons monovalentes positivos é igual à concentração de sal suporte. Esta aproximação é válida para o caso de $C_s \geq 10 C_p$, o que implica em supor fontes infinitas de íons na borda da cela. Nesta situação a concentração média de sal suporte desejada pode ser obtida variando apropriadamente o valor de C_1^0 , implicando numa solução iterativa entre a equação (23) e a equação (28).

A aproximação de fonte infinita de íons na borda da célula pode ser utilizada para analisar um sistema contendo sal de polímero e uma mistura de sais suporte mono e bivalentes com o mesmo coíon, com a condição de que $C_s + C_2 \geq 10 C_p$ (onde C_s é a concentração de cátions monovalentes provenientes do sal suporte e C_2 é a concentração de cátions bivalentes). Nesta situação pode-se supor que $C_3^0 = C_1^0 + 2C_2^0$, onde C_3^0 , C_1^0 e C_2^0 são concentrações de ânions monovalentes e cátions mono e bivalentes de referência, respectivamente. Nesta aproximação, para um determinado conjunto de valores de C_1^0 e C_2^0 (e conseqüentemente C_3^0) obtém-se o valor de $y_1(x)$. Variando convenientemente os valores de C_1^0 e C_2^0 é possível obter as concentrações médias desejadas. Deve-se notar que, para este sistema, torna-se necessário resolver a EPB iterativamente com as equações referentes às concentrações médias dos íons monovalentes e bivalentes. Um bom teste para verificar a validade da solução obtida é verificar a seguinte relação: $C_s + 2C_2 = C_3$.

Entretanto, este método é pouco prático quando se deseja aplicá-lo para se obter a isoterma de Scatchard para uma experiência de competição entre os íons bivalentes e monovalentes

na ocupação de sítios de um polímero. Neste tipo de experimento é realizada uma titulação da solução de sal-de-polímero mais excesso de sal suporte 1:1 com sal de íons bivalentes. No início da titulação as concentrações de sal bivalente são muito inferiores à concentração de polímero (cerca de duas ordens de grandeza menor) sendo incorreto supor que $C_2 = C_2^0$. Esta igualdade implica em assumir fonte infinita de íons bivalentes, válida somente para o caso em que $C_2 \geq 10 C_p$.

Nesta situação, pode-se iniciar a solução supondo a existência de fonte infinita para os íons monovalentes, ou seja $C_1^0 = C_s^0 = C_s$, e atribuir a C_2^0 um valor inferior a C_2 , e após resolver a EPB, verificar se a concentração de íons bivalentes obtida após a integração da equação (28) é igual (dentro de uma margem de tolerância previamente escolhida) à concentração desejada. Caso não seja, modifica-se o valor de referência C_2^0 e reinicia-se a solução da EPB.

Ao obter-se o valor de C_2 desejado, deve-se ainda verificar o cumprimento da equação (32) (eletroneutralidade), e em não se verificando, variar os valores de referência dos cátions positivos e/ou negativos. E assim sucessivamente, para cada nova concentração de íons a ser analisada.

Uma forma alternativa de resolver este sistema consiste em "inverter" a solução do modelo, ou seja: para uma concentração de íons bivalentes de referência calcula-se a concentração de íons bivalentes na solução. Nos experimentos realizados neste trabalho, a concentração de sal suporte é de 50 a 100 vezes maior que a concentração de polímero, e o sal bivalente foi variado desde valores de 100 vezes menores que a concentração de polímero até valores 3 ou 4 vezes maiores que a concentração de

polímero. Portanto, durante todo o experimento, a força iônica foi determinada principalmente pela concentração de sal suporte. Nesta situação é possível supor que $C_s = C_1^0$ e $C_2^0 = C_1^0 + 2C_2^0$, sendo que o número de íons bivalentes ligados será calculado pela seguinte relação:

$$N_2^b = \int_{V_L} n_2^0 e^{-2y_1} dv \quad (33)$$

onde $V_L = \pi b (R_b^2 - R_p^2)$ e R_b é o ponto onde o potencial reduzido é igual à unidade. O número de íons bivalentes livres, será igual a:

$$N_2^f = \int_{V_f} n_2^0 e^{-2y_1} dv \quad (34)$$

onde $V_f = \pi b (R_c^2 - R_b^2)$.

Com estes resultados é possível calcular:

a) a fração de íons bivalentes "ligados" ao polímero θ_2 :

$$\theta_2 = \frac{N_2^b}{N_p} \quad (35)$$

b) a constante de associação aparente no limite de θ_2 tendendo a zero $K_2(0)$:

$$\lim_{\theta_2 \rightarrow 0} \left(\frac{N_2^b / N_2^f}{C_p} \right) = K_2(0) \quad (36)$$

c) o coeficiente de atividade aparente γ_2 :

$$\gamma_2 = N_2^f / N_2 \quad (37)$$

onde N_2 é igual ao número total de íons bivalentes em cada célula:

$$N_2 = N_2^b + N_2^f. \quad (38)$$

Outra modificação introduzida nas rotinas computacionais utilizadas na solução da EPB, consiste em não impor o ponto onde o potencial e o campo reduzidos sejam praticamente nulos (da ordem de 10^{-4}), sendo que este ponto (R_b) é determinado pelos critérios de convergência adotados, que consistem em só aceitar a solução da EPB, quando tanto o potencial e o campo sejam menor que um certo valor previamente escolhido, que nas simulações realizadas neste trabalho foi de 10^{-4} .

Estas modificações introduzidas na solução da EPB: "inversão" do problema e não imposição do ponto R_b , possibilitaram a simulação rápida e eficiente dos experimentos de competição realizados neste.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os estudos físico-químicos e teóricos realizados com o objetivo de compreender os principais mecanismos envolvidos no processo de seletividade iônica observada na interação entre íons e polieletrólitos.

Devido às características estruturais apresentadas pelos ácidos nucleicos naturais e ante a possibilidade de poder selecionar a composição dos mesmos, utilizando ácidos nucleicos sintéticos, este tipo de polieletrólito foi escolhido para a realização deste trabalho.

A seletividade iônica apresentada por diferentes polieletrólitos e em diferentes condições experimentais foi estudada utilizando o íon bivalente cálcio. A escolha de cálcio deveu-se ao fato das evidências experimentais indicarem que este íon não se liga especificamente ao polímero (Braulin, 1987), tornando o complexo ácidos nucleicos-cálcio bastante suscetível a mudanças do meio iônico.

A monitoração do cálcio livre pode ser realizada de forma simples e confiável por meio de métodos de espectroscopia óptica no visível, utilizando indicadores metalocrômicos. Esta monitoração foi realizada utilizando especificamente o indicador Tetrametilmurexida (TMM).

A seguir são apresentados e discutidos os dados obtidos com o auxílio do indicador metalocrômico referentes à interação do cálcio com diversos ácidos nucleicos em diferentes condições físico-químicas.

ESTUDO DA SELETIVIDADE IÔNICA DE ÁCIDO NUCLEÍCO
NATURAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ELETRÓLITO
SUPORTE NaCl (FORÇA IÔNICA)

A estabilidade conformacional de ácidos nucleicos, seu comportamento em solução (configuração da cadeia (Anderson, 1982), e sua reatividade com ligantes (Anderson, 1978a), são influenciados pelo ambiente iônico.

Neste sentido, o objetivo do estudo apresentado neste item, é o de quantificar o efeito produzido pelo meio iônico na ligação do íon cálcio aos ácidos nucleicos. Estes experimentos de competição entre o íon bivalente com os íons monovalentes da solução, em diferentes condições físico-químicas, fornecem uma variedade de informações experimentais, que possibilitam avaliar as duas principais contribuições energéticas da interação do cálcio aos ácidos nucleicos: a contribuição eletrostática devido ao poço de potencial do polieletrólito e a contribuição entrópica devida a alterações no solvente nas proximidades do polieletrólito devida à troca de íons monovalentes por bivalentes.

Os experimentos de ligação do cálcio ao sal de ácido desoxiribonucleico extraído de timo de bezerro (ct-DNA) na presença de eletrólito suporte 1:1 foram realizados a temperatura constante. As amostras contendo entre 0,2 e 0,5 mM de grupos fosfatos de DNA-sal de sódio (NaDNA), aproximadamente 60 μ M TMM e eletrólito suporte NaCl, foram preparadas conforme descrito no capítulo II.

Nos experimentos de titulação, alíquotas de CaCl_2 , a uma concentração molar conhecida, foram adicionadas a estas amostras, e foram registrados espectros de absorção óptica do TMM

entre 400 e 700 nm. A figura 1, mostra os espectros típicos a este tipo de experimentos.

Figura 1: Espectros de absorção óptica típicos, referentes a uma titulação contendo: $C_{\text{TMM}} = 60.1\mu\text{M}$, $C_p = 0.22\text{ mM}$, $\text{NaCl} = 10.0\text{mM}$. $T = 290\text{K}$

Como pode ser visto nesta figura, o pico de absorção óptica em 530 nm, característico do corante livre, desloca-se para 490 nm, característico do complexo cálcio-TMM, indicando a diminuição da espécie TMM livre e o conseqüente aumento da concentração do complexo cálcio-TMM.

Para todas as condições estudadas observou-se a presença do ponto isosbético em 510 nm, indicando a existência de somente duas espécies cromóforas na solução: TMM livre e TMM complexado. Esta última observação praticamente afasta a possibilidade de interação direta entre o corante e os ácidos nucléicos.

Os experimentos realizados consistem em medir, pelo método da razão entre absorções (descrito no capítulo II), a concentração de cálcio complexado ao corante; e conhecendo a constante de associação entre o cálcio e o TMM (K_{TMM}), na mesma condição físico-química (Apêndice I), e a concentração total de cálcio adicionada à solução, determina-se a concentração de cálcio ligada ao polímero:

$$C_2^b = C_2 + C_{TMM}^b + C_2^f \quad (1)$$

onde C_2 é a concentração total de cálcio na solução; C_2^b é a concentração de cálcio ligada ao polímero; C_{TMM}^b é a concentração de cálcio complexada ao corante e C_2^f a concentração de cálcio livre na solução.

Desta forma, dados os valores de C_2^b e C_2^f e conhecendo a concentração de grupos fosfatos C_p em solução, constrói-se um gráfico da razão entre θ_2 ($\theta_2 = C_2^b/C_p$) e a concentração de cálcio livre na solução C_2^f versus a fração de

grupos fosfato ocupados (θ_2). Este gráfico é conhecido como gráfico de Scatchard.

Sendo a interação entre ligante e polímero interpretada de acordo com a teoria de múltiplo equilíbrio, temos que para um dado conjunto de n grupos fosfato livres e consecutivos, a equação de equilíbrio pode ser escrita como:

logo a equação de ação das massas é:

$$\frac{[\text{Ligantes ligados}]}{[\text{Ligantes livres}]} = K_2 [\text{Grupos fosfato livres}] \quad (3)$$

sendo:

$$[\text{Ligantes ligados}] = [\text{Grupos fosfato ocupados}] = C_2^b$$

$$[\text{Ligantes livres}] = C_2^f$$

$$[\text{Grupos fosfato livres}] = [\text{Total de grupos fosfato}] - [\text{Grupos fosfato ocupados}]$$

$$[\text{Total de grupos fosfato}] = C_p$$

$$[\text{Grupos fosfato ocupados}] = n C_2^b$$

pois se 1 ligante ocupa n grupo fosfato, então C_2^b ligantes ligados ocupam $n C_2^b$ grupos fosfato. Logo a equação de ação das massas pode ser escrita como:

$$\frac{C_2^b}{C_2^f} = K_2 (C_p - n C_2^b) \quad (4)$$

Dividindo ambos os membros por C_p obtém-se a equação da ação das massas na formulação de Scatchard tradicional:

$$\frac{\theta_2}{C_2^f} = K_2 (1 - n\theta_2) \quad (5)$$

Da análise da equação (5), verifica-se que quando os dados experimentais são diagramados na forma de gráficos de Scatchard, é possível obter o valor da constante aparente de ligação para ligar o primeiro ligante ao polímero $K_2(0)$ e o número n de grupos fosfatos do polímero ocupados por um ligante, pois quando θ_2 tende a zero, θ_2/C_2^f tende a $K_2(0)$, e quando θ_2/C_2^f tende a zero, θ_2 tende a $1/n$.

Na figura 2, são apresentados na forma de diagramas de Scatchard os resultados obtidos da competição do cálcio com o sódio na ligação ao DNA, em três forças iônicas diferentes.

Estas isotermas apresentam um perfil côncavo, com concavidade voltada para cima. Este comportamento indica que a ligação do cálcio ao DNA é uma ligação anticooperativa, desde que a constante aparente de ligação do cálcio ao DNA diminui à medida em que os sítios no polímero são ocupados.

Apesar de ser uma ligação anticooperativa, os pontos correspondentes a $\theta_2 < 0,2$, estão razoavelmente alinhados, e isto permite a obtenção dos valores de $K_2(0)$ através de extrapolação para $\theta_2=0$.

Entretanto, a determinação do valor de $K_2(0)$ por extrapolação para $\theta_2 = 0$ não é precisa, pois nesta região a incerteza das medidas é grande.

Figura 2: Isotermas de Scatchard referentes à interação cálcio-NaDNA em três forças iônicas: 10, 20, 30 mM. T = 290K. As barras indicam a magnitude do erro em diversos pontos das curvas.

Uma forma alternativa, e mais precisa para se obter os valores de $K_2(0)$ e n é através de um gráfico $1/\theta_2 \times 1/C_2^f$, isto é, a forma inversa do gráfico de Scatchard.

Reescrevendo a equação (5) temos:

$$\frac{1}{\theta_2} = n + \frac{1}{K_2} \frac{1}{C_2^f} \quad (6)$$

onde se verifica que a intersecção com o eixo $(\theta_2)^{-1}$ fornece o valor n e a declividade da curva fornece o valor $(K_2)^{-1}$. A figura 3 obtida com os mesmos pontos experimentais mostrados na figura 2, mostra o gráfico de Scatchard inverso. A linearidade observada neste gráfico pode estar indicando que os sítios são independentes entre si, ou que o processo é moderadamente anticooperativo, ou ainda que o processo de exclusão estérica devido ao tamanho dos íons, não é significativo.

Com os valores da constante aparente de ligação entre o cálcio e o DNA ($K_2(0)$) a 290K assim determinados, estudaremos sua dependência com a força iônica (I).

A dependência linear entre $\ln(K_2(0))$ e $\ln(I)$, mostrada na figura 4, é prevista pela teoria de condensação de contraíons proposta por Manning (M2V), que prediz que a taxa de variação de $\ln(K_2(0))$ com o $\ln(I)$, isto é, $d[\ln(K_2(0))]/d[\ln(I)]$, é igual à valência do íon transferido da solução (livre) para a região de condensação em torno do DNA, isto é:

$$\frac{d\ln(K_2(0))}{d\ln(I)} = -2 \quad (7)$$

Figura 3: Forma inversa do gráfico de Scatchard, para a ligação cálcio-NaDNA na presença de 10mM NaCl. T = 290K. A linha representa o melhor ajuste linear aos dados experimentais.

A declividade das retas obtidas dos ajustes, por regressão linear, aos dados experimentais, a 290K e mostrada na figura 4, é igual a -1,98, em excelente concordância com o valor previsto pela teoria.

Com o objetivo de constatar a aplicabilidade da teoria a outras temperaturas, experimentos foram realizados a 287, 290, 298 e 303K. Estes resultados são mostrados na figura 5. Na Tabela I são mostrados os valores de $K_2(0)$ e $d[\ln(K_2(0))]/d[\ln(I)]$ nas diferentes forças iônicas e temperaturas.

TABELA I

Valores de $K_2(0)$ e $d[\ln(K_2(0))]/d[\ln(I)]$ para várias temperaturas e forças iônicas para o sistema DNA/Na/Ca sal suporte: NaCl.

TEMPERATURA (K)	287	290	298	303
FORÇA IÔNICA I (M)	$K_2(0)(M^{-1})$			
0,01	9700	7870	7050	6300
0,02	2400	2070	1750	1530
0,03	1080	950	770	670
$\frac{d[\ln(K_2(0))]}{d[\ln(I)]}$	-1.84	-1.98	-2.05	-1.87

Figura 4: Gráfico $\ln[K_2(0)]$ vs $\ln(I)$ para a ligação cálcio-NaDNA na presença de NaCl a $T = 290\text{K}$. A linha representa o ajuste linear aos dados experimentais.

Figura 5: Gráfico $\ln[K_2(0)]$ vs $\ln(I)$ para a ligação cálcio-NaDNA na presença de NaCl nas temperaturas de 290, 298, 303 K. As linhas representam o ajuste linear aos dados experimentais.

Os estudos realizados para obter a dependência da constante aparente de ligação do cálcio ao DNA na presença do eletrólito suporte NaCl, foram estendidos a outros 2 tipos de íons monovalentes: KCl e LiCl.

Para estes experimentos o contra-íon do DNA foi trocado por K^+ e Li^+ através de cromatografia de troca iônica; os experimentos de ligação com cálcio foram realizados na presença de KCl e LiCl respectivamente. As titulações na presença destes dois sais foram realizadas a 290K, nas mesmas condições descritas anteriormente.

A figura 6 mostra os gráficos de Scatchard para as três espécies iônicas na presença de 10 mM do respectivo sal.

Estas isotermas de ligação do cálcio ao DNA revelam que esta interação depende da espécie do cátion monovalente utilizado como eletrólito suporte. Isto é quantificado pelos valores das constantes aparentes de ligação do cálcio ao polímero. Observa-se ainda que este processo de ligação é anticooperativo para quaisquer destes eletrólitos.

Os dados mostrados na figura 6 são reapresentados na forma de um gráfico $1/\theta_2 \times 1/C_2^f$ na figura 7. As linhas cheias neste gráfico representam o melhor ajuste obtido por regressão fornecendo os valores de $K_2(0)$ e o número n de grupos fosfato do polímero ocupados por um íon Ca^{2+} , mostrados na Tabela II.

Figura 6: Isotermas de Scatchard referentes à interação do cálcio com três espécies de sal de DNA: KDNA, NaDNA e LiDNA, na presença de 10mM do respectivo sal. T= 290K.

Figura 7: Forma inversa do gráfico de Scatchard referente aos dados mostrados na figura 6. As linhas representam o ajuste linear aos dados experimentais.

TABELA II

Valores de $K_2(0)$ e n , referentes aos dados mostrados na figura 7, obtidos por regressão linear.

	I (M)	$K_2(0) (M^{-1})$	n
KDNA	0.01	8200	2.9
NaDNA	0.01	7800	3.0
LiDNA	0.01	3800	4.1

Verifica-se que a constante aparente de ligação do cálcio ao DNA é mais baixa na presença de lítio do que na presença de sódio ou potássio. Na presença de Na^+ , $K_2(0)$ é menor ou aproximadamente igual do que na presença de K^+ , isto é:

$$K_2^{Li}(0) < K_2^{Na}(0) \leq K_2^K(0),$$

Da mesma maneira, os resultados dos ajustes realizados mostram que o número de sítios de ligação, ou o número de grupos fosfatos do DNA, que interagem com um íon de cálcio dependem da espécie do contraíon:

$$n_{Li} = 4.15 > n_{Na} = 3.0 \approx n_K = 2.9$$

Estes resultados permitem estabelecer uma sequência de afinidade do contraíon monovalente (K, Na, Li) pelo polímero:

$$Li > Na \gtrsim K$$

pois o cálcio, na competição com os cátions monovalentes na interação ao DNA, realiza trabalho maior para deslocar o lítio do que para deslocar o sódio ou potássio.

A determinação experimental da afinidade de contraíons, é um aspecto importante no estudo de polieletrólitos. Muitos autores têm realizado experimentos de competição iônica em mistura de íons monovalentes, usando diferentes técnicas, sem mostrar completa concordância entre os resultados.

Ross e Scrugs (Ross, 1964), analisando a mobilidade eletroforética dos mesmos sais do DNA que os aqui estudados, encontraram a seguinte sequência de especificidade: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$. Por outro lado, Bleam e cols (Bleam, 1980), utilizando NMR para medir tempos de relaxação de ^{23}Na em experimentos de competição de ^{23}Na com diferentes sais, obtiveram a sequência $\text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$.

Anderson e Bauer (Anderson, 1978b), em um experimento muito elegante para medir diferenças no grau de torção causadas por diferentes sais suporte, em DNA circular fechado superhelicoidal, obtiveram a seguinte sequência: $\text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, que é a mesma ordem obtida por Strauss e cols (Strauss, 1967) no estudo do efeito Donnan para estes sistemas. Esta sequência foi a mesma obtida também por Harlon e cols (Harlon, 1975), no estudo da depressão da banda positiva de dicroísmo circular induzida por diferentes sais em DNA natural, descrita como transição B-C.

Excetuando-se os resultados obtidos por NMR, os resultados descritos na literatura mostram boa concordância com os resultados aqui descritos, principalmente no que tange à maior afinidade do polímero pelo lítio.

Comparando com os resultados de outros autores,

nossos experimentos fornecem ainda informações adicionais sobre dois aspectos importantes nesta competição: a estequiometria de ligação de cálcio ao DNA e o caráter anticooperativo desta ligação.

A anticooperatividade, observada nos gráficos da figura 6 pode ter origem na interação negativa de sítios de ligação (sítios idênticos mas dependentes), e/ou a duas contribuições entrópicas, cujas origens são:

a) impossibilidade estatística de ocupação de sítios vizinhos por impedimento estérico (exclusão de sítios),

b) a troca de íons monovalentes por bivalentes na região do poço de potencial nas vizinhanças do políon. Desta forma, a liberação de contraíons monovalentes para a solução, quando os íons bivalentes se "ligam" ao políon, cria um fluxo, de origem entrópica, que dificulta o fluxo de íons bivalentes para as proximidades do polieletrólito.

Os valores da constante aparente de ligação e do número de sítios no polímero ocupados pelo íon Ca^{2+} , obtidos através de regressão linear do gráfico $(\theta_2)^{-1} \times (C_2^f)^{-1}$ foram utilizados para testar dois modelos propostos na literatura para descrever a ligação anticooperativa, que são: o modelo de exclusão de sítios proposto por McGhee e Von Hippel (McGhee, 1974) e o modelo de Friedman Manning (Friedman, 1984).

O modelo de Friedman-Manning propõe um fator de correção estimado com base na teoria de condensação de contraíons, que deveria completar a descrição proposta por McGhee e Von Hippel.

Nossos testes mostraram que o modelo de McGhee e Von Hippel, descreve relativamente bem a anticooperatividade

observada na ligação de cálcio ao DNA e, de uma maneira geral o fator proposto por Friedman-Manning superestima a anticooperatividade, a exemplo do que ocorre quando se estuda a ligação de drogas cationicas com DNA (Ruggiero, 1987).

Uma outra tentativa foi feita no sentido de colocar o fator de correção proposta por Friedman-Manning na função de Scatchard (equação 5), que descreve a ligação a sítios idênticos e independentes (Cantor, 1979). Mesmo com esta expressão, a concavidade devida somente ao termo de Friedman-Manning é mais acentuada do que a observada experimentalmente.

A adição de um fator exponencial às funções de Scatchard e de McGhee e Von Hippel para descrever a interação entre os sítios de ligação foi realizada por nós. O ajuste destas equações modificadas aos dados experimentais forneceram uma energia de interação entre os sítios de aproximadamente 3kcal/mol no ajuste com a função de Scatchard e de 60cal/mol com a função de McGhee e Von Hippel. Em ambos os casos os resultados são de difícil compreensão pois os valores de energia de interação diferem duas ordens de grandeza.

Entretanto, o pequeno valor da energia de interação entre os sítios obtido com a utilização da McGhee e von Hippel modificada parece indicar que basta levar em consideração a exclusão estatística de sítios de ligação, para descrever a anticooperatividade observada.

Estes dados parecem evidenciar que a anticooperatividade observada é devida mais a um efeito das dimensões dos íons envolvidos do que propriamente à interação negativa entre os sítios ou ao efeito polieletrólítico ao menos como descrito por Friedman-Manning.

Esta hipótese acima é reforçada pelos valores dos números de sítios do políon ocupados pela ligação de um íon Ca^{2+} . Na presença de Li^+ , o cálcio ocupa quatro grupos fosfato ao passo que na presença de K^+ ele ocupa apenas três. Levando-se em conta que na ligação de um íon bivalente, dois íons monovalentes são liberados para a solução, os valores de n sugerem que cada íon lítio ocupe em média dois sítios no políon, ao passo que 2 íons potássio ou sódio ocupem aproximadamente três sítios.

Desta forma, o lítio estaria mais fortemente ligado ao DNA do que o potássio ou sódio, sendo assim mais difícil a ligação do Ca^{2+} na sua presença.

Na nossa argumentação acima, o termo ocupação merece esclarecimento adicional. No próximo item evidencia-se que a ligação dos íons Ca^{2+} ao DNA é territorial e não sítio específica.

Resultados obtidos por outros autores, indicam que Li^+ , K^+ , Na^+ também se ligam territorialmente aos ácidos nucléicos. Assim, os dois tipos de íons estariam livres para mover-se no poço de potencial do políon, dentro de uma região, que na teoria de Manning é chamada de volume da condensação, e que é também observada na resolução numérica da KPB. Desta forma, o termo ocupação não significa que os íons estejam fixos aos grupos do polímero, mas refere-se ao trânsito médio dos íons na região próxima ao polímero.

O estudo da dependência da constante aparente de ligação do cálcio ao DNA com a temperatura permite a obtenção de alguns parâmetros termodinâmicos.

Os valores de $K_2(0)$, apresentados na Tabela I (item 4.2), referentes a uma mesma força iônica e nas diferentes temperaturas, foram utilizados para construir um gráfico de $\ln(K_2(0))$ em função do inverso da temperatura (diagrama de van't Hoff). Este diagrama é mostrado na figura 8. A variação da entalpia de van't Hoff é dada por:

$$\Delta H_{\text{vH}} = - \frac{d [R \ln(K_2(0))]}{d (1/T)} \quad (8)$$

Cabe lembrar que o valor de entalpia assim obtido corresponde ao valor de entalpia do sistema: polímero + sal suporte + corante + cálcio. Neste valor de entalpia está incluída a variação de entalpia referente à interação do cálcio com o corante, sendo necessário desta forma retirá-la da contribuição total.

Na Tabela III são apresentados os valores de $\Delta H_{\text{vH}}^{\text{TMM}}$ referentes à interação TMM-Ca, $\Delta H_{\text{vH}}^{\text{Sis}}$ do sistema e o $\Delta H_{\text{vH}}^{\text{DNA}}$ para a interação NaDNA-Ca, onde $\Delta H_{\text{vH}}^{\text{TMM}}$ foi obtido da Tabela II do Apêndice 1, $\Delta H_{\text{vH}}^{\text{Sis}}$ foi obtido da declividade da curva mostrada na figura 8 e $\Delta H_{\text{vH}}^{\text{DNA}} = \Delta H_{\text{vH}}^{\text{Sis}} - \Delta H_{\text{vH}}^{\text{TMM}}$.

TABELA III

Variação de Entalpia (kcal/Mol) calculada através da declividade do diagrama de van't Hoff mostrado na figura 8 para o sistema DNA/Na/Ca em 10mM NaCl

$\Delta H_{\text{vH}}^{\text{Site}}$	$\Delta H_{\text{vH}}^{\text{TMM}}$	$\Delta H_{\text{vH}}^{\text{DNA}}$
-4.10	-3.85	-0.25

O valor relativamente modesto para ΔH_{vH} da interação DNA-Ca, evidencia que esta interação é do tipo territorial e não do tipo sítio-específica (Cantor, 1979).

Com o valor de ΔH_{vH} para o sistema DNA/Na/Ca e conhecendo o valor de $K_2(0)$ em várias temperaturas pode-se calcular a variação de energia livre (ΔG) e a variação de entropia (ΔS) para esta ligação, isto é:

$$\Delta G = -RT \ln(K_2(0))$$

e:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{\text{vH}}}{T} - \frac{\Delta G}{T}$$

Os valores de ΔG e ΔS em diferentes temperaturas são mostrados nas Tabelas IV-A e IV-B.

TABELA IV-A

Variação da Energia Livre (kcal/mol) com a temperatura para o sistema DNA/Na/Ca. Força iônica 10mM NaCl.

T = 287K	290K	298K	303K
-5.22	-5.1	-5.23	-5.25

TABELA IV-B

Variação da Entropia (cal/mol K) com a temperatura para o sistema DNA/Na/Ca. Força iônica 10mM NaCl.

T =	287K	290K	298K	303K
	18.0	17.6	17.4	17.2

Estes dados mostram que a complexação exotérmica ($\Delta H_{\text{vh}} < 0$) é acompanhada de um ganho entrópico $\Delta S > 0$. Podem contribuir para deste processo entrópico os seguintes fatores:

a) desidratação do íon bivalente: a ligação do íon bivalente ao grupo fosfato induz a perda da camada de hidratação do íon, fazendo uma ponte com o oxigênio do grupo fosfato.

b) desidratação do polímero: a ligação do íon cálcio ao polímero pode conduzir, semelhantemente, à desidratação do DNA.

c) redistribuição iônica: quando o cálcio se liga ao polímero, há uma redistribuição dos contraíons na solução, devido à liberação/remoção destes da região de condensação.

Figura 8: Diagrama de van't Hoff referentes à interação cálcio-NaDNA, na presença de 10mM NaCl. A linha representa o ajuste linear aos dados experimentais.

4.5. INFLUÊNCIA DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA NA SELETIVIDADE IÔNICA

A diferença essencial entre as conformações A e B de dupla hélice de polinucleotídeos reside no modo de empacotamento do açúcar, sendo C'_9 -endo para a família A e C'_2 -endo para a família B. Os diferentes modos de empacotamento dos açúcares implicam na variação na distância entre grupos fosfato adjacentes, variando de 5.9 Å para a conformação C'_9 -endo (A) a 7.0 Å para a conformação C'_2 -endo (B) (figura 9).

Além dos modos de empacotamento dos açúcares, o parâmetro mais importante que diferencia a conformação A da B, é o parâmetro, D, que descreve o deslocamento do par de bases em relação ao eixo da hélice.

Este parâmetro é que determina a profundidade e a largura dos sulcos da dupla hélice.

Na conformação A, o parâmetro D varia de +4.4 a +4.9 Å, indicando que os pares de bases estão afastados na direção da periferia da dupla hélice, resultando num sulco maior profundo e de abertura estreita e num sulco menor raso.

Na conformação B, o parâmetro D varia de -0.2 a -1.8 Å, indicando que os pares de bases estão compactados no interior da dupla hélice, determinando sulcos profundos e aberturas largas. Os valores de profundidade e largura dos sulcos da dupla hélice nas diferentes conformações (A e B), para diferentes sequências de bases estão resumidos na tabela V (Saenger, 1988).

Figura 9: Conformação A: figuras (a) e (b). Conformação B: figuras (c) e (d). As figuras (a) e (c) são vistas perpendiculares ao eixo da dupla hélice. As figuras (b) e (d) representam as hélices rodadas de 27° e 31.5° respectivamente, para poder visualizar a profundidade máxima dos sulcos.

TABELA V

POLÍMERO	CONF	h(Å)*	ξ**	SULCOS			
				LARGURA(Å)		PROFUNDIDADE(Å)	
				MAIOR	MENOR	MAIOR	MENOR
ct-DNA	B	3.4	4.2	14.0	10.0	8.0	9.5
p(dA-dT)	B	3.4	4.2	14.0	10.0	8.0	9.5
p(dG-dC)	B	3.4	4.2	14.0	10.0	8.0	9.5
p(I).p(C)	A	2.6	5.6	6.5	10.0	13.0	3.0

* distância entre pares de grupos fosfato (projeção sobre o eixo do polímero).

** em solução aquosa na temperatura de 298K.

A configuração em estruturas de dupla hélice apresentada pelos ácidos nucleicos leva a esconder grupos atômicos que, desta forma, não serão expostos à ação do solvente. Alder e Kim (Alder, 1978) calcularam a superfície total acessível ao solvente, nas conformações A e B do DNA para determinar quantitativamente a proporção de grupos escondidos e expostos. Os resultados por eles obtidos sugerem que na conformação B a formação de aglomerados de água em torno do grupo fosfato é mais propícia, pois o oxigênio do fosfato fica mais exposto ao solvente nesta configuração. Na conformação A o oxigênio fica mais escondido, ficando menos exposto à interação com o solvente.

Desta forma, o número de moléculas de água compondo a primeira camada de hidratação em torno de um nucleotídeo é: 10.5 para a conformação A e 19.3 para a conformação B, em boa concordância com as 20 moléculas de água determinadas para a primeira camada de hidratação do B-DNA (Texter, 1978).

Estas características estruturais apresentadas pelos ácidos nucléicos torna a utilização destes polieletrólitos importante no estudo da influência da estrutura secundária na interação com os íons da solução.

Estas características estruturais, principalmente a estabilidade da dupla hélice em solução, é determinante na escolha do tipo de ácido nucléico.

Certos tipos de ácidos nucléicos sintéticos são instáveis na temperatura ambiente e em baixa concentração de eletrólito suporte, como é o caso do poli(dA-dT).

Estas características dos ácidos nucléicos, levaram a escolher a temperatura de 290K para estudar a influência das diferentes conformações e a composição de bases nos processos de competição estudados, pois, nessa temperatura, os diferentes polímeros utilizados apresentam grande estabilidade conformacional.

Os resultados a seguir apresentados, foram obtidos utilizando os métodos experimentais e analíticos descritos em itens anteriores, e é feita uma divisão segundo o aspecto a ser analisado. No item 4.5.1. é analisada a influência da composição de bases e da espécie de eletrólito suporte na interação de polímeros na conformação B com os íons da solução, e no item 4.5.2 é analisada a influência da conformação e espécie de eletrólito suporte nessa interação.

Isotermas de ligação de Ca^{2+} a polinucleotídeos sintéticos na conformação B e com sequência de bases bem definidas poli(dA-dT).poli(dA-dT) e poli(dG-dC).poli(dG-dC) foram obtidas a 290K e na presença de 10 mM NaCl ou LiCl.

Na Tabela VI os valores da constante aparente de ligação do cálcio ($K_2(0)$) e o número n de grupos fosfato ocupados por cada cálcio, determinados para estes polineocleotídeos são apresentados paralelamente aos valores correspondentes ao DNA natural nas mesmas condições.

Os valores da constante de associação na presença do sódio parecem não depender fortemente da sequência de base. Entretanto, nota-se uma significativa queda na constante de ligação do cálcio ao poli(dA-dT) em relação ao DNA natural. Isto pode ser devido ao fato que o poli(dA-dT) é mais hidratado do que o ct-DNA e do que o poli(dG-dC) (Manning, 1978).

TABELA VI

Dados Referentes à interação cálcio-polímero na presença de 10mM de eletrólito suporte . T= 290K.

POLÍMERO (Conform.B)	Sal Suporte (10mM)	$K_2(0)(M^{-1})$	n
ct-DNA	Na	7800	3.2
	Li	3800	4.1
poli(dA-dT)	Na	5800	3.9
	Li	2900	4.5
poli(dG-dC)	Na	6800	2.9
	Li	4400	4.6

Isotermas semelhantes foram obtidas nas mesmas condições experimentais para o poliribonucleotídeo poli(rI).poli(rC) (RNA). Este polinucleotídeo encontra-se em solução, na conformação A.

Os dados obtidos com DNA e RNA (poli(rI).poli(rC)) na presença de 10 mM NaCl estão na figura 10, na forma de gráficos $1/\theta_2 \times 1/C_2^f$. Destes gráficos os valores de $K_2(0)$ e n foram obtidos e são apresentados na Tabela VII. Estes resultados mostram que quando se comparam as conformações A e B, na conformação A a interação cálcio-polímero é maior do que na conformação B, para ambos eletrólitos suportes. Este aumento ocorre na mesma direção do aumento na densidade linear de carga do polímero na conformação A em relação à conformação B ($\xi_A = 5.2$ e $\xi_B = 4.2$). Este comportamento indica que esta interação é principalmente de origem eletrostática.

TABELA VII
Dados referentes à interação cálcio-polímero na presença de 10mM de diferentes eletrólitos suporte. T= 290K.

POLÍMERO	Sal Suporte (0.01M)	$K_2(0) (M^{-1})$	n
ct-DNA	Na	7800	3.2
	Li	3800	4.1
poli(rI). poli(rC)	Na	13500	3.8
	Li	16000	4.2

Figura 10: Forma inversa do diagrama de Scatchard para a interação cálcio-NaDNA e cálcio-NaRNA, na presença de 10mM NaCl. T= 290K. As linhas representam o ajuste linear aos dados experimentais.

Observa-se que na conformação B, a presença do lítio diminui a constante de ligação do cálcio ao DNA em relação ao da constante observada na presença de sódio, ou seja: $K_2^{Li}(0) < K_2^{Na}(0)$. Na configuração A observa-se uma inversão neste comportamento, pois a constante de ligação do cálcio ao RNA na presença de lítio é menor que na presença de sódio: $K_2^{Li}(0) > K_2^{Na}(0)$.

Esta inversão detectada pode estar correlacionada com as características geométricas e de hidratação das duas conformações (resumidas na Tabela V), bem como com os raios dos íons hidratados do eletrólito suporte.

Uma correlação possível é que o lítio parece preferir a conformação que tenha sulcos maiores, conformação B, já que o trabalho realizado pelo Ca^{2+} para deslocar esta espécie é maior na conformação B que na conformação A ($K_2^{Li}(A) > K_2^{Li}(B)$).

Se tomarmos como referência ainda a constante de ligação de Ca^{2+} na presença de sódio na conformação B, observamos que o lítio está muito mais fortemente ligado à conformação B do que à conformação A.

Analisando-se as constantes de ligação de cálcio ao DNA e ao RNA, na presença dos dois contra-íons, nota-se que o Ca^{2+} liga-se com menos facilidade ao LiDNA do que ao NaDNA e com maior facilidade ao LiRNA do que ao NaRNA. Isto parece indicar que a ligação do lítio ao DNA é mais favorável que ao RNA.

Por outro lado, se analisarmos as constantes de ligação do Ca^{2+} tanto ao RNA quanto ao DNA, na presença de sódio, em comparação com os dados obtidos na presença de lítio, nota-se que é mais difícil deslocar o sódio do que o lítio quando o cálcio se liga ao RNA. A diferença entre as constantes de ligação

cálcio-polímero na presença de sódio entre as conformações A e B, indicam que o sódio é mais acessível à conformação A do que o lítio. Este comportamento não seria esperado se o único fator determinante desta interação contraíon-macromoléculas fosse de origem elétrica.

Entretanto, o fator de acessibilidade do contraíon ao políon mostra-se efetivo, dado que a comparação entre as constantes de associação medidas mostra que o lítio, que tem raio de hidratação maior do que o sódio, é mais sensível à dimensão do sulco.

Outra correlação possível é que o polímero menos hidratado (conformação A) deve impor maiores restrições ao contraíon mais hidratado (lítio).

4.6 INFLUÊNCIA DO COSOLVENTE NA SELETIVIDADE IÔNICA

A influência da água de hidratação tanto do polímero, constatada através das diferenças observadas na interação polímero-catião bivalente utilizando polímeros com conformações de hidratação diferente na presença de eletrólitos suporte com cátions de raios de hidratação diferenciados, motivou a realização de experimentos que pudessem avaliar a influência do solvente na interação dos ácidos nucleicos com os íons da solução.

Os experimentos de titulação foram realizados acrescentando-se nas amostras contendo os ácidos nucleicos preparadas como previamente descrito, diferentes concentrações molales de metanol ou sacarose. Durante as titulações realizadas na presença de eletrólito suporte na concentração de 10 mM de NaCl

ou LiCl, a temperatura manteve-se constante em 290K. As concentrações de cálcio livre na solução e complexado ao polímero, foram determinadas pelo método da razão.

Nestas determinações, foi utilizada a constante aparente de ligação do cálcio ao indicador metalocrômico, previamente determinada nas mesmas condições físico-química em que os experimentos com polímero foram realizados. Nestes experimentos constatou-se, através do espectro de absorção óptica, que o corante não interage diretamente com os solutos da solução (vide Apêndice I).

Para não introduzir mudanças conformacionais nos ácidos nucleicos, constatadas através de espectros de Dicroísmo Circular (CD), adicionou-se na solução 20% em peso de metanol ou sacarose, que correspondem a concentrações molales de 0,73 e 7.8 respectivamente.

Os valores da constante aparente de associação do cálcio ao polímero, $K_2(0)$, nas condições experimentais descritas foram obtidos a partir de gráficos de Scatchard e de gráficos de $1/\theta_2 \times 1/C_2^f$.

Os experimentos realizados com ácidos nucleicos na conformação A (poli(rI).poli(rC)) e na conformação B (ct-DNA) na presença de metanol e sacarose mostram que há uma alteração induzida na seletividade iônica devido à presença do cosolvente.

Na figura 11, na qual é mostrado um gráfico de Scatchard para o sistema DNA/Na/Ca, são comparados os dados referentes à ligação do cálcio ao NaDNA em solução aquosa, em solução com metanol e em solução com sacarose. Verificamos que o metanol produz um aumento de $K_2(0)$ da ordem de 50% em relação à água, e a sacarose aumenta $K_2(0)$ aproximadamente 25%, também em

relação à água.

Ao se analisar a conformação A, na forma de sal de sódio, verifica-se que o metanol produz um aumento da constante de ligação $K_2(0)$ ($\approx 40\%$) e a sacarose diminui $K_2(0)$ ($\approx 48\%$), em relação à água (figura 12).

Em um experimento análogo, realizado com os ácidos nucleicos nas configurações A e B na forma de sal de lítio, obteve-se os seguintes resultados:

Conformação B: Tanto o metanol como a sacarose não produzem mudanças significativas na constante de ligação (é da ordem de 8%), quando os dados são comparados com o resultado obtido para a solução aquosa.

Conformação A: O metanol produz um aumento de aproximadamente 37% em $K_2(0)$ e a sacarose não altera o valor de $K_2(0)$, quando os dados são comparados com o valor de $K_2(0)$ obtido para a solução aquosa.

Estes dados estão apresentados na Tabela VIII.

Figura 11: Isotermas de Scatchard referentes à interação cálcio-NaDNA na presença de 10mM NaCl e 20% em peso de metanol e sacarose. T= 290K.

Figura 12: Isotermas de Scatchard referentes à interação cálcio-NaRNA na presença de 10mM NaCl e 20% em peso de metanol e sacarose. T= 290K.

TABELA VIII

Valores de $K(0)_2$ para as configurações A e B em sal de lítio e sódio (10mM) na presença e ausência de cosolvente. T=290K.

Conformação	Sal suporte (0,01M)	$K_2(0) \text{ (M}^{-1}\text{)}$		
		Água	Metanol (20%)*	Sacarose (20%)**
B	Na	7800	11850	9780
B	Li	3800	4100	4110
A	Na	13500	18900	9100
A	Li	16000	21700	16100

* concentração molal = 0.73

** concentração molal = 7.8

Estas observações não permitem chegar a uma conclusão definitiva sobre o papel do cosolvente na seletividade iônica.

No próximo item apresentaremos resultados obtidos por simulação de modelos teóricos que poderiam explicar a alteração da constante aparente de ligação do cálcio ao B-DNA na presença de NaCl devido à alteração da constante dielétrica ϵ da solução.

A questão pendente é porque a constante dielétrica não produz o mesmo tipo de mudança sobre a constante de associação do cálcio ao DNA na presença do lítio, ou ainda nesta constante de associação ao RNA.

Estes dados mostram, portanto, que fatores como a geometria do políon e o tamanho do contraíon não podem ser desprezados.

ANÁLISE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS SEGUNDO O MODELO DE CONDENSAÇÃO DE CONTRAÍONS E O MODELO CELULAR.

Neste item os resultados experimentais obtidos serão confrontados com os dados obtidos das simulações realizadas com os modelos teóricos de condensação de contraíons de duas variáveis e o modelo celular, aos quais nos referimos como M2V e EPB respectivamente.

É importante salientar que nos modelos teóricos utilizados não há parâmetros ajustáveis. Os valores dos parâmetros utilizados nas simulações dos diferentes experimentos de competição, referem-se às condições experimentais e a dados estruturais do polímero, tais como: concentração de grupos fosfato (C_p), concentração de eletrólito suporte (C_1), concentração de CaCl_2 (C_2), temperatura, constante dielétrica do solvente, distância entre grupos fosfato (b) e diâmetro do polímero (R_p).

Na comparação dos dados teóricos (M2V e EPB) com os dados experimentais referentes ao NaDNA a 290K e sal suporte 10 mM, mostrados na forma de isotermas de Scatchard na figura 13a, verifica-se que a previsão feita pelo modelo M2V superestima a interação DNA-Cálcio. Uma análise melhor pode ser feita rerepresentando estes dados em gráficos da fração de cálcio "ligada" (θ_2) (figura 13b) e em gráficos da atividade aparente do íon bivalente (γ_2) (figura 13c) em função da fração total de cálcio na solução ($r_2 = C_2/C_p$).

Na figura 13b observa-se que o valor da fração de cálcio "ligada" (condensada) é superestimada pelo modelo M2V, e conseqüentemente, a concentração de íons no volume de condensação

V_b em torno do polímero, como é visto na figura 13c.

Isto pode estar indicando que o volume de condensação V_b utilizado neste modelo é subestimado, resultando em uma concentração de íons bivalentes condensados excessiva. A determinação do volume de condensação é um ponto obscuro desta teoria. V_b é determinado por:

$$V_b = 10^3 e (1 - \xi^{-1}) (Kb)^2 / C_1 \quad (9)$$

onde e é a base do logaritmo natural, ξ é o parâmetro de carga ($\xi = 4.16$ para B-DNA a 290K), K é o parâmetro de Debye e C_1 a concentração de sal suporte.

Verifica-se, assim, que V_b não depende da concentração de sal suporte C_1 , pois o produto $K^2 C_1^{-1}$ não depende de C_1 .

Com o objetivo de avaliar o efeito do volume de condensação neste modelo, foram geradas isotermas de ligação para diversos valores de V_b , até que se obtivesse uma isoterma coincidente com a gerada pelo modelo celular, que é a que melhor descreve os dados experimentais, como mostrado na figura 13d.

O valor do raio do volume de condensação obtido desta maneira, foi de $R_b \simeq 25 \text{ \AA}$, aproximadamente 8 $\text{\AA}$ maior que o raio que pode ser determinado a partir da equação (9). Por outro lado, o raio do volume de condensação, determinado pelo modelo celular, nas mesmas condições utilizadas no modelo M2V, é de $R_p \simeq 34 \text{ \AA}$.

Figura 13a: Isotermas de Scatchard referentes à interação cálcio-NaRNA na presença de 10mM NaCl, 290K. A linha cheia representa a previsão pelo modelo M2V e a linha tracejada a previsão pelo modelo EPB, com os seguintes parâmetros: $I = 10\text{mM}$, $R_p = 10\text{\AA}$, $b = 1.7\text{\AA}$ e $T = 290\text{K}$.

Figura 13b: Gráfico mostrando a variação da fração de sítios ocupados do polímero (θ_2) em função da razão entre a concentração total de cálcio e a concentração de grupos fosfato do polímero C_p (r_2). Mesmas condições da figura 13a.

Figura 13c: Gráfico da atividade aparente $\gamma_2 = C_2^f/C_2$ em função de r_2 . Mesmas condições da figura 13a.

Figura 13d: Gráfico mostrando as isotermas de Scatchard obtidas com o modelo M2V para três raios de condensação diferentes, modelo EPB e dados experimentais. Mesmas condições da figura 13a.

No modelo celular (EPB) o raio do volume de condensação, pode ser escolhido no ponto onde o potencial reduzido $y_1 = \frac{q\psi(r)}{kT}$ é igual a -1,0 : $y_1(R_0) = -1.0$, pois para valores de $y_1(r)$ maior que -1.0, a energia cinética kT é maior que a energia eletrostática $q\psi(r)$.

No modelo celular o valor do potencial reduzido em $r = 25 \text{ \AA}$ é aproximadamente igual a -1,8.

Nas figuras 13a, 13b e 13c, verifica-se que o modelo EPB descreve satisfatoriamente os dados experimentais, evidenciando a importância da contribuição eletrostática nesta interação.

Outro aspecto importante a ser observado nestes dois modelos, é a descrição correta feita em relação à dependência da constante aparente de ligação do cálcio ao DNA com a força iônica.

O modelo M2V prevê uma relação

$$\frac{d[\ln(K_2(0))]}{d[\ln(I)]} = -2.0$$

e o modelo EPB obtém-se:

$$\frac{d[\ln(K_2(0))]}{d[\ln(I)]} \simeq -1.86$$

sendo que os valores experimentais obtidos para esta relação é $\simeq -2.0$. Na figura 14 é mostrado o gráfico da variação do $\ln(K_2(0))$ em função do $\ln(I)$ obtida pelos 2 modelos e os valores experimentais para o NaDNA a 290K.

Figura 14: Gráfico mostrando a variação de $\ln[K_2(0)]$ em função de $\ln(I)$ para a interação cálcio-NaDNA e segundo as previsões dos modelos M2V e EPB. Condições experimentais: sal suporte NaCl, T = 290K.

A dependência da constante de ligação cálcio-polímero com a temperatura, mostrada na figura 15, indica que a variação de entalpia, descrita pelos dois modelos, é pequena, e próxima em módulo, do valor experimental obtido para o caso estudado (NaDNA em 10 mM NaCl). Este resultado é um forte indício que a interação polímero-cálcio é do tipo territorial, pois ambos os modelos pressupõem que a associação é deste tipo. Os valores de ΔH_{VH} obtidos com os dois modelos e o obtido experimentalmente, são mostrados na Tabela IX.

TABELA IX
Valores da Entalpia de van't Hoff (kcal/mol) obtidos experimentalmente e com os dois modelos teóricos (M2V e KPB) para o sistema DNA/Na/Ca em 10mM NaCl.

$\Delta H_{\text{VH}}^{\text{EXP}}$	$\Delta H_{\text{VH}}^{\text{M2V}}$	$\Delta H_{\text{VH}}^{\text{KPB}}$
-0.25	-0.15	+0.45

Na figura 16 é mostrada a dependência da constante aparente de ligação com o parâmetro de carga $\xi = \frac{q^2}{\epsilon kTb}$, onde este parâmetro descreve a densidade de carga do polímero sendo determinada principalmente pela distância das projeções dos grupos fosfato sobre o eixo do polímero (b). Os valores de $\xi = 3.2, 4.16$ e 5.2 utilizados nas simulações com os modelos M2V e KPB descrevem os parâmetros de carga de uma configuração em fita simples, conformação B e conformação A, respectivamente a 290K, sendo os respectivos valores de $b = 3.26, 1.7, 1.26 \text{ \AA}$. Os dados experimentais apresentados nesta figura correspondem aos valores por nós obtidos com ct-DNA, poli(rI)-poli(rC) e dados da literatura (Manzini, 1990) para poli(rC). Verifica-se que a

Figura 15: Gráfico de van't Hoff mostrando o ajuste aos dados experimentais (os mesmos dados mostrados na figura 8) obtidos com os modelos M2V e EPB.

Figura 16: Gráfico mostrando a dependência da constante aparente de ligação cálcio-polímeros com o parâmetro de carga ξ . Os valores de ξ referem-se à configuração de fita simples ($\xi = 3.26$); conformação B ($\xi = 4.16$) e conformação A ($\xi = 5.22$). $T = 290K$.

dependência entre $K_2(0)$ e ξ descrita pelo modelo KPB é próxima à observada experimentalmente, indicando novamente que a contribuição principal para a interação polímero-cálcio é de origem eletrostática, sendo que a contribuição da componente entrópica, incorporada no modelo M2V é superestimada neste modelo.

Outro dado que corrobora esta observação pode ser visto na figura 17, onde é mostrada a dependência entre $K_2(0)$ e a constante dielétrica da solução, determinada experimentalmente ao se utilizar cosolvente na solução.

Observa-se nesta figura que o modelo M2V descreve um comportamento inverso ao observado em experimentos de ligação cálcio-Na. Por outro lado, o modelo celular parece descrever melhor os dados experimentais.

No entanto, a dependência de $K_2(0)$ com ϵ , descrita pelo modelo celular não é capaz de explicar porque a interação LiDNA-Ca é insensível à variação da constante dielétrica, porque a interação NaRNA-Ca é mais intensa na presença de metanol e menos intensa na presença de sacarose, e porque na presença de lítio a sacarose não tem nenhum efeito na ligação LiRNA-Ca em relação à água.

As variações observadas na constante de ligação de íons a políons determinadas pela presença de solutos neutros em solução são frequentemente atribuída na literatura, às mudanças ocorridas no valor da constante dielétrica na solução. A diversidade apresentada na Tabela VIII mostra claramente que é necessário buscar outros fatores que possam descrever o efeito observado.

Figura 17: Gráfico mostrando a dependência entre $K_2(0)$ e a constante dielétrica ϵ da solução, segundo previsão feita pelos modelos M2V e EPB. Os dados experimentais referem-se à interação cálcio-NaDNA na presença de 10mM NaCl a 290K e 20% de metanol ($\epsilon=71$) ou 20% de sacarose ($\epsilon=76$) ou na ausência de cosolvente ($\epsilon=82$).

Os resultados apresentados e discutidos neste item mostram que o modelo celular fornece uma descrição muito satisfatória do comportamento destes biopolímeros em solução, e o modelo de condensação de contrai ons atribui um peso relativo muito grande às interações de origem não eletrostáticas, resultando numa descrição insatisfatória para o sistema composto por estes biopolímeros.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

O estudo da competição de íons cálcio com sódio, potássio, lítio, em sua ligação com ácidos nucléicos natural e sintéticos mostraram que a substituição do íon monovalente pelo cálcio apresenta uma ordem seletiva, sendo mais fácil deslocar o sódio e o potássio das vizinhanças da conformação B (DNAs) do que o lítio. Uma ordem inversa foi observada com a conformação A (RNA).

Outra distinção detectada foi que o número de grupos fosfato disponíveis para ligação do cálcio também é uma função da espécie do contra-íon monovalente e segue a mesma ordem de seletividade observada nas constantes de ligação determinadas.

Estes dados permitiram correlacionar fatores ligados à geometria do macro-íon com o tamanho do contra-íon hidratado, levando à constatação de que fatores esteroquímicos também são responsáveis pela determinação do estado de eletroneutralização do polieletrólito em solução iônica.

Foi possível ainda correlacionar a afinidade observada com os estados de hidratação dos íons monovalentes e os do macro-íon. Ou seja, o lítio, que dentre os estudados é o mais hidratado foi o que apresentou maior afinidade pela conformação B, ao passo que o sódio e o potássio, menos hidratados, apresentaram maior afinidade pela conformação A.

Entre os modelos teóricos analisados: condensação de contra-íons (M2V) e celular (EPB), este último se mostrou mais adequado à descrição de parte dos dados experimentais, especialmente no que concerne às variações da constante de ligação do cálcio aos ácidos nucléicos com a força iônica, temperatura e densidade linear de carga. Entretanto, ambos os modelos foram incapazes de descrever a seletividade iônica observada. Muito provavelmente, estes modelos falham por não incluir em sua

formulação parâmetros que descrevam as dimensões dos íons e os detalhes estruturais do polieletrólito.

Detectou-se, também, que o modelo de condensação de contraíons M2V falha na estimativa da extensão da região de condensação, conduzindo a superestimar a concentração de íons bivalentes ligados ao polieletrólito e, conseqüentemente, a superestimar a energia desta ligação. A estequiometria determinada para a conformação B na presença dos diferentes contraíons indica que o lítio ocuparia um volume de condensação maior do que o ocupado pelo sódio ou pelo potássio.

Finalmente, os experimentos realizados na presença de cosolventes indicaram que a variação da constante dielétrica por si só não é capaz de explicar as mudanças observadas nas constantes de ligação do cálcio aos ácidos nucleicos induzidas por cosolvente. Outros fatores necessariamente devem ser explorados a fim de explicar os efeitos observados na interação cálcio-polímeros na presença de cosolventes.

APÊNDICE 1

1. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE APARENTE DE LIGAÇÃO DO CÁLCIO AO TMM (K_{TMM})

Para monitorar o cálcio na solução contendo os ácidos nucleicos, foram medidas as concentrações de cálcio ligado ao corante e determinadas as concentrações de cálcio livre na solução. Com estes valores, e conhecendo-se a concentração total de cálcio na solução, é possível determinar a concentração de cálcio "ligado" ao polímero.

Para determinar a concentração de cálcio livre é necessário conhecer a constante aparente de ligação entre o cálcio e o TMM (K_{TMM}). Observamos que esta constante aparente de ligação do cálcio ao TMM depende das diferentes condições físico-químicas nas quais se trabalha (força iônica, espécie de sal suporte, temperatura, cosolvente).

Lembramos que na determinação de K_{TMM} foi utilizado o método da razão, descrito no Capítulo II.

Nos itens apresentados a seguir, são mostrados os resultados obtidos na determinação da constante aparente de ligação do cálcio ao TMM nas mesmas situações físico-químicas utilizadas no estudo realizado com os ácidos nucleicos.

1.1 FORÇA IÔNICA E ESPÉCIE IÔNICA

Os valores da constante aparente de ligação do cálcio ao TMM, obtidos com o método da razão em diferentes forças iônicas (I), foram determinados titulando-se com cálcio uma

solução aquosa $\approx 60 \mu\text{M}$ TMM. As diferentes forças iônicas das amostras foram ajustadas ao valor desejado adicionando-se à solução volumes adequados de concentrações conhecidas de XCl ($\text{X} = \text{Na}^+, \text{Li}^+, \text{K}^+$). Para não alterar significativamente a força iônica da solução, tomou-se cuidado para que a concentração máxima de cálcio na solução não ultrapassasse a concentração de $0,3\text{mM}$ durante a titulação. Com isto a força iônica da solução sofre, no máximo, acréscimo de aproximadamente 1mM , valor tolerado no tipo de medida realizada, pois a K_{TMM} não sofre alteração significativa quando a força iônica apresenta variações desta ordem de grandeza.

Os valores de K_{TMM} obtidos para cada força iônica e para cada espécie de sal suporte, resultado de 7 a 8 adições de Ca^{++} , em média, apresentaram flutuação da ordem de 3%.

A figura 1 mostra os gráficos de $\ln(K_{\text{TMM}}) \times \ln(I)$ para NaCl , KCl e LiCl . As retas interpolando os pontos experimentais representam o melhor ajuste determinado por regressão linear.

Nesta figura verifica-se que a variação de K_{TMM} com a força iônica é diferente para os três sais suporte. A diminuição de K_{TMM} observada com os três tipos de sais suporte utilizados indica que é necessário dispendir mais energia para associar o cálcio ao corante à medida em que a força iônica aumenta. Isto é devido ao acréscimo da blindagem eletrostática.

Na Tabela I são mostradas as expressões, obtidas por regressão linear, que relacionam a variação da K_{TMM} com a concentração molar de sal suporte para as três espécies iônicas a 290K .

Nos experimentos de competição de cálcio com ácidos nucleicos serão utilizados os valores de K_{TMM} obtidos com o auxílio destas expressões, pois nem sempre é possível ajustar o

Figura 1: Gráfico $\ln(K_{TMM})$ vs $\ln(I)$ obtido para a interação cálcio-TMM em sal suporte XCl, a 290K, onde X = Li, Na, K. As retas representam o ajuste linear aos dados experimentais.

TABELA I
Relações entre a concentração de sal suporte
XCl (M) e K_{TMM} para X = K, Na, Li. T=290K

KCl	$ln(K_{TMM}) = -0.178 \ln([K]) + 5.76$
NaCl	$ln(K_{TMM}) = -0.167 \ln([Na]) + 5.71$
LiCl	$ln(K_{TMM}) = -0.258 \ln([Li]) + 5.15$

valor da força iônica aos mesmos valores nos quais foi determinada a constante aparente de ligação do cálcio ao TMM (K_{TMM}).

1.2 TEMPERATURA

Ao se estudar a termodinâmica da interação de cálcio com o ct-DNA no sistema ct-DNA/Na/Ca/água, utilizando o método de medidas proposto neste trabalho, é necessário conhecer o valor da entalpia de van't Hoff nas diferentes forças iônicas utilizadas, sendo, portanto, necessário determinar a dependência de K_{TMM} em relação à temperatura.

A variação da constante de ligação K_{TMM} com a temperatura permitiu estimar a entalpia de van't Hoff (ΔH_{vH}) para a interação do TMM com o cálcio, que pode ser obtida a partir da declividade da curva $ln(K_{TMM}) \times 1/T$ (gráfico de van't Hoff):

$$\Delta H_{vH} = - \frac{d [R ln(K_{TMM})]}{d(1/T)}$$

onde R = 1.98 cal/mol.

Os diagramas van't Hoff obtidos para a ligação do cálcio ao TMM na presença de NaCl e em diferentes forças iônicas estão mostradas na figura 2.

O método utilizado e os cuidados tomados na determinação dos valores de K_{TMM} para cada temperatura e força iônica foram os mesmos descritos no item anterior (4.2.1).

Na Tabela II são mostrados os valores de ΔH_{vH} determinados por regressão linear a diferentes valores de força iônica.

TABELA II
Variação da entalpia de van't Hoff para a interação cálcio-TMM com a concentração de sal suporte NaCl.

I (M)	ΔH_{vH} (Kcal/mol)
0,01	-3.85
0,02	-3.80
0,03	-3.65
0,04	-3.26

Figura 2: Dependência de K_{TMM} com o inverso da temperatura. Diagrama de van't Hoff. Várias forças iônicas. Sal suporte: NaCl.

Sendo um dos objetivos deste trabalho estudar a influência de cosolventes (soluto + água) na seletividade iônica de ácidos nucleicos, foi necessário avaliar sua influência sobre a constante aparente de ligação do cálcio ao TMM.

Inicialmente foi estudada a influência de metanol, etanol, etileno glicol e sacarose no valor de K_{TMM} , na ausência de eletrólitos suportes.

Nestes experimentos, realizados à temperatura de 290K, manteve-se o cuidado de não ultrapassar, durante as titulações, a força iônica de 1,0 mM. Os valores de K_{TMM} obtidos para cada tipo de cosolvente em cada concentração molal do soluto na solução, foram resultado da média simples dos valores de K_{TMM} obtidos em cada titulação da solução com cálcio, sendo em média realizadas 7 adições de cálcio em cada titulação.

Durante as titulações de cálcio ao TMM foi observado um ponto isosbéstico em 510 nm, tanto na presença, quanto na ausência dos diferentes solutos estudados. Este resultado indica que as espécies envolvidas no equilíbrio químico considerado são as mesmas, tanto no meio simples quanto no meio misto (soluto + água), indicando assim a inexistência de interação direta entre soluto-corante.

A figura 3 mostra os gráficos de $\ln(K_{TMM})$ determinados em função da concentração molal dos diferentes solutos estudados. Como pode ser observado, o $\ln(K_{TMM})$ mantém uma relação linear para todos os solutos e em toda a faixa de valores da concentração molal investigada. As retas representam o melhor ajuste linear obtido, e as expressões que relacionam a K_{TMM} com a

concentração molal de cada tipo de cosolvente são mostradas na Tabela III-A. Estas expressões serão utilizadas, no estudo de ácidos nucleicos.

TABELA III-A

Dependência entre K_{TMM} e a molalidade X do cosolvente na ausência de sal suporte. T =290K

Metanol:	$K_{TMM} = 863 \exp (0.172 X)$
Etanol:	$K_{TMM} = 899 \exp (0.195 X)$
Etileno Glicol:	$K_{TMM} = 898 \exp (0.103 X)$
Sacarose:	$K_{TMM} = 887 \exp (0.306 X)$

TABELA III-B

Dependênciaentre K_{TMM} e amolalidade Xdo cosolvente na presença de 10mM desalsuporte NaCle LiCl. T = 290K.

COSOLVENTE (Molal)	SAL SUPORTE	
	NaCl (0,01M)	LiCl (0,01M)
METANOL	$K_{TMM} = 666 \exp(0.114 X)$	$K_{TMM} = 575 \exp(0.141 X)$
SACAROSE	$K_{TMM} = 642 \exp(0.156 X)$	$K_{TMM} = 550 \exp(0.717 X)$

Analizando as taxas de variação da K_{TMM} com a concentração de cosolvente sem eletrólito suporte, dada pelos coeficientes das retas obtidas por regressão linear ajustadas aos

Figura 3: Dependência de K_{TMM} com o tipo e a fração molal de cosolvente. Força iônica nula $T=290K$.

dados experimentais, mostrados na Tabela III-B, verificamos que a sacarose produz taxa de variação maior que todos os outros cosolventes estudados. A ordem de eficiência mostra ser uma função do peso molecular do cosolvente (ou da complexidade da cadeia).

Tendo em vista que a possibilidade de interação direta soluto-corante foi descartada acima, resta a possibilidade de interação direta soluto-cálcio. Esta, entretanto, também pode ser eliminada, pois, se este fosse o caso, deveríamos observar diminuição e não aumento da constante de associação corante-cálcio.

A outra situação investigada envolve a determinação de K_{TMM} na presença de solutos e NaCl e LiCl como eletrólitos suporte.

A dependência de K_{TMM} com a concentração molal de sacarose na ausência de eletrólito suporte, na presença de 10mM de NaCl e de 10mM de LiCl é mostrada na figura 4a. Estas dependências com a concentração de metanol são mostradas na figura 4b.

Nestas figuras observamos que:

a) a presença de eletrólito suporte diminui a interação entre o Ca^{++} e o TMM;

b) Na faixa de concentração estudada, a mesma a ser utilizada no estudo com ácido nucléico, observa-se uma boa linearidade entre $\ln K_{TMM}$ e a concentração de solutos na presença e na ausência de eletrólito suporte na concentração de 10 mM;

c) A taxa de variação muda na presença de eletrólito suporte:

Para a sacarose $\frac{d[\ln(K_{TMM})]}{d [X]}$ é 50% menor na presença de 10 mM de NaCl e 100% maior na presença de 10 mM de LiCl que na ausência de eletrólito suporte;

Para metanol $\frac{d [\ln(K_{TMM})]}{d [X]}$ é 66% menor na presença de 10 mM de NaCl e 82% menor na presença de 10 mM de LiCl que na ausência de eletrólito suporte.

Estes dados são apresentados na Tabela III-C.

TABELAIII-C

Taxa de variação da K_{TMM} com a concentração molal X de cosolvente, na presença de 10mM de NaCl ou LiCl e na ausência de sal suporte. T=290K.

COSOLVENTE	$d[\ln(K_{TMM})]/d[X]$		
	sem sal suporte	0,01M NaCl	0,01M LiCl
METANOL	0.172	0.114	0.141
SACAROSE	0.306	0.156	0.717

Figura 4a: Dependência de K_{TMM} com a concentração molal de Metanol. Concentração de sal suporte: 0 e 10 mM, NaCl ou LiCl. T = 290K.

Figura 4b: Dependência de K_{TMM} com a concentração molal de Sacarose. Concentração de sal suporte: 0 e 10 mM, NaCl ou LiCl. $T = 290K$.

BIBLIOGRAFIA

- ALDER, C.J. & KIM, S.H. *J. Mol. Biol.*, 132, 411-434 (1979).
- ANDERSON, C.F., RECORD Jr., M.T. & HART, P.A. *Biophys. Chem.*, 7, 301-316 (1978a).
- ANDERSON, P. & BAUER, W. *Biochemistry*, 17, 594-607 (1978b).
- ANDERSON, C.F. & RECORD Jr., M.T. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 33, 191-222 (1982).
- ANDERSON, C.F. and RECORD Jr., M.T. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19, 423-465 (1990).
- ARNOTT, S., FULLER, W., HODGSON, A. and PRUTTON, I. *Nature*, 201, 1160-1163 (1964).
- ARNOTT, S., HUKINS, D.W.L. and DOVER, S.D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1392-1399 (1972).
- ASTBURY, W.T. *Symp. Soc. Exp. Biol. (Nuclei Acids)* 1, 66-67 (1947).
- AVERY, O.T., MACLEOD, C.M. and MC CARTY, M. *J. Exp. Med.* 79, 137 (1944).
- BAILEY, P.B., SHAMPINE, I.F. & WOLTMAN, P.E. *Nonlinear Two Point Boundary Value Problem*. New York, Academic Press (1968).
- BLEAM, M.L., ANDERSON, C.K. & RECORD Jr., M.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3085-3094 (1980).
- BRAULIN, W. H., DRAKENBERG, T. & NORDENSKIOLD, L. *Biopolymers*, 26, 1047-1062 (1987).
- CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P. *Biophysical Chemistry*. New York, W. H. Freeman & Co. (1979).
- CHAMBELIN, M.J. and PATTERSON, D.L. *J. Mol. Biol.* 12, 410-428 (1965).
- CRICK, F.H.C. and WATSON, J.D. *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A.* 223, 80-96 (1954).
- DAVIDSON, J.N. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons. (1957).
- DEVARAJAN, S., PATTABIRAMAN, N. and SHAFFER, R.H. *Biopolymers*, 27, 187-200 (1988).
- FRIEDMAN, R.A.G & MANNING, G.S. *Biopolymers*, 23, 2671-2714 (1984).
- GRANOT, J. *Biopolymers*, 22, 1831-1841 (1983).
- GULLAND, J.M., *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 12, 95-103 (1947).

- HANLON, S., BRUDNO, S., WU, T.T. & WOLF, B. *Biochemistry*, 14, 1648-1660 (1975).
- JAYARAM, B., SWAMINATHAN, S., BEVERIDGE, D.L., SHARP, K. and HONIG, B. *Macromolecules*, 23, 3156-3165 (1990).
- KATCHASLKY, A. *Pure Appl.Chem.*, 26, 327-373 (1971).
- KLEIN, B.K., ANDERSON, C.F., RECORD Jr., M.T. *Biopolymers*, 20, 2263-2280 (1981).
- LE BRET, M. & ZIMM, B.H. *Biopolymers*, 23, 271-285 (1984).
- LEWIN, S. *J. Theoret. Biol.*, 17, 181-212 (1967).
- LINDSTROM, F. and DIEHL, H. *Anal. Chem.*, 31, 1123-1127 (1960).
- MANNING, G.S. *J. Chem. Phys.*, 51, 924-933 (1969).
- MANNING, G.S. *Polyelectrolytes*, Ed. E.Selegny, D.Reidel Publishing Company (1974).
- MANNING, G.S. *Quant. Rev. Biophys.*, 11, 179-246 (1978).
- MANNING, G.S. *Acc. Chem. Res.*, 12, 443-449 (1979).
- MANZINI, G., XODO, L.E., FOGOLARI, F. and QUADRIFOGLIO, F. *Biopolymers*, 30, 325-333 (1990).
- McGHEE, J. D. & Von HIPPEL, P.H. *J.Mol. Biol.*, 86, 469-489 (1974).
- OHNISHI, S. T. *Anal. Biochem.*, 85, 165-179 (1978).
- ONSAGER, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 627 (1949).
- OOSAWA, F. *Polyelectrolytes*. New York, Ed. Marcel Dekker (1971).
- PEZZANO, H. and PODO, F. *Chem.Rev.*, 80, 365-401 (1980).
- POLAND, D. & SHERAGA, H. *Helix-Coil Transition in Biopolymers*. Academic Press (1970).
- PRESS, W.H.; FLANNERY, B.P., TEUKOLSKY, S.A. & VETTERLING, W.T. *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*. New York, Cambridge University Press (1987).
- RECORD Jr., M.T., ANDERSON, C.F., MILLS, P. MOSSING, M. and ROE, J. *Adv. Biophys.*, 20, 109-135 (1985).
- ROSS, P.D. & SCRUGGS, R.L. *Biopolymers*, 2, 231(1964).
- RUGGIERO, J., MANZINI, G. & QUADRIFOGLIO, F. *Biopolymers*, 26, 1975-1979 (1987).
- SAENGER, W. *Principles of Nucleic Acids Structures*. 2 ed. New York, Springer Verlag (1988).
- SAENGER, W. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 16, 93-114 (1987).
- SCATCHARD, G. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 51, 660-672 (1949).

- SCHAEFER, M. and FROEMMEL, C. *J. Mol. Biol.*, 216, 1045-1066 (1990).
- STRAUSS, U.P., HELFGOTT, C. & PINK, H. *J. Phys. Chem.*, 71, 2550-2575 (1967).
- SISSOEFF, I.; GRISVARD, J. and GUILLE, E. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 31, 165-199 (1976).
- TEXTER, J. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 33, 83-97 (1978).
- WATSON, J.D. *The Double Helix*. Weidenfeld & Nicholson, London (1968).
- WATSON, J.D. and CRICK, F.H.C., *Nature*, 171, 737-738 (1953).
- WATTS, H.A. & SHAMPINE, L.F., Sandia Laboratories, Albuquerque-New Mexico, USA (1986).
- WESTHOF, E. - *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*; 17, 125-144 (1988).
- WILKINS, M.H.F., STOKES, A.R. and WILSON, H.R. *Nature*, 172, 759-765 (1953).
- ZAMENHOF, S., BRAWERMANN, G. and CHARGAFF, E. *Biochim. Biophys. Acta*, 9, 402-405 (1952).