

7.2 Dicroísmo circular

Através do método de absorção ótica obteve-se resultados que informam sobre a formação de espécies diferentes dependentes da concentração de DNA e sal, porém este método não informa sobre a forma de ligação da molécula do corante com DNA (intercalação ou ligação superficial). Pelo método de dicroísmo circular é possível inferir se os BCD se ligam na superfície ou se intercalam nas moléculas de DNA, e também obter informações sobre a formação de espécies.

As medidas iniciais com soluções de BCD em PPB tanto na ausência quando na presença do sal não deram nenhum sinal de dicroísmo, o que mostra que estes corantes não possuem atividade ótica em solução aquosa nem na forma monomérica nem na forma agregada. Entretanto, na presença de DNA para todos os BCD apareceu um forte sinal do dicroísmo mostrando que as formas de BCD ligados com DNA possuem atividade ótica.

7.2a Dicroísmo circular dos BCD na presença de DNA

Os gráficos de 85 a 92 mostram o comportamento dos espectros de dicroísmo circular dos BCD na presença de DNA.

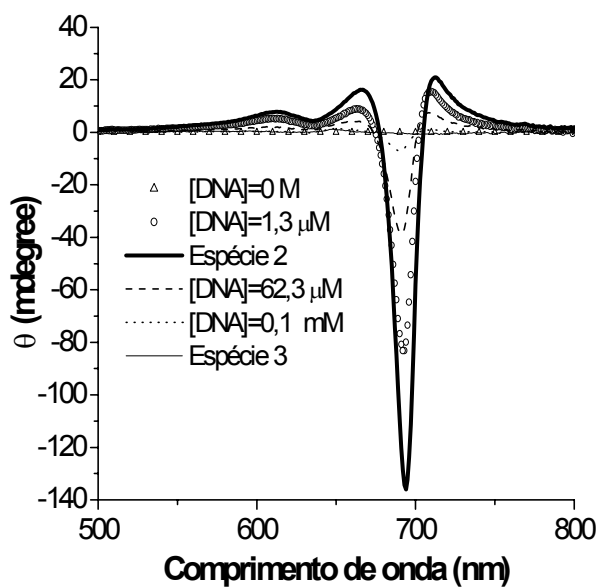


Gráfico 85 – Espectros de DC do [BCD(180°)] = 2,48 μ M em função da concentração de DNA

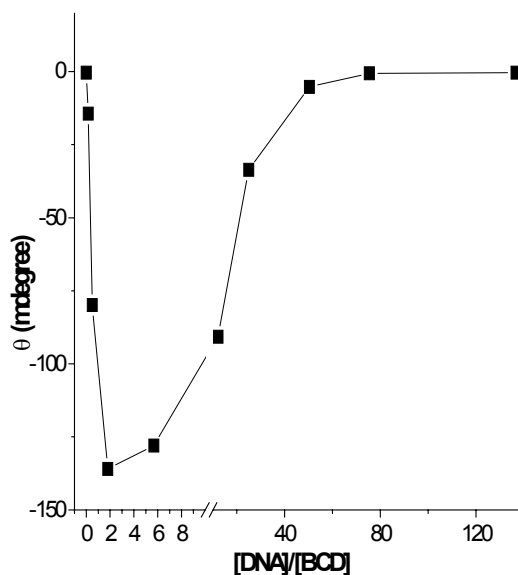


Gráfico 86 – Variação do máximo dos espectros de DC pela concentração de DNA para $\lambda = 694$ nm.

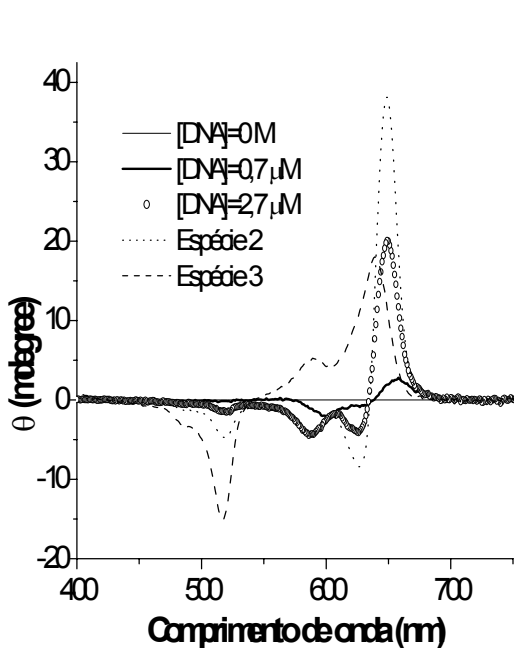


Gráfico 87 – Espectros de DC do [BCD(150°)] = 3,70 μM em função da concentração de DNA

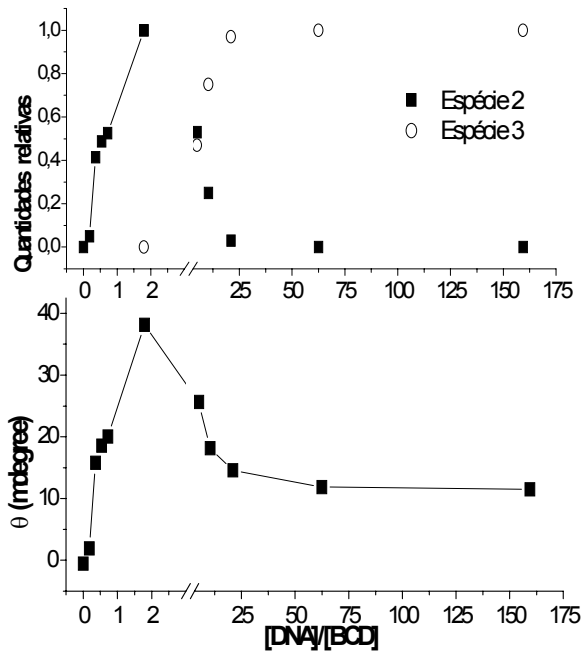


Gráfico 88 – Variação do máximo dos espectros de DC pela concentração de DNA para $\lambda = 649$ nm

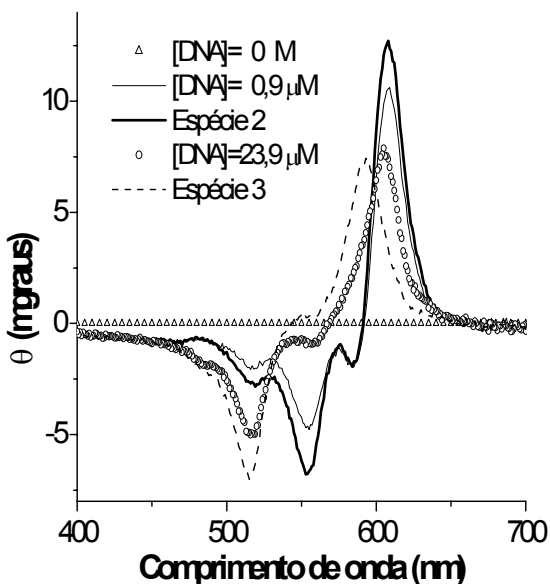


Gráfico 89 – Espectros de DC do [BCD(120°)] = 7,42 μM em função da concentração de DNA

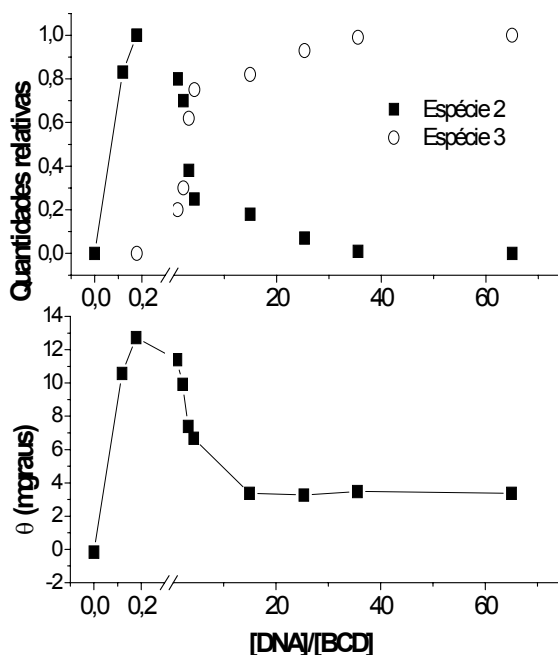


Gráfico 90 – Variação do máximo dos espectros de DC pela concentração de DNA para $\lambda = 608$ nm.

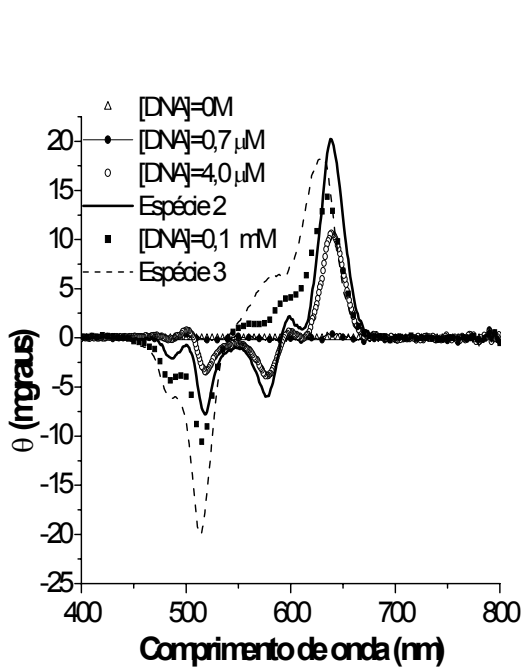


Gráfico 91 – Espectros de DC do $[\text{BCD}(90^\circ)] = 5,69 \mu\text{M}$ em função da concentração de DNA

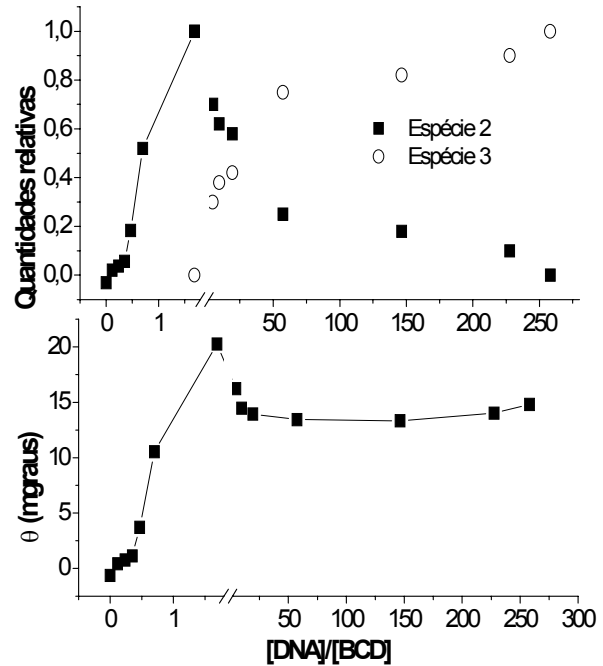


Gráfico 92 – Variação do máximo dos espectros de DC pela concentração de DNA para $\lambda = 638 \text{ nm}$.

A análise dos espectros de DC mostra que para todos os BCD a adição de DNA induz ao aparecimento do sinal de dicroísmo na região espectral onde os BCD possuem absorção ótica. A dependência do sinal pela concentração de DNA para todos os corantes pode ser dividida em duas fases, sendo que as características dessas fases dependem da estrutura do corante.

Para o BCD 180⁰ essas fases são as seguintes: no início o sinal aumenta com aumento da concentração de DNA até atingir um valor máximo (1^a fase). Com maior aumento de $[\text{DNA}]$ o sinal começa a diminuir sem deslocamento e mudança no perfil, e finalmente desaparece (2^a fase). A razão $[\text{DNA}]/[\text{BCD}]$ onde o sinal atinge o máximo ($1,7 \pm 1,1$) é próxima à do conteúdo máximo dos agregados de BCD obtido nos experimentos de absorção ótica ($0,6 \pm 0,5$). A razão $[\text{DNA}]/[\text{BCD}]$ onde o sinal desaparece ($110,0 \pm 35,0$) é próxima de onde os agregados se desagregam totalmente formando a forma monomérica ligada do corante ($193,0 \pm 20,0$). Assim podemos concluir que esse sinal aparece devido à formação dos agregados do BCD que nessa

forma possui a atividade ótica e os monômeros desse corante não possuem atividade ótica nem na forma ligada nem na forma livre. Esse pode ser relacionado com a estrutura linear do corante que possui alto grau da simetria.

Para todos os outros corantes observamos também duas fases na mudança do sinal de CD em função de [DNA]. Na primeira fase aparece o sinal que aumenta com a concentração de [DNA] até atingir um máximo. Com um maior aumento na concentração de DNA a intensidade desse sinal começa a diminuir e aparece outro sinal com o perfil completamente diferente.

Estes resultados comprovam que ocorre o aparecimento de espécies diferentes de BCD dependentes da concentração de DNA, sendo que os monômeros não têm sinal, mas com a adição de DNA ocorre a formação de agregados de BCD nas moléculas de DNA e a formação de monômeros de BCD ligados no DNA. Para o BCD com 180°, os espectros mostram que a última espécie também não tem sinal de dicroísmo circular, como a primeira, e por este motivo não é apresentado o gráfico de formação das espécies para este corante. Para os outros BCD a segunda e a terceira espécie apresentam atividade. Este fato se deve à geometria das moléculas.

Os valores da razão [DNA]/[BCD] para ocorrer a formação das espécies são mostrados na tabela 5.

	BCD (180°)	BCD (150°)	BCD (120°)	BCD (90°)
Q.R.E.* 50% Esp (1-2) ([DNA]/[BCD])	-----	0,6 ± 0,3	0,11 ± 0,08	0,7 ± 0,3
Q.R.E.* 100% Esp 2 ([DNA]/[BCD])	1,7 ± 1,1	1,8 ± 0,6	0,2 ± 0,2	1,1 ± 0,4
Q.R.E. 50% Esp (2-3) ([DNA]/[BCD])	-----	5,1 ± 5,0	3,2 ± 0,5	34,12 ± 5,5
Q.R.E.* 100% Esp 3 ([DNA]/[BCD])	110,0 ± 35,0	119,1 ± 58,5	65,0 ± 2,0	258,5 ± 17,0

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

Tabela - 5: Valores da razão [DNA]/[BCD] para a formação das espécies

Os valores das razões obtidos com o método de dicroísmo circular concordam, em sua maioria, com os valores obtidos pelo método de absorção ótica. O valor mais discordante

comparado com os da absorção ótica é o valor da QRE 50% para formação da espécie 2 e 3 para o BCD 150°, que neste caso é menor que o valor obtido com a absorção. Este fato pode ter ocorrido devido ao método de DC levar em conta, além da concentração, a geometria das moléculas.

Uma das informações importantes obtidas com o método de DC foi inferir sobre se as moléculas de BCD se ligam na superfície do DNA ou se elas se intercalam entre as hélices.

Foram feitas medidas do espectro de DC do DNA sem corantes e na presença de todos os corantes, sendo os resultados iguais. O gráfico 93 apresentado abaixo mostra que não houve nenhuma mudança no perfil do espectro de DNA pela presença dos BCD, mas apenas ocorreu o aumento da intensidade pelo aumento da concentração de DNA. Este resultado mostra que os BCD não mudam a estrutura espacial das moléculas de DNA. Isso significa que eles não se intercalam nas moléculas de DNA mas se ligam na sua superfície.

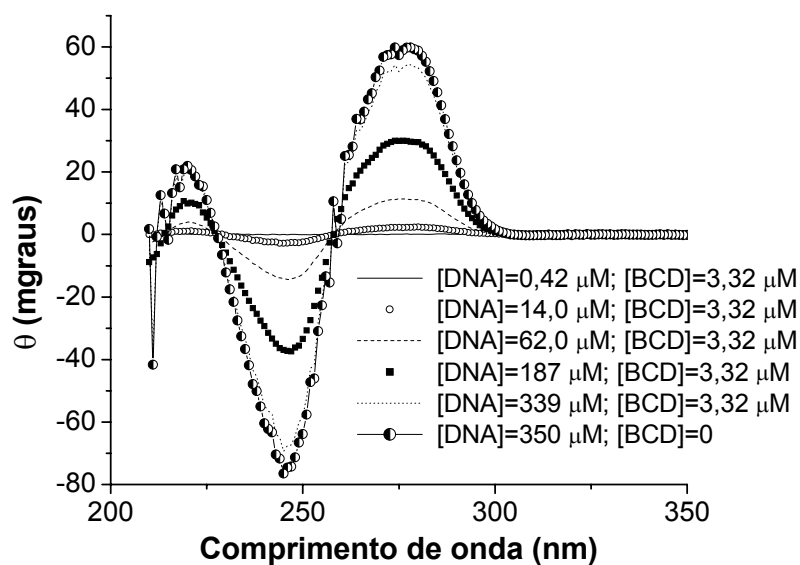


Gráfico 93 - Espectro de DC para a molécula de DNA na presença do [BCD(180°)]

7.3b Dicroísmo circular dos BCD na presença de DNA e NaCl

Os gráficos de 94 a 101 mostram a influência da força iônica nos espectros de DC nas soluções de BCD com a adição de DNA. Os experimentos foram realizados com concentração de sal de 0,2M, sendo adicionado DNA gradativamente.

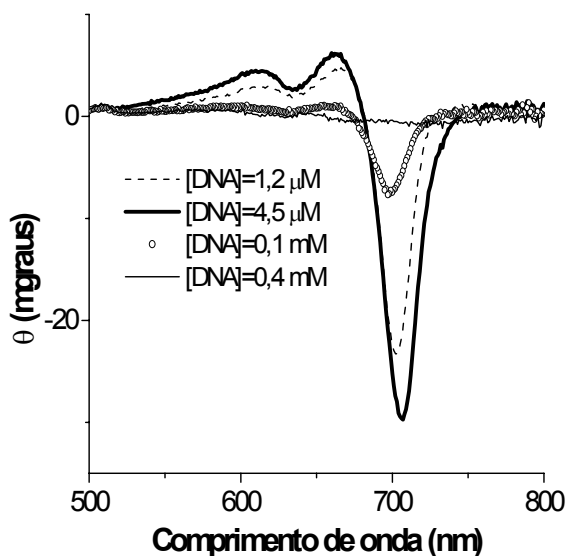


Gráfico 94 – DC pela concentração de DNA.
[NaCl]= 0,2M. [BCD(180°)] = 2,48 µM

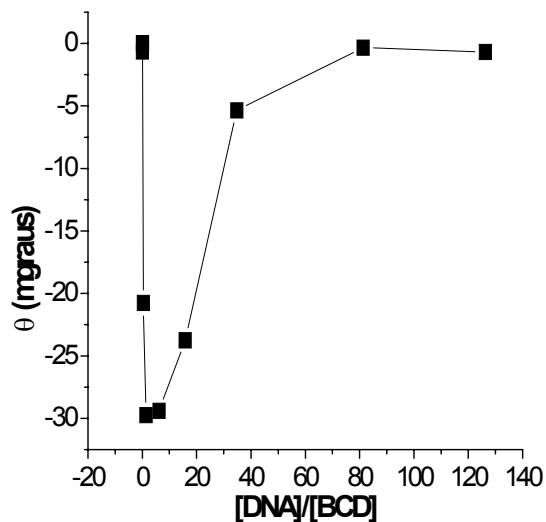


Gráfico 95 – Variação dos espectros de DC dos BCD pela concentração de DNA para $\lambda = 707$ nm.

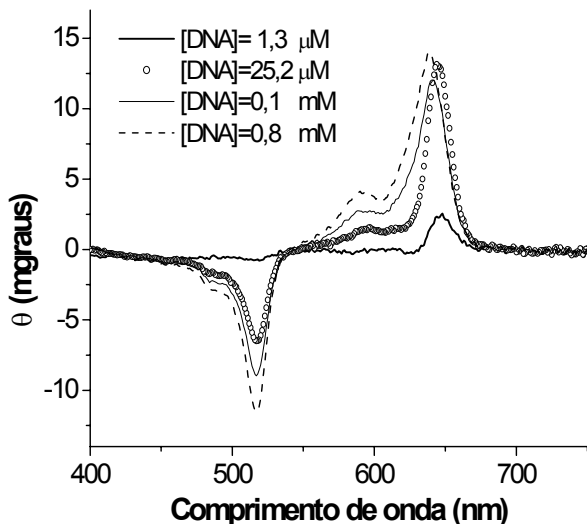


Gráfico 96 – DC pela concentração de DNA.
[NaCl]= 0,2M. [BCD(150°)] = 3,70 µM

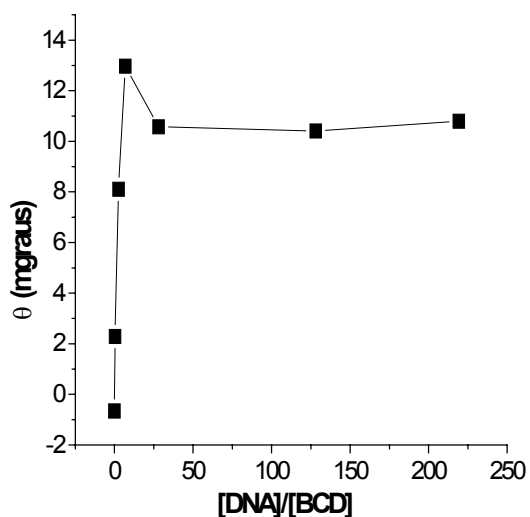


Gráfico 97 – Variação dos espectros de DC dos BCD pela concentração de DNA para $\lambda = 646$ nm.

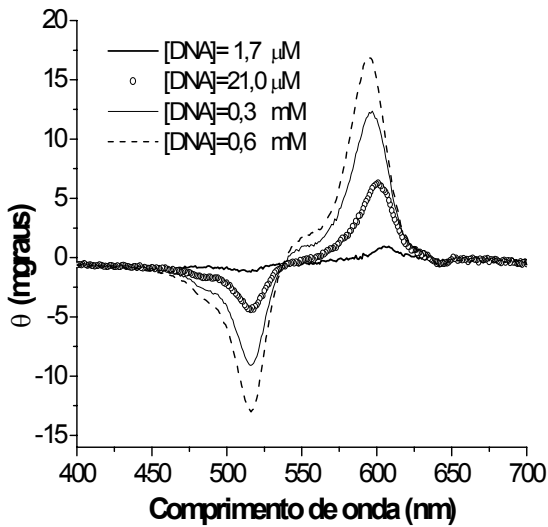


Gráfico 98 – DC pela concentração de DNA.
[NaCl]= 0,2M. [BCD(120°)] = 7,42 μ M

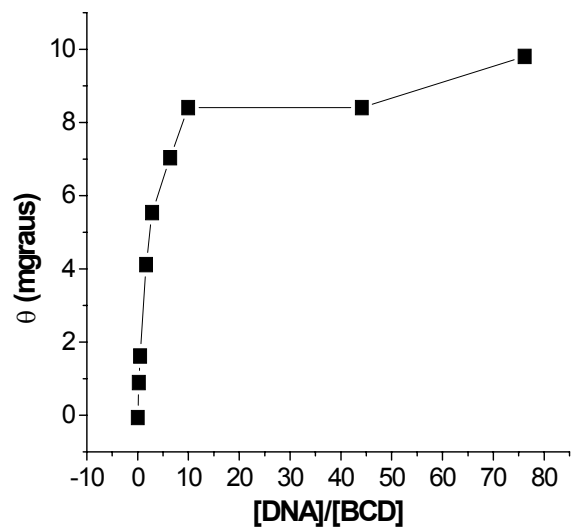


Gráfico 99 – Variação dos espectros de DC dos BCD pela concentração de DNA para $\lambda = 606$ nm.

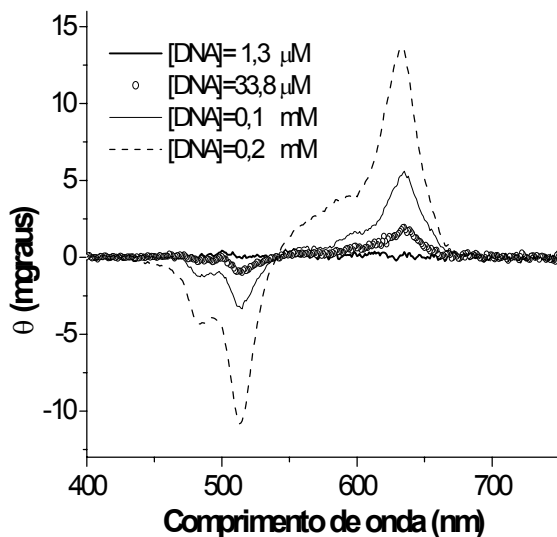


Gráfico 100 – DC pela concentração de DNA.
[NaCl]= 0,2M. [BCD(90°)] = 5,69 μ M

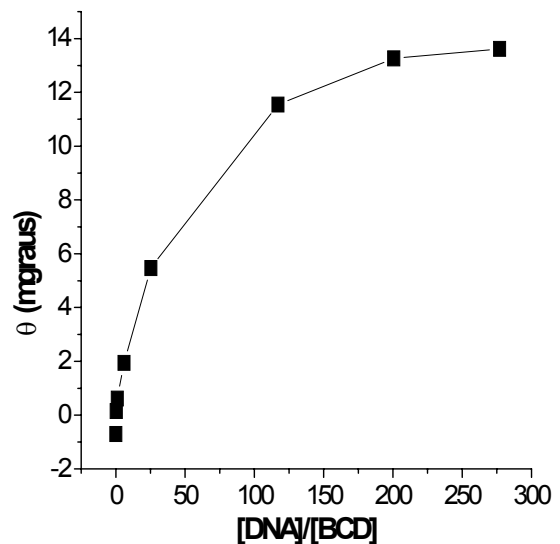


Gráfico 101 – Variação dos espectros de DC dos BCD pela concentração de DNA para $\lambda = 634$ nm.

A análise mostra que na presença de sal apenas o sinal dos monômeros ligados aparece, e o sinal não é característico comparado com os agregados observados sem sal. Isso significa que na presença de sal não ocorre a primeira fase como ocorre na ausência de sal, mas somente a segunda fase. Por este motivo não há as mudanças do perfil dos espectros e eles praticamente só mudam suas intensidades. A única exceção para este comportamento é para o BCD 180°, que se

comporta da mesma maneira que na ausência de sal só que a amplitude do sinal é 5 vezes menor que na ausência de sal. Novamente isto se deve à geometria deste corante que quando ligado na superfície do DNA na forma monomérica não apresenta atividade.

Pela comparação dos espectros, com e na ausência de sal, nota-se que ocorre a diminuição das intensidades do sinal dos corantes quando na presença de sal. Esse resultado está em concordância com a conclusão sobre o efeito da competição entre os cátions do sal e as moléculas de corantes sobre os sítios de ligação do DNA. Na presença do sal em concentrações maiores que dos BCD, os sítios do DNA são ocupados pelo sal seguindo a eletronegatividade das bases: $CG > AT$ [28]; fazendo com que tenha não só menos moléculas de BCD ligadas na superfície do DNA, mas que estas moléculas se deslocam para sítios menos eletronegativos desfavorecendo sua agregação. Por outro lado, a constante de ligação dos corantes com sítios menos eletronegativos deve ser menor, e para atingir a mesma quantidade de moléculas ligadas é necessária maior concentração de DNA.