



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
QUÍMICA ORGÂNICA**

**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA INTERAÇÃO ENTRE DERIVADOS
DE 1,2-NAFTOQUINONAS E ALBUMINA SÉRICA HUMANA (ASH)**

Cosme Henrique Coêlho dos Santos de Oliveira

Sob a Orientação do Professor
Dr. Francisco de Assis da Silva

e Co-orientação do Professor
Dr. Darí Cesarin Sobrinho

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração
em Química Orgânica

Seropédica, RJ
Maio de 2014

547

O48e

T

Oliveira, Cosme Henrique Coêlho dos Santos de, 1986-
Estudo espectroscópico da interação entre
derivados de 1,2-naftoquinonas e albumina sérica
humana (ASH) / Cosme Henrique Coêlho dos Santos de
Oliveira. - 2014.
176 f.: il.

Orientador: Francisco de Assis da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Química, 2014.

Bibliografia: f. 86-92.

1. Química orgânica - Teses. 2. Naftoquinona -
Teses. 3. Albumina - Teses. 4. Análise espectral -
Teses. I. Silva, Francisco de Assis da, 1954-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso
de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

COSME HENRIQUE COÊLHO DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/05/2014

Francisco de Assis da Silva, Dr. - Depto. de Química/ICE/UFRRJ
(Presidente)

Aurélio Baird Buarque Ferreira, Dr. - Depto. De Química/ICE/UFRRJ

Nanci Câmara de Lucas Garden, Dra. - Depto. /IQ/UFRRJ

Luciano Ramos Suzart, Dra. - Depto. /IQ/UFRRJ
(Suplente)

Rodrigo José Correia, Dr. /IQ/UFRRJ
(Suplente)

DEDICATÓRIA

“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida.” (Vinícius de Moraes)

Aos meus pais, Cosme de Oliveira e Lúcia Helena, por toda a dedicação e carinho.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original” (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. e orientador Francisco de Assis da Silva e ao Prof. e co-orientador Darí Cesarin Sobrinho pela orientação, ensinamentos, estímulos e amizade.

Aos meus pais, Cosme de Oliveira e Lúcia Helena Coêlho dos Santos de Oliveira, pelo apoio, incentivo, dedicação e compreensão em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã, Elaine Cristiane Coêlho dos Santos de Oliveira, pela paciência e amizade.

As minhas tias, Heloisa Helena e Ilma Coelho dos Santos, pelo apoio, acolhendo-me em sua casa em alguns momentos desta dissertação, e por acreditar no meu potencial.

Aos demais professores, técnicos e funcionários do Depto. de Química/ ICE/ UFRRJ pela contribuição direta ou indireta, apoio e ajuda para a realização desta dissertação.

A todos os colegas dos cursos de mestrado e de doutorado do PPGQ/ ICE/ UFRRJ, que me ajudaram direta ou indiretamente, e pela amizade.

Aos meus amigos Thiago, João Victor, Rodolfo, Carlos Alberto, Matheus, Naza, Jeniffer, Cíntia, Rodrigo, Romulo, André, entre outros que, de uma forma ou de outra, sempre torceram por mim.

À UFRRJ pela sua existência e contribuição para a minha formação.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

OLIVEIRA, Cosme Henrique Coêlho dos Santos de. **Estudo espectroscópico da interação entre derivados de 1,2-naftoquinonas e albumina sérica humana (ASH)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A interação entre albumina sérica humana (ASH) e os derivados da 1,2-naftoquinona (LF, LF4Me, LF24Me, LF4Br, LF4Cl, LP4F, LP4Me e LP24Me), em solução tamponada (PBS, pH = 7,4), foi estudada por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), dicroísmo circular (DC), espectroscopia de emissão de fluorescência e espectroscopia de emissão de fluorescência com resolução temporal. Os resultados obtidos para as constantes de velocidade supressão de fluorescência de ASH ($k_q \approx 10^{12}$ L/mol.s) e para o tempo de vida de fluorescência τ_2 ($\approx 6,6$ ns) sugerem um mecanismo estático para o processo de supressão. Os valores termodinâmicos de energia livre de Gibbs, encontrados para a interação das 1,2-naftoquinonas com a ASH (≈ -24 a -29 kJ/mol) sugerem a ocorrência de um processo espontâneo via um mecanismo reversível. Já os valores negativos de ΔH° e positivos de ΔS° encontrados em todos os casos ($-6,60$ a $-21,82$ kJ/mol e $+10,79$ a $+64,61$ J/mol.K, respectivamente) indicam que o processo de interação ocorre pela formação de uma ligação de hidrogênio em ambiente hidrofóbico. Os estudos das distâncias do raio de Förster r , entre doador e aceptor, (≈ 2 a 3 nm), indica a ocorrência de uma forte interação entre 1,2-naftoquinona/ASH que independe da temperatura. A diminuição na porcentagem de hélice- α verificado nos estudos de dicroísmo circular (≈ 60 a 53 %) indicam a ocorrência da interação entre as 1,2-naftoquinonas com ASH o que pode ser reflexo da mudança conformacional da proteína para acomodar melhor os compostos na cavidade hidrofóbica da albumina sérica próximo ao resíduo de triptofano.

Palavras-chave: Espectroscopia, naftoquinonas, albumina sérica humana (ASH).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Cosme Henrique Coêlho dos Santos de. **Spectroscopic study of the interaction between naphthoquinones derivatives and human serum albumin (HSA)**. 2014. Dissertation (Master Science in Chemistry, Organic Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The interaction between human serum albumin and derivatives 1,2-naphthoquinones in buffered solution was studied by UV - Visible, circular dichroism spectroscopy, fluorescence emission spectroscopy and fluorescence emission spectroscopy with temporal resolution. The results obtained for the rate constants of fluorescence quenching of HSA [$K_q = 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$] and fluorescence lifetime τ_2 ($\approx 6.6 \text{ ns}$) suggest a static mechanism for the quenching process. Thermodynamic values for Gibbs energy free found for the interaction between 1,2-naphthoquinones and ASH (≈ -24 to $-29 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) suggest the occurrence of a spontaneous process via reversible mechanism. Already positive and negative values of ΔH° and ΔS° found in all cases (-6.60 to -21.82 kJ/mol and a $+64.61$ to $10.79 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$), respectively, indicating that the interaction occurs by formation of a hydrogen bond at room hydrophobic. Studies about distances of the rays of Foster, r , between donor and acceptor ($\approx 2\text{-}3 \text{ nm}$), indicates a strong interaction between 1,2-naphthoquinone and ASH, which is independent of temperature. The decrease in the percentage of α -helix verified in studies of circular dichroism (53 to 60%) indicating the interaction between HSA with 1,2-naphthoquinonas which may reflect the conformational change of the protein to better accommodate the compounds in the hydrophobic cavity serum albumin near the tryptophan residue.

Key words: Spectroscopy, naphthoquinone, human serum albumin (HSA).

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

AD	gua milli-Q
ASB	Albumina sérica bovina
ASH	Albumina sérica humana
BSA	Bovine serum albumin
DC	Dicroísmo circular
HSA	Human serum albumin
LF	2-fenil-2,3-diidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona
LF4Cl	2-(4-clorofenil)-2,3-diidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona
LF4Br	2-(4-bromofenil)-2,3-diidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona
LF4Me	2-(4-metilfenil)-2,3-diidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona
LF24Me	2-(2,4-dimetilfenil)-2,3-diidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona
LP4F	2-(4-fluorofenil)-3,4-diidro-2H-benzo(h)-cromeno-5,6-diona
LP4Me	2-(4-metilfenil)-3,4-diidro-2H-benzo(h)-cromeno-5,6-diona
LP24Me	2-(2,4-dimetilfenil)-3,4-diidro-2H-benzo(h)-cromeno-5,6-diona
MEOH	Metanol
MRE	Elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual
PBS	Phosphate buffer solution
UV-Vis	Espectrometria no ultravioleta/visível

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valor de constante de dissociação (pK) e ponto isoeletrônico (pI) dos aminoácidos normalmente encontrados em proteínas 9
- Tabela 2** – Coeficientes de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 23°C 29
- Tabela 3** – Temperatura utilizada na absorção de UV-VIS de ASH na presença dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). 55
- Tabela 4** – Concentração final dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 310 K. 56
- Tabela 5** – Temperaturas utilizadas na espectroscopia de emissão de fluorescência de ASH na presença dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). 56
- Tabela 6** – Concentração final dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 305 K, 310 K e 315 K. 56
- Tabela 7** – Concentração final dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L diluída na proporção (1:1), em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 305 K, 310 K e 315 K. 57
- Tabela 8** – Temperaturas utilizadas na espectroscopia de dicroísmo circular de ASH na presença dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). 57
- Tabela 9** – Concentração dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) após a adição de alíquotas de uma solução das LFs ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), em 3 mL da solução de ASH ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L), para T=305 K, 310 K e 315 K. 57
- Tabela 10** – Concentração final da 1,2-naftoquinonas LF após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,48 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 58
- Tabela 11** – Valores de K_{SV} e k_q obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K). 64
- Tabela 12** – Valores de K_a obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K). 66

Tabela 13 - Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para as 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). 66

Tabela 14 – Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH° , ΔS° e ΔG° obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). 68

Tabela 15 - Valores de número e ordem de ligação (n e K_b) obtidos a partir dos gráficos de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). 71

Tabela 16 - Valores de J , R_0 , E e r calculados a partir da sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K, 310 K e 315 K) e o espectro de absorção UV-Vis das 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 75

Tabela 17 - % hélice- α calculado em 208 nm e em 222 nm para ASH ($pH = 7,4$) em 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), $T = 305$ K, 310 K e 315 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LFs, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$ e $32,30$ ($\times 10^{-6}$) mol/L 80

Tabela 18 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF ($C_{LF} = 1,48 \times 10^{-3}$). 83

Tabela 19 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF4Br ($C_{LF4Br} = 7,88 \times 10^{-4}$). 102

Tabela 20 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF4Cl ($C_{LF4Cl} = 3,22 \times 10^{-4}$). 109

Tabela 21 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF4Me ($C_{LF4Me} = 1,38 \times 10^{-3}$). 117

Tabela 22 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF24Me ($C_{LF24Me} = 1,18 \times 10^{-3}$). 124

Tabela 23 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LP4Me ($C_{LP4Me} = 1,12 \times 10^{-3}$). 132

Tabela 24 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LP24Me ($C_{LP24Me} = 1,67 \times 10^{-4}$). 139

Tabela 25 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LP4F ($C_{LP4F} = 9,74 \times 10^{-4}$). 147

Tabela 26 – MRE calculado em nm e em nm para ASH ($pH = 7,4$) em derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), $T = 305$ K, 310 K e 315 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LFs, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LFs} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L. 148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura para os diferentes tipos de quinonas	1
Figura 2 – Resumo esquemático do ciclo oxidativo das quinonas, representado pela β -lapachona	6
Figura 3 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas	10
Figura 4 – Estrutura de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas	11
Figura 5 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas	12
Figura 6 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)	12
Figura 7 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)	13
Figura 8 – Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína [Lehninger <i>et al.</i> (1993)]	15
Figura 9 – Estrutura primária de uma proteína caracterizada pela formação de uma ligação peptídica	15
Figura 10 – Estrutura secundária para uma proteína tipo: a) hélice- α e b) folha- β [Lehninger <i>et al.</i> (1993)]	16
Figura 11 – Exemplo de estrutura terciária para uma proteína. Treptavidina, uma proteína formada apenas por folhas beta e alças	16
Figura 12 – Exemplo de estrutura quaternária para uma proteína. Oxi-hemoglobina, uma proteína formada apenas por hélices- α e alças [PDB, 1HHO]	16
Figura 13 – a) Estrutura secundária da ASH, ilustrando a localização dos subdomínios, codificados por cores: IA-vermelho; IB-vermelho claro; IIA, verde; IIB-verde claro; IIIA,-azul; IIIB-azul claro. (GHUMAN <i>et al.</i> , 2005) b) Estrutura quaternária da ASH com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque (construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB (Protein Data Bank)) [Dose (1982)]	19
Figura 14 – Esquema da luz elípticamente polarizada gerada por dicroísmo circular, onde (R) e (L) representam a magnitude dos vetores elétricos da luz circularmente polarizada para a direita e esquerda respectivamente, sendo θ o valor medido para a elipticidade como resultado do efeito Cóton observado [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf]	23
Figura 15 – Representação esquemática de um aparelho de dicroísmo circular DC, onde são mostrados os componentes básicos para sua operação. [modificado de http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance]	24
Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular representativos de estruturas secundárias de proteínas [modificado de www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf]	25

Figura 17 – Espectro de absorção e emissão de fluorescência para os aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c) triptofano [modificado de Lakowicz (2006)]	28
Figura 18 – Espectro de anisotropia de absorção do triptofano como função da orientação do resíduo indólico em relação as bandas 1L_a e 1L_b . [modificado de Lakowicz (2006)]	30
Figura 19 – Espectro de emissão de fluorescência do resíduo indólico do triptofano em diferentes ambientes químicos [modificado de Lakowicz (2006)]	31
Figura 20 – Processos de supressão intermoleculares descritos pelos mecanismos: estático e dinâmico [modificado de Lakowicz (2006)]	31
Figura 21 – Mecanismos de supressão de fluorescência: a) mecanismo estático e b) mecanismo dinâmico	32
Figura 22 – Descrição hipotética do processo de supressão de fluorescência do fluoróforo F pelo supressor Q [modificado de Valeur (2001)]	34
Figura 23 – Gráfico de Stern-Volmer para o modelo de supressão estática da fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q [modificado de Lakowicz (2006)]	35
Figura 24 – Gráfico de supressão de fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q segundo o modelo de supressão estática de Perrin [modificado de Lakowicz (2006)]	36
Figura 25 – Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmica da fluorescência do fluoróforo F por um supressor Q . [modificado de Lakowicz (2006)]	39
Figura 26 – Gráfico de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificado para o processo de supressão combinado (estática e dinâmica) da fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q [modificado de Lakowicz (2006)]	41
Figura 27 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de um sistema contendo mais de um fluoróforo sendo apenas um deles acessível. [modificado de Lakowicz (2006)]	43
Figura 28 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a possibilidade de mais de um sítio de ligação. [modificado de Lakowicz (2006)]	44
Figura 29 – Representação esquemática da integral de sobreposição para o processo de Transferência de energia ressonante (não-radiativa) de Förster. [modificado de Turro (1978)]	45
Figura 30 – Representação esquemática do processo de Transferência de energia ressonante (não-radiativa) de Förster [modificado de Turro (1978)]	45
Figura 31 – Princípios de fluorimetria resolvida no tempo pulsada [modificado de Valeur (2001)]	48
Figura 32 – Curva de decaimento de fluorescência [modificado de Lakowicz (2006)]	50

Figura 33 – Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho. 51

Figura 34 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. 59

Figura 35 - Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações da 1,2-naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. 60

Figura 36 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF) $C_{LF} = 0,99$ ($\times 10^{-5}$) mol/L e da 1,2-naftoquinona LF em PBS, $C_{LF} = 0,99$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. 61

Figura 37 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações da 1,2-naftoquinona LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K. 62

Figura 38 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF). 64

Figura 39 - Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF). 65

Figura 40 - Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF). 67

Figura 41 - Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF). 71

Figura 42 - Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da 1,2-naftoquinona (LF). $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 74

Figura 43 - Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da 1,2-naftoquinona (LF). $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 74

Figura 44 - Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da 1,2-naftoquinona (LF). $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 75

Figura 45 - Espectros de dicroísmo circular de ASH (pH = 7,4), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 305$ K, 310 K e 315 K. 77

Figura 46 - Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 78

Figura 47 - Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH : LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0$; 3,98 ; 7,94; 15,75 e 31,01 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 310 K. 78

Figura 48 - Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0$; 3,98 ; 7,94; 15,75 e 31,01 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 315 K. 79

Figura 49 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 82

Figura 50 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0$; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85; 11,20; 22,40 e 44,80 ($\times 10^{-6}$) mol/L) a T = 298 K. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 83

Figura 51 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0$; 0,33; 0,66; 9;90; 1;32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 ($\times 10^{-5}$) mol/L. 95

Figura 52 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF4Br) $C_{LF4Br} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF4Br em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 95

Figura 53 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0$; 0,33; 0,66; 9;90; 1;32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 ($\times 10^{-5}$) mol/L, a T = 310 K. 96

Figura 54 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Br. 96

Figura 55 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Br. 97

Figura 56 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Br. 97

Figura 57 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Br. 98

Figura 58 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Br. $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 98

Figura 59 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Br. $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 99

Figura 60 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Br. $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 99

Figura 61 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Br, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 100

Figura 62 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Br, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K. 100

Figura 63 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Br, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K. 101

Figura 64 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF4Br) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0$; 2,62; 5,22; 7,80; 10,40; 12,90; 15,50; 18,00; 20,50; 39,90; 76,00 ($\times 10^{-6}$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 101

Figura 65 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0$; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 ($\times 10^{-5}$) mol/L. 102

Figura 66 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF4Br) $C_{LF4Br} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF4Br em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 103

Figura 67 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0$; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K. 103

Figura 68 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Cl. 104

Figura 69 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Cl. 104

Figura 70 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Cl. 105

Figura 71 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona LF4Cl. 105

Figura 72 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Cl, $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 106

Figura 73 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Cl, $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 106

Figura 74 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Cl, $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 107

Figura 75 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Cl, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 107

Figura 76 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Cl, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{CH35F} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K. 108

Figura 77 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K. 108

Figura 78 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF4Cl) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0$; 1,07; 2,13; 3,19; 4,24; 5,28; 6,31; 7,34; 8,36; 16,3; 31,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 109

Figura 79 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0$; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 ($\times 10^{-5}$) mol/L. 110

Figura 80 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF4Me) $C_{LF4Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF4Me em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 110

Figura 81 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0$; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 e ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K. 111

Figura 82 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Me. 111

Figura 83 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Me. 112

Figura 84 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Me. 112

Figura 85 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Me. 113

Figura 86 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF4Me, $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 113

Figura 87 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF4Me, $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 114

Figura 88 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF4Me, $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 114

Figura 89 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K. 115

Figura 90 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K. 115

Figura 91 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K. 116

Figura 92 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF4Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4,58; 9,14$ ($x 10^{-6}$ mol/L); 1,37; 1,82; 2,26; 2,71; 3,15; 3,58, 6,99 e 13,30 ($x 10^{-5}$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 116

Figura 93 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) em LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($x 10^{-5}$) mol/L. 117

Figura 94 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF24Me) $C_{LF24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF24Me em PBS, $C_{LF24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 118

Figura 95 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) em LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($x 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K. 118

Figura 96 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF24Me. 119

Figura 97 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF24Me. 119

Figura 98 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF24Me. 120

Figura 99 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) LF24Me. 120

Figura 100 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF24Me, $C_{ASH} = C_{LF24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 121

Figura 101 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF24Me, $C_{ASH} = C_{LF24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 121

Figura 102 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF24Me, $C_{ASH} = C_{LF24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 122

Figura 103 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K. 122

Figura 104 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K. 123

Figura 105 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K. 123

Figura 106 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF24Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,92; 7,81; 11,70; 15,50; 19,30; 23,10; 26,90; 30,60; 59,70$ e $114,00 (x 10^{-6})$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 124

Figura 107 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) em LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5})$ mol/L. 125

Figura 108 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LP4Me) $C_{LP4Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LP4Me em PBS, $C_{LP4Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 125

Figura 109 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 0,25; 0,50; 0,74; 0,98; 1,22; 1,46; 1,69$ e $1,92(x 10^{-5})$ mol/L, a $T = 310$ K. 126

Figura 110 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4Me. 126

Figura 111 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4Me. 127

Figura 112 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4Me. 127

Figura 113 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4Me. 128

Figura 114 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4Me, $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 128

Figura 115 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4Me, $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 129

Figura 116 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4Me, $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 129

Figura 117 – Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em LP4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me}=0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K. 130

Figura 118 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} =0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K. 130

Figura 119 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} =0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K. 131

Figura 120 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LP4Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 3,72; 7,42; 11,10; 14,70; 18,40; 22,00; 25,50; 29,10; 56,70$ e $108,00 (x 10^{-6})$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 131

Figura 121 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP24Me} =0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5})$ mol/L. 132

Figura 122 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LP24Me) $C_{LP24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LP24Me em PBS, $C_{LP24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 133

Figura 123 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5})$ mol/L, a $T = 310$ K. 133

Figura 124 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP24Me. 134

Figura 125 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP24Me. 134

Figura 126 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP24Me. 135

Figura 127 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP24Me. 135

Figura 128 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP24Me, $C_{ASH} = C_{LP24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 136

Figura 129 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP24Me, $C_{ASH} = C_{LP24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 136

Figura 130 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP24Me, $C_{ASH} = C_{LP24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 137

Figura 131 – Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em LP24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K. 137

Figura 132 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K. 138

Figura 133 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K. 138

Figura 134 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LP24Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 0,56; 1,11; 1,65; 2,20; 2,74; 3,27; 3,81; 4,34; 8,46$ e $16,10 (x 10^{-6})$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 139

Figura 135 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. 140

Figura 136 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LP4F) $C_{LP4F} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LP4F em PBS, $C_{LP4F} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L. 140

Figura 137 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K. 141

Figura 138 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4F. 141

Figura 139 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4F. 142

Figura 140 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4F. 142

Figura 141 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4F. 143

Figura 142 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4F, $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 143

Figura 143 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4F, $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 144

Figura 144 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4F, $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 144

Figura 145 – Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em LP4F, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 145

Figura 146 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4F, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K. 145

Figura 147 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4F, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K. 146

Figura 148 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LP4F) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,24; 6,45; 9,64; 12,80; 16,00; 19,10; 22,20; 25,30; 49,30; 93,90$ ($\times 10^{-6}$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 As Quinonas	1
1.1.1 As Naftoquinona	2
1.1.2 O Lapachol	3
1.1.3 A β -Lapachona	5
1.1.4 Importância Biológica das Quinonas	6
1.2 Aminoácidos	8
1.2.1 Aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas	10
1.2.2 Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas	10
1.2.3 Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas	11
1.2.4 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)	12
1.2.5 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)	12
1.3 Proteínas	13
1.3.1 Albuminas	17
1.3.2 Albumina sérica humana (ASH)	17
1.4 Estudo da interação entre ASH e compostos bioativos	19
1.4.1 Absorção de luz no ultravioleta-visível (UV-Vis)	21
1.4.2 Absorção de luz circularmente polarizada Dicroísmo circular - Cálculo da porcentagem de estrutura hélice	22
1.4.2.1 Cálculos da porcentagem de estrutura hélice- α	25
1.4.3 Estudos de fluorescência de proteínas	26
1.4.3.1 Propriedades Espectrais dos Aminoácidos Aromáticos	28
1.5 Estudos de supressão de fluorescência	31
1.5.1 Supressores de Fluorescência	33
1.5.2 Modelos teóricos para os processos de supressão	33
1.5.2.1 Supressão Estática	33
1.5.2.2 Teoria da Supressão Colisional	36
1.5.3 Equação de Stern-Volmer modificada para o processo de supressão combinado: estático e dinâmico	40
1.5.4 Equação de Stern-Volmer modificada para um sistema contendo mais de um fluoróforo	42

1.5.5 Equação de Stern-Volmer modificada para um sistema contendo mais de um sítios de interação (n)	43
1.6 Transferência de energia a longa distância	44
1.6.1 Processo de transferência de energia ressonante de Förster	44
1.7 Fluorescência resolvida no tempo	48
2 OBJETIVO	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1.1 Aparelhos	52
3.1.2 Vidraria	52
3.1.3 Reagentes	52
3.2 Métodos	53
3.2.1 Soluções	53
3.2.2 Estudos espectroscópicos na região do ultravioleta/visível (UV-Vis)	53
3.2.3 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência	54
3.2.4 Estudos espectroscópicos de dicroísmo circular	55
3.2.5 Condições de análises	55
3.2.5.1 Ultravioleta/Visível	55
3.2.5.2 Fluorescência	56
3.2.5.3 Dicroísmo	57
3.2.5.4 Experimento de tempo de vida de fluorescência	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)	59
4.2 Espectroscopia de fluorescência	61
4.3 Cálculo do raio de Förster	72
4.4 Dicroísmo circular (DC)	77
4.5 Tempo de vida de fluorescência	81
5 CONCLUSÕES	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Quinonas

As quinonas podem ser definidas quimicamente como compostos formados a partir da oxidação de fenóis. Sua principal característica estrutural é a presença de dois grupos carbonílicos formando um sistema conjugado. Esses compostos podem ser agrupados em diferentes classes que estão baseadas nos diversos tipos do sistema cíclico (Figura 1):

a) Benzoquinonas são compostos dicarbonílicos conjugados que possuem apenas um anel benzênico.

b) Naftoquinonas dividem-se em 1,2 e 1,4-naftoquinonas, dependendo da posição dos grupos carbonílicos.

c) Antraquinonas podem ser definidas quimicamente como substâncias fenólicas derivadas da dicetona do antraceno sendo caracterizado por ser uma *para*-quinona.

d) Fenantrenoquinonas são derivadas do fenantreno, sendo esta última uma *orto*-quinona.

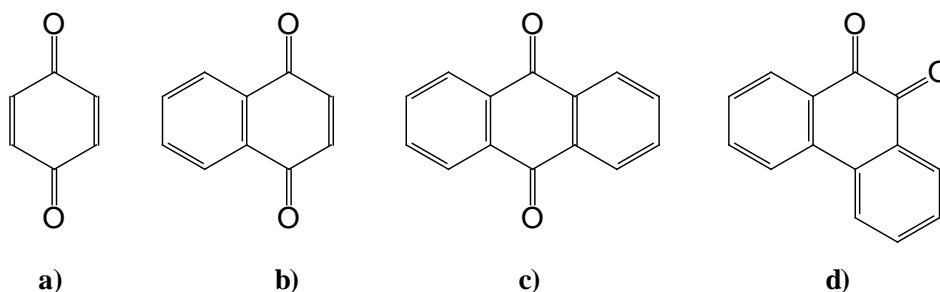


Figura 1 – Estrutura para os diferentes tipos de quinonas

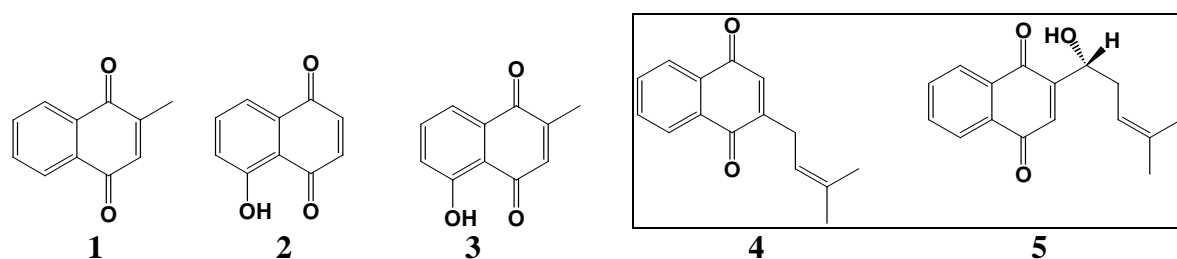
Na natureza as quinonas são encontradas em várias famílias de plantas, fungos, bactérias e insetos, e se destacam por apresentar atividade antimalária [Santos *et al.* (2004), Fieser (1927) e Fieser *et al.* (1948)], antitumoral [Silva *et al.* (2003), Liu *et al.* (2004) e Asche (2005)], antiviral [Pinto *et al.* (1987)], anti-inflamatória [Almeida *et al.* (1990)], antibacteriana [Guiraud *et al.* (1994)], antifúngica [Garnier *et al.* (1996) e Almeida *et al.* (1990)], tripanossomicida [Pinto *et al.* (2000), De Moura *et al.* (2001) e Garnier *et al.* (1996)], moluscicida [Santos *et al.* (2000), Dos Santos *et al.* (2001), Asche (2005) e Barbosa *et al.* (2005)], leishmanicida [Teixeira *et al.* (2001)], antiprotozoário [De Moura *et al.* (2001) e

Zani *et al.* (1997)] e inibidora da enzima transcriptase reversa do vírus HIV [Stagliano *et al.* (2006) e Zani *et al.* (1997)].

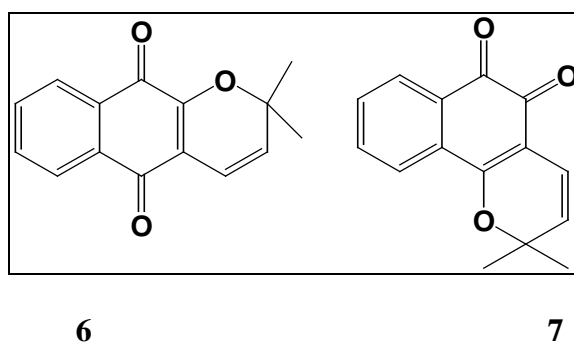
1.1.1 As naftoquinonas

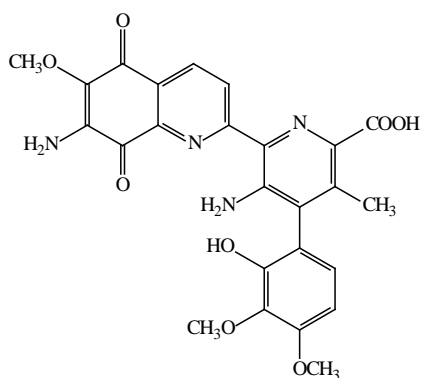
Naftoquinonas são substâncias com grande importância na química medicinal, o que se deve à sua capacidade de atuar como um agente oxirredutor através da parte quinoidal, podendo assim atuar no transporte de elétrons e processos de fosforilação oxidativa.

Inicialmente foi utilizada na indústria dos corantes. As naftoquinonas naturais, como a lawsona (**1**), juglona (**2**), plumbagina (**3**), lapachol (**4**), e shicona (**5**) foram isoladas de fontes vegetais e se destacam por seus usos na medicina tradicional [Bruneton (2001)].

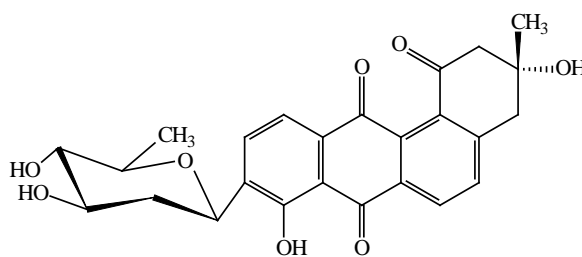


Outros exemplos de naftoquinonas naturais são: α -lapachona (**6**), β -lapachona (**7**), estreptonigrina (**8**) e urdamicinona (**9**), as quais possuem uma grande variedade de diferentes tipos de atividades biológicas.



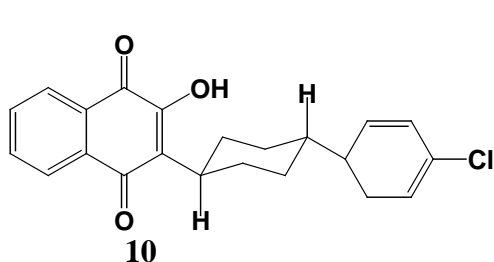


8

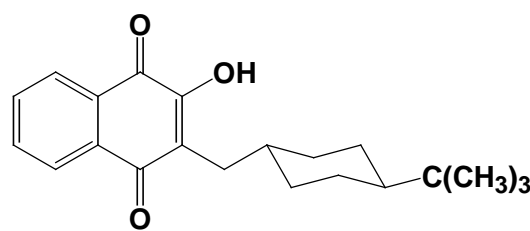


9

Duas substâncias sintéticas derivadas do lapachol, a atovaquona (10) e a buparvaquona (11) encontram-se sob forma comercial, sendo a primeira antimalárica, contra protozoários do gênero *Plasmodium* [Chukwuemeka (1999)] e a segunda, contra leishmaniose animal.



10



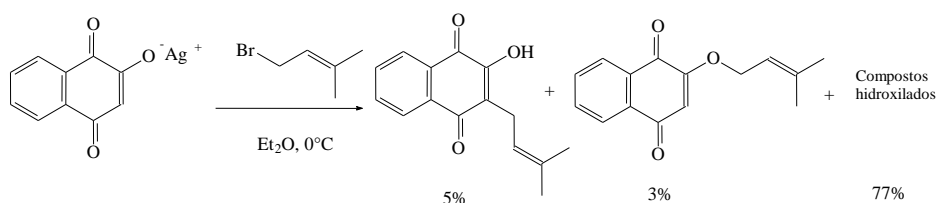
11

1.1.2 O Lapachol

Os estudos com o lapachol (4) tiveram seu início com os trabalhos de Arnaudon que foi o primeiro a proceder ao seu isolamento do cerne de uma árvore Argentina, conhecida pelos índios como lapacho [Arnaudon (1858)], sendo que Paternò realizou uma série de estudos na tentativa de elucidar a estrutura do lapachol [Paternò (1882)].

Atualmente sabe-se que o lapachol (4) pode ser isolado a partir de inúmeras espécies de plantas das Famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae. No Brasil o lapachol (4) pode ser encontrado em grandes quantidades nas árvores da espécie *Tabebuia impetiginosa*. (Ipê) sendo facilmente obtido por método de extração ácido-base [Ferreira (1996)].

Uma proposta estrutural foi sugerida por Hooker [Hooker (1892) e Hooker (1896)], sendo que a sua elucidação se deu posteriormente por Fieser, através de sua síntese pela alquilação do sal de prata da lausona (12) a (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) com 1-bromo-3-metil-3-butenol, em uma solução etérea a 0°C [Fieser (1927)] (Esquema 1).



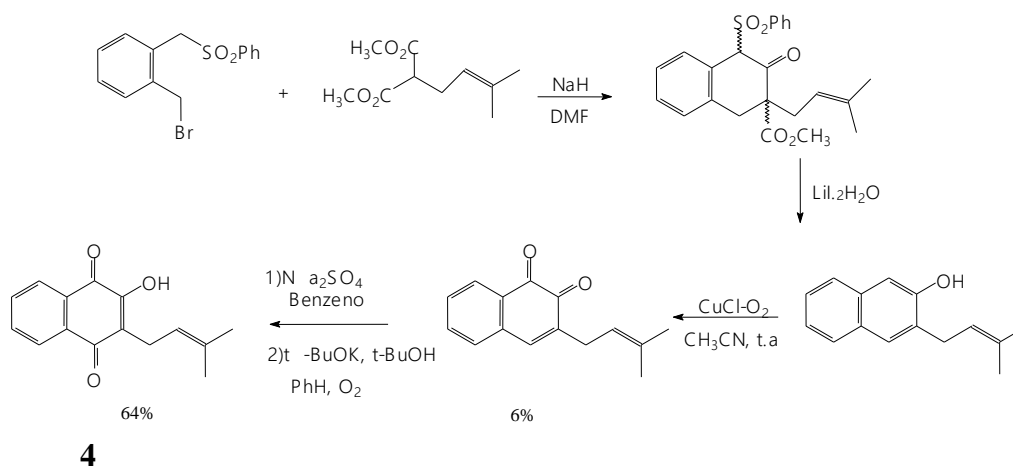
12

4

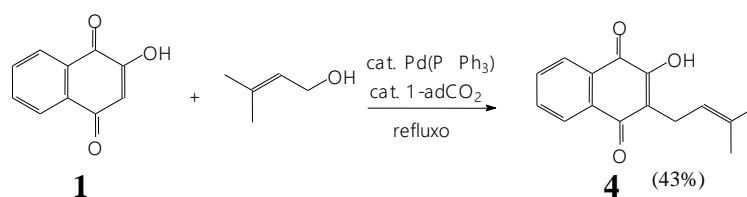
Esquema 1

Desde a descoberta de sua atividade biológica contra o carcinoma de Walker-256 [Rao *et al.* (1968)], o lapachol (**4**) vem sendo alvo de inúmeras pesquisas, nas quais são propostas modificações estruturais de forma a obter novos compostos bioativos.

Entre esses métodos de síntese podemos destacar as reações de acoplamento propostas por Ghera e Bem-David (Esquema 2) [Ghera e Ben-David (1985)] e por Spyrondis e colaboradores (Esquema 3) [Kazantzi *et al.* (2007)].

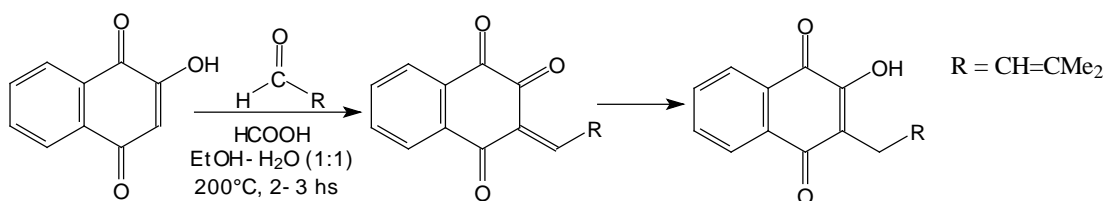


Esquema 2



Esquema 3

Recentemente uma metodologia baseada na condensação de Knoevenagel da lausona (1) e 3-metil-but-2-enal, seguida de uma reação de redução foi proposta por Ferreira e colaboradores [Ferreira *et al.* (2011)] (Esquema 4).



Esquema 4

1.1.3 A β -Lapachona

A β -lapachona (7) pode ser classificada como uma 1,2-naftoquinona de ocorrência natural em plantas da família Bignoniaceae. Pode ser obtida sinteticamente a partir do lapachol (4) via uma reação em meio de ácido sulfúrico concentrado [Hooker (1892)]. A β -lapachona (7) também pode ser obtida partindo-se da lausona (1) em uma reação de uma única etapa [Ferreira *et al.* (2009)].

Mesmo apresentando uma considerável atividade biológica contra *T. cruzi* e contra células cancerosas a β -lapachona (7) não pode ser utilizada como fármaco devido à sua elevada citotoxicidade. No entanto esta citotoxicidade pode ser vista como uma estratégia importante para o controle da proliferação de diversos tipos de células cancerosas, apresentando uma elevada atividade *in vitro* contra linhagens de células humanas malignas de pulmão, mama, colo-retal, próstata, melanoma e leucemia.

Em alguns estudos radioterápicos, a β -lapachona (7) vem apresentando uma ação sinérgica, aumentando o efeito desse tipo de tratamento sobre células de melanoma humano (U1-Mel) [Bey *et al.* (2007)].

Os mecanismos de ação da β -lapachona (7) nas células cancerígenas ainda não estão bem esclarecidos. Acredita-se que ela possa atuar diretamente nas enzimas de reparação do DNA como a topoisomerase II, NAD(P)H e quinona oxidoreductase-1 (NQO1), sendo que a sua atividade biológica está relacionada ao processo de apoptose (morte celular programada), o qual aumenta a sua citotoxicidade.

1.1.4 - Importância Biológica das Quinonas

Do ponto de vista químico, a atividade biológica apresentada pelas quinonas está diretamente ligada ao ciclo redox como consequência de sua estrutura química, e assim induzir o estresse oxidativo nas células [Ferraz *et al.* (2001)], através da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como: ânions radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (HO^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) [Almeida *et al.* (1990)].

A geração das ERO no ambiente celular é responsável pela condição descrita como estresse oxidativo, causando danos irreversíveis em algumas biomoléculas-chave, como DNA e proteínas [Salas *et al.* (2008)], podendo levar até mesmo à apoptose [Garnier *et al.* (1996)]. O ciclo redox descrito na Figura 2 foi proposto como um mecanismo biológico de atuação das quinonas [Salas *et al.* (2008), Pinto *et al.* (2000), de Moura *et al.* (2001) e da Silva *et al.* (2003)].

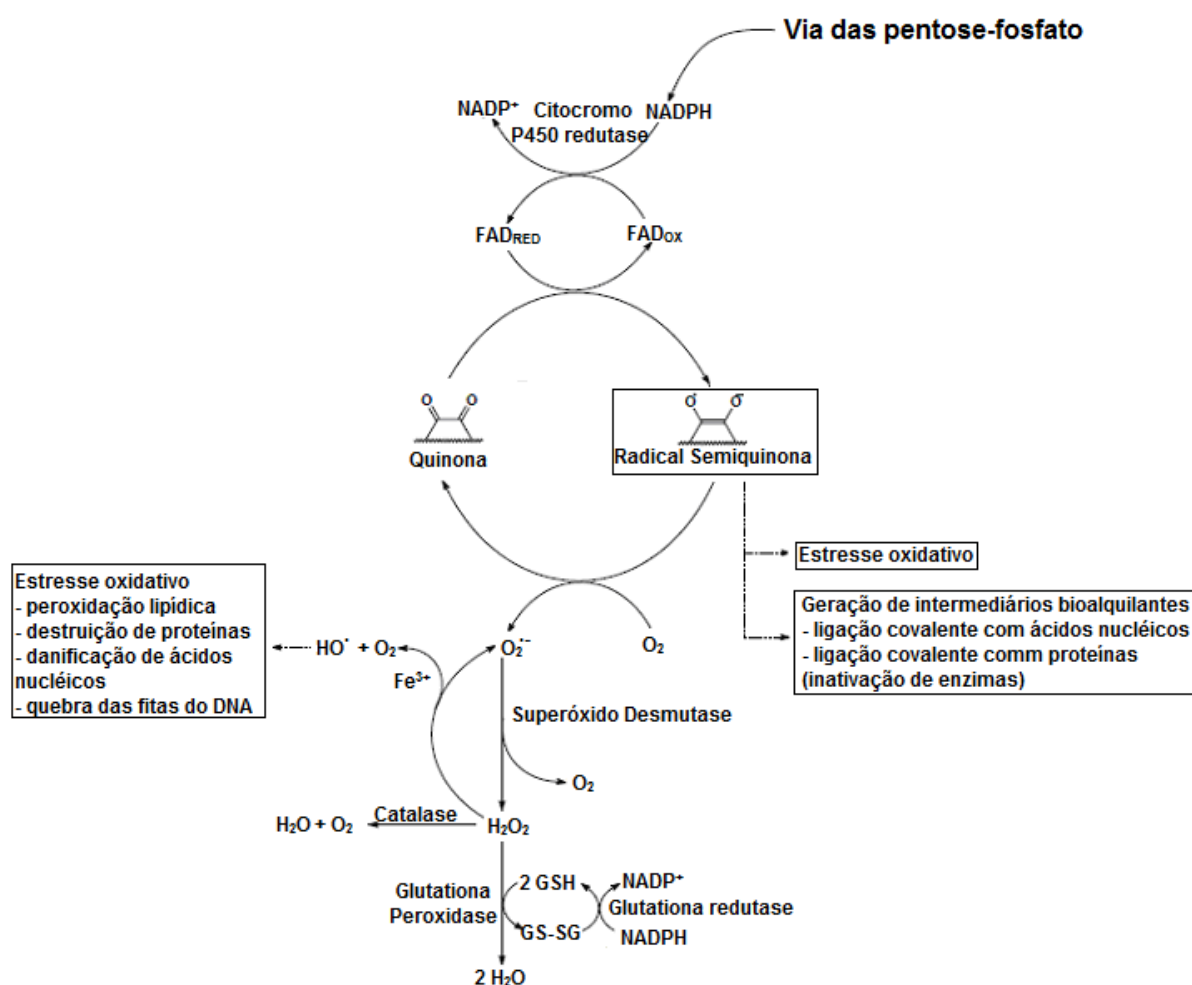
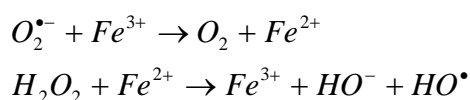


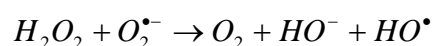
Figura 2 – Resumo esquemático do ciclo oxidativo das quinonas, representado pela β -lapachona

O mecanismo proposto envolve inicialmente um processo de redução do substrato quinônico (SQ) através da transferência de um elétron ($SQ^{\cdot-}$) ou de dois elétrons ($SQ^{\cdot-2}$) a partir da enzima NADPH citocromo P450 redutase (P450R). NADH citocromo b5 redutase (b5R) e NADH ubiquinona oxidoreductase [Wang *et al.* (2010), Yan *et al.* (2008), Holtz *et al.* (2003)]. Na etapa seguinte o radical semiquinona, formado pela redução de um elétron, pode sofrer oxidação, em condições aeróbicas, restaurando a quinona inicial, e gerando o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esse ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em solução aquosa, e na presença de oxigênio molecular, desencadeia uma série de reações subsequentes gerando peróxido de hidrogênio, que na presença de ferro (Fe^{2+}) forma o radical hidroxila (HO^{\cdot}) através da reação de Fenton [Asche (2005) e Zani *et al.* (1997)]. Alternativamente a formação do radical hidroxila pode se dar por uma reação do peróxido de hidrogênio com ($O_2^{\cdot-}$), numa reação conhecida como de Haber-Weiss [Brumark *et al.* (1989)] (esquema 5) O radical hidroxila é a espécie reativa de oxigênio que causa os maiores danos celulares devido ao seu elevado potencial de oxidação (2,8 eV), com a sua ação sendo direcionada tanto para as bases nitrogenadas do DNA quanto para as unidades de carboidratos, resultando na quebra da ligação N-glicosídica.

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



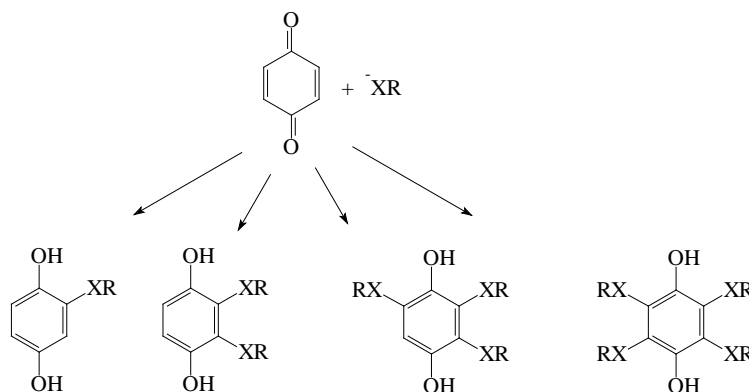
Esquema 5

A atividade biológica das quinonas, baseadas em seu potencial redox, depende estritamente da sua estrutura. Sendo assim, grupos substituintes aceptores de elétrons ligados diretamente ao sistema quinônico serão capazes de alterar a densidade eletrônica sobre o sistema conjugado da dicetona e terão efeitos significativos em sua eficiência como substratos geradores de EROs

Devido a esse processo, as quinonas têm forte citotoxicidade tanto sobre as células cancerígenas quanto sobre as normais, atuando também sobre as enzimas como as topoisomerases, que são críticas para a replicação do DNA [Stagliano *et al.* (2006)].

Outra característica química importante para a atividade biológica das quinonas, está correlacionada com a sua habilidade em atuar como ácidos de Lewis (eletrófilo) e, dessa forma participar como substrato em reações nucleofílicas nos processos metabólicos e, como

consequência, gerar derivados que podem apresentar uma maior toxicidade (Esquema 6) [El-Najjar *et al.* (2011)].



Esquema 6

1.2 Aminoácidos

Um composto caracterizado como aminoácido é qualquer molécula que contém na mesma molécula os grupos funcionais amina e ácido carboxílico. Em bioquímica, este termo é usado como termo curto e geral para se referir aos aminoácidos alfa, ou seja, aqueles em que as funções amina (NH_3^+) e carboxila (COO^-) estão ligadas ao mesmo carbono.

Existem várias classes de aminoácidos. Os aminoácidos padrões, primários ou protéicos são os 20 aminoácidos frequentemente encontrados em proteínas (**Tabela 1**). Os aminoácidos especiais, secundários ou raros são aqueles que ocorrem apenas em certos tipos de proteínas. Normalmente são derivados dos aminoácidos padrões, como por exemplo, 4-hidroxiprolina e 5-hidroxilisina (colágeno), N-metil-lisina (miosina), γ -carboxiglutamato (protrombina) e desmosina (elastina).

Tabela 1 – Valor de constante de dissociação (pK) e ponto isoeletrônico (pI) dos aminoácidos normalmente encontrados em proteínas

Aminoácido	Abreviações			pK			pI
	Comum	Letra	α -COOH	α -NH ₃	Outro (R)		
Alanina	Ala	A	2,34	9,69	-	6,02	
Arginina	Arg	R	2,17	9,04	12,48 (guanidino)	10,76	
Aspartato	Asp	D	2,09	9,82	3,86 (carboxil)	2,97	
Asparagina	Asn	N	2,02	8,80	-	5,41	
Glutamato	Glu	E	2,19	9,67	4,25 (carboxil)	3,22	
Glutamina	Gln	Q	2,17	9,13	-	5,65	
Cisteína	Cys	C	1,96	10,28	8,18 (sulfidril)	5,07	
Fenilalanina	Phe	F	1,83	9,13	-	5,48	
Glicina	Gly	G	2,34	9,60	-	5,97	
Histidina	His	H	1,82	9,17	6,0 (imidazol)	7,59	
Isoleucina	Ile	I	2,36	9,68	-	6,02	
Leucina	Leu	L	2,36	9,60	-	5,98	
Lisina	Lys	K	2,18	8,95	10,53 (ϵ -amino)	9,74	
Metionina	Met	M	2,28	9,21	-	5,75	
Prolina	Pro	P	1,99	10,60	-	6,30	
Serina	Ser	S	2,21	9,15	-	5,68	
Tirosina	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07 (fenol)	5,66	
Treonina	Thr	T	2,63	10,43	-	6,53	
Triptofano	Trp	W	2,38	9,39	-	5,66	
Valina	Val	V	2,32	9,62	-	5,97	

Os aminoácidos apresentam as seguintes propriedades gerais:

- Com exceção da glicina, todos os aminoácidos são ópticamente ativos, ou seja, desviam o plano da luz polarizada.
- As configurações absolutas de açúcares simples e aminoácidos são especificadas pelo sistema D,L. Os α -aminoácidos que constituem as proteínas têm a configuração estereoquímica L. Os D-aminoácidos são encontrados em alguns antibióticos: valinomicina e actinomicina D, e em paredes de algumas bactérias: peptidoglicano.
- A cadeia lateral (R) determina as propriedades de cada aminoácido.

Os α -aminoácidos são divididos em classes, com base na natureza das cadeias laterais (grupo R). Os 20 tipos de cadeias laterais dos aminoácidos protéicos variam em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de ligações de hidrogênio, características hidrofóbicas e reatividade química.

1.2.1 Aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas

(glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina)

Os grupos R nessa classe de aminoácidos são hidrofóbicos e não-polares (Figura 3). As cadeias laterais volumosas da alanina, valina, leucina e isoleucina, com suas formas estruturais específicas, desempenham papel fundamental na estabilização da estrutura secundária das proteínas pela promoção de interações hidrofóbicas em seu interior. A glicina é o aminoácido de estrutura mais simples, apresentando dois hidrogênios ligados ao carbono α , não contribuindo efetivamente para a existência de interações hidrofóbicas. Além dessas interações hidrofóbicas, podemos destacar ainda a metionina, que apresenta um grupamento tioéter na cadeia lateral, e a prolina que possui uma estrutura cíclica (grupo imino) que leva à redução da flexibilidade local na região polipeptídica que a contém.

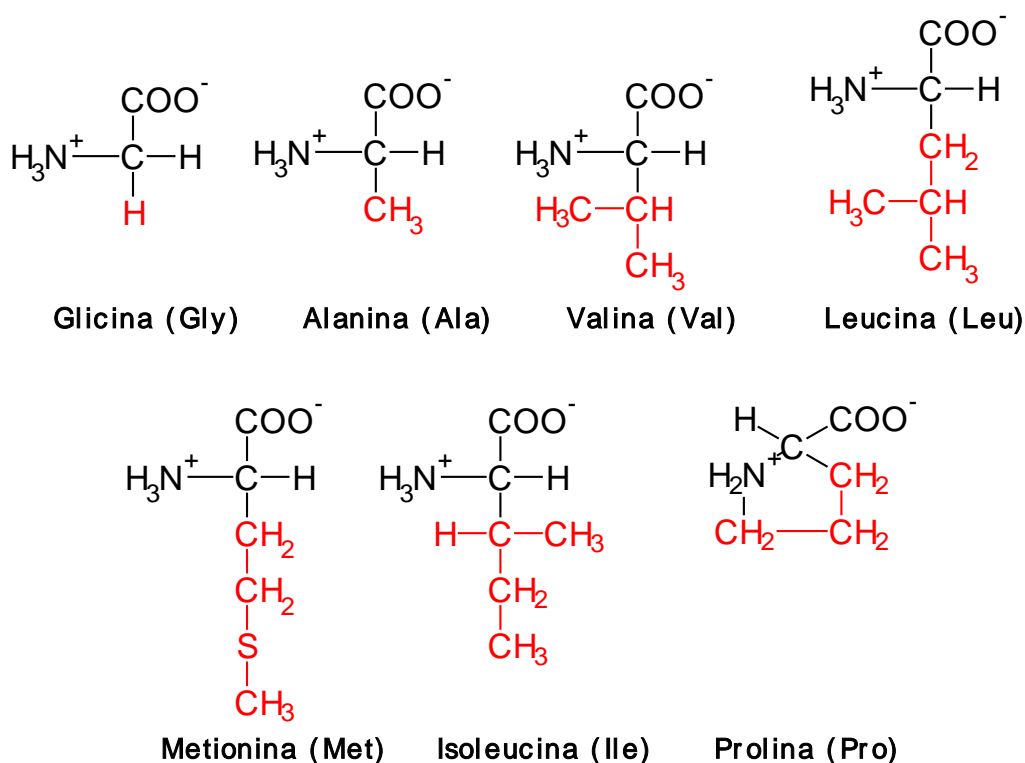


Figura 3 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais não-polares e alifáticas

1.2.2 Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas

(fenilalanina, tirosina, triptofano)

Os α -aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 4) possuem em sua cadeia lateral grupos substituintes aromáticos e podem ser classificados como relativamente apolares

(hidrofóbicos), podendo ainda desenvolver, quando possível, interações do tipo π -stacking e tipo-T. Em alguns casos, como o da tirosina, que possui uma hidroxila fenólica, pode-se observar a formação de ligações de hidrogênio e de reações de desprotonação, resultando em fenolatos, sendo, por isso, um grupo funcional importante na atividade de algumas enzimas. Já o α -aminoácido triptofano, que possui um anel indólico, apresenta um ligeiro momento dipolar como consequência da sua estrutura química, sendo também capaz de fazer ligações de hidrogênio relativamente fracas.

Devido ao fato do triptofano, tirosina e fenilalanina apresentarem sistemas cromofóricos, esses podem absorver luz na região ultravioleta baixo do espectro (250 a 300 nm). Esse fato é responsável por uma forte absorbância da luz pelas proteínas no comprimento de onda próximo a 280nm.

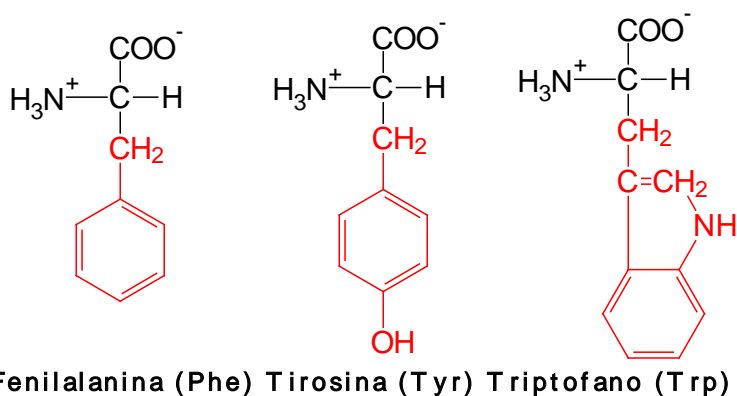


Figura 4 – Estrutura de aminoácidos com cadeias laterais aromáticas

1.2.3 Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas

(serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina)

A cadeia lateral R dos α -aminoácidos: serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina (Figura 5) apresenta grupo funcional “hidrogênio prótico” capaz de estabelecer fortes interações por ligação de hidrogênio com a água e, conseqüentemente, tornando esse compostos mais solúveis em ambiente hidrofílico. A polaridade da serina e da treonina é devida a seus respectivos grupos hidroxila; a da cisteína, a seu grupo sulfidril; e a da asparagina e da glutamina, a seus grupos amida.

A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico, unido covalentemente, chamado de cistina, no qual duas moléculas de cisteína estão unidas por uma ligação dissulfeto. Os resíduos unidos por ligação dissulfeto são fortemente hidrofóbicos (apolares). As ligações dissulfeto têm um papel importante na estabilização de estruturas de

muitas proteínas, em virtude de formação de ligações covalentes entre diferentes partes de uma molécula protéica ou entre duas cadeias protéicas distintas.

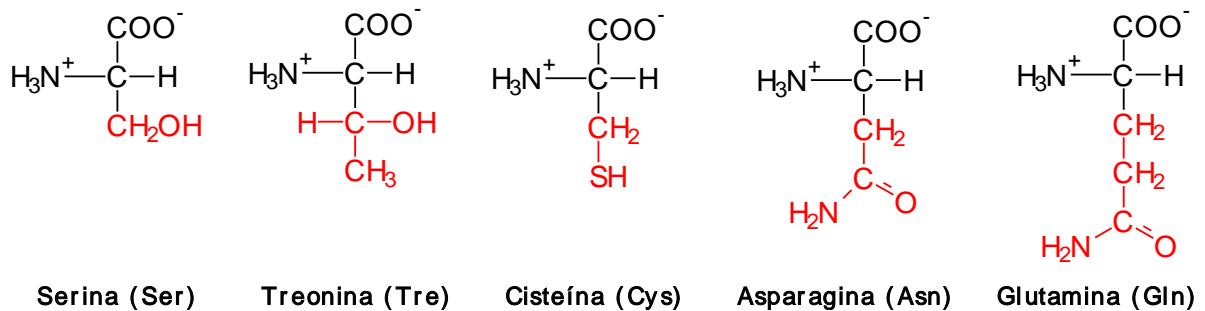


Figura 5 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas

1.2.4 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)

(*aspartato, glutamato*)

Em pH fisiológico (pH=7) os α -aminoácido aspartato e glutamato tem uma carga líquida negativa, sendo caracterizados pela presença em sua estrutura de um segundo grupo carboxila (Figura 6).

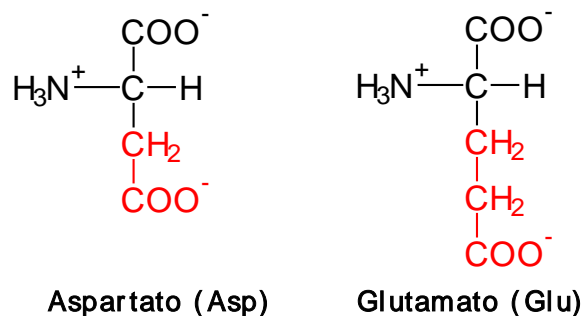


Figura 6 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)

1.2.5 Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)

(*arginina, lisina, histidina*)

As cadeias laterais R com características mais hidrofílicas (Figura 7) são aquelas carregadas positiva ou negativamente. Os aminoácidos que sustentam em sua estrutura uma carga positiva líquida em pH 7 são a lisina e a arginina que apresentam um grupo amônio e um grupo guanidino imida, respectivamente. O α -aminoácido histidina, que contém um grupo imidazol, tem como característica básica possuir uma cadeia lateral com pK_a próximo da neutralidade. Em muitas reações catalisadas por enzimas, um resíduo de histidina facilita a reação ao servir como doador ou aceptor de prótons.

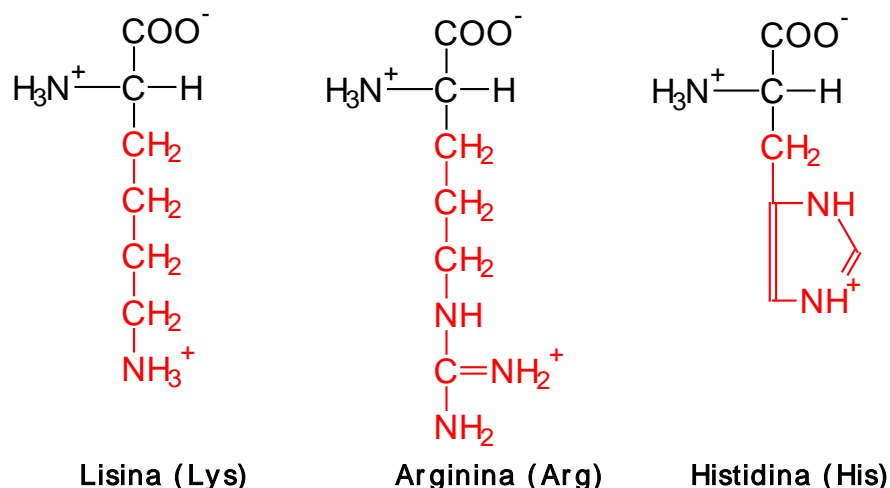


Figura 7 – Estruturas de aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)

1.3 Proteínas

O professor de química holandês Gerardus Johannes Mulder (1802-1880) foi o primeiro a utilizar o termo proteína (do grego proteios, primeiro, primitivo) para se referir às substâncias albuminóides. O sueco Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) já o havia sugerido a utilização desse termo, por acreditar que as substâncias albuminóides eram os constituintes fundamentais de todos os seres vivos.

O reconhecimento das proteínas remonta ao século XVIII, através da com a descoberta de novos componentes biológicos, como a clara de ovo (albúmen), o sangue e o leite, entre outros compostos que, em altas temperaturas e em meio ácido, coagulam. Substâncias com esse tipo de comportamento foram denominadas albuminóides (semelhantes ao albúmen).

Em 1902, foi sugerido pelo químico alemão Franz Hofmeister (1850-1922), que as proteínas seriam formadas pelo encadeamento de aminoácidos.

As suas subunidades monoméricas relativamente simples constituídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente em diferentes combinações e sequências lineares, fornecem a chave para a estrutura de milhares de proteínas diferentes. Assim, cada uma das sequências de aminoácidos que formam as proteínas pode dar origem a diversos de produtos com funções variadas, como: proteínas transportadoras, hormônios, fibras musculares, revestimento da pele, proteínas do cristalino ocular, anticorpos, matriz óssea, enzimas, antibióticos, venenos de cobras, proteínas de reserva de sementes, casco de tartarugas, penas de aves, além de outras substâncias com distintas atividades biológicas.

[www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/298.pdf acessado em 30/05/2013]

As proteínas correspondem, sob o ponto de vista químico, a um conjunto de compostos classificados como macromoléculas formadas de subunidades de aminoácidos ligados através de uma ligação peptídica (amida), que resultam em estruturas que apresentam desde cadeias menores, contendo cerca de dezenas de resíduos de aminoácidos, até compostos que são formados por milhares dessas subunidades. Devido à sua grande estrutura química (elevado peso molecular), esses compostos formam soluções coloidais que assumem uma estrutura conformacional específica dependendo de sua configuração química, que é determinada pela seqüência de aminoácidos presentes em sua estrutura. Nos animais superiores as proteínas constituem cerca de 50% do peso seco dos tecidos e são classificadas em duas categorias [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

- Proteínas globulares: são proteínas em que as cadeias de amino ácidos se voltam sobre elas mesmas, formando um conjunto compacto que tem forma esferóide ou elipsóide, em que os três eixos da molécula tendem a ser de tamanhos similares. Em geral, são proteínas de grande atividade funcional, como por exemplo, as enzimas, os anticorpos, os hormônios, a hemoglobina; são solúveis em meio aquoso [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].
- Proteínas fibrosas: são proteínas em que as cadeias de amino ácidos se ordenam de maneira paralela, formando fibras ou lâminas estendidas, nas quais o eixo longitudinal predomina sobre os transversais. Em geral, são pouco solúveis em água e participam na formação de estruturas de sustentação, como as fibras do tecido conjuntivo e outras formações de tecidos de grande resistência mecânica.

A estrutura molecular das proteínas é muito complexa, por essa razão é conveniente dividi-la em níveis distintos de organização: estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, (Figura 8) [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

a) estrutura primária – está correlacionada com a seqüência de aminoácidos sendo que as cadeias não apresentam ramificações (Figura 9);

b) estrutura secundária – estabelece sua conformação em relação aos ângulos diedro ψ (C_{α} -N) e ϕ (C-C $_{\alpha}$) (Figura 9) a qual é geralmente mantida por ligações de hidrogênio gerando a hélice- α , folha- β , alças- β e γ e regiões de estruturas desordenadas (Figura 10);

c) estrutura terciária – caracterizada pela sua disposição tridimensional completa que se forma a partir das forças de atração ou repulsão eletrostática, das ligações de hidrogênio, das

forças de van der Waals e das pontes de dissulfeto existentes entre os resíduos de aminoácidos que formam as cadeias (Figura 11); e

d) estrutura quaternária – é formada por oligômeros tridimensionais, que podem ser compostos por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária que estabelecem entre elas - ligações hidrogênio, atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e/ou pontes de dissulfeto entre cisteínas de cadeias diferentes. Um exemplo deste tipo de estrutura é a albumina humana, que apresenta estrutura quaternária composta por duas estruturas terciárias gerando uma proteína globular (Figura 12).

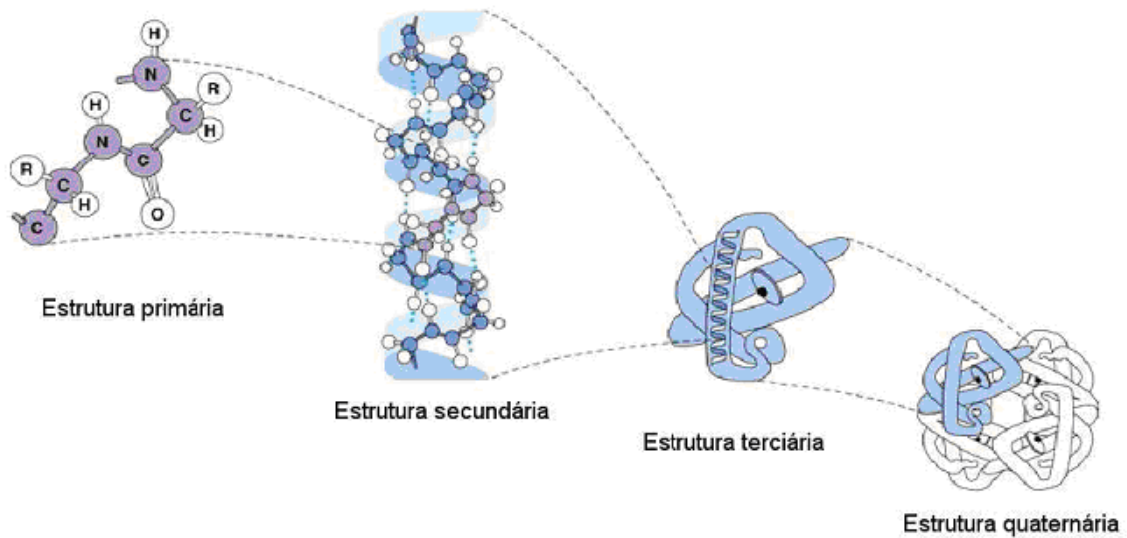


Figura 8 – Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína [Lehninger *et al.* (1993)]

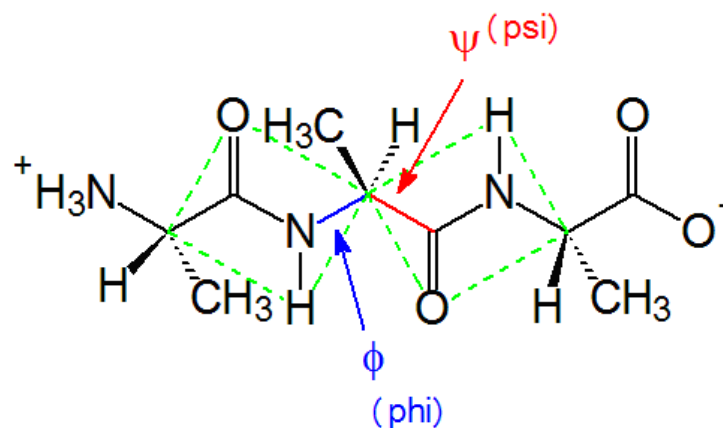


Figura 9 – Estrutura primária de uma proteína caracterizada pela formação de uma ligação peptídica

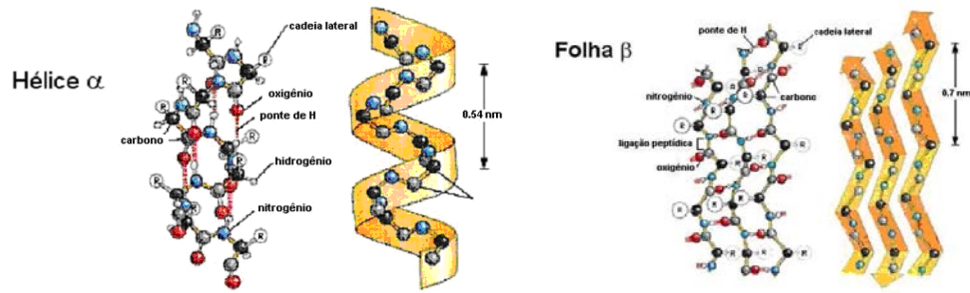


Figura 10 – Estrutura secundária para uma proteína tipo: a) hélice- α e b) folha- β [Lehninger *et al.* (1993)]



Figura 11 – Exemplo de estrutura terciária para uma proteína. Treptavidina, uma proteína formada apenas por folhas beta e alças

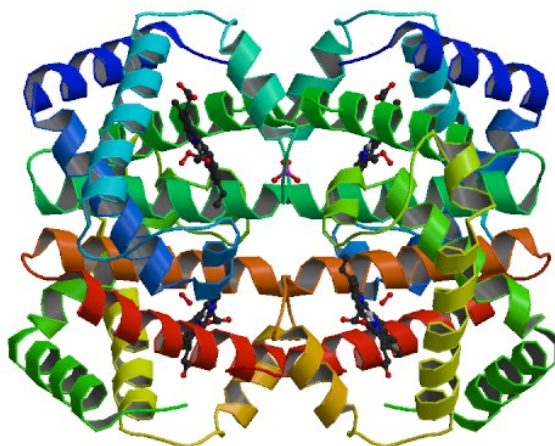


Figura 12 – Exemplo de estrutura quaternária para uma proteína. Oxi-hemoglobina, uma proteína formada apenas por hélices- α e alças [PDB, 1HHO]

1.3.1 Albuminas

As albuminas pertencem a uma classe de proteínas globulares que apresentam um alto valor biológico, estando presente na clara do ovo, no leite e no sangue. No sangue é a principal proteína, que se encontra em grande abundância no plasma, e é sintetizada no fígado. A concentração normal de albumina no sangue animal fica entre 3,5 e 5,0 gramas por decilitro, correspondendo a cerca de 50% das proteínas plasmáticas. As outras proteínas presentes no plasma chamam-se globulinas.

As albuminas séricas (ASs) além de ser a proteína predominante no plasma sanguíneo [Zsila *et al.* (2003) e Takehara *et al.* (2009)] é a de maior solubilidade, e têm muitas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da pressão osmótica [He *et al.* (1992), Sugio *et al.* (1999), Cui *et al.* (2008) e Yue *et al.* (2008)] e controle do pH [Sugio *et al.* (1999) e Tang *et al.* (2006)].

Talvez a função biológica mais importante das ASs seja a sua capacidade transportadora, distribuidora e metabolizadora de inúmeros ligantes endógenos e exógenos (por exemplo, compostos bioativos, metabólitos, ácidos graxos, amino ácidos (geralmente triptofano e cisteína), hormônios, esteróides, cátions e ânions, metais (como cálcio, cobre, zinco, níquel, mercúrio, prata e ouro etc.) como resultado do aumento de solubilidade desses compostos no plasma [He *et al.* (1992), Bhattacharya *et al.* (2000), Zsila *et al.* (2003), He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Tang *et al.* (2006), Cui *et al.* (2007), Li *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Li *et al.* (2008), Shaw e Pal (2008), Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)]. A ligação entre compostos bioativos e ASs é um fator altamente determinante para a farmacodinâmica e farmacocinética desses compostos, que dependendo da concentração administrada, pode afetar a distribuição e também na sua eliminação por parte do organismo.[Petitpas *et al.* (2001), He *et al.* (2005), Cui *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Stan *et al.* (2009)].

1.3.2 Albumina sérica humana (ASH)

A albumina sérica humana (ASH) é um polipeptídeo simples e não-glicosilado [Falini *et al.* (2006) e Li *et al.* (2009)] com aproximadamente 67% de hélice- α [He *et al.* (1992), He *et al.* (2006) e Stan *et al.* (2009)] (Figura 13).

A estrutura da ASH apresenta três domínios compostos de estrutura do tipo hélice- α (I, II e III) [Sugio *et al.* (1999), Petitpas *et al.* (2001), Falini *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shaw e Pal (2008) e Yue *et al.* (2008)]. Cada domínio subdivide-se em dois subdomínios, A e B

[Falini *et al.* (2006)], que contém seis e quatro hélices- α , respectivamente [Petitpas *et al.* (2001) e He *et al.* (2005)]. Análises cristalográficas da estrutura revelam que os sítios de ligação com os compostos bioativos estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA [Sulkowska (2002), Zsila *et al.* (2003), Tang *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shaw *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)], os quais são consistentes com os sítios I e II, respectivamente [Cui *et al.* (2007) e Li *et al.* (2009)]. Uma grande cavidade hidrofóbica (um resíduo de triptofano) está presente no subdomínio IIA [Cui *et al.* (2007) e Li *et al.* (2009)]. A geometria da bolsa em IIA é completamente diferente do encontrado para IIIA [Kandagal *et al.* (2006)]. O sítio I também é conhecido como o sítio de ligação da warfarina, e é formado por uma bolsa no subdomínio IIA e contém somente um triptofano de ASH (Trp-214) neste subdomínio [Krangh-Hansen *et al.* (2002), Kandagal *et al.* (2006), Stan *et al.* (2009) e Takehara *et al.* (2009)]. O sítio II está localizado no subdomínio IIIA e é conhecido como o sítio de ligação da benzodiazepina [Krangh-Hansen *et al.* (2002) e Stan *et al.* (2009)]. Dentre esses sítios, o sítio I parece ser mais versátil, porque ele pode se ligar com alta afinidade a compostos que são muito diferentes do ponto de vista químico [Peters (1996) e Stan *et al.* (2009)]. A ASH é um polipeptídeo com 585 resíduos de aminoácidos [Cui *et al.* (2008), Li *et al.* (2008), Shaw e Pal (2008) e Li *et al.* (2009)], contendo 17 pares de dissulfeto, uma cisteína livre [He *et al.* (1992), Sugio *et al.* (1999), Bhattacharya *et al.* (2000), Petitpas *et al.* (2001), He *et al.* (2006) e Stan *et al.* (2009)] e um resíduo de triptofano (Trp-214) [He *et al.* (1992), Li *et al.* (2007), Shaw e Pal (2008) e Takehara *et al.* (2009)]. Na ASH, os domínios I, II e III contêm os resíduos de aminoácidos 1-195, 196-383, 384-585, respectivamente [Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Li *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)]. O peso molecular da albumina humana (ASH) é de 66-66,5 kDa (66.000-66.500 g/mol) [Tang *et al.* (2005) e He *et al.* (2006)] e sua concentração no plasma sanguíneo é de 40 mg/mL (4-5 g/100 mL) [Sugio *et al.* (1999)].

A albumina sérica humana (ASH) possui apenas um resíduo de cisteína livre, Cys-34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A Figura 13 mostra a estrutura de cadeias de duas moléculas de ASH (PDB, 1BM0), onde os resíduos Cys-34 e Trp-214 aparecem como esferas [Dose (1982)].

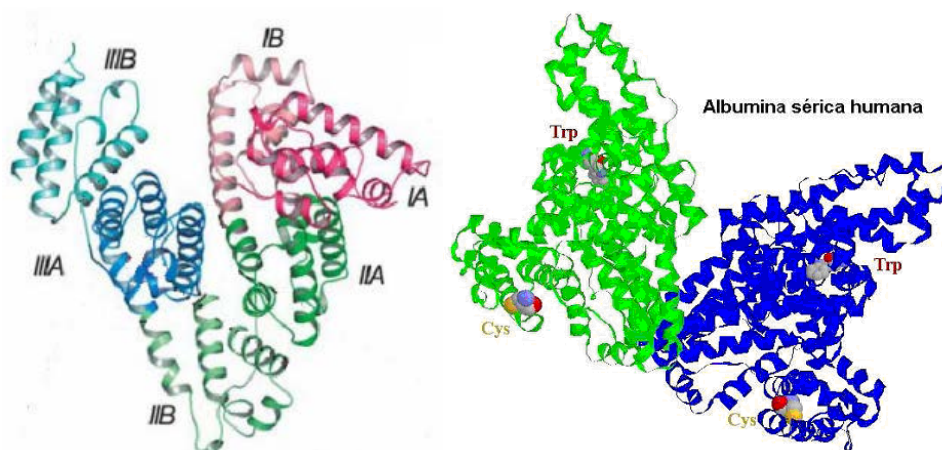


Figura 13 – a) Estrutura secundária da ASH, ilustrando a localização dos subdomínios, codificados por cores: IA-vermelho; IB-vermelho claro; IIA, verde; IIB-verde claro; IIIA,-azul; IIIB-azul claro. (GHUMAN *et al.*, 2005) b) Estrutura quaternária da ASH com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque (construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB (Protein Data Bank)) [Dose (1982)]

1.4 Estudo da interação entre ASH e compostos bioativos.

Dentre algumas técnicas geralmente utilizadas para detectar a interação entre um composto bioativo e a albumina sérica (AS) destacam-se: espectroscopia de fluorescência [Xu *et al.* (1996), Yamasaki *et al.* (1999) e Wilting *et al.* (1980)], espectroscopia no ultravioleta (UV) [Baroni *et al.* (2001)], espectroscopia de dicroísmo circular (DC) [Wilting *et al.* (1980)], espectroscopia Raman [Shen *et al.* (2003)], ressonância magnética nuclear (RMN) [Sulkowska *et al.* (2005)], eletroquímica [Hepel (2005) e Wu *et al.* (2004)], reflectância total atenuada - infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) [Millot *et al.* (2001)], modelagem molecular (MM) [Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008) e Monti *et al.* (2009)] e fotólise por pulso de laser [Bueno *et al.* (2009) e Monti *et al.* (2009)]. Sendo assim, a interação entre compostos bioativos e a albumina sérica humana (ASH), e o efeito da transferência de energia nessas interações, vêm sendo investigados por essas técnicas de análise, assim como os efeitos da temperatura sobre estas interações droga-albumina (ASH).

A espectroscopia de UV-Vis é muito usada para a verificação de um processo de interação entre compostos bioativos ASs o qual pode ser evidenciado pela ocorrência de deslocamentos na região de máximo no comprimento de absorção da ASH.

A espectroscopia de fluorescência é um dos métodos mais poderosos para se estudar as interações moleculares envolvendo proteínas, isso porque é uma técnica altamente sensível, seletiva, conveniente, rápida, simples e com fundamento teórico abundante. Ela apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais empregados para se estudar a interação

compostos bioativos-proteínas, tais como, cromatografia de exclusão por afinidade ou tamanho, ultrafiltração e ultracentrifugação. Esses métodos convencionais apresentam pouca sensibilidade ou tempo de operação muito longo, ou ambos. Além disso, esses métodos normalmente requerem proteínas em concentrações muito superiores à da constante de dissociação do complexo droga-proteína sob investigação [Oravcova *et al.* (1996) e Epps *et al.* (1998)]. Medindo-se a variação de fluorescência intrínseca da albumina através da técnica de supressão de fluorescência, podemos medir a acessibilidade de supressores aos grupos fluoróforos. Esta informação pode ajudar a prever o mecanismo de interação dos compostos bioativos com a albumina sérica [Yue *et al.* (2008)].

A supressão de fluorescência se refere a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma amostra. Uma variedade de interações moleculares pode resultar em supressão, incluindo reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão colisional [Lakowicz (2006) e Cheng *et al.* (2009)]. A supressão tanto estática quanto dinâmica pode ser distinguida por sua dependência com a temperatura e a viscosidade do meio, ou por mudanças consideráveis no tempo de vida do estado excitado singlete [Cheng *et al.* (2009)].

Partindo-se dos estudos de supressão de fluorescência, os valores para os parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° e ΔS° podem ser obtidos experimentalmente por estudos de supressão empregando-se gráficos de Stern-Volmer, de Stern-Volmer modificado e de van't Hoff, os quais possibilitam ainda a obtenção de outros valores como constantes de ligação (K_b) e o número de sítios de interação (n).

As forças que atuam entre uma molécula pequena e uma macromolécula incluem, principalmente, ligação hidrogênio, força de van der Waals, força eletrostática, força de interação hidrofóbica e outras. Considerando a dependência da constante de ligação com a temperatura, um processo termodinâmico é responsável pela formação do complexo [Li *et al.* (2007) e Yue *et al.* (2008)].

Os cálculos do raio de Förster obtidos através da sobreposição dos espectros de emissão e absorção doador-aceptor fornecem a distância média entre o resíduo de triptofano da albumina (doador) e a molécula supressora (aceptor), que pode ser calculado de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster [Förster (1948), Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)].

O dicróismo circular é muito usado para uma análise sobre a estrutura conformacional de proteínas. Em especial no caso das ASs um processo de interação entre um composto bioativos-AS leva a uma mudança em sua estrutura terciária que é caracterizado pela

diminuição da quantidade de hélice- α presente em sua estrutura, podendo assim ser obtidas informações qualitativas a respeito deste processo de interação.

Os experimentos de tempo de vida de fluorescência podem ser úteis para a determinação do tipo de mecanismo envolvido nos processos de supressão, pois um mecanismo estático não apresentará nenhuma mudança do tempo de vida de fluorescência da albumina, sendo observada, nesse caso, apenas uma diminuição da intensidade de fluorescência como consequência do processo de supressão com o aumento da concentração do supressor. Por outro lado um mecanismo dinâmico que tem como característica fundamental uma constante de velocidade de supressão dependente da viscosidade do meio, será totalmente influenciado pela concentração da espécie aceptora, ou seja, um aumento da concentração do supressor tem como efeito final à diminuição do tempo de vida de fluorescência observado juntamente com a diminuição da intensidade do sinal de fluorescência [Cheng *et al.* (2009)].

1.4.1 Absorção de luz no ultravioleta-visível (UV-Vis)

A absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorbância (A) e é definida pela Equação 1 [Fasman (1996) e Woody (1995)].

$$A = \log(I_0/I)$$

Equação 1

Onde:

A - absorbância;

I₀ - intensidade da luz incidente;

I - intensidade após a luz percorrer uma distancia **l** no meio.

Segundo a lei de Lambert-Beer (Equação 2) [Pace *et al.* (1995)], pode-se determinar o coeficiente de extinção molar, ou coeficiente de absorção molar, ou absorvidade molar (ϵ) [Pace *et al.* (1995)].

$$A = \epsilon.c.l$$

Equação 2

Onde:

A - absorbância;

c - concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L);

l - distância que a luz percorre no meio (em cm) e

ϵ - coeficiente de extinção molar (em L/cm.mol).

Efeitos de deslocamento na banda de absorção máxima da ASH próximo a região de $\lambda_{\max} = 280$ referente a transição $\pi\pi^*$ que esta diretamente ligado ao residuo cromofórico do triptofano, podem indicar a formação de um complexo de associação (interação ligante) entre os compostos bioativos-proteína. Um deslocamento para menores comprimentos de onda quando sob complexação, quando comparado com o espectro de absorção da proteína livre, indicam um ambiente químico mais hidrofóbico, enquanto que o oposto, um deslocamento batocromico esta diretamente associado a um ambiente químico próximo ao resíduo do triptofano como sendo mais hidrofílico.

1.4.2 Absorção de luz circularmente polarizada Dicroísmo circular - Cálculo da porcentagem de estrutura hélice α .

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica sensível que possibilita monitorar mudanças conformacionais em proteínas, [Yue *et al.* (2008)] sendo geralmente usado para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas [Kelly *et al.* (2005) e Cheng *et al.* (2009)]. O dicroísmo circular é particularmente útil para o estudo de moléculas quirais e macromoléculas, tais como proteínas, carboidratos, dendrímeros, etc., compostos esses que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de dicroísmo circular. O DC é uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário (direita) ou no sentido anti-horário (esquerda). O DC é a diferença de absorção (A) da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita: $DC = A_E - A_D$ (Equação 3).

$$DC = A_E - A_D.$$

Equação 3

Onde:

DC - dicroísmo circular;

A_E - absorvância para a luz circularmente polarizada para a esquerda e

A_D - absorvância para a luz circularmente polarizada para a direita.

Da mesma forma que a absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorvância, o mesmo pode ser feito para a luz circularmente polarizada onde temos um coeficiente de extinção molar para a direita ou para a esquerda, ϵ_D e ϵ_E , respectivamente.

O dicroísmo circular molar ($\Delta\varepsilon$), (Equação 4), é definido como a diferença entre os coeficientes de extinção a esquerda e a direita [Fasman (1996), Hecht (1998) e Woody (1995)].

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_E - \varepsilon_D = (A_E - A_D)/c.l$$

Equação 4

Onde:

$\Delta\varepsilon$ - dicroísmo circular molar (em L/cm.mol);

ε_E - coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (em L/cm.mol) e

ε_D - coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita (em L/cm.mol).

A luz linearmente polarizada é composta de dois componentes circularmente polarizados de mesma intensidade. Em cada uma dessas componentes o vetor eletromagnético gira na direção de propagação. Observando-se perpendicularmente a variação no vetor elétrico com o tempo, para uma amostra que apresente dicroísmo circular, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, rodando no sentido horário para a luz polarizada circularmente para a direita e anti-horário para a esquerda (Figura 14).

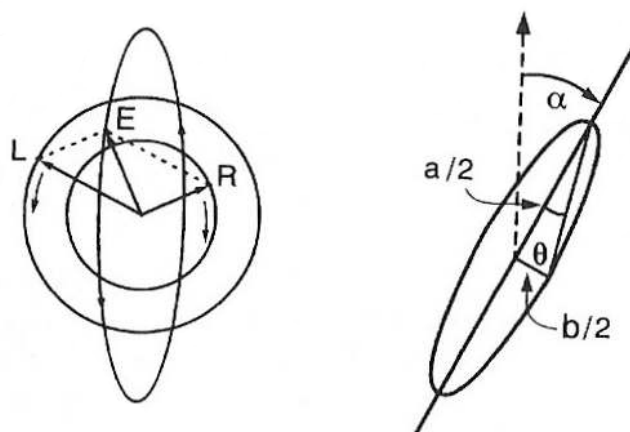


Figura 14 – Esquema da luz elípticamente polarizada gerada por dicroísmo circular, onde (R) e (L) representam a magnitude dos vetores elétricos da luz circularmente polarizada para a direita e esquerda respectivamente, sendo θ o valor medido para a elipticidade como resultado do efeito Cóton observado [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf]

Todos os instrumentos comerciais de DC (Figura 15), medem a variação de absorvância (ΔA) ($\Delta A = A_E - A_D = (\varepsilon_E - \varepsilon_D).c.l$). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para elipticidade (θ) (Equação 5). [Fasman (1996) e Woody (1995)] e ww.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

$$\theta(\text{em deg}) = 180 \cdot \ln 10 \cdot \Delta A / 4\pi = 32,98 \Delta A$$

Equação 5

Onde:

θ - elipticidade (em deg (graus));
 ΔA - variação de absorbância.

Para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade (θ) é expressa na forma de elipticidade molar (θ_m), (Equação 6) [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf], que também é representada por MRE (elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual). Dessa forma, o dicroísmo circular (DC) gera luz elipticamente polarizada. [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

$$\theta_m = 1000 / c \cdot l = 3298 \Delta \epsilon$$

Equação 6

Onde:

θ_m - elipticidade molar (em deg.cm².dmol⁻¹);
 θ - elipticidade (em deg (graus));
 c - concentração da espécie que absorve a luz;
 l - distância que a luz percorre no meio (em cm) e
 $\Delta \epsilon$ - dicroísmo circular molar (em L/cm.mol).

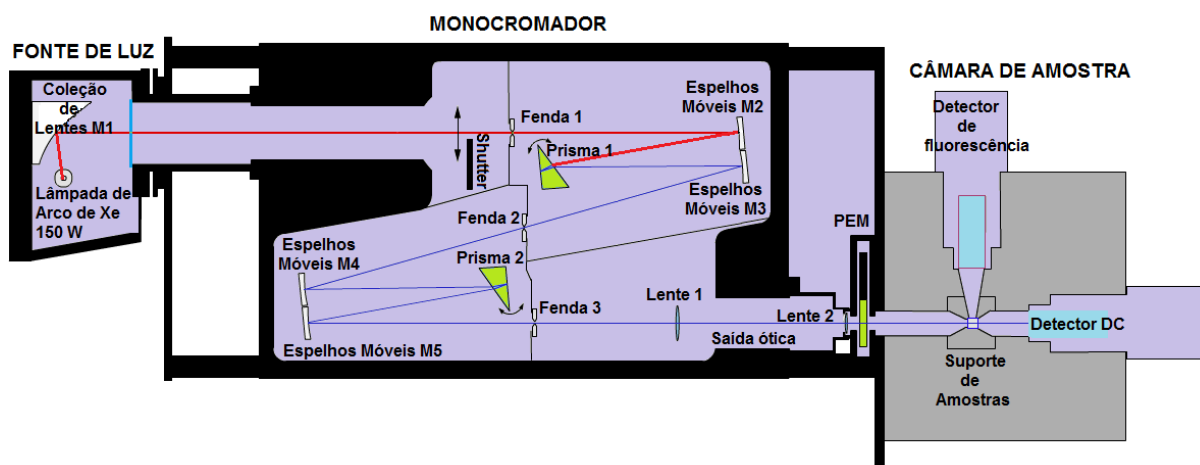


Figura 15 – Representação esquemática de um aparelho de dicroísmo circular DC, onde são mostrados os componentes básicos para sua operação. [modificado de <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance>]

Para avaliar a estrutura secundária de proteínas globulares que apresentam sua conformação preferencial na forma de uma hélice- α , são feitas medidas na região do ultravioleta, sendo que valores negativos máximos de elipticidade (θ) em 208 nm e 222 nm indicam a presença de uma estrutura predominantemente na conformação hélice- α , enquanto que uma banda negativa 215 nm e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- β (Figura 16). [Johnson (1988), Venyaminov e Yang (1996) e Cordeiro (2005)].

Existem algumas vantagens na utilização desta técnica, como por exemplo: experimentos simples e rápidos; recuperação total da amostra (técnica não destrutiva); as análises são feitas em solução. e tem-se uma reprodução muito próxima do que é a realidade dos sistemas biológicos *in vivo*.

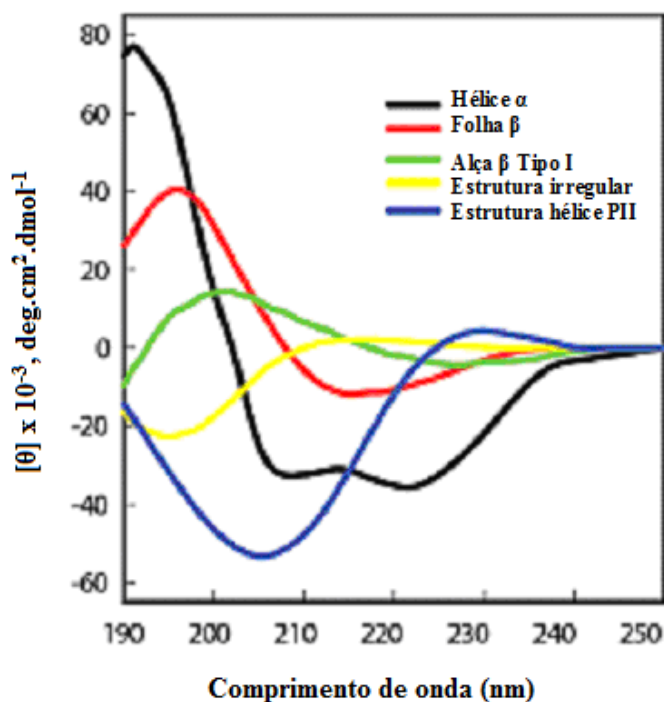


Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular representativos de estruturas secundárias de proteínas [modificado de www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf]

1.4.2.1 Cálculos da porcentagem de estrutura hélice- α .

Estimativas acerca do % de hélice- α para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença de supressor podem ser estimadas usando as Equações 7 e 8 [Chen *et al.* (1972), Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Yue *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)]. Os valores experimentais de elipticidade molar (θ_m) nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm são utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (MRE),

especificamente MRE_{208} e MRE_{222} (Equação 7) [Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006) e Stan *et al.* (2009)]. Essas bandas negativas em torno de 208-209 nm e 222-223 nm (na região do ultravioleta) são características da estrutura hélice- α de proteína [Stan *et al.* (2009)] e correspondem às transições $n\pi^*$ que ocorrem na sua estrutura secundária (no caso, albumina sérica humana (ASH)) [Yang *et al.* (2002) e Yue *et al.* (2008)]. Posteriormente, os valores de MRE_{208} e MRE_{222} são substituídos na Equação 8 [Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Li *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008) e Stan *et al.* (2009)] e assim usados para calcular os valores de percentual de hélice- α na estrutura secundária da ASH (% hélice- α).

$$MRE = \frac{\theta}{(10 \cdot n \cdot l \cdot C_p)}$$

Equação 7

Onde:

MRE = elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (deg.cm²/dmol);

θ = elipticidade observada (mdeg);

n = número de amino ácidos residuais ou resíduos de amino ácido (582 para ASH);

l = comprimento ótico da cubeta (1 cm);

C_p = concentração molar de ASH (1,00x10⁻⁶ mol/L).

$$\% \text{ hélice } - \alpha = \left[\frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \right] \times 100 \quad \% \text{ hélice } - \alpha = \left[\frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \right] \times 100$$

Equação 8

Onde:

MRE_{208} - elipticidade residual significativa em 208 nm (deg.cm²/dmol);

MRE_{222} - elipticidade residual significativa em 222 nm (deg.cm²/dmol);

% hélice- α - percentual de α -hélice na estrutura da ASH

1.4.3 Estudos de fluorescência de proteínas

Nas aplicações bioquímicas de fluorescência sempre se utiliza a fluorescência intrínseca. Em proteínas, os três aminoácidos aromáticos, fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) são os responsáveis pelo processo de emissão. O triptofano, que é o fluoróforo com o maior rendimento quântico de fluorescência, está presente em

aproximadamente 1 mol % na proteína. As proteínas possuem normalmente um número reduzido de Trp em sua estrutura, o que facilita a interpretações dos dados espectrais.

Do ponto de vista espectroscópico a grande vantagem da utilização do triptofano na interpretação estrutural das proteínas reside no fato de que sua emissão é sensível ao ambiente químico em que se encontra. Sendo assim, mudanças no espectro de emissão de fluorescência a partir do Trp estão associadas a alterações conformacionais da estrutura secundária das proteínas.

O Trp pode ser suprimido por adição de supressor externo ou por grupos próximos dentro da proteína. Um fator que complica na interpretação de fluorescência de proteínas é a presença de aminoácidos de fluorescência múltipla, na maioria das proteínas. O ambiente de cada resíduo é distinto e as propriedades espectrais de cada resíduo são geralmente diferentes. Entretanto, o espectro de absorção e emissão de resíduos de Trp em proteínas recobre a maioria dos comprimentos de onda úteis e é difícil separar contribuições de cada Trp em uma proteína multi-Trp. Mesmo as proteínas com um único Trp exibem intensidade de desativação multi-exponencial dificultando uma interpretação do processo de desativação via tempo de vida.

A fluorescência de proteína pode ser complexa, entretanto um progresso considerável foi alcançado nas décadas passadas. A origem do decaimento multi- exponencial de Trp em água esta agora largamente entendido com consequência da presença de isômeros conformacionais rotacionais (rotâmeros). Estes rotâmeros têm diferentes orientações dos grupos amino e carboxil em relação ao anel indólico. A grande variação do rendimento quântico de fluorescência do Trp em diferentes proteínas parece resultar de supressores que se encontram nas proximidades do Trp, os quais incluem resíduos de lisina e histidina. Sob condições apropriadas parece que mesmo grupos amida na coluna peptídica podem atuar como supressores.

Efeitos anisotrópicos exibidos por Tyr e Trp são sensíveis a difusões rotacionais totais de proteínas e ao grau de movimento segmental durante o tempo de vida do estado excitado. Portanto, a fluorescência de proteínas pode propiciar informações consideráveis sobre a estrutura e a dinâmica proteicas e é sempre usada para estudar dobramento de proteínas (ou proteína dobrável) e reações de associação.

Sumarizando, o crescente entendimento da fotofísica do grupo indol, a habilidade de se alocar o resíduo Trp em locais almeçados e a avaliação de numerosas estruturas de proteínas tem resultado no crescente entendimento de fatores gerais que governam o processo de fluorescência de proteínas. A alta sensibilidade da emissão a partir de Trp quanto aos

detalhes de seu ambiente local tem providenciado inúmeras oportunidades para se estudar função, dinâmica e dobramento de proteínas. [Lakowicz (2006)]

1.4.3.1 Propriedades Espectrais dos Aminoácidos Aromáticos.

Como dito anteriormente os aminoácidos responsáveis pela emissão de fluorescência nas proteínas são: a Tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe). e o Triptofano (Trp) Os respectivos espectros de absorção e emissão estão mostrados na Figura 17. O processo de emissão de fluorescência das proteínas é normalmente dominado pelo resíduo do triptofano Trp que absorve em comprimento de onda deslocado para o vermelho e exibe alto coeficiente de extinção molar. Normalmente a energia absorvida pela fenilalanina e tirosina é transferida para o resíduo Trp na mesma proteína. Na Tabela 2 estão representados os coeficientes de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência para a tirosina, fenilalanina e para o triptofano.

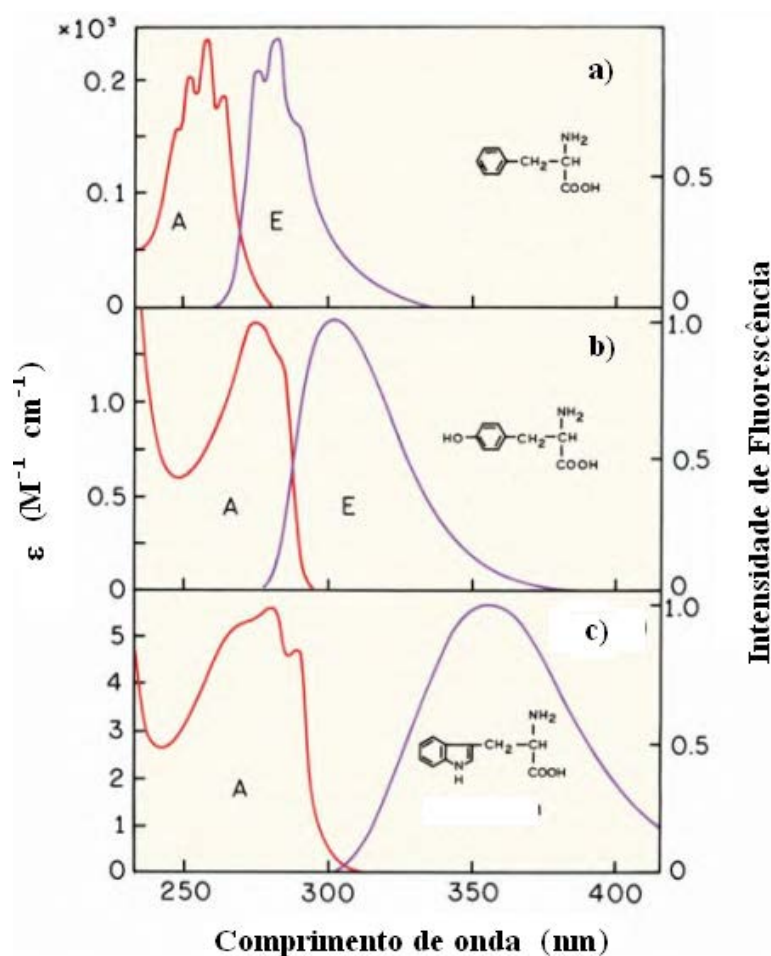


Figura 17 – Espectro de absorção e emissão de fluorescência para os aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c) triptofano [modificado de Lakowicz (2006)]

Tabela 2 – Coeficientes de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência para Phe, Tyr e Trp em solução aquosa neutra a 23°C

<i>Aminoácido</i>	λ_{abs} (nm)	λ_{em}	ε (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϕ_f
Fenilalanina, Phe	257	282	200	0,03
Tirosina, Tyr	274	303	1400	0,14
Triptofano, Trp	280	340	5600	0,13

[www2.dbd.puc-rio.br/permagamum/tesesabertas/0321568_05_cap_03.pdf e Lakowicz (2006)]

A fenilalanina exibe seus espectros de absorção e emissão deslocado para o azul quando comparado com os demais resíduos fluorescente ($\lambda_{abs} = 257$ e $\lambda_{em} = 282$ nm). Já para o resíduo de Tyr os processos de absorção e emissão se encontram em uma situação intermediária ($\lambda_{abs} = 274$ e $\lambda_{em} = 303$ nm) e é relativamente insensível à polaridade do solvente. Os espectros de absorção e emissão do Trp estão deslocados para o vermelho e em água apresentam os seguintes valores ($\lambda_{abs} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 340$ nm).

Nos estudos de fluorescência de proteínas, estas são geralmente excitadas em seu máximo de absorção, a cerca de 280 nm ou em comprimento de onda mais longo. Conseqüentemente, a fenilalanina (Figura 17) não é excitada na maioria dos experimentos. Além disso, o rendimento quântico de fluorescência da Phe é pequeno, em torno de 0,03 (Tabela 2), assim, a emissão deste resíduo protéico é raramente observado. A absorção de proteína em 280 nm se deve tanto aos resíduos de Tyr quanto ao Trp. A 23°C em solução aquosa neutra o rendimento quântico de fluorescência de Tyr e Trp é de 0,14 e 0,13 respectivamente. Em comprimentos de onda maiores que 295 nm, a absorção é predominantemente a partir do Trp.

Devido às suas características químicas a tirosina se apresenta como um fluoróforo bastante simples. Seu comportamento fotofísico pode apresentar uma maior complexidade em determinados pH. A função fenólica presente em sua estrutura faz com que o seu comportamento químico no estado excitado seja totalmente diferente do estado fundamental. No estado excitado, a tirosina pode ser facilmente ionizada (pKa=4) enquanto que no estado fundamental esse resíduo de aminoácido apresenta menor acidez (pKa=10) Em solução neutra o grupo hidroxila do sistema aromático pode dissociar durante o tempo de vida de estado excitado, levando à diminuição do rendimento quântico de fluorescência. Emissão de tirosina

só é observável em algumas proteínas, porém, acredita-se que o caminho preferencial para o processo de desativação a partir do estado excitado seja o processo de ionização.

Outro processo de desativação que pode estar contribuindo para o baixo rendimento quântico de fluorescência por parte da Phe e da Tyr pode ser atribuído a processos de transferência de energia que podem ocorrer por vários mecanismos, como transferência de energia de Förster ou mesmo pelo mecanismo trivial. No caso específico do Trp podemos esperar ainda efeito de filtro interno em altas concentrações de proteínas.

O resíduo indólico do triptofano possui duas bandas de emissão características. A possibilidade de excitação eletrônica para dois níveis de energia quase isoenergéticos, 1L_a e 1L_b introduz o fenômeno de anisotropia molecular e consequentemente apresentam bandas de absorção (Figura 18) e emissão distintos que são diferentemente sensíveis à polaridade do solvente (Figura 19).

Um segundo efeito associado a mudanças no processo de emissão de fluorescência do Trp está relacionado à sua habilidade de doar elétrons no estado excitado (aumento do potencial de redução quando excitado) e como consequência a possibilidade de supressão da fluorescência por um mecanismo colisional. [Lakowicz (2006)]

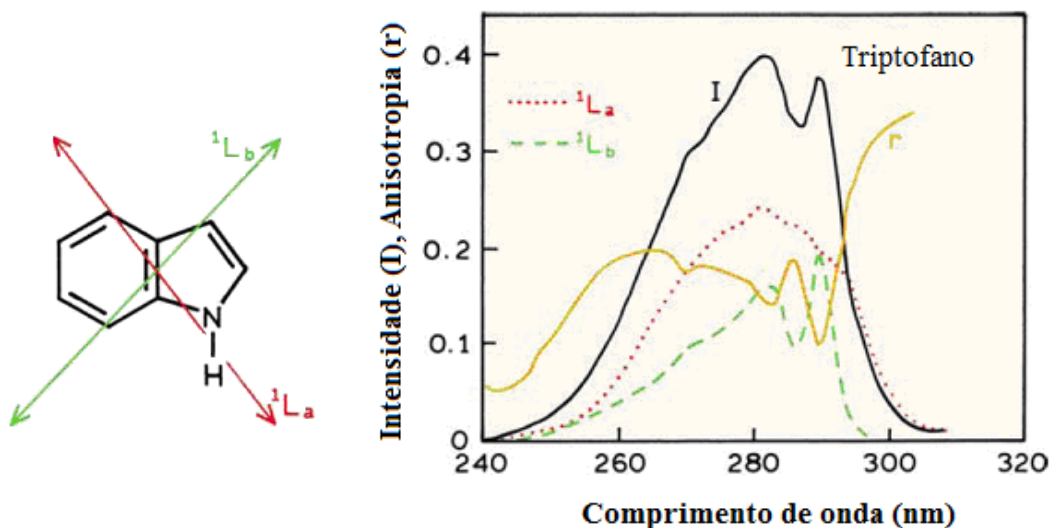


Figura 18 – Espectro de anisotropia de absorção do triptofano como função da orientação do resíduo indólico em relação às bandas 1L_a e 1L_b [modificado de Lakowicz (2006)]

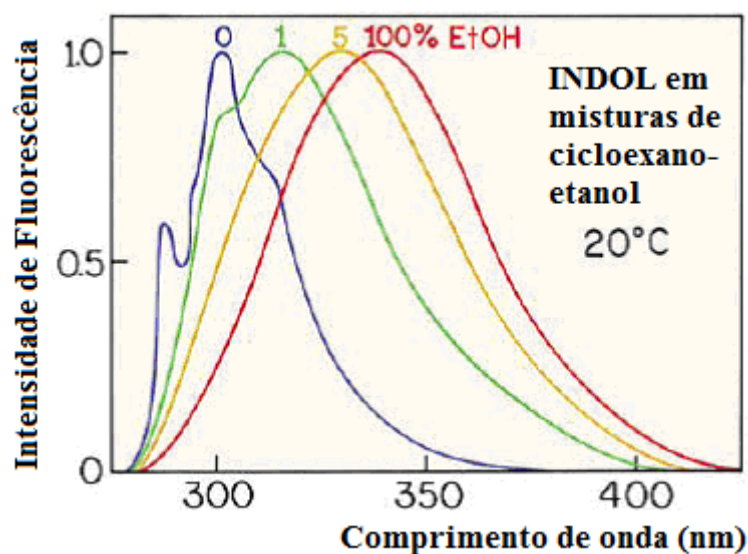


Figura 19 – Espectro de emissão de fluorescência do resíduo indólico do triptofano em diferentes ambientes químicos [modificado de Lakowicz (2006)]

1.5 Estudos de supressão de fluorescência

Podemos chamar de supressão de fluorescência qualquer processo que reduz a intensidade da fluorescência intrínseca de um composto. O processo de supressão de fluorescência pode se dar através de vários caminhos inter e intramoleculares e, entre eles, podemos citar reações no estado excitado, transferência de energia ressonante, transferência de elétron, formação de complexos no estado fundamental, transferência de prótons, formação de exímeros e excíplexos.

Para os processos de supressão intermoleculares podemos destacar dois mecanismos: um estático e outro dinâmico como mostrado na Figura 20.

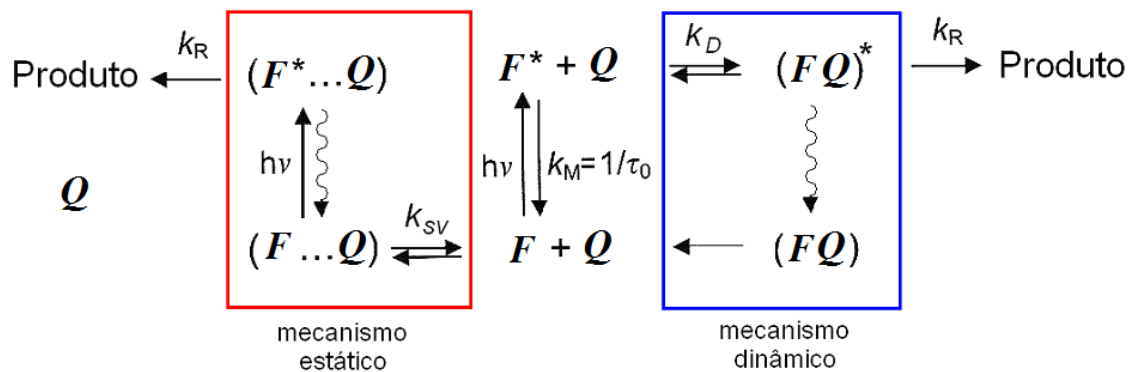


Figura 20 – Processos de supressão intermoleculares descritos pelos mecanismos: estático e dinâmico [modificado de Lakowicz (2006)]

No mecanismo de supressão via modelo estático, é formada uma associação entre fluoróforo e o supressor ainda no estado fundamental, sendo este complexo não fluorescente. (Figura 21a).

No caso da supressão via mecanismo dinâmico, o supressor no estado fundamental deve difundir de encontro ao fluoróforo, durante o tempo de vida do estado excitado. Após o contato, o fluoróforo retorna ao seu estado fundamental, sem emissão de um fóton. (Figura 21b). Em geral, a supressão ocorre sem qualquer alteração permanente nas moléculas, isto é, sem uma reação fotoquímica.

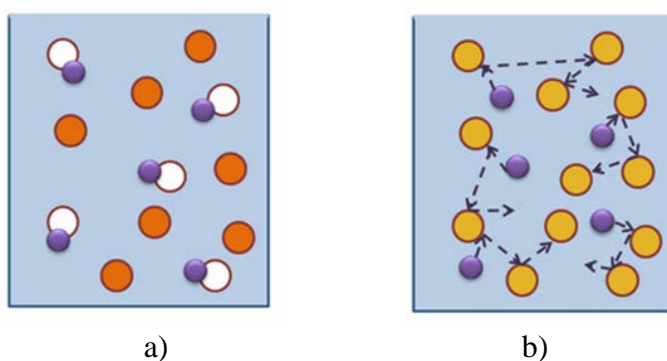


Figura 21 – Mecanismos de supressão de fluorescência: a) mecanismo estático e b) mecanismo dinâmico

A supressão de fluorescência tem sido amplamente estudada tanto como um fenômeno fundamental, como uma fonte de informação em sistemas organizados onde podemos investigar a relação hóspede-hospedeiro, tais como proteínas, membranas, vesículas, micelas, dendrímeros, entre outros. Esses processos são conhecidos como complexos de inclusão e as aplicações de supressão são devido às interações moleculares que resultam em supressão.

A exigência de contato molecular para que ocorra o processo de supressão permite estudar diversos fenômenos. Por exemplo, as medidas de supressão podem revelar a acessibilidade dos fluoróforos aos supressores. Considerando-se um fluoróforo ligado a uma proteína ou a uma membrana, se a proteína ou a membrana é impermeável ao supressor e o fluoróforo está localizado no interior da macromolécula, nem a supressão colisional nem a estática podem ocorrer. Por esta razão, os estudos de supressão podem ser usados para revelar a localização do fluoróforo em proteínas e membranas, bem como a sua permeabilidade frente a supressores. Além disso, a taxa de supressão colisional pode ser usada para determinar o coeficiente de difusão do supressor.

1.5.1 Supressores de Fluorescência

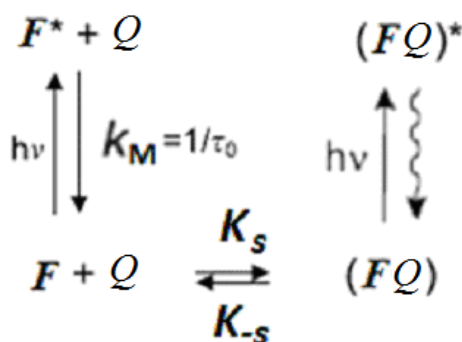
Uma grande variedade de substâncias atua como supressores de fluorescência. A exigência mínima para que uma espécie química atue como supressor está relacionado com o seu nível de energia do estado excitado. Para que ocorra um processo de supressão relativamente eficiente o estado excitado do supressor deve ser de energia menor que a do doador. Em alguns casos se aceita que a energia do estado excitado do acceptor (supressor) possa ser 5 Kcal/mol maior que a do doador de energia. Nesse caso em especial o processo é ativado termicamente, ou seja, a quantidade de energia necessária para proporcionar a transferência de energia doador-acceptor é obtida pelo choque entre as espécies[Turro (1978)].

Um dos mais conhecidos supressores colisionais é oxigênio molecular, com as suas características químicas, baixa energia do estado excitado (94 kJ.mol^{-1}), alto coeficiente de difusão ($2,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$) e pequena restrição estérica o tornando um supressor eficiente para estados excitados. Dependendo da amostra sob investigação, frequentemente é necessário remover o oxigênio dissolvido para obter resultados confiáveis.

1.5.2 Modelos teóricos para os processos de supressão

1.5.2.1 Supressão Estática

O processo de supressão estática pode ser descrito pelo Esquema 7. A supressão nesse caso ocorre como resultado da formação de um complexo no estado fundamental não fluorescente entre o fluoróforo F e o supressor Q , com a Figura 22 mostrando as duas hipóteses para a ocorrência do processo de supressão.



Esquema 7

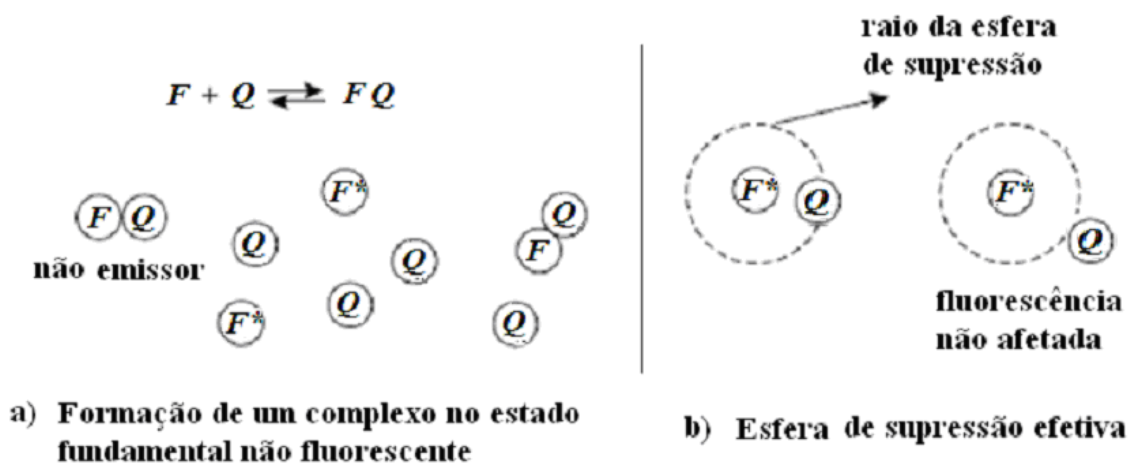
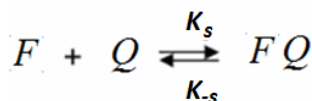


Figura 22 – Descrição hipotética do processo de supressão de fluorescência do fluoróforo F pelo supressor Q [modificado de Valeur (2001)]

Hipótese a) – Formação de um complexo no estado fundamental não fluorescente onde K_s é a constante de equilíbrio (ou constante de associação) (Esquema 8). A equação de Stern-Volmer para o processo de supressão estática de um fluoróforo F por um supressor Q pode assim ser deduzida (Equação 9).



Esquema 8

$$K_{sv} = \frac{[FQ]}{[F][Q]}$$

Consequentemente

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q]$$

Equação 9

Onde:

- $[F_0]$ - é a concentração do fluoróforo livre,
- $[F]$ - é a concentração de fluoróforo não complexado,
- $[Q]$ - representa a concentração de supressor,
- $[FQ]$ - é a concentração do complexo,
- $K_s = K_{sv}$ - é a cte de Stern-Volmer

Um gráfico de F_0/F contra $[Q]$ será linear com intercepto igual a 1 quando $[Q]=$ zero e com inclinação fornecendo o valor da constante de supressão K_{SV} (Figura 23).

Como os fluoróforos complexados não são fluorescentes, nesse caso a fluorescência residual é observada somente a partir dos fluoróforos não complexados e sendo assim o tempo de vida de fluorescência é independente da concentração do supressor $[Q]$ e como consequência $\tau_0 / \tau = 1$.

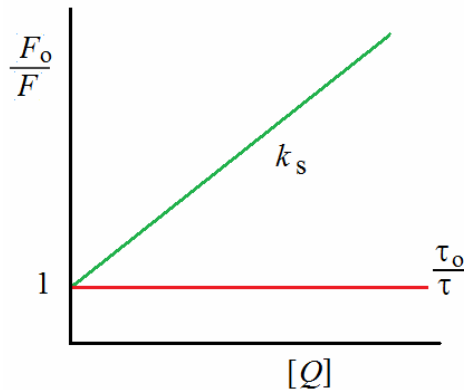


Figura 23 – Gráfico de Stern-Volmer para o modelo de supressão estática da fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q [modificado de Lakowicz (2006)]

Hipótese b) – Esfera de supressão efetiva (Perrin): Modelo no qual a supressão do fluoróforo é assumida ser completa se a molécula do supressor Q estiver localizada internamente a uma esfera de volume V_q localizada ao redor do fluoróforo F . A probabilidade de que n moléculas de Q estejam no interior do V_q obedece à distribuição de Poisson.

Onde: [Valeur (2001)]

$$P_n = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} \exp(-\langle n \rangle)$$

$\langle n \rangle$ é o numero médio de supressores no volume V_q

$$V_q: \langle n \rangle = V_q N_a [Q] \quad \left| \begin{array}{l} V_q \text{ (L)} \\ [Q] \text{ mol L}^{-1} \\ N_a \text{ é o número de Avogadro} \end{array} \right.$$

A probabilidade de não existir supressor no volume V_q é:

$$P_0 = \exp(-\langle n \rangle) = \exp(-V_q N_a [Q])$$

Sendo que, devido ao fato da intensidade de emissão ser proporcional a F_0 , o modelo de Perrin leva a:

$$\frac{F_0}{F} = \exp(V_q N_a [Q])$$

Como consequência, a altas concentrações de supressor, a relação F_0/F não será linear e mostra uma curvatura ascendente (Figura 24).

A baixas concentrações de supressor a expressão $\exp(V_q N_a [Q]) \approx 1 + V_q N_a [Q]$, assim sendo a dependência com a concentração é quase linear como no caso da equação de Stern-Volmer ($V_q N_a$ – normalmente $1-3 \text{ L mol}^{-1}$, o que leva a uma esfera de raio de aproximadamente 10 \AA) (Equação 10).

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D [Q]) \exp([Q] \sqrt{N}/1000)$$

Equação 10

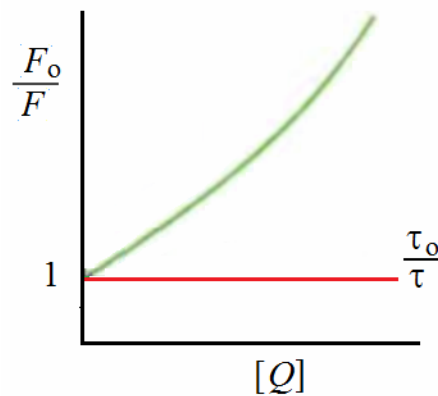
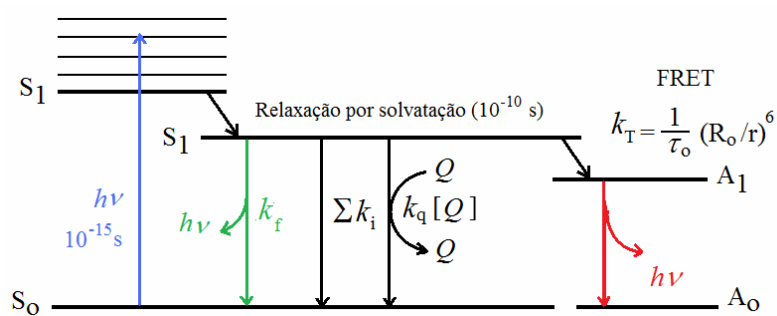


Figura 24 – Gráfico de supressão de fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q segundo o modelo de supressão estática de Perrin [modificado de Lakowicz (2006)]

1.5.2.2 Teoria da Supressão Colisional

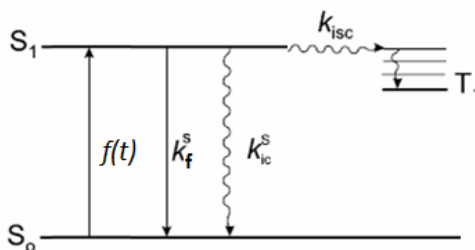
Uma visão cinética para o processo de supressão colisional pode ser descrita pelo diagrama de Jablonski simplificado (Esquema 9). Nesse diagrama estão representados os processos de desativação: intrínseca (natural), supressão colisional e por transferência de energia ressonante de Förster.



Esquema 9

Para esse mecanismo, quando sob iluminação constante (estado estacionário) podemos ter os seguintes diagramas de energia: [modificado de Lakowicz (2006)]

a) Na ausência de supressor: (Esquema 10)



Esquema 10

Para o processo no estado estacionário a variação de fluorescência com o tempo é dada pela seguinte expressão: (Equação 11)

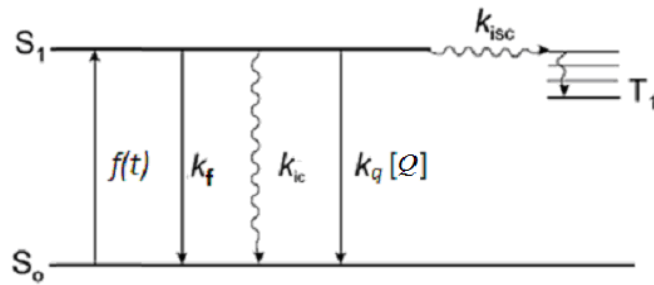
$$\frac{d|F^*|}{dt} = f(t) - k_M |F^*|_0 = 0$$

Equação 11

Nesse caso a constante de desativação intrínseca é dada pelo somatório de todos os processos de desativação:

$$k_M = k_f + k_{ic} + k_{isc} = 1/\tau_0$$

b) Na presença de supressor, o processo de decaimento pode ser representado como segue: (Esquema 11)



Esquema 11

Para o processo no estado estacionário a variação da intensidade de fluorescência com o tempo é dada pela seguinte expressão: (Equação 12)

$$\frac{d|F^*|}{dt} = f(t) - (k_M + k_q[Q])|F^*| = 0$$

Equação 12

Onde:

k_M - cte de desativação intrínseca,

$f(t)$ - é uma função da cte de excitação,

k_f - cte de velocidade radiativa,

k_{ic} - cte de velocidade de conversão interna,

k_{isc} - cte de velocidade de cruzamento entre sistemas e

k_q - cte de velocidade de supressão devido à supressão dinâmica

Dividindo a equação 11 pela equação 12, obtemos a equação de Stern-Volmer para o processo dinâmico de supressão de fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q . (Equação 13)

$$\frac{F_0}{F} = \frac{k_M + k_q[Q]}{k_M} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$

Equação 13

A mesma equação pode ser obtida através dos tempos de vida na ausência e na presença de supressor: (Equação 14)

$$\tau_0 = k_M^{-1}$$

$$\tau = (k_M + k_q[Q])^{-1}$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Equação 14

Conseqüentemente:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}$$

Onde:

F_0 e F - intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente;

k_q - constante de velocidade de supressão bimolecular;

τ_0 - tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor ;

τ - tempo de vida do fluoróforo na presença de supressor;

Q - concentração de supressor;

$K_{SV} = k_q \tau_0$ - constante de supressão de Stern-Volmer

Obs: Se a supressão é conhecida por ser dinâmica, a constante de Stern-Volmer pode ser representado por K_D . Caso contrário, esta constante pode ser descrito como K_{SV} .

Nesse caso um gráfico de F_0/F contra $[Q]$ será linear e com intercepto igual a 1 quando a concentração do supressor for zero e K_D^{-1} é a concentração do supressor na qual $F_0/F = 2$ ou 50% da intensidade é extinta. (Figura 25)

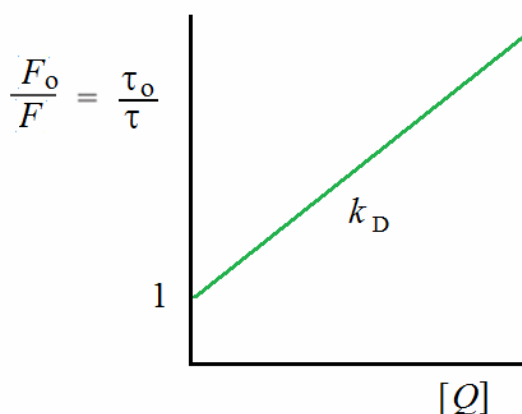


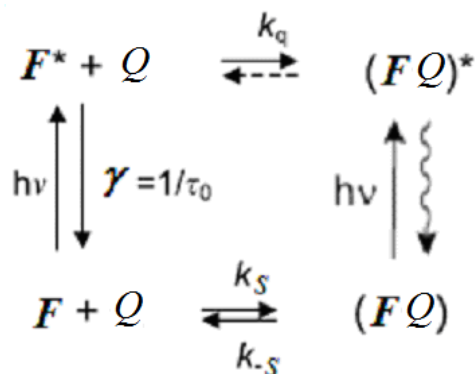
Figura 25 – Gráfico de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmica da fluorescência do fluoróforo F por um supressor Q . [modificado de Lakowicz (2006)]

Esta equação ilustra uma característica importante da supressão colisional, o que é equivalente a uma diminuição da intensidade de fluorescência e tempo de vida na medida que se adiciona concentrações crescentes de supressor. A diminuição no tempo de vida ocorre porque a presença do supressor proporciona um caminho adicional que leva à desativação de uma fração do estado excitado por um mecanismo outro que não a fluorescência.

A constante de velocidade de supressão bimolecular (k_q), que reflete a eficiência de supressão ou a acessibilidade dos fluoróforos ao supressor quando controlada por difusão tipicamente resulta em valores de k_q muito próximos à constante de velocidade de difusão (k_{dif}). Por exemplo, em solução aquosa $k_{dif} = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Murov *et al.* (1993)]. Os valores de k_q menores do que o valor da constante de velocidade de difusão pode ser consequência de uma blindagem estérica do fluoróforo ou uma baixa eficiência de supressão. Os valores aparentes de k_q maiores do que aqueles controlados por difusão indicam geralmente algum tipo de interação já no estado fundamental.

1.5.3 Equação de Stern-Volmer modificada para o processo de supressão combinado: estático e dinâmico

Para um processo combinado, onde podemos ter parte da supressão via um caminho estático e parte via um caminho dinâmico, o seguinte esquema pode ser escrito. (Esquema 12)



Esquema 12

Nesse caso, podemos dividir o processo de supressão em uma fração dinâmica e outra estática, sendo que a fluorescência fracionada remanescente (F/F_0) é dada pelo produto da fração não complexada (f), e a fração não suprimida por encontros colisionais: (Equação 15)

$$\frac{I}{I_0} = \frac{[F]}{[F_0]_{\text{din}}} \times \frac{[F]}{[F_0]_{\text{est}}}$$

/
\
 fração de moléculas fluorescente não complexada
 fração de moléculas fluorescente não suprimidas

Equação 15

Para o processo de supressão estático:

$$f = \frac{F}{F_0} = \frac{1}{(1 + K_S[Q])}$$

Equação 16

Para o processo de supressão dinâmico:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\tau}{\tau_0} = \frac{1}{(1 + K_D[Q])}$$

Equação 17

Substituindo as Equações 16 e17 na Equação 15 e reagrupando as variáveis temos:

$$K_{app} = \left[\frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]$$

Equação 18

Onde:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app} [Q]$$

Equação 19

A principal característica dos gráficos de Stern-Volmer (Equação 19) em tais circunstâncias é uma curvatura para cima, côncavo em direção ao eixo y. (Figura 26a) Um gráfico da equação de Stern-Volmer modificada para esse caso leva a um intercepto igual a $K_D + K_S$ e inclinação $K_D K_S$.

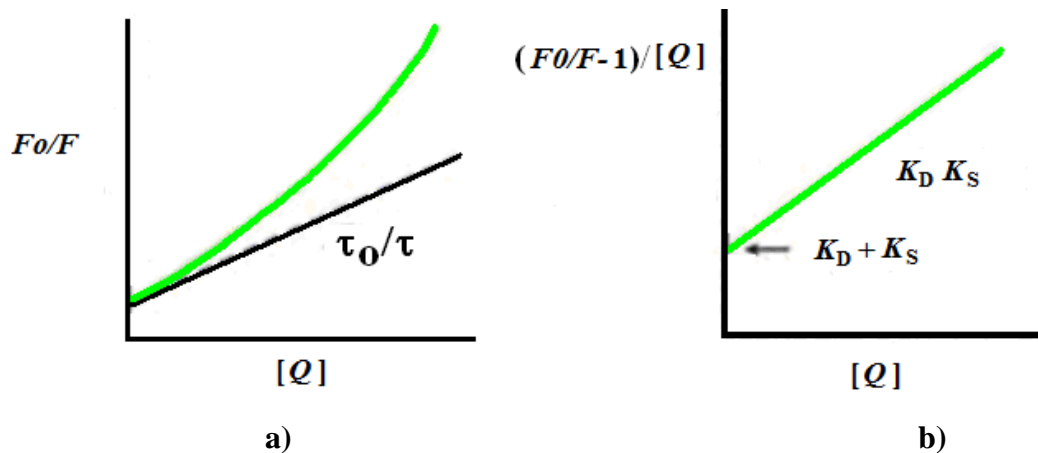


Figura 26 – Gráfico de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificado para o processo de supressão combinado (estática e dinâmico) da fluorescência de um fluoróforo F por um supressor Q [modificado de Lakowicz (2006)]

Obs: A porção dinâmica da supressão observada pode ser calculada a partir de experimentos de tempo de vida

1.5.4 Equação de Stern-Volmer modificada para um sistema contendo mais de um fluoróforo

Quando um sistema contém mais de um fluoróforo, a fluorescência total será a soma das fluorescências parciais provenientes de todas as espécies emissivas:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} + \dots + F_{0n}$$

Para um modelo com duas espécies emissivas sendo apenas uma acessível, teremos que a intensidade observada será dada pela seguinte equação de Stern-Volmer modificada:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a[Q]} + F_{0b}$$

Equação 20

K_a - cte de Stern-Volmer para a fração de fluoróforos acessíveis.

Reagrupando as variáveis temos:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \left(\frac{K_a[Q]}{1 + K_a[Q]} \right)$$

Definindo o termo f_a como sendo a fração de fluoróforos acessíveis.

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0b} + F_{0a}}$$

Temos:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

Equação 21

Nesse caso um gráfico de F_0/F contra $[Q]$ será uma curva côncava em direção ao eixo x . O gráfico de $F_0/\Delta F$ contra $1/[Q]$ será linear e com intercepto igual a $1/f_a$ quando a concentração do supressor for zero e K_D^{-1} é a concentração do supressor na qual $F_0/F = 2$ ou 50% da intensidade é extinta (Figura 27).

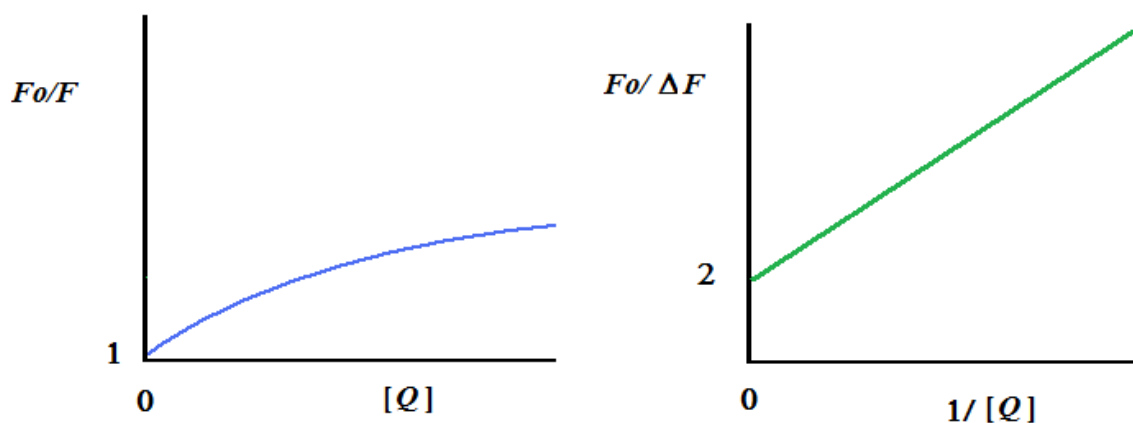
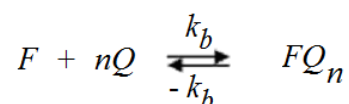


Figura 27 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de um sistema contendo mais de um fluoróforo sendo apenas um deles acessível. [modificado de Lakowicz (2006)]

1.5.5 Equação de Stern-Volmer modificada para um sistema contendo mais de um sítio de interação (n)

No caso de um processo de supressão onde existe a possibilidade de ocorrência de mais de um sítio de ligação a equação cinética (Equação 22) para esse caso será escrita como (Esquema 13):



Esquema 13

Consequentemente:

$$K_b = [Q_n F] / [Q]^n [F]$$

Onde:

$$[Q_n F] = F_0 - F$$

Logo:

$$\log(F_0 - F) / F = \log k_b + n \log [Q]$$

Equação 22

Nesse caso, na equação de Stern-Volmer modificada, n representa o número de sítios de ligação e k_b é a constante de associação que está correlacionada ao processo de interação. (Equação 22)

Um gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ contra $\log[Q]$ será linear com coeficiente angular igual a n e ordenada igual a $\log k_b$. (Figura 28)

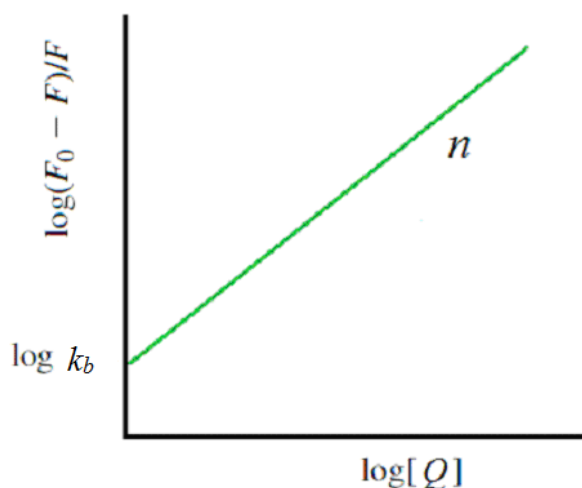


Figura 28 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a possibilidade de mais de um sítio de ligação. [modificado de Lakowicz (2006)]

1.6 Transferência de energia a longa distância

Os processos de transferência de energia podem ser divididos em dois grupos. O primeiro é baseado em um modelo puramente espectroscópico, onde a energia do estado excitado é transferido a partir do fluoróforo F para o supressor Q , através da emissão de um fóton que é gerado a partir do doador e subsequentemente absorvido pelo acceptor. Esse mecanismo é conhecido como mecanismo trivial [Turro (1978)].

1.6.1 Processo de transferência de energia ressonante de Förster

Um segundo processo é aquele onde o mecanismo de transferência ocorre sem a emissão de um fóton. Nesse caso, a transferência de energia se processa por um mecanismo oriundo de perturbações fracas que podem ser formuladas pela “regra de ouro” onde a transferência de energia é dada pela probabilidade de transição que é governada pela seguinte equação: (Equação 23)

$$\text{Probabilidade } (Q^*A \rightarrow QA^*) \rightarrow \frac{2\pi}{h}(\rho)\langle\psi_i | H | \psi_f\rangle^2$$

Equação 23

Onde:

ψ_i - é a função de onda do estado inicial

ψ_f - é a função de onda do estado final

ρ - é a medida do número ou da densidade dos estados iniciais e finais capazes de interagirem e

H - é a interação específica capaz de acoplar ψ_i e ψ_f o qual pode ser representado esquematicamente na Figura 29.

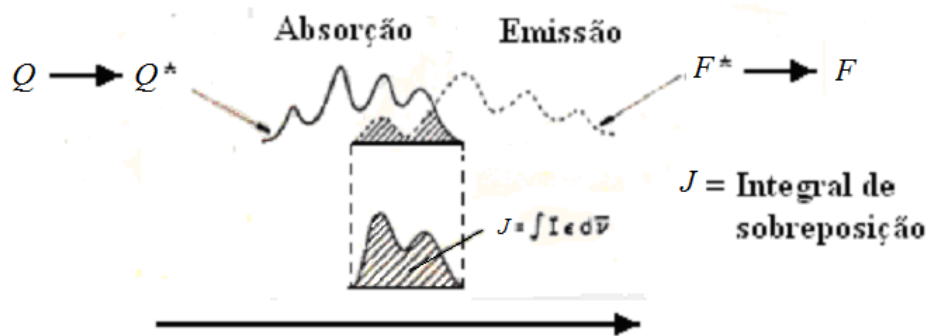


Figura 29 – Representação esquemática da integral de sobreposição para o processo de Transferência de energia ressonante (não-radiativa) de Förster [modificado de Turro (1978)]

Esse processo é baseado em uma interação coulômbica, onde a transferência de energia ocorre através do espaço sem a necessidade do contato físico entre as duas espécies. (Figura 30)

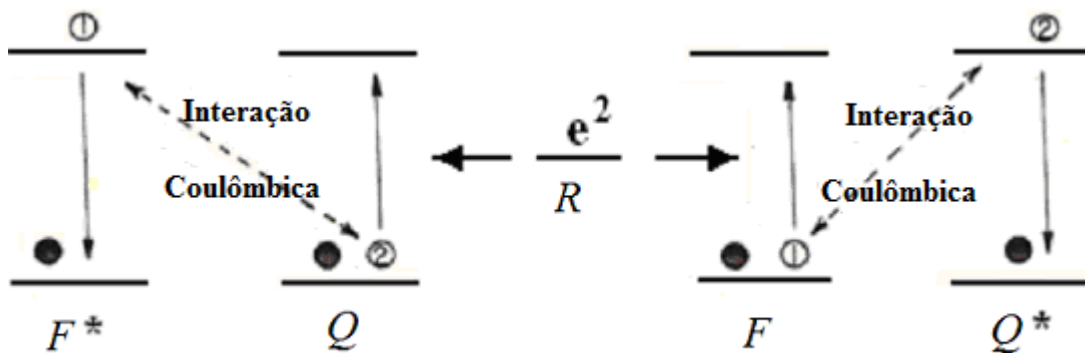


Figura 30 – Representação esquemática do processo de Transferência de energia ressonante (não-radiativa) de Förster [modificado de Turro (1978)]

A eficiência de transferência de energia (E) entre doador e acceptor está relacionada com as distâncias (R_0) e (r) que representam a distância crítica entre o doador/acceptor, quando a eficiência de transferência for 50% e a distância efetiva doador/acceptor respectivamente.

O mecanismo coulômbico pode ser interpretado como uma interação clássica entre duas partículas carregadas. O campo elétrico próximo à espécie eletronicamente excitada comporta-se como um dipolo oscilante com frequência (ν) e com momento de dipolo instantâneo (μ) que pode ser dado pela expressão:

$$\mu = \mu_a \cos 2\pi \nu t$$

Equação 24

Com a eficiência de transferência de energia desta interação podendo ser escrita como (Equação 25):

$$E_{(\text{dipolo-dipolo})} \propto \mu_D \mu_A / R^3$$

Equação 25

Nesse modelo a eficiência de transferência de energia (E) está diretamente relacionada com as distâncias (R_0) e (r) entre doador e acceptor e pode ser obtida experimentalmente a partir da sobreposição do espectro de emissão de fluorescência da espécie doadora com o espectro de absorção da espécie acceptora. Matematicamente o valor da integral de sobreposição (J) entre os espectros de emissão (doador) com o espectro de absorção (acceptor) pode ser calculado a partir da Equação 26 [Lakowicz (2006), Xie *et al.* (2005), [Shi *et al.* (2007)].

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda}$$

Equação 26

Onde:

J - integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASH) com o espectro de absorção do acceptor (naftoquinona);

$F(\lambda)$ - intensidade de fluorescência do doador (ASH) em um comprimento de onda λ ;

$\varepsilon(\lambda)$ - coeficiente de absorção molar, ou absorvidade molar do acceptor (naftoquinona) em um comprimento de onda λ [Pace *et al.* (1995)];

λ - comprimento de onda (λ em cm; 1 nm = 1×10^{-7} cm; 1 cm = 1×10^7 nm);

$\Delta\lambda$ - variação de comprimento de onda.

Os valores de (R_0) que representa a distância crítica entre o doador e o acceptor, quando sua eficiência de transferência é 50% podem ser obtidos pela Equação 27 [Epps *et al.* (1998), Yue *et al.* (2008) e Karreman *et al.* (1967)].

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J$$

$$\left. \begin{array}{l} K^2 = 2/3 \\ N = 1,336 \\ \phi = 0,15 \end{array} \right\} \text{ASH}$$

Equação 27

Onde:

K^2 - fator de orientação espacial do dipolo ou fator de orientação entre a emissão do dipolo do doador e a absorção do dipolo do acceptor (assumindo que doador e acceptor são livres para assumir qualquer orientação, $K^2 = 2/3$);

N - índice de refração do meio;

ϕ - rendimento quântico de fluorescência do doador;

J - integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador com o espectro de absorção do acceptor;

R_0 - distância crítica entre o doador e o acceptor, quando sua eficiência de transferência é 50%.

Para esses cálculos, o fator de orientação espacial do dipolo ou fator de orientação entre a emissão do dipolo do doador e a absorção do dipolo do acceptor K^2 é o parâmetro mais incerto. Teoricamente, o parâmetro K^2 pode ser na faixa de 0 a 4, mas os valores extremos requerem orientações muito rígidas. Se ambos, doador e acceptor são fracamente ligados e são livres para assumir qualquer orientação, então K^2 é igual a 2/3 [Liu *et al.* (2003), Kandagal *et al.* (2006), Shi *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Qing *et al.* (2009)].

Os valores de eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador e acceptor E podem ser obtidos através da Equação 28 [Sklar *et al.* (1977), Horrocks Jr. *et al.* (1981), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Lakowicz (2006), Mahesha *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shi *et al.* (2007), Banerjee *et al.* (2008), Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)].

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Equação 28

Conseqüentemente os valores da distância entre o doador e o acceptor, ou distância de interação r podem ser obtidos pela seguinte equação (Equação 29) [Sklar *et al.* (1977) e Yue *et al.* (2008)]:

$$r^6 = \frac{R_0^6 \cdot (1 - E)}{E}$$

Equação 29

Onde:

- E = eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador e acceptor,
- F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência do supressor,
- F = intensidade de emissão de fluorescência na presença do supressor,
- R_0 = distância crítica entre o doador e o acceptor, quando sua eficiência de transferência é 50% e
- r = distância de ligação entre doador e acceptor.

1.7 Fluorescência resolvida no tempo

Fluorimetria pulsada, técnica de fluorescência resolvida no tempo utilizada neste trabalho, trabalha no domínio de tempo. A amostra é excitada por um pulso de luz curto (um LED pulsado com comprimento de onda no máximo de absorção do fluoróforo) e a resposta da fluorescência é apresentada em função do tempo. (Figura 31)

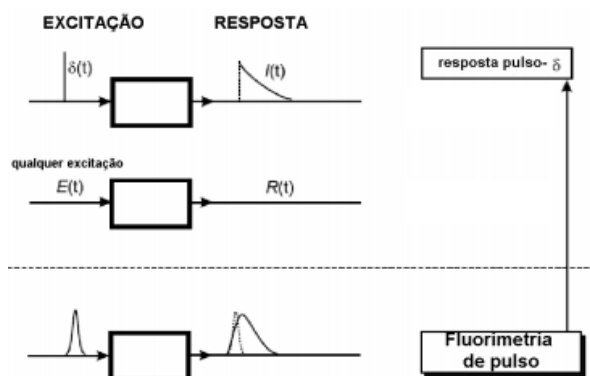


Figura 31 – Princípios de fluorimetria resolvida no tempo pulsada [modificado de Valeur (2001)]

Supondo, em um exemplo, que uma amostra contendo um fluoróforo seja excitada com um pulso de luz infinitamente curto, resultando na excitação de uma população inicial N_0 de fluoróforos para o primeiro estado excitado singlete, o decaimento para o estado fundamental ocorre com uma constante de velocidade $k_r + k_{nr}$. (Equação 30)

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr}) \cdot N(t)$$

Equação 30

Onde:

$N(t)$ - número de moléculas excitadas no tempo t ,
 k_r - constante de velocidade radiativa (fluorescência ou fosforescência) e
 k_{nr} - constante de velocidade de decaimento não radiativo.

A emissão é um evento aleatório, onde cada fluoróforo possui igual probabilidade de emissão num dado intervalo de tempo. Ao integrar a equação 30, tem-se um decaimento exponencial da população excitada. (Equação 4)

$$N = N_0 \cdot \exp(-t/\tau)$$

Equação 31

Como a intensidade radiativa (I) é proporcional a $N(t)$ pode ser expresso como: (Equação 5)

$$I = \alpha \cdot \exp(-t/\tau)$$

Equação 32

Onde τ é o tempo de vida e α a intensidade no tempo zero, com τ sendo mostrado na Equação 33

$$\tau = (k_r + k_{nr})^{-1}$$

Equação 33

O tempo de vida de fluorescência, em geral, é relacionado com o tempo requerido para a intensidade decair 63.21% ($1/e$) de seu valor inicial. O tempo de vida é determinado através do coeficiente angular do gráfico $\log I(t)$ versus t . (Figura 32)

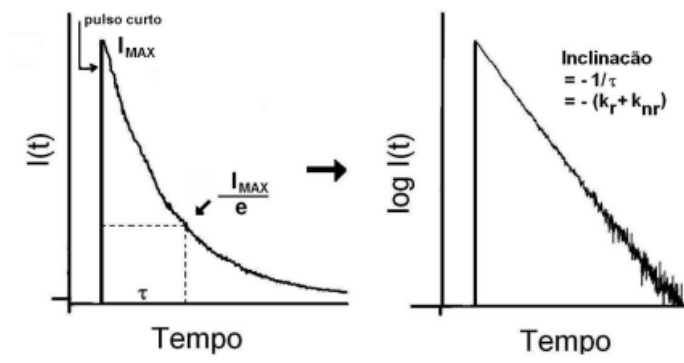


Figura 32 – Curva de decaimento de fluorescência [modificado de Lakowicz (2006)]

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar a interação de compostos bioativos análogos a 1,2-naftoquinona com albumina sérica humana através das técnicas espectroscópicas de absorção no UV/Vis, fluorescência, dicroísmo circular e fluorometria de resolução temporal, e obter os parâmetros físico-químicos ΔG° , ΔH° e ΔS° envolvidos nos processos de interação composto bioativo/proteína. Também serão determinados os valores de integral de sobreposição, a distância crítica quando da transferência de 50% da energia R_0 e r , assim como, as mudanças conformacionais que ocorrem nas ASH quando da interação com compostos bioativos.

As substâncias furânicas e pirânicas derivadas da 1,2-naftoquinona estudadas neste trabalho estão mostrados na Figura 33.

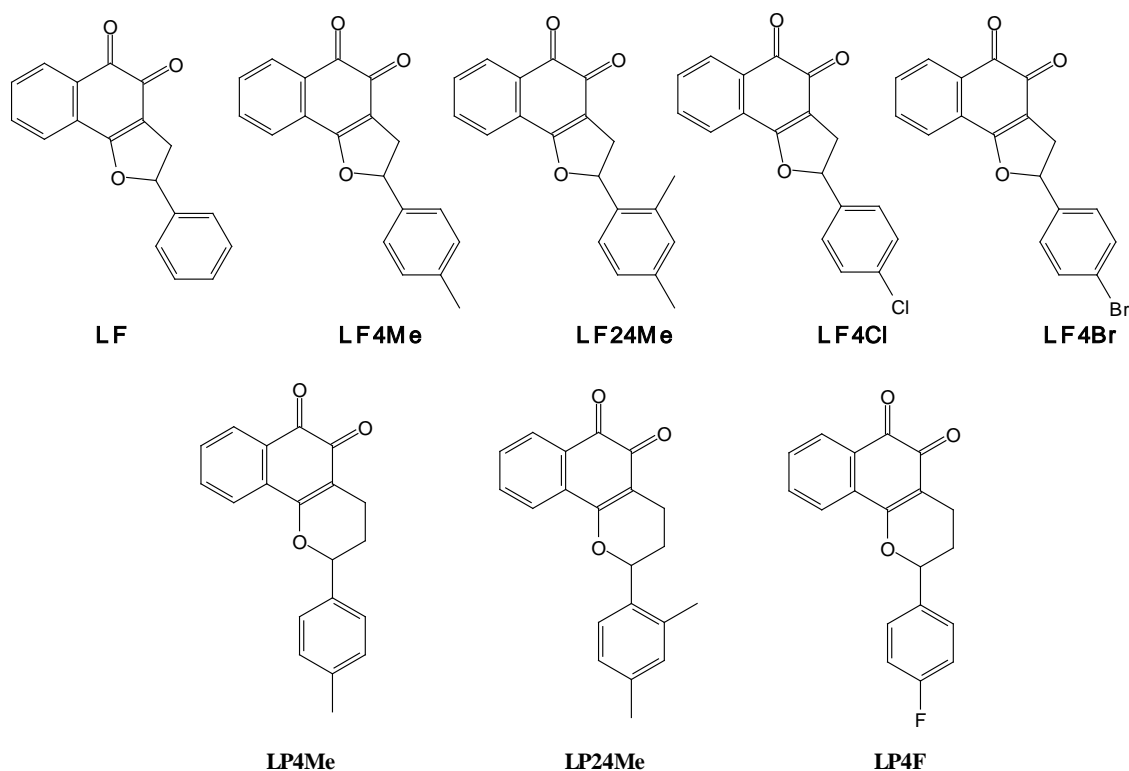


Figura 33 – Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Aparelhos

Os espectros na região do ultravioleta (UV) e os espectros de fluorescência foram realizados em um espectrofluorímetro Jasco modelo J-815 com cela de quartzo de 1 cm de passo ótico equipada com sistema termostatizado Jasco PFD-425S15F com precisão de 0,1°C.

Os espectros de dicroísmo circular foram feitos no espectropolarímetro Jasco modelo J-815 com cela de quartzo de 1 cm de passo ótico equipada com sistema termostatizado Jasco PFD-425S15F com precisão de 0,1°C.

Os experimentos de fluorescência com resolução temporal foram realizados utilizando-se um espectrofluorímetro Edinburgh FLS-920, onde foi empregado, para excitação, um laser de diodo pulsado da Edinburgh Instruments ($\lambda_{exc} = 280 \pm 10$ nm; pulso de 850 ps; 1,8 μ W/pulso), com monitoramento da emissão a 340 nm.

3.1.2 Vidraria

Todo o material de vidro utilizado nos processos de preparação e na manipulação das amostras foi limpo de acordo com o roteiro abaixo:

- A vidraria foi colocada em imersão em uma solução de etanol/água, com 10% de NaOH, durante 24 horas;
- Enxaguada com água corrente;
- Enxaguada com água destilada;
- Enxaguada com etanol P.A.;
- Enxaguada com acetona P.A.;
- Enxaguada com acetona grau espectroscópico;
- Seca em estufa a 150°C.

3.1.3 Reagentes

As 1,2-naftoquinonas utilizadas nesse estudo foram sintetizadas no Laboratório de Síntese de Carboidratos e Nucleosídeos, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, e gentilmente cedidos pelo Dr. Vitor F. Ferreira e pela Dr^a Sabrina Baptista Ferreira.

Metanol, grau espectrofotométrico, foi adquiridos à Vetec.

A albumina utilizada neste trabalho foi a albumina sérica humana (ASH), produto comercial comprado da Aldrich.

Sachês de PBS, utilizados neste trabalho, foram produtos comerciais comprados da Aldrich, com os quais foram preparadas soluções tampão fosfato (PBS) de pH = 7,4.

Água, grau milli-Q, foi obtida através do aparelho DIRECT-Q, modelo MILLIPORE, que se encontra na sala 22 do departamento de química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no LBBMA (Laboratório de bioquímica e biologia molecular de artrópodes).

3.2 Métodos

As 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) foram analisados por técnicas de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis), e em albumina sérica humana (ASH) por técnicas de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência com variação de temperatura ($\lambda_{exc} = 280$ nm; T = 305 K, 310 K, 315 K) e dicroísmo circular com variação de temperatura (T = 305 K, 310 K e 315 K).

3.2.1 Soluções

- Soluções de concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L dos derivados das 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em etanol (solução 1);
- Solução buffer de fosfato (PBS), uma solução tampão fosfato de pH = 7,4 (1 sachê solubilizado em 1 L de água milli-Q);
- Soluções $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L de albumina sérica humana (ASH) em solução buffer de fosfato (PBS) (tampão fosfato de pH = 7,4) (solução 2);
- Soluções $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L de albumina sérica humana (ASH) em solução buffer de fosfato (PBS) (tampão fosfato de pH = 7,4) (solução 3).

3.2.2 Estudos espectroscópicos na região do ultravioleta/visível (UV-Vis)

Foram registrados espectros de absorção na região do UV-Vis para a ASH e os derivados das naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em solução tampão de PBS (pH = 7,4) com varreduras na faixa de 200 nm a 450 nm, com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Estudos do processo de interação dos compostos bioativo/ASH foram realizados por titulação de uma alíquota contendo 3 mL da solução de albumina sérica humana (ASH) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. Inicialmente foi registrado os espectros de na região do UV-Vis da solução de albumina pura (branco). Aos 3 mL de solução de albumina (ASH), foi adicionada sucessivamente alíquotas de 10 μ L de uma solução dos derivados de naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, e os espectros de absorção UV-Vis eram registrados na faixa entre 200 a 450nm. (Figuras 34, 35, 65, 79, 93, 107, 121 e 135).

3.2.3 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência

Foram registrados espectros de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{ex}=280$, emissão 290 - 450 nm) em solução tampão de PBS (pH = 7,4), com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K (Figura 37).

Os estudos da interação dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) com a albumina sérica humana (ASH), por espectroscopia de fluorescência foi realizada inicialmente pelo registro da emissão de fluorescência de uma alíquota de 3 mL de uma solução de albumina sérica humana (ASH) tamponada com PBS (pH = 7,4) concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L de modo a obter a intensidade de fluorescência inicial (F_0), sendo em seguida, realizada uma titulação através da adição de alíquotas sucessivas dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L de modo a obter um valor de supressão inicial (F_0-F) com aproximadamente 10% do valor inicial da fluorescência da ASH (F_0) (Figuras 37, 53, 67, 81, 95, 109, 123 e 137).

As condições utilizadas para estas análises foram as seguintes: espectro de emissão de fluorescência (varredura de 337 nm a 343 nm), e comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ nm), com fendas de emissão a 5,0 nm e de excitação a 10 nm e velocidade de 100 nm/min. Todos os estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência foram realizados nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K.

3.2.4 Estudos espectroscópicos de dicroísmo circular

As condições utilizadas para esta análise foram: varredura (faixa) de 200 nm a 250 nm, com velocidade de 100 nm/min no espectropolarímetro e controle de temperatura (T = 305 K, 310 K e 315 K). A linha de base foi realizada com uma solução aquosa de PBS (pH = 7,4). Para a realização das análises de dicroísmo circular, foram colocados em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico, uma alíquota de 3 mL de uma solução de albumina (ASH) com uma concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L tamponada com PBS (pH = 7,4), a partir da qual foi registrado a sua elipticidade inicial de modo a se obter o espectro inicial (Figura 45). A essa solução foram adicionadas alíquotas com volumes: 12 μ L, 24 μ L, 48 μ L e 96 μ L dos derivados da 1,2-naftoquinona (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, de tal forma a se obter uma relação composto bioativo/ASH nas proporções de 1:0; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. Após cada uma dessas adições, foram feitas leituras das soluções contidas na célula de quartzo.(Figuras 46, 47 48, 61, 62, 63, 75, 76, 77, 89, 90, 91, 103, 104, 105, 117, 118, 119, 131, 132, 133, 145, 146 e 147)

3.2.5 Condições de análises

3.2.5.1 Ultravioleta/Visível

Tabela 3 – Temperatura utilizada na absorção de UV-VIS de ASH na presença dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br).

pH	T (K)
7,4	310

Tabela 4 – Concentração final dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 310 K.

Adição de LFs (de 10 μ L em 10 μ L)	Concentração de LFs (10^{-6} mol/L)
0 μ L	0
10 μ L	3,32
20 μ L	6,62
30 μ L	9,90
40 μ L	13,20
50 μ L	16,40
60 μ L	19,60
70 μ L	22,80
80 μ L	26,00

3.2.5.2 Fluorescência

Tabela 5 – Temperaturas utilizadas na espectroscopia de emissão de fluorescência de ASH na presença dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br).

pH	T (K)
7,4	305
	310
	315

Tabela 6 – Concentração final dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 305 K, 310 K e 315 K.

Adição de LFs (de 10 μ L em 10 μ L)	Concentração de LFs (10^{-6} mol/L)
0 μ L	0
10 μ L	3,32
20 μ L	6,62
30 μ L	9,90
40 μ L	13,20
50 μ L	16,40
60 μ L	19,60
70 μ L	22,80
80 μ L	26,00

Tabela 7 – Concentração final dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L diluída na proporção (1:1), em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 305 K, 310 K e 315 K.

Adição de LFs (de 15 μ L em 15 μ L)	Concentração de LFs (10^{-6} mol/L)
0 μ L	0
15 μ L	2,49
30 μ L	4,95
45 μ L	7,39
60 μ L	9,80
75 μ L	12,20
90 μ L	14,60
105 μ L	16,90
120 μ L	19,20

3.2.5.3 Dicroísmo

Tabela 8 – Temperaturas utilizadas na espectroscopia de dicroísmo circular de ASH na presença dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br).

pH	T (K)
7,4	305
	310
	315

Tabela 9 – Concentração dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) após a adição de alíquotas de uma solução das LFs ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), em 3 mL da solução de ASH ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L), para T=305 K, 310 K e 315 K.

(ASH:1,2-naftoquinona)	Concentração final de 1,2-naftoquinona (10^{-6} mol/L)
(1:0)	0
(1:4)	3,90
(1:8)	7,90
(1:16)	15,70
(1:32)	31,00

3.2.5.4 Fluorescência resolvida no tempo

Para o experimento de fluorescência com resolução temporal, utilizou-se uma solução $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L de ASH em PBS, em pH 7,4 e temperatura ambiente.

Tabela 10 – Concentração final da 1,2-naftoquinonas LF após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,48 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L

Adição de 1,2-naftoquinonas	Concentração (10^{-6} mol/L)
0 μ L	0
10 μ L	4,92
20 μ L	9,80
30 μ L	14,70
40 μ L	19,50
50 μ L	24,30
60 μ L	29,00
70 μ L	33,70
80 μ L	38,40
160 μ L	74,90
320 μ L	143,00

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão acerca dos estudos fotofísicos da interação dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) com albumina sérica humana (ASH) estão apresentados a seguir.

4.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)

A albumina sérica humana (ASH) apresenta uma banda em comprimento de onda em torno de 280 nm, a qual é atribuída principalmente à absorção por parte do triptofano e em menor grau pela tirosina e pela fenilalanina. (Figura 34)

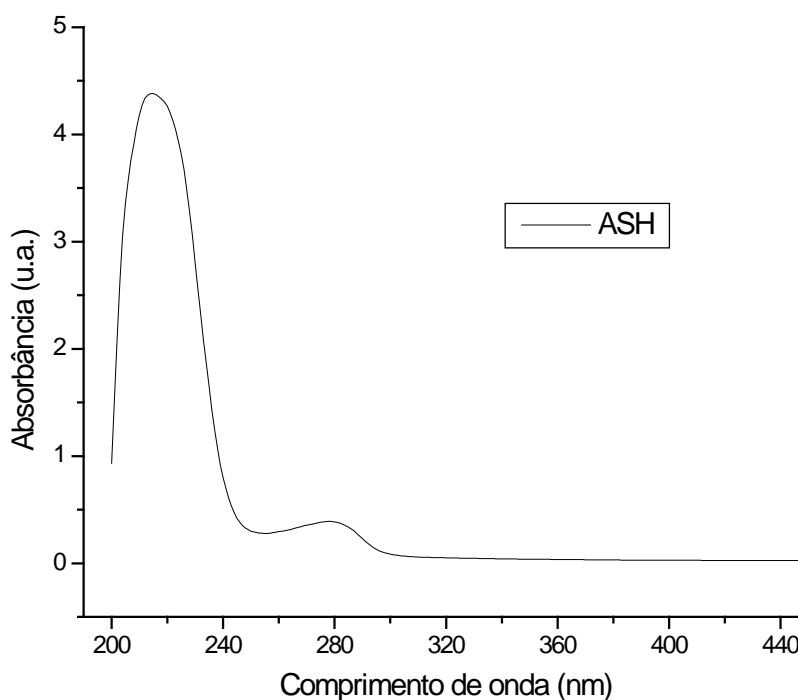


Figura 34 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L

O processo de interação no estado fundamental entre os derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) com a ASH foi investigado empregando-se espectros de absorção na região do UV-Vis (200 nm a 450 nm). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 35 para LF e no anexo para os demais compostos (Figuras 65, 79, 93, 107, 121 e 135).

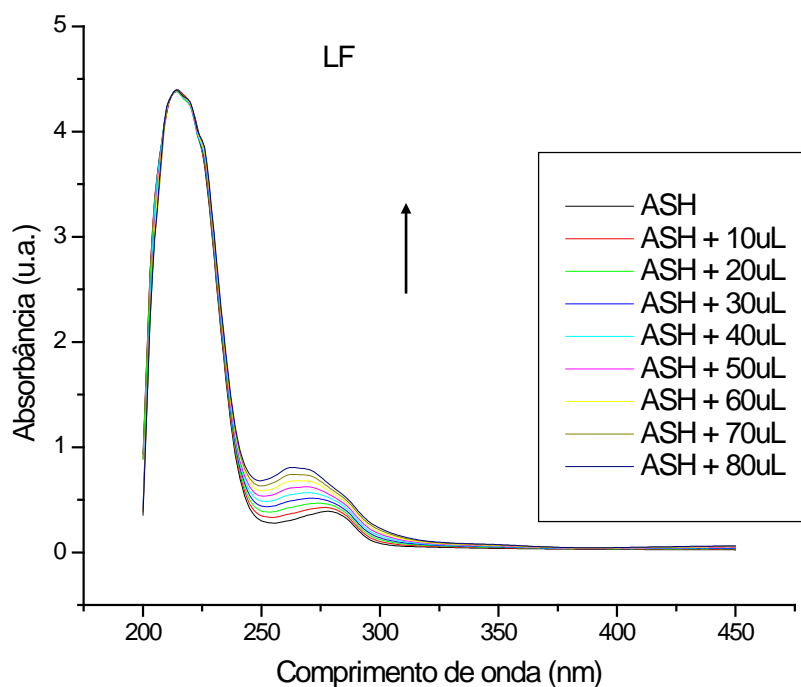


Figura 35 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações da 1,2-naftoquinona(LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (\times 10^{-5})$ mol/L

Os resultados destes estudos (Figura 35) mostram um aumento das bandas de absorção com o aumento da concentração de 1,2-naftoquinona ao mesmo tempo em que pode ser observado um leve deslocamento hipsocrômico (para o azul) da banda de absorção próxima a 280 nm, característica do triptofano, indicando uma possível formação de um complexo entre LF e ASH no estado fundamental. Os mesmos efeitos podem ser observados para os demais compostos estudados. (Figuras 51, 65, 79, 93, 107, 121 e 135)

No entanto, um indicativo da formação de um complexo no estado fundamental por estudos de absorção na região do UV-Vis pode ser descartado quando se analisa diretamente os espectros normalizados na região do UV-Vis, para o sistema 1,2-naftoquinona/ASH (Figura 36 e, 52, 66, 80, 94, 108, 122 e 136 para as demais 1,2-naftoquinonas estudadas), os quais mostraram a ausência de efeitos característicos que podem ser correlacionado com a formação de um complexo no estado fundamental.

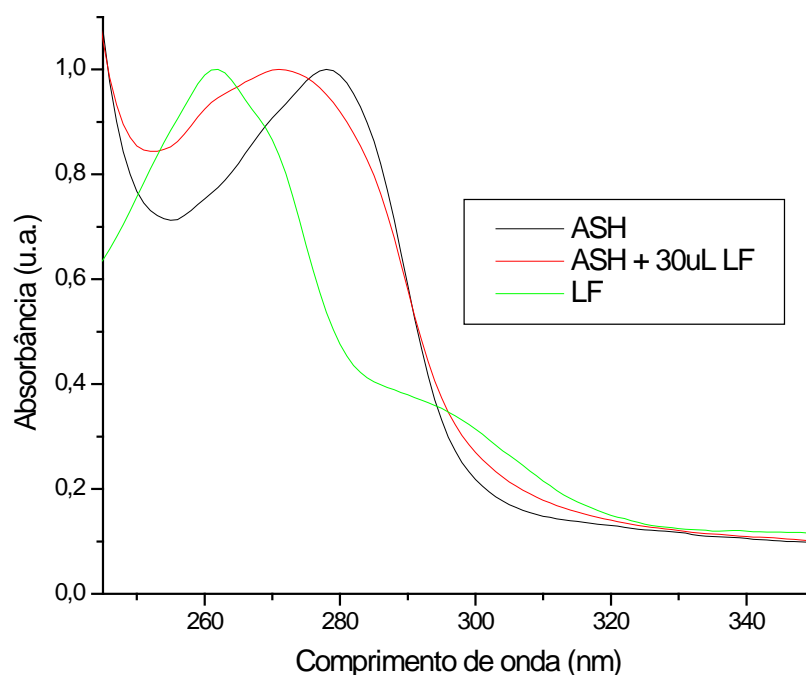


Figura 36 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF) $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L

Para a formação desses complexos entre as 1,2-naftoquinonas/ASH seria esperado que as regiões principais para a ligação dos compostos bioativos nos sítios de ligação da albumina que estão localizadas em uma cavidade hidrofóbica no subdomínio IIA, o qual é consistente com o sítio II e o resíduo de triptofano (Trp-214) de ASH está nesse subdomínio. Existe uma grande cavidade hidrofóbica presente no subdomínio IIA, onde muitos compostos bioativos, como por exemplo, as 1,2-naftoquinonas, podem se ligar formando os complexos 1,2-naftoquinona-ASH.

4.2 Espectroscopia de fluorescência

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência da ASH pelos compostos derivados da 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 310 K estão apresentados na Figura 37 para LF e no anexo para os demais compostos (Figuras 53, 67, 81, 95, 109, 123 e 137).

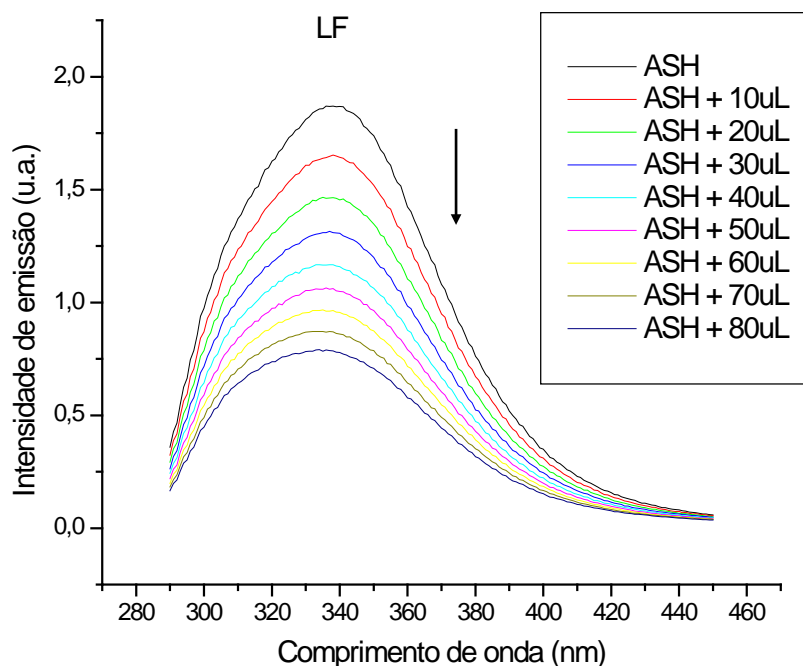


Figura 37 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações da 1,2-naftoquinonas LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LF} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 310 \text{ K}$

Nesses estudos, observou-se que a emissão de fluorescência da ASH foi suprimida pela adição de alíquotas sucessivas das 1,2-naftoquinonas. Tomando como exemplo a LF, a sucessiva adição desse composto levou a uma gradativa diminuição na intensidade de emissão de fluorescência de ASH (Figura 37), fato este que sugere uma possível interação entre LF e a ASH, e que a 1,2-naftoquinona está localizada próxima ao resíduo de triptofano contido na estrutura da albumina [Wei *et al.* (2006) e Cheng *et al.* (2009)]. Com o aumento da concentração de LF na solução de ASH, também foi observado um leve deslocamento para o azul na banda de emissão de fluorescência da ASH, sugerindo que o cromóforo presente na proteína (ASH), após a adição da 1,2-naftoquinona encontra-se em um ambiente diferente daquele anterior à sua adição, ou seja, na ASH pura (livre) [He *et al.* (2006) Cui *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008). Li *et al.* (2008), (2009), e Ribeiro (2010)]. Como consequência, pode-se admitir que o cromóforo da ASH passa a estar localizado em um ambiente mais hidrofóbico após a adição das 1,2-naftoquinonas, o que pode ser um indicativo de possíveis mudanças conformacionais da proteína (ASH). [Yuan *et al.* (1998), Zhang *et al.* (2008) e Cui *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008)] Os mesmos efeitos foram observados para os demais compostos estudados (Figuras: 53, 67, 81, 95, 109, 123 e 137).

Existem casos na literatura onde o aumento da concentração dos compostos bioativos leva a um leve deslocamento para o vermelho (maiores comprimentos de onda) na emissão de fluorescência, sugerindo que o composto se liga à cavidade hidrofóbica da albumina, levando a um aumento de polaridade ao redor do resíduo de triptofano [Shi *et al.* (2007) e Tang *et al.* (2006)].

Os mecanismos possíveis para o processo de supressão podem ser *estático* ou *dinâmico*, e sua interpretação pode ser investigada através de experimentos de supressão de fluorescência da proteína. Gráficos de Stern-Volmer a diferentes temperaturas [Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)], permitem que se obtenha as constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) e as constantes de velocidade de supressão de fluorescência (k_q) para a interação 1,2-naftoquinonas/ASH (Equação 9) [Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Lakowicz (2006), Xie *et al.* (2006), Cui *et al.* (2007), Li *et al.* (2007), Shi *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Li *et al.* (2009), Cheng *et al.* (2009), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)].

Nesse caso, para a determinação das constantes de velocidade de supressão k_q , foi utilizado o valor de $\tau_0 = 10$ ns para o tempo de vida de ASH na ausência de supressor, [Xie *et al.* (2005), Tang *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Lakowicz (2006), Cui *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)].

Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes à supressão de fluorescência do resíduo de triptofano da ASH pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), a diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K), estão mostrados na Figura 38 para LF e no anexo para os demais compostos (Figuras: 54, 68, 82, 96, 110, 124 e 138).

Os valores de K_{SV} e k_q para os estudos da interação dos derivados da 1,2-naftoquinona (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) com ASH vão apresentados na tabela 11. Os valores para k_q obtidos demonstram que o mecanismo mais provável para o processo de supressão da fluorescência de ASH pela interação com as 1,2-naftoquinonas é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelas 1,2-naftoquinonas ($k_q \cong 10^{12}$ a 10^{13} L/mol.s), e sua pouca dependência com a temperatura. (Tabela 11) Os valores para k_q encontrados nesse estudo são muito mais altos do que a constante de velocidade de difusão ($k_q \cong 5 \times 10^9$ L/mol.s, em água), indicando a formação inicial de uma pré-associação 1,2-naftoquinonas/ASH. Os valores obtidos para K_{SV} (10^3 a 10^5 L/mol) e para k_q (10^{11} a 10^{14} L/mol.s) foram semelhantes aos descritos na literatura

para outras moléculas [He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0}$$

Equação 9

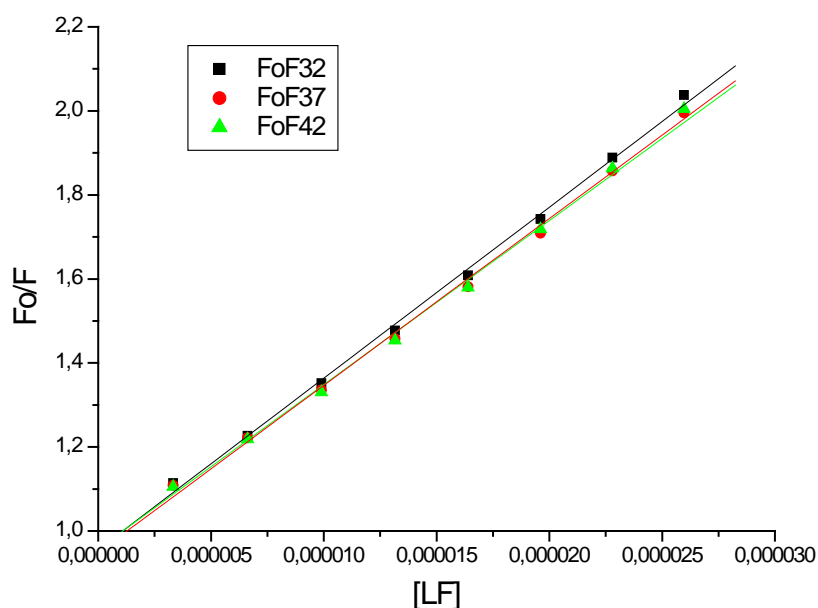


Figura 38 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF)

Tabela 11 – Valores de K_{sv} e k_q obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K)

T (K)	305		310		315	
	K_{sv} 10^5 L/mol	k_q 10^{12} L/mol.s	K_{sv} 10^5 L/mol	k_q 10^{12} L/mol.s	K_{sv} 10^5 L/mol	k_q 10^{12} L/mol.s
LP4Me	6,25	6,25	5,75	5,75	5,31	5,31
LP24Me	13,74	13,74	13,53	13,53	12,63	12,63
LP4F	4,40	4,40	4,23	4,23	4,02	4,02
LF	4,08	4,08	3,91	3,91	3,97	3,97
LF4Me	2,57	2,57	2,38	2,38	2,34	2,34
LF24Me	7,06	7,06	7,29	7,29	7,46	7,46
LF4Cl	5,27	5,27	5,32	5,32	5,27	5,27
LF4Br	4,30	4,30	4,10	4,10	3,85	3,85

As constantes de supressão efetivas para as 1,2-naftoquinonas, ou constantes de ligação de Stern-Volmer modificadas (K_a) (Equação 21), foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer modificados [He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Lakowicz (2006), Tang *et al.* (2006), Xie *et al.* (2006), Cui *et al.* (2007), Li *et al.* (2007), Li *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Li *et al.* (2009) e Cheng *et al.* (2009)], conforme mostrado na Figura 39 para a 1,2-naftoquinona LF e no anexo para os demais compostos (Figuras 55, 69, 83, 97, 111, 125 e 139).

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a} \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f}$$

Equação 21

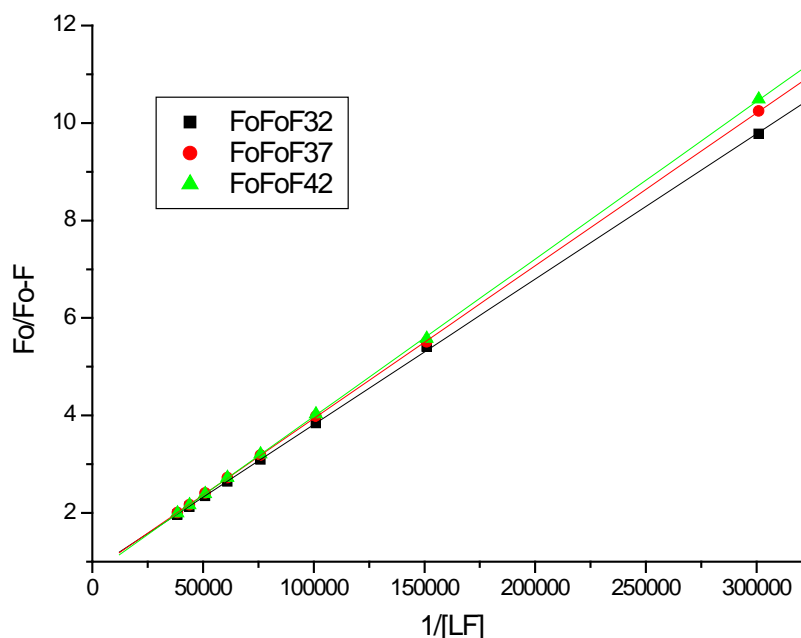


Figura 39 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF)

Os valores de K_a encontrados para a interação 1,2-naftoquinona/ASH estão todos na faixa entre ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol) (Tabela 12 e correspondente tratamento estatístico, Tabela 13) o que deixa claro que as 1,2-naftoquinonas se ligam fortemente a ASH, pois os valores de K_a foram semelhantes ao da literatura para outras moléculas que apresentam fortes interações entre as moléculas bioativas e albumina ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol) [He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Tabela 12 – Valores de K_a obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em diferentes temperaturas (305 K, 310 K e 315 K)

Composto	Temperatura (K)		
	305 Ka (10^5 L/mol)	310 Ka (10^5 L/mol)	315 Ka (10^5 L/mol)
LP4Me	4,87	4,37	3,86
LP24Me	8,78	7,50	7,20
LP4F	3,24	2,98	2,99
LF	2,78	2,55	2,30
LF4Me	2,02	1,70	1,54
LF24Me	4,46	4,17	3,77
LF4Cl	3,93	3,73	3,45
LF4Br	1,37	1,12	1,10

Tabela 13 – Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados pela supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para as 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br)

Composto	Valores estatísticos			
	R (Coeficiente de correlação)	SD (Desvio Padrão da regressão)	N (Números de pontos)	P (Probabilidade)
LP4Me	0,99995	0,02331	8	<0.0001
LP24Me	0,99991	0,02458	8	<0.0001
LP4F	1	0,00775	8	<0.0001
LF	0,99992	0,03502	8	<0.0001
LF4Me	0,99989	0,04574	8	<0.0001
LF24Me	0,99998	0,01161	8	<0.0001
LF4Cl	0,99999	0,01175	8	<0.0001
LF4Br	0,99987	0,04536	8	<0.0001

Através dos valores de K_a encontrados para a supressão de ASH foram construídos gráficos de van't Hoff empregando-se a Equação 34, os quais estão apresentados na Figura 40 para a 1,2-naftoquinona LF, como exemplo, e no anexo para os demais derivados (Figuras 56, 70, 84, 98, 112, 126 e 140), [Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Tang *et al.* (2006), Xie *et al.* (2006), Cui *et al.* (2007), Li *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Li *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009), Qing *et al.* (2009) e Li *et al.* (2009)]. A partir destes gráficos foram obtidos os parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia (ΔH°) e de entropia (ΔS°) envolvidos no processo de supressão da fluorescência da ASH, os quais permitiram o cálculo do valor da variação de energia livre de Gibbs (ΔG°) (Tabela 14). Foram escolhidas as temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K, pois a albumina sérica humana (ASH) não apresenta qualquer degradação estrutural nestas temperaturas.

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Equação 34

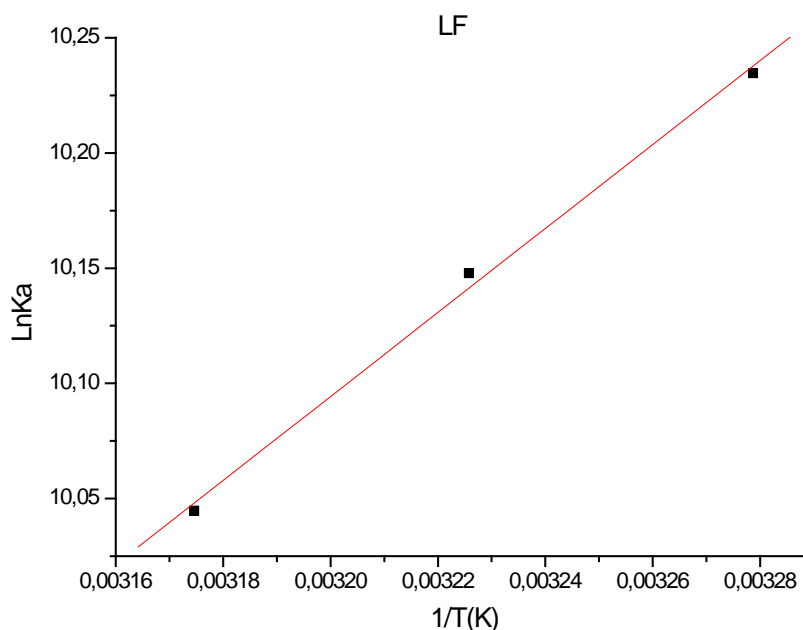


Figura 40 - Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinona (LF).

Tabela 14 – Valores dos parâmetros termodinâmicos ΔH° , ΔS° e ΔG° obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br).

	T	ΔH°	ΔS°	ΔG°
	(K)	(kJ/mol)	(J/mol.K)	(kJ/mol)
	305			-27,38
LP4Me	310	-18,58	28,85	-27,52
	315			-27,67
	305			-28,82
LP24Me	310	-15,82	42,61	-29,03
	315			-29,24
	305			-26,30
LP4F	310	-6,60	64,61	-26,63
	315			-26,95
	305			-25,96
LF	310	-15,15	35,43	-26,14
	315			-26,31
	305			-25,11
LF4Me	310	-21,82	10,79	-25,16
	315			-25,22
	305			-27,17
LF24Me	310	-13,46	44,94	-27,39
	315			-27,61
	305			-26,84
LF4Cl	310	-10,39	53,93	-27,11
	315			-27,38
	305			-24,09
LF4Br	310	-17,83	20,50	-24,19
	315			-24,29

Em uma interação composto bioativo/proteína, valores positivos de ΔS° frequentemente levam à evidência de que a interação é hidrofóbica [Ross e Subramanian (1981), Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)], devido às moléculas de água que estão arranjadas

ordenadamente ao redor do ligante, conferindo assim à proteína uma melhor conformação randômica. Por outro lado, valores negativos de ΔS° indicam uma interação desfavorável do ponto de vista entrópico como consequência de uma maior organização formada pelo sistema composto bioativo/proteína, o que deve ser consequência de processos que apresentam fortes interações intermoleculares, como a formação de ligação de hidrogênio e ou forças eletrostáticas.

No caso do parâmetro entálpico (ΔH°), valores negativos indicam que o processo de interação é governado pela formação de ligações fortes entre o composto bioativo/proteína. O que é compatível com interações do tipo ligação de hidrogênio em um ambiente com caráter predominantemente hidrofílico. Por outro lado, valores de entalpia positivos sugerem interações fracas e um ambiente predominantemente hidrofóbico.

A combinação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH° e ΔS°) será o responsável pelo resultado global final envolvido nos processos de interação compostos bioativos/proteína, cuja resultante irá governar a espontaneidade ou não do processo que é descrita pela energia livre de Gibbs (ΔG°).

A combinação de valores de ΔS° positivos e de ΔH° negativos indicam que os processos de ligação serão favorecidos tanto pela entropia quanto pela entalpia. Por outro lado, para interações tipicamente hidrofóbicas, os valores de ΔS° e de ΔH° são positivos, sendo a espontaneidade da interação governada exclusivamente pela entropia. Já valores de ΔS° e de ΔH° negativos, indicam que a interação composto bioativo/proteína é principalmente comandada pela entalpia e a entropia é desfavorável para a ligação, apontando para interações por forças de van der Waals e formação de ligação hidrogênio em um meio dielétrico baixo [Ross e Subramanian (1981), Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)]. Além disso, interações eletrostáticas específicas entre espécies iônicas e soluções aquosas são caracterizadas por um valor de ΔS° positivo e um pequeno valor de ΔH° negativo [Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Os valores de ΔH° negativos encontrados em todos os casos estudados para as 1,2-naftoquinonas, mostraram que o processo de interação 1,2-naftoquinonas/ASH foi exotérmico (Tabela 14). Os valores de ΔS° positivos evidenciaram que o tipo de interação entre as 1,2-naftoquinonas/ASH possui um certo caráter hidrofóbico, e os valores de ΔG° negativos ($\Delta G^\circ \cong -29$ a -24 kJ/mol) demonstraram a espontaneidade da interação 1,2-naftoquinonas/ASH (Tabela 14). Para o processo de interação 1,2-naftoquinona/ASH baseado simplesmente em um modelo de força intermolecular, podemos inferir que ela pode envolver uma razoável

interação hidrofóbica, evidenciada pelos valores positivos de ΔS° , o que pode ser explicado pela baixa solubilidade em água das 1,2-naftoquinonas estudadas. Já os valores de ΔH° indicam que o sistema quinônico deve estabelecer uma interação razoável tipo ligação de hidrogênio, pela presença de um sistema α -dicarbonila nos compostos estudados. Os menores valores em módulo encontrados para os derivados contendo substituintes retiradores de elétrons, como no caso dos compostos LF4Cl e LP4F, poderiam ser justificados pela diminuição da possibilidade de formação de interação tipo ligação de hidrogênio.

O papel exercido pelos fatores entálpico (ΔH°) e entrópico (ΔS°) para a interação entre a ASH e a série de 1,2-naftoquinonas estudadas (Tabela 14), deve estar correlacionado aos efeitos eletrônicos gerados pelos átomos ou grupos de átomos presentes como substituintes no anel aromático sobre os elétrons π dos sistemas insaturados das 1,2-naftoquinonas, bem como os possíveis efeitos estéricos gerados pelos grupos substituintes ou mesmo pela diferença estrutural entre as duas classes de compostos (piranosídica e furanosídica).

Para uma supressão estática, os sítios de ligação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula. Valores de constantes de ligação (K_b) e de números de sítios de ligação (n) foram obtidos a partir da construção de gráficos de $\log(F_0 - F)/F$ versus $\log[Q]$ (Equação 22) [Gao *et al.* (2004), Kandagal *et al.* (2006), Xie *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shi *et al.* (2007), Qi *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Li *et al.* (2009), Cheng *et al.* (2009), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)], como mostrados na Figura 41 para LF e no anexo para os demais derivados fluorados (Figuras 57, 71, 85, 99, 113, 127 e 141). De acordo com os resultados mostrados na tabela 15, o número de sítios de ligação entre a ASH e as 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) é aproximadamente igual a 1. Isso indica que existe somente uma interação molecular entre as 1,2-naftoquinonas estudadas e uma molécula de ASH.

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q]$$

Equação 22

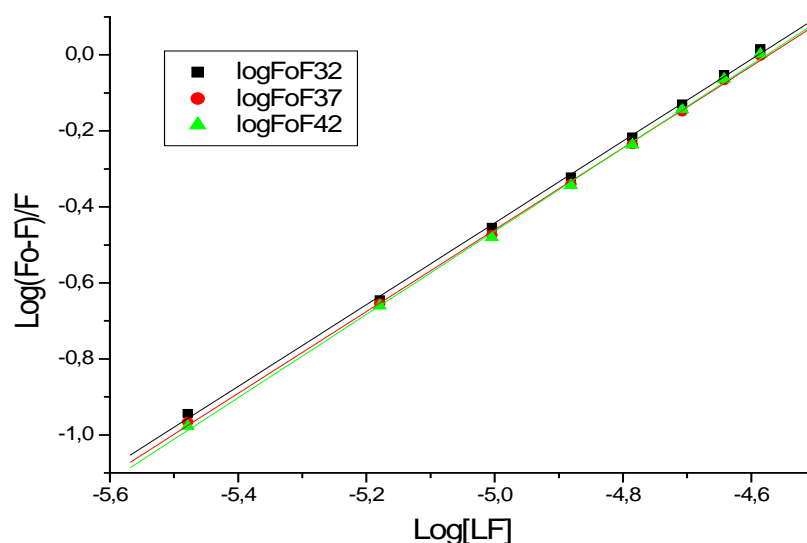


Figura 41 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela 1,2-naftoquinonas (LF)

Os resultados encontrados para os valores de K_b e n (Tabela 15) mostraram, mais uma vez, pouquíssima dependência com a temperatura. De uma maneira geral, os valores de K_b e n indicam que o provável mecanismo de supressão de fluorescência de ASH pelas 1,2-naftoquinonas é estático, pois não houve uma relação com o aumento da temperatura.

Tabela 15 – Valores de número e ordem de ligação (n e K_b) obtidos a partir dos gráficos de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br)

	T (K)	n	K_b
LP4Me	305	1,05	109342,80
	310	1,05	100563,40
	315	1,06	95119,60
LP24Me	305	1,10	413085,50
	310	1,13	540380,90
	315	1,12	453513,30
LP4F	305	1,06	81401,05
	310	1,06	79746,20
	315	1,05	69424,06
LF	305	1,08	86564,50
	310	1,08	83548,70
	315	1,10	10268,97
LF4Me	305	0,93	12101,24
	310	0,94	13065,62
	315	0,96	16262,60
LF24Me	305	1,11	204018,70
	310	1,13	263566,40
	315	1,16	358121,20

Tabela 15 – Continuação

	305	1,07	100700,10
LF4Cl	310	1,08	113224,40
	315	1,09	129476,20
	305	1,09	106981,80
LF4Br	310	1,11	125979,50
	315	1,10	100359,80

4.3 Cálculo do raio de Förster

A distância entre o resíduo de triptofano (doador) e a molécula supressora (acceptor) pode ser calculada de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster [Förster (1948), Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)], com a eficiência de transferência de energia (E) estando relacionada com as distâncias R_0 e r entre doador e acceptor [Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)].

O processo de transferência de energia envolvido na interação entre ASH e as 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) foi verificado a partir da sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) e os espectros de absorção UV/visível a diferentes temperaturas ($T = 305$ K, 310 K e 315 K) quando $[ASH] = [1,2\text{-naftoquinona}] = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, estão mostrados nas figuras 42, 43 e 44 para a 1,2-naftoquinona LF, enquanto que para as demais 1,2-naftoquinonas estudadas encontram-se no anexo. (Figuras 58, 59, 60; 72, 73, 74, 86, 87, 88, 100, 101, 102, 114, 115, 116, 128, 129, 130, 142, 143 e 144).

Os valores da integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASH) com o espectro de absorção do acceptor (1,2-naftoquinonas) (J) foram calculados de acordo com a Equação 26 [Horrocks Jr. *et al.* (1981), Sytnik e Litvinyuk (1996), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), Lakowicz (2006), Xie *et al.* (2005), Mahesha *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shi *et al.* (2007), Banerjee *et al.* (2008), Cui *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)].

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} = \frac{\sum F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda}$$

Equação 26

A **Equação 27** [Karreman *et al.* (1967), Horrocks Jr. *et al.* (1981), Sytnik e Litvinyuk (1996), He *et al.* (2005), Gao *et al.* (2004), Xie *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Lakowicz (2006), Mahesha *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shi *et al.* (2007), Banerjee *et al.* (2008), Cui *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)] foi utilizada para calcular os valores de distância crítica (R_0) entre o doador (ASH) e o acceptor (1,2-naftoquinona), quando sua eficiência de transferência é 50%, sendo que os valores adotados para os parâmetros K^2 , N e Φ vão mostrados a seguir [Liu *et al.* (2003), Kandagal *et al.* (2006), Shi *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Qing *et al.* (2009)].

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J$$

$$\left. \begin{array}{l} K^2 = 2/3 \\ N = 1,336 \\ \phi = 0,15 \end{array} \right\} \text{ASH}$$

Equação 27

Para calcular os valores de eficiência de transferência de energia (E) entre doador (ASH) e acceptor (1,2-naftoquinonas) foi usada a Equação 28 [Sklar *et al.* (1977), Horrocks Jr. *et al.* (1981), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), Xie *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Lakowicz (2006), Mahesha *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shi *et al.* (2007), Banerjee *et al.* (2008), Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Wang *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)]. Os valores de J , R_0 , E e r calculados estão apresentados na Tabela 16.

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad r^6 = \frac{R_0^6 \cdot (1 - E)}{E}$$

Equação 28

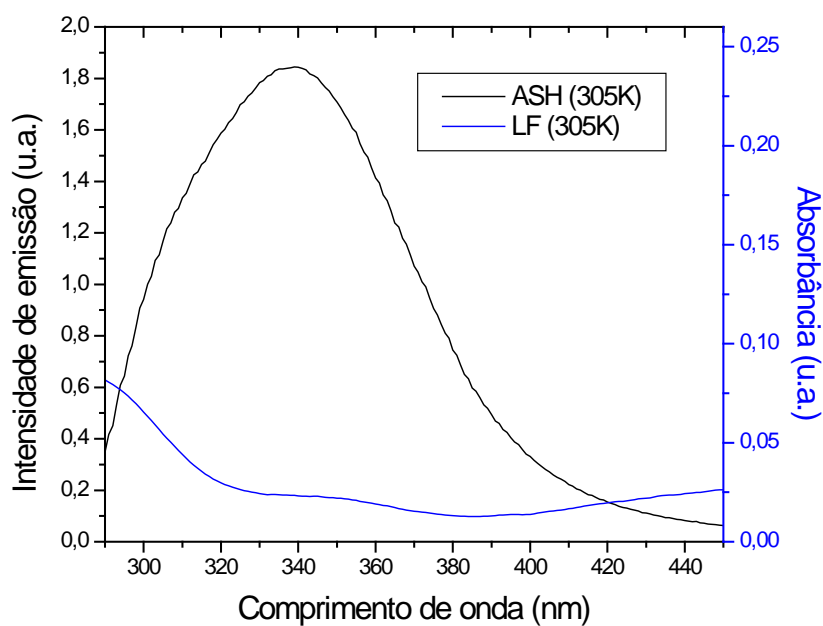


Figura 42 - Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da 1,2-naftoquinona (LF). $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

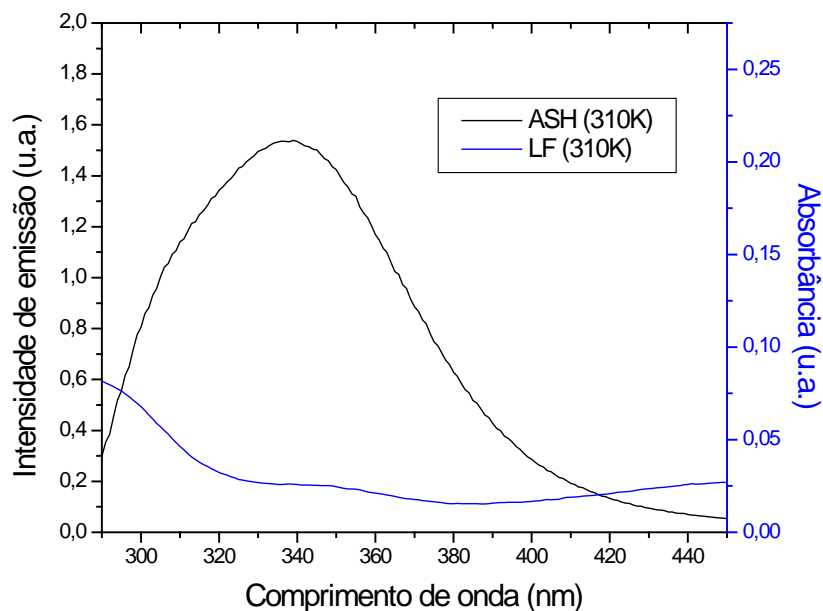


Figura 43 - Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da 1,2-naftoquinona (LF). $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

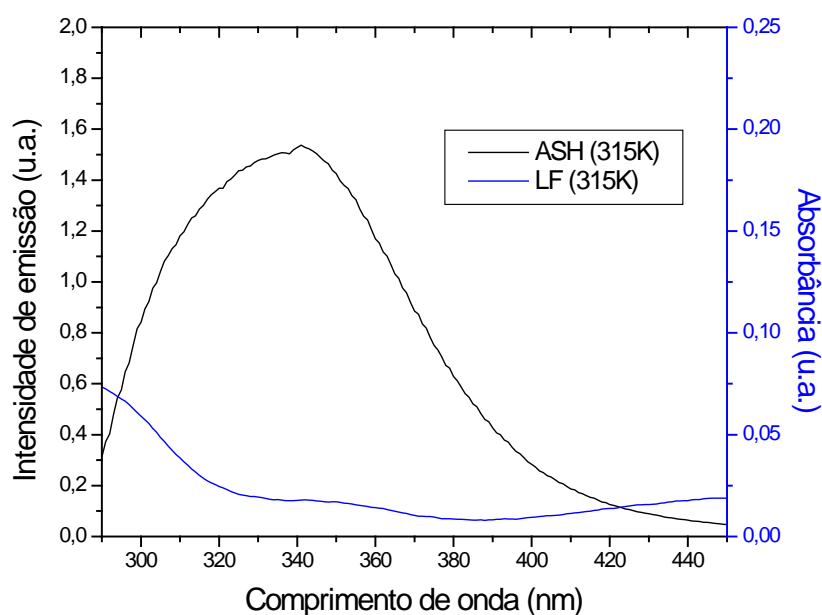


Figura 44 - Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da 1,2-naftoquinona (LF). $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 16 - Valores de J , R_0 , E e r calculados a partir da sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K, 310 K e 315 K) e o espectro de absorção UV-Vis das 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

	T (K)	J $10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$	R_0 (nm)	E	r (nm)
LP4Me	305	4,68	2,86	0,45	2,97
	310	3,73	2,76	0,43	2,89
	315	5,99	2,98	0,43	3,12
LP24Me	305	13,50	3,42	0,61	3,17
	310	12,20	3,36	0,60	3,13
	315	11,20	3,31	0,59	3,11
LP4F	305	2,43	2,57	0,34	2,87
	310	3,34	2,71	0,32	3,08
	315	3,55	2,73	0,30	3,15
LF	305	3,52	2,73	0,33	3,08
	310	3,87	2,77	0,29	3,22
	315	2,75	2,62	0,29	3,04
LF4Me	305	4,51	2,84	0,36	3,13
	310	4,48	2,84	0,35	3,16
	315	4,22	2,81	0,34	3,15

Tabela 16 – Continuação

LF24Me	305	2,34	2,55	0,46	2,62
	310	7,30	3,08	0,45	3,20
	315	7,09	3,07	0,43	3,22
LF4Cl	305	7,98	3,13	0,37	3,43
	310	5,28	2,92	0,32	3,31
	315	4,41	2,83	0,34	3,17
LF4Br	305	4,28	2,82	0,47	2,87
	310	7,14	3,07	0,44	3,20
	315	7,30	3,08	0,45	3,20

De acordo com a Equação 28, e para as condições de ASH ($K^2 = 2/3$, $N = 1,336$ e $\phi = 0,15$) [Miller (1979) e Cheng et al. (2009)], o valor da distância entre as 1,2-naftoquinonas e o resíduo de triptofano obtido com $r \cong 2$ a 3 nm (Tabelas 16) foi menor que 7 nm ($r < 7$ nm) [He et al. (2006) e Yue et al. (2008)] para todos os casos de interação entre 1,2-naftoquinonas/ASH. Isto é um forte indício da possibilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASH e as 1,2-naftoquinonas. Isso está de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster (Teoria de Förster) [Yue et al. (2008)], indicando que ocorreu realmente, um processo de supressão estática na interação entre as 1,2-naftoquinonas e ASH. [Lakowicz (2006) e Cheng et al. (2009)].

4.4 Dicroísmo circular (DC)

Espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para avaliar a mudança estrutural de ASH induzida pela adição das 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br). Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASH na ausência de 1,2-naftoquinonas (Figura 45) e na presença de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) em diferentes temperaturas ($T = 305\text{ K}$, 310 K e 315 K), estão apresentados nas Figuras 46, 47 e 48 para a 1,2-naftoquinona (LF) e para as demais 1,2-naftoquinonas estão mostrados no anexo (Figuras 61, 62, 63, 75, 76, 77, 89, 90, 91, 103, 104, 105, 117, 118, 119, 131, 132, 133, 145, 146 e 147). Os espectros de DC de ASH e de 1,2-naftoquinonas/ASH (Figuras 45, 46 e 47) foram semelhantes quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas, o que significa que a estrutura de ASH foi mantida [Yue *et al.* (2008)]. Nestes estudos foi observado que a adição de alíquotas das 1,2-naftoquinonas à albumina sérica humana influenciou na sua elipticidade, sendo que a interação das 1,2-naftoquinonas com a ASH resultou na diminuição de ambas as bandas (208 e 222 nm), sugerindo a ocorrência de pequenas mudanças na estrutura secundária da proteína, o que pode ser indicativo de complexos entre ASH e as 1,2-naftoquinonas.

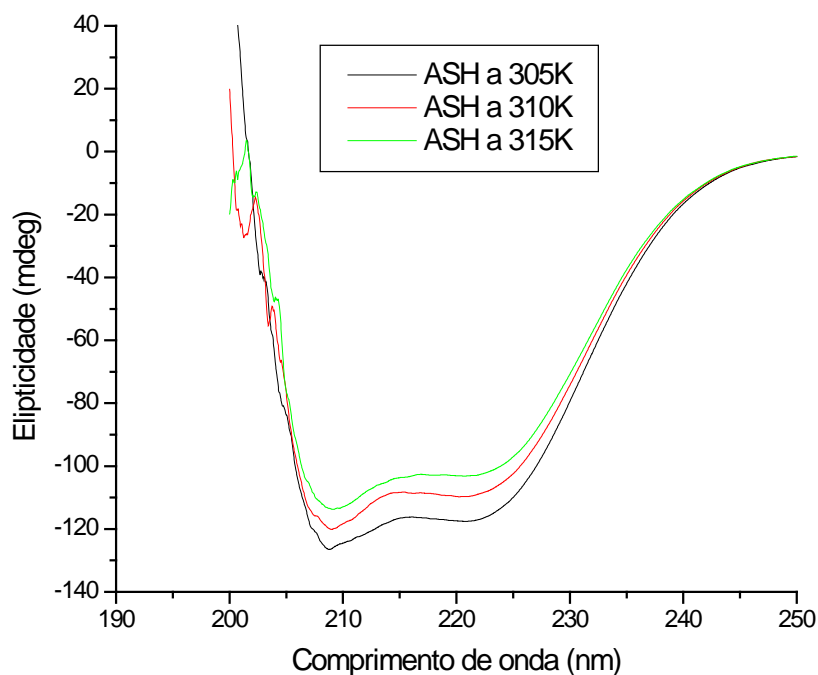


Figura 45 - Espectros de dicroísmo circular de ASH ($\text{pH} = 7,4$), $C_{\text{ASH}} = 1,00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, a $T = 305\text{ K}$, 310 K e 315 K .

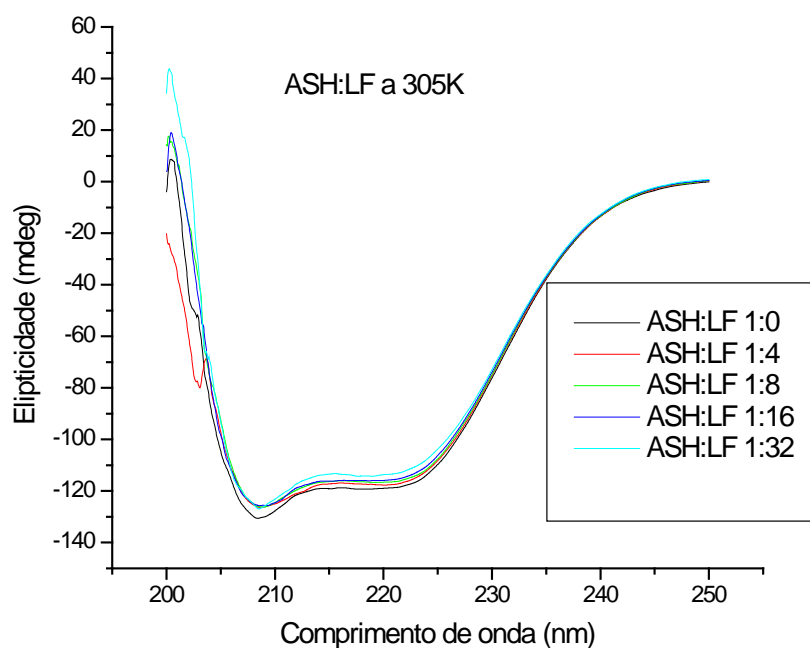


Figura 46 - Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 305 K.

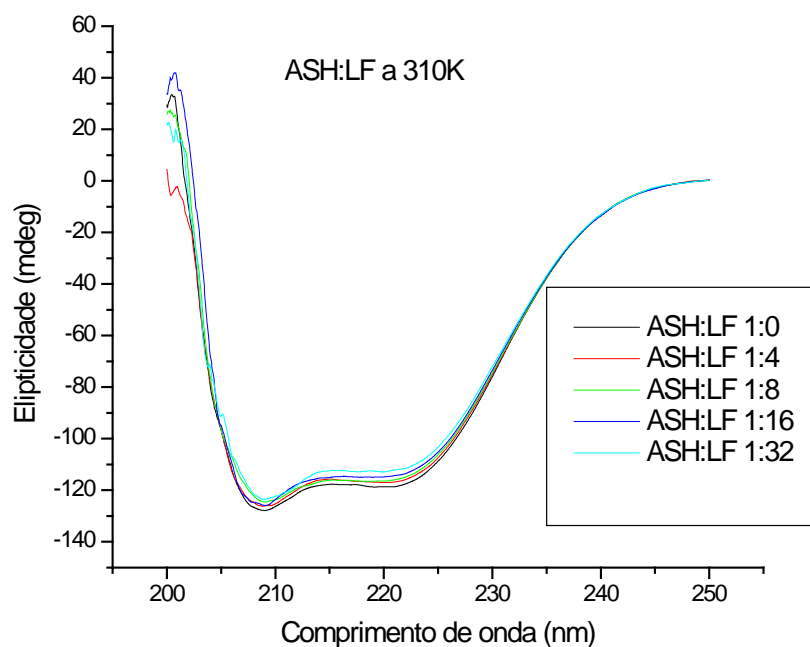


Figura 47 - Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH : LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0$; 3,98; 7,94; 15,75 e 31,01 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 310 K.

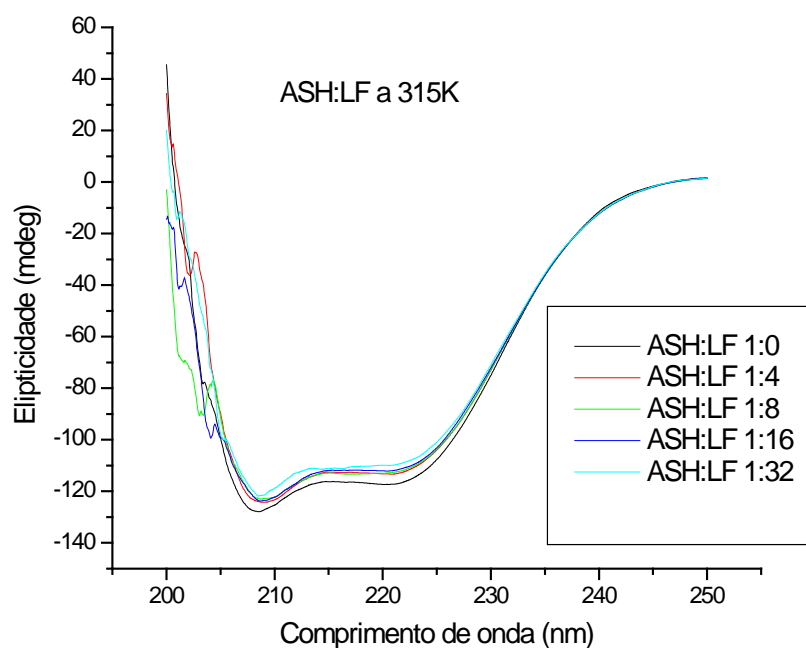


Figura 48 - Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0$; 3,98 ; 7,94; 15,75 e 31,01 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

Estimativas acerca da % de hélice- α para a estrutura secundária de ASH na ausência e na presença das 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br) foram feitas usando as Equações 7 e 8 [Chen *et al.* (1972), Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Yue *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)]. Os valores experimentais de elipticidade (θ) foram lidos nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm, e foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (*MRE*), especificamente MRE_{208} e MRE_{222} (Equação 7) [Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006) e Stan *et al.* (2009)]. Posteriormente, os valores de MRE_{208} e MRE_{222} foram substituídos na Equação 8 [Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Li *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008) e Stan *et al.* (2009)] para calcular os valores de percentual de hélice- α na estrutura secundária da ASH (%hélice- α), (Tabelas 17).

$$MRE = \frac{\theta}{(10.n.l.C_p)}$$

Equação 7

$$\% \text{ hélice-}\alpha = \left[\frac{(-MRE_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \right] \times 100 \quad \% \text{ hélice-}\alpha = \left[\frac{(-MRE_{222} - 2340)}{30300} \right] \times 100$$

Equação 8

Tabela 17 - % hélice- α calculado em 208 nm e em 222 nm para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), T = 305 K, 310 K e 315 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LFs, C_{ASH} = 1,00 x 10⁻⁶ mol/L e C_{LF} = 0; 3,98 ; 7,94; 15,75 e 31,01 (x 10⁻⁶) mol/L.

	T (K)	% hélice- α					
		305		310		315	
		ASH:Q	208	222	208	222	208
LP4Me	1:0	60,95	58,21	60,34	57,61	61,09	57,52
	1:4	59,27	56,66	60,08	55,86	57,48	55,75
	1:8	58,65	56,03	56,32	55,65	57,51	54,75
	1:16	52,57	54,90	52,90	54,74	56,39	53,65
	1:32	23,93	45,87	29,39	49,71	38,49	50,45
LP24Me	1:0	60,99	57,97	62,62	60,15	60,16	56,86
	1:4	59,11	56,99	60,80	57,91	60,29	55,93
	1:8	58,84	56,57	60,54	57,50	58,37	55,55
	1:16	58,24	55,73	59,15	56,30	57,64	54,91
	1:32	57,86	54,32	57,82	55,19	55,54	53,70
LP4F	1:0	60,30	58,00	60,38	57,75	61,27	57,48
	1:4	57,97	56,83	59,26	56,12	58,72	55,55
	1:8	59,47	56,43	56,57	55,38	56,81	55,35
	1:16	55,46	55,94	59,15	54,51	48,15	53,11
	1:32	53,03	53,12	44,46	51,21	19,42	46,19
LF	1:0	62,71	58,77	60,83	58,59	61,72	58,22
	1:4	60,07	57,97	59,74	57,64	59,16	56,00
	1:8	59,87	57,41	58,20	57,07	58,37	55,62
	1:16	59,86	56,92	59,69	56,34	58,37	55,16
	1:32	59,88	55,59	57,90	55,17	57,18	53,95
LF4Me	1:0	60,03	57,59	60,36	56,81	61,00	57,44
	1:4	59,44	57,14	58,99	56,15	60,72	56,98
	1:8	58,42	56,49	58,97	55,76	60,43	56,44
	1:16	58,10	56,04	57,87	54,86	59,61	55,74
	1:32	57,87	54,37	53,47	53,00	58,52	54,32
LF24Me	1:0	61,05	57,92	60,68	58,06	60,23	57,93
	1:4	59,11	57,11	60,15	56,57	57,97	55,64
	1:8	59,03	56,94	58,91	56,19	58,61	55,33
	1:16	59,46	56,24	57,70	55,72	57,28	54,33
	1:32	57,69	55,12	57,42	53,94	56,54	53,62

Tabela 17 – Continuação

	1:0	58,73	58,43	54,84	53,55	56,86	54,96
	1:4	59,64	58,42	53,74	52,81	55,40	53,36
LF4Cl	1:8	57,41	57,77	53,25	52,34	57,00	52,88
	1:16	57,68	56,98	53,77	52,01	55,70	52,27
	1:32	62,35	55,97	54,25	50,81	52,39	50,98
	1:0	58,44	56,98	58,17	56,00	59,50	56,24
	1:4	58,47	56,32	57,09	55,39	58,04	55,29
LF4Br	1:8	57,46	55,75	56,66	54,71	57,30	54,86
	1:16	57,93	55,55	56,32	54,27	56,62	54,12
	1:32	57,23	54,72	55,01	53,29	56,92	53,38

Os resultados obtidos para a variação do % hélice α da estrutura secundária da proteína (ASH), mostrados na Tabela 17, apresentam uma diminuição com a presença das 1,2-naftoquinonas (nas razões molares de ASH/1,2-naftoquinonas de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na ausência de 1,2-naftoquinonas (ASH/1,2-naftoquinonas na proporção 1:0), indicando que houve interação das 1,2-naftoquinonas com os resíduos de aminoácidos da cadeia principal polipeptídica de ASH e que houve uma diminuição da rede de ligações hidrogênio [Kang *et al.* (2004), Shaikh *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)]. Esta justificativa é compatível com as possíveis mudanças conformacionais obtidas pela observação dos espectros de UV-Vis e de emissão de fluorescência. A interação entre a albumina sérica humana (ASH) e as 1,2-naftoquinonas, avaliada por dicróismo circular mostrou-se dependente da concentração de 1,2-naftoquinona ministrada e muito pouco da temperatura, ocorrendo, de uma maneira geral, diminuição da % de hélice- α na estrutura da ASH, devido ao aumento de concentração das 1,2-naftoquinonas.

4.5 Estudos da supressão de fluorescência resolvida no tempo

O espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo para ASH está mostrado na figura 49. Os dois tempos de vida encontrado $\tau_1 = 2,62$ ns e $\tau_2 = 6,74$ ns, estão condizentes com os valores apresentados na literatura (2 a 4 ns e 6,3 ns). O tempo τ_1 está correlacionado com o tempo de vida do triptofano livre enquanto que τ_2 diz respeito ao processo de decaimento de fluorescência que está relacionado com o tempo de vida da interação do triptofano e seu meio ambiente com as transições 1L_a e 1L_b , os aminoácidos da parte hidrofóbica da ligação peptídica. (Figura 18)

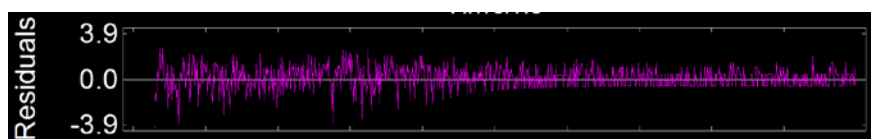
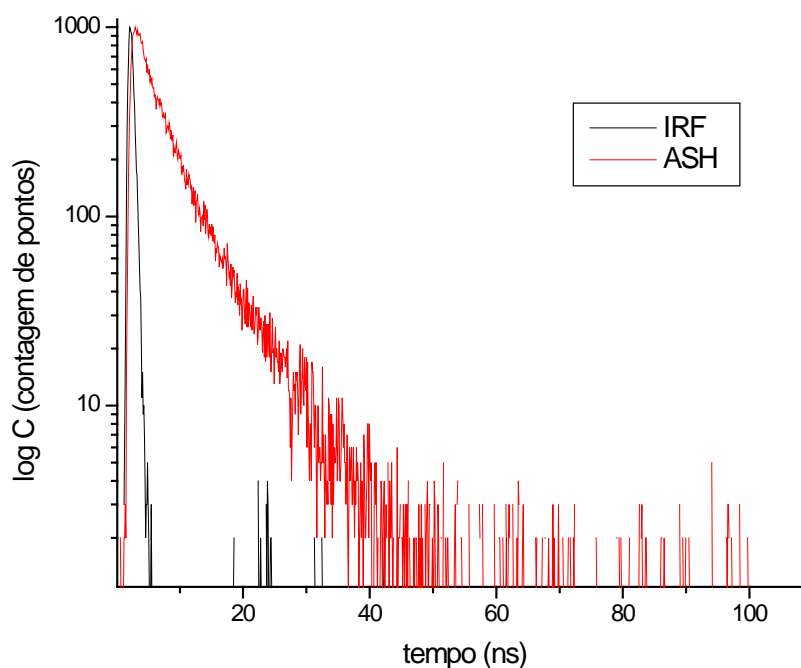


Figura 49 – a) Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). b) Resíduos.

Os resultados dos estudos de decaimento de emissão de fluorescência com resolução temporal para o sistema 1,2-naftoquinona LF/ASH estão mostrados na figura 50 e no anexo para as demais 1,2-naftoquinonas (Figuras 64, 78, 92, 106, 120, 134 e 148). Os valores de τ_1 e τ_2 (Tabela 18) encontrados para o composto LF e tabelas 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25, para as demais 1,2-naftoquinonas (LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4F, LP4Me e LP24Me) apresentaram uma variação dentro do erro experimental, o que leva a considerar um processo estático para a supressão de fluorescência da proteína pelas espécies supressoras (1,2-naftoquinonas).

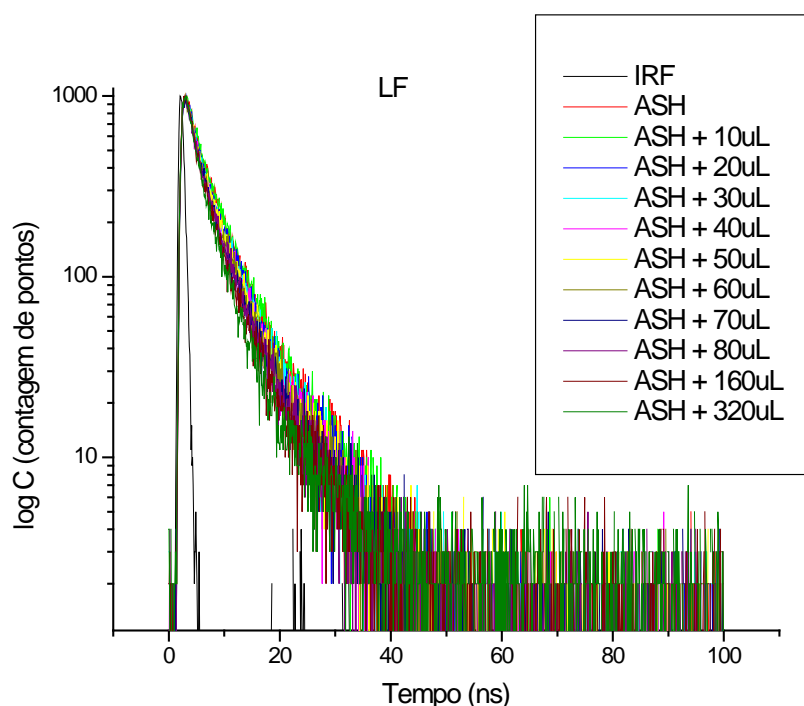


Figura 50 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85$ ($\times 10^{-6}$ mol/L), 1,12, 2,24 e 4,48 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a $T = 298$ K. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento)

Tabela 18 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF ($C_{LF} = 1,48 \times 10^{-3}$)

[LF] 10^{-6} M	T_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,62	6,74	0,835
4,92	2,47	6,75	0,787
9,80	2,40	6,60	0,766
14,70	2,38	6,59	0,757
19,50	2,43	6,62	0,773
24,30	2,42	6,48	0,828
29,00	2,51	6,81	0,735
33,70	2,45	6,65	0,730
38,40	2,35	6,36	0,769
74,90	2,34	6,54	0,943
143,00	2,31	6,61	0,990

5 CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos realizados nesse trabalho possibilitaram chegar as seguintes conclusões:

Os estudos espectroscópicos na região do UV-Vis, correlacionados com a banda de absorção em 280nm, não forneceram informações relativa ao processo de interação entre as 1,2-naftoquinonas estudadas com a ASH.

Os resultados positivos para a supressão de fluorescência indicaram a formação de interação entre os derivados da 1,2-naftoquinona estudados com a ASH. Os Valores negativos para a energia livre de Gibbs encontrados em todos os casos revelam a espontaneidade do processo. Os valores negativos para os parâmetros entálpicos, encontrados em todos os casos estudados, sugerem uma possível interação via ligação de hidrogênio entre as 1,2-naftoquinonas e a ASH. Já os valores positivos encontrados para a entropia, em todos os casos, levam a uma situação de maior hidrofobicidade das 1,2-naftoquinonas quando sob complexação, quando comparado ao ambiente na sua ausência. Essa evidencia também pode ser observada pelo leve deslocamento para o *azul* na banda de emissão da proteína (ASH), com o aumento da concentração das 1,2-naftoquinonas. Os efeitos na polaridade do microambiente ao redor do resíduo de triptofano indicam uma provável formação do complexo 1,2-naftoquinona/ASH.

Os resultados de supressão de fluorescência obtidos através das equações de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificadas indicaram um possível mecanismo estático, o que pode ser verificado pelos elevados valores de k_q ($\approx 10^{12}$ L/mol.s) encontrados em todos os casos estudados. Os elevados valores de K_a e K_b sugerem a formação de complexos relativamente estáveis. Já os valores de n próximos a um (1) indicam apenas um sítio de interação entre as 1,2-naftoquinonas estudadas com a ASH. A leve curvatura ascendente observada nos gráficos de Stern-Volmer, sugerem a participação de um mecanismo baseado na esfera efetiva de supressão.

Os estudos de supressão de fluorescência temporal que apresentaram resultados de τ_2 invariante próximos a 6ns para a emissão a partir do triptofano, confirmam a possibilidade de um mecanismo estático para o processo de supressão por parte das 1,2-naftoquinonas estudadas.

Os resultados obtidos para o processo de transferência de energia de Förster, com valores de $r \approx 2$ a 3 nm ($r < 7$ nm), sugerem uma alta probabilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASH e as 1,2-naftoquinonas.

Os valores obtidos nos estudos por espectroscopia de dicroísmo circular para a interação entre 1,2-naftoquinonas com ASH nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K, mostraram que ocorreu uma diminuição da % de hélice- α da estrutura secundária da proteína (ASH), como consequência apenas do aumento da concentração e independente da variação da temperatura.

Segundo as evidências apresentadas anteriormente, podemos concluir que o processo de interação 1,2-naftoquinona/ASH ocorra por um mecanismo de supressão estático com fortes evidências da participação de um processo de transferência de energia por ressonância de Förster.

Os valores negativos para a energia livre de Gibbs e o seu módulo próximo a 27 kJ/mol indicam que o processo de interação seja físico e consequentemente reversível. Sendo assim a ASH pode ser um bom carreador endógeno para as 1,2-naftoquinonas estudadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E. R.; Silva-Filho, A. A. A.; Santos, E. R.; Lopes, C. A.; *J. Ethnopharmacol.* **1990**, 29, 239.
- Amiri, M.; Jankeje, K.; Albani, J. R.; *J. Fluoresc.*, **2010**.
- Arnaudon, G.; *Compt. Rend.* **1858**, 46, 1152.
- Asche, C.; *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, 5, 449.
- Banerjee, A.; Basu, K.; Sengupta, P. K. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2008**, 90, 33.
- Barbosa, T. P.; Câmara, C. A.; Silva, T. M. S.; Martins, R. M.; Pinto, A. C.; Vargas, M. D.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6464.
- Baroni, S.; Mattu, M.; Vannini, A.; Cipollone, R.; Aime, S.; Ascenzi, P.; Fasano, M. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 6214.
- Bey, E. A.; Bentle, M. S.; Reinicke, K. E.; Dong, Y.; Yang, C. R.; Girard, L.; Minna, J. D.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Boothman, D. A.; *Proc. Nat. Acad. Sci. – PNAS* **2007**, 104, 11832.
- Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 38731.
- Brumark, A.; Cadenas, E.; *Free Radic. Bio. Med.* **1989**, 7, 435.
- Bruneton, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Plantas meicinales*, 2ª ed., Acribia: Espanha **2001**.
- Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 6891.
- Chen, G. Z.; Huang, X. Z.; Xu, J. G.; Zheng, Z. Z.; Wang, Z. B.; *The methods of fluorescence analysis*, Science Press, Beijing, **1990**.
- Chen, Y. H.; Yang, J. T.; Martinez, H. *Biochem.* **1972**, 11, 4120.
- Cheng, X. X.; Lui, Y.; Zhou, B.; Xiao, X-H.; Liu, Y. ; *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, 72, 922.
- Chukwuemeka, S. O.; *Clin. Ther.* **1999**, 21, 1456.
- Cordeiro, Y. M. L. *Bases estruturais e termodinâmicas para conversão conformacional da proteína do prion e possíveis implicações sobre a patogenia*. Tese de Doutorado, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Fevereiro, **2005**.
- Cui, F. L.; Qin, L. X., Gui-Sheng Zhang, G. S.; Yao, X. J.; Du, J. ; *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 42, 221.
- Cui, F.; Wang, J.; Cui, Y.; Li, J.; Yao, X.; Lu, Y.; Fan, J. ; *J. Luminesc.* **2007**, 127, 409.

Cui, F.; Zhang, Q.; Yan, Y.; Yao, X.; Qu, G.; Lu, Y. ; *Carbohydr. Pol.* **2008**, 73, 464.

da Silva, M. N.; de Souza, M. C. B. V.; Ferreira, V. F.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 407.

de Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Neves-Pinto, C.; Pinto, M. C. F. R.; Dantas, A. P.; Salomão, K.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 325.

dos Santos, A. F.; Ferraz, P. A. L.; de Abreu, F. C.; Chiari, E.; Goulart, M. D. F.; Sant'Ana, A. E. G.; *Planta Med.* **2001**, 67, 92.

Dose, K. *Bioquímica*. EPU/Springer, EDUSP, São Paulo, **1982**.

El-Najjar, N.; Gali-Muhtasib, H.; Ketola, R. A.; Vuorela, P.; Urtti, A.; Vuorela, H.; *Phytochemistry* **2011**, 10, 353.

Epps, D. E.; Raub, T. J.; Caiolfa, V.; Chiari, A.; Zamai, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 51, 41.

Falini, G.; Foresti, E.; Lesci, I. G.; Lunelli, B.; Sabatino, P.; Roveri, N. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1968.

Fasman, G.D. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Plenum Press, New York, **1996**.

Ferraz, P. A. L.; de Abreu, F. C.; Pinto, A. V.; Glezer, V.; Tonholo, J.; Goulart, M. O. F.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 507, 275.

Ferreira, S. B.; da Rocha, D. R.; Carneiro, J. W. M. C.; Santos, W. C.; Ferreira, V. F.; *Synllet* **2011**, 11, 1551.

Ferreira, V. F.; *Quím. Nova* **1996**, 4, 35.

Fieser, L. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, 49, 857.

Fieser, L. F.; Berliner, E.; Bondhus, F.; Chang, F. C.; Dauben, W. G.; Ettliger, M. G.; Fawaz, G.; Fields, M.; Fieser, M.; Heidelberger, C.; Heymann, H.; Seligman, A. M.; Vaughan, W. R.; Wilson, A. G.; Wilson, E.; Wu, M.-I.; Leffler, M. T.; Hamlin, K. E.; Hathaway, R. J.; Matson, E. J.; Moore, E. E.; Moore, M. B.; Rapala, R. T.; Zaugg, H. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 3151

Förster, T.; *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55.

Gao, H.; Lei, L.; Liu, J.; Kong, Q.; Chen, X.; Hu, Z.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2004**, 167, 213.

Garnier, S.; Wolfebder, J. L.; Nianga, M.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1996**, 42, 1315.

Ghera, E.; Ben-David, Y.; *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3355.

Guiraud, P.; Steiman, R.; Campos Takaki, G.M.; Seigle-Murandi, E.; Simeon, B.M.; *Planta Med.* **1994**, 60, 373.

He, W. Y.; Li, Y.; Si, H. Z.; Dong, Y. M.; Sheng, F. L.; Yao, X. J.; Hu, Z. D.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2006**, 182, 158.

He, W.; Li, Y.; Tian, J.; Liu, H.; Hu, Z.; Chen, X.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2005**, 174, 53.

He, W.; Li, Y.; Xue, C.; Hu, Z.; Chen, X.; Sheng, F.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 1837.

He, X. M.; Carter, D. C.; *Nature* **1992**, 358, 209.

Hecht, E. *Optics*. 3rd. Ed., Addison Wesley Longman, Massachusetts, **1998**.

Hepel, M. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1401.

Holtz, K. M.; Rockwell, S.; Tomasz, M.; *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 5029.

Hooker, S. C.; *J. Chem. Soc.* 1892, 62, 611.

Hooker, S. C.; *J. Chem. Soc.* **1896**, 69, 1355.

Horrocks Jr., W. D. W.; Collier, W. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2856.

Johnson, W. C. Jr. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **1988**, 17, 145.

Kandagal, P. B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Shaikh, S. M. T.; Jadegoud, Y.; Ijare, O. B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 393.

Kandagal, P. B.; Seetharamappa, J.; Ashoka, S.; Shaikh, S. M. T.; Manjunatha, D. H. J.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2006**, 39, 234.

Kang, J.; Liu, Y.; Xie, M. X.; Li, S.; Jiang, M.; Wang, Y. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1674, 205.

Karreman, G.; Steele, R. H.; Györgyi, A. S. *Biochem.* **1967**, 11, 140.

Kazantzi, G.; Malanidon-Xenikaki, E.; Spyrondis, S.; *Synlett* **2007**, 3, 427.

Kelly, S. M.; Tess, T. J.; Price, N. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1751, 119.

Khan, M. A.; Muzzamil, S.; Musarrat, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, 30, 243.

Khan, S. N.; Islam, B.; Rajeswari, M. R.; Usmani, H.; Khan, A. U. *Acta Biochim. Polonica* **2008**, 55, 399.

Krangh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695.

Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed.*, Springer, **2006**, 278.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2^a. Ed., Sarvier, São Paulo, **1993**.

Li, D.; Ji, B.; Sun, H.; *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, 73, 35

Li, D.; Zhu, J.; Jin, J.; Yao, X.; *J. Mol. Struct.* **2007**, 846, 34.

Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z.; *J. Mol. Struct.* **2008**, 885, 64.

Li, R.; Kenyon, G. L.; Cohen, F. E.; Chem, X.; Gong, B.; Miller, R. E.; Nuzum, E. O.; Resenthal, P. J.; McKerrow, J. H.; *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 5031.

Li, Y.; Yao, X.; Jin, J.; Chen, X.; Hu, Z.; *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1774, 51.

Liu, J.; Tian, J. N.; Zhang, J.; Hu, Z.; Chen, X.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376, 864.

Liu, K. C.; Li, J.; Sakya, S.; *J. Med. Chem.* **2004**, 4, 1105.

Mahesha, H. G.; Singh, S. A.; Srinivasan, N.; Rao, A. G. A.; *FEBS J.* **2006**, 273, 451.

Millot, M. C.; Servagent-Noinville, S.; Taleb, N. L.; Baron, M. H.; Revault, M.; Sébille, B. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **2001**, 753, 101.

Monti, S.; Manet, I.; Manoli, F.; Ottani, S.; Marconi, G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 805.

Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L.; *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993.

Oravcova, J.; Bobs, B.; Lindner, W. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1996**, 677, 1.

Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. *Protein Sci.* **1995**, 4, 2411.

Paternò, E.; *Gazz. Chim. Ital.* **1882**, 12, 387.

Peters, T. *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, **1996**.

Petitpas, I.; Bhattacharya, A.; Twine, S.; East, M.; Curry, S.; *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22804.

Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Lagrota, M. H. C.; Wigg, M. D.; Aguiar, A. N. S.; *Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses. Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **1987**, 29, 15-20.

Pinto, C. N.; Dantas, A. P.; de Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Polequevitch, P. F.; Pinto, M. C. F. R.; de Castro, S. L.; Pinto, A. V.; *Arzneimittel-Forsch.* **2000**, 50, 1120.

Qi, Z. D.; Zhou, B.; Xiao, Q.; Shi, C.; Liu, Y.; Dai, J.; *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, 193, 81.

Qing, W. Y.; Ping, T. B.; Mei, Z. H.; Hua, Z. Q.; Cheng, Z. G.; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2009**, 94, 183.

Rao, K. V.; McBride, T. J.; Oleson, J.; *J. Cancer Res.* **1968**, 28, 1952.

Ribeiro, A. M.; *Estudo espectroscópico da interação entre flavonóides e albumina sérica bovina (ASB). Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Março, 2010.*

Ross, P. D.; Subramanian, S.; *Biochem.* **1981**, 20, 3096.

Salas, C.; Tapia, R. A.; Ciudad, K.; Armstrong, V.; Orellana, M.; Kemmerling, U.; Ferreira, J.; Maya, J. D.; Morello, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 671.

Salas, C.; Tapia, R. A.; Ciudad, K.; Armstrong, V.; Orellana, M.; Kemmerling, U.; Ferreira, J.; Maya, J. D.; Morello, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 668.

Santos, A. F.; Ferraz, P. A. L.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Goulart, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; *Int. J. Parasitol.* **2000**, 30, 1199.

Santos, E. V. M.; Carneiro, J. W. M.; Ferreira, V. F. “*Quantitative structure-activity relationship in aziridinyl-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method*” *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 87.

Shaikh, S. M. T.; Seetharamappa, J.; Kandal, P. B.; Manjunatha, D. H.; Ashoka, S. *Dyes Pigments* **2007**, 74, 665.

Shaw, A. K.; Pal, S. K. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* **2008**, 90, 69.

Shen, X. C.; Liang, H.; Guo, J. H. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 95.

Shi, X. Y.; Cao, H.; Ren, F. L.; Xu, M.; *Chem. Biodiver.* **2007**, 4, 2780.

Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 407

Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. *Biochem.* **1977**, 16, 5100.

Stagliano, K. W.; Emadi, A.; Lu, Z.; Malinakova, H. C. Twenter, B.; Yu, M.; Holland, L. E.; Rom, A. M.; Harwood, J. S.; Amin, R.; Johnson, A.; Yves, P.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 5651.

Stan, D.; Matei, I.; Mihailescu, C.; Savin, M.; Matache, M.; Hillebrand, M.; Baci, I.; *Mol.* **2009**, 14, 1614.

Stryer, L. *Biochemistry*. 4th. Ed., W. H. Freeman and Company, New York, EUA, **1995**.

Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**, 12, 439.

Sulkowska, A.; *J. Mol. Struct.* **2002**, 614, 227.

Sytnik, A.; Litvinyuk, I.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12959.

Takehara, K.; Yuri, K.; Shirasawa, M.; Yamasaki, S.; Yamada, S. *Anal. Sci.* **2009**, 25, 115.

Tang, J.; Luan, F.; Chen, X.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3210.

Tang, J.; Qi, S.; Chen, X. ; *J. Mol. Struct.* **2005**, 779, 87.

Tang, K.; Qin, Y. M.; Lin, A. H.; Hu, X.; Zou, G. L.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 404.

Teixeira, M. J.; Almeida, Y. M.; Viana, J. R.; Holanda Filha, J. G.; Rodrigues, T. P.; Prata, J. R. C. Jr.; Coelho, I. C. B.; Rao, V. S. Pompeu, M. M. L.; *Phytother. Res.* **2001**, 15, 44.

Turro, N. J; *Molecular Photochemistry*; Benjamin-Cummings Pub. Co.; **1978**.

Valeur, B.; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH (Electronic), **2001**.

Venyaminov, S. Y.; Yang, J. T. (1996). *Determination of protein secondary structure. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Ed. Fasman, G. D., Plenum Press, New York, EUA, **1996**, 69.

Wang, N.; Ye, L.; Zhao, B. Q.; Yu, J. X.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2008**, 41, 589.

Wang, Y. Li.; Xia, R.; *Scien. Hortic.* **2010**, 125, 116.

Wang, Y.; Gray, J.; Mishin, V. ; *Mol. Cancer Ther.* **2010**, 9, 1852.

Wei, Y. L.; Li, J. P.; Dong, C.; Shuang, S. M.; Liu, D. S.; Huie, C. W. *Talanta* **2006**, 70, 377.

Wilting, J.; van der Giesen, W. F.; Janssen, L. H. M.; Weideman, M. M.; Otagiri, M.; Perrin, J. *H. J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3032.

Woody, R.W. *Meth. Enzymol.* **1995**, 246, 34.

Wu, K.; Knox, R.; Sun, X. Z.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 347, 221.

Wu, Y. H.; Ji, X. B.; Hu, S. H. *Bioelectrochem.* **2004**, 64, 91.

Xie, M. X.; Long, M.; Liu, Y.; Qin, C.; Wang, Y. D.; *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1760, 1184.

Xie, M. X.; Xu, X. Y.; Wang, Y. D.; *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1724, 215.

Xu, Y.; Shen, H. X.; Huang, H. G. *Chem. J. Chin. Univ.* **1996**, 17, 1856.

Yamasaki, K.; Maruyama, T.; Yoshimoto, K.; Tsutsumi, Y.; Narazaki, R.; Fukuhara, A.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1432, 313.

Yan, C.; Kepa, J. K.; Siegel, D.; *Mol. Pharmacol.* **2008**, 74, 1657.

Yang, P.; Gao, F. *The principle of bioinorganic chemistry*, Science Press, Beijing, **2002**, 349.

Yuan, T.; Weljie, A. M.; Vogel, H. J.; *Biochem.* **1998**, 37, 3187.

Yue, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zhu, J.; Qin, J.; Chen, X.; *J. Luminesc.* **2008**, 128, 513.

Yue, Y.; Zhang, Y.; Qin, J.; Chen, X.; *J. Mol. Struct.* **2008**, 888, 25.

Zani, C. L.; Chiari, E.; Krettli, A. U.; Murtaa, S. M. F.; Cunninghamc, M. L.; Fairlambc, A. H.; Romanha, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 2185.

Zhang, G.; Que, Q.; Pan, J.; Guo, J.; *J. Mol. Struct.* **2008**, *881*, 132.

Zsila, F.; Bikádi, Z.; Simonyi, M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 447.

<http://professor.ucg.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/16673/material/bioquimica-basica.pdf>

<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc24/ccd1.pdf>

http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materiais/298.pdf

<http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/5-cd-spectrometer-performance>

http://www.uff.br/gcm/GCM/graduacao_arquivos/Apostila.pdf

www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf, visitada em 31/05/2013.

www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf, visitada em 31/05/2013.

www.chem.uzh.ch/zerbe/CD-Spectroscopy.pdf

7 ANEXO

Os espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) e com derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) em estão mostrados nas Figuras: 34, 35, 51, 65, 79, 93, 107, 121 e 135.

Os espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) $C_{LFs} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e das 1,2-naftoquinonas em PBS, $C_{LFs} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L estão mostrados nas Figuras: 36, 52, 66, 80, 94, 108, 122 e 136.

Os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) a T=298 K, derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) estão mostrados nas Figuras: 37,53, 67, 81, 95, 109, 123 e 137.

Os gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) estão mostrados nas Figuras: 38, 54, 68, 82, 96, 110, 124 e 138.

Os gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) estão mostrados nas Figuras: 39, 55, 69, 83, 97, 111, 125 e 139.

Os gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) estão mostrados nas Figuras: 40, 56, 70, 84, 98, 112, 126 e 140.

Os gráficos de $\text{Log}(F_0-F)/F$ versus $\text{log}[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelos derivados de 1,2-naftoquinonas (L LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F), estão mostrados nas Figuras: 41, 57, 71, 85, 99, 113, 127 e 141.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F), estão mostrados nas Figuras: 42, 58, 72, 86, 100, 114, 128 e 142.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 310 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F), estão mostrados nas Figuras: 43, 59, 73, 87, 101, 115, 129 e 143.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV dos derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) estão mostrados nas Figuras: 44, 60, 74, 88, 102, 116, 130 e 144.

Os espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a $T = 305$ K estão mostrados nas Figuras: 45, 46, 61, 75, 89, 103, 117, 131 e 145.

Os espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a $T = 310$ K, estão mostrados nas Figuras: 45, 47, 62, 76, 90, 104, 118, 132 e 146.

Os espectros de dicroísmo circular ASH ($pH = 7,4$) em derivados de 1,2-naftoquinonas (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F) nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a $T = 315$ K, estão mostrados nas Figuras: 45, 48, 63, 77, 91, 105, 119, 133 e 147.

Os decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) e em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF, LF4Br, LF4Cl, LF4Me, LF24Me, LP4Me, LP24Me e LP4F), com o IRF (fator de resposta do instrumento) estão mostrados nas Figuras: 49, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134 e 148.

Tabela 26 – MRE calculado em 208nm e em 222 nm para ASH ($pH = 7,4$) em derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), $T = 305$ K, 310 K e 315 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LFs, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LFs} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L.

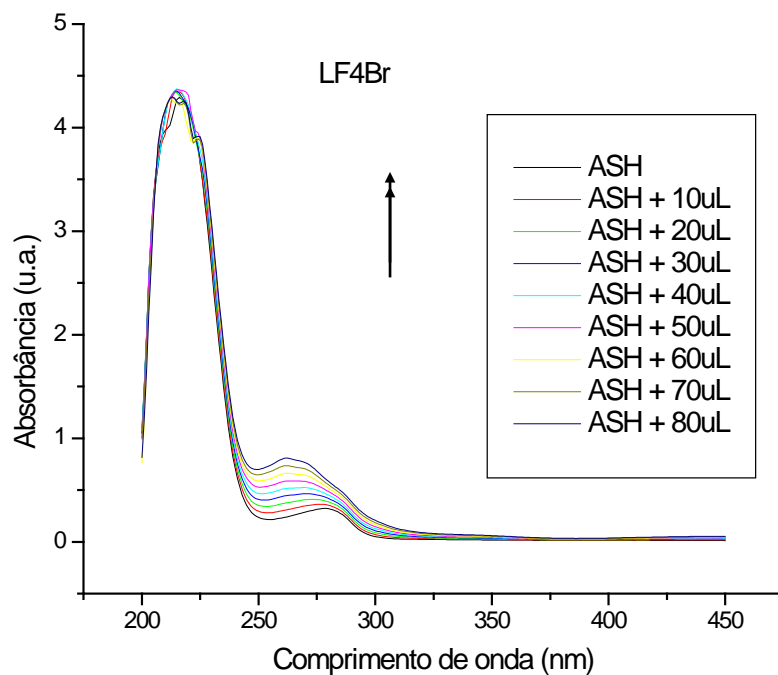


Figura 51 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5})$ mol/L.

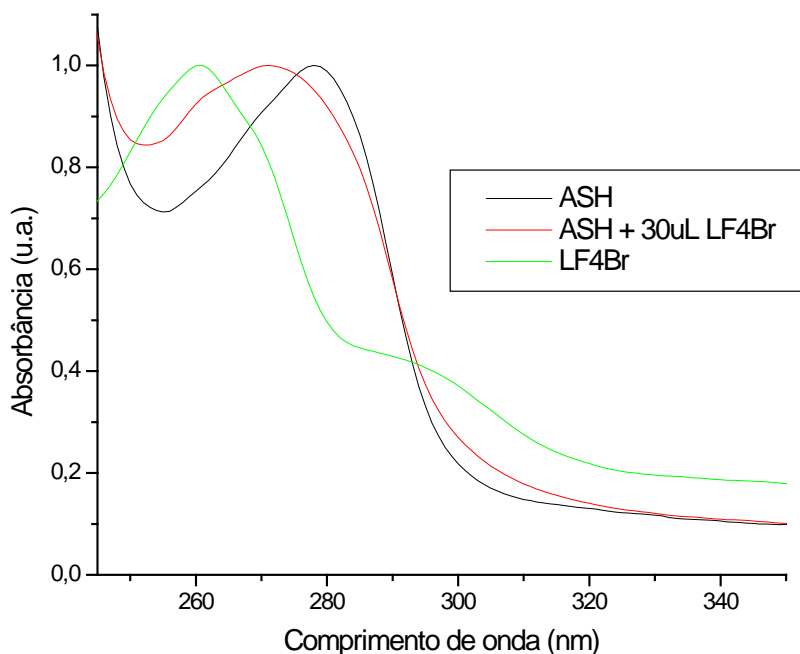


Figura 52 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona (LF4Br) $C_{LF4Br} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF4Br em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

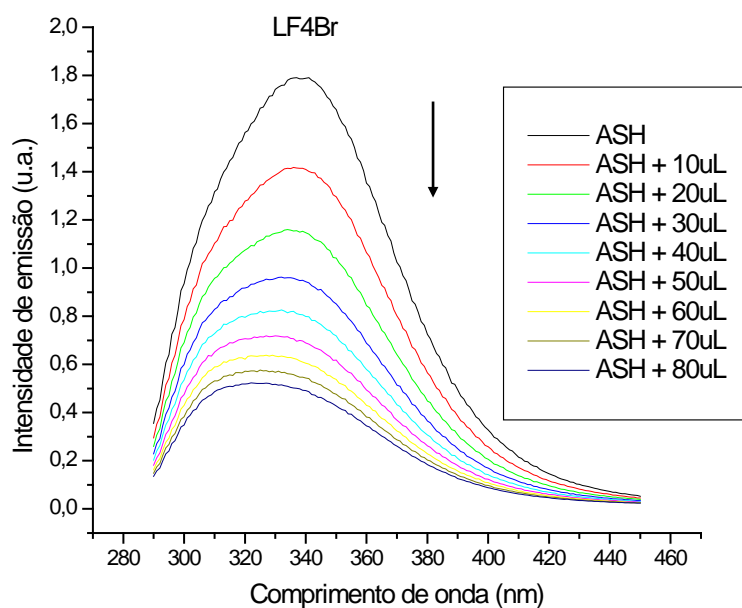


Figura 53 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LF4Br} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$ e $3,84 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 310 \text{ K}$.

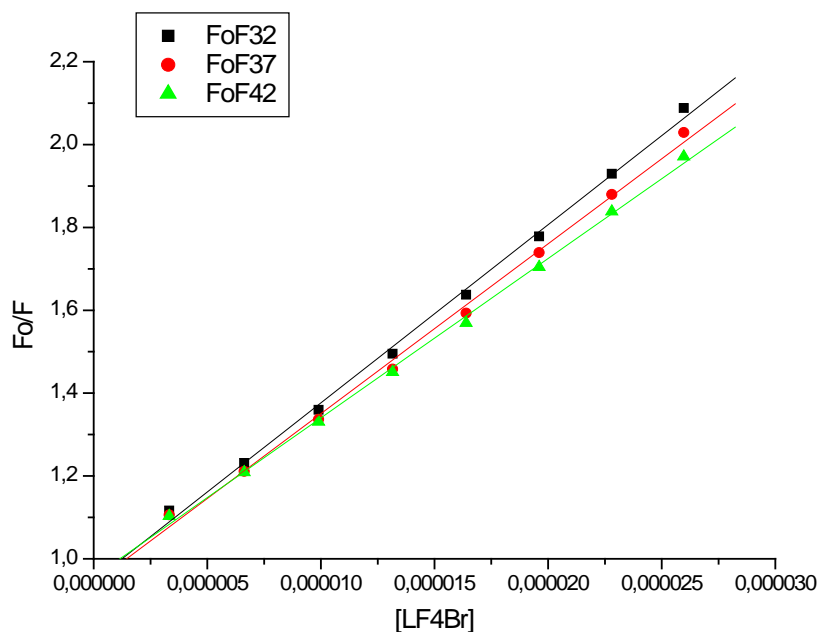


Figura 54 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Br.

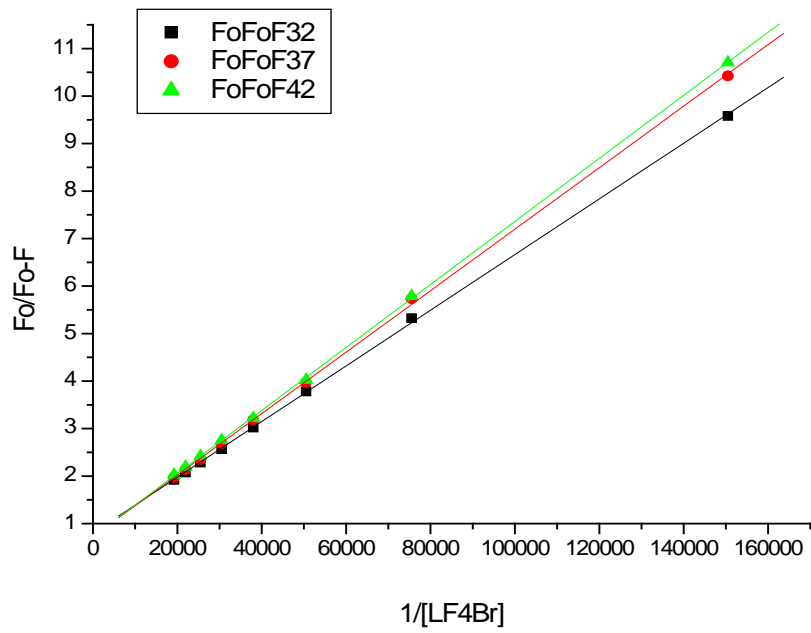


Figura 55 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Br.

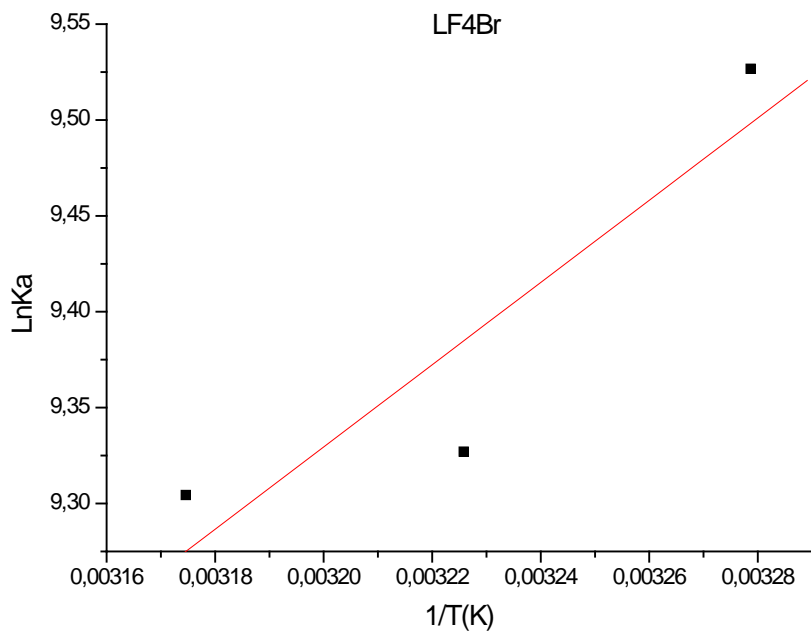


Figura 56 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Br.

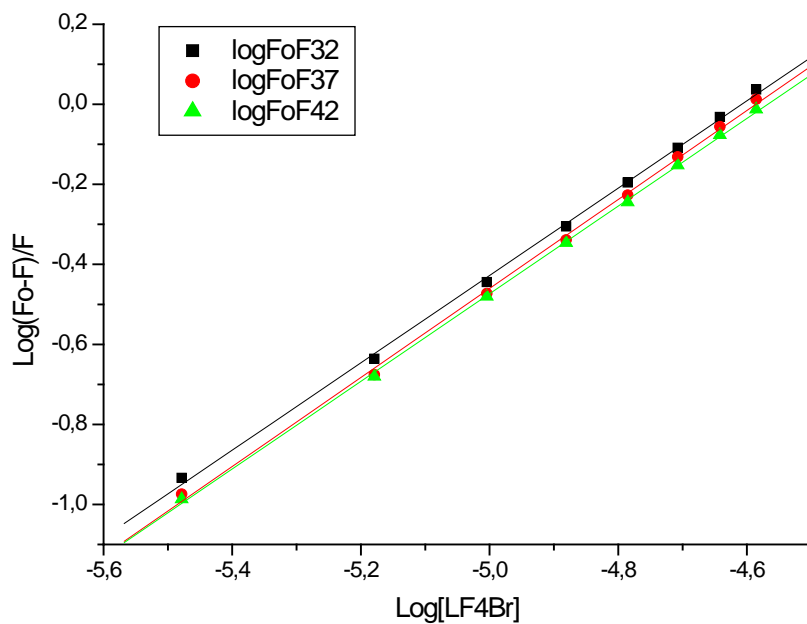


Figura 57 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Br.

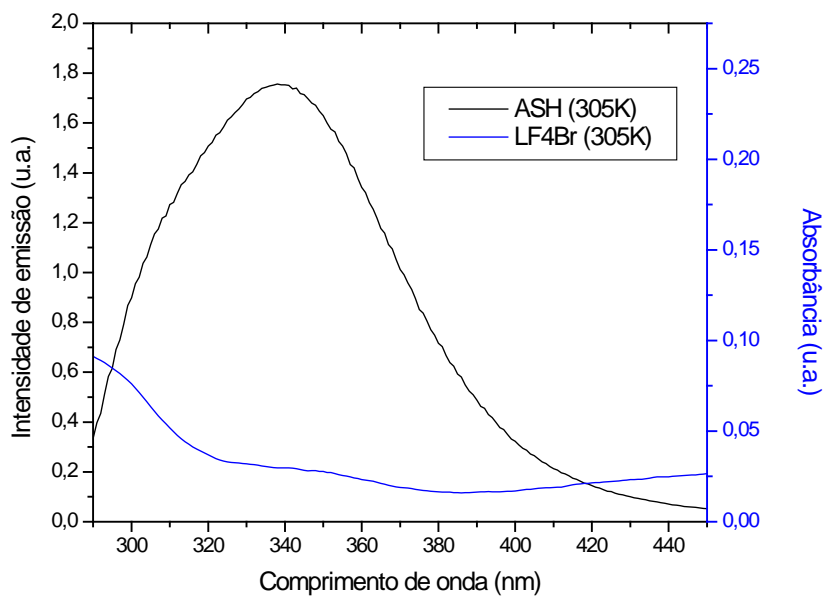


Figura 58 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF4Br. $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

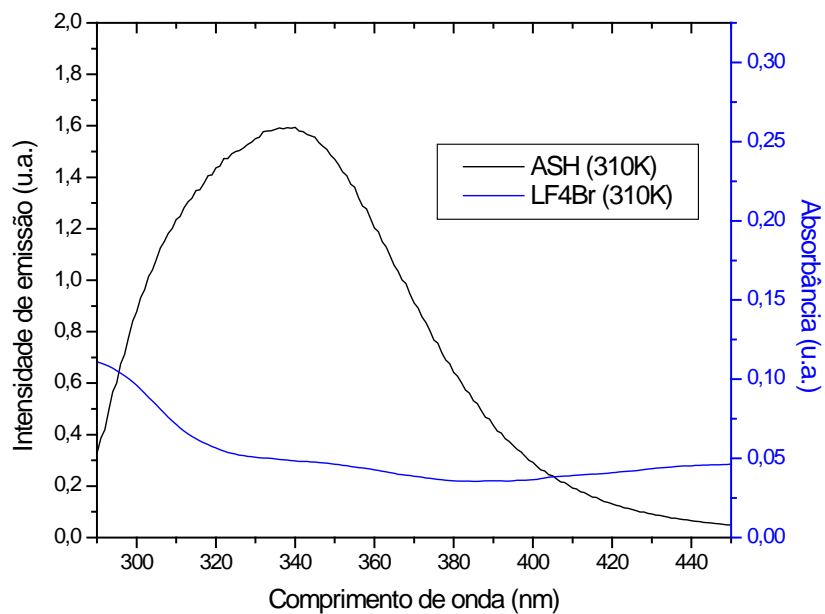


Figura 59 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Br. $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

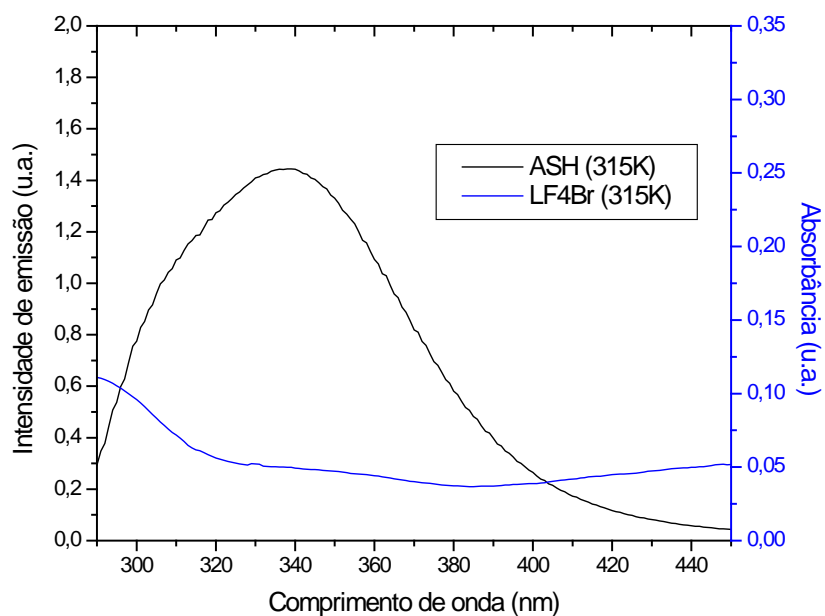


Figura 60 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Br. $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

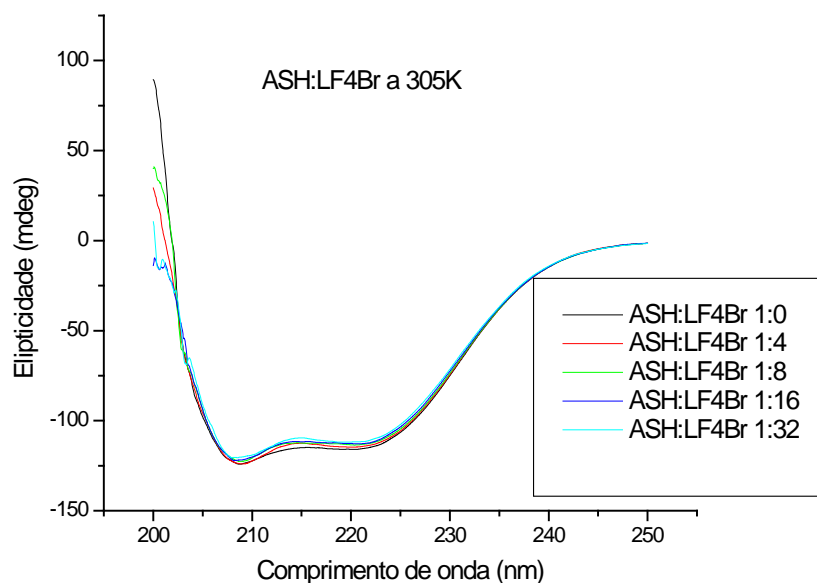


Figura 61 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Br, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K.

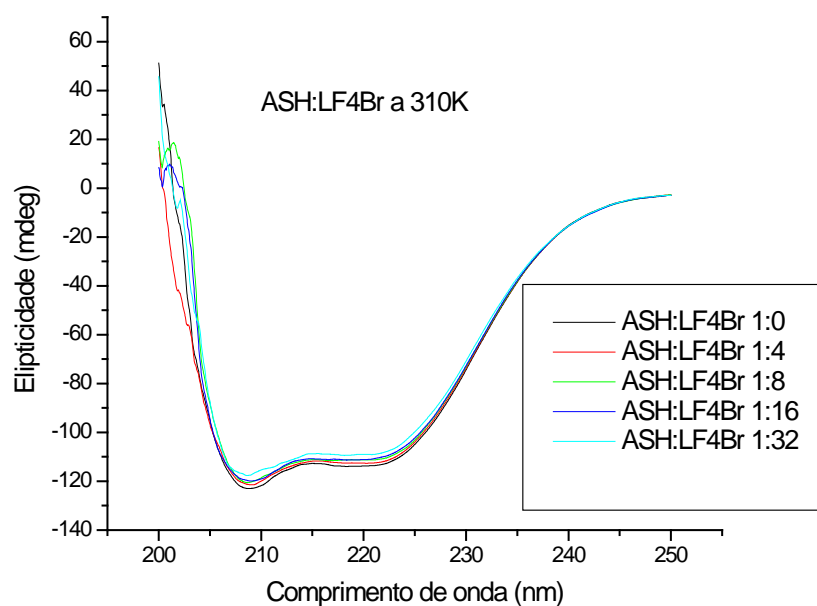


Figura 62 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Br, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

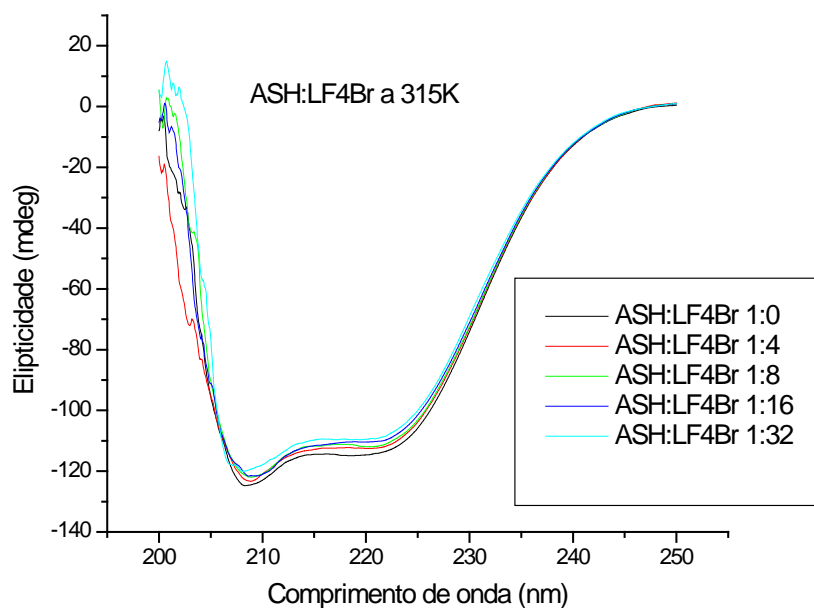


Figura 63 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Br, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

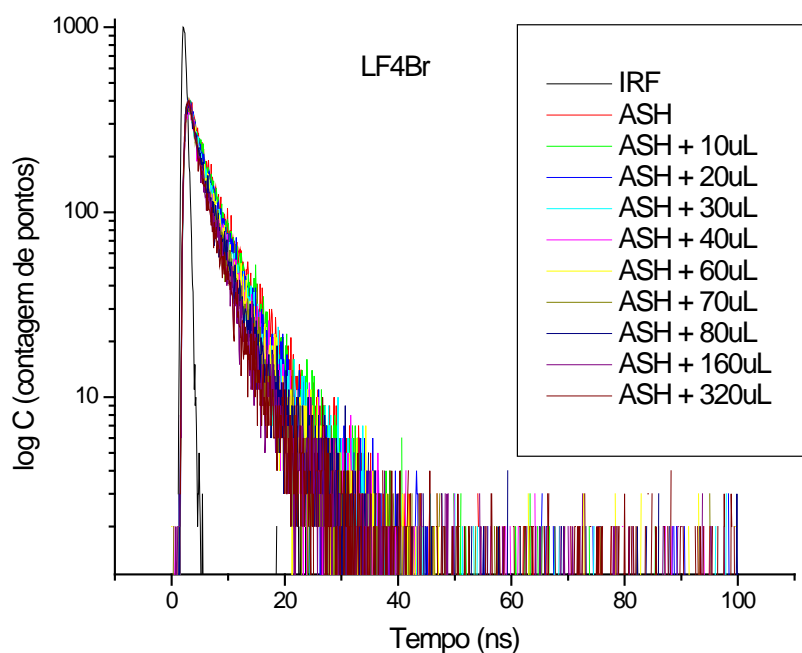


Figura 64 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF4Br) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 2,62; 5,22; 7,80; 10,40; 12,90; 15,50; 18,00; 20,50; 39,90; 76,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 19 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF4Br ($C_{LF4Br} = 7,88 \times 10^{-4}$).

[LF4Br] 10^{-6} (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,56	6,40	0,588
2,62	3,72	7,72	0,582
5,22	1,54	5,67	0,504
7,80	-	-	-
10,40	2,01	5,09	0,544
12,90	2,17	5,62	0,451
15,50	1,50	4,47	0,536
18,00	1,54	4,49	0,488
20,50	2,40	5,56	0,595
39,90	1,55	4,12	0,558
76,00	1,98	4,70	0,603

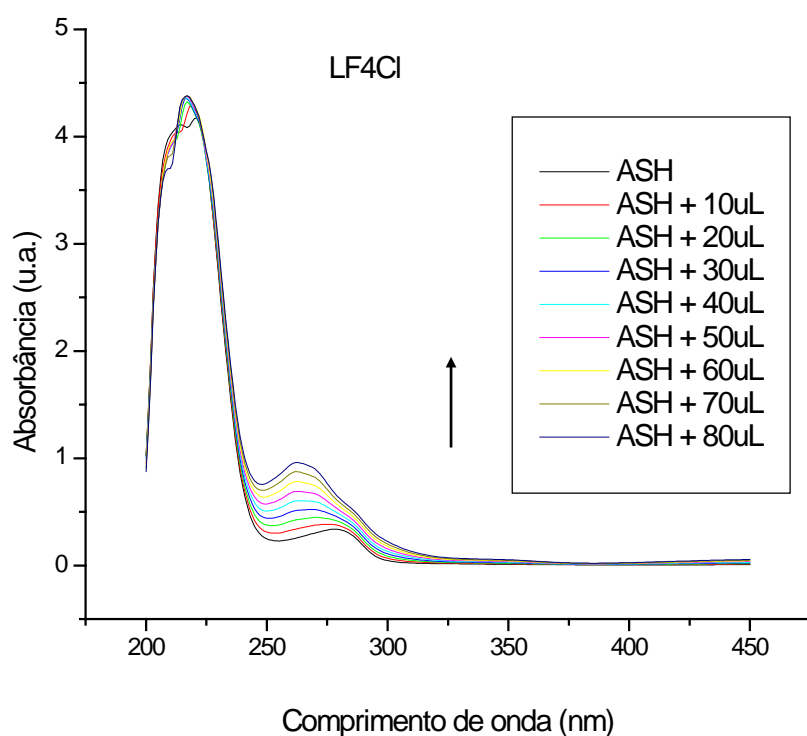


Figura 65 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L.

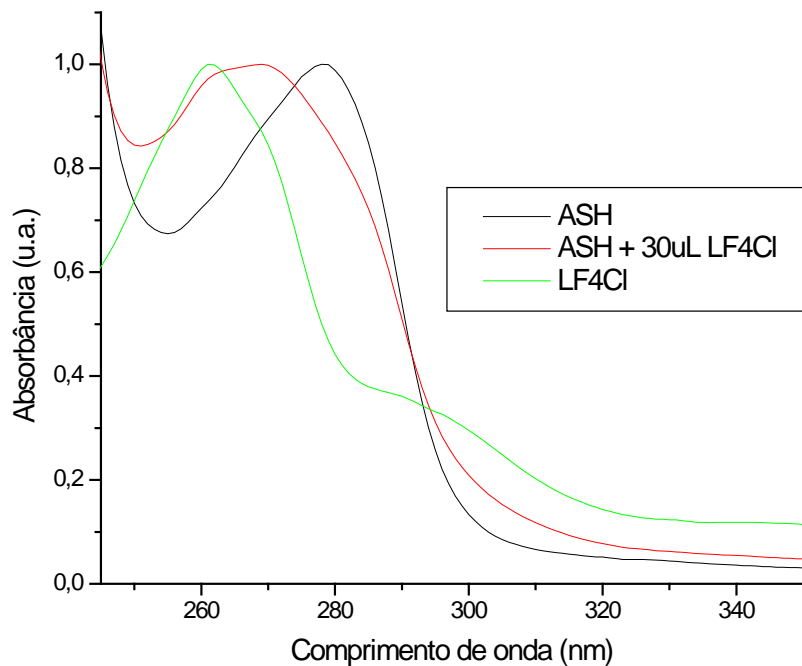


Figura 66 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona(LF4Br) $C_{LF4Br} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF4Br em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

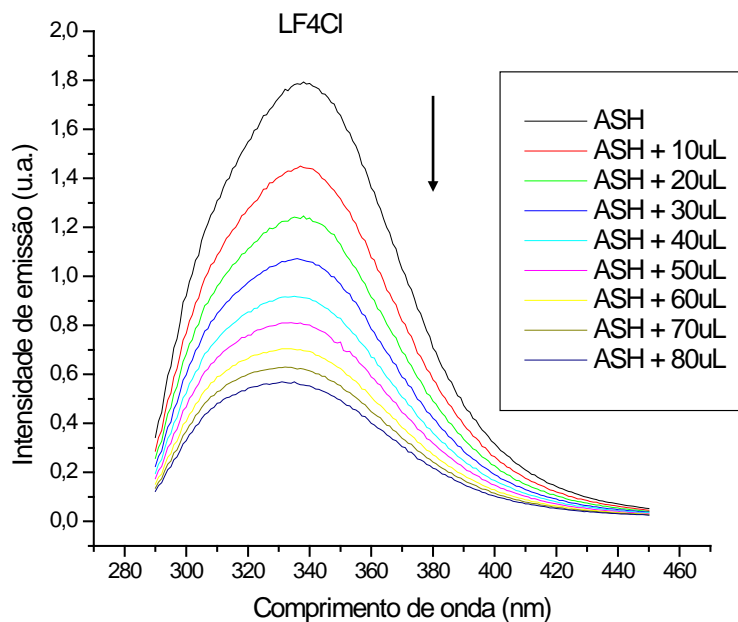


Figura 67 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$ e $3,84 (x 10^{-5})$ mol/L, a $T = 310$ K.

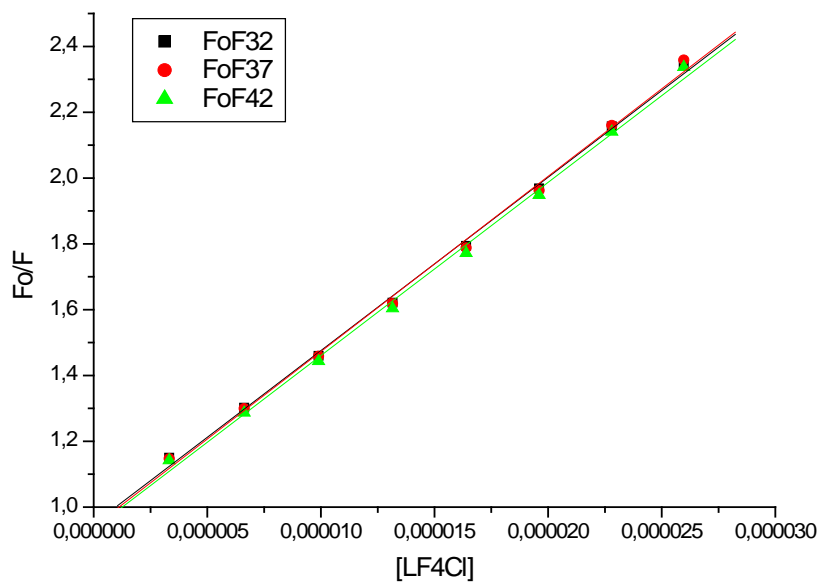


Figura 68 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Cl.

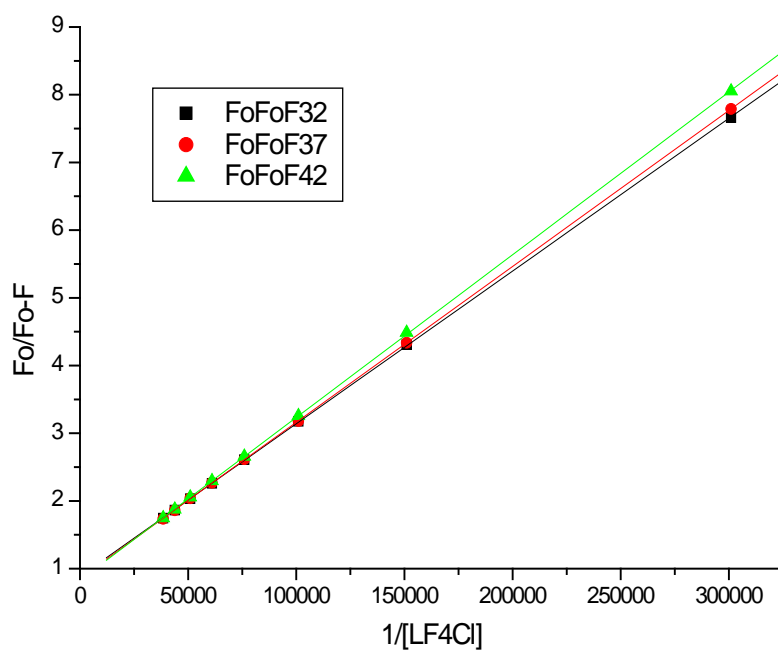


Figura 69 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Cl.

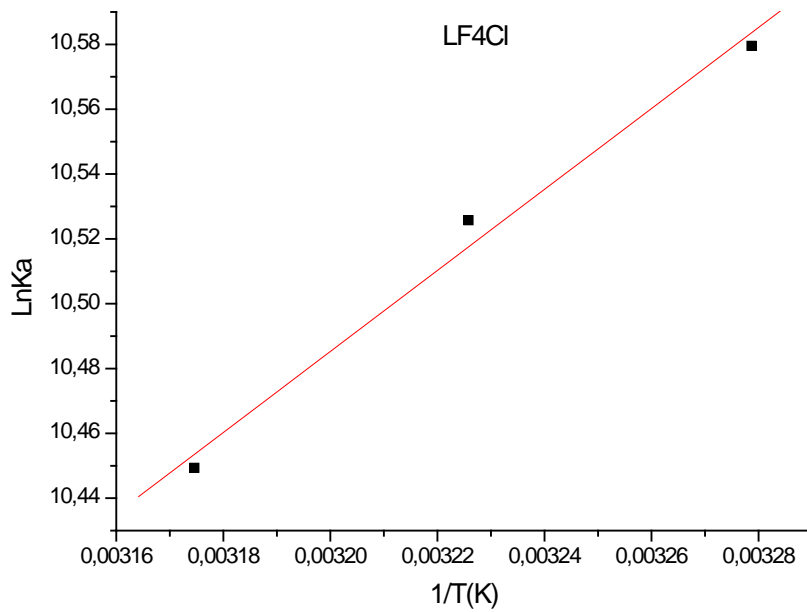


Figura 70 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Cl.

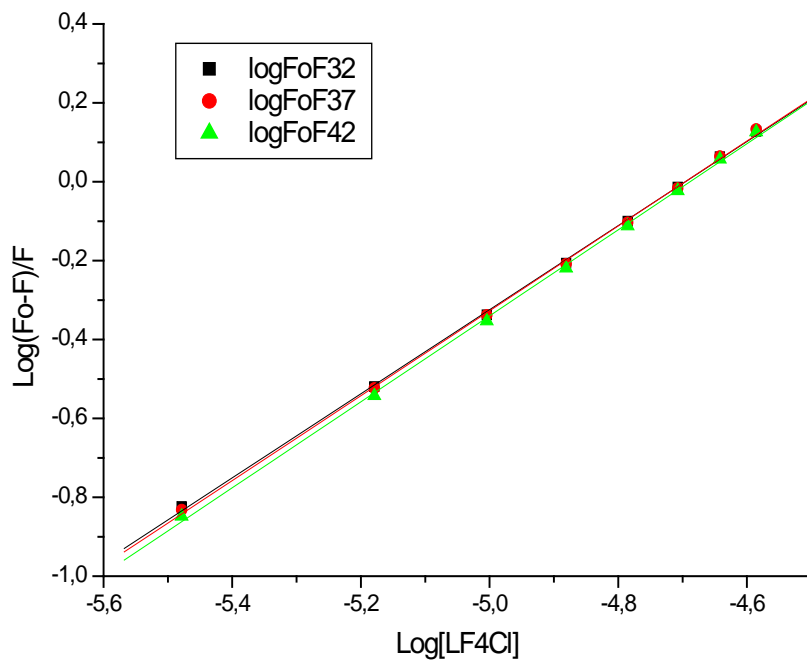


Figura 71 – Gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela 1,2-naftoquinona LF4Cl.

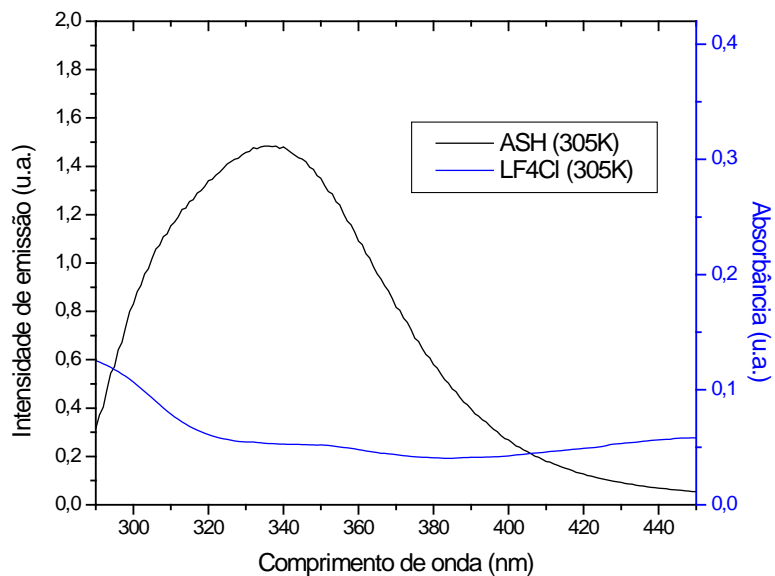


Figura 72 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Cl, $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

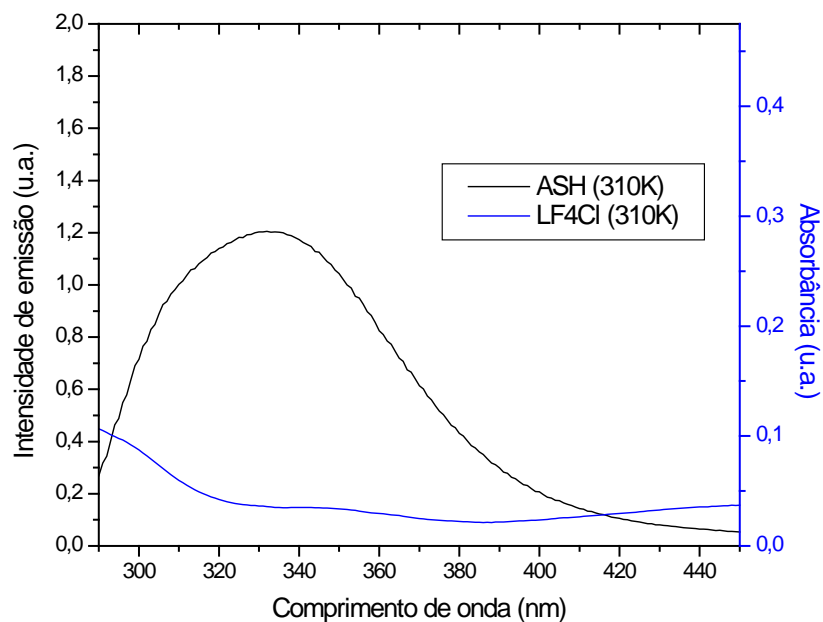


Figura 73 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Cl, $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

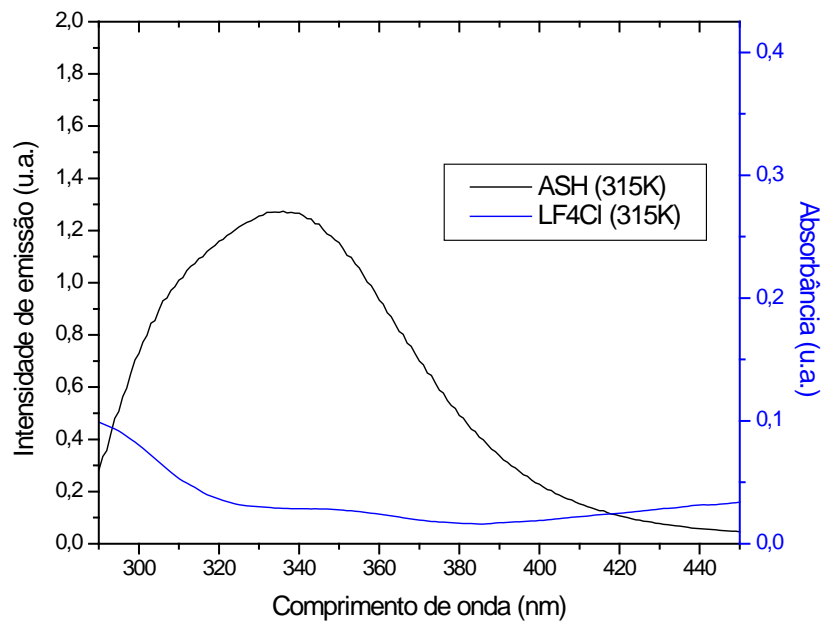


Figura 74 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF4Cl, $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

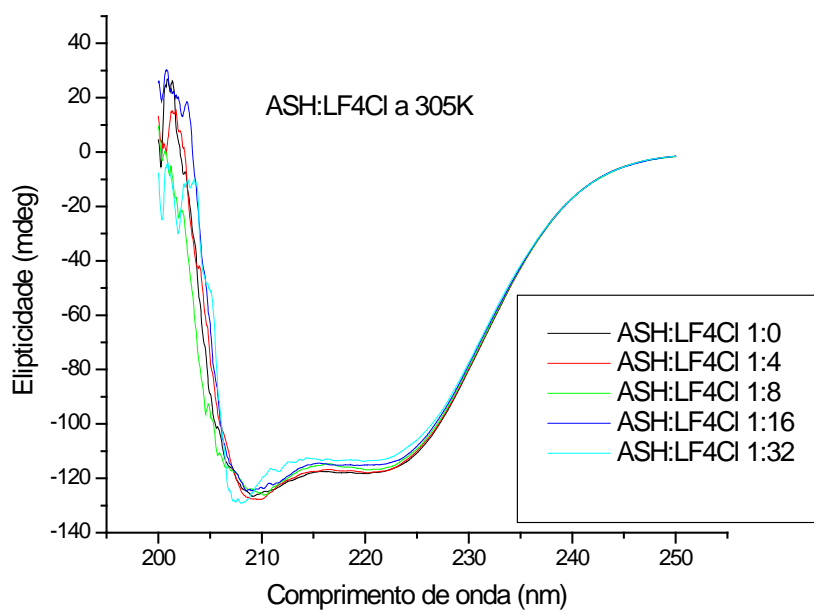


Figura 75 – Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) em LF4Cl, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01(x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K.

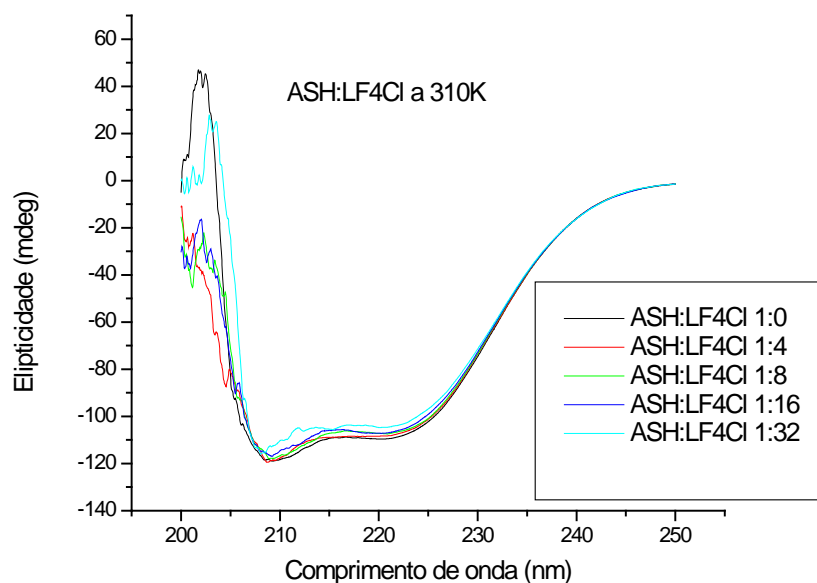


Figura 76 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Cl, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

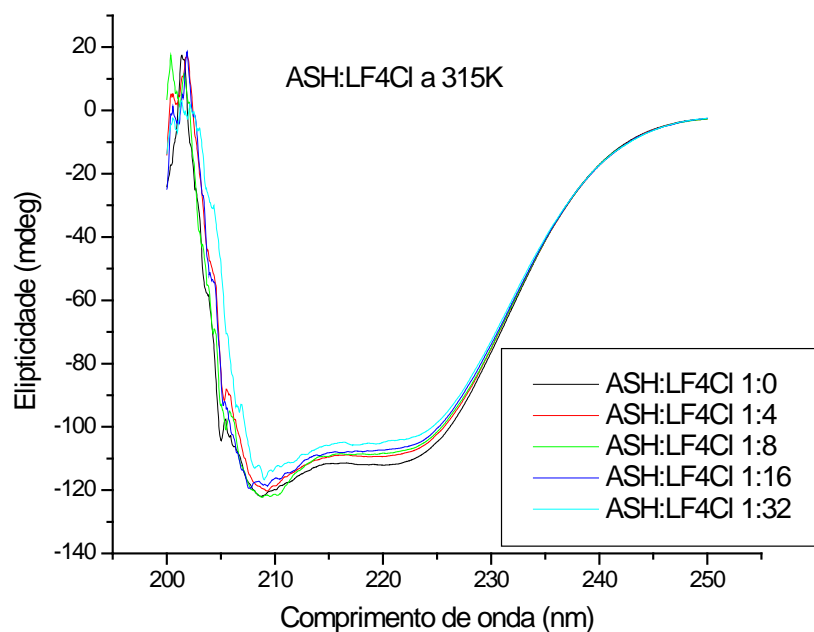


Figura 77 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em 1,2-naftoquinona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

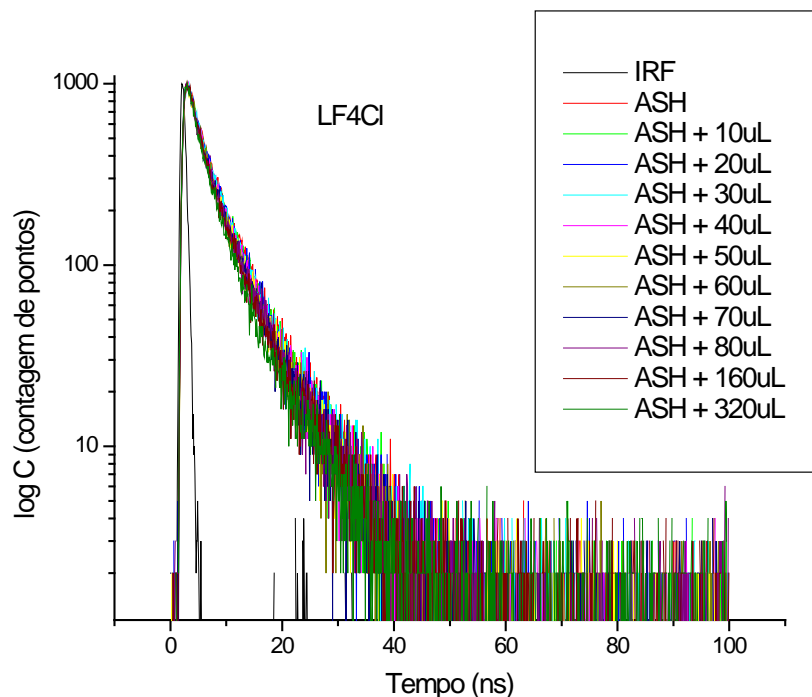


Figura 78 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$), para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF4Cl) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LF4Cl} = 0; 1,07; 2,13; 3,19; 4,24; 5,28; 6,31; 7,34; 8,36; 16,30; 31,00$ ($\times 10^{-6} \text{ mol/L}$). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 20 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF4Cl ($C_{LF4Cl} = 3,22 \times 10^{-4}$).

[LF4Cl] 10^{-6} (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	-	-	-
1,07	2,56	6,79	0,799
2,13	2,94	7,10	0,833
3,19	2,77	7,27	0,795
4,24	2,33	6,52	0,757
5,28	2,64	6,80	0,708
6,31	2,53	6,69	0,798
7,34	2,26	6,27	0,843
8,36	2,56	6,74	0,772
16,30	-	-	-
31,00	2,53	6,69	0,740

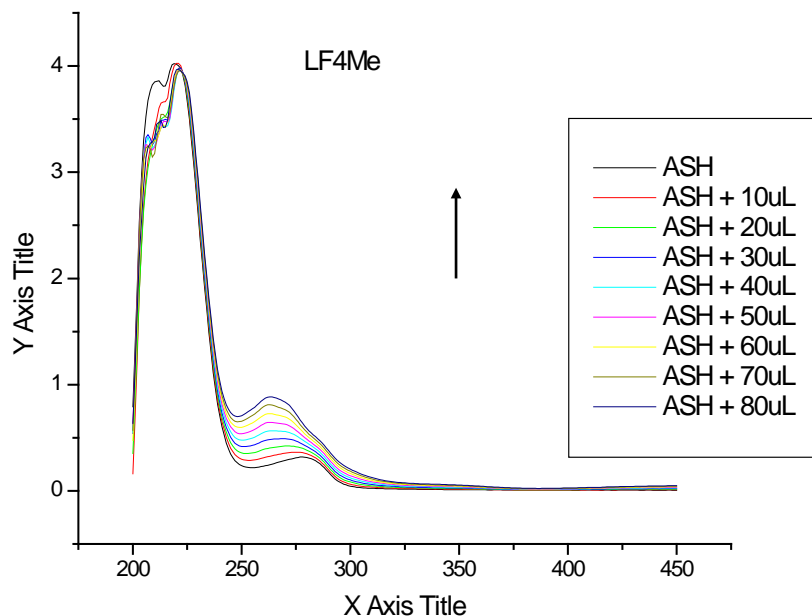


Figura 79 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60(x 10^{-5})$ mol/L.

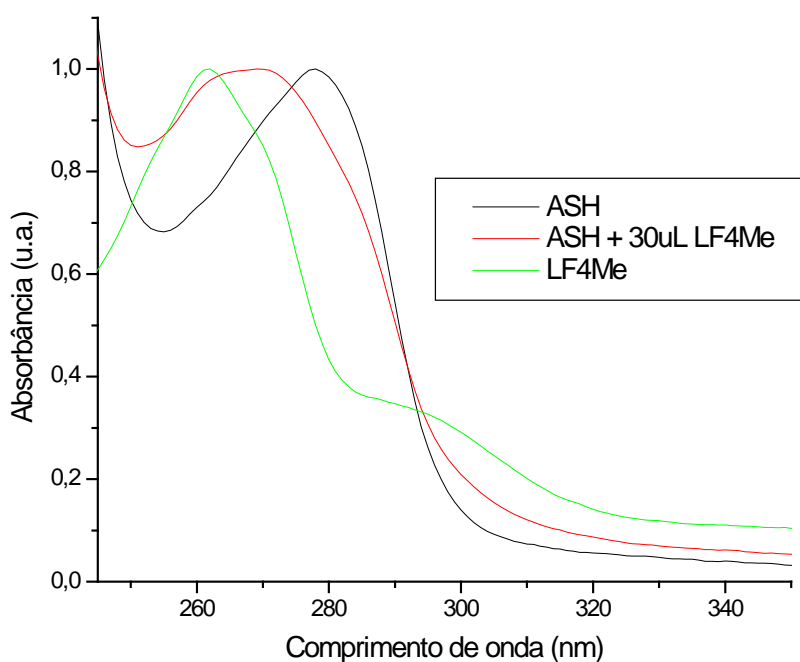


Figura 80 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona(LF4Me) $C_{LF4Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF4Me em PBS, $C_{LF} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

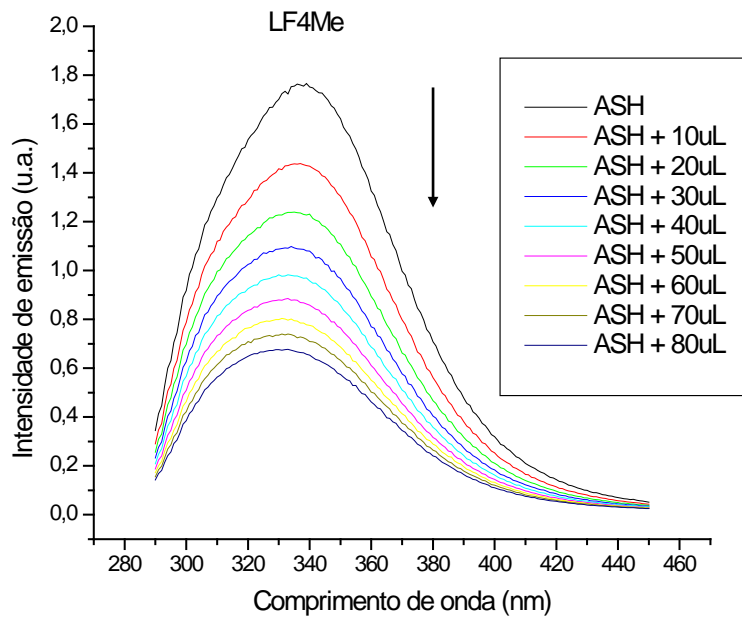


Figura 81 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) em LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LF4Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ e ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310 \text{ K}$.

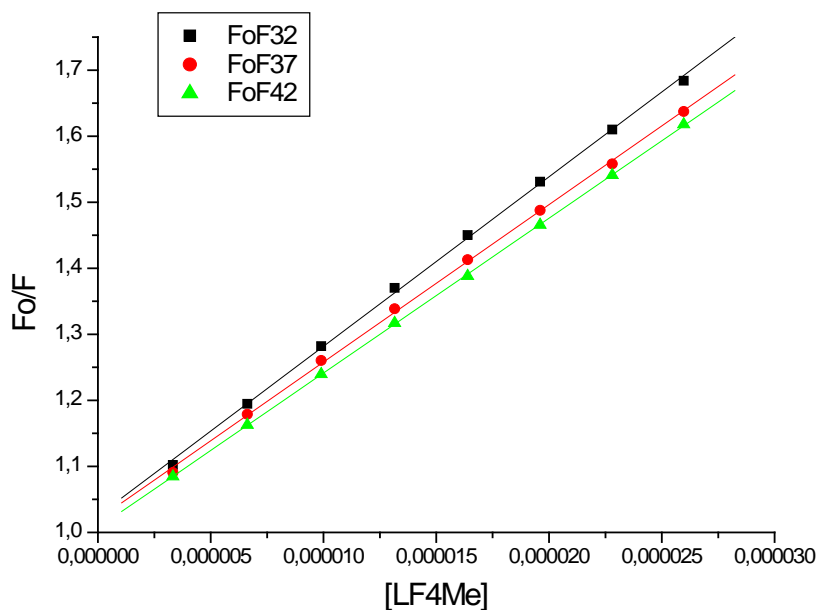


Figura 82 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Me.

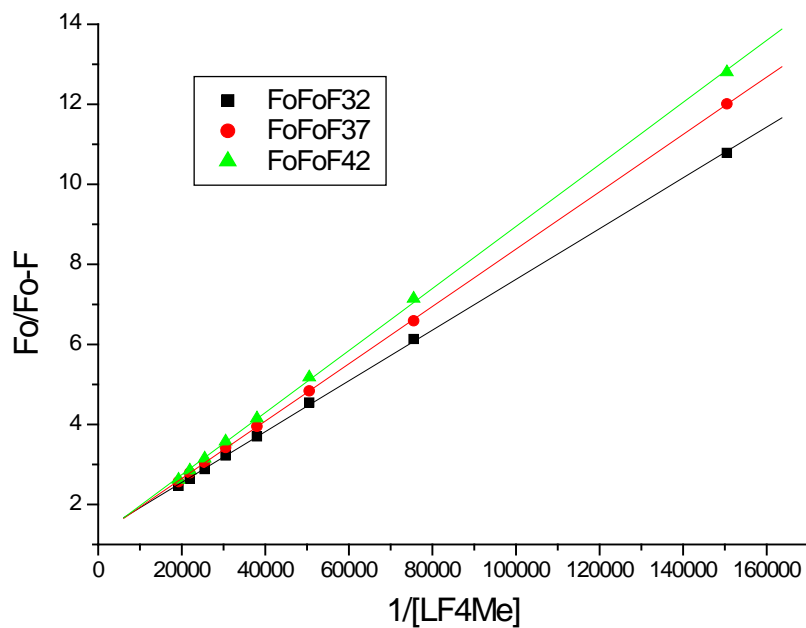


Figura 83 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Me.

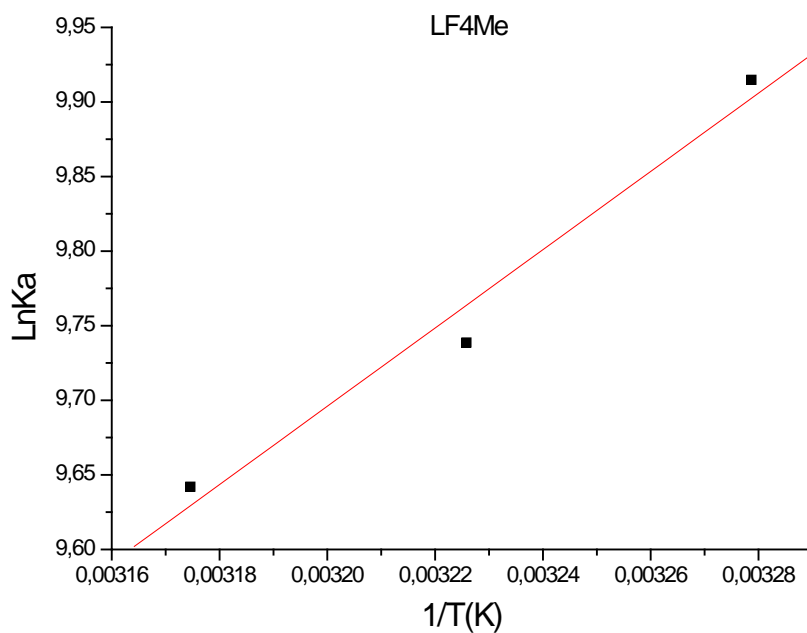


Figura 84 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF4Me.

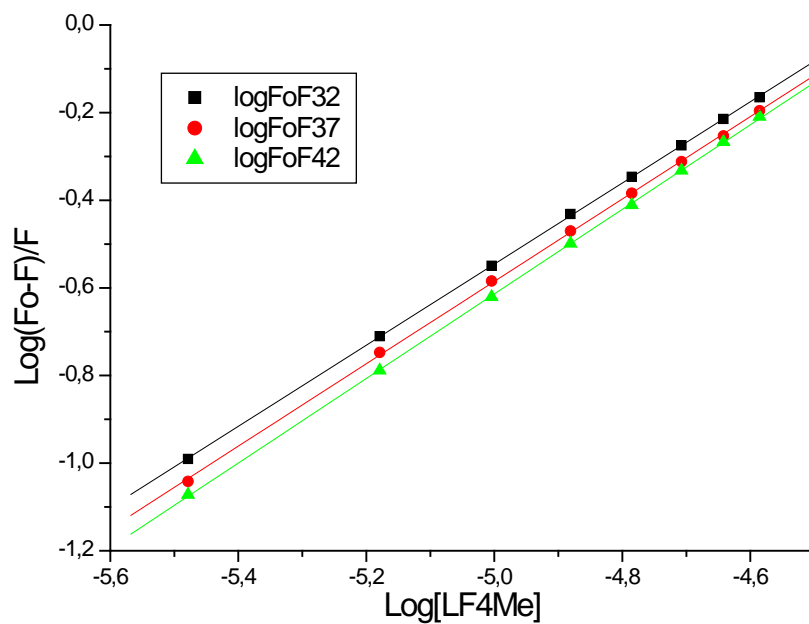


Figura 85 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF4Me.

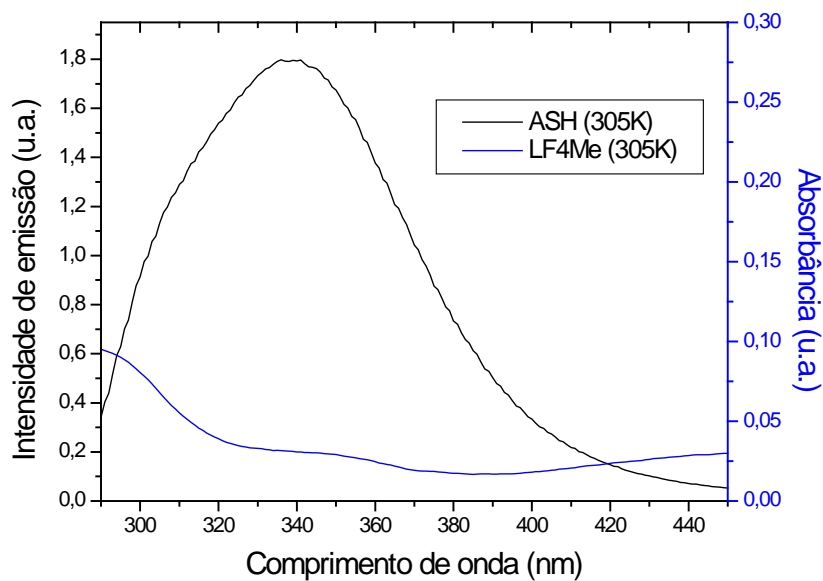


Figura 86 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LF4Me, $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

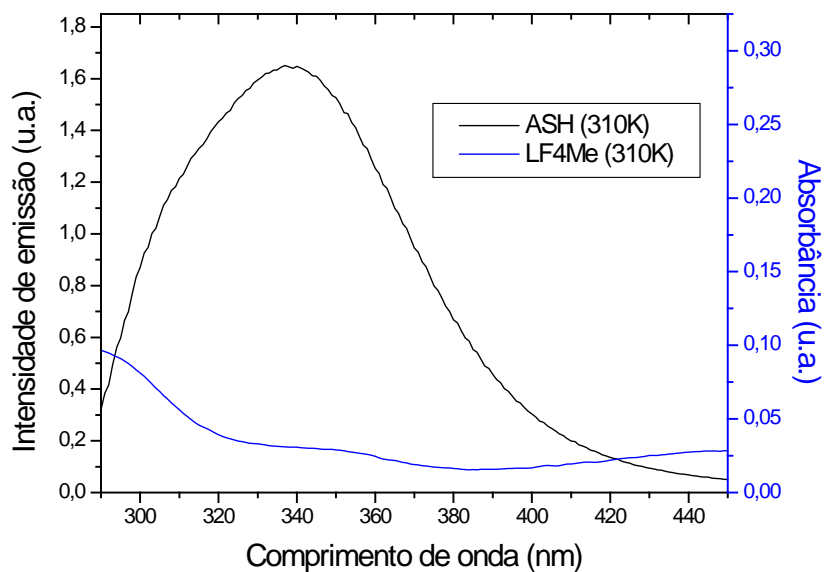


Figura 87 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Me, $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

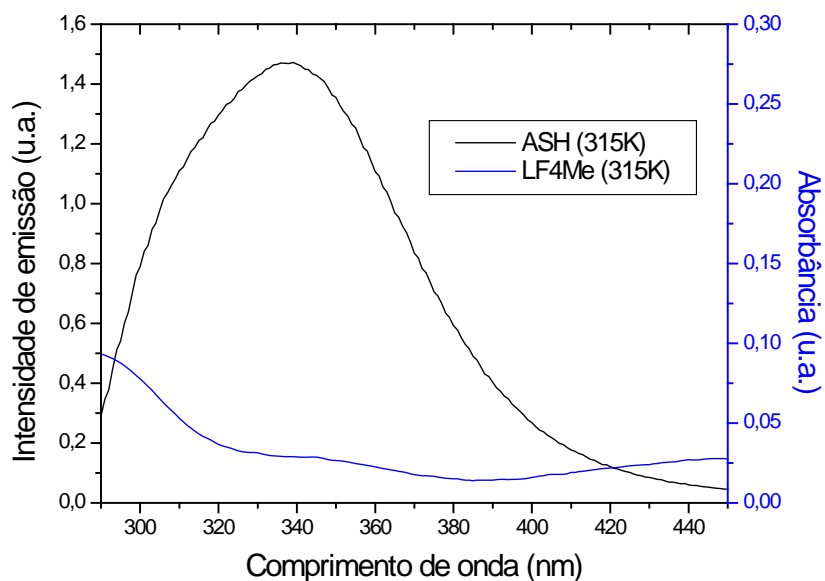


Figura 88 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF4Me, $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

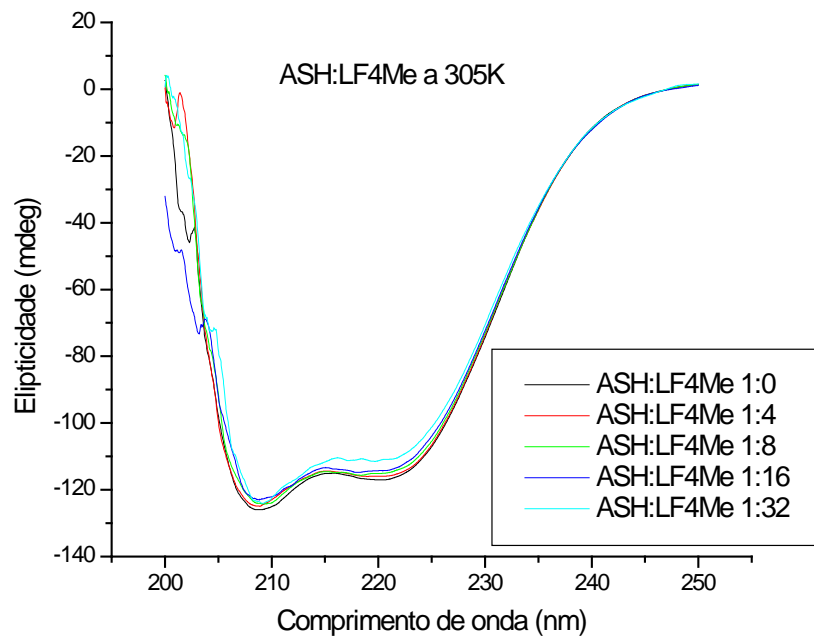


Figura 89 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K.

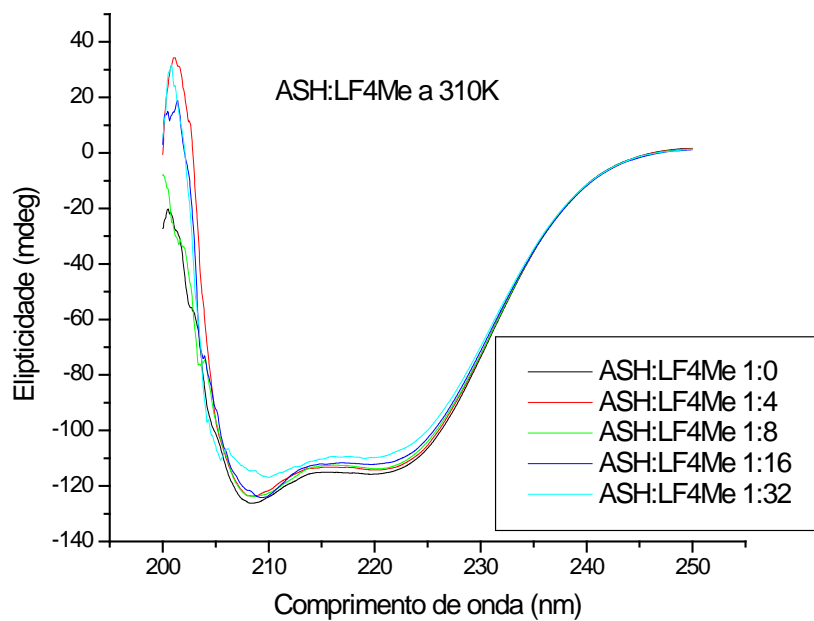


Figura 90 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

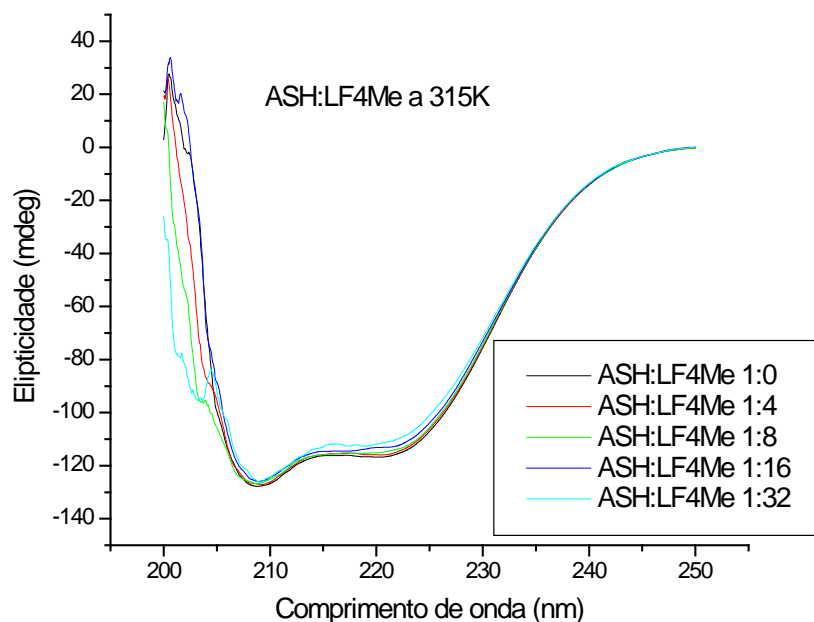


Figura 91 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

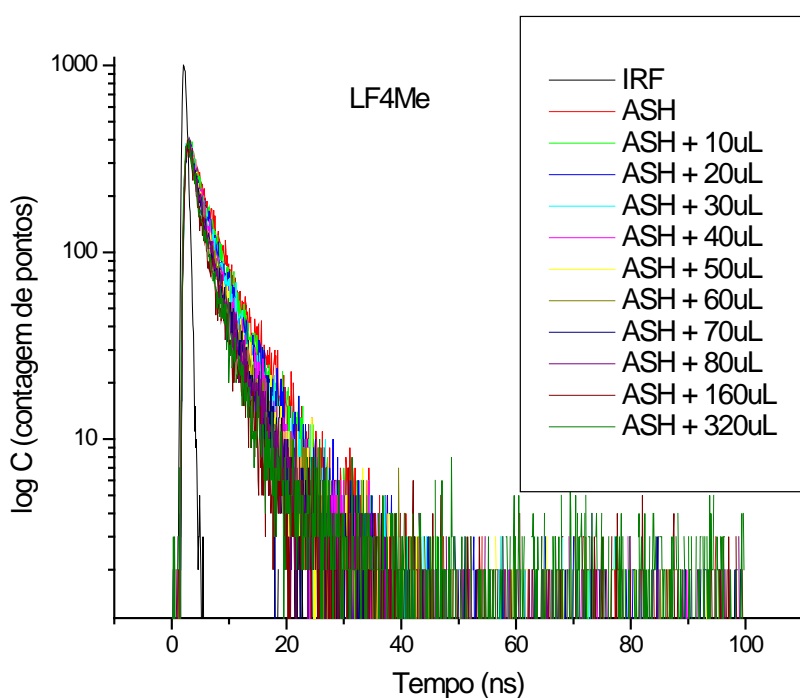


Figura 92 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF4Me) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4,58; 9,14; 13,70; 18,20; 22,60; 27,10; 31,50; 35,80; 69,90; e 133,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 21 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF4Me ($C_{LF4Me} = 1,38 \times 10^{-3}$).

[LF4Me] 10^{-6} (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,61	6,38	0,564
4,58	2,22	5,96	0,608
9,14	2,07	5,75	0,644
13,70	2,28	5,82	0,607
18,20	2,44	6,17	0,557
22,60	1,93	5,42	0,570
27,10	1,99	5,56	0,596
31,50	1,77	4,82	0,641
35,80	2,04	5,43	0,618
69,90	1,78	4,51	0,667
133,00	2,29	6,61	0,808

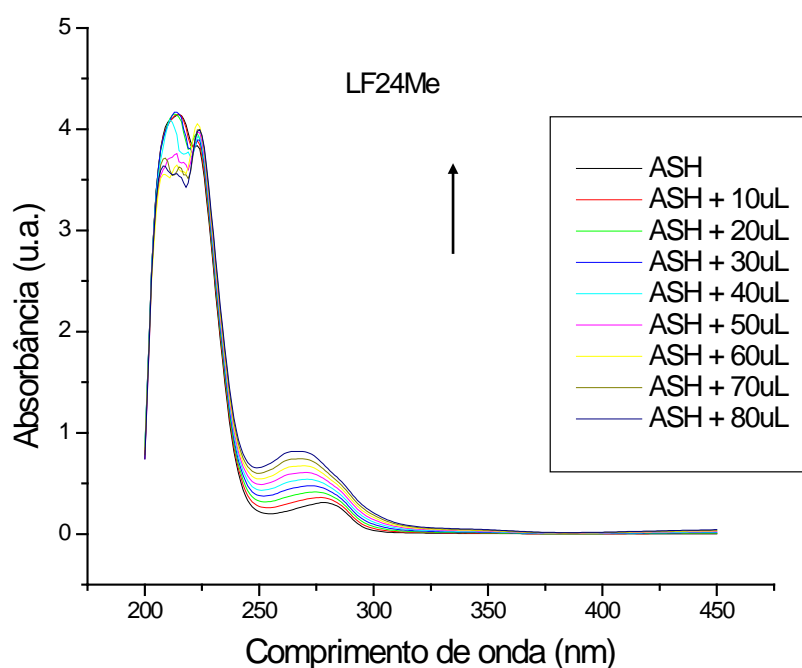


Figura 93 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L.

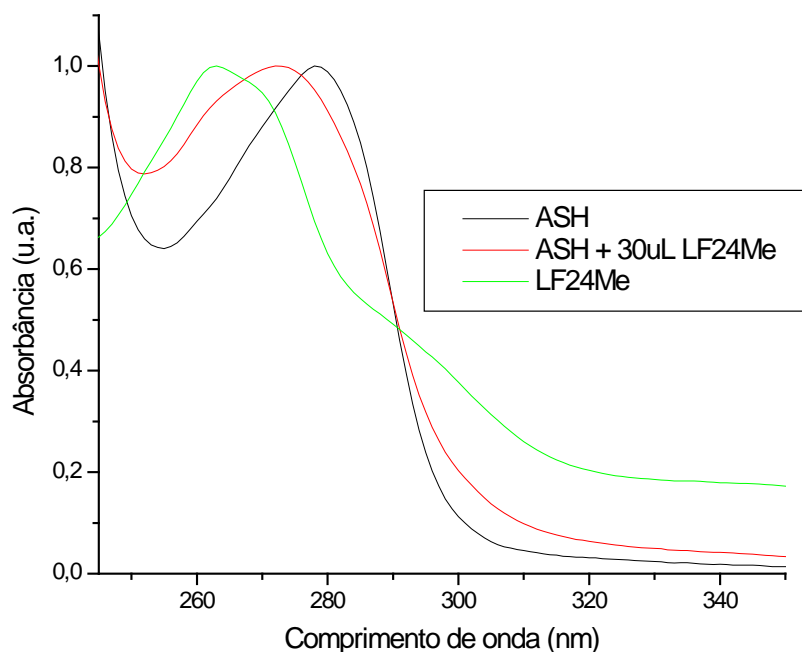


Figura 94 - Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona(LF24Me) $C_{LF24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LF24Me em PBS, $C_{LF24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

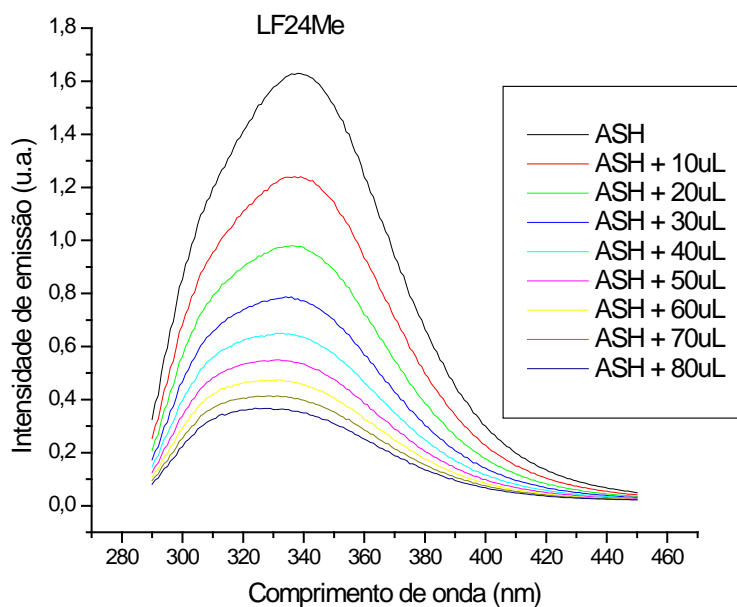


Figura 95 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$ e $3,84 (\times 10^{-5})$ mol/L, a $T = 310$ K.

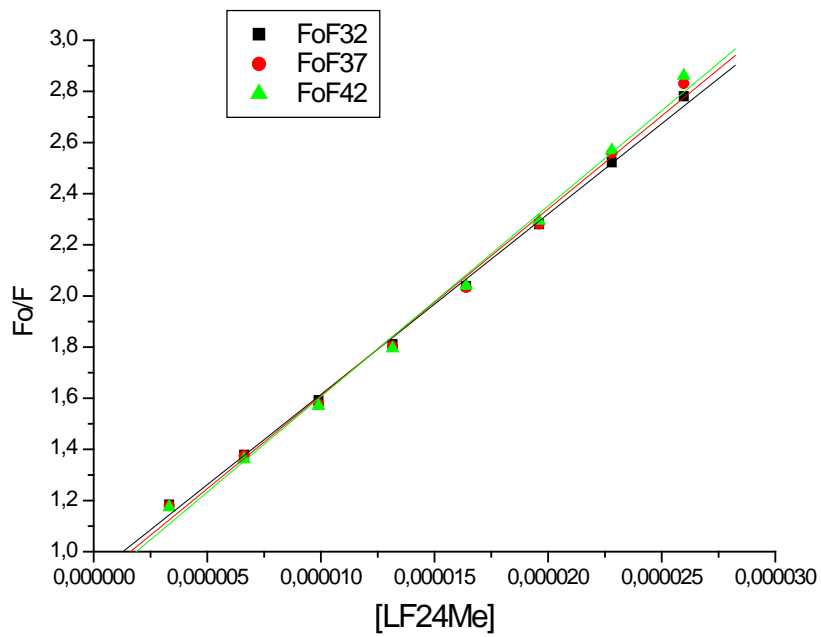


Figura 96 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF24Me.

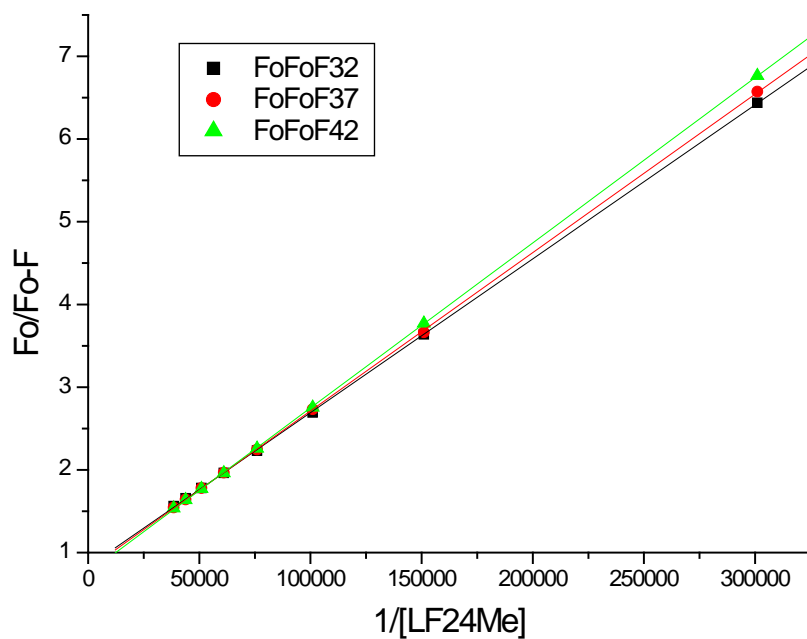


Figura 97 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LF24Me.

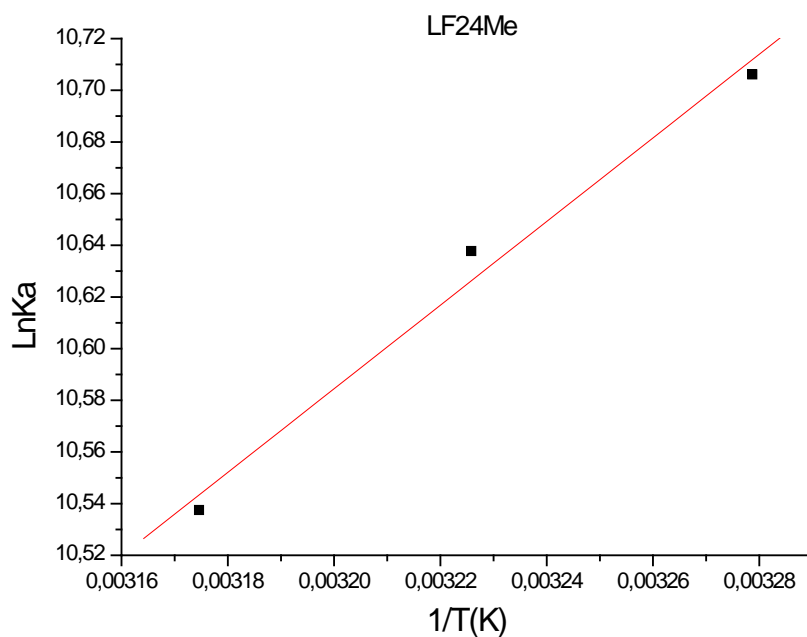


Figura 98 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LF24Me.

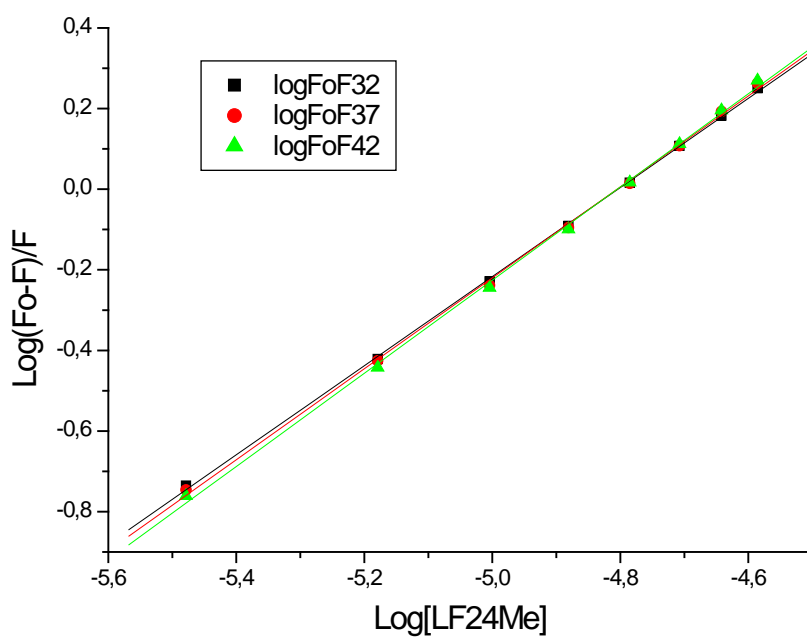


Figura 99 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) LF24Me.

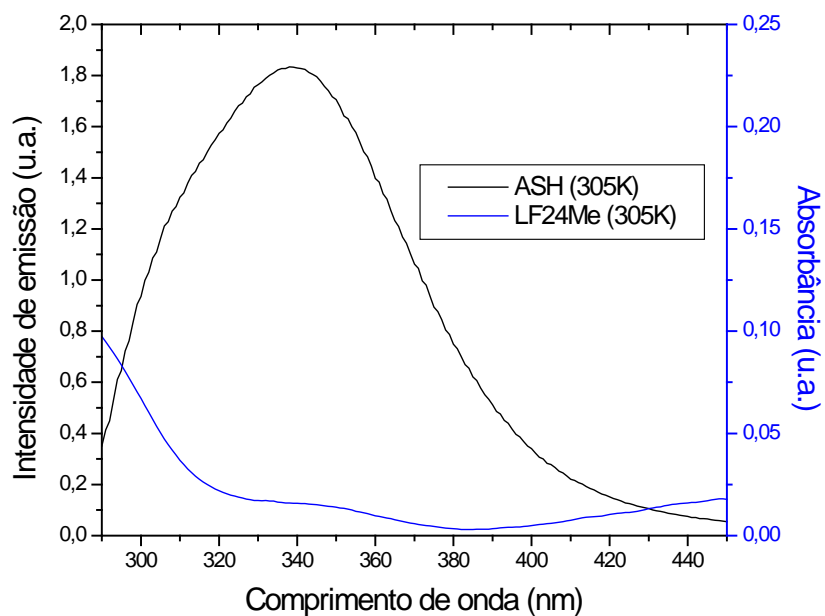


Figura 100 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF24Me, $C_{ASH} = C_{LF24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

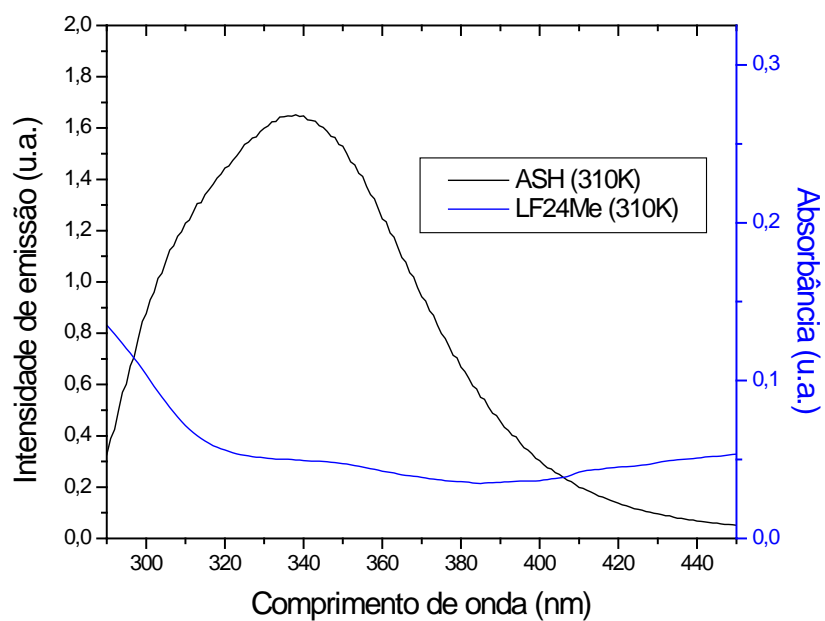


Figura 101 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF24Me, $C_{ASH} = C_{LF24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

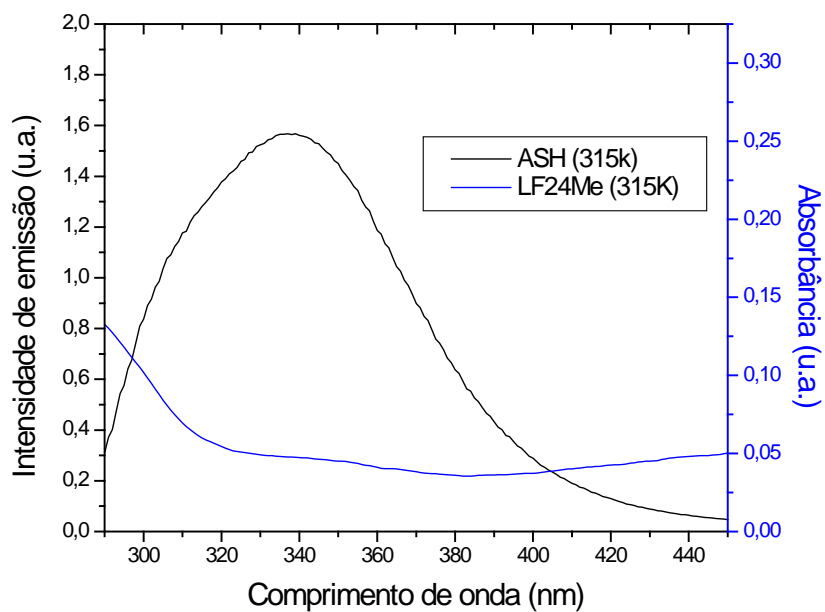


Figura 102 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LF24Me, $C_{ASH} = C_{LF24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

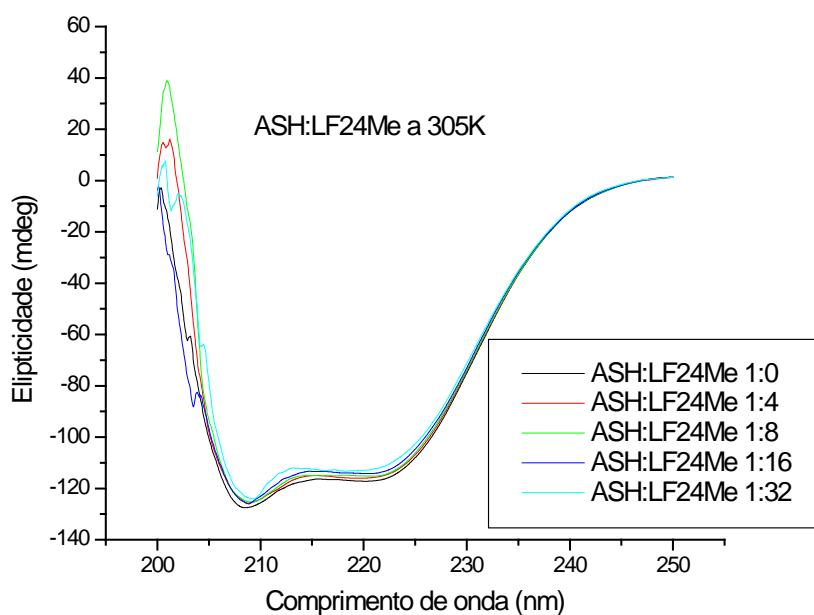


Figura 103 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, mol/L, a $T = 305$ K.

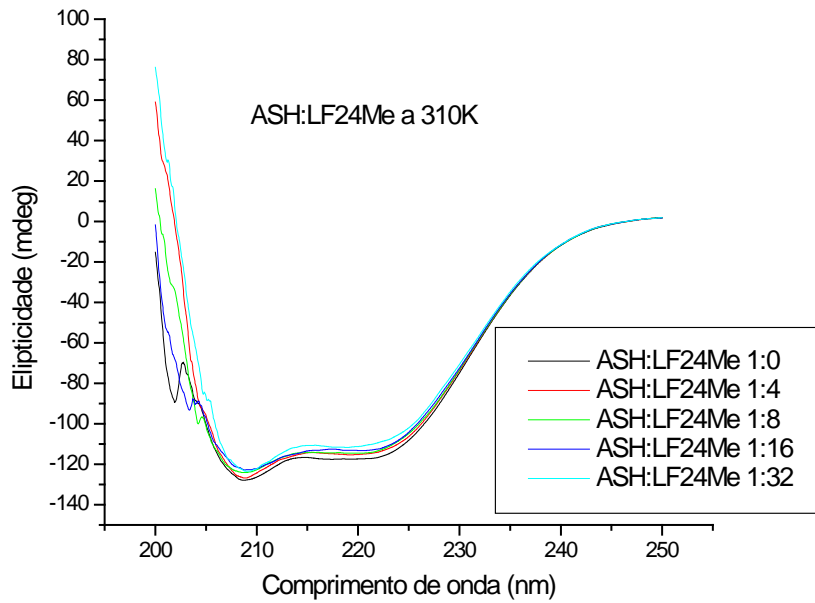


Figura 104 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, mol/L, a $T = 310$ K.

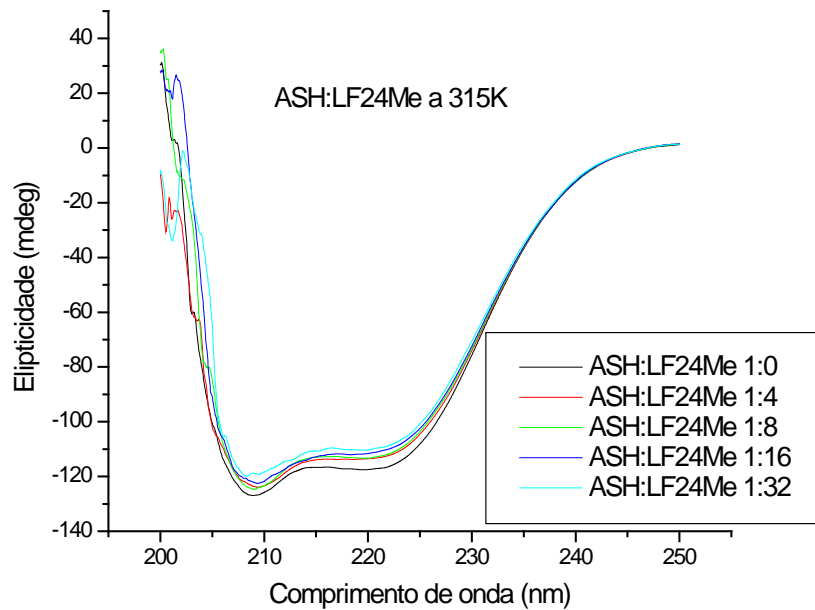


Figura 105 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LF24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LF24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, mol/L, a $T = 315$ K.

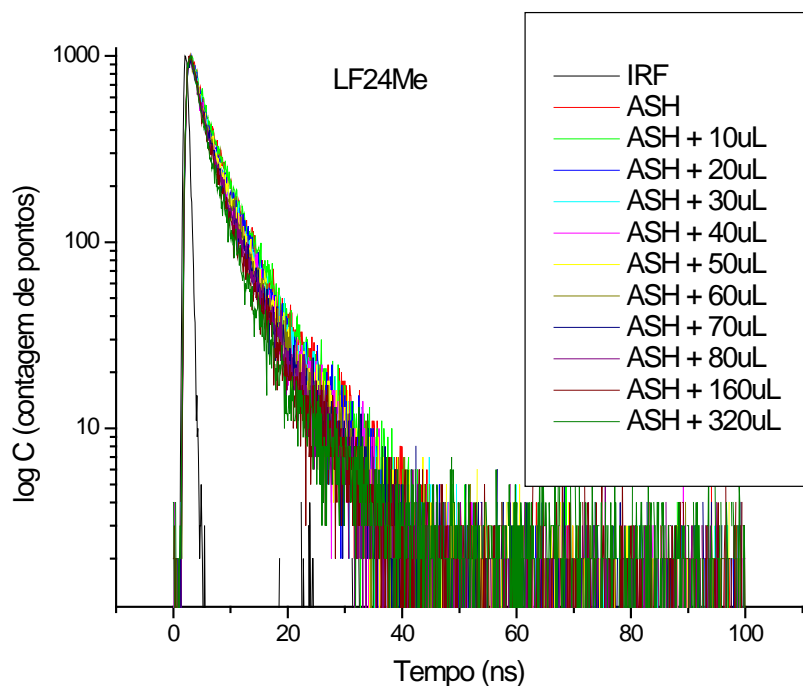


Figura 106 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$), para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LF24Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LF24Me} = 0; 3,92; 7,81; 11,70; 15,50; 19,30; 23,10; 26,90; 30,60; 59,70$ e $114,00$ ($\times 10^{-6} \text{ mol/L}$). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 22 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LF24Me ($C_{LF24Me} = 1,18 \times 10^{-3}$).

[LF24Me] 10^{-6} (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,79	7,16	0,717
3,92	2,47	6,75	0,787
7,81	2,40	6,60	0,766
11,70	2,38	6,59	0,757
15,50	2,43	6,62	0,773
19,30	2,42	6,48	0,828
23,10	2,51	6,81	0,735
26,90	2,45	6,65	0,730
30,60	-	-	-
59,70	2,34	6,54	0,943
114,00	2,31	6,61	0,990

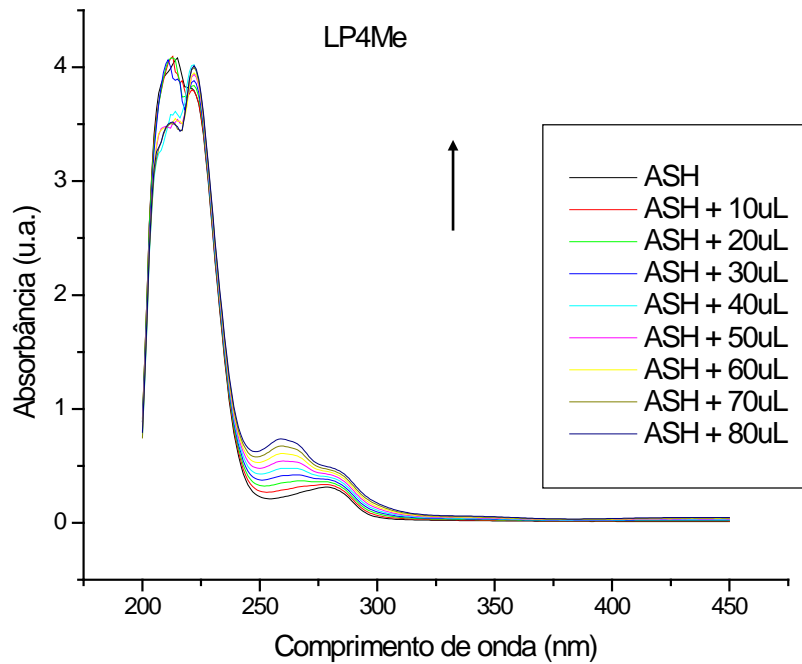


Figura 107 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5})$ mol/L.

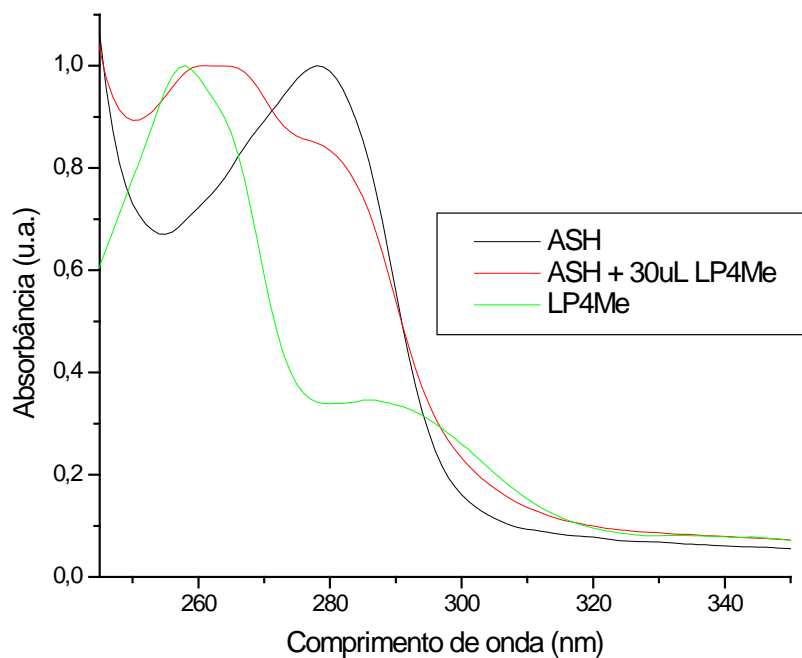


Figura 108 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona(LP4Me) $C_{LP4Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LP4Me em PBS, $C_{LP4Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

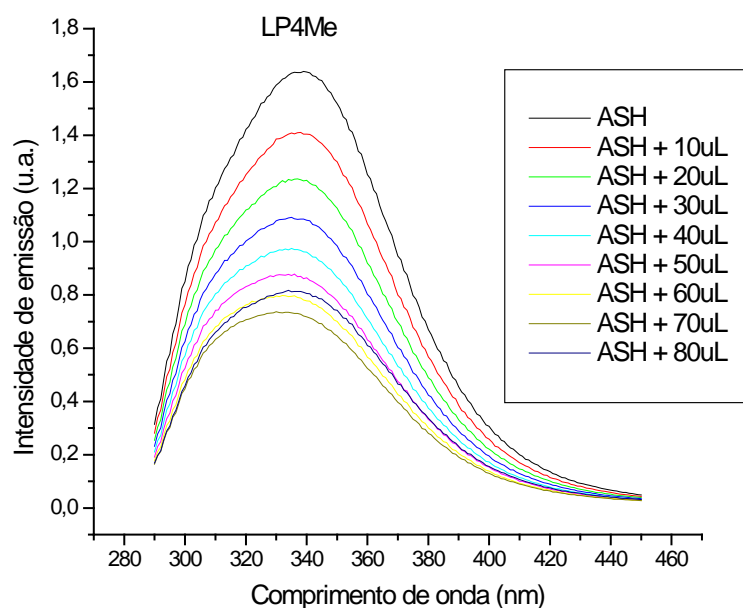


Figura 109 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) em LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LP4Me} = 0; 0,25; 0,50; 0,74; 0,98; 1,22; 1,46; 1,69$ e $1,92(x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 310 \text{ K}$.

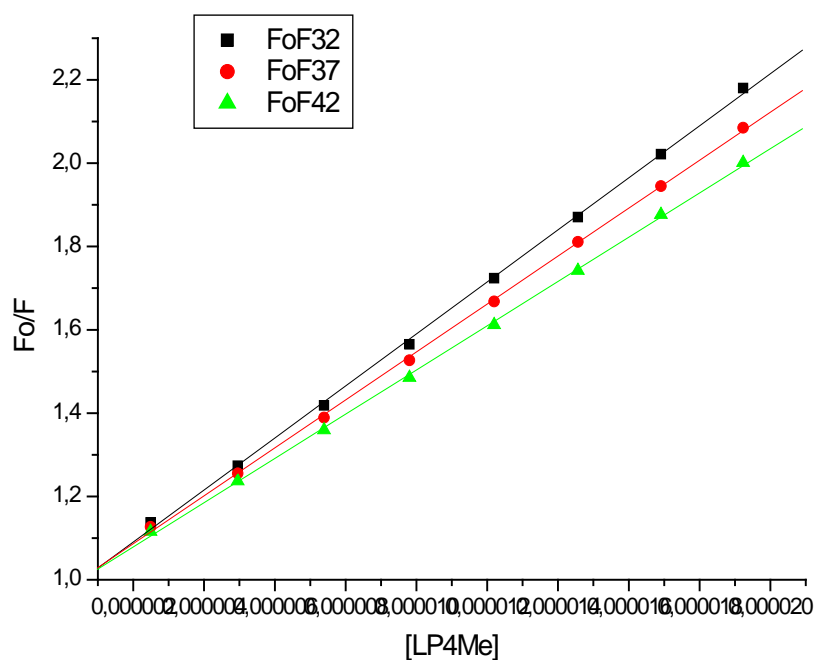


Figura 110 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP4Me.

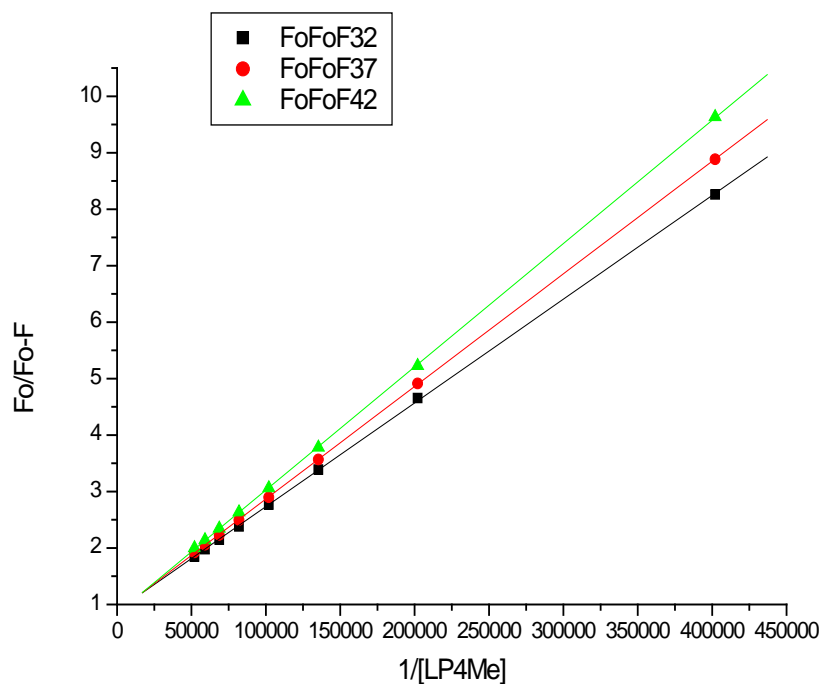


Figura 111 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP4Me.

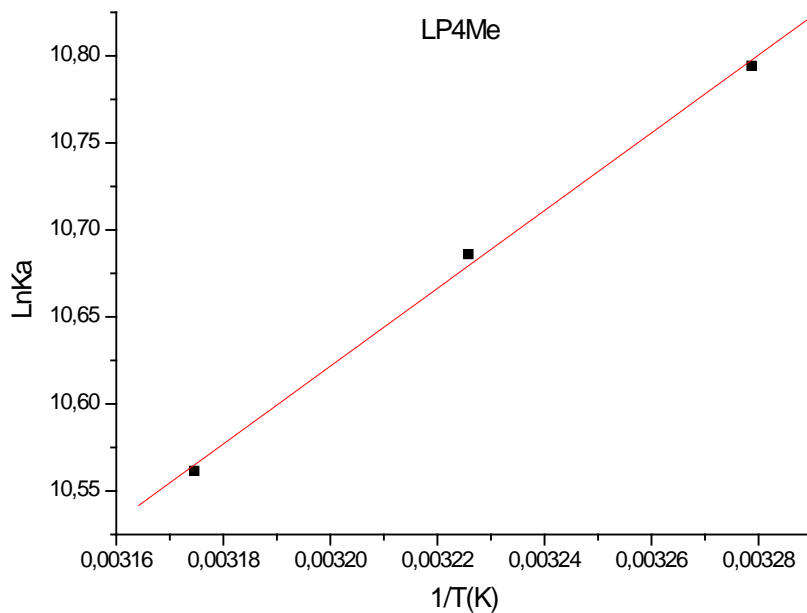


Figura 112 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP4Me.

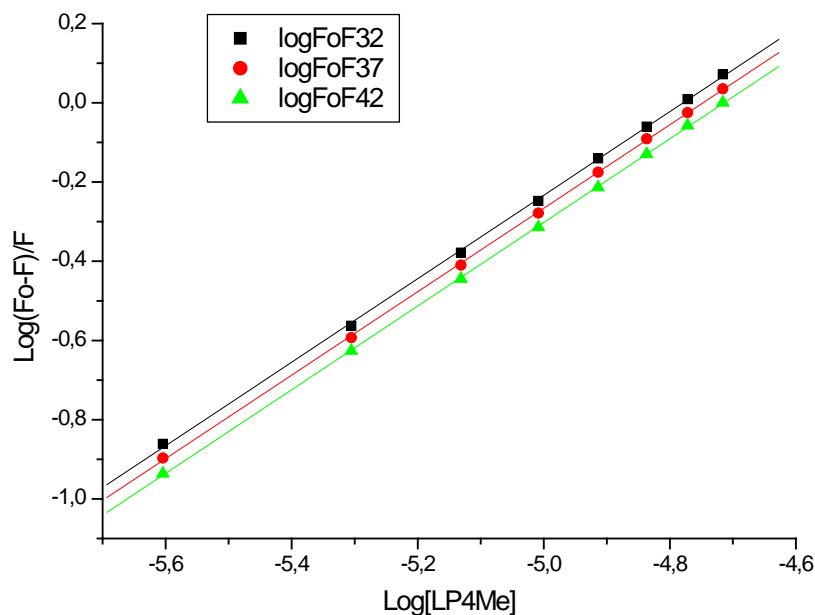


Figura 113 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4Me.

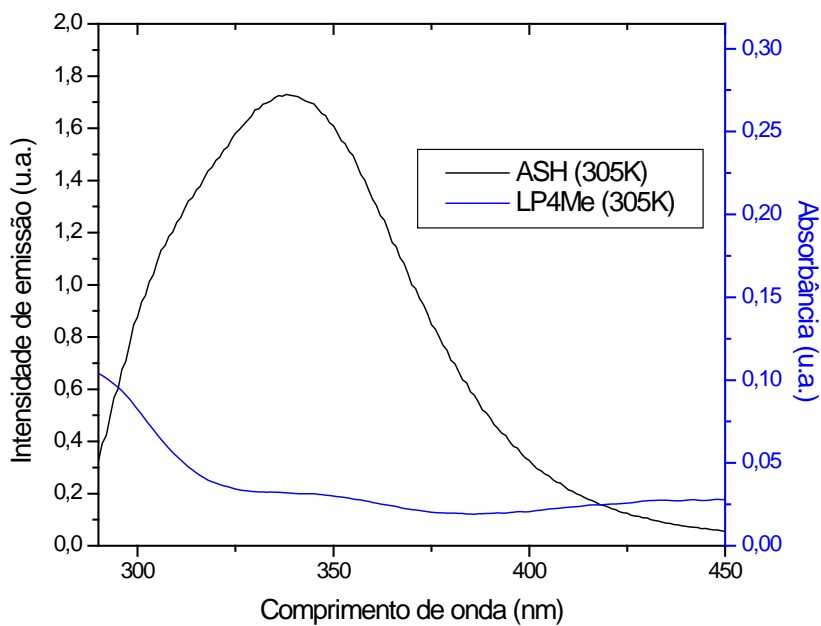


Figura 114 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LP4Me, $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

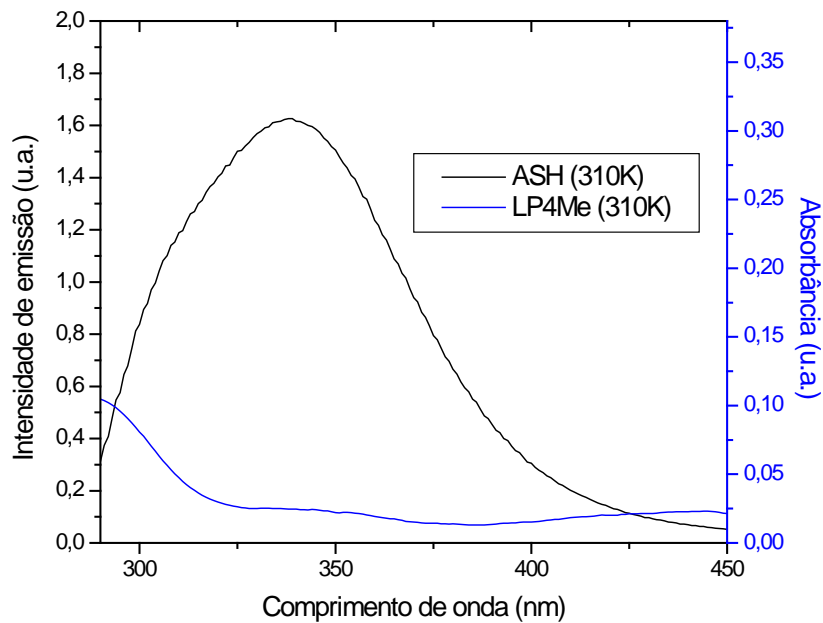


Figura 115 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4Me, $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

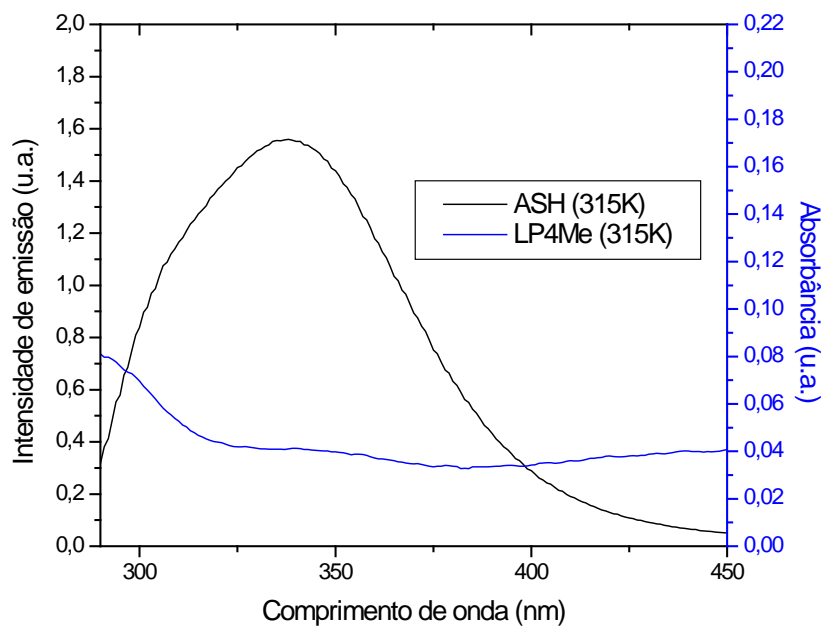


Figura 116 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4Me, $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

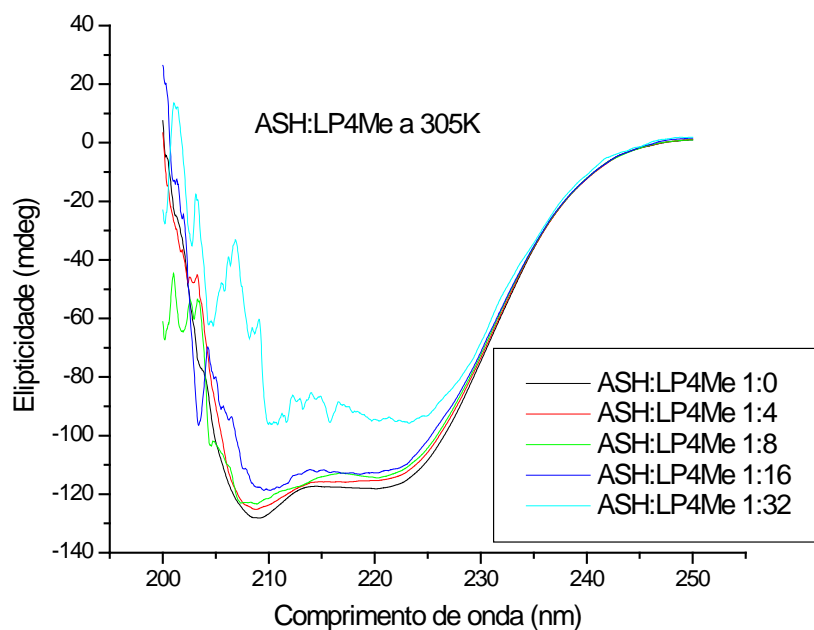


Figura 117 – Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em LP4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, mol/L, a $T = 305$ K.

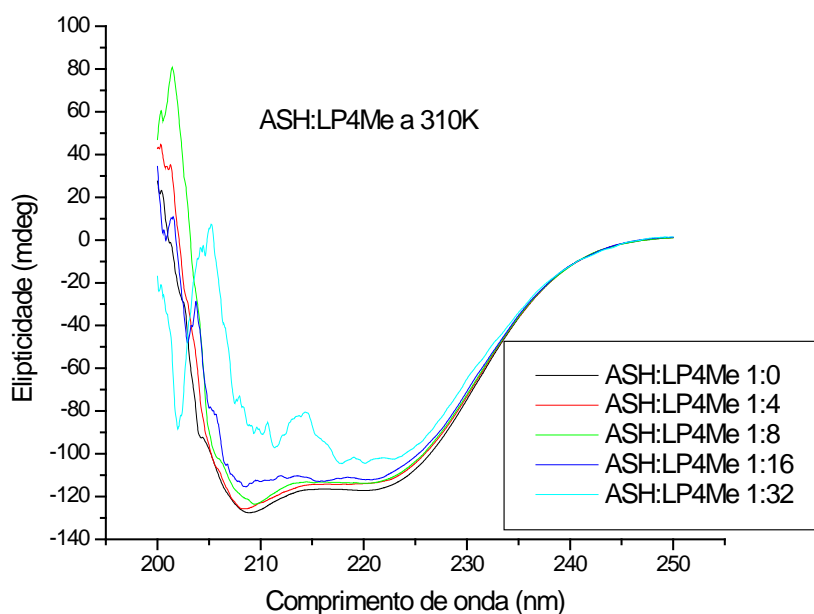


Figura 118 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

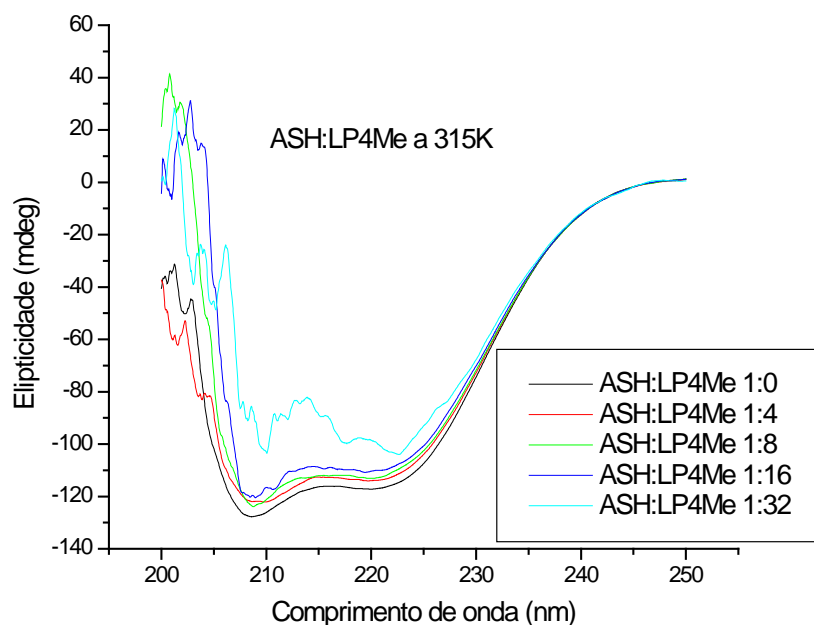


Figura 119 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

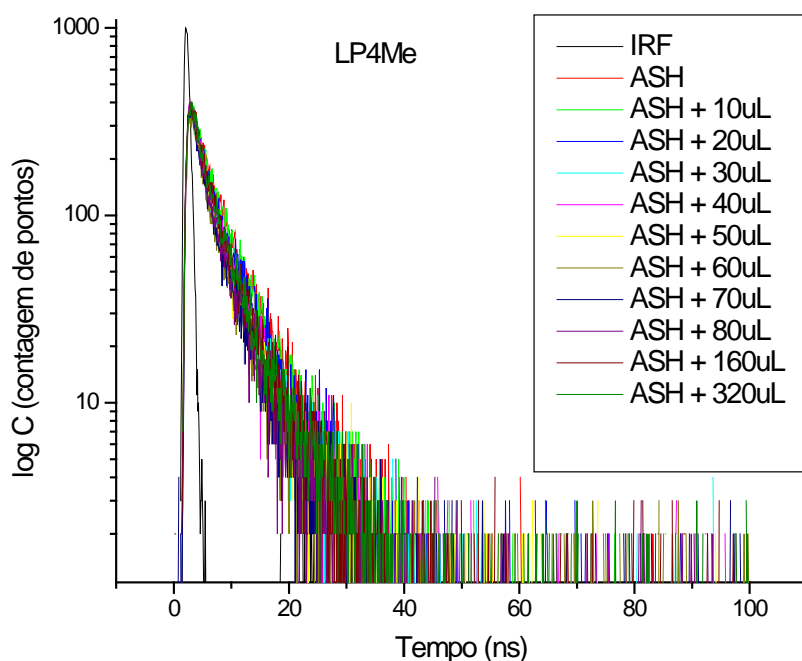


Figura 120 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LP4Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 3,72; 7,42; 11,10; 14,70; 18,40; 22,00; 25,50; 29,10; 56,70$ e $108,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 23 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LP4Me ($C_{LP4Me} = 1,12 \times 10^{-3}$).

[LP4Me] 10^{-6} (M)	T_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,83	6,65	0,596
3,72	2,21	6,15	0,607
7,42	2,27	5,95	0,657
11,10	2,36	6,34	0,542
14,70	2,58	6,67	0,607
18,40	2,08	5,77	0,559
22,00	2,09	5,56	0,619
25,50	1,88	5,19	0,549
29,10	1,73	5,01	0,640
56,70	2,46	6,22	0,593
108,00	2,21	5,88	0,611

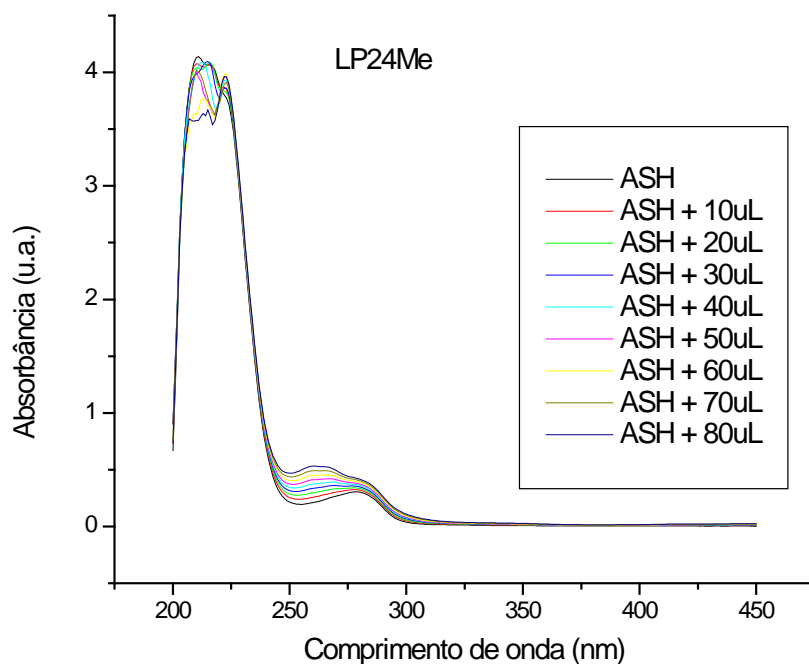


Figura 121 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L.

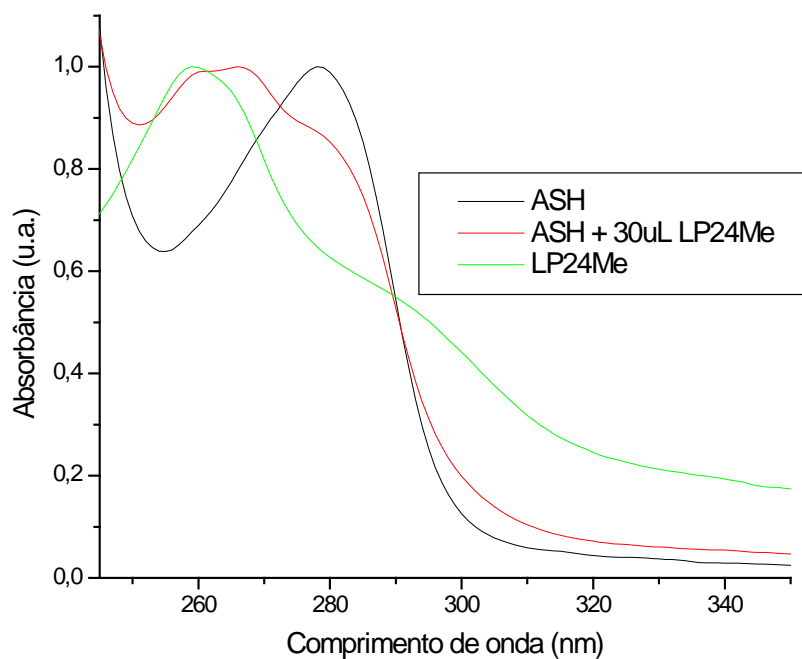


Figura 122 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona(LP24Me) $C_{LP24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LP24Me em PBS, $C_{LP24Me} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

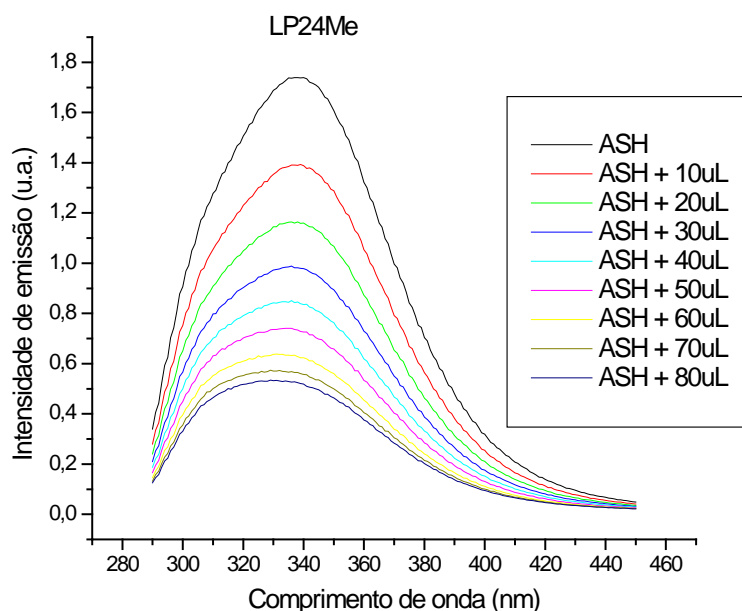


Figura 123 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60$ ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K.

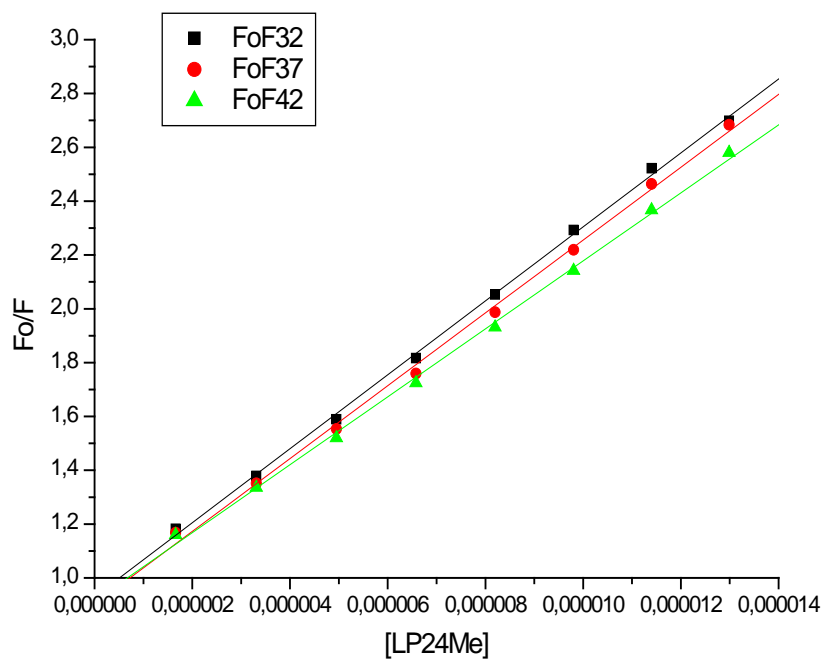


Figura 124 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP24Me.

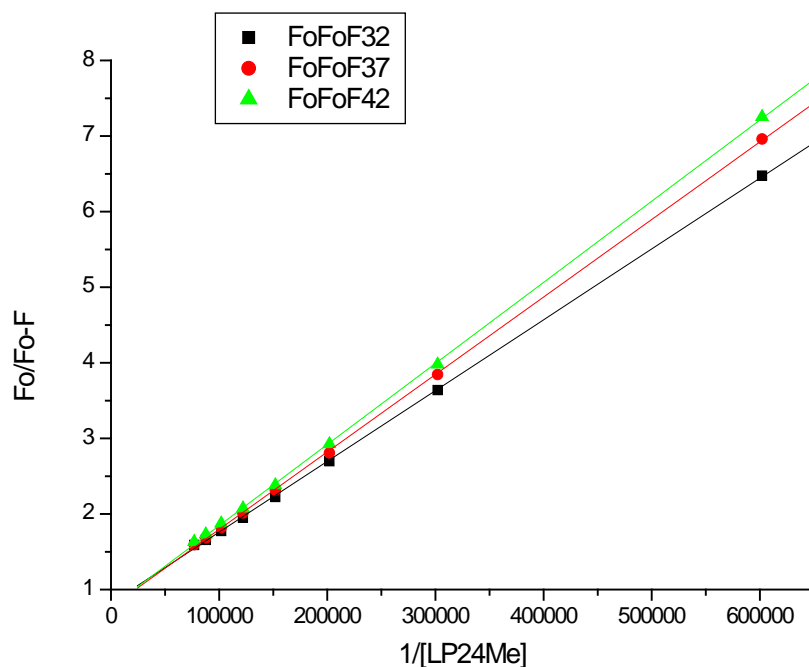


Figura 125 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP24Me.

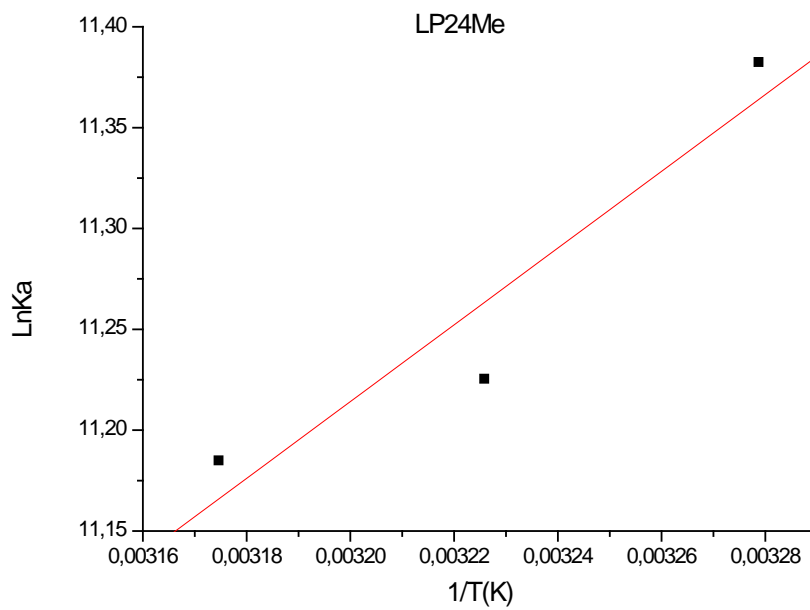


Figura 126 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP24Me.

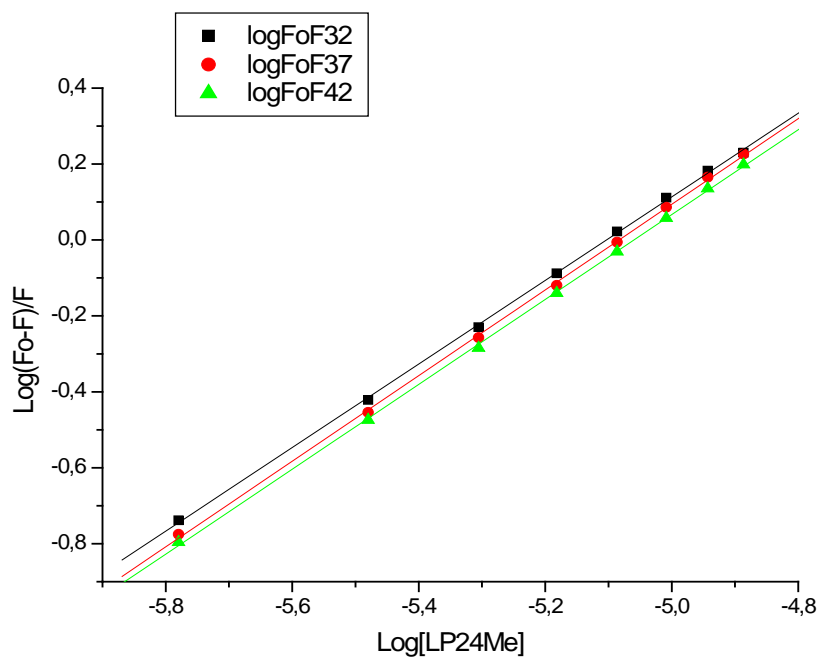


Figura 127 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP24Me.

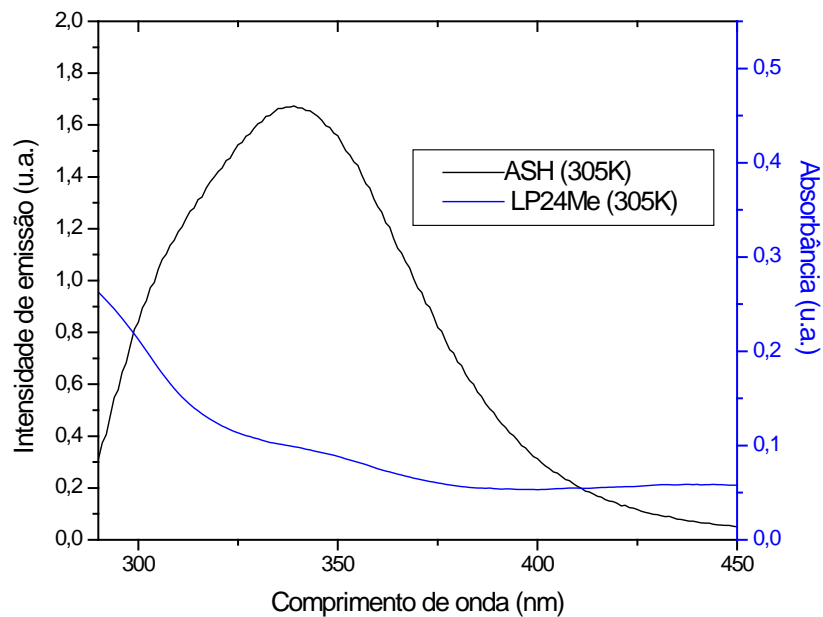


Figura 128 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP24Me, $C_{ASH} = C_{LP24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

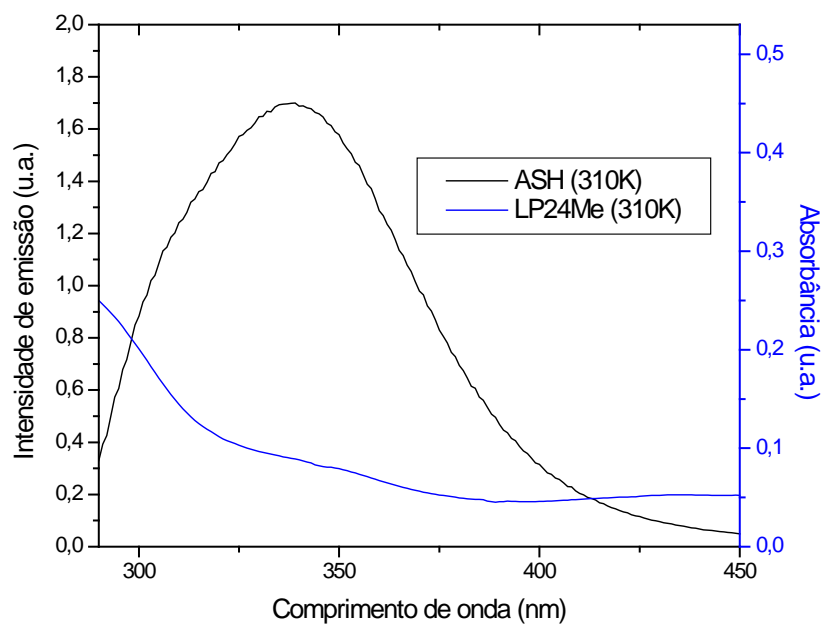


Figura 129 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP24Me, $C_{ASH} = C_{LP24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

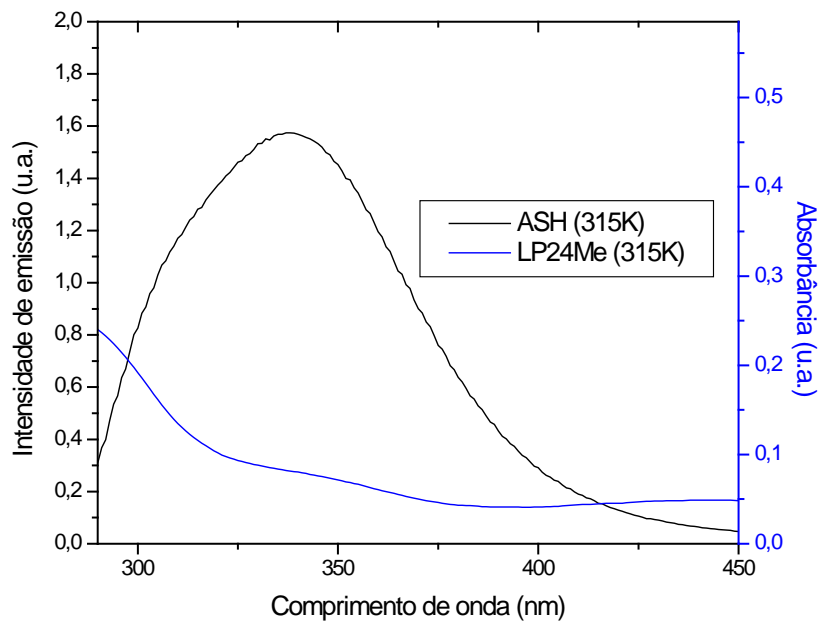


Figura 130 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP24Me, $C_{ASH} = C_{LP24Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

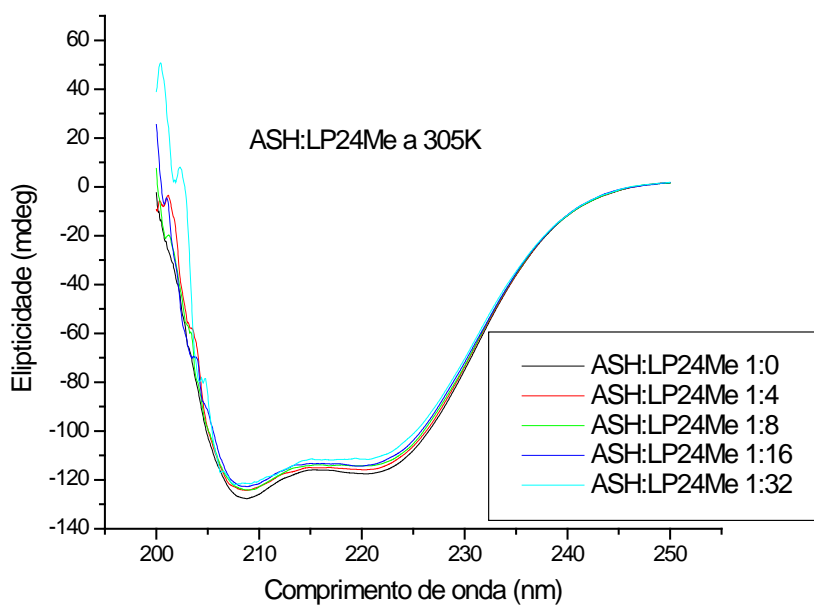


Figura 131 – Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em LP24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, mol/L, a $T = 305$ K.

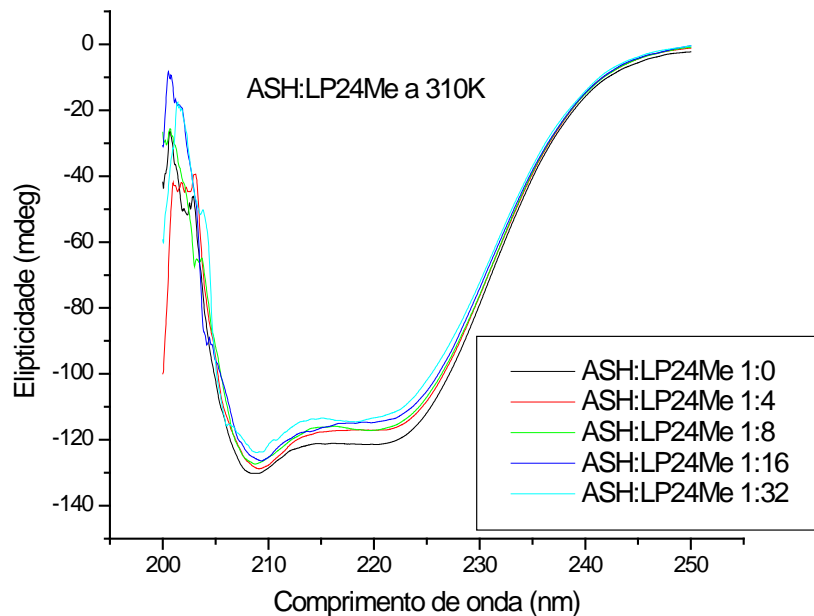


Figura 132 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

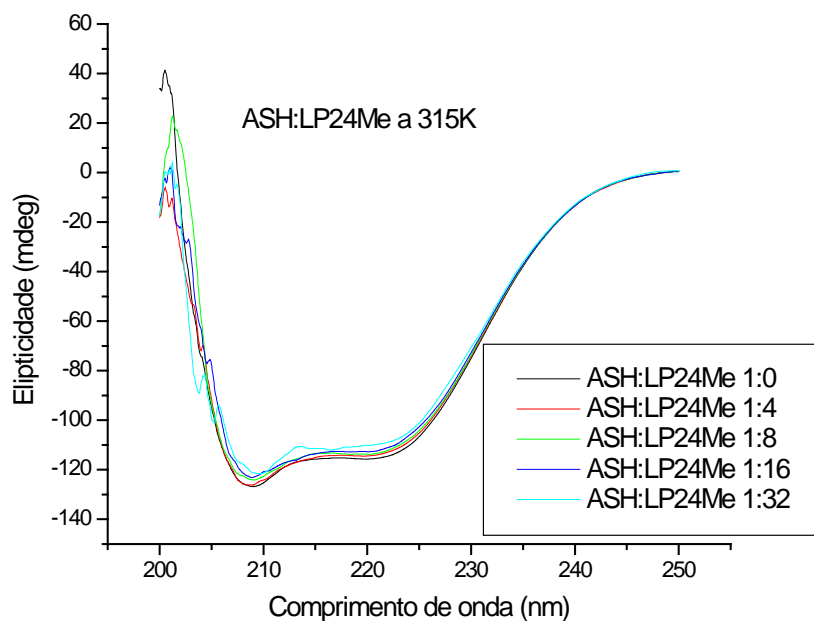


Figura 133 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP24Me, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP24Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP24Me} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K.

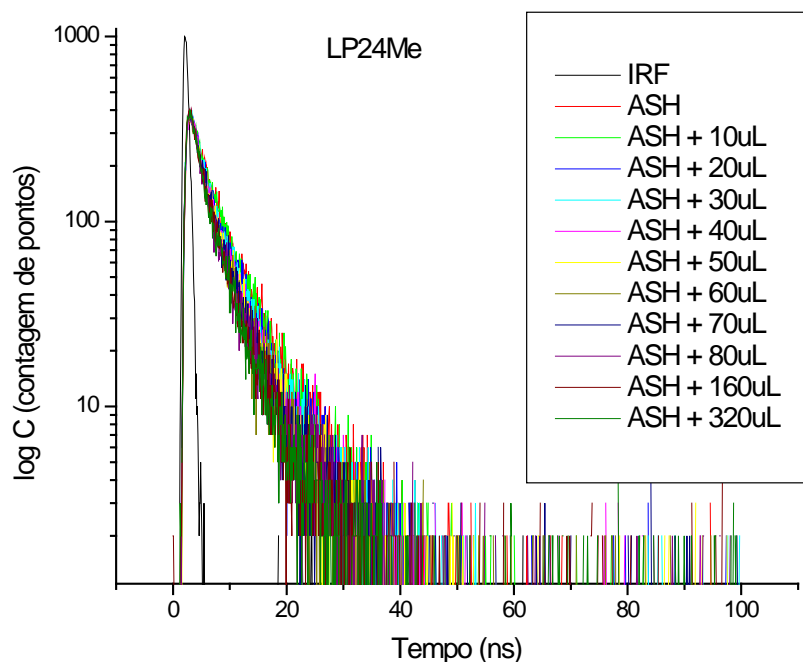


Figura 134 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$), para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LP24Me) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LP24Me} = 0; 0,56; 1,11; 1,65; 2,20; 2,74; 3,27; 3,81; 4,34; 8,46$ e $16,10$ ($\times 10^{-6} \text{ mol/L}$). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 24 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LP24Me ($C_{LP24Me} = 1,67 \times 10^{-4}$).

[LP24Me] 10^{-6} (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,62	6,70	0,525
0,56	2,45	6,24	0,585
1,11	2,46	6,17	0,600
1,65	2,22	6,10	0,564
2,20	1,90	5,68	0,547
2,74	2,18	5,88	0,534
3,27	1,97	5,62	0,593
3,81	2,33	5,66	0,613
4,34	2,04	5,99	0,588
8,46	2,27	5,42	0,569
16,10	1,81	4,98	0,607

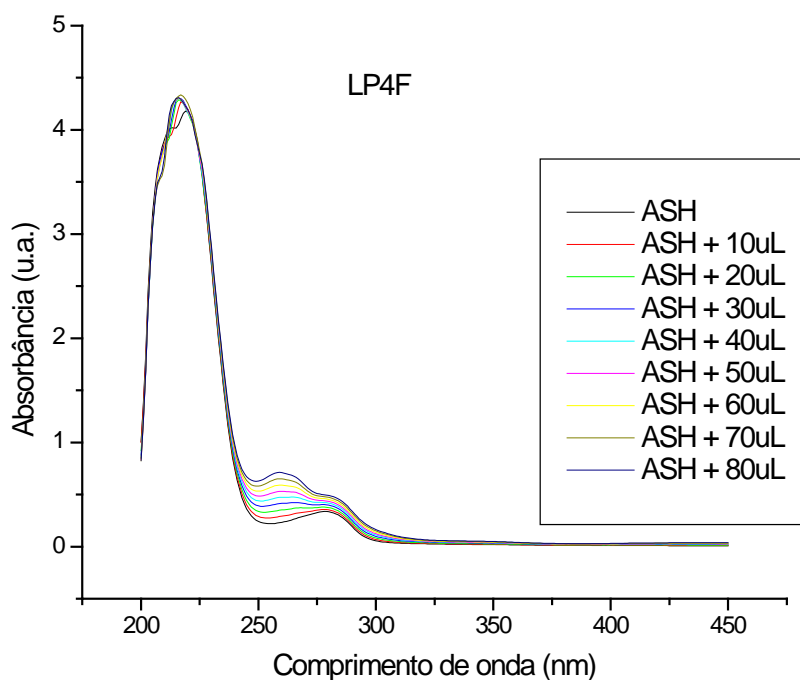


Figura 135 – Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28$ e $2,60 (x 10^{-5})$ mol/L.

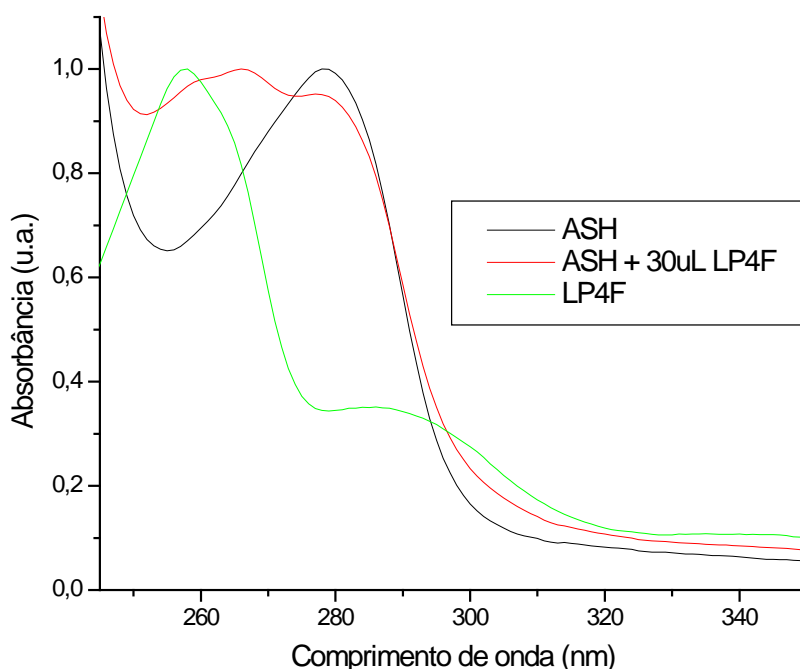


Figura 136 – Espectros de absorção no UV-Vis normalizados para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, ASH na presença da 1,2-naftoquinona(LP4F) $C_{LP4F} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L e da 1,2-naftoquinona LP4F em PBS, $C_{LP4F} = 0,99 \times 10^{-5}$ mol/L.

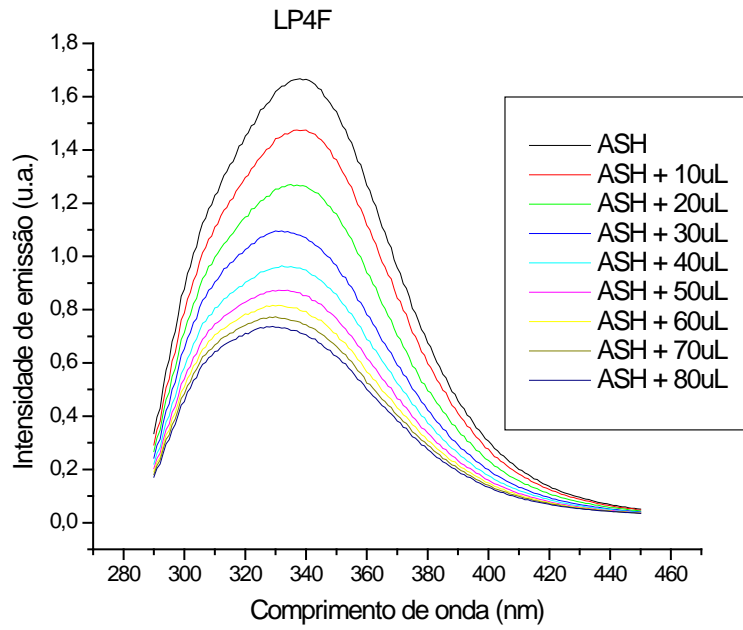


Figura 137 – Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) em LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LP4F} = 0$; 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,64; 1,96; 2,28 e 2,60 ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310 \text{ K}$.

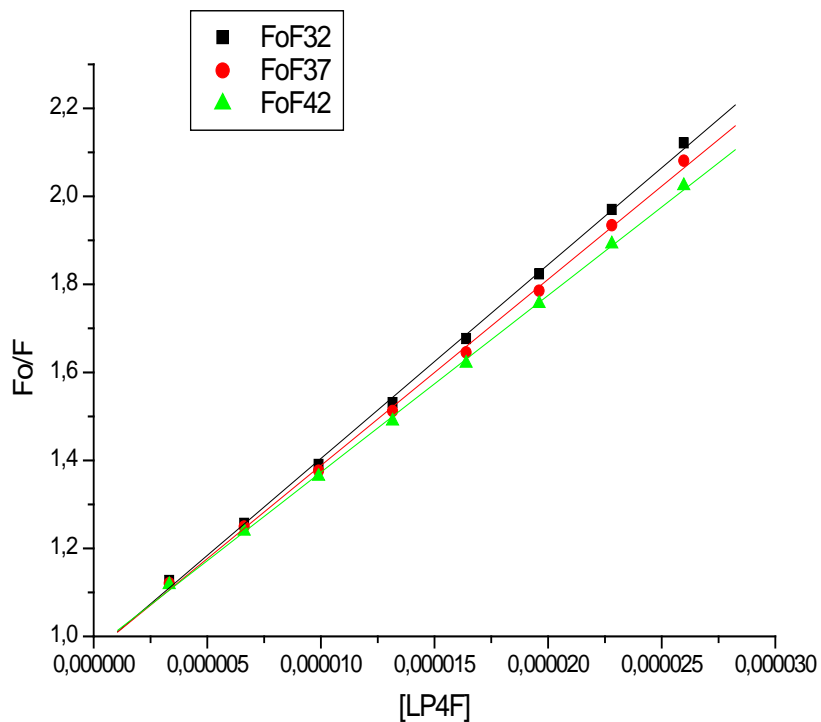


Figura 138 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP4F.

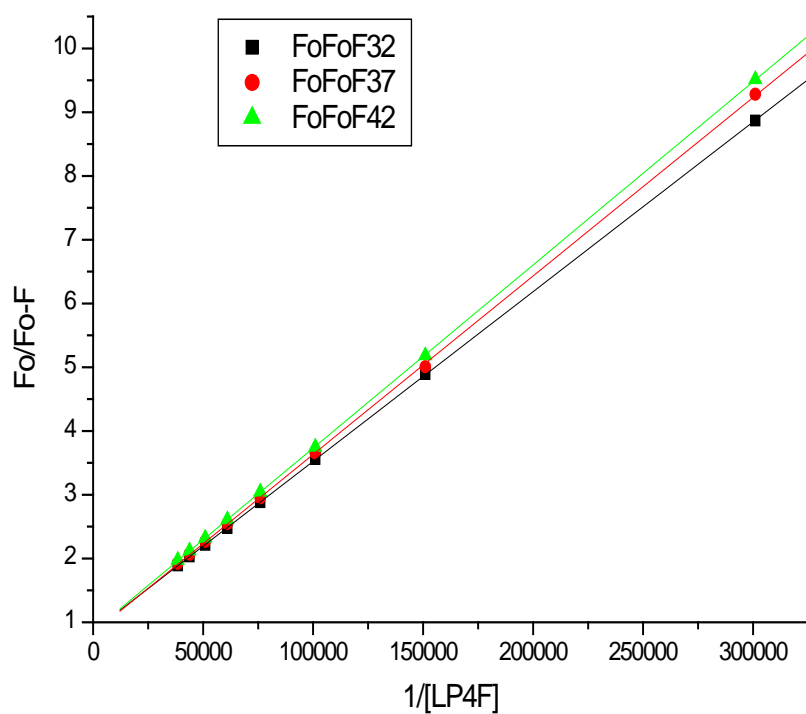


Figura 139 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP4F.

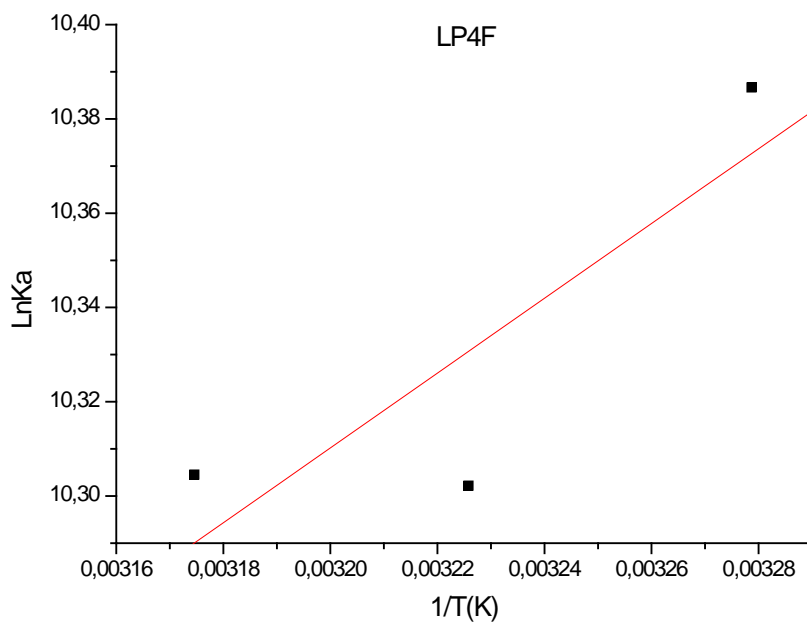


Figura 140 – Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela LP4F.

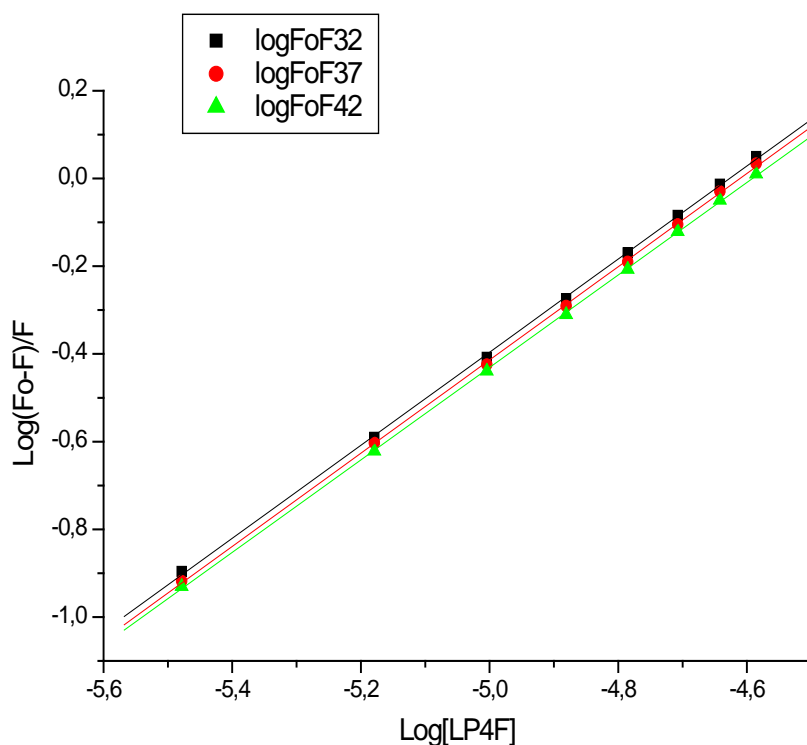


Figura 141 – Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela LP4F.

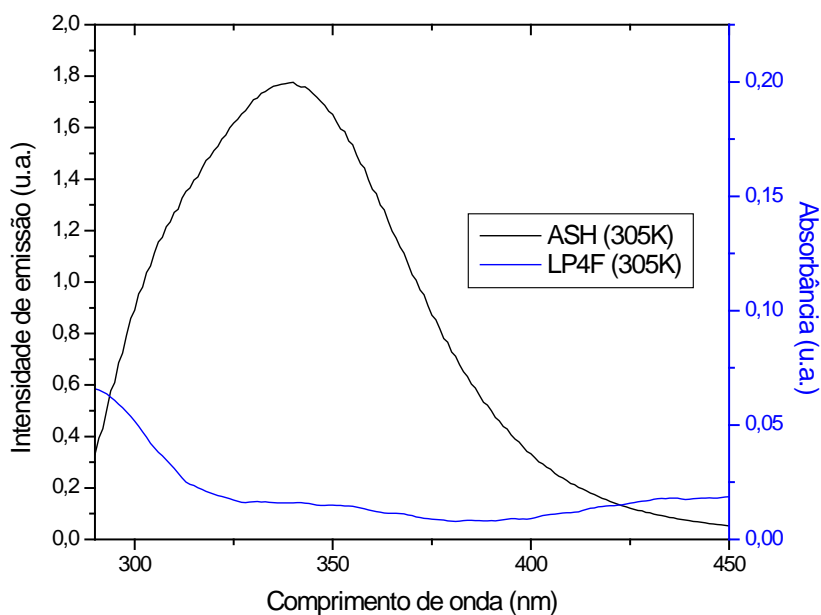


Figura 142 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da LP4F, $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

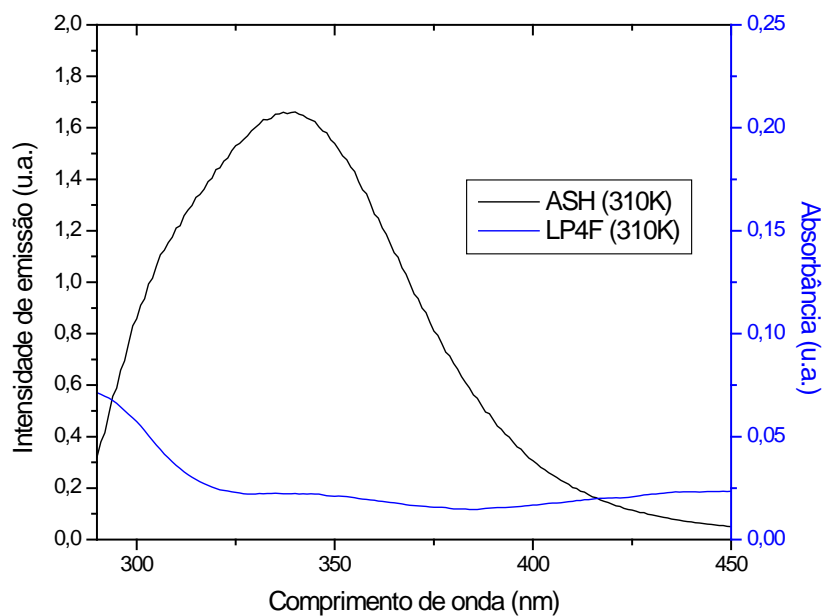


Figura 143 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4F, $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

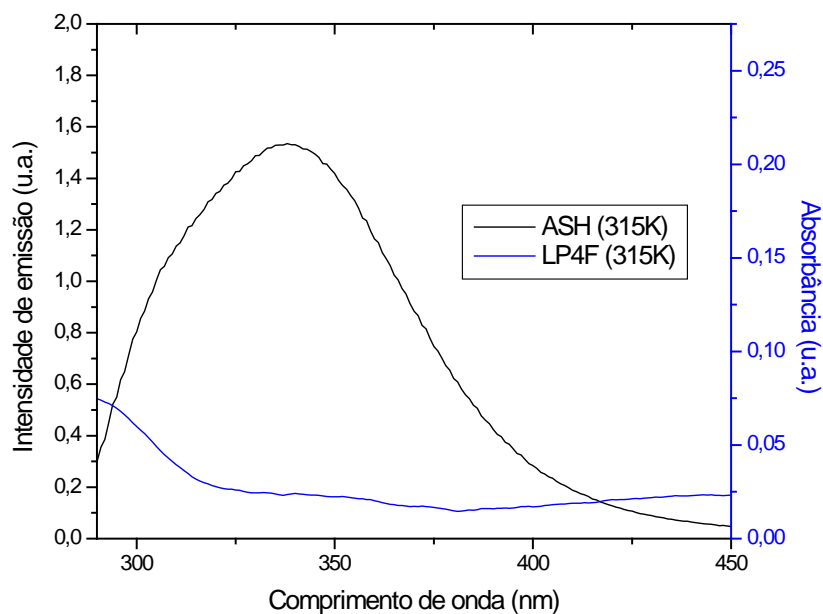


Figura 144 – Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da LP4F, $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

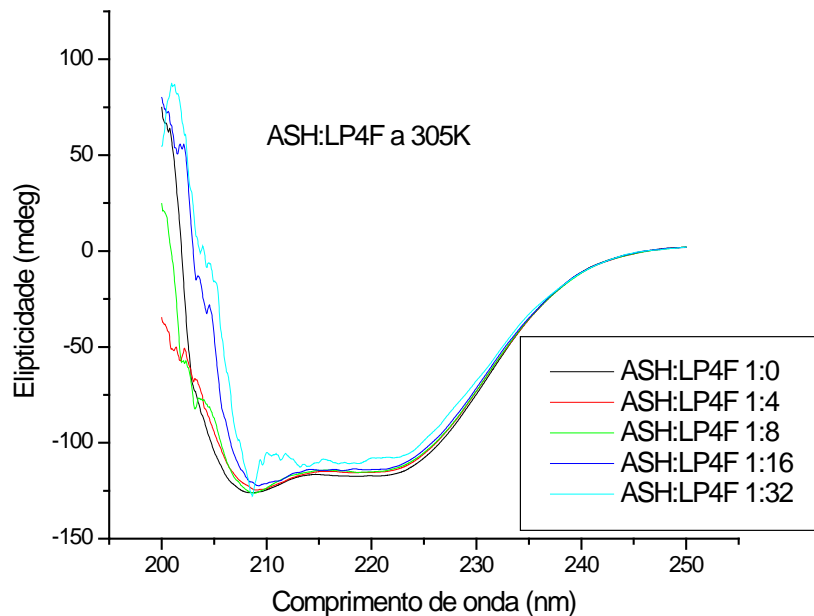


Figura 145 – Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em LP4F, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, mol/L, a $T = 305$ K.

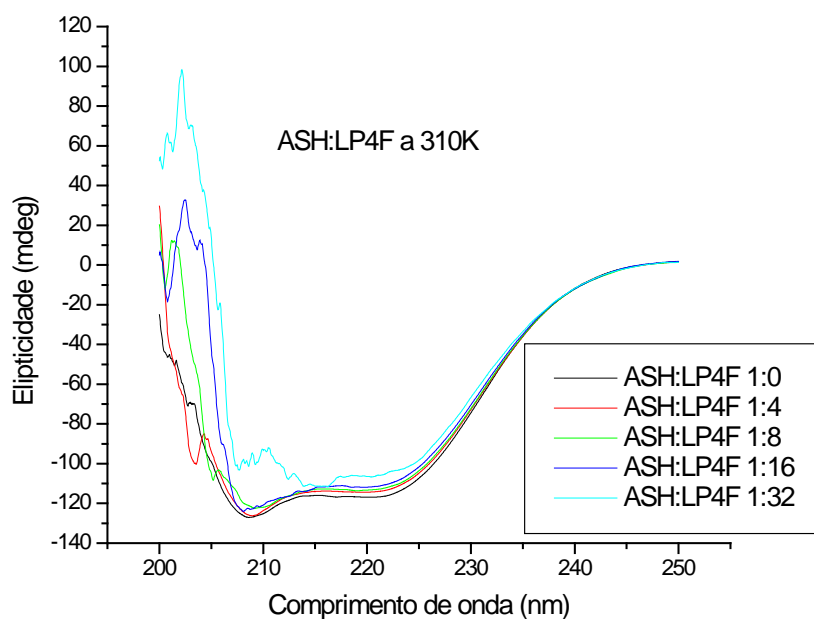


Figura 146 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4F, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

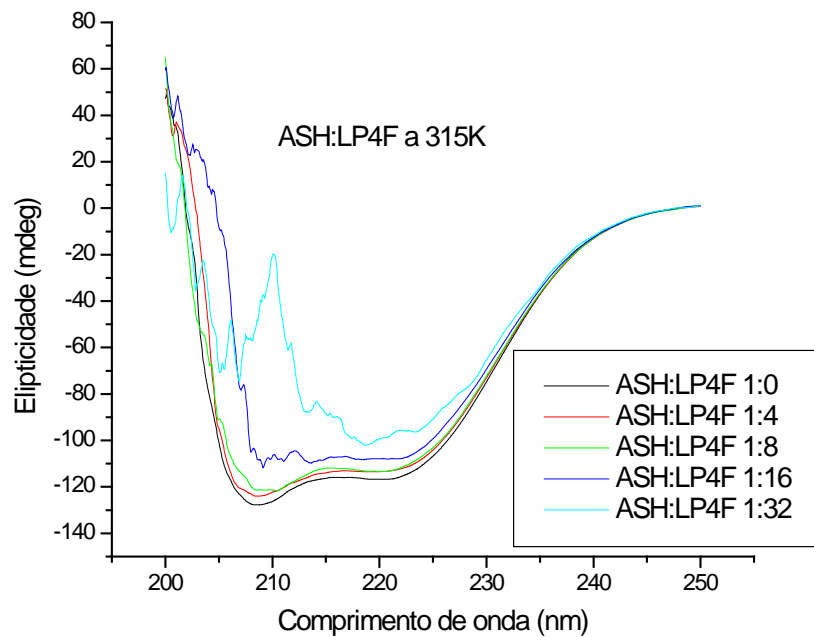


Figura 147 – Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em LP4F, nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

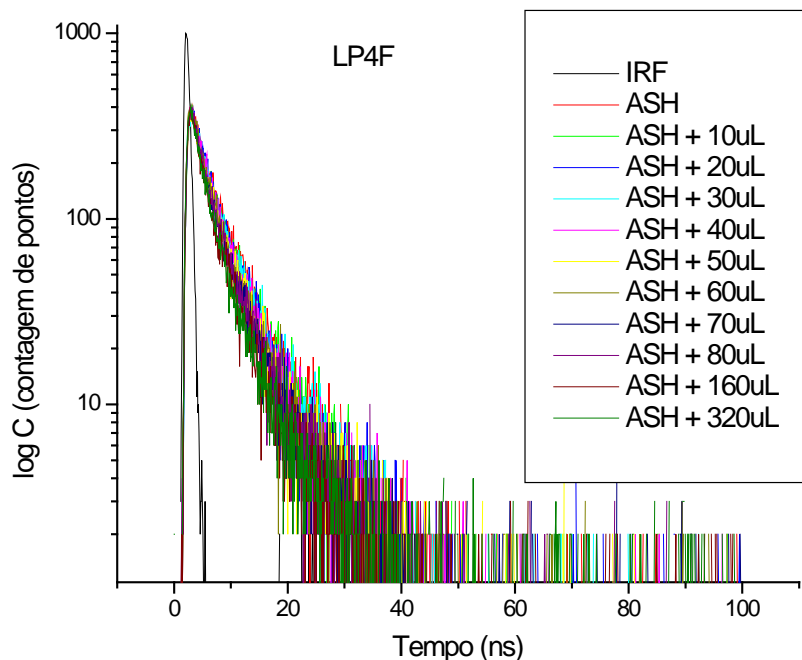


Figura 148 – Decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de 1,2-naftoquinona (LP4F) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 3,24; 6,45; 9,64; 12,80; 16,00; 19,10; 22,20; 25,30; 49,30; 93,90$ ($\times 10^{-6}$) mol/L). O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 25 – Valores de tempo de vida τ_1 e τ_2 (em ns) para ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L), com a adição de alíquotas da 1,2-naftoquinona LP4F ($C_{LP4F} = 9,74 \times 10^{-4}$).

[LP4F] 10^{-6} (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0	2,52	6,14	0,637
3,24	-	-	-
6,45	2,57	6,20	0,600
9,64	-	-	-
12,80	2,95	6,68	0,658
16,00	2,46	6,31	0,668
19,10	-	-	-
22,20	-	-	-
25,30	2,19	5,93	0,616
49,30	2,32	6,03	0,608
93,90	2,32	6,15	0,603

Tabela 26 – MRE calculado em nm e em nm para ASH (pH = 7,4) em derivados de 1,2-naftoquinonas (LP4Me, LP24Me, LP4F, LF, LF4Me, LF24Me, LF4Cl e LF4Br), T = 305 K, 310 K e 315 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LPs, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LFs} = 0; 3,98; 7,94; 15,75$ e $31,01 (x 10^{-6})$ mol/L.

T (K)		θ_{208} (mdeg)	$MRE_{208} 10^4$ (deg.cm ² /dmol)	θ_{222} (mdeg)	$MRE_{222} 10^4$ (deg.cm ² /dmol)	
LF	305	1:0	-129,79	-2,22	-117,85	-2,01
		1:4	-125,31	-2,14	-116,44	-1,99
		1:8	-124,96	-2,14	-115,46	-1,97
		1:16	-124,94	-2,14	-114,58	-1,96
		1:32	-124,99	-2,14	-112,22	-1,92
	310	1:0	-126,61	-2,16	-117,54	-2,01
		1:4	-124,74	-2,13	-115,86	-1,98
		1:8	-122,14	-2,09	-114,85	-1,96
		1:16	-124,67	-2,13	-113,56	-1,94
		1:32	-121,62	-2,08	-111,48	-1,91
	315	1:0	-127,45	-2,19	-116,28	-2,00
		1:4	-123,12	-2,12	-112,38	-1,93
		1:8	-121,80	-2,09	-111,70	-1,92
		1:16	-121,79	-2,09	-110,89	-1,91
		1:32	-119,79	-2,06	-108,76	-1,87
LF4Cl	305	1:0	-123,04	-2,10	-117,25	-2,00
		1:4	-124,58	-2,13	-117,25	-2,00
		1:8	-120,80	-2,06	-116,10	-1,98
		1:16	-121,25	-2,07	-114,70	-1,96
		1:32	-129,18	-2,21	-112,91	-1,93
	310	1:0	-116,44	-1,99	-108,61	-1,86
		1:4	-114,57	-1,96	-107,29	-1,83
		1:8	-113,74	-1,94	-106,46	-1,82
		1:16	-114,62	-1,96	-105,88	-1,81
		1:32	-115,44	-1,97	-103,75	-1,77
	315	1:0	-119,86	-2,05	-111,11	-1,90
		1:4	-117,38	-2,01	-108,27	-1,85
		1:8	-120,10	-2,05	-107,43	-1,84
		1:16	-117,89	-2,02	-106,33	-1,82
		1:32	-112,29	-1,92	-104,05	-1,78

Continua

Tabela 26 – Continuação

		1:0	-122,54	-2,09	-114,70	-1,96
		1:4	-122,59	-2,10	-113,52	-1,94
	305	1:8	-120,87	-2,07	-112,51	-1,92
		1:16	-121,68	-2,08	-112,15	-1,92
		1:32	-120,50	-2,06	-110,69	-1,89
		1:0	-122,09	-2,09	-112,95	-1,93
		1:4	-120,25	-2,06	-111,88	-1,91
LF4Br	310	1:8	-119,53	-2,04	-110,67	-1,89
		1:16	-118,95	-2,03	-109,88	-1,88
		1:32	-116,72	-2,00	-108,16	-1,85
		1:0	-124,34	-2,13	-113,38	-1,94
		1:4	-121,86	-2,08	-111,69	-1,91
	315	1:8	-120,61	-2,06	-110,93	-1,90
		1:16	-119,45	-2,04	-109,63	-1,87
		1:32	-119,96	-2,05	-108,31	-1,85
		1:0	-125,24	-2,14	-115,77	-1,98
		1:4	-124,23	-2,12	-114,97	-1,97
	305	1:8	-122,51	-2,09	-113,82	-1,95
		1:16	-121,97	-2,08	-113,02	-1,93
		1:32	-121,58	-2,08	-110,06	-1,88
		1:0	-125,80	-2,15	-114,39	-1,96
		1:4	-123,47	-2,11	-113,22	-1,94
LF4Me	310	1:8	-123,44	-2,11	-112,53	-1,92
		1:16	-121,57	-2,08	-110,94	-1,90
		1:32	-114,12	-1,95	-107,64	-1,84
		1:0	-126,88	-2,17	-115,51	-1,97
		1:4	-126,41	-2,16	-114,69	-1,96
	315	1:8	-125,91	-2,15	-113,73	-1,94
		1:16	-124,54	-2,13	-112,49	-1,92
		1:32	-122,68	-2,10	-109,98	-1,88

Continua

Tabela 26 – Continuação

		1:0	-126,98	-2,17	-116,36	-1,99
		1:4	-123,68	-2,11	-114,92	-1,96
	305	1:8	-123,54	-2,11	-114,62	-1,96
		1:16	-124,27	-2,12	-113,37	-1,94
		1:32	-121,27	-2,07	-111,39	-1,90
		1:0	-126,34	-2,16	-116,60	-1,99
		1:4	-125,44	-2,14	-113,96	-1,95
LF24Me	310	1:8	-123,33	-2,11	-113,28	-1,94
		1:16	-121,30	-2,07	-112,46	-1,92
		1:32	-120,82	-2,07	-109,30	-1,87
		1:0	-125,58	-2,15	-116,38	-1,99
		1:4	-121,74	-2,08	-112,31	-1,92
	315	1:8	-122,84	-2,10	-111,76	-1,91
		1:16	-120,58	-2,06	-109,99	-1,88
		1:32	-119,32	-2,04	-108,74	-1,86
		1:0	-127,00	-2,17	-117,00	-2,00
		1:4	-124,00	-2,12	-114,00	-1,95
	305	1:8	-123,00	-2,10	-113,00	-1,93
		1:16	-113,00	-1,92	-111,00	-1,90
		1:32	-64,00	-1,09	-95,00	-1,62
		1:0	-125,77	-2,15	-115,81	-1,98
		1:4	-125,33	-2,14	-112,70	-1,93
LP4Me	310	1:8	-118,95	-2,03	-112,33	-1,92
		1:16	-113,15	-1,93	-110,73	-1,89
		1:32	-73,27	-1,25	-101,81	-1,74
		1:0	-127,04	-2,17	-115,64	-1,98
		1:4	-120,92	-2,07	-112,51	-1,92
	315	1:8	-120,96	-2,07	-110,73	-1,89
		1:16	-119,07	-2,04	-108,79	-1,86
		1:32	-88,70	-1,52	-103,11	-1,76

Continua

Tabela 26 – Continuação

		1:0	-127,00	-2,17	-116,00	-1,99
		1:4	-124,00	-2,11	-115,00	-1,96
	305	1:8	-123,00	-2,11	-113,97	-1,95
		1:16	-122,00	-2,09	-112,47	-1,92
		1:32	-121,56	-2,08	-109,97	-1,88
		1:0	-129,64	-2,22	-120,32	-2,06
		1:4	-126,54	-2,16	-116,33	-1,99
LP24Me	310	1:8	-126,11	-2,16	-115,61	-1,98
		1:16	-123,74	-2,12	-113,49	-1,94
		1:32	-121,49	-2,08	-111,52	-1,91
		1:0	-125,47	-2,14	-114,48	-1,96
		1:4	-125,68	-2,15	-112,84	-1,93
	315	1:8	-122,42	-2,09	-112,16	-1,92
		1:16	-121,18	-2,07	-111,01	-1,90
		1:32	-117,62	-2,01	-108,88	-1,86
		1:0	-126,00	-2,15	-116,00	-1,99
		1:4	-122,00	-2,08	-114,00	-1,96
	305	1:8	-124,00	-2,12	-113,72	-1,94
		1:16	-117,00	-2,01	-112,85	-1,93
		1:32	-113,36	-1,94	-107,84	-1,84
		1:0	-125,84	-2,15	-116,05	-1,98
		1:4	-123,94	-2,12	-113,16	-1,93
LP4F	310	1:8	-119,37	-2,04	-111,86	-1,91
		1:16	-123,75	-2,12	-110,32	-1,89
		1:32	-98,82	-1,69	-104,46	-1,79
		1:0	-127,35	-2,18	-115,58	-1,98
		1:4	-123,02	-2,10	-112,16	-1,92
	315	1:8	-119,79	-2,05	-111,80	-1,91
		1:16	-105,08	-1,80	-107,83	-1,84
		1:32	-56,35	-0,963	-95,56	-1,63