

6 Materiais e métodos

Os BCD foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciências da Ucrânia na forma de sais de cloreto [*Corante*⁺⁺*Cl*₂⁻]. As moléculas de DNA usadas nos experimentos são de timo de bezerro (*Calf Thymus*), e foram obtidas da empresa Worthington Biochemical Co. (USA).

Neste trabalho foram estudados quatro BCD com ângulos de 180°, 150°, 120° e 90° entre os cromóforos, com peso molecular de 653 g/mol. Todos os experimentos foram realizados em pH = 6,9 utilizando solução de tampão fosfato (PBS) preparada com 5 mM NaH₂PO₄ + 2.5 mM Na₂HPO₄ em água purificada com o sistema Milli-Q. As soluções estoque foram preparadas em etanol com altas concentrações, sendo diluídas em PPB com quantidade de etanol na solução final menor do que 5%.

As soluções estoque de DNA foram preparadas dissolvendo 10 mg de DNA em 1 ml de PPB, sendo feita a preparação com um dia de antecedência ao experimento e armazenadas na temperatura de 4°C. As concentrações de DNA foram determinadas pelo método de absorção ótica através do coeficiente de absorção molar (ϵ) do DNA: $\epsilon^{260\text{nm}} = 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (determinado em pares de bases) [36]. As concentrações dos BCD foram obtidas utilizando o mesmo método, sendo os valores, dos coeficientes de absorção molar, determinados neste trabalho.

A determinação dos ϵ para quatro BCD foi feita utilizando solução estoque preparada em ácido fórmico e posteriormente diluída em PPB mantendo o pH = 6,9. E com solução estoque preparada em etanol e diluição em etanol e água. A concentração para a determinação do ϵ foi extremamente baixa (10^{-7} M) e conseqüentemente a absorção ótica *A* também foi muito baixa na cubeta com caminho ótico de 1 cm (*A* < 0,02), assim utilizou-se uma cubeta com caminho ótico igual a 5cm.

Os experimentos com absorção ótica foram avaliados para valores de densidades óticas numa faixa $2,0 \geq A \geq 0,2$. Para os experimentos de fluorescência, espalhamento da luz por ressonância e dicroísmo circular as densidades óticas tomaram valores entre 0,5 e 0,05.

O rendimento quântico de fluorescência foi determinado usando como padrão a porfirina *meso*-tetrakis(4-*N*-methyl-pyridiniumyl) na forma de base livre em solução aquosa à pH = 6,8 ($\phi_{\text{fluo}} = (5,0 \pm 0,1)\%$ [37]). A absorção ótica da solução do corante no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{ex}} = 584 \text{ nm}$) foi ≤ 0.1 .

Foram avaliadas as características espectrais dos BCD dependentes da presença de NaCl, DNA e DNA com NaCl. Na ausência de DNA a concentração de NaCl variou de 7,5 mM até 3,5 M, na presença de DNA foram feitos experimentos com duas concentrações fixas de NaCl: 7,5mM e 0,2 M. O NaCl foi usado na forma de sal, sendo adicionado diretamente na cubeta. A adição de DNA foi feita variando a concentração do DNA entre 10^{-7}M até 10^{-3}M , com a adição da solução de DNA diretamente na cubeta. Todos estes experimentos foram feitos utilizando cubeta com caminho ótico de 1 cm.

Os espectros de absorção ótica foram monitorados com o espectrofotômetro da marca Beckman DU640. Os experimentos de CD foram realizados com o espectropolarímetro da marca Jasco J-810, e os espectros de fluorescência e espalhamento da luz por ressonância foram realizados com o aparelho da marca Hitachi FL 4500 com o ângulo entre os feixes de emissão e de excitação 90° . As análises dos espectros foram feitas com o uso do programa comercial Origin® e pelo programa desenvolvido pelo autor (ver apêndice).

Todos os experimentos foram feitos na temperatura de 25°C.