
7.1e Análise dos BCD na presença de DNA

Os experimentos da interação dos BCD com o DNA foram realizados partindo da solução pura de BCD com a adição gradativa de solução de DNA, até os espectros atingirem um ponto de saturação onde não ocorreram mais mudanças. Os espectros para cada um dos BCD foram divididos em dois gráficos seguindo a saturação das mudanças para determinada concentração de DNA (Gráficos de 41 a 56).

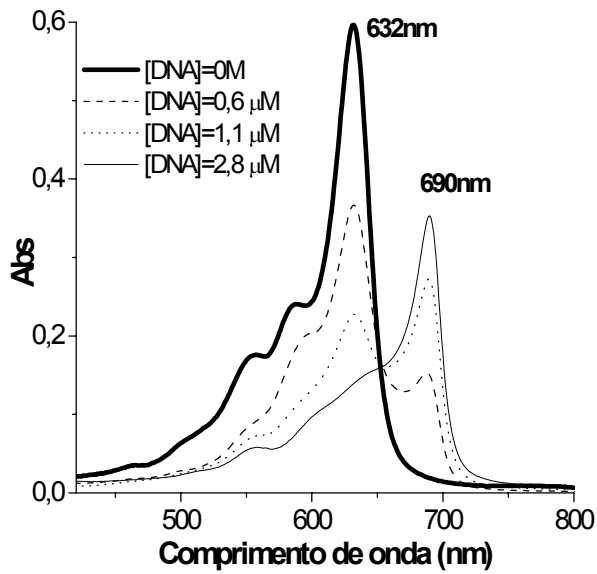


Gráfico 41 – Primeira fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(180°)] = 4,51 μM

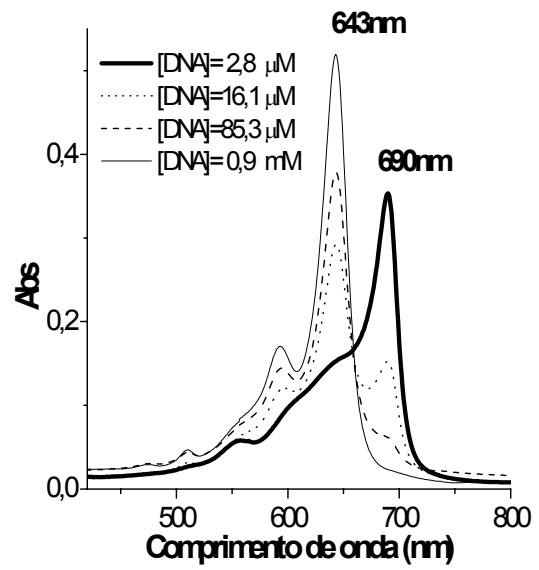


Gráfico 42 - Segunda fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(180°)] = 4,51 μM

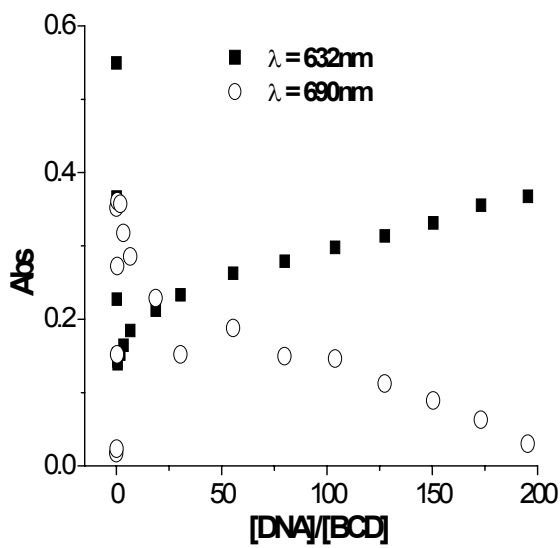


Gráfico 43 – Mudanças de absorção nas bandas do [BCD(180°)] = 4,51 μM em função do [DNA]

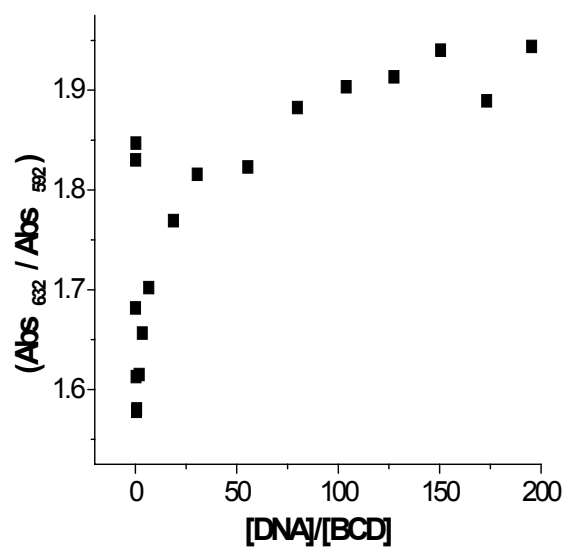


Gráfico 44 – Razão de absorção óptica das bandas para o [BCD(180°)] = 4,51 μM em função do [DNA]

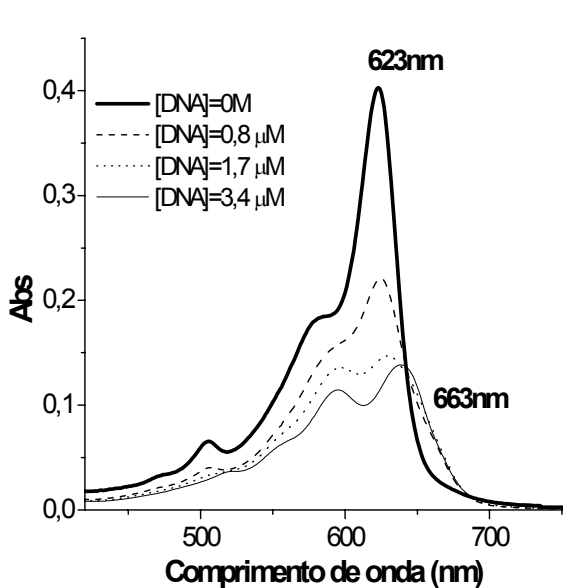


Gráfico 45 – Primeira fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(150°)] = 2,90 μM

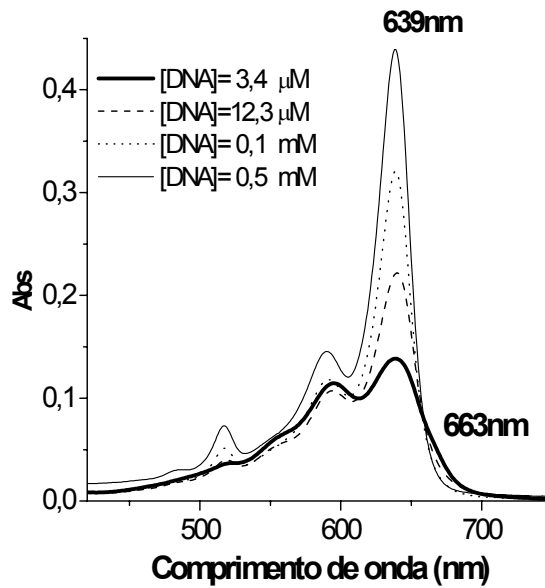


Gráfico 46 - Segunda fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(150°)] = 2,90 μM

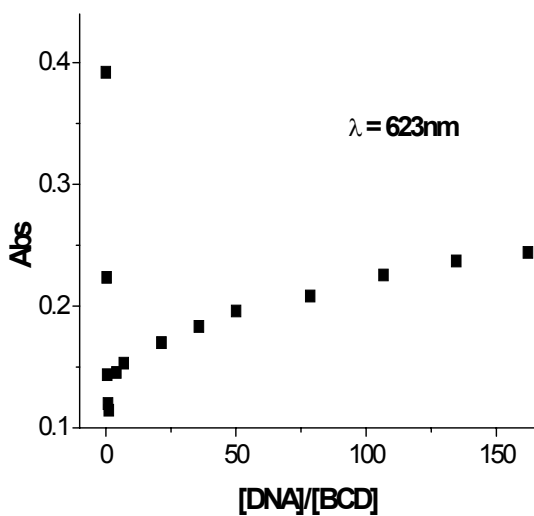


Gráfico 47 – Mudanças de absorção nas bandas do [BCD(150°)] = 2,90 μM em função do [DNA].

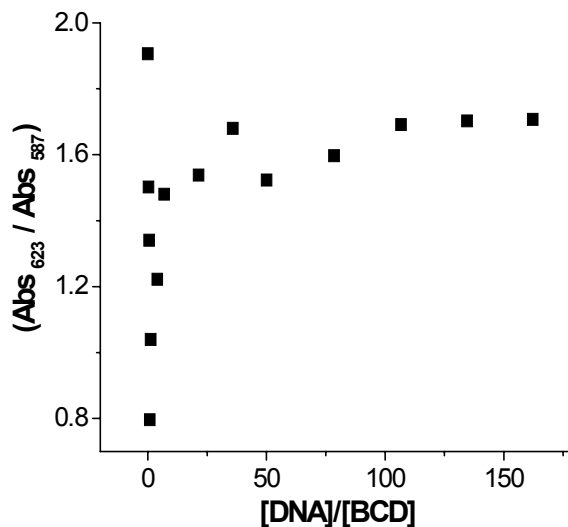


Gráfico 48 – Razão de absorção óptica das bandas para o [BCD(150°)] = 2,90 μM em função do [DNA]

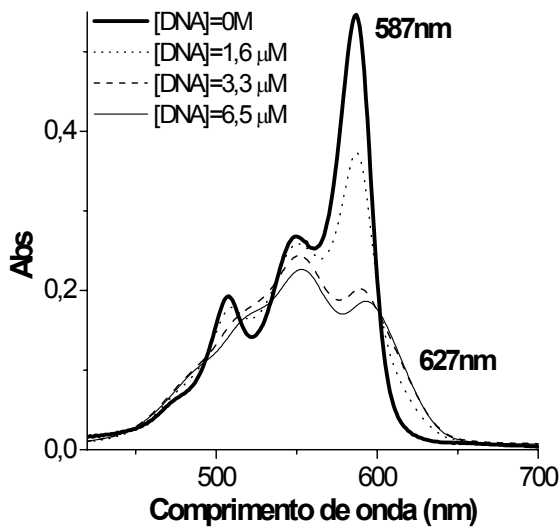


Gráfico 49 - Primeira fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(120°)] = 8,04 μM

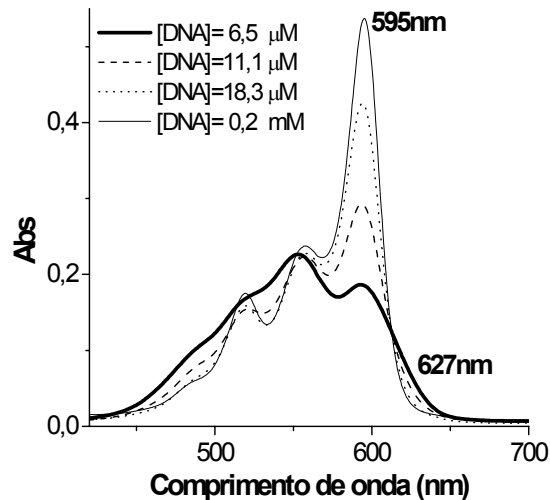


Gráfico 50 – Segunda fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(120°)] = 8,04 μM

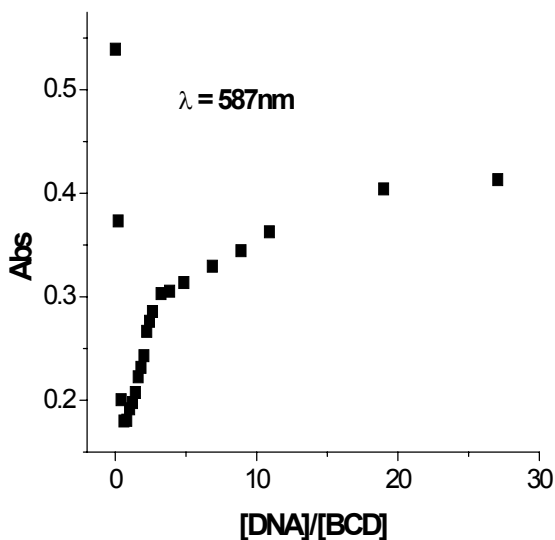


Gráfico 51 -- Mudanças de absorção nas bandas do [BCD(120°)] = 8,04 μM em função do [DNA].

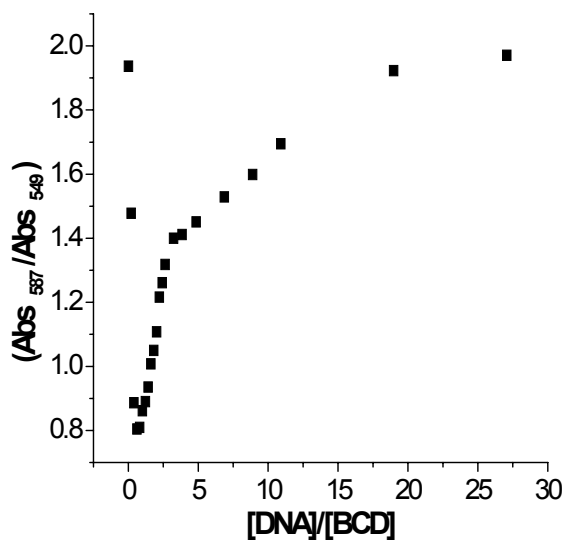


Gráfico 52 – Razão das bandas de absorção óptica para o [BCD(120°)] = 8,04 μM em função da [DNA]

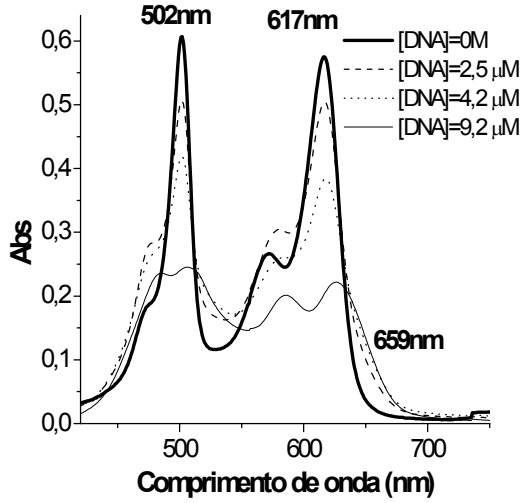


Gráfico 53 - Primeira fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(90°)] = 6,71 μM

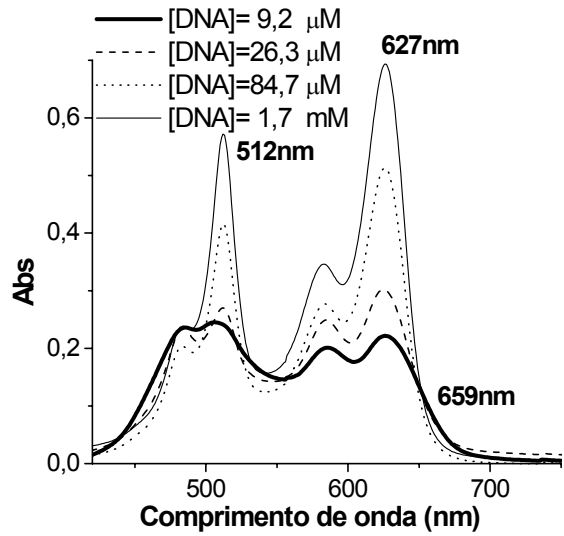


Gráfico 54 – Segunda fase das mudanças dos espectros de absorção óptica em função da [DNA].
[BCD(90°)] = 6,71 μM

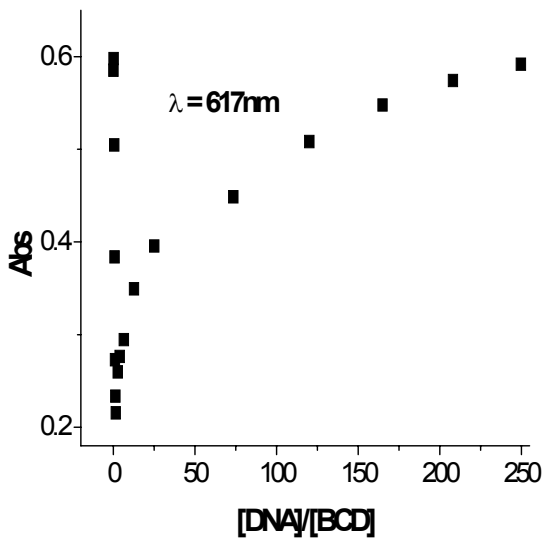


Gráfico 55 – Mudanças de absorção nas bandas do [BCD(90°)] = 6,71 μM em função do [DNA].

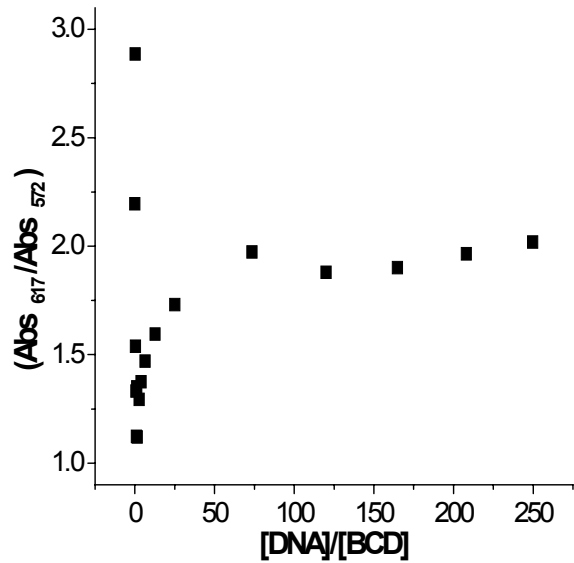


Gráfico 56 – Razão das bandas de absorção óptica para o [BCD(90°)] = 6,71 μM em função da [DNA]

Os gráficos indicam que os espectros de absorção dos BCD se modificam drasticamente na presença das moléculas de DNA. Em baixas concentrações de DNA ocorre a diminuição da intensidade das bandas dos monômeros de BCD, com o aparecimento das bandas dos agregados tipo H e J. Numa determinada faixa de concentrações de DNA a absorção dos agregados atinge um patamar, mostrando que neste momento existem apenas a espécies agregadas H+J. Com o maior aumento da concentração de DNA ocorre o aparecimento de novas bandas até atingir a saturação onde desaparece completamente a banda dos agregados e não há mais mudanças nos espectros. A forma dos últimos espectros é igual à dos monômeros, apenas deslocado para comprimentos de onda maiores. A análise deste comportamento aponta para a formação de um complexo do corante monômero com o DNA.

Numa análise geral das mudanças dos espectros pelo aumento da concentração de DNA, pode-se entender que ocorre um processo em que aparecem três espécies diferentes na solução dependentes da concentração de DNA, sendo que para determinadas concentrações é possível obter cada espécie pura. A primeira espécie é a monomérica, onde apenas moléculas livres de BCD estão presentes, a segunda é formada por agregados (H+J) de BCD no DNA e a terceira são monômeros de BCD ligados no DNA. Este modelo já foi descrito na literatura para uma classe de porfirinas [18,28,29].



No primeiro estágio ocorre a formação do monômero ligado no DNA. No segundo estágio os corantes formam os agregados ligando-se com as moléculas do corante que já se ligaram com DNA. Porém estas fases são muito rápidas e por isso não podemos detectar separadamente a ligação da primeira molécula do corante com DNA e a posterior formação de agregados pelo método de absorção ótica sem alta resolução temporal. No final desta fase numa certa concentração de DNA já não há a presença dos monômeros livres na solução contribuindo para a formação do espectro. Quando a concentração do DNA aumenta mais, o terceiro estágio começa ocorrendo a desagregação dos BCD, até restar apenas a presença das espécies “monômero+DNA”.

Diante destas mudanças é possível fazer a análise do conteúdo relativo de cada espécie considerando primeiro a formação da espécie 1-2 e depois 2-3 (gráficos de 57 a 64). Para tanto foi desenvolvido um programa computacional (ver apêndice) que analisa a quantidade relativa de espécies através da área dos espectros.

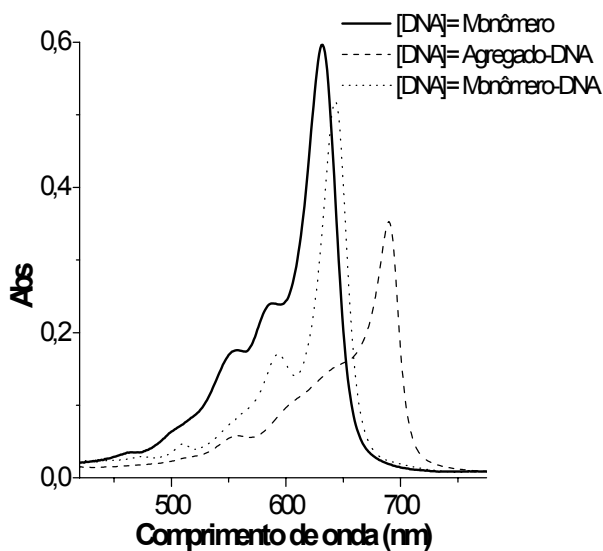


Gráfico 57 – Espectros do monômero livre ([DNA]=0 M), agregado ligado com DNA ([DNA]=2,84 μ M) e monômero ligado com DNA ([DNA]=0,88 mM). [BCD(180°)] = 4,51 μ M

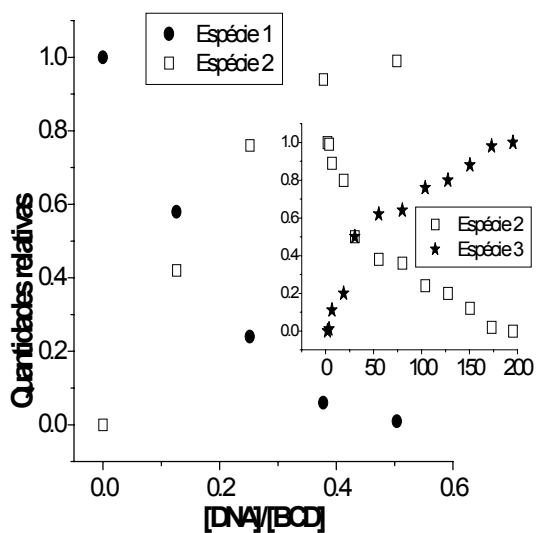


Gráfico 58 – Quantidades relativas das espécies de [BCD(180°)] dependente da concentração de DNA

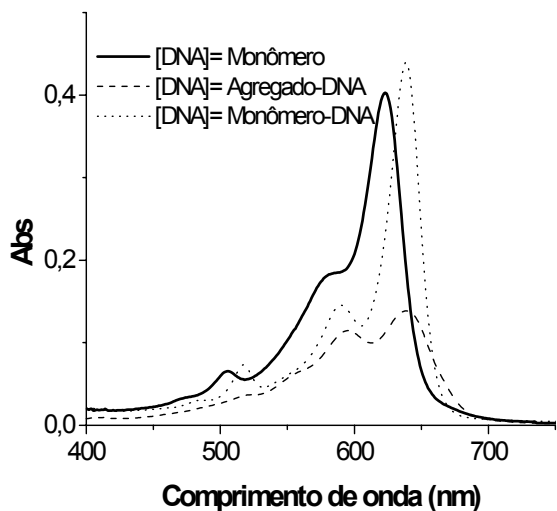


Gráfico 59 – Espectros do monômero livre ([DNA]=0 M), agregado ligado com DNA ([DNA]=3,36 μ M) e monômero ligado com DNA ([DNA]=0,47 mM). [BCD(150°)] = 2,90 μ M

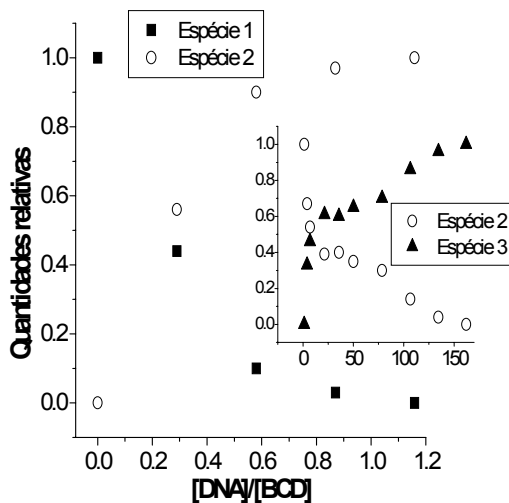


Gráfico 60 – Quantidades relativas das espécies de [BCD(150°)] dependente da concentração de DNA

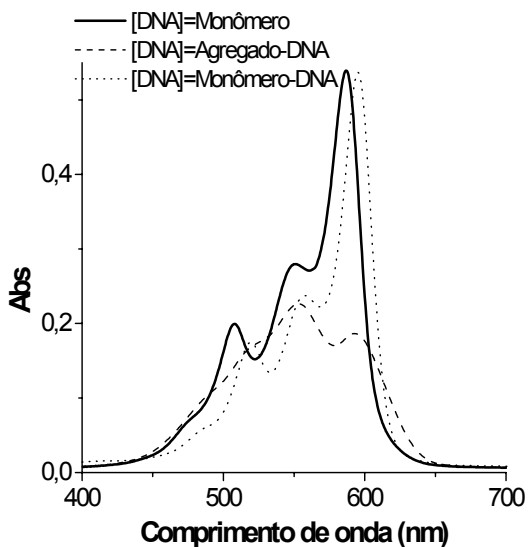


Gráfico 61 – Espectros do monômero livre ([DNA]=0 M), agregado ligado com DNA ([DNA]=6,50 μ M) e monômero ligado com DNA ([DNA]=0,22 mM). [BCD(120°)] = 8,04 μ M

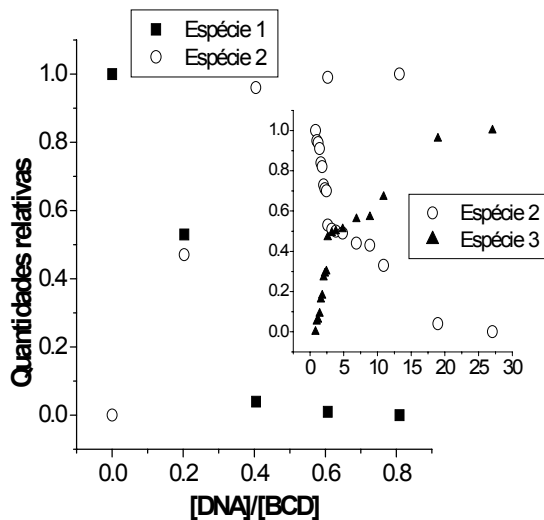


Gráfico 62 – Quantidades relativas das espécies de [BCD(120°)] dependente da concentração de DNA

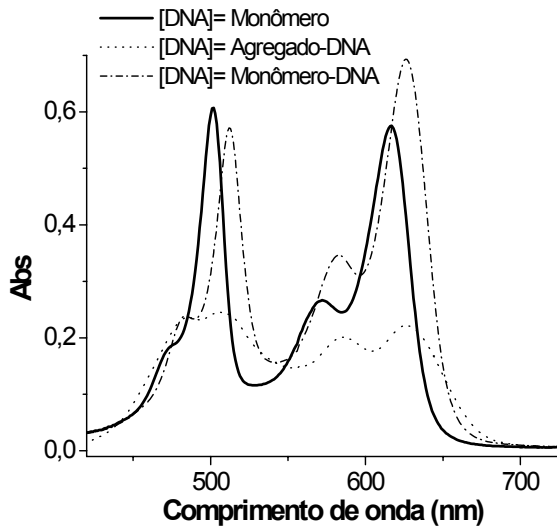


Gráfico 63 – Espectros do monômero livre ($[DNA]=0$ M), agregado ligado com DNA ($[DNA]=9,23 \mu\text{M}$) e monômero ligado com DNA ($[DNA]=1,67$ mM). $[BCD(90^\circ)] = 6,71 \mu\text{M}$

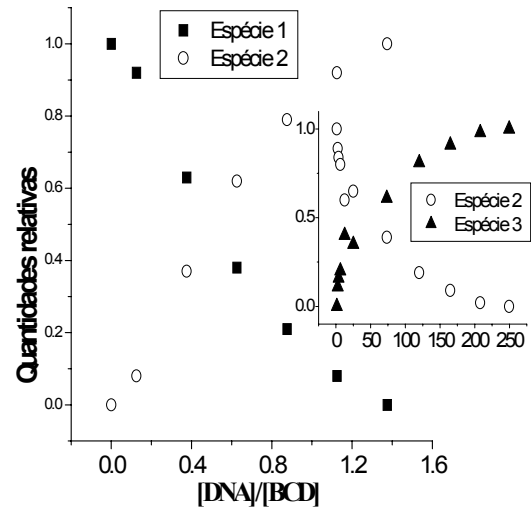


Gráfico 64 – Quantidades relativas das espécies de $[BCD(90^\circ)]$ dependente da concentração de DNA

A primeira espécie é a dos monômeros de BCD que ocorre em solução pura ($[DNA]=0\text{M}$). A segunda começa a aparecer quando é adicionado DNA na solução, onde, segundo o modelo proposto, as moléculas de BCD se agregam na superfície das moléculas de DNA, até uma concentração de DNA onde todas as moléculas de BCD estão agregadas. Neste momento há o aparecimento da terceira espécie. Com o aumento da concentração de DNA as moléculas de BCD começam a se desagregar, se ligando nas novas moléculas de DNA que foram adicionadas na solução, formando a espécie monômeros de BCD ligados no DNA.

A formação da segunda espécie, agregados de BCD na superfície do DNA, possui características espectrais muito parecidas com os agregados formados apenas pela presença de NaCl mostrados anteriormente, o que pode comprovar o modelo proposto. A terceira espécie tem a forma dos espectros igual ao dos monômeros de BCD, apenas com máximos da absorção deslocados para comprimentos de onda maiores, que vem a comprovar a tese de que esta espécie é formada por

monômeros de BCD. Esse deslocamento aparece devido à diferença dos meios onde os monômeros dos corantes se encontram na forma livre e na forma ligada. Deve-se observar que a posição dos picos de absorção dos monômeros ligados no DNA é mais próxima com os monômeros no etanol do que na água (Tabela 2). Isso pode significar que os monômeros ligados se encontram num meio menos polar do que água no “bulk”. Isto pode acontecer pela reestruturação da água pela interação com as moléculas do DNA ou na região entre os pares de bases do DNA, se as moléculas dos corantes intercalarem entre eles.

A formação dos agregados de corantes pela interação com DNA pode ser explicada da mesma maneira que na presença de NaCl. Como já foi dito no capítulo 2 (Base científica) a superfície da molécula do DNA possui carga negativa. Por causa disso ela atrai as moléculas carregadas positivamente. Quando essas moléculas se ligam no DNA a carga positiva do BCD compensa a carga negativa do DNA facilitando assim a agregação da molécula ligada (BCD).

Os gráficos de 65 a 68 mostram a comparação entre os espectros dos agregados de BCD formados através da adição do sal e através da interação com DNA.

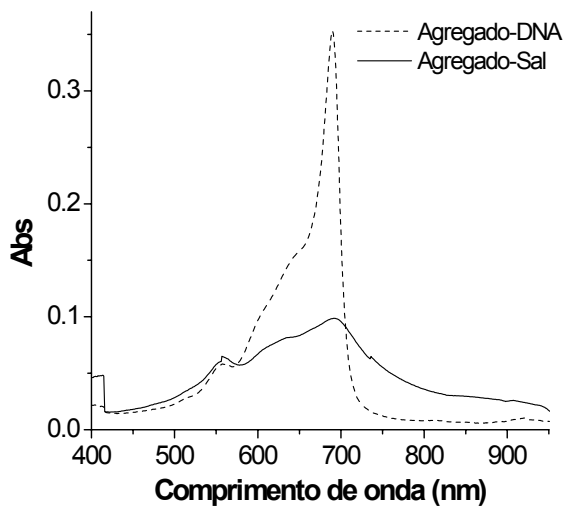


Gráfico 65 – Comparação entre os espectros dos agregados formados pela adição de NaCl e DNA BCD 180°.

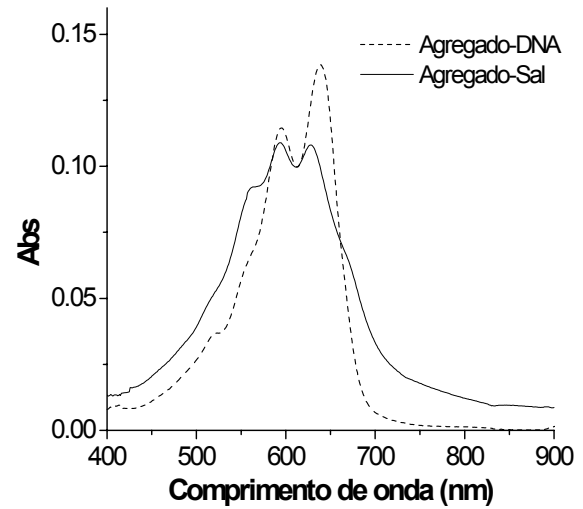


Gráfico 66 – Comparação entre os espectros dos agregados formados pela adição de NaCl e DNA BCD 150°.

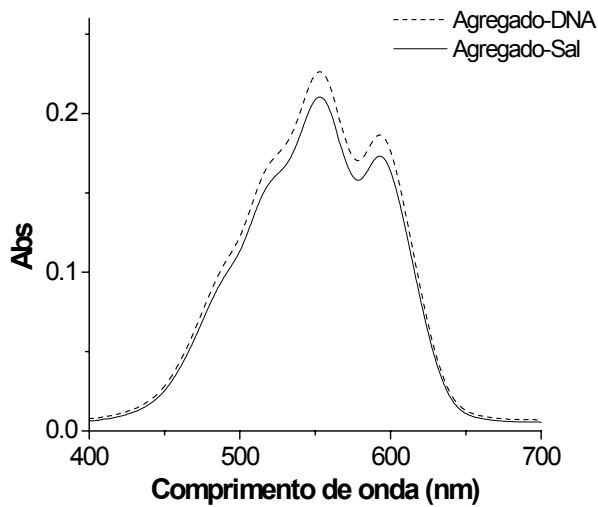


Gráfico 67 – Comparação entre os espectros dos agregados formados pela adição de NaCl e DNA. BCD 120°.

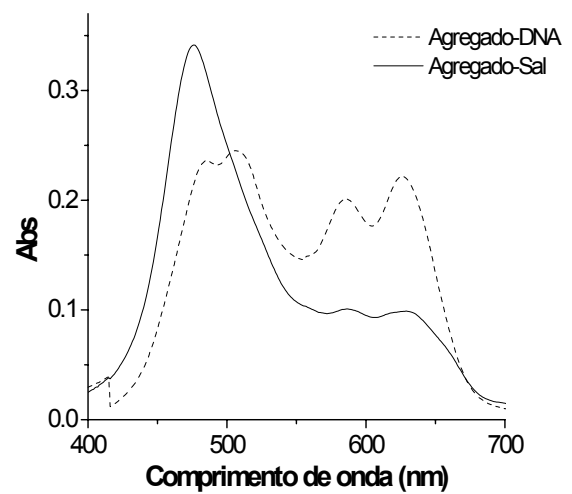


Gráfico 68 – Comparação entre os espectros dos agregados formados pela adição de NaCl e DNA. BCD 90°.

Pode-se observar que em geral as bandas de agregados formados na presença de sal são mais difusas do que as formadas pela interação com DNA. Isso pode significar que a estrutura de

agregados na presença de sal é menos organizada do que os ligados com DNA. Provavelmente a molécula de DNA funciona como uma matriz ajudando na organização da estrutura do agregado.

A concentração de DNA para formar as espécies dos corantes depende do ângulo entre seus cromóforos (Veja Tabela 4). Neste caso, diferente do caso com sal, além da geometria dos corantes, também se deve levar em conta a geometria das moléculas de DNA como fatores que influenciam nos processos de formação das espécies. Os valores da concentração de DNA para a formação das espécies são mostrados na tabela 4.

	BCD (180°)	BCD (150°)	BCD (120°)	BCD (90°)
Q.R.E.* 50% Esp (1-2) ([DNA]/[BCD])	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,63 ± 0,03
Q.R.E.* 100% Esp 2 ([DNA]/[BCD])	0,6 ± 0,3	1,3 ± 0,5	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4
Q.R.E. 50% Esp (2-3) ([DNA]/[BCD])	34,5 ± 5,0	26,8 ± 5,0	4,0 ± 0,5	42,5 ± 5,5
Q.R.E.* 100% Esp 3 ([DNA]/[BCD])	193,0 ± 20,0	158,5 ± 8,5	27,0 ± 2,0	251,5 ± 7,0

* Q.R.E. = Quantidades Relativa de Espécies

Tabela-4: Valores de [DNA]/[BCD] necessários para formar as espécies 2 e 3.

O gráfico aponta para valores próximos, da quantidade [DNA]/[BCD], para ocorrer a formação da espécie agregada de corantes. Já os valores desta quantidade para a desagregação de corantes são bem diferenciados. Observa-se que o BCD com 180° e 90° entre os cromóforos devem formar agregados mais fortemente ligados que os outros, pois a quantidade de DNA para que haja a separação dos agregados, QRE 50%, é cerca de 6,5 vezes maior e para a formação completa da espécie 3 é cerca de 9,3 vezes maior em relação ao BCD 120° entre os cromóforos.